

# 生理体液法测定 40 例健康志愿者血浆游离氨基酸正常值\*

何桂珍<sup>1</sup>, 陶智兵<sup>2</sup>, 张文辉<sup>2</sup>, 王洁<sup>1</sup>

(1. 北京协和医院肠外肠内营养科, 北京 100730; 2. 北京苏里曼制药有限公司, 北京 102127)

**摘要:**目的 建立生理体液的方法分析血浆氨基酸和测定健康志愿者血浆游离氨基酸正常值。方法 ①建立方法学:包括血样重复性、回收率、线性、稳定性;②测定 40 例健康志愿者血浆氨基酸正常值。结果 不同浓度的标准液(2 nmol, 4 nmol 和 8 nmol)进行分析,以氨基酸的峰面积对进样量作线性回归,所有氨基酸的  $R^2$  均在 1~0.999;血样不同氨基酸的批内重复性(rsd;0.30~2.90)和批间重复性(rsd;0.40~5.16);回收率 93.1%~107.4%。测定 40 例健康志愿者(男:女=1:1)的血浆氨基酸正常值,并与其它仪器测定的结果进行比较。结论 用枸橼酸锂缓冲系统分析血样游离氨基酸,有很好的重复性、回收率、线性和稳定性。比较不同仪器测定的健康志愿者血浆游离氨基酸正常值表明有较好的一致性,证实生理液分析方法的可靠性。

**关键词:**氨基酸测定;氨基酸正常值;生理体液法。

中图分类号:R446.112 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-046-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.013

## Establishing Physiological Body Fluid Method to Evaluate the Normal Value of Plasmic Free Amino Acid in Normal Healthy Volunteers

HE Gui-zhen<sup>1</sup>, TAO Zhi-bing<sup>2</sup>, ZHANG Wen-hui<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>1</sup>

(1. Department of Enteral and Parenteral Nutrition, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China; 2. Funded by National Natural Science Foundation of China and the Natural Sciences Foundation of Beijing, Beijing 102127, China)

**Abstract: Objective** To analyze the plasma amino acid levels and evaluate the free amino acids value of normal healthy volunteers in plasma by establishing physiological fluid method. **Methods** ① Establishment of methodology: including repeatability of blood sample, recovery rate, linearity, and stability; ② The free amino acid values in plasma in 40 normal healthy volunteers were analyzed. **Results** With the standard solution of different concentrations (2, 4 and 8 nmol) analyzed and linear regression of amino acid calculated, found that  $R^2$  of all the amino acids were within the range from 1 to 0.999. The repeatability with in batch and between batches of different amino acid in blood samples were respectively 0.30~2.90 (rsd) and 0.40~5.16 (rsd); recovery rates were 93.1%~107.4%. Then evaluated the normal values of plasma amino acid in 40 healthy volunteers (male vs female; 1 vs 1), and compared the results with that measured by other instruments. **Conclusion** With lithium citrate buffer system to analyze the free amino acid in blood samples, it displayed good reproducibility, recovery rate, linearity and stability. Comparison of different instruments measuring the free amino acids in plasma of normal healthy volunteers showed good agreement, confirming that the method of physiological fluid analysis is reliable.

**Keywords:** amino acid determination; amino acid normal value; physiological fluid method

蛋白质是生命最重要的两个基本成分之一(另一个为核酸)。蛋白质是由 20 多种氨基酸以不同形式连接而成的共价多肽链。氨基酸是蛋白质的基本组成单位。人和动物必须用氨基酸或蛋白质作为氮源,食物中的蛋白质必须先分解为氨基酸,然后再合成自身的蛋白质,体内已有的蛋白质又不断地分解进行更新。游离氨基酸是体内合成蛋白质的主要来源。在肠内和肠外营养病人中,氨基酸的补充是合成蛋白质的主要氮源<sup>[1~4]</sup>。所以从某种程度上讲,人体蛋白质代谢的生理意义取决于氨基酸代谢。研究血浆游离氨基酸的动态平衡可以

帮助了解体内氨基酸的代谢情况<sup>[5~6]</sup>。本文建立生理体液(血、尿和组织)的分析方法,并测定一组健康志愿者血浆游离氨基酸正常值,为临床研究氨基酸代谢提供参考依据。

### 1 材料和方法

1.1 仪器 塞卡姆全自动氨基酸分析仪:(SYKAM, S433D 德国);氨基酸锂型分离柱(Li-柱型号),锂缓冲系统。检测波长:通道 1 波长 570 nm,通道 2 波长 440 nm,用于脯氨酸以及羟基脯氨酸的测定。

1.2 分离条件 三个不同 pH 的柠檬酸锂缓冲

\* 基金项目:本研究获国家自然科学基金(30940069)和北京市自然科学基金(7102127)资助。

作者简介:何桂珍(1952),女,教授,研究方向:临床营养代谢研究(氨基酸、脂肪和肠屏障),Tel:010-69154096,13601207118,E-mail:hgzpumc@163.com。

液: A (pH2.9, 0.12 mol/L), B (pH4.2, 0.3 mol/L), C (pH8.00, 0.3 mol/L) 和再生液 D: LiOH (0.5 mol/L), 显色液为茚三酮, 样品稀释液(枸橼酸锂缓冲液 pH2.2, 0.12 mol/L)。缓冲液 A/B/

C/D 泵流速: 0.45 ml/min; 显色剂茚三酮溶液/水冲洗液泵流速: 0.25 ml/min。缓冲液梯度洗脱时间和分离柱变温程序见表 1。标准品和血样的分析时间均为 128 min/个。

表 1 生理体液氨基酸分析程序

时间 (min)	缓冲液泵(%)				茚三酮泵(%)		柱温程序	
	Buffer A	Buffer B	Buffer C	Buffer D	茚三酮	水	时间(min)	柱温(°C)
0.00	100.0	0.0	0.0	0.0	100	0	0.00	44
9.00	100.0	0.0	0.0	0.0	100	0		
11.00	79.0	21.0	0.0	0.0	100	0		
30.00	79.0	21.0	0.0	0.0	100	0	30.00	44
34.00	66.0	34.0	0.0	0.0	100	0	31.00	37
39.50	62.0	38.0	0.0	0.0	100	0	39.00	37
41.00	62.0	38.0	0.0	0.0	100	0	46	60
44.00	64.0	36.0	0.0	0.0	100	0	72	60
63.00	0.0	100.0	0.0	0.0	100	0		
64.00	0.0	100.0	0.0	0.0	100	0		
69.00	0.0	0.0	100.0	0.0	100	0		
79.00	0.0	0.0	100.0	0.0	100	0	77	64
82.00	0.0	0.0	86.0	14.0	100	0		
84.00	0.0	0.0	86.0	14.0	100	0		
84.10	0.0	0.0	80.0	20.0	100	0		
101.00	0.0	0.0	78.0	22.0	100	0		
101.10	0.0	0.0	0.0	100.0	100	0	103	74
105.00	0.0	0.0	0.0	100.0	100	0		
105.10	100.0	0.0	0.0	0.0	0	100		
128.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0	100	113	44
128.10	100.0	0.0	0.0	0.0	0	100	128	44

1.3 标准液配制 ①色氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺混合液配制: 由于生理液标准品中没有色氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺三个氨基酸, 因此需要单独配制。精密称量色氨酸 (Sigma, No. BCBC115V, 美国)、门冬酰胺 (Sigma, No. 021M5416V, 美国)、谷氨酰胺 (Sigma, No. BCBC6452V, 美国), 置 25 ml 量瓶中, 加样品稀释液 (Sykam, No. 6001007, 德国) 溶解并稀释至刻度, 混匀, 制成色氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺各 2.5 μmol/ml 的混合溶液, ②取 1 ml 上述溶液于 25 ml 量瓶中, 另取生理标准液 Type B (日本和光, No. EPF0020, 日本)、Type AN-II (EPF0807, 日本) 各 1.0 ml, 加样品稀释液稀释至刻度, 混匀作为标准对照溶液。将配制好的标准溶液、分装于 EP 管中 -80°C 保存。有效期为配置后 2 月内。测定前, 将标准液取出, 缓慢升温到室温, 摇匀后上机。

1.4 重复性、回收率和稳定性测定 批内重复性: 同一氨基酸标准液连续进样重复测定 6 次, 以峰面积计算标准液在氨基酸分析仪上的重复性。批间重复性: 分别在 0 天 (20110816)、6 天 (20110822)、10 天 (20110826) 每次连续重复 6 次测定同一批氨基酸标准液的重复性, 并计算其批间重复性。回收率: 精密称取谷氨酰胺 8.76 mg、色氨酸 7.86 mg 置 25 ml 量瓶中, 加样品稀释液溶解并稀释到刻度

混匀, 精密量取 800 μl, 加标准对照品溶液 Type B 以及 Type AN-II 各 400 μl, 加样品稀释液稀释到 5.0 ml, 混匀作为标准溶液 1。精密量取 500 μl 溶液 1 加样品稀释液 500 μl, 混匀后作为标准对照溶液 S; 取 500 μl 沉淀蛋白后的血样, 加 500 μl 样品稀释液混匀后作为血样溶液 T; 取 500 μl 沉淀蛋白后的血样, 加入 500 μl 标准溶液 1 混匀作为标准加血样混合溶液 M。标准对照溶液 S、血样溶液 T、标准加血样混合溶液 M 各进样分析 5 次, 按各峰峰面积的平均值分别计算标准和血样的回收率。

$$\text{回收率} \% = \frac{(AM - AT)}{As} \times 100\%$$

As: 标准溶液 S 峰面积均值; AT: 血样溶液 T 峰面积均值; AM: 标准加血样混合溶液 M 峰面积均值。氨基酸标准液的稳定性: 标准液分装后置 -80°C 冰箱保存, 分别在 0 天、30 天和 60 天测定标准液的稳定性。

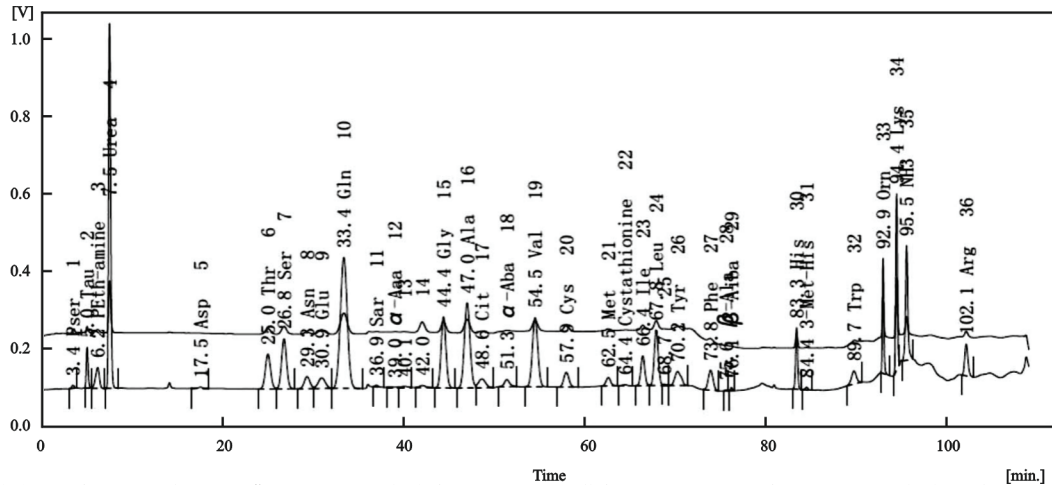
1.5 血样处理 取病人清晨空腹全血 2.5 ml, 肝素抗凝, 取血后立即置冰浴放置 15 min 后, 3 500r/min 离心 15 min, 取上清液 800 μl, 加 200 μl 10 g/dl 磺基水杨酸 (sulfosalicylic acid, SSA) 沉淀蛋白, 混匀后至冰浴或 4°C 放置 30 min 以沉淀完全, 3 500 r/min 离心 20 min, 上清液倒入 EP 管, -80°C 冰箱保存。上机分析前用样品稀释缓冲液

(pH2.2)1:1 稀释,用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤后进样,进样量 50 μl。样品浓度按外标法以峰面积计算。

1.6 统计学分析 所有数据以均数±标准差( $\bar{x}$ ±s)表示,用 EXCEL 2007 编辑并采用 SPSS 18.0 统计软件。

## 2 研究结果

2.1 生理液方法学的考证 在上述仪器条件下,测定血浆中游离氨基酸成分,每个氨基酸之间的分离度除谷氨酰胺(1.2)外,其余氨基酸峰的分离度均大于 1.5,对称性在 0.93~1.2 之间(图 1)。



血浆中主要的氨基酸成分:2. 牛磺酸(Tau),5. 门冬氨酸(Asp),6. 苏氨酸(Thr),7. 丝氨酸(Ser),8. 门冬酰胺(Asn),9. 谷氨酸(Glu),10. 谷氨酰胺(Gln),15. 甘氨酸(Gly),16. 丙氨酸(Ala),17. 瓜氨酸(Citr),19. 缬氨酸(Val),20. 胱氨酸(Cys),21. 甲硫氨酸(Met),23. 异亮氨酸(Ile),24. 亮氨酸(Leu),26. 酪氨酸(Tyr),27. 苯丙氨酸(Phe),30. 组氨酸(His),31. 3-甲基组氨酸(3-Met-His),32. 色氨酸(Trp),33. 鸟氨酸(Orn),34. 赖氨酸(Lys),35. 氨(NH<sub>3</sub>),36. 精氨酸(Arg)。

图 1 血浆游离氨基酸分析图谱

2.1.1 重复性与回收率(批内重复性、批间重复性、回收率):氨基酸分析的批内重复性(rsd:0.30~2.90)、批间重复性(rsd:0.40~5.16)和回收率

(93.1%~107.4%)见表 2。稳定性考察结果表明氨基酸标准液在-80℃冰箱放置 60 天基本没有变化,见表 3。

表 2 批内批间重复性(以峰面积计算)

氨基酸	批内重复性(Area)									批间重复性(Area)			回收率(%) (n=5)
	1. (20110816, n=6)			2. (20110822, n=6)			3. (20110826, n=6)			三次合并(n=18)			
	$\bar{x}$	s	rsd(%)	$\bar{x}$	s	rsd(%)	$\bar{x}$	s	rsd(%)	均值	sd	rsd(%)	
Tau	4 066.9	39.7	0.98	3 815.2	50.9	1.33	3 796.5	20.1	0.53	3 882.6	128.2	3.30	99.53
Asp	8 417.1	57.3	0.68	8 602.1	113.7	1.32	8 541.0	77.7	0.91	8 526.1	112.8	1.32	99.0
Thr	8 629.8	59.7	0.69	8 692.5	19.5	0.22	8 681.3	12.6	0.14	8 670.1	42.5	0.49	100
Ser	8 616.5	57.6	0.67	8 650.0	18.2	0.21	8 633.5	16.3	0.19	8 634.3	34.7	0.40	102.0
Asn	7 425.2	125.5	1.69	7 547.7	71.7	0.95	7 528.7	38.1	0.51	7 505.0	94.2	1.26	99.3
Glu	8 405.7	246.4	2.93	8 512.9	133.3	1.57	8 490.2	71.8	0.85	8 473.3	156.4	1.85	101
Gln	7 854.9	165.3	2.10	7 977.9	77.9	0.98	7 877.5	76.1	0.97	7 906.3	116.6	1.47	93.1
Gly	8 590.7	55.7	0.65	8 672.8	29.4	0.34	8 658.4	14.4	0.17	8 643.6	48.9	0.57	100
Ala	8 578.4	72.2	0.84	8 548.4	33.8	0.40	8 459.4	39.7	0.47	8 525.8	69.8	0.82	101
Val	8 643.8	68.0	0.79	8 635.9	27.2	0.31	8 610.2	86.7	1.01	8 629.1	62.9	0.73	100
Cys	9 544.7	66.7	0.70	9 785.3	36.7	0.38	9 765.9	17.6	0.18	9 707.7	116.0	1.20	99.2
Met	8 571.3	83.7	0.98	8 586.9	49.4	0.58	8 526.4	24.9	0.29	8 561.0	58.6	0.68	100.1
Ile	8 558.1	58.2	0.68	8 513.2	25.7	0.30	8 506.7	39.7	0.47	8 524.1	45.4	0.53	99.5
Leu	8 637.9	40.1	0.46	8 685.6	24.2	0.28	8 674.7	34.9	0.40	8 667.7	37.2	0.43	99.5
Tyr	8 492.7	41.7	0.49	8 560.9	33.8	0.39	8 545.1	60.0	0.70	8 535.3	52.6	0.62	98
Phe	8 173.4	50.9	0.62	8 258.0	47.0	0.57	8 263.6	42.7	0.52	8 235.1	60.0	0.73	100.23
His	7 817.8	45.7	0.58	7 972.0	25.0	0.31	7 916.0	31.1	0.39	7 906.9	71.5	0.90	101.5
Trp	7 117.7	255.2	3.59	7 724.2	273.3	3.54	7 781.3	273.6	3.52	7 566.0	390.6	5.16	95
Orn	9 068.8	75.3	0.83	9 163.5	96.1	1.05	9 037.2	83.7	0.93	9 091.1	98.5	1.08	99.3
Lys	8 624.3	176.5	2.05	8 652.0	211.5	2.45	8 540.8	176.0	2.06	8 604.6	184.3	2.14	105.2
Arg	7 595.1	136.2	1.79	7 956.5	126.9	1.59	7 981.1	60.6	0.76	7 858.9	204.3	2.60	98.7
Pro	1 793.6	24.4	1.36	1 713.4	9.5	0.56	1 700.6	16.7	0.98	1 732.5	44.1	2.55	107.4
Total	173 224.2	960.9	0.55	175 227.1	694.6	0.40	174 516.1	576.0	0.30	174 387.1	1 095.1	0.63	

表3 标准液-80℃60天稳定性(以峰面积计算)

氨基酸	0天(n=6)		30天(n=6)		30天/0天	60天(n=6)		60天/0天
	$\bar{x}$ (Area)	s	$\bar{x}$ (Area)	s		$\bar{x}$ (Area)	s	
Tau	3 796.5	20.1	4 017.1	20.1	1.058	3 898.1	11.2	1.027
Asp	8 541.0	77.7	8 545.8	71.9	1.001	8 241.0	34.8	0.965
Thr	8 681.3	12.6	8 772.4	52.7	1.011	8 438.1	39.6	0.972
Ser	8 633.5	16.3	8 787.5	52.7	1.018	8 415.5	39.5	0.975
Asn	7 528.7	38.1	7 471.4	50.3	0.992	7 219.5	33.1	0.959
Glu	8 490.2	71.8	8 633.4	66.5	1.017	8 118.6	55.2	0.956
Gln	7 877.5	76.1	8 028.8	118.8	1.019	7 620.1	76.0	0.967
Gly	8 658.4	14.4	8 734.1	43.9	1.009	8 348.5	53.1	0.964
Ala	8 459.4	39.7	8 583.7	69.4	1.015	8 275.4	47.9	0.978
Val	8 610.2	86.7	8 688.1	92.8	1.009	8 404.9	45.0	0.976
Cys	9 765.9	17.6	9 653.5	62.4	0.988	9 288.9	63.4	0.951
Met	8 526.4	24.9	8 773.6	134.1	1.029	8 258.8	157.3	0.969
Ile	8 506.7	39.7	8 621.0	95.4	1.013	8 363.2	41.5	0.983
Leu	8 674.7	34.9	8 842.7	75.3	1.019	8 516.4	51.4	0.982
Tyr	8 545.1	60.0	8 711.0	116.1	1.019	8 360.9	78.6	0.978
Phe	8 263.6	42.7	8 254.7	46.4	0.999	7 904.2	54.3	0.957
His	7 916.0	31.1	8 035.8	46.7	1.015	7 551.9	82.1	0.954
Trp	7 781.3	273.6	7 720.3	331.5	0.992	7 280.9	479.3	0.936
Orn	9 037.2	83.7	9 267.2	108.3	1.025	8 768.8	112.9	0.970
Lys	8 540.8	176.0	8 714.2	49.3	1.020	8 194.0	45.5	0.959
Arg	7 981.1	60.6	7 906.0	209.9	0.991	7 323.5	153.1	0.918
Pro	1 700.6	16.7	1 776.9	27.1	1.045	1 743.7	25.5	1.025
Total	174 516.1	60.5	176 539.3	68.8	1.012	172 433.2	96.4	0.988

2.1.2 线性:用不同浓度的标准液(2,4和8 nmol)进行分析,以氨基酸的峰面积对进样量作线性回归,所有氨基酸的  $R^2$  均在 1~0.999,见表4。

表4 不同浓度的氨基酸线性结果(以峰面积计算)

名称	2 nmol	4 nmol	8 nmol	回归方程
Tau	1 419.78	2 943.46	6 018.38	$Y=1 533X-117.6 R^2=1$
Asp	2 955.48	6 131.85	12 650.56	$Y=1 533X-117.6 R^2=13$
Thr	009.52	6 262.18	12 945.11	$Y=1 658X-331.9 R^2=1$
Ser	3 016.85	6 290.68	13 011.67	$Y=1 667X-343.6 R^2=1$
Glu	2 863.57	6 014.83	12 397.19	$Y=1 589X-327.6 R^2=1$
Gln	<u>3.512 008 nmol</u> 4 487.62	<u>7.024 016 nmol</u> 9 294.20	<u>14.04 803 nmol</u> 18 904.85	$Y=1 368X-317.7 R^2=1$
Gly	2 997.36	6 219.51	12 935.59	$Y=1 659X-360.6 R^2=0.999$
Ala	2 994.91	6 265.90	12 983.98	$Y=1 666X-364.1 R^2=1$
Val	3 000.76	6 297.73	12 964.83	$Y=1 661X-332.7 R^2=1$
Cys	3 285.61	6 790.78	14 075.61	$Y=3 603X-356.8 R^2=0.999$
Met	3 036.22	6 364.40	12 872.30	$Y=1 637X-217.7 R^2=1$
Ile	3 024.78	6 264.44	12 875.67	$Y=1 643X-280.8 R^2=1$
Leu	3 034.10	6 264.73	12 916.43	$Y=1 649X-291.7 R^2=0.999$
Tyr	2 987.72	6 165.02	12 760.77	$Y=1 631X-310.1 R^2=0.999$
Phe	2 917.44	6 062.15	12 603.18	$Y=1 617X-353.0 R^2=0.999$
His	2 860.44	6 027.13	12 594.22	$Y=1 625X-423.1 R^2=0.999$
Trp	<u>2.346 nmol</u> 2 864.51	<u>4.692 nmol</u> 6 236.53	<u>9.384 nmol</u> 13 010.10	$Y=1 441X-522.2 R^2=1$
Lys	2 915.83	6 271.02	13 017.87	$Y=1 684X-457.6 R^2=1$
Arg	2 805.47	5 866.14	11 809.22	$Y=1 498X-166.0 R^2=0.999$
Pro	594.57	1 247.79	2 629.30	$Y=340.0X-96.18 R^2=0.999$

2.1.3 样品的重复性和稳定性:同一血样五次稳定性重复测定的结果 rsd(%)在 0.41~7.86;血样

在-80℃储存一个月后基本是没变化的(表5~6)。

表5 血样五次重复性(以峰面积计算)

氨基酸	血样1	血样2	血样3	血样4	血样5	$\bar{x}$	s	rsd(%)
Tau	4 416.9	4 464.4	4 394.7	4 377.3	4 356.3	4 401.9	41.45	0.94
Asp	934.6	971.3	921.3	926.5	953.4	941.4	20.68	2.20
Thr	4 456.1	4 476.8	4 396.4	4 409.5	4 392.0	4 426.2	38.05	0.86
Ser	5 325.0	5 333.9	5 249.3	5 278.9	5 239.6	5 285.3	42.90	0.81
Glu	3 210.2	3 097.9	3 140.3	3 165.5	3 110.8	3 145.0	44.93	1.43
Gln	16 689.8	16 636.8	16 467.6	16 517.5	16 311.1	16 524.5	148.99	0.90
Gly	9 798.1	9 831.8	9 661.4	9 730.7	9 647.4	9 733.9	81.32	0.84
Ala	13 546.2	13 648.3	13 399.4	13 475.3	13 322.3	13 478.3	126.53	0.94
Cit	959.81	146.1	1 093.5	998.8	974.1	1 034.5	81.30	7.86
Val	7 633.9	7 647.6	7 500.4	7 597.1	7 501.8	7 576.2	70.98	0.94
Cys	501.4	513.2	497.8	485.5	472.8	494.1	15.48	3.13
Ile	2 376.8	2 321.7	2 362.5	2 339.0	2 359.3	2 351.9	21.58	0.92
Leu	4 596.3	4 553.6	4 561.5	4 559.2	4 549.8	4 564.1	18.58	0.41
Tyr	1 878.3	1 883.1	1 858.4	1 870.6	1 877.9	1 873.7	9.66	0.52
Phe	2 075.9	2 086.2	2 099.3	2 122.3	2 107.1	2 098.2	18.04	0.86
His	2 451.4	2 450.6	2 441.9	2 436.6	2 422.2	2 440.6	11.97	0.49
Trp	1 598.3	1 657.6	1 664.1	1 617.0	1 751.1	1 657.6	59.06	3.56
Orn	3 750.5	3 769.0	3 705.8	3 718.5	3 697.3	3 728.2	30.46	0.82
Lys	5 478.6	5 443.5	5 348.8	5 398.2	5 293.8	5 392.6	73.63	1.37
Arg	2 664.2	2 748.9	2 827.2	2 572.9	2 552.1	2 673.1	116.45	4.36
Pro	1 487.4	1 513.0	1 468.1	1 502.2	1 461.0	1 486.3	22.00	1.48
Total	95 829.8	96 195.4	95 059.8	95 099.1	94 353.4	95 307.5	720.48	0.76

表6 血样-80℃存放四周稳定性( $\mu\text{mol/L}$ )

氨基酸	0天	2周	3周	4周	$\bar{x}$	s	rsd(%)
Tau	74.69	73.20	74.55	72.37	73.70	1.11	1.51
Asp	3.47	3.86	3.88	3.46	3.67	0.23	6.34
Thr	108.12	116.92	114.74	117.42	114.30	4.28	3.74
Ser	95.82	100.60	97.37	100.82	98.65	2.46	2.49
Asn	49.7	58.58	54.85	51.55	53.67	3.90	7.27
Glu	23.81	24.23	23.33	21.33	23.18	1.29	5.55
Gln	508.13	568.76	572.59	576.05	556.38	32.31	5.81
Gly	205.96	220.85	226.70	227.69	220.30	10.03	4.55
Ala	373.76	380.55	420.46	414.03	397.20	23.46	5.91
Val	165.12	176.74	179.29	179.99	175.29	6.92	3.95
Cys	35.64	38.64	38.87	38.65	37.95	1.54	4.07
Met	21.06	21.39	21.54	21.74	21.43	0.29	1.3
Ile	44.79	445.15	45.36	45.67	45.24	0.37	0.82
Leu	97.58	99.30	101.64	100.09	99.65	1.69	1.69
Tyr	48.69	43.34	43.47	44.89	45.10	2.50	5.54
Phe	46.57	48.04	49.16	48.79	48.14	1.14	2.38
His	71.85	77.44	77.00	77.66	75.99	2.77	3.65
Trp	23.05	22.49	24.91	23.01	23.36	1.06	4.53
Lys	130.38	143.49	138.82	141.36	138.51	5.75	4.15
Arg	89.09	87.23	87.02	88.08	87.85	0.94	1.07
Pro	159.31	160.74	163.11	167.50	162.67	3.58	2.20
Total	2 376.59	2 511.53	2 558.64	2 562.13	2 502.22	86.88	3.47

2.2 健康志愿者的血浆游离氨基酸正常值 在方法学建立的基础上,测定40例健康志愿者(男:女

=1:1)的血浆氨基酸正常值,并与我们80年代用Beckman氨基酸分析仪分析的结果进行比较,除

了个别氨基酸有些差异,大多数的氨基酸都基本接近(表 7)。

表 7 比较不同仪器测定健康志愿者的血浆游离氨基酸正常值( $\mu\text{mol/L}$ )

氨基酸	男性 <sup>a</sup>		男性 <sup>b</sup>		女性 <sup>a</sup>		女性 <sup>b</sup>	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Tau	41.95	10.13	59.49	16.00	43.91	13.44	47.99	13.00
Asp	5.31	1.84	8.83	2.40	4.25	1.21	6.75	1.60
Thr	141.84	20.20	145.70	35.00	146.49	38.84	117.90	26.00
Ser	127.30	17.82	133.50	20.00	140.89	31.41	118.90	22.00
Asn	51.87	7.54	57.40	24.00	51.56	7.96	44.39	15.00
Glu	31.13	18.43	38.52	21.00	21.18	9.86	23.00	4.10
Gln	622.23	38.44	724.70	157.00	588.99	88.26	579.70	120.00
Gly	265.00	53.35	252.50	65.00	292.46	74.58	209.50	64.00
Ala	452.30	107.01	414.00	120.00	443.25	119.81	326.10	69.00
Val	263.19	33.71	253.30	39.00	221.13	37.43	218.90	34.00
Cys	44.08	5.80	73.10	12.00	43.76	6.74	62.78	11.00
Met	30.75	3.14	42.24	8.00	27.36	4.69	32.55	5.60
Ile	78.51	16.31	67.44	18.00	63.40	10.46	53.00	9.20
Leu	153.04	19.37	139.90	29.00	120.33	19.25	108.20	22.00
Tyr	66.77	17.59	74.35	14.00	68.00	13.77	59.79	8.00
Phe	61.69	6.51	69.73	11.00	56.88	8.00	63.92	9.00
His	87.77	7.97	81.51	11.00	85.31	10.00	73.42	12.00
Trp	47.10	21.81	68.51	15.00	43.00	12.83	81.65	20.00
Orn	79.40	13.78	77.99	20.00	66.17	14.50	69.21	29.00
Lys	177.45	51.54	186.30	33.00	148.63	50.28	157.80	29.00
Arg	81.21	11.38	93.54	37.00	91.43	21.90	70.76	21.00
Pro	230.76	68.89	169.70	54.00	185.21	49.37	165.10	56.00
Total	3 140.65	552.56	3232.25	761.40	2 953.57	644.61	2 691.31	600.50

注:a:SYKAM 分析仪,德国;b:Beckman 分析仪,美国。

3 讨论 氨基酸分析主要应用离子交换层析原理。通过交链球形磺酸聚乙烯树脂的离子交换柱作固定相,用缓冲液作流动相,使氨基酸混合物分离为各种成分,然后与茚三酮混合产生蓝紫色化合物,在 570 nm 有最大吸收,没有游离氨基的氨基酸如脯氨酸和羟脯氨酸和茚三酮反应产生黄色化合物,在 440 nm 有最大吸收。血浆和尿、组织中的游离氨基酸除了正常的 18 种氨基酸和 2 个酰胺外,还有许多其他的氨基酸衍生物,如牛磺酸(Tau)、鸟氨酸(Orn)、瓜氨酸(Citr)和 3-甲基组氨酸(3-MHis)等。由于生理液和组织的成分复杂,用钠的缓冲系统很难把所有氨基酸分开,导致某些氨基酸相互重叠而引起结果的偏差,用枸橼酸锂的缓冲系统能使所有生理液和组织的游离氨基酸完全分离,所以分析血浆和尿、组织中的游离氨基酸应该用生理液的分析方法(锂缓冲系统)。

样品的处理要尽快完成,防止样品中的蛋白质分解,尤其是在磺基水杨酸沉淀蛋白后,标本应放置冰浴或 4℃ 冰箱 30 min 使蛋白质沉淀完全。配制缓冲液的化学试剂必须用分析级(AR)以上或经过特殊纯化处理;被储存在塑料容器中的化学试剂决不能靠近氨盐或氨液;使用仔细清洗过的玻璃器具并不要碰到玻璃器具内部(因为皮肤上有大量

游离氨基酸)。

应用德国塞卡姆氨基酸分析仪,分析标准液和样品的重复性和回收率、每个氨基酸在不同浓度时的线性、样品在 -80℃ 冰箱保存的时间稳定性的研究表明,如果标本处理得当,缓冲液配制精确,仪器保养良好,就能达到理想的分析结果。

应用该方法测定 40 例健康志愿者血浆游离氨基酸正常值,并与我们以前的结果进行比较得到非常相似的结果<sup>[7]</sup>,进一步证实生理液方法的可靠性。

4 结论 用枸橼酸锂缓冲系统分析血样游离氨基酸,有很好的重复性、回收率、线性和稳定性。比较不同仪器测定的健康志愿者血浆游离氨基酸正常值表明有很好的-一致性,证实生理液分析方法的可靠性。

参考文献:

[1] Anowska WK, Pomierny B, Filip M, et al. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(4): 444-462.  
 [2] Di Girolamo FG, Situlin R, Mazzucco S, et al. Omega-3 fatty acids and protein metabolism: enhancement of anabolic interventions for sarcopenia [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2014, 17(2): 145-150.  
 [3] Pierre JF, Heneghan AF, Lawson CM, et al. Pharmacutrition review: physiological (下转 54 页)

有显著意义。KIM-1 是肾小管损伤的敏感指标,长期蛋白尿可引起重吸收蛋白负荷过重以及毒性作用,可造成肾小管损伤,从而促进尿 KIM-1 的表达。

多项研究表明,NGAL 可以作为急性肾损伤早期可靠的诊断指标<sup>[10~12]</sup>,其正常情况下肾脏组织很少表达,在肾脏急性缺血再灌注后,肾小管上皮细胞产生并分泌一系列与免疫反应相关的物质,其中 NGAL 浓度迅速升高,可能与肾小管间质中浸润的中性粒细胞发生凋亡有关<sup>[13,14]</sup>。本研究结果显示,尿 NGAL 水平在病理性蛋白尿出现之前就开始升高,是出现于 DN 早期的标志物,NGAL 随着 DN 的进展而逐步增加,组间差异有显著意义。

综上所述,尿 KIM-1 和 NGAL 作为一种新型肾脏疾病生物标记物,与肾小管损伤有密切联系,在 DN 的早期诊断、监测进展等方面有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Lysaght MJ. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(Suppl 1): S37-40.
- [2] Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, et al. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes; U. K. Prospective Diabetes Study 74[J]. Diabetes, 2006, 55(6): 1832-1839.
- [3] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2534-2543.
- [4] 张春雷, 吕琪, 张书楠, 等. IL-18 在糖尿病中引起肾损伤的机制探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 573-575.  
Zhang CL, Lü Q, Zhang SN, et al. Investigation of interleukin-18 on kidney injury mechanisms[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(5): 573-575.
- [5] 孙惠力, 程小燕, 戈娜, 等. 两种糖尿病肾病大鼠模型的对比研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(20): 244-146.

Sun HL, Cheng XY, Ge N, et al. Study on two different diabetic nephropathy rat model[J]. Guide of China Medicine, 2010, 8(20): 244-146.

- [6] Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) and kidney injury molecule 1(KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril[J]. Diabet Med, 2010, 27(10): 1144-1150.
- [7] 袁朝伟, 杨茂君, 周雪琴, 等. 尿肾损伤分子-1 与胱蛋白酶抑制剂 C 对早期糖尿病肾病诊断价值对比研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(12): 5323-5325.  
Yuan CW, Yang MJ, Zhou XQ, et al. The value of urinary KIM-1, serum cystatin C in predicting the early diabetic nephropathy[J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2013, 7(12): 5323-5325.
- [8] Fu WJ, Xiong SL, Fang YG, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study[J]. Endocrine, 2012, 41(1): 82-88.
- [9] Kim SS, Song SH, Kim IJ, et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(2): 251-257.
- [10] Parikh CR, Devarajan P, Zappitelli M, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1737-1747.
- [11] Soni SS, Pophale R, Ronco C. New biomarkers for acute renal injury[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(8): 1257-1263.
- [12] Parikh CR, Coca SG, Thiessen-Philbrook H, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1748-1757.
- [13] Clerico A, Galli C, Fortunato A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(9): 1505-1517.
- [14] Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, et al. Review article: acute kidney injury in critical illness[J]. Can J Anaesth, 2010, 57(11): 985-998.

收稿日期: 2014-05-05

修回日期: 2014-11-20

(上接 51 页) mechanisms[J]. J Parenter Enteral Nutr, 2013, 37(5 Suppl): 51S-65S.

- [4] Kivrak I, Kivrak S, Harmandar M. Free amino acid profiling in the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*) using UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2014(158): 88-92.
- [5] Batch BC, Hyland K, Svetkey LP. Branch chain amino acids: biomarkers of health and disease[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2014, 17(1): 86-89.
- [6] Kui B, Balla Z, Végh ET, et al. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by

large doses of basic amino acids in rodents[J]. Lab Invest: A Journal of Technical Methods and Pathology, 2014, 94(2): 138-149.

- [7] 何桂珍, 蒋朱明, 罗家骊, 等. 内标准的生理液分析法测定血浆和尿游离氨基酸[J]. 中国医学科学院学报, 1986, 8(5): 382-386.  
He GZ, Jiang ZM, Luo JL, et al. Determination of amino acids in Plasma and urine by physiological fluid analysis and internal standard method[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 1986, 8(5): 382-386.

收稿日期: 2014-07-11

修回日期: 2014-09-11