

• 论 著 •

血清尿酸紫外分光光度参考方法的建立及性能评价

陈 明,王 磊[△],赖文泉,余枝广
(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 518057)

摘 要:目的 以尿酸酶紫外光度法为基础,建立血清中尿酸测定的参考方法并评价其性能。方法 用新鲜患者血清样本、迈瑞常规复合校准品等对方法的精密度进行评估;用有证参考物质 SRM909b I 和 II、IFCC 参考实验室质评样本 Rela A/B 对方法的准确度进行初步评价,同时测定新鲜人血清并与同位素稀释质谱法进行方法学对比,验证方法准确度。结果 方法对新鲜患者血清、厂家复合校准品等不同类型样本批内不精密度 CV_{intra} 小于 1%,总不精密度 CV_t 小于 2%;有证参考物质 SRM909b I / II 测定结果均在参考值范围内,对 UA 参考实验室能力验证样本 Rela A/B 测定结果与中心值结果相对偏差小于 0.5%;血清样本测定结果与同位素稀释液相质谱法可比,线性回归斜率 1.005,相关系数 0.999,医学决定水平处引入的相对误差小于 3.25%。结论 血清尿酸紫外分光光度法已基本建立,精密度和准确度符合要求,测量结果和同位素稀释液相色谱/质谱法可比,可为常规系统尿酸溯源体系的建立和性能评估提供便捷有效的方法。

关键词:尿酸; 分光光度法,紫外线; 参考方法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.011 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)03-0278-03

Development and evaluation of reference method for the detection of serum uric acid based on ultraviolet colorimetric method
Chen Ming, Wang Lei[△], Lai Wenquan, Yu Zhiguang
(Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Shenzhen Guangdong 518057, China)

Abstract: Objective To develop a reference method for the detection of serum uric acid based on enzymic ultraviolet colorimetric and evaluate its performance. **Methods** Method precision was evaluated with fresh patient serum, Multi Serum Calibrator and other materials. Method accuracy was investigated with SRM909b level I, level II from the National Institute of Standards (NIST) and EQA sample Rela A/B for reference laboratory, and the method was compared with ID-LC/MS/MS for further validation. **Results** CV_{intra} of method precision was less than 1% and CV_t was less than 2% for different type of samples. Method accuracy was proved to good for the detection of SRM909b, Rela A/B, and the results fell in the range of target value, with relative bias less than 0.5%, compared with the result of reference laboratory for the detection of Rela samples. The method comparison with ID-LC/MS/MS showed fine correlation ($r>0.99$, slope=1.005) and the estimated error for medicine decide level (MDL) by this enzymic colorimetric method was less than 1%. **Conclusion** The reference method was established basically. Analytic characteristics such as precision and accuracy were conformed to meet the requirements. The established enzymic ultraviolet colorimetric reference methods could be used as a convenient and effective method for the establishment of traceability and performance evaluation for the determination of uric acid in routine system.

Key words: uric acid; spectrophotometry, ultraviolet; reference method

尿酸,又名 2,4,6-三羟基嘌呤(简称 UA),是临床检验的常规检测项目之一,是痛风、肝肾等疾病诊断、治疗和监测的重要指标之一,在临床上具有十分重要的意义^[1-3]。尿酸的检测方法较多,主要有液相色谱法^[4]、磷钨酸还原法^[5]和尿酸酶法^[6]等。同位素稀释液相色谱/质谱法是目前检测 UA 最准确和有效的方法,具有最高的计量学溯源性。然而,该方法对仪器设备的要求较高,常规实验室难以实现。磷钨酸还原法主要原理是用磷钨酸将 UA 氧化成尿囊素和二氧化碳,而自身还原成钨蓝。由于该方法主要是利用氧化-还原反应的原理,特异性较差,血清中的还原性物质,如抗坏血酸等对其干扰较大。因此,使用时存在一定的局限性。尿酸酶法是目前 UA 检测使用最为广泛的方法,具有较强的特异性。美国临床化学协会标准委员会(AACC)氮化合物-尿酸研究组提出了以尿酸酶法为基础的尿酸检测候选参考方法^[6-7]。该方法使用分光光度计作为检测仪器,具有特异性高、精密度好、准确度高和抗干扰能力强等优点,用非动力学尿酸酶法对血清中的 UA 进行定量分析。然而,目前关于该方法的研究和报道均较少,尚没有建立

标准的参考测量程序。本研究以该法为基础,对方法的精密度、准确度、及与质谱方法的可比性等进行了评估,以建立血清尿酸紫外分光光度参考方法,可为常规系统尿酸溯源体系的建立和性能评估提供便捷有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Tris-HCl、Tris-base、三氯乙酸(TCA)、尿酸酶均购自美国 Sigma 公司;尿酸标准物质购自中国国家标准物质技术研究中心。

1.1.2 仪器 美国 PE 公司紫外可见分光光度计;瑞士梅特勒天平 205DU 电子天平和 pH 计;德国 Eppendorf 移液器;北京北利离心机。

1.1.3 样本 有证标准物质 SRM909b I 和 II 购自美国国家标准与技术研究院(NIST);UA 国际参考方法能力评估样本 2009 Rela A 和 Rela B 由 IFCC 提供;40 例人血清收集自医院临床标本,并采用同位素稀释液相色谱/质谱决定性方法定值;常规生化复合校准品 MSC 为厂家血清基质冻干产品校准品。

[△] 通讯作者, E-mail: wanglei. sj@mindray. com。

1.2 方法

1.2.1 测定原理 尿酸酶可特异性地将尿酸水解,生成尿囊素。尿酸在 293 nm 处有特征吸收峰,而尿囊素没有,根据反应前后吸光度的变化可定量测量样本中尿酸的含量。

1.2.2 样本处理 样本处理步骤如表 1 所示。

表 1 UA 参考方法样本测试流程

试剂	Test 管(mL)	Blank 管(mL)
样本	0.5	0.5
100 mmol/L Tris-buffer(pH 8.5,37 ℃)	2.5	2.5
100 U/L 尿酸酶	1.0	0.0
封口,37 ℃反应 60 min		
100 g/L TCA	2.0	0.0
尿酸酶空白反应液*	0.0	3.0
轻轻混匀后室温静置 45 min,1 200 g 离心 40 min,取上清液测试 293 nm 处吸光度		

* :由 100 U/L 尿酸酶溶液和 100 g/L TCA 溶液按照 1 : 2 体积混合而成。

1.2.3 结果计算 每天样本测试前按表 1 流程测试 UA 标准梯度溶液,可得到 UA 浓度 X 和修正吸光度 $Y(A_{\text{blank}}-A_{\text{test}})$ 的工作曲线: $Y= bX+a$ (b 为工作曲线斜率,a 为截距),将待测样本的修正吸光度 A 代入上述工作曲线中即可计算出待测样本中尿酸的含量。

1.2.4 尿酸标准储备液吸光度验证 用去离子水将 100 mg/dL尿酸标准储备液稀释 100 倍,然后以水为空白,在 293 nm 测试其吸光度,5 个样本,每个样本测 2 次,计算 10 次测量均值,并与理论要求值进行比较。

1.2.5 尿酸标准梯度溶液吸光度验证 用验证合格的 100 mg/mL 尿酸标准储备液按照表 2 要求制备标准梯度溶液。然后将各梯度溶液用去离子水稀释 10 倍,在 293 nm 测试各梯度溶液稀释液的吸光度(空白为去离子水),并与理论要求值进行比较。

表 2 UA 标准梯度溶液配置比例

标准工作液浓度(mg/dL)	标准储备液量(mL)	去离子水 (mL)
2	0.20	9.80
4	0.40	9.60
6	0.60	9.40
8	0.80	9.20
10	1.00	9.00
15	1.50	8.50
20	2.00	8.00
25	2.50	7.50

1.2.6 上清液吸光度稳定性 按照表 1 所示流程进行样本处理,当常规生化复合校准品 MSC 离心结束后,立即取上清液进行测试,测试完后,将上清液室温保存,间隔 5、10、30 min 和 60 min 后再重新测试其吸光度,考察上清液吸光度稳定性。

1.2.7 方法精密度验证实验 批内不精密度 CV_{intra} :1 d 内重复测量精密度评价样本 8 次,计算 8 次测量结果的 CV_{intra} ,作为批内不精密度;总不精密度 CV_t :在试剂有效期内任选 3 d 测试常规生化复合校准品 MSC、2009Rela A 和 Rela B,计算 3

d 测量结果的总不精密度 CV_t 。

1.2.8 定标重复性评价 在试剂有效期内任选 3 d,用尿酸标准梯度溶液进行定标,比较 3 次定标曲线的差异。

1.2.9 方法准确度验证 定标后,用同样的方法测试新鲜复融 SRM909b 水平 I 和水平 II 以及 2009 Rela A 和 Rela B,计算 SRM909b 水平 I、水平 II、2009 Rela A 和 Rela B 的吸光度并计算其实测值,然后与参考范围比较。

1.2.10 方法学对比 取 40 份用同位素稀释液相色谱/质谱法定值的血清,用建立的 UA 参考方法测定,并将测量结果与同位素稀释液相色谱/质谱法定值结果进行回归比较。

2 结 果

2.1 尿酸标准储备液吸光度验证 100 mg/dL 尿酸标准储备液稀释 100 倍后理论吸光度吸光度均值为 0.7572,在 0.750 ± 0.010 范围内。

2.2 尿酸标准梯度溶液吸光度验证 尿酸标准梯度溶液稀释 10 倍后的实测吸光度与理论吸光度在 99%~101%,且每次实测吸光度/实测吸光度均值在 98%~102%。

2.3 反应液吸光度稳定性验证 在 60 min 之内,空白吸光度、样本吸光度和样本修正吸光度无明显变化(<±0.005),反应液稳定。

2.4 精密度验证 血清基质冻干常规生化复合校准品 MSC、2009 Rela A、2009 Rela B,以及新鲜血清样本的测试批内不精密度 CV_{intra} 均小于 1%,总不精密度 CV_t 均小于 2%。

2.5 定标重复性评价 3 d 3 次的定标结果如表 3 所示,斜率的不精密度 CV 为 0.42%。

表 3 定标重复性评价结果

项目	斜率	截距
1	0.058 79	0.005 16
2	0.058 58	0.001 01
3	0.059 07	0.003 75
CV(%)	0.42	/
设定要求	<1%	<0.01

/ :无数据。

2.6 准确度验证实验 准确验证结果如表 4 所示,SRM909b 水平 I 和水平 II 测试结果均在靶值范围内;2009 Rela A 和 Rela B 测试结果与另外两家实验室测试结果基本一致。

表 4 准确度验证结果

项目	909b 水平I	909b 水平II	2009 Rela A	2009 Rela B
测试结果(mg/dL)	4.57	12.24	6.62	5.54
参考值(mg/dL)	4.66±0.20	12.32±0.38	6.63*	5.57*
相对偏差	-2.03%	-0.66%	-0.15%	-0.54%
设定要求	±5%	±5%	±5%	±5%

* :2009 年两家实验室 Rela 测试结果

2.7 方法学对比实验 以同位素稀释液相色谱/质谱法测定结果为 X 轴,以尿酸酶紫外光度法测试结果为 Y 轴,对两种方法的测试结果进行线性拟合。拟合曲线相关系数大于 0.999,尿酸的医学决定水平为 110、480 和 640 μmol,则尿酸酶紫外光度法引入的相对误差分别为 -0.64%、0.24%和 0.30%,小于参考方法室间能力评估等效限 3.25%,尿酸酶紫外光度法与同位素稀释液相色谱/质谱法可比。

3 讨 论

目前,临床检验中绝大部分项目采用自动化分析仪器及配套试剂盒进行测定,尽管检测效率和精密度大大提高,但结果的准确性和可比性有待提高,建立有效、准确,同时便于操作运行的参考方法是进行常规检测结果量值溯源和评估的重要前提,相对于同位素稀释液相色谱/质谱法,本研究以期建立血清尿酸测定的紫外分光光度参考方法。

精密度是方法可靠的前提之一,本研究对不同性状及基质成分的血清基质冻干校准品、参考方法能力评估(RELA)样本和新鲜患者血清样本进行方法的精密度评估,以期获得方法的精密度进行了研究,结果表明方法精密度良好,批内精密度小于 1%,批间精密度小于 2%,对不同样本类型表现一致。

参考方法的建立需要对各种主要影响量进行评估确认,标准物质浓度及定标重现性是关键要素。本研究使用尿酸国家标准物质作为量值传递标准,为确定配制标准溶液和多点稀释校准液浓度的准确和标准化,对各浓度标准液吸光度进行测定,确认吸光度测定结果与文献结果一致^[6]。在手工参考方法测定过程中,天间差异是结果最大变异来源,这种变异包括定标差异、试剂配制、人工操作以及仪器工作状态的变动,其中定标过程是主要因素,本研究对定标曲线的变异进行了分析,在人员操作熟练和仪器状态良好的情况下,3 d 内标准曲线回归斜率变异在 0.5% 以内,表明方法良好的稳定性和重现性,但前提是做好仪器性能确认和人员操作培训。

准确度是方法可靠性的关键,通过分析有证参考物质或直接与已有的高级溯源方法进行比较,或通过正确性室间质评活动以确认方法的准确性。本研究首先分析测试有证参考物质 SRM909b,以及 IFCC 参考实验室质量评价(RELA)样本,对方法的准确度进行了初步验证,再通过测试真实临床新鲜血清与尿酸 ID-LC/MS/MS 决定性方法进行比较,确认结果的可

比性。

综上所述,血清尿酸紫外分光光度法已基本建立,具有优于常规方法的精密度和准确度,测量结果和同位素稀释液相色谱/质谱法可比,可为尿酸检测溯源体系的建立和常规系统性能评估提供便捷有效的方法。

(相关实验得到了杨振华老师,卫生部临检中心张传宝老师的大力支持,在此深表感谢!)

参考文献

[1] 李加平,喻巧云.高尿酸血症与代谢综合征的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1322-1325.

[2] 李红静.临床上血清尿酸与冠心病的关联[J].国际检验医学杂志,2011,32(3):428.

[3] 张纯.2160 例社区居民高尿酸血症与相关疾病的分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):126-128.

[4] Arno H, Dietmar F, Klaus K, et al. Quantitation of urinary uric acid by reversed phase liquid chromatography[J]. Clin Chem, 1981, 27(8):1445-1456.

[5] James JC, Holly C, Roberta D, et al. A simplified alkaline phosphotungstate assay for uric acid in serum[J]. Clin Chem, 1971, 17(3):158-160.

[6] Patricia HD, Nathan G, Teresa C, et al. A candidate reference method for uric acid in serum[J]. Clin Chem, 1982, 28(2):284-290.

[7] Patricia D, Nathan G, David B, et al. A candidate reference method for uric acid in serum[J]. II. Interlaboratory Testing[J]. Clin Chem, 1982, 28(2):291-293.

(收稿日期:2011-10-09)

(上接第 277 页)

参考文献

[1] Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4):641-644.

[2] Bai H, Saku K, Liu R, et al. Analysis of a new polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene: association with serum lipoprotein levels and coronary heart disease [J] Cardiol, 1996, 28(4):207-212.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56-62.

[4] Wu XN, Zhou YH. The diagnose and treatment experience of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Dig, 2003, 23(9):562.

[5] Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, et al. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I milano[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(5):992-997.

[6] Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein[J]. Curr Opin Lipidol, 2000, 11(1):105-115.

[7] Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, et al. D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide, inhibits the inflammatory response induced by influenza A infection of human type II pneumocytes[J].

Circulation, 2004, 10(20):3252-3258.

[8] Shi ST, Polyak SJ, Tu H, et al. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins[J]. Virology, 2002, 292(2):198-210.

[9] Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, et al. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10)[J]. Int J Obes (Lond), 2006, 30(5):794-799.

[10] Norton PA, Gong Q, Mrhta AS, et al. Hepatitis B virus-mediated changes of apolipoprotein mrna abundance in cultured hepatoma cell[J]. J Virol, 2003, 77(9):5503-5506.

[11] Smith JD, Brington EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A- I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro[J]. J Clin Invest, 1992, 89(6):1796-1800.

[12] 叶倩,陈燕,李筱莉,等.原发性肝癌患者乙型肝炎病毒标志物模式与病毒 DNA 载量分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(2)185-186.

[13] 孟令国,李和楼,赵建香,等. HBV-DNA 与 PreSI 以及 ALT 联合检测乙型肝炎的临床意义[J].国际检验医学杂志,2009,30(11)1052-1054.

(收稿日期:2011-10-09)