

血红蛋白、胆红素、乳糜对干化学法和酶速率法检测血氨的干扰研究

欧元祝¹, 龚敬凯¹, 林斐然¹, 唐立萍¹, 朱宇清¹, 刘佳², 王华梁¹

(1. 上海市临床检验中心, 上海 200126; 2. 解放军总医院第五医学中心, 北京 100039)

摘要: **目的** 探讨内源性干扰物质血红蛋白(Hb)、胆红素(Bil)和乳糜微粒对酶速率法[谷氨酸脱氢酶(GLDH)法]和干化学法检测血氨的影响。**方法** 根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP7-A2文件要求收集临床血浆样本, 制备高、低2个浓度的基础样本, 并配制含不同浓度干扰物(Hb、Bil及乳糜)的干扰血浆样本。分别采用GLDH法和干化学法进行检测, 计算干扰样本与基础样本血氨检测结果的相对偏移(高值样本)和绝对偏移(低值样本)。以澳大利亚皇家病理学院(RCPA)的允许偏移标准(血氨 $\leq 30 \mu\text{mol/L}$ 时为 $\pm 3 \mu\text{mol/L}$; 血氨 $> 30 \mu\text{mol/L}$ 时为 $\pm 10\%$)作为临床可接受标准。**结果** 不同浓度的Hb对干化学法检测血氨高、低值样本均无干扰, 所有偏移均在允许偏移范围内。Hb对GLDH法检测血氨高、低值样本产生负干扰, 且干扰程度随Hb浓度的升高而逐渐增大。Bil对干化学法检测血氨低值样本产生正干扰, 当 $\text{Bil} \geq 184.4 \mu\text{mol/L}$ 时已超出允许偏移范围; 对高值样本无干扰。不同浓度的Bil对GLDH法检测血氨低值样本均产生负干扰, 对于血氨高值样本, 当 $\text{Bil} \geq 246.2 \mu\text{mol/L}$ 时, 对GLDH法检测产生负干扰。乳糜对干化学法检测血氨高值样本无干扰; 浓度为612 FTU时对血氨低值样本产生正干扰, 1 534 FTU时为负干扰。不同浓度乳糜对GLDH法检测血氨低值样本均产生负干扰, 对于血氨高值样本, 除乳糜浓度为306 FTU时无干扰外, 其他乳糜浓度均产生负干扰。**结论** 干化学法对Hb、Bil及乳糜微粒的抗干扰能力优于GLDH法, 但这些干扰物质均会影响2种方法检测血氨的重复性。

关键词: 血氨; 干扰; 血红蛋白; 胆红素; 乳糜

Interference effects of hemoglobin, bilirubin and chyle on the measurement of plasma ammonia by dry chemistry method and enzymatic assay method OU Yuanzhu¹, GONG Jingkai¹, LIN Feiran¹, TANG Liping¹, ZHU Yuqing¹, LIU Jia², WANG Hualiang¹. (1. Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China; 2. The Fifth Medical Center of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To study the interference effects of endogenous substances [hemoglobin (Hb), bilirubin (Bil) and chyle granules] on the measurement of plasma ammonia by enzymatic assay method [glutamic dehydrogenase (GLDH) method] and dry chemistry method. **Methods** According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2 guideline, clinical plasma samples were collected, and basic samples with high and low concentrations were prepared. GLDH method and dry chemistry method were used to measure plasma ammonia respectively, and the relative deviation (high value samples) and absolute deviation (low value samples) of plasma ammonia determination results between interference samples and basic samples were calculated. The allowable deviation standard of the Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) ($\pm 3 \mu\text{mol/L}$ for plasma ammonia $\leq 30 \mu\text{mol/L}$, $\pm 10\%$ for plasma ammonia $> 30 \mu\text{mol/L}$) was used as the clinical acceptable standard. **Results** Different concentrations of Hb did not interfere with the high and low value samples of plasma ammonia determined by dry chemistry method, and all the deviations were within the allowable deviation range. Hb had negative interference on the high and low value samples of plasma ammonia determined by GLDH method,

基金项目: 上海市卫生健康委员会面上项目(201740013)

作者简介: 欧元祝, 女, 1975年生, 硕士, 主任技师, 主要从事临床化学质量管理和标准化工作。

通信作者: 王华梁, E-mail: wanghualiang@sccl.org.cn.

and the degree of interference increased with the increasing of Hb concentrations. Bil had positive interference on the low value samples of plasma ammonia determined by dry chemistry method, when $\text{Bil} \geq 184.4 \mu\text{mol/L}$, it had exceeded the allowable deviation range. There was no interference on the high value samples. Different concentrations of Bil had negative interference on the low value samples of plasma ammonia determined by GLDH method. For the high value samples of plasma ammonia, when $\text{Bil} \geq 246.2 \mu\text{mol/L}$, it had negative interference on GLDH method. Chyle had no interference on the high value samples of plasma ammonia determined by dry chemistry method. There was positive interference in the chyle concentration of 612 FTU, and there was negative interference in the chyle concentration of 1 534 FTU. Different concentrations of chyle had negative interference on the samples with low value samples of plasma ammonia determined by GLDH method. For the high value samples of plasma ammonia, except the chyle concentration of 306 FTU, the other chyle concentrations had negative interference. **Conclusions** The anti-interference ability of dry chemistry method to Hb, Bil and chyle is better than that of GLDH method, but these interfering substances will affect the repeatability of the 2 methods.

Key words: Plasma ammonia; Interference; Hemoglobin; Bilirubin; Chyle

氨主要产生于胃肠道,由人体内的氨基酸和其他含氮化合物代谢产生。氨的代谢主要通过肝脏形成尿素来进行。正常人体内血氨含量极低,一旦升高会对中枢神经系统产生毒性。临床血氨检测主要用于肝性脑病的诊断和治疗监测。由于各种影响因素的存在,如样本抗凝剂的使用、运输和保存的温度及内源性和外源性物质的干扰,使得血氨成为检测难度较大的项目^[1]。内源性的干扰主要来自患者样本的溶血、黄疸和脂血,溶血引起的干扰主要来自于红细胞内高浓度分析物的释放、血红蛋白(hemoglobin, Hb)自身的光谱干扰及干扰分析物检测的化学反应;黄疸的干扰机制主要是样本中胆红素(bilirubin, Bil)浓度升高引起的光谱干扰和化学效应,且结合Bil和未结合Bil的干扰是等效的^[2-3];脂血导致的干扰主要是乳糜微粒和极低密度脂蛋白聚集产生光散射作用造成的样本混浊^[2]。不同抗凝剂的影响及保存温度的影响已有较多报道^[4],Hb、Bil和乳糜微粒等内源性物质对血氨检测结果干扰方向和干扰程度的系统研究尚未见相关报道,尤其是对不同检测方法的干扰影响。目前,临床测定血氨最常用的方法为酶速率法[谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GLDH)法]和干化学法。湿式生化分析仪均采用GLDH法。由于血氨需在采样后30 min内完成检测,我国越来越多的医院使用干化学分析仪进行血氨测定。本研究拟参考美国临床实验室标准化协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) EP7-A2文

件^[5],系统评价内源性干扰物质Hb、Bil和乳糜微粒对GLDH法和干化学法检测血氨的干扰。

1 材料和方法

1.1 样本来源

根据CLSI EP7-A2文件建议,收集解放军总医院第五医学中心临床实验室检测后的剩余新鲜肝素抗凝血样本,均无溶血、黄疸和脂血。所有样本均在采集后15 min内分离血浆。低值样本:将检测完毕后的部分剩余血浆立即混合,离心过滤后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存,血氨浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 。高值样本:将检测后的剩余血浆在室温放置约4 h,然后混合,离心过滤, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存,血氨浓度为 $80 \mu\text{mol/L}$ 。此2份样本作为基础样本。

1.2 仪器和试剂

Vitros 5600干式生化分析仪(美国Ortho公司)及血氨配套试剂(干化学法,批号101802501826)、校准品(批号05281-B1)、质控品(批号D6163、G6496)。cobas c501全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司)及血氨配套试剂(GLDH法,批号342739)、c.f.a.s校准品(批号30559301)。质控品(批号M701051、M701052)购自美国贝克曼库尔特公司。

1.3 方法

1.3.1 干扰样本的配制 采用干扰检查A试剂盒(日本Sysmex公司,批号ER8001;干扰物浓度:Hb 46 g/L,未结合Bil $3\ 089 \mu\text{mol/L}$,结合Bil $3\ 389 \mu\text{mol/L}$,乳糜1 534 FTU),参照文献[3]和文献[6]的报道,配制5个浓度梯度的Hb、

Bil及乳糜干扰样本,覆盖轻、中、重度溶血、黄疸及脂血浓度范围。因结合Bil和非结合Bil的化学特性并不会产生不同的干扰^[2-3],因此本研究对Bil的干扰评价选用未结合Bil。3种干扰物的浓度见表1。

表1 3种干扰物的浓度

浓度梯度	乳糜/FTU	Bil/($\mu\text{mol/L}$)	Hb/(g/L)
1	306	61.8	0.92
2	612	123.6	1.84
3	918	184.4	2.76
4	1 224	246.2	3.68
5	1 534	309.0	4.60

1.3.2 干扰实验 采用干化学法和GLDH法检测干扰样本和基础样本,重复检测3次,计算干扰样本与基础样本的相对偏移(高值样本)和绝对偏移(低值样本)。检测样本前先检测质控品,以保证检测质量,所有检测均在2 h内完成。临床可接受的干扰偏移范围采用澳大利亚皇家病理学院(the Royal College of Pathologists of Australasia, RCPA)的允许偏移标准:血

氨 $\leq 30 \mu\text{mol/L}$ 时为 $\pm 3 \mu\text{mol/L}$,血氨 $> 30 \mu\text{mol/L}$ 时为 $\pm 10\%$ 。

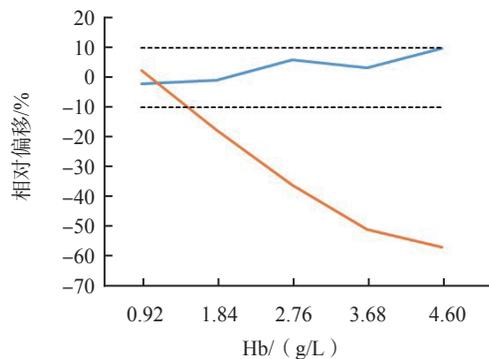
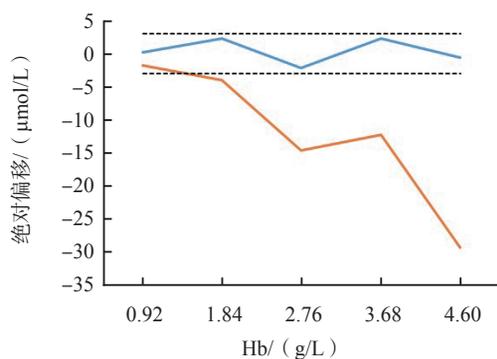
2 结果

2.1 Hb对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

不同浓度的Hb对干化学法检测血氨高、低值样本均无干扰,所有偏移均在允许偏移范围内。Hb对GLDH法检测血氨高、低值样本产生负干扰,且干扰程度随Hb浓度的升高而逐渐增大,在Hb为4.60 g/L时血氨检测结果已为负值,仅0.92 g/L Hb的偏移在允许偏移范围内。见表2、图1。

表2 Hb对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

Hb/(g/L)	低值样本的偏移/ ($\mu\text{mol/L}$)		高值样本的偏移/%	
	GLDH法	干化学法	GLDH法	干化学法
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
0.92	-0.8	0.2	2.3	-2.3
1.84	-4.0	2.3	-17.6	-1.2
2.76	-14.6	-2.2	-36.0	5.8
3.68	-12.2	2.3	-51.0	3.2
4.60	-29.2	-0.6	-57.0	9.7



注: (a) 低值样本; (b) 高值样本; — 干化学法; — GLDH法; ----- 允许偏移范围。

图1 Hb对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

2.2 Bil对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

Bil对干化学法检测血氨低值样本产生正干扰,当Bil $\geq 184.4 \mu\text{mol/L}$ 时已超出允许偏移范围;对高值样本无干扰。不同浓度Bil对GLDH法检测血氨低值样本均产生负干扰,对于血氨高值样本,当Bil $\geq 246.2 \mu\text{mol/L}$ 时对GLDH法产生负干扰。见表3、图2。

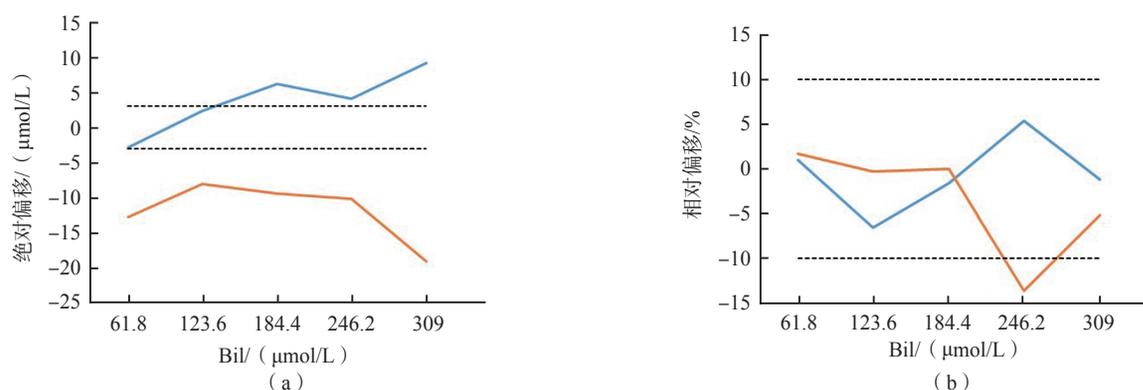
2.3 乳糜对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

乳糜对干化学法检测血氨高值样本无干扰;乳糜浓度为612 FTU时对血氨低值样本产生正

表3 Bil对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

Bil/ ($\mu\text{mol/L}$)	低值样本的偏移/ ($\mu\text{mol/L}$)		高值样本的偏移/%	
	GLDH法	干化学法	GLDH法	干化学法
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
61.8	-12.8	-2.9	1.7	1.0
123.6	-8.0	2.3	-0.3	-6.6
184.4	-9.4	6.1	0.0	-1.6
246.2	-10.2	4.0	-13.7	5.4
309.0	-19.1	9.1	-5.2	-1.2

干扰,1 534 FTU时为负干扰。不同浓度乳糜对GLDH法检测血氨低值样本均产生负干扰;对于



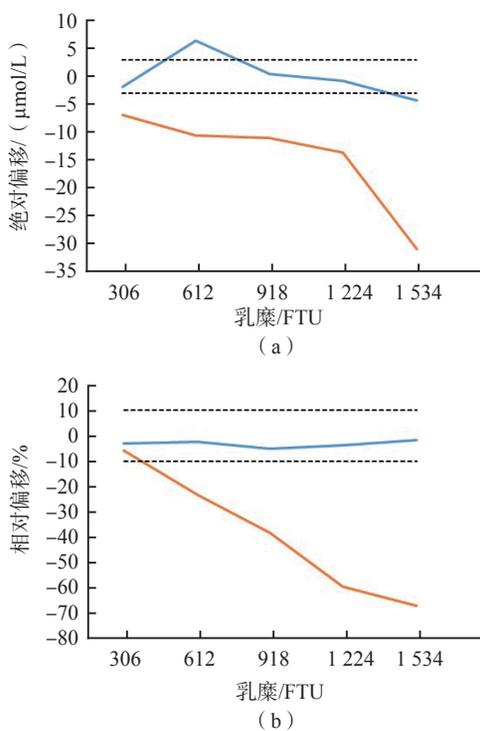
注：(a) 低值样本；(b) 高值样本；— 干化学法；— GLDH法；----- 允许偏移范围。

图2 Bil对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

血氨高值样本，除乳糜浓度为306 FTU时无干扰外，其他乳糜浓度均产生负干扰。见表4、图3。

表4 乳糜对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

乳糜/FTU	低值样本的偏移/ (μmol/L)		高值样本的偏移/%	
	GLDH法	干化学法	GLDH法	干化学法
0	0.0	0.0	0.0	0.0
306	-7.0	-1.9	-5.9	-2.9
612	-10.6	6.4	-23.4	-2.3
918	-11.0	0.5	-38.2	-5.1
1 224	-13.6	-0.7	-59.4	-3.7
1 534	-30.8	-4.3	-67.0	-1.6



注：(a) 低值样本；(b) 高值样本；— 干化学法；— GLDH法；----- 允许偏移范围。

图3 乳糜对干化学法和GLDH法检测血氨的干扰

3 讨论

由于样本的不稳定及其他影响因素较多，血氨检测结果的准确性和稳定性一直是临床检测中较难解决的问题。本研究采用的GLDH法试剂说明书要求使用乙二胺四乙酸抗凝血浆进行检测，而本研究收集的血浆样本均为用于干化学法检测的肝素抗凝血，采用GLDH法检测肝素抗凝血浆中的血氨，结果显示，除导致基础样本浓度偏低外，并未影响本研究的干扰试验。

溶血样本的干扰作用主要是红细胞内高浓度成分逸出会增加血浆分析物浓度、Hb对吸光度的干扰、某些细胞成分对化学反应的干扰。正常情况下，血浆中氨处于一个较低的水平，当样本发生溶血时，细胞内氨的释放会直接导致血浆中氨浓度的升高，从而使检测结果升高。以往报道中的溶血干扰血氨测定的研究均采用模拟临床溶血样本进行试验^[7]，尚未见Hb本身对血氨检测干扰的研究。因此，本研究采用商品化的干扰试剂盒评价Hb、Bil及乳糜对血氨检测的干扰。由于目前我国及CLIA、美国病理学家协会（the College of American Pathologists, CAP）均无血氨的允许总误差和允许偏移标准，所以本研究采用RCPA的允许偏移标准作为评价标准。

本研究所用的GLDH法试剂检测血氨的原理为：氨在GLDH作用下与酮戊二酸、NADPH反应生成谷氨酸和NADP⁺，在340 nm处吸光度值的下降与样本中血氨浓度成正比。干化学法测定血氨的原理为干片比色法，即在干片上涂覆多层分析成分，干片中添加只允许气体氨通过的半透膜，血浆中的氨离子转化为气态氨后，

透过半透膜与显色剂发生反应,进而测得血氨浓度。本研究结果显示, Hb>1.84 g/L时对GLDH法产生明显的负干扰,且随Hb浓度的升高,干扰程度逐渐增大。说明尽管溶血时细胞内血氨的释放会导致血氨检测结果升高,但Hb本身也会干扰GLDH法中340 nm处的吸光度值,从而导致明显的负干扰^[8]。不同浓度Hb对干化学法检测血氨无明显干扰,所有偏移均在允许偏移范围内。宋玉梅等^[9]的研究结果显示,高Bil会让血氨的检测结果显示明显低于实际水平,甚至出现负值这种明显偏离临床的现象。本研究结果显示,Bil对GLDH法血氨低值样本的干扰情况与宋玉梅等^[9]的研究结果一致;高Bil对干化学法检测血氨低值样本产生了较明显的正干扰,但Bil对2种方法检测血氨高值样本未产生明显的干扰。本研究结果还显示,乳糜对GLDH法检测血氨产生明显的负干扰,且干扰程度随乳糜浓度的升高而增大;对干化学法检测血氨高值样本无干扰,对血氨低值样本产生不同方向的干扰(乳糜浓度为612 FTU时为正干扰,1 534 FTU时为负干扰)。

Hb、Bil及乳糜对GLDH法检测血氨的干扰可能与干扰物质对检测方法中吸光度值产生影响有关^[2, 9]。由于湿化学法采用透射光进行检测,当光线透过样本时,干扰物质会干扰光线的强度,导致吸光度值受影响,进而影响检测结果。干化学法特有的多层涂膜及半透膜设计会有效过滤掉乳糜等干扰大分子,同时其反射光检测的原理也会将一些干扰物质排除在外。因此,在血氨的测定方法中,干化学法对Hb、Bil及乳糜的抗干扰能力优于GLDH法,但这些

内源性干扰物质均会影响这2种方法检测血氨的重复性。

参考文献

- [1] NIKOLAC N, OMAZIC J, SIMUNDIC A M. The evidence based practice for optimal sample quality for ammonia measurement[J]. Clin Biochem, 2014, 47 (12) : 991-995.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis[S]. C56-A, CLSI, 2012.
- [3] AGARWAL S, VARGAS G, NORDSTROM C, et al. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays[J]. Clin Chim Acta, 2015, 438: 241-245.
- [4] 赵然, 刘永娥, 毕鸣梓. 不同抗凝剂对血氨检测结果的影响[J]. 医学信息, 2015, 28 (14) : 84-85.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry[S]. EP7-A2, CLSI, 2005.
- [6] NOVELLI C, VIDALI M, BRANDO B, et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation tests by evaluation of 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples[J]. Biochem Med (Zagreb), 2018, 28 (3) : 030711.
- [7] EL-KHOURY J M, BUNCH D R, WANG S. Is the effect of hemolysis on plasma ammonia measurement overrated?[J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136 (5) : 471-472.
- [8] 程正江. 血红蛋白和胆红素干扰临床化学分析的机理初探[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 26 (6) : 488-491.
- [9] 宋玉梅, 周国芹. 稀释血清标本消除高胆红素对血氨测定的干扰[J]. 检验医学与临床, 2011, 8 (7) : 845-847.

(收稿日期: 2020-07-09)

(本文编辑: 龚晓霖)