

• 论 著 •

# 循环酶法同型半胱氨酸试剂的分析性能验证

杨云帆

(临清市人民医院检验科, 山东临清 252600)

**摘要:**目的 对应用于全自动生化分析仪的同型半胱氨酸(Hcy)试剂进行分析性能验证,并应用于临床。方法 在日本 Olympus AU-640 全自动生化分析仪上对四川新成公司生产的循环酶法测定 Hcy 试剂进行性能验证,参考 CLSI EP6-A、EP15-A、EP-7 方案对检测方法的精密度、线性范围、干扰因素(胆红素、血红蛋白、乳糜)进行评估,与传统的高效液相色谱法(HPLC)进行了比对,并对分析前质量控制影响因素进行实验分析。结果 精密度实验为批内:CV 2.37%(低值)、3.58%(高值),总 CV: 4.52%(低值)、4.85%(高值);该法与 HPLC 法相关性良好( $r^2=0.996, P>0.05$ );线性范围为 2.0~50.0  $\mu\text{mol/L}$ ,线性相关良好;试验浓度内的 3 种干扰物(胆红素小于或等于 20 mg/dL,三酰甘油小于或等于 1 000 mg/dL, Hb $\leq 150$  mg/dL)对试剂无显著干扰;采血体位对结果有影响;全血标本 1 h 内分离血清,血清 4  $^{\circ}\text{C}$  12 h 内及 -20  $^{\circ}\text{C}$  15 d 内结果无明显变化;EDTA 与肝素防凝血结果无差异。Hcy 水平与心脑血管病发生呈正相关,其阳性检出率高于传统的血脂指标。结论 应用于全自动生化分析仪的循环酶法 Hcy 试剂具有较高的精密度和灵敏度,与 HPLC 测定相关良好,可满足临床测试要求,适合血清(浆)Hcy 的常规和自动化分析。

**关键词:**同型半胱氨酸; 循环酶法; 高效液相色谱法; 自动化分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)12-1715-03

## Circulation enzymatic homocysteine reagent performance verification

Yang Yunfan

(Department of Clinical Laboratory, Linqing City People's Hospital, Linqing, Shandong, 252600, China)

**Abstract:** Objective To do performance verification for full automatic biochemical analyzer of homocysteine reagent analysis and applied in the clinic. **Methods** In Japan to push around AU-640 fully automatic biochemical analyzer in sichuan new into the company's production cycle enzymatic determination of homocysteine (Hcy) reagent for performance verification, reference CLSI EP6-A, EP15-A, EP-7 scheme for the precision of the detection method, linear range, interference factors (bilirubin, hemoglobin, chyle) assessed, and the traditional, the high efficiency liquid chromatography (HPLC) had carried on the comparison, and the quality control before the influencing factors of experiment analysis. **Results** In precision experiments, batch: CV 2.37% (undervalued), 3.58% (high value), the total CV: 4.52% (low), 4.85% (high value); In good correlation with HPLC method ( $r^2=0.996, P>0.996$ ); The linear range of 2.0~50.0  $\mu\text{mol/L}$ , good linear correlation; Test concentration within the three distractors (bilirubin 20 mg/dL or less, triglycerides 1 000 mg/dL or less, Hb 150 mg/dL or less) no significant interference of reagent; In pursuance of postures have an impact on the results; Whole blood specimens of 1 hour separation serum, serum 4  $^{\circ}\text{C}$  for 15 days and 12 hours -20  $^{\circ}\text{C}$  results have no obvious change; EDTA with heparin anti-clotting results no difference. Hcy levels were positively correlated with cardio-cerebrovascular disease, the positive detection rate higher than that of the traditional blood fat index. **Conclusion** Through out the cycle of automatic biochemical analyzer enzymatic homocysteine reagent has high precision and sensitivity, and traditional, the high efficiency liquid chromatography (HPLC) determination of the related good, can meet the requirements of clinical test, is suitable for the normal serum (plasma Hcy) and automated analysis.

**Key words:** homocysteine; circulation enzymatic; high performance liquid chromatography; automated analysis

早在 20 世纪 70 年代,流行病学调查就发现同型半胱氨酸(Hcy)是心脑血管疾病的独立危险因素,之后有许多研究相继证实了 Hcy 与心梗、冠状动脉硬化、脑中风等有密切关系<sup>[1]</sup>,美国每年约有 3 000 多万人体检中增加 Hcy 检测,并以每年 30% 的比率递增。因此积极探讨和验证一种简单易行、经济实用的检测方法作为常规筛查 Hcy 水平,对预防心脑血管病的发生和降低该病的死亡率,提高全民健康水平意义重大。目前,测定 Hcy 的方法有很多种,包括高效液相色谱法(HPLC)、氨基酸分析法、荧光偏振免疫分析(FPIA)和放射性酶联免疫吸附法<sup>[2]</sup>和酶学分析法。其中 HPLC 法是最常用的方法,但是需要特殊设备。循环酶法是利用酶的底物特性,放大靶物

质(被测物)的检测方法,此法仅循环靶物质,具有快速、简便、灵敏度高,易于自动化等特点。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 将已知 Hcy 浓度的患者血清混合,制备高、低浓度(约 32.5  $\mu\text{mol/L}$  和 6.4  $\mu\text{mol/L}$ )两份混合血清,各分装 20 份于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存,用于精密度试验;收集高、低 Hcy 浓度两份患者混合血清(约 28.6  $\mu\text{mol/L}$  和 4.5  $\mu\text{mol/L}$ )用于干扰试验;留取来本院心内科就诊患者血清标本 50 份,其中 16 份来由心内科明确诊断为冠状动脉粥样硬化的患者,用循环酶法和高效液相色谱法同时测定进行比对及判断 Hcy 异常符合率初步评估;留取门诊患者抗凝全血 20 份,同一标本分别用 EDTA

与肝素防凝真空采血管留取,用于不同防凝剂对检测结果的影响;取 10 名受试者,先平卧取血,10 min 后坐位取血,用于不同体位对检测结果的影响;取在不同温度下、不同存放时间的同份标本 10 份,用于观察不同温度下、不同存放时间对检测结果的影响;另从 2013 年 8 月份查体中选取 80 例体检结果正常的健康人,年龄 28~50 岁,其中男 45 例,女 35 例。用于参考范围的验证。

1.2 仪器与试剂 日本 Olympus AU-640 全自动生化分析仪,美国 PELC-480 型高压液相色谱仪。四川省新成生物科技有限公司生产的 Hcy 试剂(批号 0913102)及其配套校准品;乳糜:西安立邦制药有限公司生产(批号 08031 12);血红蛋白(牛血红蛋白):北京经科宏达生物公司(批号 Sigma H-3760);胆红素(Bilirubin, Mixed Isoners):北京经科宏达生物公司(批号 Sigma A-7631)。

1.3 方法

1.3.1 精密度评价 依据 CLSI EP15-A 文件<sup>[3]</sup>所提供方案,用循环酶法 Hcy 试剂分别测定高、低浓度(约 32.5 μmol/L 和 6.4 μmol/L)两份混合血清,连续 5 d,每天 4 次。计算批内及总变异,并确认其不精密度范围是否与厂商标注的相符合。

1.3.2 线性范围评价 配制 Hcy 浓度为 2、10、20、30、40、50 μmol/L 的参考物,对参考物按浓度从高到低各测定 3 次,记录测定结果。按照 CLSI EP6-A 文件<sup>[4]</sup>所提供方案检查数据,检查离群值,判断重复性,之后进行多元线性回归,并绘制散点图进行评价。

1.3.3 干扰试验 按照 CLSI EP7-P 文件<sup>[5]</sup>所提供方案,将干扰物分别加入高、低浓度两份患者混合血清中,两组干扰血清胆红素终浓度分别为 0.5、10、15、20、25 mg/dL,血红蛋白终浓度分别为 0、50、100、150、200 mg/dL,三酰甘油终浓度分别为 0、200、400、600、800、1 000、1 200 mg/dL。分别测定每个浓度混合血清 2 次,求均值,计算添加干扰物与干扰物为 0 时的百分偏差。以超过±10%为标准判断是否存在干扰。

1.3.4 与高效液相色谱法比对试验 50 份比对血清标本分别用循环酶法与高效液相色谱法进行测定,记录结果,进行结果比对并判断 Hcy 异常符合率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度试验 用已知浓度为 6.4 μmol/L 和 32.5 μmol/L 两份混合血清,分别用循环酶法测定 20 次,批内 CV(%)分别为 2.37、3.58,总 CV(%)分别为 4.52、4.85,而试剂盒声明 CV(%)值批内小于 5.0,批间小于 10,试剂实测精密度均小于试剂盒标注的精密度,变异较小,可满足临床应用。

2.2 线性范围评价 配制 Hcy 浓度为 2、10、20、30、40、50 μmol/L 的参考物,用本法测定,结果分别为 2.05、9.8、19.6、30.9、39.8、51.2 μmol/L,理论值(*X*)与测定值(*Y*)之间的线性回归: $Y = 0.998X + 0.6055, r^2 = 0.996$ ,Hcy 浓度在 2.0~50.0 μmol/L 范围内线性关系良好。

2.3 干扰试验 结果见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。以百分偏差超过±10%为标准判断,胆红素小于或等于 20 mg/dL,三酰甘油小于或等于 1 000 mg/dL, Hb≤150 mg/dL 对试剂无显著干扰。由表 1 可以看出,加入不同浓度干扰物后,所引起的百分偏差分别为胆红素 25 mg/

dL 时,低值浓度为 12.2%,高值浓度为 11.9%,而胆红素浓度小于或等于 20 mg/dL 时所引起的百分偏差均小于 10%;血红蛋白 200 mg/dL 时,低值浓度为 12.2%,高值浓度为 11.2%,而 Hb≤150 mg/dL 时引起的百分偏差均小于 10%;三酰甘油 1 200 mg/dL 时,低值浓度为 13.3%,高值浓度为 16.1%,三酰甘油小于或等于 1 000 mg/dL 时所引起的百分偏差均小于 10%。由此可以看出,胆红素小于或等于 20 mg/dL,三酰甘油小于或等于 1 000 mg/dL, Hb≤150 mg/dL 对试剂无显著干扰。

2.4 比对试验 分别以厂商说明书提供的参考范围为标准,循环酶法和高效液相色谱法同时测定 50 份血清,测定结果的异常情况符合率见表 2。由表 2 可以看出循环酶法和高效液相色谱法一致性良好。

表 2 循环酶法和高效液相色谱法测定 Hcy 异常结果比较(份)

循环酶法	高效液相色谱法		合计
	阳性	阴性	
阳性	23	2	25
阴性	1	24	25
合计	24	26	50

2.5 标本种类比较 取 20 份标本,每份分别置 EDTA 和肝素真空采血管中,同时离心分离,取血浆进行 Hcy 测定,每份标本测定 2 次,取平均值。Hcy 浓度分别为:EDTA 血浆(9.3±1.6) μmol/L、肝素血浆(9.53±1.8) μmol/L,经统计学比较,二种防凝血结果比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.6 不同体位结果的差异 取 10 名受试者,先平卧取血,10 min 后坐位取血,同时离心分离血清检测 Hcy 浓度,结果为坐卧位(8.13±1.8) μmol/L,平卧位(7.45±1.78) μmol/L,两者比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.7 不同温度下、不同存放时间的影响 取 10 份全血标本,每份分装 5 支试管分别在取血后 10、30、40、60、70 min 离心分离血清进行 Hcy 检测,每份标本测两次,取均值,提取血清存放-20℃冰存,每天取出一份连测 10 d。各组结果进行比较,经分析。结果全血血清标本在 10、20、30、60 min 内差异无统计学意义(*P* > 0.05),70 min 时结果开始升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。血清-20℃保存 10 d 内结果比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.8 参考值范围 选用 80 例体检结果正常、肝肾功能试验等各项理化指标正常的体检者的空腹血清标本,年龄 28~50 岁,其中男 45 例,女 35 例。男性参考值(11.74±4.08) μmol/L;女性参考值(8.96±3.11) μmol/L。与文献[6]报道健康人血清 Hcy 浓度相符。

3 讨 论

Hcy 为含巯基氨基酸,是胱硫醚和蛋氨酸转硫化和甲基化代谢旁路中形成的中间体。80%的 Hcy 在血中通过二硫键与蛋白质结合,只有很少一小部分游离 Hcy 参加循环。自 20 世纪 60 年代初在尿中首次被发现以来,Hcy 被认为与多种先天性代谢缺陷有关,如胱硫醚 β 合成酶缺乏是已知的造成高同型半胱氨酸尿症的原因。最近,人们又发现高同型半胱氨酸血症是发生外周血管、脑血管和冠状动脉血管疾病的危险因素之一。随着研究的深入,血浆 Hcy 作为心脑血管病尤其是脑卒

中的独立危险因子的地位已经得到确立。鉴于我国脑卒中发病率(250/10 万)明显高于国外,故有学者<sup>[7]</sup>提出了“H”型高血压的概念,强调在控制血压的同时,还要控制高同型半胱氨酸血症。国外的 HOPE-2 再研究已确认叶酸预防脑卒中有效,其中 65% 的患者合并了 ACEI 类药物使脑卒中风险显著下降 25%。国内亦有学者使用依那普利加叶酸片控制伴有 Hcy 升高的高血压病患者,并取得良好效果<sup>[8]</sup>。可见高同型半胱氨酸血症的防治已受到广泛重视,并可能为我国脑卒中的高发寻找到一个有效的一级预防措施。Hcy 不仅可影响脂类代谢,还可通过多种其他途径诱发心血管疾病。据调查,相当大比例的人群面临高同型半胱氨酸血症的危险,尤其是当食物中叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 摄入不足时更是如此。这些说明,遗传因素、环境因素、叶酸及维生素 B<sub>12</sub> 摄入量都与同型半胱氨酸血症有关<sup>[9-10]</sup>。

为达到分析前的质量保证,又研究了标本的防凝与储存,标本存放时间等对实验结果的影响,实验表明 EDTA、肝素二种防凝剂间结果比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。对不能立即操作的标本可在一般室温下(20℃)1 h 内分离血清备用,血清-20℃10 d 内无明显变化。坐位取血结果偏高可能与体位重力作用,血浆浓度高有关。建议对同一患者采用相同体位以消除差异。

综上所述,Hcy 作为独立的心血管风险指标已被广泛接受,是高血脂、吸烟、糖尿病之外的又一危险因素。尽管许多有关高同型半胱氨酸血症的生物化学基础有待明确,其检测与各种疾病的关系和治疗检测将需进一步探讨,虽然使用叶酸、维生素 B<sub>12</sub>、维生素 B<sub>6</sub> 后可降低其体内浓度,但并非用于治疗。目前,测定 Hcy 的常用方法是 HPLC,对还原型 Hcy 的荧光衍生物或使用电化学检测器直接测量。Hcy 的测定主要采用 HPLC 方法,由于时间和价格因素,仅在大医院或检验中心应用,目前,Hcy 的测定方法还有荧光偏振免疫分析(FPIA)和酶联免疫吸附实验(ELISA)。本实验是通过特异性的 Hcy 甲基转移酶和 S 腺苷 Hcy 水解酶催化 Hcy 转变为 S 腺苷 Hcy, S 腺苷 Hcy 再水解生成 Hcy,使反应循环进行,信号不断放大。循环酶法与最常用的 HPLC 法比较,适合在多种自动化分析仪上测定,不需特殊的设备,省却了检测前荧光衍生,消除了由于衍生而造成的误差,操作简便,灵敏度高,线性范围宽,抗干扰因素强,精密度较好,可以满足大批量标本的同时自动化分析。由于目前自动化分析仪在国内大多数医院已经普及,所以

循环酶法测定 Hcy 是一种值得推广的方法。

### 参考文献

[1] Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, et al. Homocysteine, MTHFR 677C→T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis[J]. *Neurology*, 2002, 59(4): 529-536.

[2] Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications[J]. *Clin Chem*, 1993, 39(1): 1764-1779.

[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP15-A User demonstration of performance for precision and accuracy [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2001.

[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.

[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP7-P Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 1986.

[6] Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocysteine, diet, and cardiovascular disease: A statement for health care professionals from the nutrition committee, American Heart Association AHA Science Advisory[J]. *Circulation*, 1999, 99(1): 178.

[7] 胡大一, 徐希平. 有效控制“H”型高血压-预防卒中的新思路[J]. *中华内科杂志*, 2008, 47(1): 976-977.

[8] 李建平, 霍勇, 刘平, 等. 马来酸依那普利叶酸片降压降同型半胱氨酸的疗效和安全性[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2007, 39(1): 614-618.

[9] 季福绥, 范海荣, 孙福成, 等. 老年人亚甲基四氢叶酸还原酶、蛋氨酸合成酶基因多态性及同型半胱氨酸水平与冠心病的关系[J]. *中华老年医学杂志*, 2004, 23(6): 376-379.

[10] Siri PW, Verhoef MP, Ph D, et al. Vitamins B6, B12 and Folate: Association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis[J]. *J Am Coll Nutr*, 1997, 17(5): 435-441.

(收稿日期: 2015-01-08)



(上接第 1714 页)

[8] Selim TE, Ghoneim FIR, Khashaba MT et al. Plasma soluble fibrin monomer complex is a useful predictor of disseminated intravascular coagulation in neonatal sepsis[J]. *Haematologica*, 2010, 90(3): 419-425.

[9] 刘宝琰, 钟梅, 余艳红, 等. 妊娠高血压综合征患者血栓前状态功能指标的检测及其意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2013, 38(2): 85-86.

[10] Balaji V, Madhuri BS, Ashalatha S, et al. Glycosylated haemoglobin in gestation period diabetes mellitus in Asian Indian women[J]. *Diabetes Care*, 2012, 30(7): 1865-1867.

[11] 严宏. 妊娠产妇不同孕期凝血 4 项指标检测分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(13): 130-131.

[12] 吕涌涛, 芦璐, 葛汝村. 凝血和抗凝及纤溶功能改变在进展型脑梗

死患者中的临床意义[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2011, 7(6): 401-403.

[13] Bremer HA, Bronuner EJP, Wallewbury HCS on Effects of labor and delivery on fibrinolysis[J]. *Eur J Obstet Gynecol*, 2014, 55(2): 163-167.

[14] 张慧娟, 费冲, 邵慧珍, 等. 正常及妊娠高孕妇血小板颗粒膜蛋白和纤溶状态的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 29(2): 423-424.

[15] 张爱民, 常艳敏. 血清同型半胱氨酸 D-二聚体水平与冠心病的关系[J]. *检验医学与临床*, 2010, 29(8): 1063-1065.

[16] 傅林金, 张永爱. D-二聚体、凝血四项在孕妇正常分娩前后变化的临床意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2011, 27(3): 257-258.

(收稿日期: 2015-01-12)