

· 论 著 ·

基于尿酸酶-钯纳米粒子的比色分析定量检测血清尿酸的方法建立及初步应用评价^{*}

邹瑟音¹,雷 达¹,凌连生²,黄文秀²,闫俊平¹

1. 广东省第二人民医院检验医学部,广东广州 510000;

2. 中山大学化学工程学院,广东广州 510000

摘要:目的 建立基于尿酸酶-钯纳米粒子(MCA-Pd NPs)的比色分析法进行临床血清尿酸的定量检测。

方法 应用比色分析方法检测吸光度值,通过专一性试验、线性范围确定、重复性试验和回收试验等对建立的检测体系进行方法学评价,并检测 40 份不同尿酸水平的临床血清标本,与生化分析仪结果进行比较。

结果 检测体系对尿酸具有较高的特异度和选择性;在 50.0~1 000.0 μmol/L 浓度范围内线性关系良好;批内和批间精密度分别为 2.86%~3.51% 和 5.12%~7.63%;回收率为 97.0%~104.0%;40 份临床血清标本检测结果与生化分析仪检测结果线性相关回归方程为 $Y_{\text{生化分析仪}} = 0.9964X_{\text{新建方法}} - 0.4754, r = 0.9958$ 。

结论 所建立的方法对尿酸选择性高,线性范围宽,重复性好,准确度高,能够满足临床分析要求,与临床常规测定血清尿酸的结果具有较好的可比性。

关键词:钯纳米粒子; 尿酸; 方法建立

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.004

中图法分类号:

文章编号:1673-4130(2021)06-0653-04

文献标志码:A

Establishment of colorimetric method for quantitative detecting serum uric acid basing on uricase-palladium nanoparticles and evaluation for preliminary application^{*}

ZOU Seyin¹, LEI Da¹, LING Liansheng², HUANG Wenxiu², YAN Junping¹

1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. School of Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510000, China

Abstract: Objective To establish a colorimetric analysis method basing on uricase-palladium nanoparticles (MCA-Pd NPs) for quantitative detection of clinical serum uric acid. **Methods** Absorbance values were detected by colorimetric analysis method. The performance verification of the establishing method was determined by the specificity test, linear range, repeatability and recovery experiment. A total of 40 clinical serum specimens with different level of uric acid were detected and compared with the results of biochemical analyzer. **Results** The detection system had high specificity and selectivity for uric acid. A good linear relationship was found among the concentration range of 50.0~1 000.0 μmol/L. Within-run and between-run precisions were 2.86%~3.51% and 5.12%~7.63%, respectively. The recovery rate was 97.0%~104.0%. Forty clinical serum samples were tested by the establishing method and uricase colorimetric method, and the linear regression equation was $Y_{BA} = 0.9964X_{\text{new method}} - 0.4754, r = 0.9958$. **Conclusion** The established method has a high specificity, wide linear range, good repeatability, high accuracy and can meet the requirements of clinical analysis, and has good comparability with clinical routine detection method of serum uric acid.

Key words: palladium nanoparticles; uric acid; method establishment

尿酸(UA)是由黄嘌呤氧化酶作用于 DNA 和 RNA 降解产生的嘌呤代谢产物,越来越多的试验数据表明 UA 对人体有着非常重要的影响^[1-2],因此,实

时监测体内 UA 水平,掌握其水平变化显得尤为重要。不同的技术已被应用到体内外血清 UA 水平的检测,包括电化学方法、荧光检测技术、酶化学法、磷

* 基金项目:广东省中医药局课题面上项目(20202004);广东省第二人民医院青年科研项目(YQ2017-008)。

作者简介:邹瑟音,女,副主任技师,主要从事临床检验方法学建立的基础研究与临床应用研究。

本文引用格式:邹瑟音,雷达,凌连生,等.基于尿酸酶-钯纳米粒子的比色分析定量检测血清尿酸的方法建立及初步应用评价[J].国际检验医学杂志,2021,42(6):653-655.

钨酸比色法、干化学法和质谱法等^[3-5]。纳米技术的出现为 UA 的检测方法研究拓宽了新的方向,越来越多的研究者致力于 UA 检测新技术的研究^[6-9],然而将研究成果用于临床常规检测则比较少见。笔者在前期研究中发现嵌于三聚氰胺氰尿酸盐中的钯纳米粒子(MCA-Pd NPs)具有较强的过氧化物酶活性^[10-11],因此建立了基于尿酸酶-MCA-Pd NPs 的 UA 检测体系,并对该检测体系进行专一性试验、线性范围确定、重复性试验、回收试验、与常规检测方法比较等方法学评价,为将其应用于临床血清 UA 检测奠定基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 40 份血清标本来源于广东省第二人民医院门诊及住院患者,其中 UA 检测水平为低值为(108.0~195.0 μmol/L)13 例、中值者(250.0~398.0 μmol/L)13 例、高值者(450.0~820.0 μmol/L)14 例。

1.2 仪器与试剂 三聚氰胺、三聚氰酸(比利时 Acros Organics 公司);无水柠檬酸、无水乙酸钠、UA、醋酸[阿拉丁试剂(上海)有限公司];氯化钯、2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS²⁻)[生工生物工程(上海)有限公司];浓盐酸(广州化学试剂厂);尿酸酶(上海瓦兰生物科技有限公司);所有试验过程中所用的水皆为超纯水,且所用试剂均为分析纯。UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);日立 7600 生化分析仪;B-260 恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂);85-2 型恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.3 方法

1.3.1 MCA-Pd NPs 的合成 根据试验室前期研究成果合成性质稳定、具有高过氧化物酶活性的 MCA-Pd NPs^[12],室温贮存备用。

1.3.2 分析条件 以 ABTS²⁻ 为显色底物,10 μL 待测 UA 样品+50 μL 1.6 g/L 尿酸酶+100 μL 0.105 mg/mL MCA-Pd NPs+50 μL 90 mmol/L ABTS²⁻,反应温度为 37 °C,反应时间为 20 min。

1.3.3 比色分析 所有标本的比色分析均使用 UV-2550 紫外-可见分光光度计在 420 nm 处进行吸光度值检测。

1.3.4 UA 标准溶液的制备及线性范围的确定 准确称取适量的 UA 标准品,用超纯水充分溶解,此溶液为 5 mmol/L UA 标准储备液,于 4 °C 保存;临用前,将储备液用超纯水稀释至 2 mmol/L UA,此为 UA 标准应用液,再稀释成系列浓度的溶液(10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、400.0、600.0、800.0 μmol/L,以及 1.0、1.1、1.2、1.4、1.6 mmol/L)。通过测定这一系列浓度 UA 标准品的吸光度值,获得浓度与吸光度的关系曲线。

1.3.5 检测 UA 的专一性 为研究该方法检测 UA 的专一性,笔者将 UA 分别替换成超纯水、葡萄糖、胆

固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白,进行比色分析。

1.3.6 重复性试验 用空白基质配制 89.0、297.0 和 714.0 μmol/L UA 质控品,分 4 个批次检测,每批次重复测定 5 次,计算批内变异系数(CV)和批间 CV。

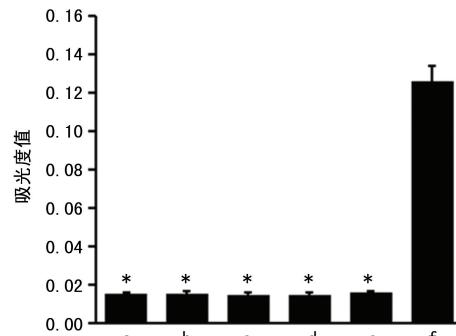
1.3.7 回收试验 制备基础样品及分析标本 1、2、3,分别用本研究建立的检测体系检测其 UA 浓度,每份样品作双份检测。

1.3.8 临床标本检测 40 份临床血清标本分别用本研究建立的检测体系和日立 7600 生化分析仪进行 UA 水平检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 所有数据用 Microsoft Excel2003 和 SPSS17.0 进行处理和统计分析,不同试验组间的结果差异采用单因素方差分析,方法之间的相关性采用线性回归分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 检测 UA 的专一性 加有 UA 的 f 管液体由无色转变为绿色,而 a、b、c、d 和 e 5 管液体仍表现为无色,在 420 nm 波长处,f 管的吸光度值均比另外 5 管高,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明尿酸酶-MCA-Pd NPs 检测体系只对 UA 有反应,具有较高的选择性。见图 1。



注:a 为超纯水;b 为葡萄糖;c 为胆固醇;d 为高密度脂蛋白;e 为低密度脂蛋白;f 为 UA;与 f 管比较,* $P < 0.001$ 。

图 1 专一性试验

2.2 线性范围的确定 浓度与吸光度值呈线性相关的浓度范围为 50.0~1 000.0 μmol/L,其线性回归方程为 $Y = 0.0001X + 0.0633$, $r = 0.9943$ 。见图 2。

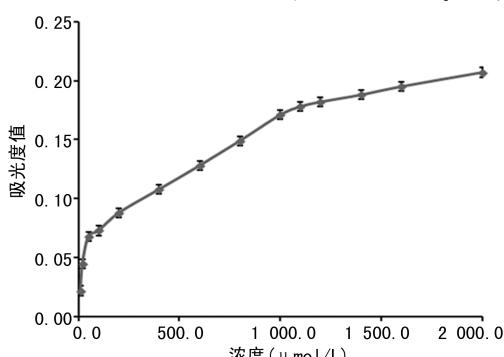


图 2 线性范围的确定

2.3 重复性试验 3 种浓度的批内 CV 分别为:

3.51%、2.86%、3.05%，批间 CV 分别为 7.63%、5.12%、7.25%。见表 1。

2.4 回收试验 UA 回收率为 97.0%~104.0%，见表 2。

表 1 尿酸酶-MCA-Pd NPs 检测体系的精密度(%)

质控 UA 浓度	批内 CV	批间 CV
89.0 μmol/L	3.51	7.63
297.0 μmol/L	2.86	5.12
714.0 μmol/L	3.05	7.25

表 2 UA 回收试验结果

项目	基础 标本	分析 标本 1	分析 标本 2	分析 标本 3	均值
测定浓度(μmol/L)	138.0	147.7	200.5	231.0	—
加入浓度(μmol/L)	—	10.0	60.0	90.0	—
回收浓度(μmol/L)	—	9.5	62.5	93.0	—
回收率(%)	—	97.0	104.0	103.0	101.3
差值(%) [*]	—	-4.33	2.67	1.67	—

注：^{*}各分析标本回收率与平均回收率差值；—为无数据。

2.6 新建方法与生化分析仪检测结果比对 经线性回归分析，回归方程为 $Y_{\text{生化分析仪}} = 0.9964X_{\text{新建方法}} - 0.4754, r=0.9958$ 。见图 3。

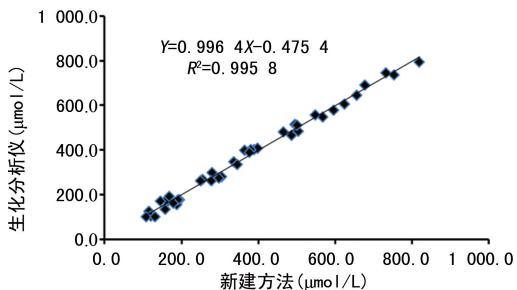


图 3 新建方法与生化分析仪检测结果比对

3 讨 论

纳米材料模拟酶与天然酶具有一定的相似性，而与天然酶相比，其具有可通过化学手段批量合成、制备工艺简单、稳定性好、便于运输和长期储存、适合进行化学修饰和改性等优点。因此，纳米材料模拟酶的研究受到越来越多的关注，如四氧化三铁磁性纳米粒子(Fe_3O_4 MNPs)、贵金属纳米粒子、碳基纳米材料等被发现具有过氧化物酶活性^[11]，并被应用到生物传感、免疫分析、癌症诊断与治疗、神经保护、环境治理等领域。该检测体系是基于尿酸酶-MCA-Pd NPs 建立起来的，MCA-Pd NPs 具有强的过氧化物酶活性，促进体系中产生的过氧化氢分解成羟基自由基，再进一步将底物 ABTS²⁺ 氧化为显绿色的自由基 ABTS^{·-}，液体由无色转变成绿色，在 420 nm 处有最大的吸收峰，MCA-Pd NPs 在检测体系中发挥着促进信号产生及传递的作用，而尿酸酶对它的底物有严格的选择性，专一催化 UA 发生化学反应^[12]，因此，在专一性试验时，将临床常规检测中与 UA 采用相同检测

原理的葡萄糖和胆固醇类物质作为对照，结果得到的吸光度值都很低，说明该方法用于 UA 检测几乎不受这类物质的干扰，确保了体系检测 UA 的高选择性。

FANG 等^[13] 和 LONG 等^[14] 应用同样具有过氧化物酶活性的双掺 NaYF4 纳米粒子进行尿酸酶催化比色法检测，检测限分别低至 5.79、6.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，而本研究所建立检测方法的测定下限只有 50.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，与前者相比有一定差距，但是在实际临床检验中，大部分的标本检测结果是正常或者高值，低值尤其是 < 60.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的标本较少见，对低值的检测临床意义不大，而 UA 高值对临床诊断痛风、高尿酸血症等疾病及治疗效果监测更有临床意义，因此 50.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的检测下限也能满足临床的需要。

目前，临床实验室的大型生化分析仪普遍使用的尿酸酶-过氧化物酶偶联法进行血清 UA 的常规检测，该方法采用的过氧化物酶为天然的植物酶，具有性质不稳定、在生物体水平较低、提纯及储存较困难等缺点，限制了它的实际应用。本研究建立的检测体系与临床大型生化分析仪有良好的可比性，而该检测体系应用的纳米材料模拟酶 MCA-Pd NPs 通过简单的化学合成即可大量获取，性质稳定，易于储存，比天然酶更具有应用前景。此外，除 UA 外，目前临床中还有许多常规检验项目如血糖、5'-核苷酶、总胆固醇、三酰甘油、高密度胆固醇和低密度胆固醇等都会用到过氧化物酶参与的检测原理，只需将检测体系中的尿酸酶换成其他特异酶如葡萄糖氧化酶等，即可对特定物质进行检测，因此，该检测体系具有灵活、简便、检测成本低、应用广泛等实用价值。

本研究应用具有过氧化物酶活性的 MCA-Pd NPs，建立基于尿酸酶-MCA-Pd NPs 的血清 UA 浓度定量检测方法，检测选择性高，线性范围宽，重复性好，准确度高，能够满足临床分析要求，与临床常规测定血清 UA 水平的结果具有较好的可比性。

参考文献

- WANG L, HU W, WANG J, et al. Low serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica: an updated Meta-analysis[J]. Mult Scler Relat Disord, 2016, 9(1): 17-22.
- FANG P, LI X, LUO J J, et al. A double-edged sword: uric acid and neurological disorders[J]. Brain Disord Ther, 2013, 2(2): 109-121.
- RAFQ A, NIRMALYA T, MIN-SANG A, et al. Solution process synthesis of high aspect ratio ZnO nanorods on electrode surface for sensitive electrochemical detection of uric acid[J]. Sci Rep, 2017, 4(18): 1-8.
- ZHAO Y, WEI X, PENG N, et al. Study of ZnS nanostructures based electrochemical and photoelectrochemical biosensors for uric acid detection[J]. Sensors, 2017, 17(6): 1235-1245.

(下转第 660 页)

制阴沟肠杆菌的医院内感染;检验科微生物室应加强对阴沟肠杆菌的耐药性监测,可以为临床医生合理用药提供参考依据;医生应遵循抗菌药物使用原则,并尽量按药敏试验结果合理选用抗菌药物,以减少细菌耐药性的产生。

参考文献

- [1] 杨雪莹,张译如,李慧玲,等.黑龙江省东部地区某医院阴沟肠杆菌的耐药情况分析[J].黑龙江医药科学,2019,42(4):22-23.
- [2] 陶佳,王文,李莎莎,等.963 株阴沟肠杆菌耐药性分析[J].宁夏医科大学学报,2017,39(8):940-942.
- [3] 叶敏纳,张晓兵.阴沟肠杆菌对碳青霉烯酶类抗菌药物耐药机制的研究[J].重庆医科大学学报,2018,43(9):1195-1198.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2015:629-646.
- [5] 俞广全,莫秀林,张秋艺.2012—2014 年阴沟肠杆菌的耐药性分析[J].临床合理用药杂志,2015,8(33):40-41.
- [6] 刘衍伶,胡龙华,杭亚平,等.2014 年临床常见分离菌耐药特性分析[J].中国抗菌药物杂志,2016,41(5):362-368.
- [7] 刘晓丹,刘宝,胡智成,等.2008—2016 年临床分离阴沟肠杆菌的分布及耐药性变迁[J].中国微生态学杂志,2017,29(11):1289-1293.
- [8] 谢强,曹明杰,王金丽,等.阴沟肠杆菌的临床分布与耐药

(上接第 655 页)

- [5] SHI Y T, WANG J, LI S H. The enhanced photo-Electrochemical detection of uric acid on Au nanoparticles modified glassy carbon electrode[J]. Nanos Res Lett, 2017, 12(1):455-462.
- [6] FUKUDA T, MUGURUMA H, IWASA H, et al. Electrochemical determination of uric acid in urine and serum with uricase/carbon nanotube/carboxymethylcellulose electrode[J]. Anal Biochem, 2020, 590(2):651-654.
- [7] DURAI L, KONG C Y, BADHULIKA S. One-step solvothermal synthesis of nanoflake-nanorod WS₂ hybrid for non-enzymatic detection of uric acid and quercetin in blood serum [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 107(2):1574-1579.
- [8] WANG K, WU C, WANG F, et al. Bimetallic nanoparticles decorated hollow nanoporous carbon framework as nanozyme biosensor for highly sensitive electrochemical sensing of uric acid[J]. Biosens Bioelectron, 2020, 150(2):111869.
- [9] WU C, ZHU L, LU Q, et al. A dual-signal colorimetric and ratiometric fluorescent nanoprobe for enzymatic determination of uric acid by using silicon nanopar-

性分析[J].中华医院感染学杂志,2015,25(22):5075-5076.

- [9] 赵松,崔颖,刘美清.阴沟肠杆菌的临床分布特点及药敏结果回顾性分析[J].安徽医药,2014,18(7):1315-1317.
- [10] 贾向红.儿科重症监护病房常见革兰阴性菌分布特点与其常用抗菌药物耐药性相关性研究[J].医药论坛杂志,2017,38(11):149-151.
- [11] 庞丹.新生儿阴沟肠杆菌感染情况和耐药性分析[J].检验医学与临床,2016,13(4):550.
- [12] 龚林,刘小丽,许慧琼,等.阴沟肠杆菌临床分离株 armA 基因分布与分子分型研究[J].中国消毒学杂志,2017,34(10):912-914.
- [13] 宁兴旺,朱惠斌,匡敏,等.107 株阴沟肠杆菌产 ESBLs 和 AmpC 酶检测及耐药性分析[J].实用预防医学,2018,25(5):534-537.
- [14] 廖奇峰.阴沟肠杆菌临床感染分布情况及药敏监测分析[J].临床医学,2016,36(8):112-113.
- [15] 文江雄,刘洋,邬小萍,等.8 株携带 bla_(NDM-1) 基因阴沟肠杆菌耐药性研究[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(5):490-495.
- [16] 黄新明,高绪锋,冯忠伟,等.阴沟肠杆菌的临床分离及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(12):1684-1685.

(收稿日期:2020-06-30 修回日期:2020-11-20)

ticles[J]. Mikrochim Acta, 2019, 186(12):754-761.

- [10] ZHOU N, ZOU S Y, LING L, et al. Peroxidase-like activity of palladium nanoparticles on hydrogen-bond supramolecular structures over a broader pH range and their application in glucose sensing [J]. Can J Chem, 2019, 97(4):317-323.
- [11] GAO L Z, ZHUANG L, NIE J, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. Nat Nanotechnol, 2007, 2(9):577-583.
- [12] JESSICA M, FRANCESCA O, SANTO G, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion[J]. Intern J Cardiol, 2016, 213(6):8-14.
- [13] FANG A, WU Q, YAO S, et al. Upconversion ratiometric fluorescence and colorimetric dual-readout assay for uric acid[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 10(86):664-670.
- [14] LONG Q, FANG A, WEN Y, et al. Rapid and highly-sensitive uric acid sensing based on enzymatic catalysis-induced upconversion inner filter effect[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86(10):109-114.

(收稿日期:2020-06-11 修回日期:2020-10-27)