

果糖胺测定方法影响因素探讨^①

钟飞燕^② 余斌杰 曲颖蕃 徐翰桢

(中山医科大学附属第一医院内分泌研究室; 广州, 510080)

提 要 作者按 Johnson 报道的氯化硝基四氮唑蓝(NBT)两次比色法测定果糖胺(FA), 对影响 FA 测定的有关因素——NBT 浓度、比色时间、终止反应方式、血清或血浆标本的选取和贮存时间等进行了详细观察与探讨, 并将操作规程标准化。依此条件测定 FA, 结果重复性好(批内 CV 2.53%, 批间 CV 3.02%)、回收率高(平均为 94.8%)。对 32 名正常人和 110 例糖尿病患者的血浆 FA 水平的研究显示: 糖尿病患者的 FA(2.23±0.38mmol/L)明显高于正常组(1.52±0.12mmol/L), 并与空腹血糖、糖化血红蛋白 A₁ 水平显著相关。

关键词 果糖胺; 糖尿病; 标准化; 四氮唑硝基蓝(NBT)

中图分类号 R587

果糖胺(fructosamine, FA)是血浆蛋白质(主要是白蛋白)分子的氨基末端与葡萄糖分子非酶催化反应生成的一种含酮胺键结构的糖化蛋白质, 其形成的量与血糖浓度有关。自 1982 年 Johnson^[1]建立了硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium, NBT)还原法测定 FA 后, 国外已广泛用于糖尿病患者血糖控制的监测, 国内亦有开展。尽管 NBT 法测定 FA 的应用日益增多, 但目前仍未有一个统一的标准化的常规操作程序, 参考值范围大小不一, 许多技术问题还有待解决, 操作尚须不断改进。为此, 本实验就 NBT 法操作中差别较大和争议较多的一些因素或条件进行探讨, 并观察 FA 在糖尿病病情监测中的应用。

1 对象和方法

1.1 研究对象

糖尿病患者 110 例(男 43 例, 女 67 例), 按 WHO 糖尿病诊断标准经临床和实验室确诊的本院专科门诊或住院病人, 年龄 16~79 岁, 病程 1 月~20 年。正常对照组 32 名(男 17 例, 女 15 例), 年龄 23~60 岁, 均无糖尿

病家族史, 身体健康, 无心、肺、肝、肾疾病, 葡萄糖耐量正常。

1.2 实验方法

1.2.1 果糖胺测定 用 NBT 两点比色法^[1~2], 以 2mmol/L 的 1-脱氧 1-吗啉果糖(DMF)作为标准, 取 0.1ml 待测血浆或血清, 加入 2ml NBT 反应试剂, 置 37℃温育 5min、10min 及 15min, 取出即刻加 10%乙酸 0.1ml, 混匀后比色, 波长为 530nm, 按下式计算结果:

$$\text{FA 浓度 (mmol/L)} = \frac{A_{T1} - A_{T2}}{A_{S1} - A_{S2}} \times 2$$

注: A_T 为测定管吸光度, A_S 为标准管吸光度

在测定过程中, 观察不同 NBT 浓度、比色时间、终止反应方式、标本选取和贮存时间等对 FA 测定的影响, 从而选择标准化的最适宜条件, 并了解正常人与糖尿病患者血浆 FA 的差异, 及其与空腹血糖、糖化血红蛋白 A₁ 的关系。

1.2.2 空腹血糖测定 用葡萄糖氧化酶法。

1.2.3 糖化血红蛋白 A₁ 测定 用硫代巴比妥酸比色法^[3]。

① 本校科研基金资助课题

② 第一作者, 29 岁, 女, 助理研究员

2 结果与讨论

2.1 NBT 浓度的选择

按照测定 FA 的步骤(固定反应时间为 10min), 观察 NBT 浓度改变对吸光度的影响, 结果见图 1。从图 1 可看出, 吸光度随着 NBT 浓度的升高而上升, 即 NBT 与果糖胺的参照标准品 DMF 之间的显色反应率相应增加, 结果与 Baker^[4]等人的报道一致。目前国内外采用的 NBT 浓度多为 0.12、0.25 或 0.5mmol/L。但从本研究结果来看, NBT 太高时出现沉淀物, 而太低时则显色过浅, 均不够敏感。另外在自动分析时作者还发现, 随 NBT 的升高 FA 测定值反而下降^[5]。故选取 0.12mmol/L (即 0.01%) NBT 作为反应浓度。

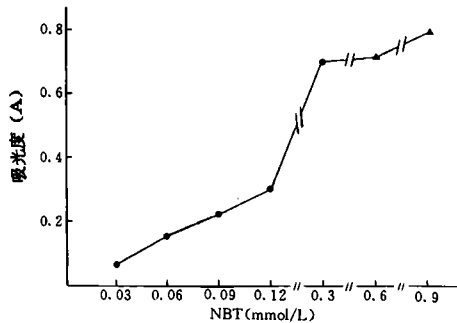


图 1 NBT 浓度与吸光度关系

注: ▲这两点处 NBT 与 DMF 反应已有沉淀生成

($A_{15} - A_5$) 所得标准曲线最为稳定, 且各参数波动较小。

果糖胺与 NBT 的反应属于无终点反应, 比色时间对测定影响较大。国内外有报告采用一次比色法, 但多主张采用两点法^[1,2]。因维生素 C 及其它还原性物质也能与 NBT 反应, 干扰 FA 测定, 故单次比色法所得结果与实际值有较大出入。有研究表明维生素 C 与 NBT 的反应在 4min 后达到顶点^[2], 5min 后基本上不影响 FA 测定, 因此采用两点法, 减去 5min 时(或其后)的吸光度(A)即可消除维生素 C 等物质的干扰。在手工操作时, $A_{15} - A_{10}$ 与 $A_{10} - A_5$ 的值很小, 不易得出准确的结果。而从本实验来看, 也以 $A_{15} - A_5$ 值最为稳定, 故作者采用 5min 与 15min 两点法, 此与魏明竞等^[2]的观点一致。在自动分析中也证明选这两点比色较好^[5]。

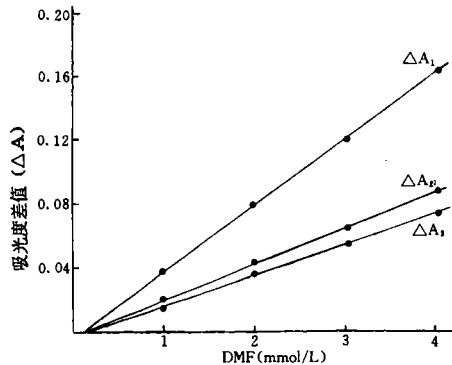


图 2 不同显色时间的标准曲线

注: ΔA_1 为 15min 与 5min 的吸光度差值; ΔA_2 为 15min 与 10min 的吸光度差值; ΔA_3 为 10min 与 5min 的吸光度差值

2.2 比色时间的选择

按照测定 FA 的步骤, 用不同浓度的 DMF (1、2、3、4mmol/L) 标准液与 NBT 反应, 分 3 种时间 (5、10、15min) 终止反应, 得出 3 种两次比色 (15 与 10min、10 与 5min、15 与 5min) 的吸光度差值, 以此作纵坐标, 浓度为横坐标, 作标准曲线(图 2)。从图中可看出, 在 4mmol/L 浓度范围内, 3 种两点法的标准曲线均为良好的直线关系。我们重复作了 7 次, 发现以 15min 减去 5min 的 A 值

2.3 终止反应方式的选择

按 FA 测定程序, 在显色 5min 时试用不同浓度的乙酸使 pH 降低来终止反应。结果 10%、20% 和 30% 3 种浓度的乙酸均可使反应液 pH 值降至 7 以下, 呈色稳定, A 值在室温 2 h 无变化, 但 A 值随乙酸浓度升高反而减小。

FA 与 NBT 无明确的反应终点, 在手工

操作时必须设法在限定时间有效地终止反应,用自动分析仪测定则不存在这个问题。据研究发现 NBT 与 DMF 当 pH 值低于 9 时,几乎不发生反应^[1]。另有报道限时温育后立即冷却,10~30min 内呈色稳定,30min 略有升高^[6],但此方法在处理大批标本时 30min 内难以完成全部比色任务,故不宜选用。根据本实验结果,作者选取加 10%乙酸作为终止反应的方式,并认为在处理大批标本时以降低 pH 值效果较好。

2.4 血清与血浆标本的选取

测定 32 人的血清和血浆(肝素抗凝)标本的 FA,得血清 FA 为 $1.75 \pm 0.13 \text{ mmol/L}$,血浆 FA 为 $1.52 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$ 。经统计学分析表明血浆 FA 明显低于血清 FA ($P < 0.01$),这与 Fluckiger 等^[7]报道的结果相符。血清与血浆的 FA 值呈正相关($r = 0.75, P < 0.001$),因此只要评价结果时与其相对应的正常值作为参考来判别 FA 的高低,则检测 FA 选血清或血浆标本都是可行的。

2.5 标本的保存时间

将血清、血浆标本各 3 份置 -20°C 贮存,于不同时间(立即、1d、7d 和 14d)取出测 FA 值,结果均无明显不同($P > 0.05$),这与 Jury 报道(标本贮存于 6°C)结果^[8]基本一致。因此收集标本后存于冰箱,每周或两周测 1 次 FA 值是可行的,其结果差异不大。

2.6 正常参考值范围和标准化问题

附表 正常人和病人的 FPG、FA 及 GHbA₁ 比较¹⁾($\bar{x} \pm s$)

项 目	<i>n</i>	FPG (mmol/L)	FA (mmol DMF/L)	GHbA ₁ mg HMF/g)
正 常 人	32	5.240 ± 0.560	1.52 ± 0.12	0.180 ± 0.015
糖尿病患者	110	$12.770 \pm 4.292^{2)}$	$2.23 \pm 0.33^{2)}$	$0.320 \pm 0.083^{2)}$

注:1)与正常组比较; 2) $P < 0.01$

据进行相关分析发现 FA 与 FPG、GHbA₁ 与 FPG、FA 与 GHbA₁ 间均呈正相关,相关系数分别为 0.67、0.55 和 0.7($P < 0.01$)。这些结果表明糖尿病患者 FA 值明显高于正常对照,FA 随血糖的升高而升高,即糖代谢控制

果糖胺作为糖尿病病情控制的指标,其测定较糖化血红蛋白 A₁ 方便、省时、经济,但目前推广应用仍有困难,原因在于 FA 测定中的标准化问题尚未解决。据 Upton 对 35 个实验室的调查,各室间测定值高低悬殊^[9]。各室所得正常人血清 FA 平均值差异很大,小者仅为 1.43 mmol/L ^[10],大者可达 2.55 mmol/L ^[11]。从前面的讨论中我们已清楚 FA 测定受许多因素的影响,因此需要选用适当的反应条件,建立参考方法,统一操作规程,逐步使 FA 测定标准化。

以上述本室推荐选用的条件(NBT 浓度为 0.12 mmol/L 、比色时间为 5min 与 15min、终止反应用 10%乙酸),测定果糖胺,其批内变异系数为 2.53%($n = 20$),批间变异系数为 3.02%($n = 6$),回收率为 94.8%(88.0%~101.5%, $n = 9$)。结果表明本室所确立的实验条件和检测方法重复性好,回收率高,是可接受的。对 32 名正常人的血清和血浆 FA 值进行测定,得血浆 FA 为 $1.52 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$ ($1.28 \sim 1.76 \text{ mmol/L}$),血清 FA 值为 $1.75 \pm 0.13 \text{ mmol/L}$ ($1.49 \sim 2.01 \text{ mmol/L}$)。

2.7 果糖胺测定的临床应用

选取 110 例糖尿病患者的标本,用本法测定 FA,同时还测定空腹血糖(FPG)及糖化血红蛋白 A₁(GHbA₁),结果见附表。对数

越差 FA 越高,FA 与 GHbA₁ 一样可用于监测血糖的变化。但由于 FA 糖化的主要部分为白蛋白,其半衰期约为 14~20 d,反映抽血前 2~3 周的平均血糖水平;且血浆蛋白不经细胞膜阻隔,对血糖变化的反应更为敏感;在

妊娠、溶血性疾病或高血红蛋白 F 血症时不受干扰,这些特性决定了 FA 与 GHbA₁ 两者不能互相取代,结合使用可起互补作用,能更全面地监测糖尿病患者的血糖控制情况。

参 考 文 献

- 1 Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein, An index of diabetic control. *Clin Chem Acta*, 1982, 127: 87
- 2 魏明竟, 苏子林. 血清果糖胺分析的方法和应用. *中华医学检验杂志*, 1988, 11(2): 69
- 3 李航海, 余斌杰, 黄葆钧, 等. 糖化血红蛋白 A₁ 的化学法测定及其在糖尿病病情控制评价上的意义. *中华医学检验杂志*, 1983, 6(3): 137
- 4 Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, et al. Use of proteinbased standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem*, 1985, 31: 1550
- 5 钟飞燕, 余斌杰, 陈志勇. 自动化测定果糖胺的实验研究. *中山医科大学学报*, 1994, 15(2): 146
- 6 滕万钟, 孙爱霞, 王金明, 等. 用 NBT 还原反应测定血清糖化蛋白的初步研究. *中华医学检验杂志*, 1985, 8(4): 202
- 7 Fluckiger R, Woodtli T, Berger W. Evaluation of the fructosamine test for the measurement of plasma protein glycation. *Diabetologica*, 1987, 30: 648
- 8 Jury DR, Dunn PJ. Laboratory assessment of a commercial kit for measuring fructosamine in serum. *Clin Chem*, 1987, 33(1): 158
- 9 Upton J, Lever M, Sadler WA, et al. The quality of performance of the fructosamine test. *NZ Med J*, 1988, 101(854): 606
- 10 Allgrove J, Cockrill BL. Fructosamine or glycosylated haemoglobin as a measure of diabetic control? *Arch Dis Child*, 1988, 63(4): 418
- 11 Shima K, Abe F, Chikakiyo H, et al. The relative value of glycosylated albumin, hemoglobin A_{1c} and fructosamine when screening for diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 1989, 7(4): 243

(1993-10-04 收稿 1994-09-10 修回)

AN APPROACH TO FACTORS INFLUENCING FRUCTOSAMINE ASSAY

Zhong Feiyan Yu Binjie Qu Yingfan Xu Hanzhen

(Research Unit of Endocrinology, First Affiliated Hospital Sun Yat-Sen University
of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

We have determined fructosamine (FA) with nitroblue tetrazolium (NBT) colorimetric method reported by Johnson, and have made approach to the factors influencing FA assay—NBT concentration, colorimetric time, form of stop reaction, selection and store time of serum or plasma sample, and standardized the procedure of operation. On these conditions, good repeatability (within run CV was 2.53%, between-run CV was 3.02%) and high recovery rate (average 94.8%) can be obtained. Plasma FA was measured in 110 patients with diabetes

mellitus and 32 normal subjects. These results show that the plasma FA in diabetics ($2.23 \pm 0.38 \text{ mmol/L}$) were obviously higher than those in normal control subjects ($1.52 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$), and significantly correlated with fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin A_{1c}.

Key words fructosamine; diabetes mellitus; standardization; nitroblue tetrazolium

女性苯酚胶浆绝育术可逆性的探讨

课题负责 邝健全

(中山医科大学孙逸仙纪念医院,广州,510120)

过去专家学者认为女性苯酚胶浆绝育术后输卵管全部被破坏,成为不可逆的绝育术。本研究通过对苯酚胶浆粘堵术后不同时期的输卵管超微结构作了细致的观察,发现邻近闭塞部位的输卵管粘膜结构正常,而堵塞部位仅局限于间质部及峡部,认为只有输卵管-宫角植入才是输卵管复通的唯一途径。研究者将国内外使用的输卵管-宫角植入方法作了关键性的改进:①选择壶腹部近端作为植入段,并将植入段的输卵管浆膜分离覆盖于宫角植入周围创口;②选用直径约2mm的硅胶管固定于金属单环,作为输卵管支架,管口不易粘连封闭;③宫角打洞前,采取了有效的止血措施如宫肌注射宫缩剂及用无创伤缝线缝合输卵管。研究者从1986年8月至1987年4月,无选择地连续为30例接受过苯酚胶浆绝育术,因各种原因要求复孕的育龄妇女施行了改良的输卵管宫角植入术,术后1个月行输卵管通液检查,并随访至1988年10月,通畅率达97%、宫内孕率83.3%,成功率超过国际水平,国内文献尚未见报道。该研究打破了认为苯酚胶浆类药物粘堵输卵管绝育术后不可逆的概念。改良的输卵管复通术还适用于腹式结扎术后要求复孕,因输卵管近端有病变或过短而不能做端端吻合的病例或输卵管近端炎症闭塞不孕症患者。该成果获1993年广东省科技进步二等奖,同获广东省医药卫生科技进步二等奖。

(冯世容)

(上接第317页)

参 考 文 献

- 1 陈仁标,赵桐茂,叶根耀,等. 中国大陆 HLA 多态性联合报告. 上海免疫学杂志, 1987, 7(6): 321
- 2 Helmuth R, Fildes N, Blake E, et al. HLA-DQA allele and genotype frequencies in various human populations determined by using enzy-

matic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet*, 1990, 47: 515

- 3 Oudshoorn M, Martell RW, Arendse B, et al. Unusual HLA-DR, DQ haplotypes found in South African families of black, Asian Indian, and mixed ancestral origin. *Immunology*, 1991, 31: 14

(1993-12-27 收稿 1994-10-26 修回)