

二阶导数光谱法测定蛋白质的含量

覃志坚

(右江民族医学院中心实验室)

摘要: 导数光谱是紫外可见分光光度法中用以排除干扰的一种技术。本文用日立220—A紫外可见分光光度计中测定了血清蛋白质的含量。通过实验得出的线性回归方程为 $D = 155.24c - 0.346$ ，相关系数 $r = 0.9998$ ，样本平均回收率为100.05%，精度试验 $\bar{d} = 0.077$ ， $S = 0.418$ ， $\bar{d}\bar{x} = 0.027$ ， $S\bar{x} = 0.148$ 。此法重现好，变异系数(CV) $< \pm 1\%$ ，此法简单，快速，可用于血清蛋白质的测定。

关键词: 导数光谱法，蛋白质

导数分光光度法〔1〕是将导数光谱应用于分光光度法而得名。过去采用紫外零阶光谱(原光谱)法测定血清蛋白质，常因血清的其它成分干扰而影响测定结果。本文根据导数光谱法可消除某些干扰这一特点〔2〕，用二阶导数光谱法测定血清中蛋白质的含量。结果报告如下。

一、材料与方 法

一、仪器：日立—220A型双光束可见紫外分光光度计。

试剂：蛋白质标准溶液(mg/ml)，用0.9%NaCl配制。

血清样品：附院门诊正常血清。吸取0.1ml血清直接置于100ml容量瓶中，用0.9%NaCl溶液稀释至刻度。

二、二阶导数光谱测定实验

1.测试条件：取蛋白质标准液在340~255nm中以不同操作条件做二阶导数光谱测试，经比较选择下列噪音小，稳定性好的测试条件。方式：ABS；狭缝宽度：2.nm；响应时间：2秒；纵坐标刻度： ± 0.05 ；导数阶数：2；微分宽度：2；扫描速度：120nm/min；纸速：40nm/cm。

2.血清蛋白质光谱：将稀释好的血清样品1ml加0.9%NaCl 3ml，混合后，以0.9%NaCl为空白，分别在340~255nm之内绘制紫外零阶光谱和二阶导数光谱(图1,2)。从图1看出血清蛋白的紫外零阶光谱比二阶导数光谱的峰明显宽些，证明零阶光谱受到背景吸收的影响和其它成分的干扰。而二阶导数光谱峰尖而高，分辨率也较高。本实验选择反映蛋白质特征的290与280nm为测试波长，以此二波长的峰谷间振幅值D来作定量信息〔3〕。

RESPONSE:2SEC

SLIT : 2.0NM
 SCALE : 1.00
 : 0.00
 MODE : ABS
 SCAN SPEED
 : 120NM/MIN
 CHART FORMAT
 : 40NM/CM

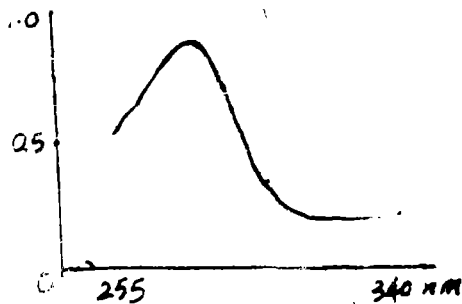


图1 蛋白质紫外零阶光谱

RESPONSE: 2SEC
 SLIT : 2.0NM
 SCALE : 0.05
 : -0.05
 MODE : ABS
 DERIVATIVE
 : DRDER 2
 : DELTA 2
 SCAN SPEED
 : 120NM/MIN
 CHART FORMAT
 : 40NM/CM

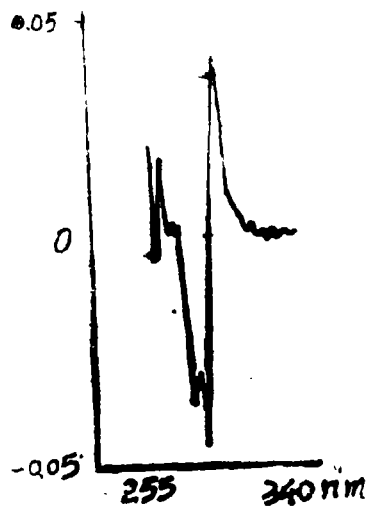


图2 蛋白质紫外二阶导数光谱

3. 蛋白质标准曲线的制备

(1) 标准溶液的配制: 准确吸取不同体积的蛋白质标准液, 用0.9% NaCl稀释成每毫升含有蛋白质0.125, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, 0.750mg的浓度待检测。

(2) 标准曲线的绘制:

测标准系列溶液的二阶导数光谱, 量取290与280nm两极值间的振幅D (以mm计), 绘制标准曲线 (见图3), 可见D值与浓度C成线性关系 (见表1)。用最小二乘法处理得回归方程为: $D = 155.24C - 0.346$ 。相关系数 $r = 0.9998$, 式中D为二阶导数振幅 (mm), C为蛋白质浓度 (mg/ml)。

4. 血清样品的测量

取9份血清样品, 分别用二阶导数光谱法测定其D值, 通过标准曲线或代入回归方程得出样品中蛋白质的含量。结果9份样中, 最大值为0.079mg/ml, 最小值为0.076mg/ml, $\bar{X} = 0.078$, $S = 0.00015$, $CV = 0.19\%$ 。

二、回收率试验

将不同量的蛋白质标准液加入到0.1ml血清样品中, 测定D值, 取D均值, 求出浓度, 计算回收率, 见表2。

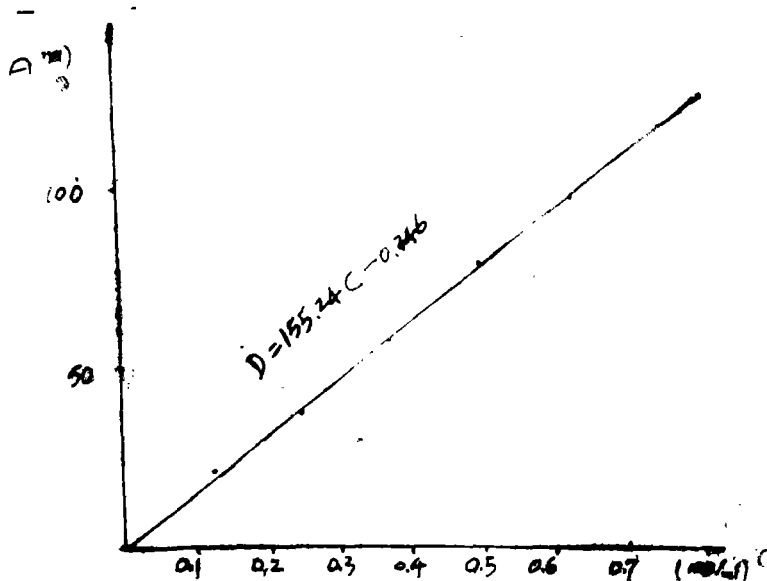


图3 蛋白质紫外二阶导数光谱标准曲线

表1 蛋白质浓度 C 与振幅 D 值的关系
(relative of the concentration (C) and amplitude (D) of protein)

C (mg/ml)	D (mm)				\bar{X}	S	CV%
	1	2	3	4			
0.125	20.08	20.11	20.12	20.09	20.10	0.018	0.090
0.250	37.14	37.16	37.15	37.13	37.15	0.013	0.035
0.375	57.92	57.90	57.88	57.92	57.91	0.019	0.033
0.500	77.21	77.19	77.22	77.18	77.20	0.018	0.023
0.625	96.76	96.74	96.73	96.74	96.74	0.013	0.013
0.750	116.32	116.33	116.34	116.30	116.32	0.017	0.015

\bar{X} (均数)、S (标准差)、CV (变异系数)

表2 回收率试验 (test of recovery ratio)

样品	实际浓度 (mg/ml)	测得浓度 (mg/ml)	回收率 (%)
血	0.1	0.103	103.00
	0.2	0.195	97.50
	0.3	0.294	98.00
清	0.4	0.399	99.75
	0.5	0.510	102.00

平均回收率为100.05%

S=2.41

CV=2.41%

三、精度试验

用同一份样品在同一条件下和同一分析室,在不同时间内分别进行8次测定,计算出平均偏差(\bar{d}) = 0.077,标准偏差(S) = 0.418,平均值的平均偏差($\bar{d}_{\bar{x}}$) = 0.027,平均值的标准偏差($S_{\bar{x}}$) = 0.148。

实验表明,本法工作曲线线性良好,测量重现性好,精度试验良好,回收率满意。可用于血清蛋白质样品的测定。

参 考 文 献

- [1] French, A.T. et al: Appl Spectroc. P: 78.1955
- [2] O' Haver Tc, et al: Anal Chem 18(23): 312, 1976
- [3] 刘布鸣等: 分析测试通报. 6(1):27:1987

DETERMINATION OF SERUM PROTEIN
BY ULTRAVIOLET SECONDARY
DERIVATIVE SPECTROSCOPY

Qin Zhijian

(A Central Laboratory of a National Medical College of the youjiang Guangxi,
Borse)

ABSTRACT

The derivative Spectrometry is a technique for eliminating the interference in ultraviolet-visible spectra. This paper deals with the determination of content of protein by the second derivation spectrometry with uv-220-A spectrophotometer. under the Experimental condition the linear equation $D = 155.24c - 0.346$, the correlation coefficient $r = 0.9998$, the average recovery ratio of sample is 100.05% in serum. The precise test $\bar{d} = 0.077$, $S = 0.418$, $\bar{d}_x = 0.027$, $S_x = 0.148$. the repeatatability is good and relative deviation is less than $\pm 1\%$, the method is simple and rapid. the method can be used in the determination of content of protein in serum.

Key words: Derivative spectrometry, Protein.