

· 技术交流 ·

自动化测定果糖胺实验条件与方法学评价^①

钟飞燕^{1,②} 余斌杰¹ 陈志勇²

(中山医科大学附属第一医院 1 内分泌研究室 2 检验科, 广州, 510080)

提 要 介绍 ABA-100 型自动生化分析仪测定血中果糖胺的方法, 对能引起果糖胺值波动, 且在各实验室使用不一致的某些反应条件(如温度、比色时间、显色剂浓度、样品与试剂体积比等)进行了观察与分析。利用此法测定果糖胺, 方法线性良好, 批内与批间变异系数分别为 1.32% 和 2.41%, 回收率平均为 97%, 优于手工测定。成人血清果糖胺的正常参考值($\bar{x} \pm s$)为 2.24 ± 0.26 mmol/L (1.7~2.8 mmol/L, $n=144$), 与国外多数报道近似。

关键词 果糖胺(FA); 糖尿病; 自动化; 四氮唑硝基蓝(NBT)

中图分类号 R587.1; 446.11

随着社会经济的发展, 糖尿病发病率逐渐上升, 现已成为继肿瘤、心血管病之后严重影响人类健康的疾病。由于对糖尿病的病因和发病机理尚未明了, 目前缺乏有效的预防法和根治的药物, 因此糖尿病的病情监控十分重要。近年来, 比色法测定果糖胺(FA)作为反映取血前 2~3 周内血糖平均水平的指标, 在国内外备受重视。已被公认为是一种简易、省时、精确的病情监测方法。目前, 国内测定果糖胺多为手工操作, 用自动分析仪来测定的报道较少。作者采用美国 Abbott 厂生产的 ABA-100 型自动生化分析仪, 测定血中果糖胺的含量, 并对方法进行探索。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

0.1 mmol/l 碳酸盐缓冲液(Na_2CO_3 , 宜兴县化学试剂厂, NaHCO_3 上海虹光化工厂); 0.12 mmol/L (0.1g/L) 四氮唑蓝(美国 Sigma 公司); 40g/L 人血清白蛋白(美国 Sigma 公司); 2.0 mmol/L 1-脱氧-1-吗啡果

糖(DMF)标准(美国 Sigma 公司)。

1.2 方 法

参照 Jury^[1]报道的方法加以修改, 使用 ABA-100 型自动生化分析仪测定果糖胺的程序: ①设定参数(即反应条件)——反应温度 37℃, 方式选择终点法, 反应方向为向上, 分析时间 5 min/周, 循环 4 圈, 滤光片 550/650 nm, 血清(或血浆)样本 10 μ l, NBT 试剂 250 μ l, 稀释板 1:26, 小数点 0.000; ②按顺序加入蒸馏水、白蛋白、DMF 标准、待测样品于转盘的杯中; ③启动仪器待反应 5 min 作第一次测定(A_5), 在 10 min 和 15 min 分别作第 2、3 次测定(A_{10} 、 A_{15})。按下式计算结果:

$$\text{FA 浓度 (mmol/L)} = \frac{A_{T15} - A_{T5}}{(A_{S15} - A_{SB15})(A_{S5} - A_{SB5})} \times 2$$

公式中, FA 代表果糖胺, A_T 为测定管吸光度, A_S 为标准管吸光度, A_{SB} 为白蛋白管吸光度, 下标数字为测定时间。

1.3 统计学处理

实验结果的显著性检验用 u 检验和配对 t 检验。

① 本校科研基金资助课题;

② 第一作者 28 岁, 女, 助理研究员

2 结果与讨论

2.1 实验条件的选择

2.1.1 反应温度的影响 国内外自动化测定果糖胺时,温度多数采用37℃,但也有报告

用30℃^[4,7]。作者分别在这两种温度条件下测定了果糖胺值(表1)。实验结果显示:37℃时的果糖胺值低于30℃时的果糖胺值,说明温度高低对测定结果有影响,这与 Baker^[2]等的报道一致。由于室温超过30℃的情况并不少见,故以选择37℃作为反应温度较适宜。

表1 不同反应条件对果糖胺测定的影响

反应条件		果糖胺浓度(mmol/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
温 度 (<i>n</i> =20)	30℃	4.78±0.75	20.5628	<0.01
	37℃	2.85±0.44		
体积比 (<i>n</i> =5)	1:10	3.58±0.32	33.4313	<0.01
	1:25	2.81±0.30		
NBT 浓度 (<i>n</i> =20)	0.12	2.85±0.44	20.5786	<0.01
	0.25	1.79±0.26		

注:3组数据均采用配对资料的 *t* 检验

2.1.2 样品与 NBT 体积比的影响 在多数自动分析仪中,样品与试剂体积比采用1:10及1:25,偶见用2:35和3:40^[2,8]。作者用1:10和1:25两种比例对标本的果糖胺进行了测定,表1结果说明样品与试剂体积比不同可影响果糖胺测定值。据 Chung^[6]报道,体积比为1:10时标准曲线的线性较差,而体积比为1:25时,标准曲线的线性较好。因此选择1:25作为反应体积比。

2.1.3 NBT 浓度的影响 不同实验室采用的 NBT 浓度以0.12和0.25 mmol/L 为多。我们用这两种浓度的 NBT 进行了果糖胺测定。表1 实验结果显示果糖胺值随着 NBT 浓度的升高反而下降。据研究 NBT 与 DMF 或血中果糖胺的反应率均随 NBT 浓度的升高而升高,但并不一致,血清果糖胺反应率的升高低于标准品 DMF 反应率的升高^[2,6]。这就造成血清果糖胺值随 NBT 浓度的增加反而下降的现象。由于 NBT 低浓度时,样品和 DMF 各自的显色反应率较一致,即测得的果糖胺值更为接近真实的果糖胺值,故我们选取0.12 mmol/L 的 NBT 作为反应浓度。

2.1.4 显色时间的影响 果糖胺与 NBT 的反应属于无终点反应^[2,3],选择合适的显色

时间比色十分重要,国内外多采用两次比色法,但究竟取哪两点来比色尚无一致的看法。有报告用5 min 与 10 min,10 min 与 15 min,15 min 与 20 min,5 min 与 15 min,2 min 与 10 min,5 min 与 25 min,9 min 与 11 min、等各不相同的比色时间,令人无所适从。我们测试了几种不同比色时间对144份正常人血清果糖胺值测定的影响,结果见表2。从表中看出:取5min 与 15min、比色所得果糖胺值介于另两种时间比色所得果糖胺值之间。这无可置疑地表明:比色时间不同可引起果糖胺测定值变化,而不是象某些报道^[4]那样不同时间点没有明显差异。许多研究者业已证明果糖胺与 NBT 显色反应的早期存在其它物质的显著干扰^[5,6],结合本实验结果,作者认为采用5与15 min 两点比色较佳。

表2 比色时间对果糖胺值的影响(*n*=144)

比色时间间隔 (min)	果糖胺浓度 (mmol/L)
5~10	2.74±0.31 ¹⁾
5~15	2.24±0.26
10~15	1.74±0.32 ²⁾

1),2) 与5~15min 组比较, *P*<0.01

综上所述,NBT 与 DMF 或果糖胺的反应对测定条件的变化极其敏感,以致在不同条件下测得的果糖胺值不一样,此与众多的文献报道结果^[2,5,6]相符。这就要求在不同仪器上修改原来的程序,编制新的测定程序^[2],使结果能反映真实的情况。从表3中可见作者

所选的条件对果糖胺值升高或降低的影响恰好各占一半。任选两高两低的条件搭配也可能得到相近的果糖胺结果,但如何取舍选择最优化的组合,统一操作规程,尚有待进一步研究与探讨。

表3 某些反应条件的变化对果糖胺值的影响

反应条件	反应条件的变化	对果糖胺值的影响
温 度	30℃→37℃ ¹⁾	由高→低
比色时间间隔	5~15min ¹⁾ →10~15min	由高→低
样品与试剂体积比	1:10→1:25 ¹⁾	由高→低
NBT 浓度(mmol/L)	0.12 ¹⁾ →0.25	由高→低

1) 为本实验所选择的反应条件

2.2 方法学评价

配制不同浓度的 DMF 标准液(1、2、3、4mmol/L)作线性观察在1.0~4.0 mmol/L 范围内基本成一直线,线性方程 $y=0.0025+0.0283x$,相关系数 $r=0.9992$ 。取混合血清作重复试验和回收试验,结果表明:自动分

析法的精密度和准确度均优于手工操作。

以本文推荐的反应条件对144名正常人血清测定果糖胺值,结果为 2.24 ± 0.26 (1.7~2.8)mmol/L,这与国外大多数实验室报道^[1,2,7,9]的正常参考值近似。

表4 果糖胺测定的手工法与自动分析法对比

方 法	线 性 (相关系数)	回 收 率 (%)	重 复 性	
			批内变异系数(%)	批间变异系数(%)
自 动	0.999	97.0	1.32	2.41
手 工	0.997	94.8	2.53	3.02

参 考 文 献

- Jury DR, Dunn PJ. Laboratory assessment of a commercial kit for measuring fructosamine in serum. Clin Chem, 1987, 33:158
- Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, et al. Use of protein - based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. Clin Chem, 1985, 31:1550
- Frandsen EK, Bacchus RA. Influence of timing in the fructosamine assay. Clin Chem, 1988, 34(11):2245
- 马建锋, 蒋仁礼. 用自动生化分析仪测定血清果糖胺的含量. 临床检验杂志, 1990, 8(1):24
- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clin Chim Acta, 1982, 127:87
- Chung H, Lees H, Gutman SI. Effect of nitroblue tetrazolium concentration on the fructosamine assay for quantifying glycosylated protein. Clin Chem, 1988 34(10):2106
- Rodriguez-Segade S, Lojo S, Camina MF, et al. Effects of various serum proteins on quantifica-

- tion of fructosamine. Clin Chem, 1989, 35 (1) : 134
- 8 Tas S, Zein El Din RR. Automated fructosamine assay with improved accuracy used to quantify nonenzymatic glycation of serum proteins in diabetes mellitus and chronic renal failure. Clin Chem, 1990, 36 (10) : 1825
- 9 San-Gil F, Schier GM, Moses RG, et al. Improved estimation of fructosamine, as a measure of glycated serum protein, with the Technicon RA-1 000 analyzer. Clin Chem, 1985, 31 : 2 005
- (1993-08-23收稿 1993-11-16修回)

EXPERIMENTAL STUDY ON AUTOMATIC ASSAY OF FRUCTOSAMINE

Zhong Feiyan Yu Binjie

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

Chen Zhiyong

(Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

This study presented the method for serum fructosamine determination by ABA-100 automatic biochemical analyzer (Abbot, USA). The various reaction conditions (e. g. temperature, colorimetric time, concentration of developed, volume ratio of reagent to sample, etc.), which were different in every laboratory were compared. Using this method in determining fructosamine, the linear correlation of the standard curve was good (range from 1. 0 to 4. 0 mmol/L, $r=0. 9992$). The coefficient of variation for within-run and between-run were 1. 32% and 2. 41%, respectively, the mean recovery was 97%, the method was superior to the manual assay. The normal reference values of fructosamine in serum for healthy adults were $2. 24 \pm 0. 26$ mmol/L (1. 7~2. 8 mmol/L, $n=144$), similar to the results reported by most literatures.

Key words fructosamine (FA); diabetes mellitus; automatic; nitroblue tetrazolium (NBT)