

• 检验技术与方法 •

应用高速离心技术消除乳糜干扰的关键参数研究*

孟凡超, 赵宗玲

(首都医科大学密云教学医院检验科, 北京密云 101500)

摘要:目的 探寻高速离心法消除乳糜干扰的关键离心参数。方法 通过向本底血清中添加乳糜微粒建立乳糜血, 在 5 个不同参数下, 离心同一组模型, 将其下层血清的生化指标与本底血清进行配对 *t* 检验, 并对存在统计学差异的实验组进行相对偏倚分析。结果 与本底血清相比, 对于 ALT、AST、TP、ALB、ALP、GGT、Fe 7 项, 相对离心力(RCF)29 703 g 离心 20 min 时的相关系数较高, 差异无统计学意义($P > 0.01$); 对于 CK、CHE 2 项, 20 672 g 离心 15 min 时的相关系数较高, 差异无统计学意义($P > 0.01$); 对于 Zn, 9 168 g 离心 5 min 时的相关系数较高, 差异尚无统计学意义($P > 0.01$); 对于 Glu、LDH、CRE、Urea、UA、Ca、P 7 项所有实验组差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 但各组产生的相对偏倚均在可接受范围之内, 对于 Ca、P 两项在 9 168 g 离心 5 min 时的相关系数较高。结论 推荐使用 29 703 g 离心 20 min 消除乳糜对 ALT、AST、TP、ALB、ALP、GGT、Fe、Glu、LDH、CRE、Urea、UA 的干扰, 使用 20 672 g 离心 15 min 消除对 CK、CHE 的干扰, 使用 9 168 g 离心 5 min 消除对 Zn、Ca、P 的干扰。

关键词: 高速离心; 乳糜血; 干扰; 离心参数

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3395-03

Research on key parameters of eliminating interference of chyle by high-speed centrifugation technique

Meng Fanchao, Zhao Zongling

(Department of Clinical laboratory, Miyun Teaching Hospital of Capital Medical University, Miyun, Beijing 101500, China)

Abstract: Objective To explore the key parameters of eliminating the interference of chyle by adopting the high-speed centrifugation technique. **Methods** To establish the chylemia by adding chylomicrons to background serum, centrifuge the same model under five different parameters, compare the biochemical indicators of lower serum with background by matched *t*-test, and to analyze the relative bias of the experimental group with statistical differences. **Results** Compared with the background serum, for ALT, AST, TP, ALB, ALP, GGT and Fe, the correlation coefficient was higher and the differences had no statistical significance ($P > 0.01$) when centrifuging for 20 min by RCF 29 703 g; for CK and CHE, the correlation coefficient was higher and the differences had no statistical significance ($P > 0.01$) when centrifuging for 15 min by 20 672 g; for Zn, the correlation coefficient was higher and the differences had no statistical significance ($P > 0.01$) when centrifuging for 5 min by 9 168 g. For Glu, LDH, CRE, Urea, UA, Ca and P, all the experimental groups had statistically significant differences ($P < 0.01$), but the relative bias in each group were within the acceptable range. For Ca and P, the correlation coefficient was higher when centrifuging for 15 min by 20 672 g. **Conclusion** It is recommended to eliminate the interference of chyle on ALT, AST, TP, ALB, ALP, GGT, Fe, Glu, LDH, CRE, Urea and UA by using the centrifugal parameters (29 703 g, 20 min), on CK and CHE by using the centrifugal parameters (20 672 g, 15 minutes) and on Zn, Ca and P by using the centrifugal parameters (9 168 g, 5 minutes).

Key words: high-speed centrifugation; chylemia; interference; centrifugal parameter

乳糜血对临床生化检验存在多重干扰机制, 主要有浊度增加或光散射、增加空白吸光度、降低比色法反应吸光度的变化以及增加标本内物质的极性与非极性^[1-2]。因此, 如何消除乳糜血对生化检验的干扰成为困扰检验工作者的一大难题。石凌波和史惠群^[3]研究利用高速离心法消除乳糜血干扰, 取得了一定成果, 但是目前对于选择高速离心机的离心参数问题, 尚缺乏统一的规范。本文以此为出发点, 研究高速离心技术消除乳糜血干扰的关键参数。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 本底血清 收集本院 2013 年 11 月生化检验的血清若干份, 要求无溶血、黄疸和血脂成分异常, 且三酰甘油浓度小于 0.7 mmol/L, 将其中每 4 份充分混匀制备成 1 例本底血清, 共

计获得本底血清 48 份。

1.1.2 脂浊血清 收集本院 2013 年 3 月至 2013 年 11 月生化检验的全部脂浊血清标本, 且无黄疸和溶血。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Olympus AU2700 全自动生化分析仪; SIGMA 3-18K 低温高速离心机。

1.2.2 试剂 中生北控生物科技股份有限公司试剂: 谷丙转氨酶 ALT 试剂盒(批号: 130561)、谷草转氨酶 AST 试剂盒(批号: 130501)、总蛋白 TP 试剂盒(批号: 131161)、清蛋白 ALB 试剂盒(批号: 131291)、碱性磷酸酶 ALP 试剂盒(批号: 130661)、谷酰转氨酶 GGT 试剂盒(批号: 130671)、葡萄糖 GLU 试剂盒(批号: 130551); 北京利德曼生化股份有限公司试剂: 肌酐 CRE 试剂盒(批号: 307221F)、尿素 UREA 试剂盒(批

* 基金项目: 北京市密云县科技计划项目(2012004)。 作者简介: 孟凡超, 男, 主管技师, 主要从事临床生化与分子诊断学研究。

号:310151D)、尿酸 UA 试剂盒(批号:306172E)、肌酸激酶 CK 试剂盒(批号:307242F)、乳酸脱氢酶 LDH 试剂盒(批号:305212E)、铁 Fe 试剂盒(批号:910131H);Beckman Coulter Biomedical Limited Company 试剂;钙 Ca 试剂盒(批号:4069)、无机磷 P 试剂盒(批号:3333)、镁 Mg 试剂盒(批号:4319)。

1.3 方法

1.3.1 干扰物的制备 将脂浊血清标本在-5℃下经 29 703 g 离心 20 min,弃去下层清液,并加入约 5 倍体积的生理盐水,充分混匀清洗,重复前述操作 2 次,最后再经高速离心后,收集上层浓缩脂质制成乳糜浓缩液作为干扰物。

1.3.2 标本制备 将每例本底血清分成两份,第一份作为对照组,第二份用以制备实验组,每组 48 例。按照干扰物与本底血清 1:100 至 1:20 的不同比例,分别向第二份中加入干扰物后充分混匀制成乳糜血(实验组),将其平均分装成 5 份,分别命名为实验组 A、B、C、D、E。常温下,分别对 A 组以 RCF 9 168 g 离心 5 min,对 B 组以 11 093 g 离心 8 min,对 C 组以 13 201 g 离心 10 min,对 D 组以 20 672 g 离心 15 min,对 E 组以 29 703 g 离心 20 min,使用注射器分别提取下层血清,注意勿混入上层混浊血清。

1.3.3 检测项目 将提取的下层血清与本底血清同时进行 ALT、AST、TP、ALB、ALP、GGT、CHE、GLU、CRE、UREA、UA、CK、LDH、Ca、P、Fe、Mg、Zn 等 18 项生化指标检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,将 5 个实验组的检测结果分别与对照组进行配对 t 检验(检验水准 $\alpha=0.01$,

$P<0.01$ 比较差异有统计学意义),选取相关系数较高、差异无统计学意义的离心参数;对于存在统计学差异的实验组,其与对照组相比产生的相对偏倚基本服从正态分布,观察其 95% 的分布区间是否超出可接受范围,选取相关系数较高、相对偏倚未超过可接受范围的离心参数。

2 结果

2.1 高速离心法消除乳糜对 11 项生化指标干扰结果比较 与对照组相比,对于 ALT、AST、TP、ALB、ALP、GGT、Fe 7 项,实验组 E 的相关系数较高、差异无统计学意义($P>0.01$),选取离心参数为:29 703 g 离心 20 min;对于 CK、CHE 2 项,实验组 D 的相关系数较高、差异无统计学意义($P>0.01$),选取离心参数为:20 672 g 离心 15 min;对于 Zn,实验组 A 的相关系数较高、差异无统计学意义($P>0.01$),选取离心参数为:9 168 g 离心 5 min;对于 Mg,所有实验组的相关系数均不高,见表 1。

2.2 高速离心法消除乳糜对 7 项生化指标干扰结果比较 与对照组相比,Glu、LDH、CRE、Urea、UA、Ca、P 7 项所有实验组均存在统计学意义上的差异($P<0.01$),其中 Glu、LDH、CRE、Urea、UA 5 项各组的相关系数均较高,偏倚均在可接受范围之内,为了使乳糜成分分离彻底,推荐使用实验组 E 的离心参数:29 703 g 离心 20 min;而 Ca、P 2 项实验组 A 的相关系数较高,偏倚在可接受范围之内,推荐使用实验组 A 的离心参数:9 168 g 离心 5 min,见表 2。

表 1 高速离心法消除乳糜对 11 项生化指标干扰结果比较($\bar{x}\pm s, n=48$)

项目	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
ALT	17.42±5.64	16.74±5.52	16.93±5.61	16.87±5.30	17.09±5.58	17.29±5.61
AST	24.57±9.45	23.93±9.26	23.80±9.39	23.98±9.33	24.15±9.57	24.41±9.60
TP	75.33±6.62	74.54±6.59	74.55±6.63	74.60±6.31	74.84±6.60	75.44±6.51
ALB	45.04±4.64	44.32±4.16	44.55±4.54	44.47±4.30	44.77±4.57	45.01±4.34
GGT	27.33±12.42	26.61±12.40	26.67±12.36	26.67±12.33	26.90±12.55	27.37±12.47
ALP	86.35±17.75	84.88±17.95	85.04±17.88	84.93±18.21	85.62±18.41	86.82±18.36
Fe	13.47±4.21	13.14±4.04	13.33±4.12	13.22±4.06	13.02±4.37	13.42±4.16
Zn	13.77±1.98	13.60±2.08	13.55±2.13	13.54±1.90	13.18±2.03	13.52±1.85
CK	166.70±306.40	161.40±295.60	161.30±297.70	162.30±297.80	165.80±303.60	165.70±306.50
CHE	8 070.00±1 334.00	7 941.00±1 319.00	7 953.00±1 324.00	7 981.00±1 323.00	8 072.00±1 331.00	8 233.00±1 354.00
Mg	0.96±0.06	0.93±0.06	0.93±0.06	0.93±0.05	0.94±0.07	0.93±0.06

表 2 高速离心法消除乳糜对 7 项生化指标干扰结果比较($\bar{x}\pm s$, 偏倚%, $n=48$)

项目	统计	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	可接受范围(%)
Glu	$\bar{x}\pm s$	5.40±1.05	5.27±1.04	5.30±1.05	5.28±1.01	5.25±1.04	5.28±1.05	
	偏倚		-4.94~1.83#	-4.95~1.87#	-4.05~1.30#	-4.54~1.89#	-4.13~1.39#	-7~7
LDH	$\bar{x}\pm s$	148.90±31.83	144.69±30.57	145.26±30.47	146.02±32.15	147.61±32.37	150.69±32.24	
	偏倚		-6.63~1.25#	-6.64~2.03#	-5.64~1.87#	-4.64~2.85#	-3.29~2.73#	-11~11
CRE	$\bar{x}\pm s$	78.98±38.99	76.90±37.65	77.45±37.96	77.24±38.04	76.99±37.40	77.63±37.78	
	偏倚		-6.37~1.98#	-6.02~1.31#	-5.79~1.56#	-6.46~1.74#	-5.08~1.81#	-12~12
Urea	$\bar{x}\pm s$	5.17±1.61	4.96±1.53	5.00±1.55	4.99±1.61	4.97±1.54	5.02±1.59	

续表 2 高速离心法消除乳糜对 7 项生化指标干扰结果比较($\bar{x} \pm s$, 偏倚%, $n=48$)

项目	统计	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	可接受范围(%)
UA	偏倚		-7.30~2.25 [#]	-7.37~2.04 [#]	-7.20~2.21 [#]	-7.34~2.12 [#]	-7.23~2.17 [#]	-8~8
	$\bar{x} \pm s$	306.57±44.92	298.54±43.38	299.77±43.64	299.16±43.55	298.91±42.88	300.45±44.28	
Ca	偏倚		-5.47~0.45 [#]	-5.34~0.19 [#]	-5.14~0.18 [#]	-5.46~0.87 [#]	-4.37~0.50 [#]	-12~12
	$\bar{x} \pm s$	2.55±0.13	2.47±0.13	2.45±0.13	2.46±0.13	2.46±0.13	2.47±0.13	
P	偏倚		-0.174~0.011 [#]	-0.215~0.018	-0.199~0.021	-0.208~0.027	-0.204~0.026	-5~5
	$\bar{x} \pm s$	1.30±0.11	1.26±0.10	1.25±0.11	1.25±0.11	1.25±0.10	1.24±0.11	
	偏倚		-8.15~1.60 [#]	-8.73~0.68	-8.59~0.95	-9.18~1.04	-10.00~0.87	-10~10

[#]: 与对照组相比, 该组数据相关系数较高, 偏倚在可接受范围之内。

3 讨 论

乳糜微粒(CM)是血液中颗粒最大的脂蛋白, 含三酰甘油近 90%, 因而其密度也最低。健康人空腹 12 h 后采血时, 血清中无 CM。餐后以及某些病理状态下血液中含有大量的 CM 时, 因其颗粒大能使光发生散射, 血液外观混浊, 形成乳糜血^[4]。因为 CM 的多重干扰机制, 乳糜血对常见临床生化检验存在干扰已经成为学界的共识。尽管试剂厂商提供了抗乳糜干扰的能力, 但其数据多依靠脂肪乳对该试剂的干扰试验获得。脂肪乳是由大豆油、卵磷脂、甘油以及水共同组成的平衡体系, 其粒子大小不完全等同于 CM 分子, 此外脂肪乳注射液的折射率也不同于人体血液中的脂蛋白^[5], 因此使用厂商提供的抗乳糜干扰能力需谨慎^[6]。

然而随着生活水平的提高, 乳糜血成为临床检验中最常见的干扰原因之一。为了消除乳糜干扰, 既往学者尝试了多种研究, 目前文献报道的消除乳糜血干扰的方法主要有乙醚萃取法^[7]、磷钨酸-镁-PEG 沉淀法^[8]、低温冷凝法^[9]及高速离心法等, 前二者需要向反应体系中引入附加成分, 一般认为测定的原反应体系发生改变, 将会影响测定结果, 而低温冷凝法耗时长, 不适合临床应用。因为乳糜成分的颗粒具有不同于其他成分的大小和密度, 才能用密度梯度离心法来分离^[10]。然而使用高速离心法时, 离心的速度、时间等关键参数及取下层血清的方式、体积等均可能影响测定结果, 因此采用高速离心法消除乳糜血干扰最好能够建立一个通行的标准化操作程序(SOP)^[11]。本文以高速离心法为基础, 研究消除乳糜血对常见生化检验的干扰的关键参数, 用以建立高速离心标准化操作程序。

通过向低三酰甘油的本底血清中加入不等量的 CM, 建立系列浓度的乳糜血标本, 要求三酰甘油浓度尽量覆盖临床可能出现的病理浓度。经过 5 个不同离心参数的高速离心处理, 比较本底血清与高速离心后的下层血清检测结果。研究发现, 与本底对照相比, 乳糜血模型经 RCF 29 703 g 离心 20 min 时, ALT、AST、TP、ALB、ALP、GGT、Fe 等 7 项结果存在的差异无统计学意义($P>0.01$), 且相关系数较高; 经 20 627 g 离心 15 min 时, CK、CHE 2 项结果存在的差异无统计学意义($P>0.01$), 且相关系数较高; 对于 Zn, 9 168 g 离心 5 min 时的相关系数较高、差异无统计学意义($P>0.01$); 对于 Mg, 5 个实验组的相关系数均不高。同时发现, 对于 Glu、LDH、CRE、Urea、UA、Ca、P 7 项, 5 个实验组差异均有统计学意义($P<0.01$)。

因此, 分析各实验组相对于本底对照组产生的相对偏倚, 参照中华人民共和国卫生行业标准 WS/T 403-2012 文件《临床生物化学检验常规项目分析质量指标》^[12]要求, 发现相对偏倚的分布范围均在 WS/T 403-2012 文件要求的允许总误差范围之内, 其中 Ca、P 2 项在 9 168 g 离心 5 min 时的相关系数较高, 而其余 5 项各组的相关系数均较高, 为使其乳糜分离彻底, 建议使用 29 703 g 离心 20 min 消除乳糜干扰。

本文使用高速离心技术消除乳糜干扰, 在分离乳糜微粒的同时, 有可能会引起血清的体积改变, 从而影响了血清中待测成分浓度的变化。然而, 这种变化的程度及其对临床结果的影响是否有意义, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 文江平, 郭拥军, 鲁辛辛, 等. 临床实验室认可中临床化学抗干扰性能的系统评估[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 216-218.
- [2] 胥华猛. 3 种方法消除脂血对生化测定干扰的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1813-1814.
- [3] 石凌波, 史惠群. 利用高速离心法消除脂血对生化测定的干扰[J]. 检验医学, 2004, 19(2): 138-140.
- [4] 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[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5): 391.
- [5] 赵建华. 脂血造成干扰的评估[J]. 齐鲁医学检验, 2005, 16(1): 16-18.
- [6] 朱征, 丁显平, 杨敏, 等. 高脂血对临床生化测定影响及处理方法的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2533-2560.
- [7] 刘万彬, 隆维. 聚乙二醇 4000 处理脂血后对生化结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 504-506.
- [8] 熊俊, 石文静, 闪全忠. 磷钨酸-镁-PEG 法消除脂血干扰的方法评估[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 50-52.
- [9] 刘畅, 姜友珍, 李爽. 乳糜血对 β_2 微球蛋白测定的影响及去除方法探讨[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(31): 3886-3887.
- [10] 李培京. 超速离心机操作应用及基本理论[J]. 现代科学仪器, 2008, 10(1): 124-125.
- [11] 张帆. 高速离心对临床常规生化项目测定结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 887-888.
- [12] 卫生部临床检验标准专业委员会. WS/T 403-2012, 临床生物化学检验常规项目分析质量指标[S]. 2012.

(收稿日期: 2014-05-13)