

馬騾血液胆硷酯酶活性的測定

吉林农业大学軍事兽医系

血液胆硷酯酶活性的改变为诊断有机磷化合物中毒动物的重要依据。有机磷化合物是抗胆硷酯酶类物质，它对胆硷酯酶具有不可逆性的抑制作用。因而有机磷化合物中毒动物，呈现胆硷能神經机能亢进的症狀。虽然存在于血液及神經系統的胆硷酯酶的关系，尚未明确，但是实验証明(1)，二者之間平行的变化，此种现象提供了血液诊断的基础。

医学文献記載：(2)(3)于某些疾病时。血液胆硷酯酶的活性值亦有改变。由此可知，血液胆硷酯酶的活性值，不仅对有机磷化合物中毒，而且对临床某些疾病的诊断，亦将具有重要意义。

关于大家畜血液胆硷酯酶的活性值，在文献上很少报导，Recliff氏(4)及Petty(5)氏曾測定牛及羊的紅血球胆硷酯酶的活性，岡部及三浦氏(6)对馬的血清胆硷酯酶活性进行过研究。此外在日語國內外之文献上，难以找到有关这方面的資料。

以微量全血进行的有机磷化合物中毒动物的快速诊断法(見作者另文)除了血清胆硷酯酶活性外，对紅血球胆硷酯酶的活性亦有一定联系。后者促使我們对馬騾紅血球胆硷酯酶活性进行測定試驗。胆硷酯酶活性的測定法很多：生物学測定法，(6)化学滴定法，(2)檢压計法，pH測定法(7)及光电比色法(4)(8)。我們选用光电比色法的原因，在于这种方法既比较准确而又能为一般实验室的条件所接受。为了成功地測定馬騾紅血球胆硷酯酶的活性值，我們將Petty氏法稍加变更。試驗的过程与結果綜述如下，仅可供作有关同志的参考。不当之处，倘希指正。

一、試驗材料及方法

82匹馬及132匹騾的血液材料，采自某部的晚用馬騾。每10Ml的頸靜脉血中，加入23%枸橼酸鈉0.3m反复旋轉10—15次。試驗証明；枸橼酸鈉的应用濃度对酶的活性沒有明显的影响。每个血液样品，离心分离15分(1500轉1分)用生理鹽水洗一次，最后制成50%紅血球生理鹽水浮游液。紅血球胆硷酯酶活性的測定是在采血后四天內完成的。在此期間內，血液样品貯存于冰箱內。

試劑：

(1) 磷酸緩液：0.134M，pH7.2；取3份(容积) Na_2HPO_4 23.5g/l 的溶液及1份 KH_2PO_4 82g/l 溶液混合，其pH 适为7.2。無論緩冲液或貯存液，在不用时一定要貯存于冰箱內。

(2) 醋酸緩冲液：0.001M，pH4.5；取42ml 0.2N 醋酸鈉(27.22g/l) 与 85ml 0.2N 醋酸(11.3m l/l) 混合。此溶液在不用时貯存于冰箱內。

(3) 乙醯胆硷溶液 0.05M；秤取0.7266g 氯化乙醯胆硷(Merck 品) 加(2)之醋酸緩冲液中，使成 100ml，不用时貯存于冰箱內，經過三周后不能使用。

(4) 乙醯胆硷溶液，0.005M，取1份(3)液与9份(1)液混合，按当日需要量进行稀釋。

(5) 鹽酸羟胺(Hydroxylamin hydrochloride) 2M；取 27.8g 鹽酸羟胺溶于 100ml 水中，使成 200ml，不用时貯存于冰箱內，过两周后不能使用。

(6) 氫氧化鈉溶液，35M；以 28g 氫氧化鈉，溶于蒸餾水使成 200ml。

(7) 硷性鹽酸羟胺，混合等容积的(5)与(6)液，此溶液須在应用直前，按需要量混合，超过 30分鐘后，不能使用。

- (8) 鹽酸：比重为 1.18 的濃鹽酸 2 容积与蒸餾水 1 容积混合。
- (9) 0.1N 鹽酸；即每公升中含有 8.31m (8) 之濃鹽酸。
- (10) 氯化高鉄 0.37M；取 10g 氯化高鉄 (FeCl₃·6H₂O) 用 (9) 液稀釋成 100ml。
- (11) 0.01% 皂苷 (Saponin) 溶液，在每公升蒸餾水中含 0.1g 皂苷。
- (12) 氯化鈉等滲溶液；在每公升蒸餾水中，含 9g 氯化鈉。

器材准备：有刻度离心分离管，0.2—5ml 吸管，水浴箱及光电比色計。

乙醯胆硷与氯化高鉄在一定条件下的显色反应是用光电比色法测定胆硷酯酶活性的化学基础。我们的操作法是分兩段进行的，首先作成 50% 血球生理鹽水浮游液，然后，进行生化学与化学反应及光电比色。在第二阶段的操作必須連續进行，不能中断。

首先吸取 0.2ml 50% 血球浮游液放入試管中，以吸管加入 1.8ml 皂苷溶液，使其溶血。取 1ml 溶血的血球液，放入試管中，然后取 2ml 乙醯胆硷溶液 (pH 7.2) 放入試驗管及对照管各 1ml。將 2 者同时放入 58°C 水浴箱中，15 分鐘后取出。各加入 4ml 硷性鹽酸羟胺溶液。然后，向对照管加入 1ml 溶血的血球液。接着立即加入 2ml 濃鹽酸及 2ml 氯化高鉄溶液。加入每种試剂之后均应彻底振搖，以定性濾紙濾出管中的浮游物。管中溶液的顏色决定于乙醯胆硷剩余量。根据我們的試驗証明：酶作用基質——乙醯胆硷的濃度，以 0.005M/ml 为最适宜。在試驗条件下，此濃度足够胆硷酯酶活性的作用，而且亦适于光电比色計刻度上的灵敏范围。水浴的时间对酶的活性亦有很大影响，我們試驗証明：以水浴 15 分鐘为适宜。倘若时间太長，由于基質被利用尽，难以测出个体間活性值的差異。

濾在管中的比色液，即时用七一型光电比色計进行比色測定，选用光电比色計的最小試杯，濾光片为 500m μ 。

胆硷酯酶在一定条件下促进乙醯胆硷的分解，产生乙酸与胆硷。用本法測得之胆硷酯酶的活性，以被紅血球胆硷酯酶所利用的乙醯胆硷的微克分子 (μ M) 濃度表示之，其計算法如下：

被紅血球胆硷酯酶所利用

$$\text{之乙醯胆硷的 } \mu\text{M} = 5(1 - \frac{A}{B})$$

A……試驗样品的消光度

B……对样品消光度。

二、結果与討論

82 匹馬与 123 匹騾紅血球胆硷酯酶的活性，測得結果如下：

畜 別	匹 数	平 約 值	最 大 值	最 小 值	标 准 差	平均值 ± 标准差	备 考
馬	82	1.20	2.54	0.57	0.32	0.88—1.52	
騾	123	1.65	2.22	0.8	0.33	1.32—1.98	

由上表可以看出，騾的紅血球胆硷酯酶的活性比馬高 0.45，原因可能是由于种屬的差異，由于材料所限，馬的測定匹数小于騾三分之一。唯能最后肯定。

我們采用双管——試驗管与对照管同时进行的光电比色法，所以由各种因素的影响而造成的誤差不会太大。

本法不仅适于馬騾紅血球胆硷酯酶活性的測定，試驗証明：同样亦用来檢查馬騾血清胆硷酯酶的活性。当有机磷化合物中毒时，在症狀尚未明显表現之前，血清胆硷酯酶的活性达到 100% 的抑制，但此时紅血球胆硷酯酶尚保持一定的活性，后者的变化可以做为中毒程度的指針。这对毒理学的中毒指标方面有利用

价值。有机磷化合物在植保和医学方面的利用范围，将日趋广泛。如同国外文献报导一样，有机磷化合物中毒动物的诊断与治疗任务，一定会提到我国兽医工作者的面前。据文献记载：有机磷化合物中毒动物的尸体，在病理解剖学缺乏特征性的变状。本法对死后诊断亦会有所帮助。

由上表可知：马骡红血球胆碱酯酶活性的变动范围很大。这除了一般个体差异之外，对马骡个体健康状况及饲养管理条件，可能存在因果联系。马骡血液胆碱酯酶的活性与各种疾病的关系，未见有文献报导。在这方面是否存在有价值的资料，尚需进一步探讨。

三、結 論

1. 利用光电比色法成功地测定了马骡红血球胆碱酯酶的活性，酶的基质的浓度为 $0.005M$ ， $38^{\circ}C$ ，水溶15分钟。
2. 以光电比色法测定82匹马，其红血球胆碱酯酶活性的平均值 $1.20\mu M$ ，标准差为 0.32 。123匹骡红血球胆碱酯酶活性的平均值为 $1.65\mu M$ ，标准差为 0.33 。
3. 本法亦适于对马骡血清胆碱酯酶活性的测定。
在此试验过程中，本八、本九部分学员协助采血，在此附谢。

参 考 文 献

- (1) Radelff R.D. and Woodard G.T.; Cholinesterase activity of normal blood of cattle and sheep; Vet. med. 51, (1956), 512—514.
- (2) Балаховский С.Д.; Методы химического анализа крови, (1953), 634—637.
- (3) Vorhaus L.J. and Kark Я.М.; Serum cholinesterase in health and disease; Am. J. Med; 14 (1953) 707—719.
- (4) Petty C.S.; Cholinesterase activity of bovine blood; Amer. J. Vet. Res. 19; 73(1958) 836;
- (5) 小原甚三,石井进; 有机磷剂,毒性试验について; 日本兽医学会杂志; 7:7 (1954) 308°
- (6) 卡迪柯夫教授Б. И. 测定胆碱酯酶活性方法的管见; 家畜病理生理学通讯 2, (1958) 1
- 7.
- (7) Michel H.O.; An electrometric method for the determination of red blood cell — plasma cholinesterase activity; J. lab and clin. med 34; (1949) 1564—1568.
- (8) 张尙有; 关于比色计的构造与原理; 化学通报11; (1956) 9—13。

* 参加该项工作有吉林农业大学军事兽医系 赵即民 王振山 钟焕亭 叫迪华 刘镜镜