

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 355—2011

血清甘油三酯的酶法测定

Guidelines for enzymatic measurements of serum triglycerides

2011-12-14 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考中华医学会检验学会《血脂测定推荐方法》、中华医学会检验分会血脂专家委员会《关于临床血脂测定的建议》制定。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准起草单位：卫生部北京老年医学研究所。

本标准起草人：王抒、董军、陈文祥。

血清甘油三酯的酶法测定

1 范围

本标准规定了血清甘油三酯酶法测定及其质量保证的基本原则。

本标准适用于临床实验室和流行病学及营养调查中的血清甘油三酯测定。生产厂商制备甘油三酯酶法测定试剂盒也可参照使用。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

分析系统 analytical system

对某检验项目在规定浓度范围内,给出分析结果的一组按规定条件使用的仪器和装置,包括试剂和物品。

[改自 ISO/IEC 导则 99:2007,3.2 测量系统 measuring system]

注 1: 对于临床生物化学检验,分析系统主要由按规定条件使用的仪器、试剂和校准物组成。

注 2: 其他标准(如 GB/T 22576—2008)中的类似概念为“检验程序”,但检验程序包括更广泛内容,对于本标准,分析系统相当于检验程序的分析部分。

2.2

验证 verification

提供客观证据,考虑任何测量不确定度,说明给定事物满足规定要求。

[ISO/IEC 导则 99:2007,2.44]

注 1: 本标准主要是指分析系统的验证,即某分析系统在本实验室的性能是否与规定性能指标或厂商提供的性能指标一致。

注 2: 有关概念是“确认”(validation),即“规定要求”满足指定用途的验证,本标准的验证包含确认的含义。

2.3

甘油三酯 triglyceride

甘油三酯是指甘油的三脂肪酸酯,形成甘油三酯的脂肪酸有多种,因此甘油三酯是一组化合物,而不是分子组成和结构固定的单一化合物。此外,血中还存在着少量甘油二酯、甘油一酯和游离甘油(正常情况下甘油二酯和甘油一酯之和不足甘油三酯的 3%,游离甘油约 0.11 mmol/L)。甘油三酯重量多以三油酸甘油酯(相对分子质量 885.5)计。

3 方法概述

3.1 总甘油测定

目前,临床实验室普遍采用酶法测定血清甘油三酯。首先,用脂肪酶水解甘油三酯为甘油和脂肪酸,然后,以多种方法测定其中的甘油部分。通常先用甘油激酶和三磷酸腺苷(ATP)将甘油磷酸化,生成磷酸甘油或二磷酸腺苷(ADP),用氧化酶或脱氢酶检测磷酸甘油,也有用丙酮酸激酶检测 ADP。多数情况下测定的结果是总甘油,即包括甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯和游离甘油之和。

3.2 去除游离甘油的方法

需要除去游离甘油时,常用以下两种方法:

- a) 外游离甘油空白法:分别用含脂肪酶和不含脂肪酶的试剂分析样品,以测定样品的总甘油和游离甘油,自总甘油中减去游离甘油得甘油三酯;
- b) 内游离甘油空白法,有两种基本模式:
 - 1) 将试剂中的脂肪酶与其他试剂成分分开,样品先与不含脂肪酶的试剂混合,温育后测定吸光度,加入脂肪酶并温育后再测定吸光度,用两吸光度之差计算甘油三酯浓度,多见于使用 NAD/NADH 氧还反应的方法;
 - 2) 仅限于使用 Trinder 反应的方法,第一步试剂除不含脂肪酶外,也不含 4-氨基安替比林,将样品与第一试剂混合并温育一定时间后,加入含脂肪酶和 4-氨基安替比林的第二试剂温育后测定,由于第一步反应系统中不含脂肪酶及 4-氨基安替比林,游离甘油产生的过氧化氢在过氧化物酶的作用下与另一色原(酚类化合物)反应产生无色物质,因此在加入第二试剂之前不需测定吸光度;第二步反应中的脂肪酶可有效消除乳糜样品的混浊,且 Trinder 反应产物的最大吸收波长多在 500 nm 以上,可只做试剂空白,样品混浊对测定结果影响较小。内游离甘油空白法不增加样品和试剂用量,但试剂需分两步加入,也不能获得样品的游离甘油含量。

4 分析系统

4.1 酶试剂

选用的血清甘油三酯酶法测定试剂盒中的酶试剂应能符合以下质量要求:

- 能水解 99% 以上的血清甘油三酯;
- 特异性高,干扰因素少;
- 在 37 °C 与血清反应达终点所需时间小于 5 min,终点时吸光度至少能稳定 60 min;
- 在血清甘油三酯浓度 0 mmol/L~11.29 mmol/L(0 mg/dL~1 000 mg/dL) 范围内,吸光度与浓度呈通过原点的直线关系;
- 试剂溶液在测定波长下的吸光度小于 0.05;
- 在规定温度下保持稳定 1 年;
- 试剂批间差小于 1%。

4.2 校准物质和质控物

酶法测定甘油三酯使用的校准物和质控物应符合如下要求:

- 可使用血清校准物,在测定总甘油的方法中也可使用甘油水溶液校准物;
- 使用校准物的甘油三酯浓度应在我国人血清甘油三酯水平高低划分界限(见附录 A)附近,在所选用的试剂、仪器条件下能使新鲜样品测定结果可溯源到甘油三酯参考系统(见附录 B);
- 使用时应将校准物的温度升至室温并充分混匀。冰冻融化后的血清校准物质可于 2 °C~8 °C 贮存 3 d,不可反复冻融;
- 制备质控物应认真选择原料和工艺,使其具有与样品相同或相似的物理、化学性质,贮存于 -20 °C 以下;如果是冰冻或冻干血清制备的质控物质融化或复溶后应使其温度升至室温,充分均匀;融化后的质控物质可于 2 °C~8 °C 贮存 3 d 不可反复冻融。甘油三酯浓度在我国人血清甘油三酯水平高低划分界限(见附录 A)附近。

4.3 仪器和设备

可选用自动生化分析仪,亦可选用光度计配合移液和恒温设备。所选用的仪器设备应满足以下要求:

- 光度分析系统在 0.1~0.8(500 nm)吸光度范围内的测定不精密度(CV)小于 1%;
- 移液系统的移液不精密度(CV)小于 1%;
- 恒温系统在 25 °C~37 °C 范围内温度变异小于 1 °C。

5 样品采集和处理

5.1 受试者准备

受试者应在取血前 2 周保持平时饮食习惯;近期内无急性病、外伤、手术等异常情况;取血前 24 h 不饮酒、不做剧烈运动;取血前禁食 12 h 除卧床患者外,取血前至少静坐 5 min。

5.2 取血方法

取前臂静脉血,止血带的使用不超过 1 min,避免溶血。

5.3 血样品的处理、贮存和测定前准备

血液样品采取后室温下静置 30 min~45 min 使凝固,避免溶血,1 500 r/min~3 000 r/min(离心力 1 100 g~1 300 g)离心 10 min 后及时吸出血清,置试管中密闭。分离的血清可于 2 °C~8 °C 贮存 1 周。-20 °C 以下可贮存更长时间,用时融化并使其温度升至室温,充分混匀。不可反复冻融。

注:亦可制备血浆用于甘油三酯测定,用乙二胺四乙酸二钠作抗凝剂,血液中抗凝剂浓度为 1 g/L 时血浆甘油三酯浓度比血清低约 3%。

6 测定步骤

6.1 安全措施

血清样品和来源于血液的参考物质、质控物质、校准物质有可能含致病微生物,须避免吞入或与皮肤接触;应按有潜在生物传染性样本对待,使用时遵循生物安全规则,并根据规定对废弃物进行处理。

6.2 测定程序及测定结果的表述

准备或开启仪器设备。按商品试剂盒说明书规定的样品-试剂比例、反应温度和时间及光度测定条件,自动或手工进行校准物、质控物或样品-试剂混合、温育和吸光度测定。应注意以下事项:

- 尽量选择能提高测定特异性的空白试验方式和测定方式;
- 校准物质的重复测定数至少为 2;
- 保留用过的酶试剂、校准物、质控物和样品至测定质量评价以后;
- 按式(1)计算样品和质控物质的甘油三酯浓度:

$$c_{\text{样品}} = [(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{校准}} - A_{\text{空白}})] \times c_{\text{校准}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$c_{\text{样品}}$ ——样品或质控物质的甘油三酯浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L);

$c_{\text{校准}}$ ——校准物质的甘油三酯浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L);

$A_{\text{样品}}$ ——样品或质控物质的吸光度;

$A_{\text{校准}}$ ——校准物质的吸光度；

$A_{\text{空白}}$ ——空白的吸光度。

——所得结果应表示至 2 位小数。

7 测定质量的监测和保持

7.1 方法的灵敏度和特异性

7.1.1 灵敏度:在甘油三酯浓度为 2.26 mmol/L 时的吸光度不低于 0.25。

7.1.2 特异性:试剂的配方设计和测定方式应可减小血清中的乳糜颗粒、胆红素、抗坏血酸等还原性物质、血红蛋白等有色物质的干扰物质。

7.2 精密度和准确度的评价

无论选用何种原理测定甘油三酯的酶试剂,均应对其适用性、线性范围、检测限、灵敏度、特异性等进行评价。选用的分析系统(试剂、校准物质和仪器)应在评价并保证其精密度和准确度之后用于病人样品分析;应用中的分析系统应监测和保持其精密度和准确度。应尽量选用分析结果可溯源至公认参考系统(见附录 B)的分析系统。可应用二级参考物质或参考测量程序评价准确度。选用的分析系统的测定结果与参考测量程序测定结果之间的相对不准确度(相对偏差)小于 $\pm 5\%$ 。

7.3 质控限的建立和应用

在精密度和准确度评价符合要求后,选用的分析系统测定拟用作质控物质的血清 20 次~30 次,计算测定结果的变异系数应小于 5%。利用获得的数据按一定的质控方法建立质控限,用以判断样品测定结果的有效性和监测测定质量的长期保持情况。质控值应在质控限以内,否则应分析原因后重新测定。

7.4 室间质评

从事血清甘油三酯测定的实验室都应参加国家或地方室间质评计划。

7.5 精密度和准确度的再评价

在质控值保持正常的情况下应每年至少进行一次准确度评价。在改变试剂、校准物质或仪器设备的种类或质控值持续出现超出质控限的随机误差或系统误差时应进行精密度或准确度再评价。

8 结果报告

应以我国法定计量单位 mmol/L 报告甘油三酯测定结果,需要时,另外给出传统单位 mg/dL 结果($1 \text{ mmol/L} = 1 \text{ mg/dL} \times 0.01129$)。以 mmol/L 为单位的的结果保留小数点后 2 位有效数字。

检验报告应注明医学决定水平,需要时,另外注明参考区间。甘油三酯降低或升高的判断,需考虑分析变异、个体内生物学变异及检验次数等因素。

附 录 A

(资料性附录)

我国人血清甘油三酯水平高低划分方案

血清甘油三酯是一项重要血脂指标,除用于分析机体甘油三酯代谢状况和高甘油三酯血症的诊断外,还用作心血管病危险因素指标。我国人血清甘油三酯水平高低划分方案(根据人民卫生出版社2007年出版的《中国成人血脂异常防治指南》),我国人血清甘油三酯水平高低划分为合适水平: $<1.70\text{ mmol/L}$ (150 mg/dL);边缘性升高: $1.70\text{ mmol/L}\sim 2.25\text{ mmol/L}$ ($150\text{ mg/dL}\sim 199\text{ mg/dL}$);升高: $\geq 2.26\text{ mmol/L}$ (200 mg/dL)。

注1:不同地区不同人群的血清甘油三酯参考值因环境与遗传因素而异,不能笼统地指定所谓“正常值及正常范围”。甘油三酯水平高低的划分方案根据冠心病流行病学研究资料及临床经验制定。

注2:我国人血清甘油三酯的个体内生物学变异约28%,个体间生物学变异约56%。

附录 B
(资料性附录)
血清甘油三酯测定的参考系统

B.1 甘油三酯参考系统的组成

B.1.1 参考物质

美国国家标准与技术研究所(NIST)有一级参考物质三软脂酸甘油酯 SRM 1595(三软脂酸甘油酯,纯度 99.5%);我国有甘油标准物质 GBW 09149。二级参考物质有美国 NIST 的 SRM 1951a 和 CDC 的多种冰冻血清;我国有血清总胆固醇、总甘油、游离甘油和甘油三酯标准物质 GBW 09145、GBW 09146、GBW 09147、GBW 09148。

B.1.2 参考测量程序

美国 NIST 的参考测量程序是基于 ID/MS 原理的甘油三酯测定法和总甘油测定法。美国疾病控制与预防中心(CDC)的甘油三酯参考测量程序一部分是二氯甲烷提取-硅胶吸附-变色酸显色甘油三酯测定法,另一部分 ID/MS 游离甘油测定法。欧洲甘油三酯参考测量程序主要是 ID/MS 总甘油测定法。我国是高效液相色谱测定总甘油和游离甘油的方法。

B.2 参考系统的应用方式及应用范围

参考系统的应用方式包括应用参考物质或应用参考测量程序。甘油三酯参考系统主要应用于以下方面:

- 分析系统的溯源和质量评价;
- 酶试剂的制备及质量评价;
- 校准物质的制备、定值及质量评价;
- 新常规方法的发展及评价;
- 室间质评计划中的靶值确定;
- 协作研究中血脂分析的质量保证。

参 考 文 献

- [1] Holman ET, Smythe L and Johnson S. Effect of sex and age on fatty acid composition of human serum lipids. *Am J Clin Nutr.* 1979,32:2390-2399.
- [2] Melchert HU, Limsathayourat N, Mihajlovic H, et al. Fatty acid patterns in triglycerides, diglycerides, free fatty acids, cholesteryl esters and phosphatidylcholine in serum from vegetarians and non-vegetarians. *Atherosclerosis.* 1987,65:159-166.
- [3] Kuksis A, Myher JJ and Sandra P. Gas-liquid chromatographic profiling of plasma lipids using high-temperature-polarizable capillary columns. *J Chromatogr.* 1990,500:427-441.
- [4] Ruiz-Gutierrez V, Prada JL and Perez-Jimenez F. Fetermination of fatty acid and triacylglycerol composition of human very-low-density lipoproteins. *J Chromatogr.* 1993,622:117-124.
- [5] Fielding FA, Humphreys SM, Allman FRC, et al. Mono-, di- and triacylglycerol concentrations in human plasma; effects of heparin injection and of a high-fat meal. *Clin Chim Acta.* 1993,216:167-173.
- [6] Stinshoff K, Weisshaar D, Stachler F, et al. Relation between concentrations of free glycerol and triglycerides in human sera. *Clin Chem.* 1977,23:1029-1032.
- [7] 李健斋. 血浆(清)甘油三酯测定方法综述. *中华医学检验杂志*, 1987,10:119-125.
- [8] Cole TG, Klotzsch SG, McNamara JR. Measurement of triglyceride concentration. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of lipoprotein testing.* Washington: AACC Press. 2000. 207-219.
- [9] Stein EA, Myers GL. National Cholesterol Education Program recommendations for triglyceride measurement: executive summary. *Clin Chem.* 1995,41:1427-1433.
- [10] Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969,6:24-27.
- [11] Fossati P and Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982,28:2077-2080.
- [12] McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, et al. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem.* 1983,29:538-542.
- [13] Klotzsch SG and McNamara JR. Triglycerides measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem.* 1990,36:1605-1613.
- [14] Megraw RE, Dunn DE and Biggs HG. Manual and continuous-flow colorimetry of triacylglycerols by a fully enzymic method. *Clin Chem.* 1979,25:273-278.
- [15] Bucolo G and David H. A completely enzymatic determination of serum triglycerides. *Clin Chem.* 1971,17:664 (abstract).
- [16] Bucolo G and David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973,19:476-482.
- [17] Rietz EB and Gullbault GG. Fluorometric estimation of triglycerides in serum by a modification of the method of Bucolo and David. *Clin Chem.* 1977,23:286-288.
- [18] Ruddel M, Elin RJ and McLean S. A method for the determination of triglycerides with automatic subtraction of the glycerol blank. *Clin Chem.* 1983,29:1226 (abstract).
- [19] Malandain H and Cano Y. Interferences of glycerol, propylene glycol, and other diols in the enzymatic assay of ethylene glycol. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996,34:651-654.

- [20] Ruddel M, Elin RJ and McLean S. A method for the determination of triglycerides with automatic subtraction of the glycerol blank. *Clin Chem*. 1983,29:1226 (abstract).
- [21] Sullivan DR, Kruijswijk Z, West CE, et al. Determination of serum triglycerides by an accurate enzymatic method not affected by free glycerol. *Clin Chem*. 1985,31:1227-1228.
- [22] Artiss JD, Strandbergh DR and Zak B. Elimination of free glycerol interference in a colorimetric enzymic triglyceride assay. *Clin Chim Acta*. 1989,182:109-116.
- [23] 杨昌国. 中华医学检验学会血脂测定推荐方法(三)血清甘油三酯测定二步酶法(草案). *中华医学检验杂志*, 1995,18:249-251.
- [24] NCCLS document EP10-A. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods. Approved Guideline—Second Edition (ISBN 1-56238-482-1). NCCLS. Wayne, PA, USA. 2002.
- [25] Myers GL, Cooper GR, Henderson LO, et al. Standardization of lipid and lipoprotein measurements. In: Rifai N, Warnick GR and Dominiczak MH ed. *Handbook of Lipoprotein Testing*. AACC Press, Washington DC. 1997; pp223-250.
- [26] Bernert JT, Bell C J, McGuffy JE, et al. Determination of “free” glycerol in human serum reference materials by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr*. 1992, 578:1-7.
- [27] Ellerbe P, Sniegowski LT and Welch MJ. Isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method for determining total glycerides and triglycerides in serum. *Clin Chem*. 1995,41: 397-404.
- [28] 陈文祥, 王抒, 董军, 等. 高效液相色谱测定血清甘油三酯的研究——一种参考方法的建议. *中华医学检验杂志*, 2000,23:87-90.
- [29] Hongxia Li, Jun Dong, Wenxiang Chen, et al. Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 2006, 47: 2089-2096.
- [30] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. *中国成人血脂异常防治指南*, 人民卫生出版社. 2007.
- [31] 李健斋, 陈文祥, 王抒, 等. 血脂水平在长时期内的生物学变异. *中华检验医学杂志*, 2003,26: 25~27.
-