

临床化学 常用项目 自动分析法

韩志钧 主编
李树中
田维发

■ 辽宁科学技术出版社

主编 韩志钧 李树中 田维发

编者 (以文章先后为序)

郭兑山	郭仁发	陈淑珍	李树中
韩志钧	李忠信	信爱军	吕凤昌
李世卿	王 森	徐卫红	徐 钧
李正求	舒继铎		

前 言

由于近年来微电子技术的发展,使得临床化学分析仪有长足进步,相应的测定方法随之有很大改进。在“临床化学分析仪导论”编写之后,国内同道纷纷建议再编写一本有关测定方法的书,这样可相辅相成,使之更加完善。因为受到大家鼓励,才在“导论”出版之后,又组织 15 名同志共同编写了这本方法学方面专著。

临床化学检测项目繁多,如作全面介绍,在内容及篇幅上将是非常大的,这是能力及财力所不允许的。最后作者抓住了临床化学常用项目这个范围进行编写。所写 39 个测定项目,可以说是最常用的。如果有关问题讨论清楚了,就可以全面提高检验日常工作质量。所谓不常用项目的测定方法学问题也可迎刃而解。

提到各项目测定方法,那真是五花八门。此次作者只选用适合自动分析的方法。有些项目适合自动分析的方法也很多,有些甚至存有争议。遇到这样问题只好选取那些国内外多数采用的方法。本书各章节都是由有实践经验的同志编写。

在每个测定方法介绍中,都安排了对该方法的评价和讨论。其中引用了很多国内外试剂说明书中资料,其可信程度取决于原材料科学性。因此希望同道在使用这部分材料时,必须采取慎重态度。事实上本书只是提示评价方法,有些评价需要自己做出。

每个测定项目都列举了正常参考值。关于正常参考值历来存有争议。编者只是列举各种资料报告的参考值或期望值供参考。这些参考值很显然受测定方法、测定仪器和所测定人群的影响,因此特别强调每个试验室必须自行用所用仪器和相应试剂确定本地区

人群的正常参考值。

自动分析涉及到试验程序和参数,这是由测定方法和仪器性能所决定的。各个仪器性能上有简有繁,因此很难找出一个适合所有仪器的共同参数。这样编者只好以性能较好,国内应用较早较广的 ENCORE 临床化学分析仪、monach™化学系统、COBAS FARA 全自动生化分析仪为例,说明参数选择与确定原则,供其他类型自动生化分析仪参考。读者可根据各自仪器性能选择和确定有关参数。对那些性能简单的分析仪,有些参数如对试剂监控、结果评价……等只好靠操作者人工完成。

在本书编写过程中,更使我们认识到占有资料及享有经验的重要性。由于搜集资料不够多,再加总结经验不够,这肯定影响本书的质量。作者只希望本书起抛砖引玉作用,引起大家对试验方法的重视和讨论。敬希同道对书中不足甚或是错误,提出批评指正。

在编写过程中受到辽宁省检验学会、空军沈阳医院领导、姜永新教授、曾玉明教授、闫佩珩教授的支持和鼓励,借此表示衷心感谢。

编 者

1991年3月于沈阳

目 录

前 言

第一章 临床化学自动分析法概要	1
第一节 终点分析法	1
第二节 比例两时间分析法	3
第三节 比例两波长分析法	4
第四节 吸光度定量分析法	5
第五节 动态分析法	6
第六节 代标准动态分析法	14
第七节 均相酶免疫分析法	14
第八节 比浊分析法	17
第九节 基质荧光标记酶免疫分析法	21
第二章 实验参数的选择与确定	23
第一节 ENCORE™分析仪实验参数选择与确定	23
第二节 Monarch™分析仪实验参数选择与确定	28
第三节 COBAS FARA 分析仪实验参数的选择与确定	43
第三章 临床化学常用项目自动分析法	57
第一节 血清碱性磷酸酶活力测定	57
第二节 血清 γ -谷氨酰基转移酶活力测定	65
第三节 血清乳酸脱氢酶活力测定	72
第四节 血清谷草转氨酶活力测定	82
第五节 血清谷丙转氨酶活力测定	92
第六节 血清淀粉酶活力测定	103
第七节 血清肌酸激酶活力测定	109
第八节 血清 CK-MB 同功酶活力测定	119
第九节 血清 α -羟丁酸脱氢酶活力测定	126
第十节 血清胆碱酯酶活力测定	130
第十一节 血清酸性磷酸酶活力测定	135

第十二节	血清亮氨酸氨基肽酶活力测定	142
第十三节	血清总胆固醇测定	146
第十四节	血清高密度脂蛋白胆固醇测定	159
第十五节	血清(浆)甘油三酯测定	166
第十六节	血液葡萄糖测定	183
第十七节	血清总蛋白测定	196
第十八节	血清白蛋白测定	206
第十九节	血清尿酸测定	212
第二十节	血清肌酐测定	219
第二十一节	血清尿素(氮)测定	226
第二十二节	血清钙测定	237
第二十三节	血红蛋白测定	244
第二十四节	血清氯直接比色测定	252
第二十五节	血清总胆红素测定	258
第二十六节	血清直接胆红素测定	268
第二十七节	血清镁测定	272
第二十八节	血浆 CO_2 结合力测定	277
第二十九节	血清无机磷测定	284
第三十节	血清铁及铁结合力测定	289
第三十一节	血氨测定	302
第三十二节	血清茶碱测定	309
第三十三节	血清前白蛋白测定	314
第三十四节	血清载脂蛋白 B 测定	320
第三十五节	血清庆大霉素测定	328
第三十六节	抗凝血酶Ⅲ测定	333
第三十七节	血清转铁蛋白测定	339
第三十八节	补体单体成份 C_3 、 C_4 测定	348
第三十九节	结合珠蛋白测定	364

第一章 临床化学自动分析法概要

近年来由于微电子技术的进步,使各种自动生化分析仪不断改进,随之方法学也日趋完善。国内已有专著详细介绍。这方面有关知识可参阅叶应妩氏主编的“临床实验诊断学”^[1]及韩志钧氏主编的“临床化学分析仪导论”^[2]。在这里笔者从实用角度出发,把临床化学自动分析法做一概要介绍,以便后面各节叙述。

第一节 终点分析法

这是最常用分析法,因为该法常有标准液,因此又称比例终点法。是经过一定反应时间之后,反应达到平衡(终点)时做的一点分析法。一般是在一定温度下试剂与样品经过一定反应时间,被送入比色系统,然后观测,由微机系统处理计算和打印显示出结果。

各种自动生化分析仪使这种测定更加合理及自动化。

M₁₀生化分析仪是美国实验仪器公司制造带微机的实用型自动生化分析仪。它是使试剂与样品经一定反应时间、一定温度条件下,被吸入流动比色杯,在比色杯内经一定的平衡时间(一般是0—5秒左右),以便消除可能存在的微小气泡,然后比色系统连续读10个读数,求出平均值。同时监测10个读数的标准差,如超出两个标准差时将打印出警告,提出信号以便操作者处理。如不超出两个标准差就可计算。

Monach™化学系统是美国实验仪器公司制造的高级自动生化分析仪。它采取吸光度测定方法,由石英钨灯产生光源,光源再经折射镜折射传导到每一反应池的上端,光线通过反应混合物时产生光的吸收,透射光通过下光路管,再通过干涉滤光片形成单色

光,只有一个特定波长的光,激发位于光滤波器底的光电倍增管,产生电流信号,透射光的强度与产生的光电流强度成正比,光电流信号通过计算机进行数据处理,显示并打印出每一样品测试的某一物质的浓度或活性。

ENCORE 分析仪是美国 Baker 公司制造的高级自动生化分析仪。它的光源灯泡为石英碘钨灯,波长范围是 290~680nm。由碘钨灯发出的光束在上光路管中经聚焦作用,再经折射镜折射,通过石英比色杯中被检溶液,产生光的吸收。透射光通过下光路管,再通过干涉滤光片形成单色光,照射到光电倍增管上,产生电流信号。透射光的强度与产生光电流信号的强度成正比。光电信号经过模拟/数字转换器变成数字,再传递给微处理机。在电子计算机控制下,每 2 秒读取一次比色杯的吸光度,30 个比色杯以 960 转/分速度自旋,微处理机每分钟对 30 个比色杯共读 28800 次吸光度,经过各种数学运算,求出被检样品含量。

ENCORE 分析仪在做终点法单项测定时,递送盘的 0 位是蒸馏水空白,1 号位是试剂空白,2—29 号位分别是标准、质控和测定。分析测定期间,递送盘和石英比色杯以 960 转/分钟速度旋转。当转子开始转动产生离心力,将试剂和样品甩到比色杯内并在规定的混合时间内混匀,比色杯有恒温装置,比色杯内的反应物在恒温下进行反应,电子计算机控制下,每 2 秒钟对每一个比色杯监测并收集一次数据。在 T_b 时读取空白吸光度 A_b ,定时空白的 T_b 常为 4 秒,即当样品及试剂混匀进行反应的第 4 秒钟,此时反应产物尚未生成,所得空白吸光度代表了每个样品和试剂的空白值。当反应继续进行,快要达到平衡(或终点时),即从 T_i 起,每隔 2 秒钟读取一次吸光度。观察二次吸光度读数的差值是否在线性限度内(终点法的线性限度通常规定为 $1\text{mA}/2$ 秒)。如果差值超过线性限度,则弃去前面数据,重新进行观测。达到要求后开始 T_w ,收集 T_w 期间所有的数据,求出该比色杯的吸光度平均值 $\bar{A}$ 。此值减去空白读数 $(\bar{A}-A_b)$,并对水空白、试剂空白进行校正,得到该杯的测定值。

然后将未知样品的测定值与标准管的测定值进行计算,得到测定结果。

这里注意空白处理。为了提高测定的准确性,测定和标准的吸光度均应减去样品空白、试剂空白、吸光度。各种自动生化分析仪处理空白方式不尽相同。ENCORE 分析仪设计了三种空白方式,即定时空白、储存空白及连续空白(详见 ENCORE 分析仪参数节)。

终点分析法采用以下计算公式:

测定结果 = (未知吸光度 - 试剂空白吸光度) × 因数

因数为标准浓度和标准吸光度改变之比

标准吸光度改变 = 标准吸光度 - 空白吸光度

如需减去样品空白,那么计算公式是:

测定结果 = (未知吸光度 - 未知空白吸光度) × 因数

因数为标准浓度和标准吸光度改变之比

标准吸光度改变 = 标准吸光度 - 标准空白吸光度

第二节 比例两时间测定法

比例两时间测定法原则上也属比例终点测定法。它所不同的是对测定及标准采用两个时间测定。

目前多数自动分析仪还是用 Jaffe 氏反应测肌酐,即肌酐能同碱性苦味酸盐生成红橙色化合物。这个反应特异性不高。维生素 C、丙酮酸、丙酮、葡萄糖、乙酰醋酸、果糖、氨基马尿酸、蛋白质、胍基醋酸内酰胺及很多其他反应产物亦能与碱性苦味酸盐生成红色。这些能与碱性苦味酸起反应的物质称假肌酐,而不是肌酐。在红细胞、血清或血浆及尿液中假肌酐约各占 60%、20% 及 5%。为测定血液“真性肌酐”,除采用血清及其无蛋白滤液而外,又利用“真假肌酐”同碱性苦味酸盐反应速度方面差异,测所谓“真性肌酐”。真性肌酐反应快,假性肌酐反应慢。GEMSTAR™ 生化分析仪是在样品与碱性苦味酸试剂混合后 25 秒和 1 分 25 秒在 500nm

处测吸光度变化。两时间吸光度变化之差,则为特异反应肌酐浓度。

比例两时间测定法计算公式为:

$$\frac{[(A_{ut2} - A_{RB2}) - (A_{ut1} - A_{RB1})] \times SC}{(A_{st2} - A_{RB2}) - (A_{st1} - A_{RB1})} = UC$$

这里:

UC=未知样品浓度

SC=标准浓度

A_{ut1} 为第一个时间读取未知样品与试剂混合体吸光度

A_{ut2} 为第二个时间读取未知样品与试剂混合体吸光度

A_{st1} 为第一个时间读取标准与试剂混合体吸光度

A_{st2} 为第二个时间读取标准与试剂混合体吸光度

A_{RB1} 为第一个时间读取试剂空白吸光度

A_{RB2} 为第二个时间读取试剂空白吸光度

第三节 比例两波长测定法

比例两波长测定法原则上也属终点分析法。所不同的是对测定及标准采用两种不同波长测定,借以消除实验影响。

目前测定血清葡萄糖多利用酶测定法。在已糖激酶存在时,葡萄糖同 ATP 反应,伴随着葡萄糖-6-磷酸和 ADP 生成。葡萄糖-6-磷酸同 NAD 反应,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶存在时,生成 6-磷酸葡萄糖和 $NADH_2$ 。 $NADH_2$ 在 340nm 有强吸收而 NAD 没有。产生 $NADH_2$ 总量同葡萄糖存在的最初量成正比。为了消除溶血对测定影响,在 340nm 和 380nm 测吸光度。因为血红蛋白在 340nm 和 380nm 呈现相同吸光度。在 340nm 和 380nm 两波长测定反应的吸光度之差同葡萄糖浓度成正比。

在自动生化分析仪无机磷测定时多采用改进 Daly 和 Eting chausun 氏改良法。该法主要使用表面活性剂,无须除蛋白。在酸性

条件下钼酸铵同血清里磷反应,形成非还原性磷钼酸化合物,在340nm吸光度变化同磷含量成正比。为了消除溶血影响,也在340nm和380nm两波长测定吸光度。

在计算时基本相同于比例两时间测定公式,所不同的是将两时间改变成两波长。如无机磷测定公式如下:

$$UC = [(A_{u340} - A_{RB340}) - (A_{u380} - A_{RB380})] \times QC \text{ 因数}$$

$$QC \text{ 因数} = SC / (A_{m340} - A_{RB340}) - (A_{m380} - A_{RB380})$$

这里:UC=未知样品磷浓度

A_{u340} =未知样品在340nm测定吸光度

A_{u380} =未知样品在380nm测定吸光度

A_{m340} =磷标准在340nm测定吸光度

A_{m380} =磷标准在380nm测定吸光度

A_{RB340} =试剂空白在340nm测定吸光度

A_{RB380} =试剂空白在380nm测定吸光度

第四节 吸光度定量法

吸光度定量法也属终点分析法的一种特殊类型。克分子消光系数 ϵ 是物质恒定物理常数,如同有一定熔点、沸点、冰点等物理常数一样可用来检查物质纯度。如还原性辅酶A克分子即mol/L消光系数 ϵ 为 6.22×10^3 ,对硝基苯酚消光系数 ϵ 为 18.5×10^3 ,对硝基苯胺消光系数 ϵ 为 9.9×10^3 。对于已经确定有 ϵ 物质,可导出分光定量系数。即吸光度为1时该物质的浓度,该系数通常简写为E。如果已知该物质的吸光度,再乘以E计算系数,即得知该物质浓度。

$$\text{物质浓度} = (\text{未知吸光度} - \text{空白吸光度}) \times E$$

$$\text{如: } Hb(g/dl) = \frac{A_{HbCN}^{540} \times 251}{11.0 \times 1.000} \times \frac{16114.5}{10000} = A_{HbCN} \times 36.8$$

这里: A_{HbCN}^{540} =HiCN法在540nm波长处测出未知样品吸光度;

251=测定时血液稀释的倍数(血 20 微升加入稀释液 5.0 毫升中);11.0=HiCN 的毫克分子消光系数,此处用其 1/4(原为 44.0);1.000=比色杯光径(此处为 1cm);16114.5=血红蛋白分子量(64458)的 1/4;10000=将毫克/升换算成报告时的 g/dl 的数字;36.8 即为 E 值。在试验条件固定时,采用一定波长及光径比色,E 值应该是固定的,为此,许多型号生化分析仪已经把 E 值作为固定因数贮入仪器中。

必须强调指出采用 E 值计算时,必须固定测定条件,其中波长及光径必须准确,否则将会发生变化。波长及光径变化了,E 值也随之变化。

在笔者接触临床化学常用方法检测中,除上述血红蛋白用分光定量系数外,还可将胆红质测定采用分光定量系数计算。

第五节 动态分析法

目前,酶浓度测定有两种方法。一种是利用核素标记或酶标记等技术直接测定酶蛋白含量,这种方法操作比较麻烦,需要一定的设备和特殊试剂,一般实验室难以实行。另一种方法是测定酶所催化的反应速度,间接计算出酶的含量,称酶活性测定法。

酶活性测定法的基础是:酶浓度(E)与产物浓度(P)或底物浓度[S]的变化成正比例。

$$[E] = K \frac{-[S]}{t} \quad [E] = K \frac{[P]}{t}$$

式中:t 表示时间,K 为常数

一般情况下,产物浓度和底物浓度的变化是一致的。但从方法学准确,精密要求,以测定产物的生成量比较合理。因产物在反应体系中是从无到有,其生成量能准确反应酶的催化活性。测定底物减少量常常不易达到精确。因为反应体系中使用的底物是过量的,测定酶催化反应的初速度,反映底物从 100%降到 99%,即 1%的

底物变化,只有用高精密和准确的方法才有可能,而且测定的相对误差仍将相当大,尤其在酶活力低时。相反,要检出从 0 到 1 的产物浓度变化,只要检测方法灵敏,测定的准确度可以很高。故酶活力测定大多数是采用测产物生成的速率,计算酶的活力。

在酶促反应过程中,不是任何时期的反应速率都和酶浓度成正比。当酶促反应刚开始,底物处于过量状态,酶与底物开始结合,生成复合物(ES),底物浓度开始下降,此时产物尚未生成。当复合物(ES)分解,生成产物(P),酶促反应速度急骤上升,经过很短的作用时间后,产物的生成量或底物的减少量与反应时间成线性关系,反应速度保持恒定不变,这一时期称为零级反应期。随酶促反应继续进行,底物不断消耗,酶促反应条件逐渐变化,酶促反应速度逐渐减慢,产物生成量或底物减少量的变化曲线逐趋平坦,这一时期称为一级反应期。此时的反应速率常常不能准确反应酶的含量。

众所周知,底物浓度对酶促反应速度有很大影响,只有当底物浓度大大超过酶饱和度时,酶促反应速度才能保持恒速,此时的酶促反应速度和酶浓度才有线性关系,因此,测定酶活性的基质液中底物浓度应当是 K_m 值的 10—20 倍,这样才能保证高酶活力的标本被准确测出。

根据上述酶活力测定的要求,只有在零级反应期,单位时间内吸光度变化值才与酶浓度成正比。目前手工操作测定酶活力的方法,大都是在实验条件较差的情况下建立的。一般是将基质液与检品混合,在一定温度下作用一定时间后,终止酶反应,再测定产物生成量或底物减少量,计算出酶的活力单位。这种方法操作简单,不需要恒温比色装置及定时装置,但无法了解酶促反应的过程,无法确定测定期是否处于零级反应期,而且这一类方法往往孵育时间较长(一般超过 15 分钟),酶促反应的最适条件难以维持,因此测定结果的准确性较差。

临床化学分析仪具有微机控制的恒温比色、自动计时、自动收

集和处理数据的装置,能够自动连续比色并记录酶促反应全过程,因此采用了连续监测法来测定酶活性,大大提高了测定的准确性和分析速度。

连续监测法是通过适当的仪器,连续测定(每 2~30 秒监测一次)酶促反应过程中某一反应产物或底物的浓度随时间变化的情况,在反应速度恒定期间,以单位时间酶反应初速度来计算酶的活力单位。如果反应体系中的产物或底物具有光学特性,可以监测反应体系的吸光度变化值;如果反应底物或产物有电化学活性可以用电化学法加以测定;若反应体系有氢离子浓度变化则可测定 PH 值。因是测定反应速率,故又名速率法。测定是在酶促反应动态期进行,又名动力学方法。我国卫生部临床检验中心推荐采用连续监测法来测定酶活性。

建立连续监测法,首先要观察酶促反应时间曲线,了解酶促反应的全过程,确定延迟期、线性反应期、混合期,以便确定测定开始时间、间隔时间、测定次数等。以碱性磷酸酶为例,对硝基苯酚磷酸盐在 PH10.2,37℃受碱性磷酸酶催化,生成对硝基苯酚,405nm,每 30 秒钟测定一次,连续 360 秒,其吸光值为:

酶促反应时间	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
(秒)												
吸光度	0.04	0.045	0.135	0.185	0.235	0.285	0.335	0.385	0.435	0.485	0.530	0.570
30 秒钟吸光度	0.04	0.045	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.045	0.04
值												

以吸光度为纵座标,以酶促反应时间为横座标作图,即为酶促反应时间曲线。本例中 60 秒前每 30 秒钟的吸光值分别为 0.04,0.045,反应速度逐渐增加,至 90 秒到 300 秒之间,每 30 秒吸光度均增高 0.05,这一期间反应速度保持恒定,即反应产物对硝基苯酚的生成量与反应时间成正比。在这一期间,单位时间(一般以 1 分钟计)吸光度变化值与酶浓度成正比。300 秒后,反应速度开始下降,30 秒钟吸光度值为 0.045,0.04,已经进入混合期,此时的反应速度不能准确反映酶的浓度。本例的酶促反应时间曲线显示,当

样品与基质液混合 37℃ 作用 90 秒之后,才进入零级反应期,因此测定酶活性时,必须经过 90 秒钟之后才能进行测定,即延迟期为 90 秒。300 秒已进入混合期。测定酶活性必须在 90—300 秒之间进行。

酶活力的大小是以酶单位数表示,酶单位是反映在特定条件下,使酶反应达到某一速度所需要的酶量。目前临床化学分析仪一般都采用 1961 年国际生化学会酶学委员会建议的国际单位。即在实验规定的条件下,每分钟催化一个微摩尔底物变化所需的酶量为一个国际单位,以 U/L 表示。临床化学分析仪一般都根据上述国际单位的定义,按照摩尔消光系数来计算酶活力单位,计算公式如下:

$$\text{酶活力 U/L} = \Delta A / \text{min} \times \frac{TV}{\epsilon \times d \times v} \times 10^6$$

$\Delta A / \text{min}$ — 每分钟吸光度变化值

ϵ — 摩尔消光系数

d — 比色皿直径(一般为 1cm)

TV — 反应液总容积(以 ml 计)

v — 样品量(以 ml 计)

10^6 — $1_{\text{mol}} = 10^6 \mu\text{mol}$ 。

临床化学分析仪采用连续监测法测定酶活性一般有两种方式:

一、 两点法:当样品和基质液混合在恒温比色杯中,经过一定反应时间(延迟期)后,进入零级反应期,于 t_0 时进行第一次比色测定,得吸光度 A_0 ,再经过一定酶反应时间后于 t_1 进行第二次比色(在零级反应期内),得吸光度 A_1 ,求 $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ 。

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{A_1 - A_0}{t_1 - t_0}$$

根据 $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ 求得 $\Delta A / \text{min}$,计算出酶活力单位 U/L(见图 1-1)。

二、 多点法:在酶促反应过程中,每隔一定时间(2—30 秒)

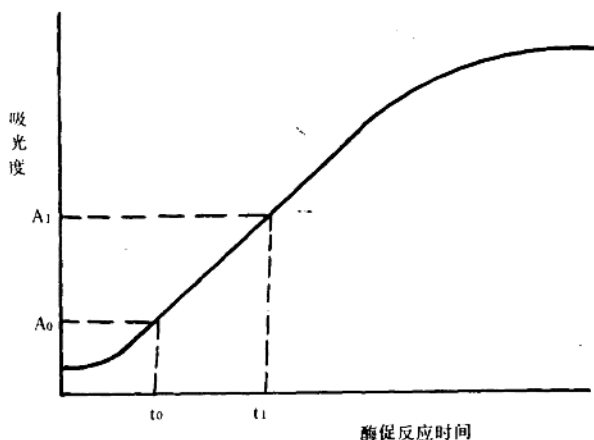


图 1-1 二点连续监测法示意图

进行一次监测,连续多次,在零级反应期间,求出单位时间内的反应速度。

(一) 多点 delta 方法: 求出各点吸光度差异即 $\delta = \Delta A = A_n - A_{n-1}$, 根据 δ 值, 观察反应是否符合线性, 图 1-2 中 δ_1 及 δ_5 值偏小, 而 $\delta_2 = \delta_3 = \delta_4$, 用于计算酶活性。

(二) 回归法: 对获得的多个数据进行回归运算, 求斜率(b)和截距(a), 将斜率值过大或过小的去掉, 如图 1-3 中 b_1, b_5 。取线性部份如图 1-3 中 b_2, b_3, b_4 计算酶活力单位。此种方式, 能对每一个样品的酶促反应曲线进行处理, 因此酶活力不同, 反应曲线不一样, 零级反应期的时间也不完全相同, 需根据具体情况选择线性段, 读取所需数据, 因而增加了测定的准确度(见图 1-3)。

(三) 带速率时间(T_R)的多点法: 在离心式临床化学分析仪测定酶活性时, 血清用量很少, 每 2 秒钟读取一次吸光度, 在如此短的反应时间里, 酶促反应的产物量或底物减少量都很少, 形成的信号微弱, 仪器本身产生一定的噪音, 因此测定的误差较大。为了

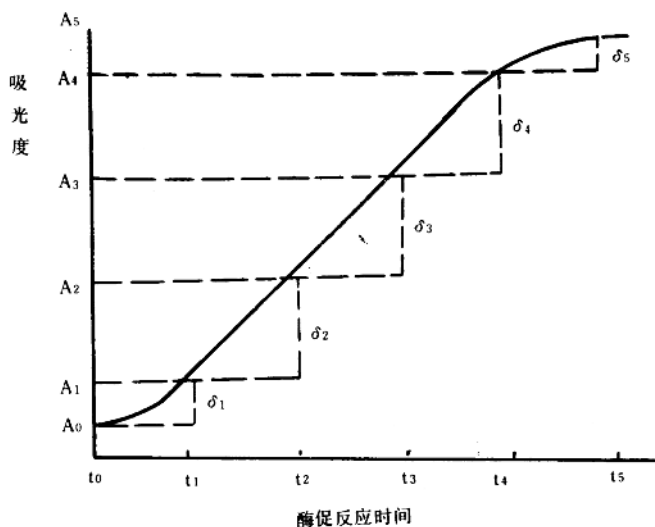


图 1-2 多点 δ 连续监测法示意图

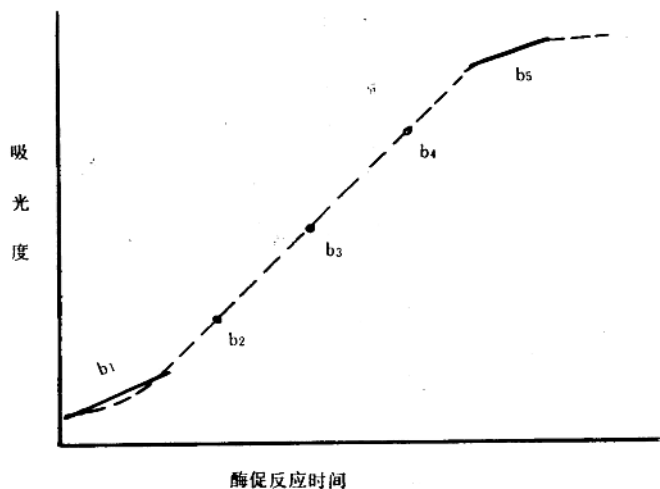


图 1-3 回归连续监测法示意图