

• 质控与标规 •

L-8900 氨基酸分析仪血浆氨基酸生物参考区间的建立

范志娟¹, 张凤美², 刘 婕², 刘树业^{1△}

(1. 天津市第三中心医院检验科/天津市人工细胞重点实验室, 天津 300170;

2. 天津医科大学, 天津 300070)

摘要:目的 用国产试剂取代原装试剂并统计得出 L-8900 氨基酸分析仪血浆氨基酸生物参考区间, 为临床诊断提供服务。方法 用国产试剂与原装试剂检测标准品和同一批血浆(50 例), 并进行比较, 观察其性能指标(包括分离度和重复性)及准确度; 使用国产试剂检测 400 例健康人的血浆游离氨基酸水平以建立血浆氨基酸生物参考区; 同时与肝功能指标进行相关性分析。结果 (1)连续 5 次检测氨基酸标准品得出其峰分离度高, 峰保留时间和峰面积重复性高, 国产试剂准确度好。(2)统计得出 19 种氨基酸的生物参考区间, 其中 10 种氨基酸存在性别差异。(3)丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平与苏氨酸水平呈负相关($P < 0.05$), 血糖(GLU)水平与缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸水平呈正相关($P < 0.05$), 总胆固醇(CHO)水平与异亮氨酸水平呈负相关($P < 0.05$)。结论 国产试剂可以替代原装试剂, 在此基础上得出血浆氨基酸生物参考区间对临床诊断及预后具有重要意义。

关键词: L-8900 氨基酸分析仪; 国产试剂; 氨基酸生物参考区间; 肝功能

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.047

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1045-03

The plasma amino acids biological reference intervals of L-8900 amino acid analyzer

Fan Zhijuan¹, Zhang Fengmei², Liu Jie², Liu Shuye^{1△}

(1. Clinical Laboratory/Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin Third Central Hospital,

Tianjin 300170, China; 2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To calculate the biological reference of plasma amino acid on L-8900 amino acid analyzer and to provide reference for clinical diagnosis with domestic reagents replacing original reagent. **Methods** By testing the original standards and the same batch of plasma (50 cases), we compared original reagents with domestic reagents for their performance (including resolution, repeatability, accuracy). We tested the plasma free amino acids of 400 cases of healthy people using the domestic reagents to establish biological reference interval of plasma amino acid, and do correlation analysis between the amino acids level and liver function. **Results** (1) Domestic reagents showed high accuracy in the results of 5 consecutive detection of amino acids were high peak separation and high peak retention time and high peak area. (2) Statistics derived biological reference interval of 19 amino acids and 10 kinds of amino acids had significant differences. (3) Correlation analysis showed that ALT and liver function were negatively correlated with threonine ($P < 0.05$). GLU and valine, isoleucine, leucine were positively correlated ($P < 0.05$). CHO and negatively correlated with isoleucine ($P < 0.05$). **Conclusion** Domestic agents can replace the original reagents, on the basis, the biological reference intervals of plasma amino acids have great importance to clinical diagnosis and prognosis.

Key words: L-8900 amino acid analyzer; domestic reagents; biological reference interval of amino acids; liver function

血浆中游离氨基酸水平与疾病(尤其是与肿瘤)的关系愈来愈受到人们的关注。在正常情况下, 人体血液及组织间的氨基酸维持一定的动态平衡。在病理状态下血浆氨基酸水平会出现明显的紊乱, 对疾病的诊断和治疗具有一定的临床意义。2008 年本院引进日立 L-8900 高效液相氨基酸分析仪, 柱后衍生的特点避免了其他物质的干扰, 其专一性强, 适合未知复杂样品氨基酸的分析^[1], 具有重复性好、仪器稳定、结果可靠等优点, 适合大量常规样品的分析^[2-4]。然而原装试剂昂贵, 订购周期长, 不能满足临床检验需要。因此, 作者尝试摸索条件以实现缓冲液国产化, 并且分析了 400 例健康人血浆游离氨基酸水平作为血浆氨基酸生物参考区间, 为临床诊疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 6 月至 2012 年 12 月在本院体检, 且各项检查均正常的健康人 400 例, 男性 200 例, 女性 200 例; 年

龄 18~83 岁。

1.2 仪器和试剂 主要仪器: 日立 L-8900 高效液相氨基酸分析仪。主要试剂: 氨基酸标准混合溶液(P/N855-5993), 标准缓冲溶液(P/N 855-3407), 原装茚三酮试剂, 优级纯枸橼酸钠、氯化钠和枸橼酸(北京国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 方法 按说明书缓冲液成分表用国产试剂配制缓冲液(注: 用无水乙醇取代硫代双乙醇), 超声 30 min 后用负压泵过滤装置过滤(滤膜孔径为 0.45 μm)备用, 同时调整分析程序以便缓冲液更好的分离氨基酸。随机选出 50 份血浆, 分别用国产试剂和原装试剂检测标准品和 50 份血浆, 对比前后二者的标准品图谱和 50 份血浆氨基酸水平; 用国产试剂检测 400 例健康人群的血浆游离氨基酸水平以计算血浆氨基酸生物参考区间, 所有检测者均清晨空腹抽取静脉血 2 mL 于肝素化离心管内离心(15 000 r/min, 15 min)。取 400 μL 血浆, 加 800 μL

8%磺基水杨酸沉淀蛋白,离心(15 000 r/min,15 min),取上清液用 0.22 μm 针头过滤器过滤后上机备用。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 参数验证结果 苏-丝氨酸、甘-丙氨酸、异亮-亮氨酸峰分离度均大于 1.2;峰保留时间(RT)的重复性好,丙氨酸变异系数(CV)为 0.01% $<$ 0.5%,精氨酸 CV 为 0.04% $<$ 0.3%;峰面

积(A)的重复性好,甘氨酸 CV 为 0.82% $<$ 1%,组氨酸 CV 为 0.33% $<$ 1%,结果符合性能条件。

2.2 原装试剂和国产试剂检测同一批血浆氨基酸水平比较 两种试剂检测结果差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.4 不同性别血浆氨基水平比较 苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、色氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、色氨酸水平,在不同性别受试者之间差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 原装试剂和国产试剂检测同一批血浆的氨基酸水平比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

氨基酸	原装试剂	国产试剂	氨基酸	原装试剂	国产试剂
牛磺酸	139.8±38.2	149.7±28.7	异亮氨酸	60.0±24.8	57.7±13.4
天门冬酸	10.8±9.8	15.6±10.2	亮氨酸	113.3±23.3	116.2±23.5
苏氨酸	591.6±146.7	580.9±95.5	酪氨酸	50.1±13.6	52.4±13.8
丝氨酸	128.3±37.2	132.7±26.3	苯丙氨酸	62.9±14.7	75.2±17.0
谷氨酸	93.0±38.5	104.9±26.3	鸟氨酸	124.9±32.1	130.3±39.5
甘氨酸	255.1±59.6	257.0±65.40	赖氨酸	170.4±33.0	177.8±31.7
丙氨酸	343.8±92.7	341.3±80.1	组氨酸	83.5±12.0	86.9±13.0
胱氨酸	43.1±17.9	45.2±17.0	色氨酸	47.1±12.1	33.3±9.9
缬氨酸	218.7±42.5	224.0±34.8	精氨酸	52.9±18.2	48.4±17.0
蛋氨酸	28.8±5.08	30.0±9.0			

表 2 不同性别血浆氨基水平的比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

氨基酸	男性($n=200$)	女性($n=200$)	氨基酸	男性($n=200$)	女性($n=200$)
牛磺酸	138.35±27.90	140.19±28.57	异亮氨酸	66.52±5.95*	55.72±12.24
天门冬酸	10.22±3.28	11.05±5.53	亮氨酸	125.11±14.84*	107.45±11.25
苏氨酸	622.66±95.82*	574.02±125.03	酪氨酸	52.36±11.95	50.42±14.68
丝氨酸	122.78±9.52*	132.62±9.92	苯丙氨酸	61.76±14.20	57.50±14.68
谷氨酸	100.84±17.93*	87.48±17.24	鸟氨酸	135.57±13.85*	110.96±11.95
甘氨酸	244.74±39.65	255.24±69.64	赖氨酸	185.97±12.81	168.90±15.01
丙氨酸	366.68±88.88	342.61±97.77	组氨酸	87.14±12.33	84.90±13.33
胱氨酸	43.53±18.81	38.80±17.74	色氨酸	48.07±7.09*	43.07±8.35
缬氨酸	228.07±22.86*	206.25±20.16	精氨酸	56.76±19.36	52.04±18.95
蛋氨酸	25.40±4.49*	22.85±5.14			

*: $P<0.05$,与女性比较。

表 3 氨基酸谱与肝功能指标相关系数

氨基酸	ALT	GLU	TG	CHO
苏氨酸	-0.26	0.03	0.10	0.18
缬氨酸	-0.04	0.25	0.17	0.16
异亮氨酸	0.04	0.19	0.19	-0.27

2.5 氨基酸谱与肝功能的相关性分析 丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平与苏氨酸水平呈负相关($P<0.05$),血糖(GLU)水平与缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸水平呈正相关($P<0.05$),总胆固醇(CHO)水平与异亮氨酸水平呈负相关($P<0.05$),氨基酸

谱与肝功能指标相关系数见表 3。

3 讨 论

与原装试剂相比,国产试剂中硫代双乙醇成分被无水乙醇取代,在图谱上的表现为苏氨酸-丝氨酸、甘氨酸-丙氨酸、异亮氨酸-亮氨酸等峰的分度较使用硫代双乙醇时稍低,然而分离效果依然显著。而柠檬酸三钠、柠檬酸、氯化钠作为缓冲液的主要试剂,选用北京国药集团生产的优级纯产品能起到很好的分离作用^[5]。在国产试剂的配制中,注意用中性洗液充分冲洗容器以保证清洁并避免在配制过程中的交叉污染。溶液的酸碱度和 Na⁺ 浓度是影响分离效果的重要因素,国产试剂纯度不够导致甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸等氨基酸出峰时间

后移,丙氨酸与胱氨酸峰重合分离不好,在 pH=1 溶液中加入 7.5 mL 1 mol/L 的氢氧化钠可使谱峰整体效果好转。

有研究表明^[6],疾病状态下人体内氨基酸水平变化对疾病的临床鉴别诊断以及治疗有重要价值,需要根据不同氨基酸谱给予患者不同的治疗。血浆氨基酸水平受多种因素的调节,如肝脏、胰岛素、生长激素等,其中最重要的影响因素是蛋白质的摄入量。因此,分析血浆氨基酸时惟一可控制的条件就是空腹取血^[7]。本研究通过使用 L-8900 氨基酸分析仪对 400 例健康人的血浆游离氨基酸进行测定,得到氨基酸生物参考区间。另外,所测的 19 种氨基酸中,有 10 种氨基酸水平在不同性别人群中比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中有 7 种都是人体必需氨基酸。除丝氨酸外,其他氨基酸水平都是男性高于女性,这可能是由于男性和女性的饮食偏嗜和生理状态不同。有研究发现,膳食中蛋白质的消化与吸收、肝脏作用、血液氨基酸水平的调节、骨骼肌的作用和氮平衡有着密切的关系^[8]。血浆游离氨基酸是氨基酸在各组织间转运的主要形式。肝脏通过维持血浆氨基酸的水平,调整不同摄入量和组织需要量之间的平衡。

本研究对氨基酸谱与肝功能相关性进行了探讨,苏氨酸能促进磷脂合成和脂肪酸氧化,具有抗脂肪肝效能,而 ALT 是评价肝功能的主要指标。肝细胞癌时,苏氨酸脱水酶活性明显降低,导致苏氨酸分解代谢减弱,但苏氨酸除了参与肿瘤细胞核酸、蛋白质合成,对肿瘤生长是否还具有其他特殊作用,尚不明确。肌肉是氨基酸代谢的场所,也是支链氨基酸代谢的主要场所。亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸均为支链氨基酸,属于必需氨基酸。在肌肉氨基酸代谢中,胰岛素起重要的调节作用。正常情况下,胰岛素在肝脏灭活,与血浆内缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸在肌肉内代谢与利用有着密切联系^[9-12],它能促进支链氨基酸进入肌肉组织,促进肌肉蛋白的合成,并减缓其分解。晚期肝硬化患者因肝功能损害,易形成高胰岛素血症,致使血中支链氨基酸减少,血糖亦降低。

综上所述,国产试剂配制方便,重复性、分离度好,准确度高,且试剂成本低,可随时制备和使用,可以替代原装试剂,在

此基础上得出血浆氨基酸生物参考区间对临床诊断及预后具有重要意义。

参考文献

- [1] 高永清. 直接分析氨基酸的两种方法[J]. 分析仪器, 2003(3): 40-43.
- [2] 施纯辉. Biochrom30 专用自动氨基酸分析系统[J]. 现代仪器, 2003(3): 38-42.
- [3] 丁永胜, 牟世芬. 氨基酸的分析方法及其应用进展[J]. 色谱, 2004, 3(22): 210-215.
- [4] 常碧影, 杨文军. 氨基酸分析与仪器性能评价[J]. 现代科学仪器, 2004, 6(1): 6-9.
- [5] 高翠红, 刘树业, 孟令海. 日立 L-8900 型氨基酸分析仪用缓冲液的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(4): 81-84.
- [6] 范志娟, 刘树业. 肝癌病人血浆氨基酸变化与肝功能的相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(2): 231-233.
- [7] 孙宁. 原发性肝癌血浆氨基酸测定的临床意义[J]. 职业与健康, 2002, 18(9): 148-149.
- [8] Belalcázar LM, Ballantyne CM. Nutrition and metabolism-sphingolipids and branched chain amino acids; indicators and effectors of adipose tissue function and diabetes risk[J]. Curr Opin Lipidol, 2011, 22(6): 503-504.
- [9] Mumtaz S, Ford AC. Losses to follow-up limit conclusions regarding the efficacy of branched-chain amino acids in patients with hepatic encephalopathy[J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(9): 1718.
- [10] 蒋滢, 蒋菊香, 徐颖, 等. 氨基酸代谢与肝性脑病[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(4): 53-58.
- [11] 姜秋芬, 刘惠敏. 肝硬化与肝癌患者血浆游离氨基酸水平分析[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(3): 34-36.
- [12] 王洁, 蔡东联. 肝硬化疾病与支链氨基酸应用研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 34(3): 63-67.

(收稿日期: 2013-11-08)

(上接第 1042 页)

参考文献

- [1] 马文昭. 丙型肝炎病毒抗体的检测及临床意义[J]. 中国现代医生, 2008, 46(13): 159.
- [2] 杨玉峰, 刘东, 丁怡文. Tecan Freedom EVO Clinical 全自动样品处理系统使用体会[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(10): 967-968.
- [3] 陈亚军, 史桂兰, 冯岭, 等. TECAN RMP 150 型全自动酶免仪应用评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(10): 33-35.
- [4] 赵飞雪. Microlab FAME 全自动酶免分析仪检测的影响因素及质量控制[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(13): 1677-1678.
- [5] 陈新瑞, 杨一芬, 唐亚梅. 辉煌之星全自动酶免疫分析连体机性能综合评价[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(4): 316-317.

- [6] 杨昌国, 许叶, 张抗. 精密度评价和方法比较中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 44-46.
- [7] 成军, 孙关忠, 郑怀竞, 等. 酶标仪性能评价与鉴定的基本方法及其初步应用[J]. 中华医学检验杂志, 1998, 21(1): 49.
- [8] 王雁, 徐楠楠, 李立峰. TECAN 全自动酶免分析仪应用体会[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(18): 4383-4383.
- [9] 闵志军, 张建伟, 张力超, 等. 全自动酶标分析系统常见故障及处理[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(3): 225-225.
- [10] 黄燕婷, 黄惠. 全自动酶免疫分析仪前处理加样系统检测 HBcAb 方法的优化[J]. 黑龙江科技信息, 2009, 13(36): 380.

(收稿日期: 2013-11-26)