

酶比色法定量检测乳糜血标本 三酰甘油的研究

邓文成 张杰良 黄雪珍 莫和国 黄培坚

作者单位: 528415 广东中山, 南方医科大学附属小榄医院检验科

通讯作者: 黄雪珍, Email: 769137702@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.03.011

【摘要】 目的 探讨血清浊度指数与反应速率法前带检查(PC)技术对三酰甘油(TG)酶比色法定量测定中假性低值的识别和消除作用,以期提高乳糜血标本中的TG浓度测定值的准确性。**方法** 选取TG浓度为0.41 mmol/L的健康体检者低值血清标本(L)与浓度为27.54 mmol/L的急性胰腺炎患者高值乳糜血清标本(H)各1份,按照不同比例配制为21份系列稀释浓度样本;另外增量1.5倍与2倍高值样本(H)反应体积获得2份极高浓度值样本,共23份高低系列浓度样本。采用血清浊度指数与反应速率法PC技术对样本进行定量测定,计算系列样本理论浓度值,记录血清浊度指数值、反应过程吸光度(A)值和实测浓度值。**结果** 系列稀释浓度样本中,血清浊度指数与样本中的乳糜程度呈正相关,并且随着TG浓度的增加而增加;低浓度样本1~12无PC报警,理论值与实测值相关性良好($R^2=0.9993$),相对偏差较小;高浓度样本13~23,理论值与实测值相关性较差($R^2=0.8641$),相对偏差较大,理论值与实测值曲线呈明显的偏离现象;而样本17~23出现前带报警,检测结果呈明显假性低值。**结论** TG酶比色法检测高浓度样本(乳糜血)会出现明显的假性低值,应用血清浊度指数与反应速率法PC技术能够迅速有效地识别反应体系中的假性低值,并通过仪器自动稀释再检测功能正确测定样本浓度。

【关键词】 乳糜血; 三酰甘油; 血清浊度指数; 反应速率法; 前带检查技术

A study on using enzyme chromatometry quantitative method to detect triglyceride in chylemia specimen

Deng Wencheng, Zhang Jieliang, Huang Xuezheng, Mo Heguo, Huang Peijian. Department of Laboratory, Affiliated Xiaolan Hospital, Southern Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong, China

Corresponding author: Huang Xuezheng, Email: 769137702@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the application of serum turbidity (lipemia) index and reaction rate method prozone check (PC) technology to recognize and eliminate the "false low value" in quantitative detection of triglyceride (TG) in chylemia specimen by enzyme chromatometry method in order to elevate the accuracy of TG concentration measurement. **Methods** One of the 2 samples was collected from a healthy case [TG concentration 0.41 mmol/L, low serum concentration sample (L)] and another one, from a patient with acute pancreatitis [TG concentration 27.54 mmol/L, high chylemia serum sample (H)]. According to different dilution proportions, the samples were serially diluted into 21 samples different in concentrations; in addition, two extremely high level samples, 1.5 and 2 times in H volume, were prepared, resulting in totally 23 samples with a serial sequence from low to high TG concentrations. The serum turbidity (lipemia) index and reaction rate method PC technology were used to carry out quantitative determination; the theoretic concentration values of the serial samples were calculated, the serum turbidity index values, the absorbance (A) values in the reaction process and the actual measurement concentrations were recorded. **Results** In the serial diluted concentration samples, the serum turbidity (lipemia) index was positively correlated with the sample chyle content, and the index and chyle content was increased along with the increase of TG concentration; the prozone check alarm was not found in the low concentration samples (1-12), and the theoretical concentration values were well coincident with the actual measurement concentration values ($R^2 = 0.9993$), the bias being relatively low; in the high concentration samples (13-23), the correlation between theoretical value and actual measurement value was relatively poor ($R^2 = 0.8641$), and the theoretical and actual measurement curves presented obvious bias phenomena; while in samples 17-23, prozone check alarm appeared and the measurement results showed obvious false low value. **Conclusion** When enzyme chromatometry method is

used to detect triglyceride in high concentration samples (chylemia), false low value of TG often appears; the application of serum turbidity (lipemia) index and reaction rate method prozone check technology can quickly and effectively recognize the false low value in the reaction process, and via the instrument automatic dilution and once more the function tested, the sample concentration was accurately determined.

【Key words】 Chylemia; Triglyceride; Serum turbidity index; Reaction rate method; Prozone check technology

三酰甘油(triglyceride, TG)是一项重要的临床血脂常规检测指标,在动脉粥样硬化、糖尿病、脂肪肝与肾病综合征等疾病的监测中都有重要意义^[1]。血清 TG 测定方法一般可分为化学法、酶比色法和色谱法三大类,国内临床实验室大多数采用酶比色法,即甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法(GPO-PAP),该方法具有简便快速、微量、精密度高的优点,且特异性强,易于达到终点^[2]。但从日常检测工作中发现,酶比色法在检测高浓度 TG 标本〔如家庭性高 TG 血症、家庭性混合型高脂血症(特别是急性胰腺炎高危状态)患者〕时,会出现严重的偏差,导致假性低值结果,从而影响临床诊断与治疗。本研究采用酶比色法定量检测血清浊度指数、反应速率,分析不同浓度样本浊度指数、反应过程吸光度(A)值与实测浓度的变化,同时根据反应监测曲线形状与前带检查(prozone check, PC)报警值识别反应过程中出现的假性低值,从而正确测定样本中 TG 浓度,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 样本来源 选择低值(L)和高值(H)血清标本各 1 份,其中 L 为健康体检者外观清亮血清, TG 浓度为 0.41 mmol/L; H 为急性胰腺炎住院患者高度混浊血清, TG 浓度为 27.54 mmol/L(稀释后测定值)。

1.2 仪器与试剂 采用 Roche Cobas C8000 全自动生化分析仪检测样本, TG 检测试剂及配套校准品与质控品、血清指数检测试剂均由 Roche 公司提供。

1.3 研究方法

1.3.1 检测原理 TG 在脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)作用下快速全面地水解为甘油,然后在甘油激酶(glycerol kinase, GK)与 GPO 作用下氧化为磷酸二羟丙酮和过氧化氢(H₂O₂)。最后在过氧化物酶的催化作用下,反应产生的 H₂O₂ 与 4-氨基比林和 4-氯酚反应形成红色染料(Trinder 终点反应),红色染料的颜色深浅与样本中的 TG 浓度成正比。

1.3.2 检测参数 TG 检测方法采用 1 点终点法,主/次波长为 505/700 nm,检测时间 10 min,仪器共

测定并记录 38 个 A 值并生成反应监测点与 A 值反应曲线图;其中第 38 点 A 值(A₃₈)用于样本浓度计算,而用于反应速率检测与 PC 的 A 值分别为第 2、4、10、14 点 A 值(A₂、A₄、A₁₀、A₁₄)。PC 在 A 值区间下限为“-3”,上限为“100”,如果 PC 值落在上下限之外,则检测值出现前带报警“>Kin”。TG 的检测范围为 0.1~10.0 mmol/L,检测浓度超出范围上限则报警“>Test”;此外,如主(次)波长的 A 值超过检测限值(32 000),则报警“>Abs”。以上所有检测参数均由 Roche 公司提供。

1.3.3 PC 与样本浓度计算^[3] $PC = [V(pmp14, pmp10)/V(pmp4, pmp2)] \times 100$; 其中 $V(pmp14, pmp10) = (A_{14} - A_{10}) / (14 - 10)$, 为第 10 点与第 14 点的 A 值反应变化速率,而 $V(pmp4, pmp2) = (A_4 - A_2) / (4 - 2)$ 为第 2 点与第 4 点的 A 值反应变化速率。PC 启动条件: $A_4 - A_2 \geq 3\ 000$ 。样本浓度计算公式: $C_x = K(A_x - A_b)$, 其中 A_x 为待测样本 A 值(A₃₈), C_x 为待测样本浓度, K(770)与 A_b(726)为校准曲线参数(本研究 C_x 与 PC 由仪器自动计算并记录)。

1.3.4 血清浊度指数(L 指数)^[3-4] L 指数是仪器测定样本(稀释后的样本)在主波长 660 nm 与 700 nm 处的 A 值,由公式 $L = 1/C \times A (C=9)$ 计算所得。血清浊度指数能半定量地反映待检样本的浊度,与样本浊度呈正相关。

1.3.5 系列稀释浓度样本配制与测定 按照“1L, 0.95L+0.05H, 0.9L+0.1H, 0.85L+0.15H, 0.8L+0.2H……0.2L+0.8H, 0.15L+0.85H, 0.1L+0.9H, 0.05L+0.95H, 1H”,用低浓度样本(L)0.41 mmol/L 对高浓度样本(H)27.54 mmol/L 进行稀释。将系列稀释浓度样本和分别增量 1.5 倍、2 倍高值样本(H)反应体积获得的 2 份高浓度样本(41.31 mmol/L、55.08 mmol/L)进行编号(样本 1~23),并在仪器上检测,计算系列样本理论浓度,记录血清浊度指数值、反应过程的 A 值与实测浓度值。

2 结果

2.1 TG 系列稀释样本理论浓度、实测浓度、血清浊

度指数、A 值及对应的 PC 值结果,见表 1。

浊度指数的相关性分析见图 1~2, TG 系列稀释样

2.2 TG 系列稀释样本理论浓度、实测浓度与血清

本反应时间与 A 值监测曲线见图 3。

表 1 TG 系列稀释样本浓度检测值和 PC 值结果

样本编号	理论浓度 (mmol/L)	实测浓度 (mmol/L)	偏差 (%)	浊度指数	吸光度(A)值						PC 值	数据报警
					A ₂	A ₄	A ₁₀	A ₁₄	A ₃₈	A ₄ - A ₂		
1	0.41	0.42	2.4	6	954	1 202	1 289	1 289	1 276	248		
2	1.78	1.90	6.9	32	1 408	2 693	3 197	3 221	3 197	1 285		
3	3.13	3.24	3.4	54	1 761	3 925	4 898	5 021	4 941	2 164		
4	4.49	4.56	1.6	77	2 142	5 228	6 623	6 728	6 652	3 086	1.7	
5	5.84	5.83	-0.2	98	2 450	6 333	8 106	8 318	8 298	3 883	2.7	
6	7.20	7.07	-1.8	128	2 772	7 530	9 689	9 832	8 298	4 758	1.5	
7	8.56	8.28	-3.2	152	3 110	8 694	11 254	11 440	11 488	5 584	1.7	
8	9.91	9.57	-3.5	179	3 349	9 795	13 014	13 124	13 161	6 446	0.9	
9	11.27	10.78	-4.3	201	3 474	10 554	14 254	14 527	14 732	7 080	1.9	> Test
10	12.62	11.95	-5.3	219	3 623	11 126	15 913	16 125	16 256	7 503	1.4	> Test
11	13.98	13.15	-5.9	248	3 788	11 563	17 378	17 625	17 815	7 775	1.6	> Test
12	15.34	14.31	-6.7	269	3 942	11 786	18 976	19 241	19 322	7 844	1.7	> Test
13	16.69	14.62	-12.4	300	3 997	11 930	19 743	19 813	19 727	7 933	0.4	> Test
14	18.05	14.64	-18.9	327	4 029	11 881	19 678	19 724	19 744	7 852	0.3	> Test
15	19.40	14.75	-24.0	344	4 113	12 068	19 972	20 043	19 894	7 955	0.4	> Test
16	20.76	14.63	-29.5	373	4 129	12 000	19 699	19 746	19 730	7 871	0.3	> Test
17	22.12	14.65	-33.8	390	4 258	11 980	19 688	19 276	19 758	7 722	-3.0	> Kin
18	23.47	14.75	-37.2	407	4 268	12 093	19 828	19 194	19 892	7 825	-4.1	> Kin
19	24.83	14.63	-41.1	423	4 275	12 025	19 757	18 128	19 729	7 750	-10.5	> Kin
20	26.18	14.89	-43.1	449	4 276	12 086	19 978	19 211	20 076	7 810	-4.9	> Kin
21	27.54	12.28	-55.4	474	4 350	12 131	19 899	15 687	16 683	7 781	-27.1	> Kin
22	41.31	5.93	-84.0		5 402	14 563	20 569	19 989	15 936	9 161	-3.2	> Kin, > Abs
23	55.08	5.87	-89.3		12 286	15 453	21 759	18 906	15 783	3 167	-45.0	> Kin, > Abs

注:有数据报警的样本 9~21 稀释 1/5 后的测定值与理论值的相对偏差<3%;空白表示无此项

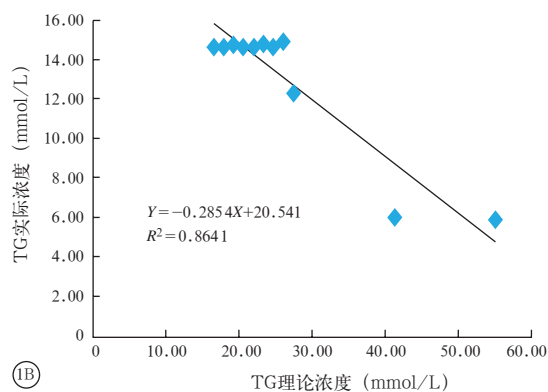
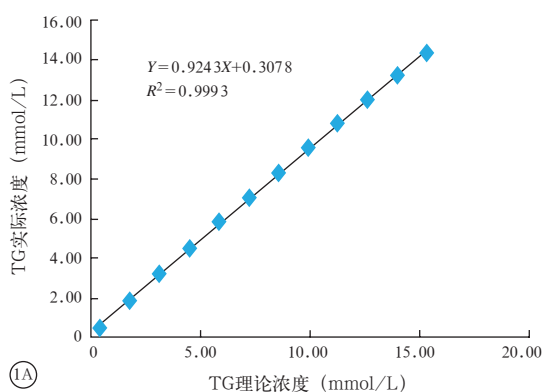


图 1 样本 1~12(A)和样本 13~23(B)TG 理论浓度与实际浓度的相关性分析

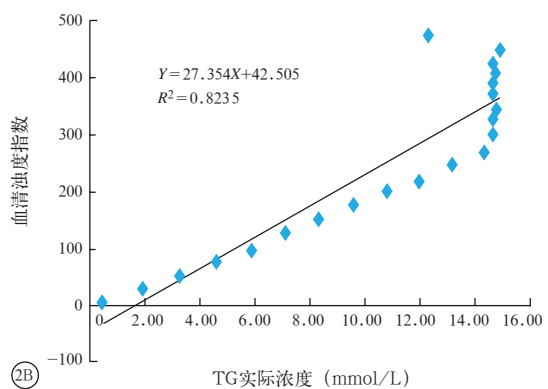
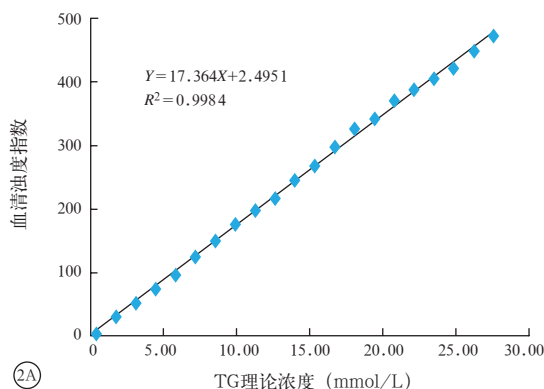


图 2 TG 理论浓度(A)、实际浓度(B)与血清浊度指数的相关性分析

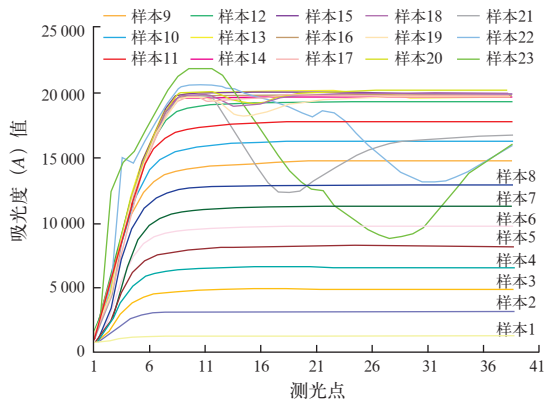


图 3 样本 1 ~ 23 的 TG 反应监测曲线

3 讨论

从表 1 与图 1~2 可知,随着样本中 TG 理论浓度的增加, L 指数、反应过程 A 值与仪器实测浓度也增加。样本 1~8 浓度在方法检测范围内 (< 10.0 mmol/L), 实测浓度与理论浓度的相对偏差较小, 结果相关性良好; 虽然样本 9~12 浓度超出检测范围 (>Test), 但相对偏差仍然在 7% 内; 而样本 13~23 的浓度明显超出方法检测上限, 实测浓度与理论浓度出现较大的负偏差, 偏差最小者为 -12.41%, 最大者超过 -50%, 其中样本 22 (41.31 mmol/L) 和样本 23 (55.08 mmol/L) 仪器实测浓度分别为 5.93 mmol/L、5.87 mmol/L (偏差分别为 -84.0%、-89.3%)。上述结果说明, 采用酶比色法定量检测 TG 时, 低浓度 (<15.34 mmol/L) 样本的检测结果相关性良好 ($R^2=0.9993$), 相对偏差较小; 而高浓度样本 (>16.69 mmol/L) 的检测结果相关性较差 ($R^2=0.8641$), 相对偏差 (负偏差) 较大, 实测值与理论值曲线呈明显分离现象, 结果呈明显假性低值。

与实测值出现较大的负偏差不同, 血清 L 指数随样本中 TG 浓度的升高而升高 (L 指数的检测范围为 0~20 000 mg/L), 呈持续上升的曲线 (同理论值)。根据厂家试剂说明书阐述, L 指数与样本浊度有关, 与 TG 水平无关; 但表 1 和图 2 显示, L 指数与 TG 呈正相关, 即随样本中血清浊度和 TG 浓度的升高, L 指数升高。试剂说明书中阐述的 L 指数和 TG 浓度之间的相关性较差, 可能与厂家性能验证实验中加入外源性脂肪乳剂有关, 与患者自身产生的乳糜微粒有本质区别 (可能 LPL 对患者的乳糜微粒水解较好)。因此, 通过 L 指数能够大致判断样本中的脂血程度与 TG 浓度, 浊度指数超过 200 提示样本浓度过高, 而超过 400 提示样本浓度极高, 需对样

本进行稀释后再测定。对于使用没有设置 PC 报警的 TG 检测试剂的实验室, L 指数检测是 TG 正确定量测定的较好选择。

PC 根据监测反应过程中 A 值的变化判断样本浓度是否达到或超出方法的检测极限, 同时根据数据报警判断样本是否为高值。根据 PC 的检测条件 ($A_4 - A_2 \geq 3000$), 从样本 4 (4.49 mmol/L) 开始, 仪器就对反应过程进行了 PC, 直至样本 23; 尽管样本 9~16 超出了检测范围上限且执行了 PC, 但 PC 值在区间 “-3~100” 内, 所以没有达到前带报警 “>Kin”。由于样本 17~23 中 TG 浓度极高, PC 值超出本研究的设定区间, 因而出现数据报警 “>Kin” (即 Kinetic unstable, Prozone 错误 / 运动不稳); 其中样本 22 和 23 除 “>Kin” 报警外, 还因其极高的血清浊度出现了 “>Abs” 报警, 即主波长 A 值出现了大于 32 000 的吸光度限值 (反应过程 A 值的最大值分别为 43 936、38 064), 提示样品浓度过高或样品脂血。

图 3 为样本 1~23 的反应过程时间与 A 值监测曲线。其中, TG 浓度在方法检测范围内的样本 1~8 的反应曲线呈上升变化明显的平滑曲线, 反应终点 A 值 (A_{38}) 随 TG 理论浓度的升高而升高, 根据计算公式 $C_x = K(A_x - A_b)$, 在 K 值与 A_b 值不变的情况下, TG 实测浓度也按一定比例明显升高, 实测值与理论值相关性良好。TG 浓度超出方法检测范围上限的样本 9~16 的反应监测曲线相对平滑, 但上升变化不明显, 而且浓度越高, 上升幅度越小; 图中样本 13~16 的反应曲线已基本重叠, 反应终点 A 值 (A_{38}) 几乎无变化, 根据计算公式, TG 实测浓度也变化不大, 稳定在 14.62~14.75 mmol/L, 显示反应过程已达到饱和状态。随 TG 浓度 (浊度) 的继续升高, 样本 17~23 的反应曲线开始出现不规则变化; 其中, 样本 17~20 的反应曲线中 $A_{11} \sim A_{20}$ 的 A 值不但没有升高, 反而出现了小幅度的下降; 而样本 21~23 的反应曲线更不规则, 反应过程 A 值变化极不稳定, 从 A_{12} 开始 A 值出现更为严重的下降倾向, 浓度越高下降幅度越大, 直至反应终点才有部分回升; 根据反应终点 A 值及其计算值, TG 实测浓度也会出现下降的低值结果。出现上述结果的原因可能为检测浓度在超出检测上限并达到饱和状态下, 若样本浓度继续升高, 检测方法会出现如 “底物耗尽 (ATP, 4-氨基比林和 4-氯酚)” 与 “缺氧 (O_2 、 H_2O_2)” 等现象, 从而导致反应过程 A 值变化不稳定

及出现错误的结果。样本 22、23 可能由于样本浓度与浊度过高,主波长 A 值超出仪器设定的吸光度限值 (>32000),尽管其 A_{38} 不低(分别为 15 936、15 783),但因在浓度值计算时,需在计算公式 $C_x = K(A_x - A_b)$ 基础上再减去样本空白(7 472、7 475),因而出现了明显假性低值(5.93 mmol/L、5.87 mmol/L),甚至可能出现“正常值”^[5]。

TG 升高与动脉粥样硬化性心血管疾病、糖尿病微血管并发症、肾病综合征等疾病风险密切相关,而高 TG 血症还可诱发急性胰腺炎^[6]。目前大多数临床实验室采用的 TG 检测方法对低浓度标本的检测性能良好,但检测高浓度和极高浓度标本(乳糜血)时则出现明显的假性低值。因此,能否正确识别测定过程中的“底物耗尽”与“缺氧”引起的假性低值,直接关系到检测结果的准确性,进而影响临床诊断与治疗。本研究采用血清浊度指数、反应速率法 PC 技术,通过观察 L 指数值、反应监测曲线变化和反应过程中有无前带报警,可有效识别反应过程中存在的“底物耗尽”与“缺氧”,并能够迅速、准确地定量测定样本的 TG 浓度,尤其是乳糜血标本的 TG 浓度。对出现血清浊度指数较高、超出方法检测上限、PC 报警或超出 A 值限值的结果,可以通过仪器上的自动稀释功能对样本进行稀释重测或采用手工合理稀释后正确测定样本中分析物浓度。

此外,临床常用的生化检验项目如丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)^[7]、肌酸激酶(creatine kinase, CK)^[8]、免疫球蛋白 G(IgG)^[9]、甲

胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)^[10]等,在检测高浓度样本时也可能存在如“底物耗尽”“钩状效应”等引起的假性低值甚至“正常值”现象。因此,临床实验室工作者应高度重视检测中高剂量分析物引起的“底物耗尽”和“钩状效应”对分析结果的影响,尽量避免反应体系中存在假性低值,切实提高检测结果的准确度,为临床提供准确可靠的诊断数据。

参考文献

- 1 府伟灵,徐克前.临床生物化学检验[M].5版.北京:人民卫生出版社,2012:68-69.
- 2 韩志钧,黄志锋,卢业成,等.临床化学常用项目自动分析法[M].3版.辽宁:辽宁科学技术出版社,2005:911-922.
- 3 ROCHE. Cobas C8000 modular analyzer series COBI-CD compendium of background information [M]. Germany: Roche Diagnostics GmbH, 2009: B9-B50.
- 4 王治国.临床检验质量控制技术[M].3版.北京:人民卫生出版社,2014:85-94.
- 5 Shephard MD, Whiting MJ. Falsely low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the enzymatic triglyceride method with modified Trinder's chromogen [J]. Clin Chem, 1990, 36(2): 325-329.
- 6 何文华,祝荫,朱勇,等.高甘油三酯血症与其他病因所致急性胰腺炎的病情严重程度及预后比较[J].中华医学杂志,2016, 96(32): 2569-2572.
- 7 闫家微,张启全,成松.全自动生化分析仪 ALT 底物耗尽现象的发现和解决[J].国际检验医学杂志,2011, 32(14): 1623-1624.
- 8 黄建平,张茜,周慰,等.生化分析仪测定磷酸肌酸激酶底物耗尽现象分析与处理[J].医学检验与临床,2016, 27(2): 34-35, 51.
- 9 刘忠民,高月亭,陈涛.自动生化分析仪自动识别免疫比浊分析中的钩状效应[J].现代临床医学生物工程学杂志,2000, 6(4): 252-254.
- 10 李慧,高致远.电化学发光免疫法检测甲胎蛋白出现钩状效应一例[J].检验医学,2012, 27(9): 706, 712.

(收稿日期:2018-07-25)

(本文编辑:张耘菲)

消 息

《实用检验医师杂志》广告业务招商

《实用检验医师杂志》由国家卫生和计划生育委员会主管,中国医师协会与天津市天津医院共同主办,是中国医师协会检验医师分会会刊。本刊为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,“万方数据—数字化期刊群”独家收录,《中国学术期刊网络出版总库》收录期刊,中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,《超星期刊域出版系统》全文收录。

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证,京期出证第 5864 号;2018 年 1 月 12 日获得天津市和平区市场和监督管理局批准从事广告发布业务(广告发布登记号:津和工商广登字 2018024 号)。广告经营范围:设计、制作印刷品广告,利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊为国内外公开发行人。目前本刊编辑部已开发了广告业务,欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。联系电话:022-23306917

