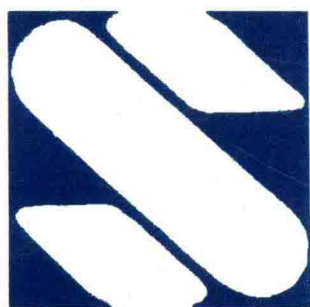


北京九强公司 论文汇编



一九九九年三月

目 录

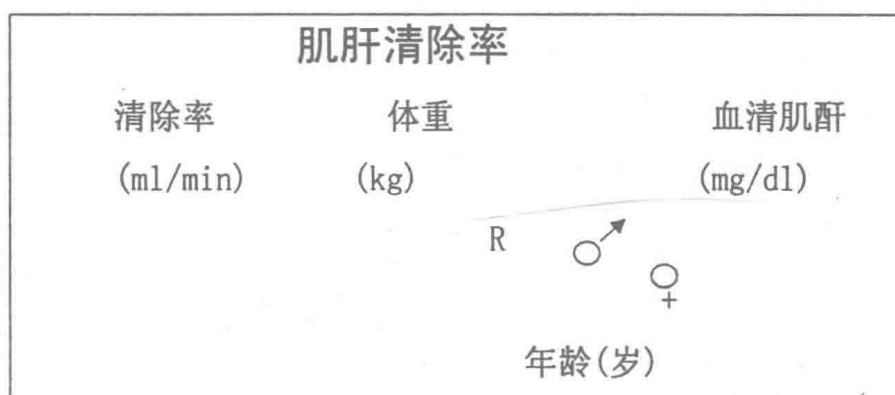
1. 酶法测肌酐.....Randox 实验室 英国 (1)
2. 免疫浊度测定法.....Randox 实验室 英国 (6)
3. 稳定的液体试剂.....Randox 实验室 英国 (9)
4. 载脂蛋白 AI. B 测定若干问题.....李健斋 (14)
5. 淀粉酶和脂肪酶测定在诊断胰腺疾病时的应用.....寇丽筠 (16)
6. 肾病实验诊断体系的更新与发展—90 年代进展回顾.....魏有仁 (22)
7. 肝病的酶学诊断及其临床意义.....魏有仁 (26)
8. 尿中微量白蛋白的测定及应用.....魏有仁 (30)
9. 尿微量白蛋白检测的应用研究—10 年回顾与前瞻.....魏有仁 (34)
10. 肌酐测定方法的进展.....魏有仁 (42)
11. 尿中 N-乙酰 β -D 氨基葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶活力的测定
.....徐国宾 朱立华 洪健美 刘静霞 夏铁安 周惠平 李庆红 (46)
12. 血清和尿肌酐酶促动力学法测定及评价.....
.....徐国宾 李凤英 杨宏云 白云 吕树文 朱立华 夏铁安 (49)
13. 免疫浊度测定法.....朱立华 (53)
14. D-3-羟丁酸测定.....朱立华 (55)
15. β -羟丁酸.....林其燧 (56)
16. D-3-羟丁酸的检测及其临床应用.....鄢盛恺 (60)
17. Randox 载脂 AI 和 B 检测试剂盒的初步评价.....鄢盛恺 (64)
18. 酶促终点自动法测定血清胆汁酸.....
.....徐国宾 朱立华 杨宏云 曹铁 夏铁安 (66)
19. 胆汁酸检测在临床上的应用.....九强公司 (69)
20. 胆汁酸的生理作用.....九强公司 (72)
21. Randox 国际质量评定计划.....康辉 陈燕 张丽霞 (74)
22. 血清钾钠酶法测定—日立 7250 全自动生化分析仪上的应用.....
.....董振南 李国君 (78)
23. 英国 Randox 公司的质控血清.....九强公司 (82)

Radox 酶法测肌酐

Marlenc King BSC (Hons)

Radox 实验室, 英国

女士们、先生们早上好。我叫 Marlenc King，今天我想与大家探讨酶法测肌酐的优越性，Radox 酶法测肌酐的特点和我们这一方法学的外界评价。



肌酸在肾脏、肝脏和胰腺通过酶催化合成。然后被转运到其它器官，如肌肉和脑，在那些地方磷酸化生成磷酸肌酸，这是一种具有高能磷酸键的化合物。

在磷酸肌酸酶肌数与肌酸互变的过程中，一些游离的肌酸变成了它的脱水产物，肌酐。

由于肌酐是内源性生成的，而且以一种恒定的速率释放到体液中，故其血浆水平总是维持在一个相当狭窄的范围内。肌酐清除率的测定常做为肾小球滤过率的指标。

对于进行性的肾功能衰竭病人，临床医生常以肌酐清除率作为是否或怎样给药的指标，特别是那些通过肾脏清除、具有潜在毒性的药物。

由于血浆肌酐测定较肌酐清除率方便、快捷，单独测定血肌酐，再结合病人体重、年龄和性别可通过一个计算图表产生肌酐清除率的估计值。这就是本张幻灯片所示的估计方法。但使用这种利用图表结果解释的方法应非常小心，尤其对于肥胖病人是不适用的。

肌酐测定
• 同位素稀释质谱法 / 高效液相色谱法
• Jaffe 反应
• Trinder 反应
• Radox 酶法测定

肌酐测定的方法有 HPLC 法，Jaffe 法，传统的 Trinder 反应和 Radox 方法。

HPLC:

Randox 酶法测定肌酐原理

原 理



在这一试验中用肌酐脱亚氨酶将肌酐转变为氨和 N - 甲基内乙酰脲。氨离子在 α - 酮戊二酸的存在下由谷氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸。NADPH 作为辅酶清除了内源性干扰。NADP⁺ 的生成量与样品中的氨的水平成正比。任何内源性的氨的干扰都将在予孵育期间（延滞期）被清除。这一期间所涉及到的反应同上，只是体系中不存在肌酐脱亚氨酶。该反应在 340nm 监测。

样品中存在的任何内源性氨通过在加肌酐脱亚氨酶之前体系中所存在的谷氨酸脱氢酶清除。由于 NADH 的氧化所引起 340nm 吸光度的下降与氨的浓度成正比，而氨的生成与肌酐的浓度成正比。

胆红素干扰

回收率%

胆红素 (mg/dl)

当使用下列方法时存在胆红素干扰

- ◆ Jaffe 方法
- ◆ Trinder 酶测肌酐法

从这一室内研究显示酶 Trinder 反应法受胆红素干扰而 Randox 肌酐酶法不受干扰。

抗坏血酸对正常血清的干扰

回收率%

抗坏血酸 (mg/dl)

- Jaffe 方法受抗坏血酸干扰
- Randox 酶法肌酐测定不受抗坏血酸干扰
- Trinder 的酶法受抗坏血酸干扰，但在 R₁ 试剂中含有抗坏血酸氧化酶的精典酶法 Trinder 反应中无抗坏血酸干扰。

因为已知抗坏血酸是非肌酐色原，我们用其评价对我们方法的干扰。Randox 产品在 150mg/dl 以下没有干扰。但在 Jaffe 方法和 Trinder 酶法都可见明显干扰。

药物干扰

- Randox 酶法测肌酐研究显示 30 种药物无干扰
- Randox 酶法测肌酐是唯一不受胆红素和药物干扰的酶学肌酐测定法。
- Randox 进行了一系列药物干扰的研究。我们还明确了 30 多种药物对该方法没有干扰。

这一酶法测定肌酐是唯一不受内源性氨、胆红素或药物影响的方法。

外界证实

- Harmoinen, A. P. T. J. Clin Chem. Clin, Biochem 1996:34:975-926.
- 在芬兰 Tampere 大学医院进行了 Randox 酶法肌酐试剂与 Johnson & Johnson 的干化学肌酐测定的比较。
- 胆红素干扰资料的确证
- Randox 酶法肌酐与 HPLC 法大的比较。

外界评价 Randox 酶法肌酐试剂是以一台日立 911 生化仪为参考的。这一工作在芬兰 Tampere 大学医院进行。包括胆红素干扰的评价，与 HPLC 方法的比较和与 J & J Vitros 干化学法的比较。

与 HPLC 的比较

- 这一研究显示 Randox 酶法肌酐试验与 HPLC 法具极佳的相关性

$Y = 0.98x + 1.4$

$\gamma = 1.00$

$h = 100$

肌酐(Randox) (μmol/L)

肌酐(HPLC) (μmol/L)

外界研究发现 Randox 与 HPLC 有极好相关性。100 个样品所得到的相关方程其γ为 1.00

Metamizol 干扰研究

这一研究显示止痛药 Metamizol 对于化学法有干扰，但对 Randox 酶法测肌酐无干扰。

肌酐($\mu\text{mol/L}$)

Metamizol (Litalgin) (mg/L)

这一芬兰的研究也显示 Randox 试验不受止痛药 Metamizol 干扰。这一发现正如幻灯所示。

在一定的肌酐浓度下当使用 Metamizol 时，其代谢物甲基-氨基-氨基比林干扰干化学法（如图空心符号所示）但不影响 Randox（实心符号）

为什么用 Randox 酶法测肌酐

- 高特异性
- 无胆红素，抗坏血酸和许多药物干扰。

Randox 酶法测肌酐具有高特异性，因为它不受非肌酐反应色原如抗坏血酸的干扰。

它是不受胆红素或药物干扰的唯一方法。

何时选择 Randox 酶法肌酐试剂

何时做这个试验：

- 儿科样品（黄疸）
- 含有如 Metamizol 这类药物的样品
- 来自透析病人（药物治疗）的样品

(1) 儿科或黄疸样品（那些样品胆红素水平升高）应当用 Randox 酶法测肌酐试剂。

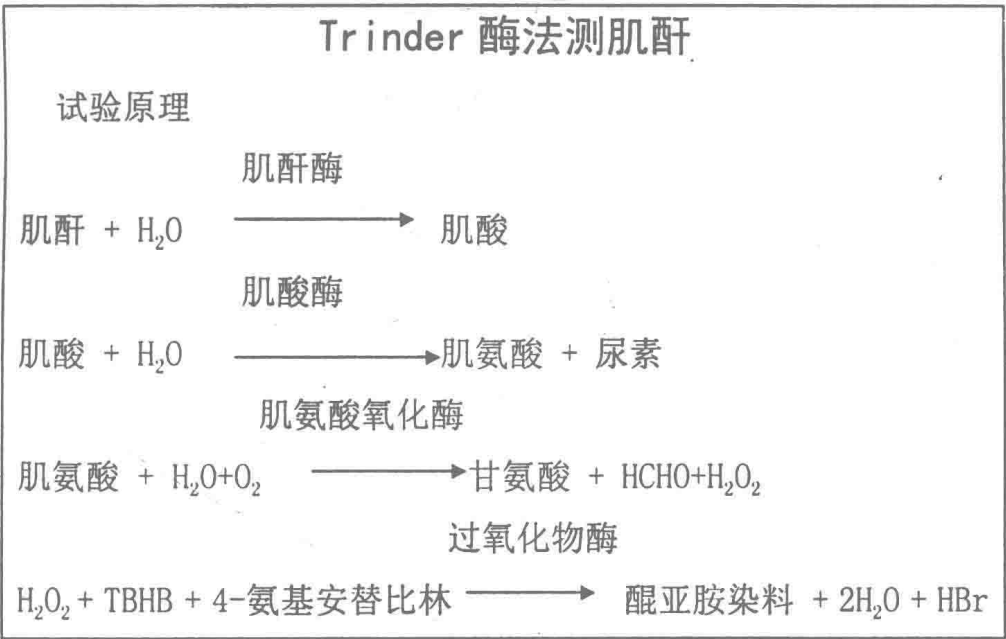
(2) 因为透析病人在用药物治疗，这一选择将不存在药物干扰。

血清肌酐测定的决定性方法是同位素稀释质谱法。与这一决定性方法相联系的参考方法是离子交换高效液相层析，于紫外光区 234nm 处监测。

Jaffe:

反应发生在肌酐与在碱性介质中形成的苦味酸盐离子之间，结果形成一桔红色的化合物。人们早已知道对于测定血浆肌酐来说 Jaffe 反应是非特异的。因为很多肌酐物质 Jaffe 反应也可显色，如蛋白质、葡萄糖、抗坏血酸、胍类、丙酮和α-酮酸。而胆红素和它的代谢产物产生一阴性的干扰。

人们尝试用各种方法来改善 Jaffe 反应的特异性,如手工方法中采用蛋白测定步骤或加入十二烷基磺酸钠形成不反应的蛋白复合物.在初始反应后采用速率法测定 25~60 秒的动力学方法也可改善 Jaffe 反应的特异性。



酶法:

肌酸酶（肌酸酶、脱亚氨酶）和肌酐水解酶通常单独或组合应用。

使用肌酸酶的方法易受高水平的内源性氨和肌酸影响。

要清除这一干扰可使用肌酐脱亚氨酶，将肌酐降作为肌酸，肌酸再通过催化生成肌氨酸。

肌氨酸再通过肌氨酸氧化酶氧化为甘氨酸，甲醛和过氧化氢。生成的过氧化氢通过过氧化物酶催化染料反应而测定。其生成量与样品中的肌酐成正比。

免疫浊度测定法

MARLENE KLING B. SC. (HONS.)

Randox Laboratories, U. K.

免疫浊度测定法

- ◆ 测定方法发生了变化
- ◆ 从象 Beckman Array 这种特殊仪器上应用过渡到应用于临床化学分析仪
- ◆ 可进行大批量样本测定
- ◆ 由 RANDOX 研制的产品

免疫浊度测定特种蛋白的测定方法已发生了变化，很多可用临床常规生化仪检测，而不需要特殊象 Beckman Array 这样的特殊仪器。

可更常规化地测定大批量标本。

RANDOX 实验室多年来致力于开发免疫浊度测定试剂盒，近年来已开发出铁蛋白，补体 C₃, C₄，酸性糖蛋白和脂蛋白 a 的测定试剂。

现有 RANDOX'S 免疫浊度测定试剂盒

免疫比浊法

- ◆ 载脂蛋白 A
- ◆ 载脂蛋白 B
- ◆ C 反应蛋白
- ◆ IgA, IgG, IgM
- ◆ 微量白蛋白
- ◆ 转铁蛋白
- ◆ 酸性糖蛋白
- ◆ C₃
- ◆ C₄

胶乳增强的免疫浊度测定法

- ◆ ASO
- ◆ CRP
- ◆ 铁蛋白
- ◆ 脂蛋白-a
- ◆ 肌红蛋白

本幻灯展示了 RANDOX'S 免疫浊度测试的全部测定项目，所有试剂都为液体稳定试剂，RANDOX 的试剂已分类化。

免疫比浊法与胶乳增强的免疫浊度测定法。

免疫散射比浊测定法

- ◆Ag-Ab 反应形成一复合物
- ◆通过测定散射光强度变化而进行定量分析
- ◆需要使用特殊仪器

Beckman Array 所用分析系统的设计原理是采用免疫散射比浊测定法。

Ag-Ab 反应形成一复合物，此复合物的量可通过测定散射光的强度变化而得知，散射的强度与样品中抗原的浓度成正比。

本法的主要缺点是需要使用特殊的测试仪器。

免疫比浊测定法

- ◆Ag-Ab 反应形成一复合物
- ◆透过样品之光线的吸光度可进行定量
- ◆易应用于常规临床生化分析仪
- ◆不需要特殊仪器。

RANDOX 试剂盒使用免疫比浊测定法，同样是 Ag-Ab 反应形成一复合物，但其与免疫散射比浊法的不同点在于在 340nm 波长监测，直接透过样品后的光吸收。

由于本法不需要附加的仪器设备，因而易于被临床生化仪采用。

胶乳增强的免疫比浊法

- ◆基本原理同免疫比浊法
- ◆胶乳颗粒用于增强样本的光吸收，从而提高测试的灵敏度。

正如前面的幻灯所示，RANDOX 在某些项目测定中应用了胶乳增强的免疫比浊法，该方法对于提高某些低浓度蛋白质测定的灵敏度十分必要，在 ASO 和 RF 测定中，将抗体连接于胶乳颗粒上可增强 Ag-Ab 复合物在 700nm/546nm 测定时的吸光度。

CRP 灵敏度

CRP 胶乳增强 标准曲线	CPR(免疫比浊) 标准曲线
0-5mg/L	0-200mg/L
$\Delta\text{AbS}: 0.0014-0.4938$	$\Delta\text{AbS}: 0.03-0.5081$

本幻灯显示了 RANDOX CRP 测定的标准曲线，从以上两条标准曲线的对比中可看出，当胶乳增强免疫比浊法与免疫比浊法在 CRP 测定中有几乎相同的吸光度变化值时，前

者的 CRP 实际含量明显少于后者。

新生儿感染

- ◆Nishida,A, Kitasato Mechcine 1986, 16, 402-413
- ◆胶乳增强的免疫比浊法测定 CRP
- ◆及时准确诊断感染的发生
- ◆提前 12-48 小时早期诊断
- ◆缩短抗生素治疗时间

CRP 胶乳增强的免疫比浊法对新生儿感染的早期诊断，有足够的特异性与灵敏度。CRP 含量为 1000ug/dl 时即可被检出，正如前面幻灯所示，只有胶乳增强的免疫比浊法才可达到对此微量物质测定的灵敏度。

本法对新生儿感染的诊断较传统方法提早 12-48 小时。

在抗生素治疗期间通过监测 CRP 含量的升高与降低，可使抗生素的使用时间缩短。

C-RP

- ◆当心肌梗塞发生后，因组织损伤 CRP 含量迅速升高
- ◆监测手术后的恢复情况(如发现感染等合并症)
- ◆CRP, 纤维蛋白原及铁蛋白的升高常与冠心病发作的危险有关
- ◆《临床化学》1997, 11:2017-2018

在近期的《临床化学》杂志提出 CRP 检测在一些其它领域也很有价值。其一是心肌梗塞，由于组织损伤会出现 CRP 迅速升高。

CRP 也可用于监测手术后病人的恢复情况。

Randox 免疫比浊测定

- ◆高灵敏度
- ◆液态稳定
- ◆易于实现自动化

稳定的液体试剂

Marlene King B.Sc (Hons)

稳定液体试剂的优点

- 无需复溶
- 准备工作少
- 组分有很好的一致性
- 绝少污染危险
- 稳定性好
- 浪费少

准备液体试剂只需很少时间

对于工作繁忙的实验室，用此种准备好立即可上机的试剂很省时
可以观察到试剂有很好的一致性：

1. 配制后的试剂无瓶间差
2. 不可能出现加错试剂体积的现象

3. 某些公司生产的冻干试剂是需要用水复溶的。但在不同的国家，不同的实验室，甚至每日所用的水的质量存在很大的变异，这可减低工作试剂的稳定性。但稳定的液体试剂排除了这个问题。

液体试剂可稳定到保存期，而冻干试剂复溶的工作试剂只能稳定几天到几周。
在使用中可发现很少浪费试剂，因为你只需用你需要的量而不必倒掉在稳定期内还未用过的试剂。

液体试剂的进展

- 质量应永远放在第一位
- 研究项目不断进行
- 已有 40 多种可应用的液体试剂

稳定的液体试剂已用了相当长一段时间，但某些试剂性能较差使用户没有信心。

性能较差的原因是由于原料质量较差引起的，这种原料进而又使试剂的实际稳定期亦受到限制。

在研制发展液体试剂时最重要的是把质量放在第一位。

Randox 在不断进行的研究项目中始终保证质量不衰。

迄今我们已研制和生产了 40 多种生化试剂。

Radox 液体稳代谢物测定试剂盒

- 白蛋白
- 胆红素
- 胆固醇
- 肌酐
- 总蛋白
- 葡萄糖(己糖激酶和葡萄糖氧化酶)
- 尿酸
- 尿素
- 甘油三酯

这张幻灯片显示的 Radox 液体稳定试剂的项目名称。

Radox 液体稳定电解质测定试剂盒

- 钙
- 镁
- 无机磷
- 铁

液体稳定试剂应达到的要求

- 试剂必须稳定至保存期
- 最佳的国际推荐配方(IFCC)
- 在线(开瓶后)的稳定性评价
- 无干扰物
- 要有方法学比较
- 进行真实的时间监测

本幻灯片显示的是 Radox 公司在液体稳定试剂售出之前所必须做的工作。

方法推荐：在发展试剂之前，必须考虑采用国际推荐方法，因为这将影响试验的最佳化。

在线评价：即将上市的试剂通常在 1 个月前已在生化仪上进行在线监测，先期进行测试。

干扰研究：对各种干扰，如甘油三酯，血红蛋白，胆红素，进行了研究。

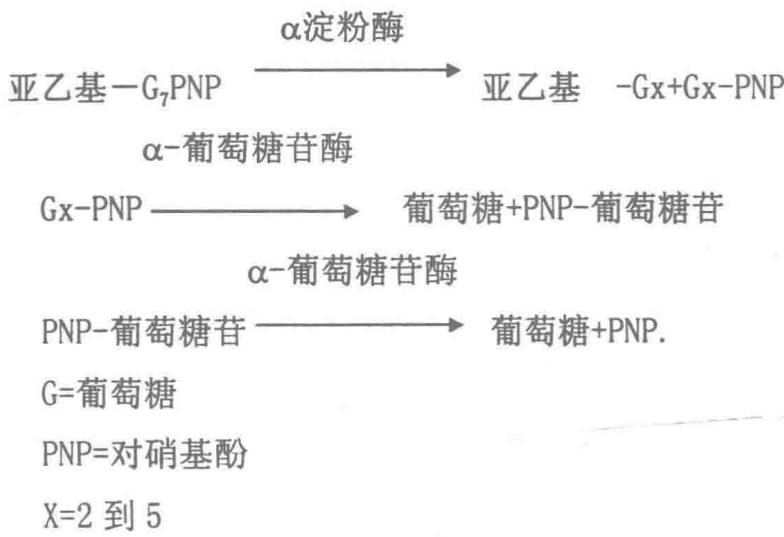
试验最佳：准确性、灵敏度、精密度和线性在开发试剂的每一个阶段都要评价。

方法学比较：在满足上述标准后，试剂要与 Radox 冻干试剂和/或其它商售试剂

比较。

真实时间监测：为使稳定性研究资料生效，应在 4℃条件下监测试剂成品的本身贮存期。

淀粉酶



下面一些幻灯将显示 Randox 新的液体淀粉酶试剂盒发展的进程。

线性评价

线性：淀粉酶（97 年 10 月 22 日）

试验方法好的标准之一是线性，我们发现我们液体试剂的线性是 2000U/L。

血红蛋白干扰

血红蛋白干扰：淀粉酶（97 年 10 月 21 日）

- Competitor
- ◇ Randox (原始的)
- ▲ Randox (改进后的)

在最初关于血红蛋白干扰的研究中我们发现我们的试剂在血红蛋白的痕量水平时就受到干扰。我们后来改进了试剂并再次评价，结果发现血红蛋白直到 10mg/dl 都无干扰。

胆红素和甘油三酯干扰的研究

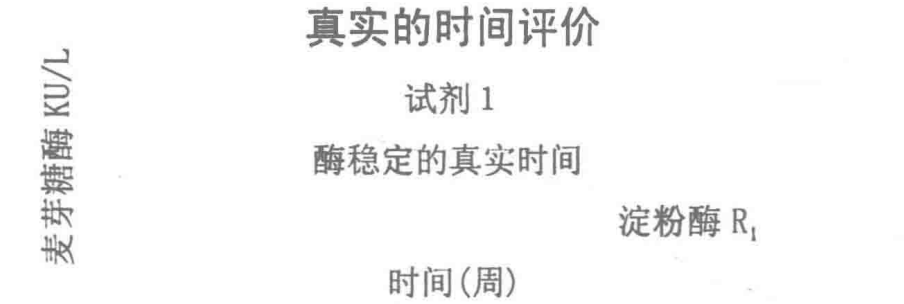
胆红素干扰：淀粉酶 甘油三酯干扰（98 年 1 月 8 日）

- 胆红素达 10mg/dl 无干扰
- 甘油三酯达 1500mg/dl 无干扰。

胆红素和甘油三酯干扰研究显示胆红素达 10mg/dl，甘油三酯达 1500mg/dl 无干扰。

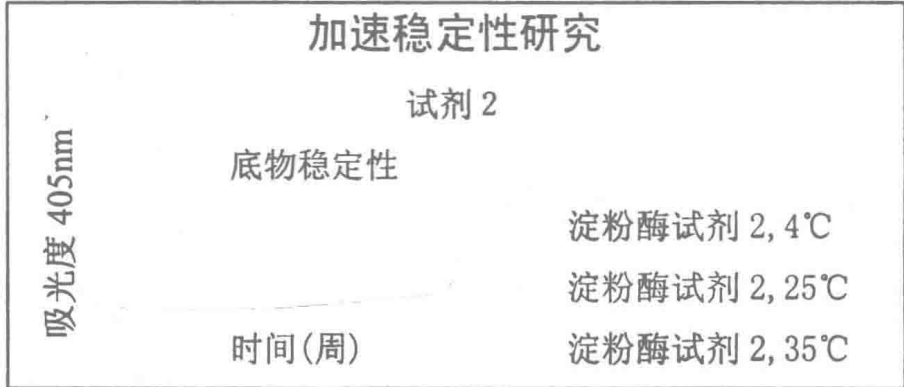


为保证试剂在不同环境中的稳定性，将试剂分别存放于 25℃、35℃6 周，在此期间进行关于质控血清的回收试验来检查，因为麦芽糖酶是需要稳定的成份，故它的活性也被监测。可以发现试剂在 6 周内是稳定的。



为监测真实时间，我们定期地检测了稳定的麦芽糖酶水平，还做了回收率和线性测定。

如图所示酶的稳定性在贮存于+2℃~+8℃条件下可达到 42 周。



底物的加速稳定性研究在 25℃和 35℃条件下监测了 5 周。在此期间进行了关于质控血清的试验回收率检查。由于底物是需要稳定的组分，故其吸光度也被监测。

可以发现试剂稳定 5 周。

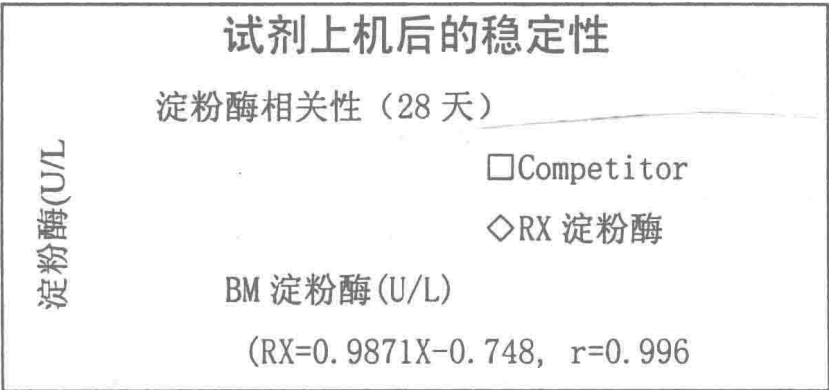


为监测真实时间，我们测定了底物的吸光度，同时还测定了回收率和线性。

如图所示在贮存于+2℃~+8℃条件下酶可稳定到 43 周。



我们以我们的液体试剂与其它商品试剂盒进行方法学比较。回归试验是
 $Y(Randox)=1.0829X-4.478$ $r=0.995$ 。



试剂在日立 717 机器上处于在线状态, 比较二种试剂的相关性, 可以发现试剂稳定 28 天。

- 新的 Randox 液体稳定酶试剂**
- 丙氨酸无氨取氨基转移酶
 - 天门冬氨酸氨基转移酶
 - 淀粉酶
 - 胰淀粉酶
 - 尿素

在我们液体淀粉酶试剂开发的同时, 我们充分认识到液体稳定试剂的市场需求, 我们以同样的标准着手以下液体试剂的开发:

ALT、AST、AMY、胰淀粉酶、尿素

谢谢大家!

载脂蛋白 AI. B 测定若干问题

卫生部北京老年医学研究所 李健斋

关于载脂蛋白 apo AI 与 apoB 的测定方法,我们於 1986 年推出火箭电泳法,1987 年举办学习班推广免疫透射比浊法。九十年代以来国内陆续出现若干商品试剂盒,多数也用透射比浊法,但在方法学上没有明显进步,相反的有的试剂盒质量差,试剂配方及所制定的操作方法不合理,校准液的定值不准确,在商品推销中存在不公平竞争等等问题。

除了方法学问题外,在临床应用上也存在认识上的偏差。有人以为 apo AI 既是 HDL 的主要蛋白质,则测定 apo AI 就可以代表 HDL,不必再测 HDL-C 了,或以为测 apo B 就可以代替 LDL-C,这种观点是不正确的。以 apo B 为例,每一个 VLDL、LDL 与 Lp(a) 颗粒中都只含一个分子 apo B,但血清中 LDL 颗粒占多数,apo B 基本上反映 LDL 颗粒的多少。LDL 颗粒大致可分为大而轻(LDL₁)与小而密(LDL₂)两类,在小颗粒 LDL 明显增多时,LDL-C 可以正常但 apo B 增高,所以这两项指标是不能互相取代的。HDL 更为复杂,每一 HDL 颗粒大约含 3-4 个 apo AI 分子,但其所携带的胆固醇量是可变的,它受 LCAT、CETP、HL 活力及其他因素的影响,高甘油三酯血症可以使 HDL-C 减少而 HDL-TG 增多,所以 HDL-C 代表 HDL 携带胆固醇的代谢状态而 apoAI 则反映 HDL 的颗粒数,两者也是不能相互取代的。在冠心病危险因素分析中,目前仍以测定 LDL-C 和 HDL-C 为主。apo B 测定的重要性日益受到重视,尤其是 LDL-C 不高,apoB 明显增高时可以估计有强致病作用(致动脉粥样硬化)的小而密 LDL 增多。

临床上对 apo 测定应用价值的评价受方法学的影响,与能否准确测定有密切关系。现在有些地方临床医生反映 apoAI、B 测定报告往往是接近平均值范围的数据,应该高的不高,应该低的不低,没有临床参考价值。为什么造成这种局面呢?其原因不外乎试剂质量低劣,配方与操作程序不合理,检验人员因为工作量大,有只图操作简便而放弃准确性要求的偏向。为了提高比浊测定 apoAI、B 的准确性,建议试剂生产厂家及检验人员重视下列基本要求,纠正不正确的做法。

1、选用优质抗血清:要求效价与亲和力高,特异性与稳定性好,与其他 apo 没有交叉反应,例如抗 apo AI 血清不应与 apo AII 有交叉反应,所以作为免疫源的 apo AI 应达到色谱纯与免疫纯。用纯化的抗体有利于减少基质效应。

2、合理的测定方法设计:

(1) 最好采用国际通用的试剂配方与操作程序;

(2) 最好用双试剂法;

(3) 手工及半自动操作时必须设血清空白管。自动分析中应在加入试剂后自动减去空白读数；

(4) 剂量反应曲线往往不通过零点或不成直线，应作 4-5 点定标。单点标准只能在特定条件下采用；

(5) 血清用量要小，如 apoAI 测定一般 0.5~2 μ l, 不预稀释难于准确加样。血清预稀释还有利于充分暴露抗原位点，减少基质效应。直接用较多的血清还可能出现抗原过剩。

3、测定结果要符合标准化要求，这就需要有正确定值的校准血清。目前国际上已有 WHO-IFCC 的 apo AI 及 apo B 参考血清。

SP1-01 为冻干的混合人血清，其 apo AI 定值为 $1.50\pm0.08\text{g/L}$ 。

SP3-07 为液态混合人血清，其 apo B 定值为 $1.22\pm0.02\text{g/L}$ 。

这项研究由美国华盛顿大学西北脂类研究实验室完成。我们已通过 WHO-IFCC 参考血清靶值转移实验，取得了转移合格证书，所制备的液态定值人血清已在国内应用。

为避免基质效应，标准血清越新鲜越好，不能外加脂蛋白成份，所以难于制备得高值血清，目前只能用一份定值血清作不同稀释度制作剂量反应曲线。