

# 血浆氨酶促终点法测定的实验研究

徐国宾 朱立华 洪健美 夏铁安

(北京医科大学第一临床医学院, 北京 100034)

**摘要** 介绍一种用谷氨酸脱氢酶-还原辅酶I (GLDH-NADH) 为反应系统的血浆氨酶促终点比色测定法. 反应体系中加入 1.9 kU/L 的乳酸脱氢酶 (LDH), 可排除内源性丙酮酸盐引起 NADH 消耗所致的吸光度持续下降对测定的干扰. 此法测定线性范围为 6~200  $\mu\text{mol/L}$ , 回收率为 90%~105%, 批内变异系数小于 5%, 常规条件下的变异系数小于 10%. 30 例健康志愿者清晨空腹静脉血浆氨水平为 10~70  $\mu\text{mol/L}$ . 此法操作简单、迅速、精确, 适合于常规分析.

**关键词** 氨, 酶促终点法, 血浆

血氨的测定对于肝疾患病人的管理、高营养治疗病人氮平衡的监测具有重要的临床意义, 也是先天性鸟氨酸循环有关酶缺乏症诊断的重要项目. 目前血氨的测定普遍采用扩散法和干化学法. 前者操作繁琐重复性差, 后者需专门的干化学分析仪. 近来国内外报告的血浆氨测定多采用酶促动力学法或终点法<sup>[1~4]</sup>. 动力学法测定的是反应动态过程中的吸光度变化, 由于血浆中氨含量甚微致使动态法测定的吸光度变化小, 测定结果的精密度很难控制; 终点法测定的是待测物基本转化前后的吸光度差值, 所测吸光度变化较动力学法大, 测定精度也有提高. 但文献报告的动态法或终点法测定, 内源性丙酮酸盐引起 NADH 消耗的问题均未得到较好解决. 本文报告了以 NADH 为底物的血浆氨 GLDH 酶促终点手工测定法. 其反应原理是在足量底物存在的条件下, 加入高活力的 GLDH 催化反应向右移动迅速接近反应终点.  $\text{NH}_4^+ + \alpha\text{-酮戊二酸} + \text{NADH} \longrightarrow \text{谷氨酸} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ . NADH 在 340 nm 处有最大吸收, 测定反应达到终点 340 nm 处吸光度的变化与同法处理的标准液比较, 计算氨的浓度. 反应体系中加入 1.9 kU/L 的乳酸脱氢酶 (LDH) 可迅速消除内源性丙酮酸盐引起 NADH 消耗所致的吸光度持续下降. 本文还

对其他实验条件如: 样品的采集与处理, 实验器皿的清洗以及试剂中主要成分最佳用量的选择等进行了探讨.

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

**1.1.1 无氨水的制备:** 于 1 000 ml 双蒸水中加入 0.01 mol/L NaOH 适量, 调节 pH 到 8.0  $\pm$  0.1, 加热煮沸 10 min, 待其冷却后密封保存备用.

**1.1.2 基础缓冲液:** 采用无氨水配制, 为 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0  $\pm$  0.05).

**1.1.3 工作底液:** 可据标本量的多少, 于基础缓冲液中按下列比例加入:  $\alpha\text{-酮戊二酸}$  15 mmol/L; NADH 0.25 mmol/L; ADP 1.5 mmol/L; LDH 1.9 kU/L. 试剂复溶后  $A_{340}$  应在 1.3~1.5 之间, 4℃密封保存可稳定 1 周. LDH 为德国宝灵曼公司产品 (Cat. No 127221).

**1.1.4 起动试剂:** 谷氨酸脱氢酶 (GLDH)  $\geq 120$  kU/L, 溶于 50% 的中性甘油, 来源同 LDH (Cat. No 127710).

**1.1.5 10 mmol/L 氨标准储存液:** 精取干燥

硫酸铵 66.8 mg 溶于 100 ml 无氨水中, 加入数滴氯仿液后 4℃ 密封保存.

**1.1.6** 100  $\mu\text{mol/L}$  氨标准应用液: 取氨标准储存液 1 ml, 加无氨水稀释到 100 ml, 加入数滴氯仿液后 4℃ 密封保存.

## 1.2 样品的采集与处理

采集空腹静脉血 2 ml, 置于 EDTA- $\text{Na}_2$  无氨抗凝瓶中 (3 mg/瓶), 盖塞后轻轻摇匀, 立即置于冰浴中送检. 于 4℃ 2 000 r/min 离心 3 min, 4℃ 保存, 1 h 内分析完毕.

## 1.3 测定仪器及方法

手工测定采用具有 340 nm 波长的分光光度计. 测定步骤见表 1.

表 1 血浆氨酶促手工法测定操作程序

|                           | 试剂空白管<br>(Re) | 标准空白管<br>(Rec) | 标准管<br>(Std) | 样本对照管<br>(Sc) | 样本测定管<br>(Sd) |
|---------------------------|---------------|----------------|--------------|---------------|---------------|
| 工作底液 (ml)                 | 1             | 1              | 1            | 1             | 1             |
| 无氨水 ( $\mu\text{l}$ )     | 175           | 125            | —            | 50            | —             |
| 氨 S 应用液 ( $\mu\text{l}$ ) | —             | —              | 125          | —             | —             |
| 血浆 ( $\mu\text{l}$ )      | —             | —              | —            | 125           | 125           |
| GLDH ( $\mu\text{l}$ )    | —             | 40             | 40           | —             | 40            |

37℃, 孵育 5 min, 测定  $A_{340}$ .

根据公式计算样本中氨浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ).

$$c = \frac{(A_{Sc} - A_{Sd}) - (A_{Re} - A_{Rec})}{A_{Rec} - A_{Std}} \times 100$$

## 2 结 果

### 2.1 最佳条件选择

**2.1.1** 酶促反应过程的监测: 取浓度为 10、125 和 200  $\mu\text{mol/L}$  的氨标准液, 按上法进行测定, 观察反应进程曲线, 2.5 min 时反应接近终点 (图 1). 本实验读取反应 5 min 时的吸光度进行计算.

**2.1.2** 最佳 pH 的选择: 配制 7.8、8.0、8.5 不同 pH 的工作底液, 对 150  $\mu\text{mol/L}$  标准液进行测定, 观察 pH 对酶促反应的影响. 当缓冲体系 pH 为 8.0 时, 待测物转化完全所需的

时间最短, 测定结果的稳定性最好.

**2.1.3** GLDH 用量的选择: 采用酶促终点法测定血氨, 由于生成物谷氨酸的堆积, 需要高活力的 GLDH 催化反应才能迅速达到平衡. 分别采用以  $\alpha$ -酮戊二酸为底物的速度法测得活力为  $0.5 \times 10^4$ 、 $7.0 \times 10^4$ 、 $10.0 \times 10^4$ 、 $18.0 \times 10^4$  U/L 的 GLDH 对 200  $\mu\text{mol/L}$  的氨标准液进行测定, 结果当 GLDH 活力  $\geq 10 \times 10^4$  U/L (反应体系中  $\geq 3 500$  U/L) 时, 反应在 2.5 min 内均可达到终点 (图 2).

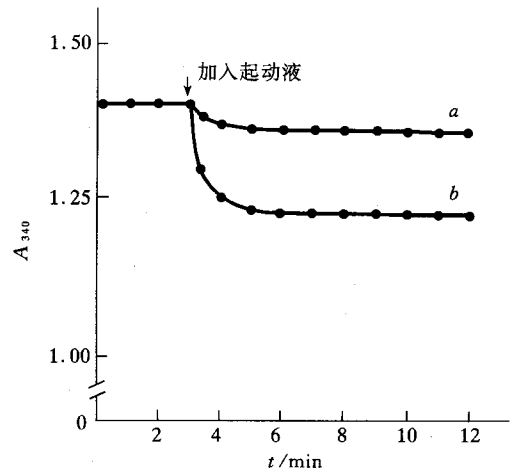


图 1 反应进程曲线

a: 标准空白管; b: 200  $\mu\text{mol/L}$  氨标准.

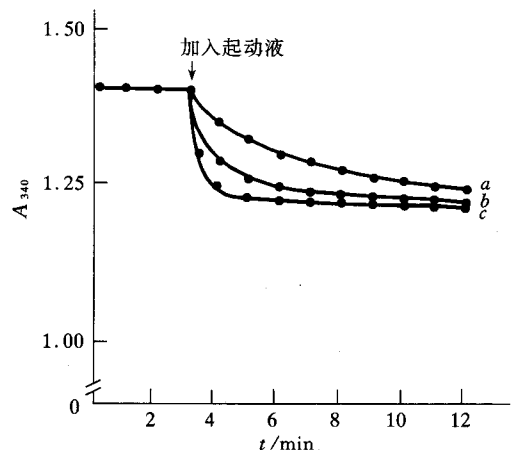


图 2 谷氨酸脱氢酶用量的选择

a:  $0.5 \times 10^4$  U/L; b:  $7.0 \times 10^4$  U/L; c:  $10.0 \times 10^4$  U/L.

**2.1.4 LDH 用量的选择:** 内源性丙酮酸盐对血氨测定的影响已有文献报告, 血清中 LDH 使丙酮酸还原成乳酸, 同时伴有 NADH 的脱氢导致血氨测定结果的不准确.



我们配制了含不同活力浓度的 LDH 工作底液, 对含不同浓度丙酮酸钠的水溶液进行测定, 观察反应进程曲线, 结果当底液中 LDH 活力达 1 kU/L 时, 10 倍于参考值上限 ( $< 0.1 \text{ mmol/L}$ ) 的血浆丙酮酸钠在 1.5 min 内可完全被转化. 本实验选 LDH 用量为 1.9 kU/L.

**2.1.5 NADH 用量的选择:** 固定其他条件, 采用含不同浓度 NADH 反应底液与高中低不同浓度的氨标准液反应, 观察加入启动试剂 GLDH 后 340 nm 处的吸光度变化, 结果底液中 NADH 浓度为 0.11 mmol/L 时, 200  $\mu\text{mol/L}$  的氨可迅速并完全转化. 考虑到内源性物质导致的 NADH 的消耗和测试仪器对吸光度的限制, 本实验选择 NADH 用量为 0.25 mmol/L.

**2.1.6 ADP 用量的选择:** ADP 对 GLDH 具稳定作用且可加速反应速度缩短反应达到平衡所需要的时间. 固定其他条件, 采用含不同浓度 ADP 的工作底液对 200  $\mu\text{mol/L}$  氨标准液进行测定, 观察反应 5 min 内吸光度的经时变化 ( $\Delta A$ ) (图 3). 当工作底液中 ADP 浓度在 0.4

~2.2 mmol/L 范围内, 200  $\mu\text{mol/L}$  的氨标准液在 2.5 min 内可达完全转化, 工作底液中 ADP 浓度超过 3.0 mmol/L 时, 酶促反应受到明显抑制. 本实验选用 1.5 mmol/L 的 ADP 为工作浓度.

## 2.2 方法学评价

**2.2.1 线性范围:** 将 800  $\mu\text{mol/L}$  血氨测定标准液采用无氨水稀释成不同浓度, 按本法测定, 观察吸光度差值-浓度曲线, 结果本法测定线性范围为 6~200  $\mu\text{mol/L}$ .

**2.2.2 重复性试验:** 采用本法对 Bio-Rad 公司出品的氨 P 值 ( $\bar{x} \pm 90 \mu\text{mol/L}$ ) 和 N 值 ( $\bar{x} \pm 30 \mu\text{mol/L}$ ) 质控物进行测定, 结果批内变异系数 ( $n=10$ ) 为 4% 和 6%. 我们还对这两种不同水平的质控物连续测定 20 d, 结果常规条件下的变异系数均小于 10%.

**2.2.3 回收率试验:** 取血氨含量为 30  $\mu\text{mol/L}$  的血浆样品 1 ml, 分别加入 330、880、1760  $\mu\text{mol/L}$  氨标准液 100  $\mu\text{l}$  做回收试验, 结果三种水平氨 (30、80、160  $\mu\text{mol/L}$ ) 的回收率分别为 105%、90% 和 96%.

**2.2.4 对比实验:** 采用本法 and 干化学法 (测定仪器为美国柯达 700XR 全自动干化学分析仪) 对 15 份病人血浆样品同时作氨 (40~190  $\mu\text{mol/L}$ ) 测定, 结果两者呈高度相关,  $y$  (本法) =  $1.025x$  (干法) - 3.503,  $r = 0.994$ , ( $\bar{x} \pm s$  为  $104 \pm 46.8$ ,  $\bar{y} \pm s$  为  $103 \pm 48.3$ ).

## 2.3 参考值

正常健康志愿者 30 例, 年龄 20~40 岁, 男女各半, 清晨空腹静脉血, EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝, 测得血浆氨分布范围为 10~70  $\mu\text{mol/L}$ .

## 3 讨 论

由于血浆中氨水平较低, 其测定精密性与准确性很难掌握. 实验过程中工作底液中氨的含量痕迹、实验所用器皿作无氨处理、标本的正确收集与处理是精确测定血浆氨的关键. 普通蒸馏水中很难做到无氨, 经数次蒸馏后水中氨也不能去除, 采用该水所配试剂空白吸光度

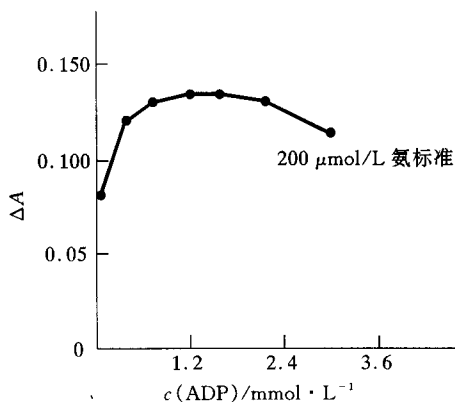


图 3 ADP 用量的选择

可下降 0.25, 氨含量达 350  $\mu\text{mol/L}$  以上, 为正常人氨水平的 5 倍多, 致使氨测定变异系数超过 15%. 于普通蒸馏水中加入适量 0.01 mol/L NaOH 调节 pH 偏碱后, 加热煮沸 5 min 可将水中氨去尽. 由于试剂中  $\alpha$ -酮戊二酸、NADH 含微量氨, 采用本文介绍的方法配制底液, 试剂空白管吸光度仅下降 0.04~0.06, 氨含量约为 80  $\mu\text{mol/L}$ , 此时氨测定仍具较好的重复性和回收率. 测定过程中所有玻璃器皿临用前均需烘烤, 所用塑料加样头应采用 1 mol/L NaOH 浸泡, 无氨水淋洗, 80  $^{\circ}\text{C}$  烘干后密封备用. 测定血氨应用的是抗凝血, 而不是血清. 抗凝剂可以是草酸钾或 EDTA- $\text{Na}_2$ . 无论采用哪一种抗凝剂, 重要的是制配好无氨污染的抗凝瓶后应盖上塞子以减少其在空气中暴露, 影响测定结果. 血浆采集后应立即置于冰浴中送检. 我们观察到 25  $^{\circ}\text{C}$  时全血样本氨含量每小时平均上升 15  $\mu\text{mol/L}$ , 因此血浆采集后应尽快完成测定. 溶血样本不可采用, 因为红血球中氨浓度为血浆的 2~3 倍.

血氨酶促法测定时血浆中内源性丙酮酸盐可引起 NADH 的消耗. 文献报告以采用血浆样品与基础应用液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育, 让其与底物充分反应后再加入 GLDH 起动反应的方法克服干扰<sup>[1]</sup>. 我们发现 LDH 为 250 U/L 的血浆样品与底液混后 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 吸光度也仍未达到平衡. 我们在缓冲液中加入过量的外源性 LDH 酶, 可迅速排除内源性丙酮酸盐和 LDH 引起 NADH 消耗导致的吸光度持续下降对测定的干扰, 提高了测定的精确度.

参 考 文 献

1 陈伟英, 王玉兰, 高 涛. 动力学法血氨的全自动分析. 中华医学检验杂志, 1992, 15 (5): 264  
2 李 勇, 庄一义. 血浆氨的酶动力学测定法探讨. 中华

医学检验杂志, 1991, 14 (1): 21  
3 Bvuce A W, Leinddecker C M, Freier E F. Two-point determination of plasma ammonia with the centrifugal analyzer. Clin Chem, 1978, 24: 782  
4 Peslr-Imam M, Kumar S, Willis C E. Enzymatic determination of plasma ammonia: evaluation of sigma and BMC kit. Clin Chem, 1978, 24: 2044

**Enzymatic End-Point Assay for Determination of Ammonia in Plasma with GLDH-NADH Reaction System.** XU Guobin, ZHU Lihua, HONG Jianmei, XIA Tiean (*Department of Clinical Laboratory, First Teaching Hospital of Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

**Abstract** An improved enzymatic end-point method for determination of plasma ammonia was reported. Semi-micromethod were used with a total incubation volume 1 165  $\mu\text{L}$ . Mix 125  $\mu\text{L}$  EDTA  $\text{Na}_2$ -anticoagulation plasma and 1 000  $\mu\text{L}$  PBS-substrate-solution containing 1.9 kU/L LDH (pH 8.0), then add 40  $\mu\text{L}$  GLDH ( $\geq 12 \times 10^4$  U/L) to start the reaction. Incubation periods were shortened to 5 min. The limited detection for ammonia in plasma is 4  $\mu\text{mol/L}$ , and this method is linear from 6 to 200  $\mu\text{mol/L}$ . The method is accurate and reliable. The analytical recovery is from 90% to 105%. The within-run CV% was  $\leq 5\%$ . The routine condition variance of the method ranged from 5% to 10%. It was found that 1.9 kU/L LDH was sufficient to eliminate the decrease of NADH by endogenous pyruvate and LDH in plasma. The normal fasting ammonia in plasma is 10~70  $\mu\text{mol/L}$ .

**Key words** ammonia, enzymatic end-point assay, plasma