

• 检验技术与方法 •

血清尿酸测定中维生素 C 氧化酶抗干扰能力研究

陈远翔¹, 廖 飞²

(1. 重庆市万州区妇幼保健院 404000; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

摘要:目的 分析用尿酸酶法测定尿酸时维生素 C 与维生素 C 氧化酶之间的量效关系, 为临床尿酸试剂盒的选购提供合理化依据。方法 用试剂盒测定维生素 C 氧化酶的活性, 配制含不同浓度维生素 C 氧化酶的尿酸检测试剂。并以维生素 C 为干扰物, 检测不同浓度维生素 C 氧化酶的抗干扰能力。结果 反应体系中维生素 C 氧化酶浓度为 200 U/L 时, 对健康人群(维生素 C 小于或等于 0.04 mmol/L)尿酸测定结果没有明显干扰(干扰值 $-4.2 \mu\text{mol/L} < \pm 1.96\text{SD}$); 当维生素 C 氧化酶浓度升高至 400 U/L 时, 对使用维生素 C 治疗后的人群(维生素 C $\leq 0.37 \text{ mmol/L}$)尿酸检测值也不会受到显著影响(干扰值 $-3.0 \mu\text{mol/L} < \pm 1.96\text{SD}$)。结论 在选购尿酸试剂时应选用维生素 C 氧化酶大于或等于 400 U/L, 可以有效防止使用维生素 C 治疗人群血液中维生素 C 对检测结果的干扰, 使检测值更接近人体血清中真实的尿酸水平。

关键词: 抗坏血酸; 尿酸; 指示剂和试剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0208-03

Research of vitamin C oxidase anti-interference capacity in determination of serum uric acid

Chen Yuanxiang¹, Liao Fei²

(1. Maternal and Child Health Hospital of Chongqing Wanzhou, Chongqing 404000, China;

2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To analyze the concentration response relationship of ascorbic acid and vitamin C oxidase in determination of serum uric acid based on uricase method. In order to provide references for purchase of clinical uric acid reagents. **Methods** Different concentrations of vitamin C oxidase in uric acid reagents were prepared. The ascorbic acid oxidase activity was detected with kit. The anti-interference ability of vitamin C oxidase at various concentration was determined when ascorbic acid as the interference substance. **Results** In case of vitamin C oxidase concentration was 200 U/L in reaction system, the effect on detection of uric acid (interference value $-4.2 \mu\text{mol/L} < \pm 1.96\text{SD}$) for healthy crowd (ascorbic acid $C \leq 0.04 \text{ mmol/L}$) was inconspicuous; and when vitamin C oxidase concentration increased to 400 U/L, the influence on measure of uric acid (interference value $3.0 \mu\text{mol/L} < \pm 1.96\text{SD}$) for the ascorbic acid treating group (ascorbic acid $C \leq 0.37 \text{ mmol/L}$) was unobvious either. **Conclusion** To prevent the interference of blood ascorbic acid for determination of uric acid in the ascorbic acid treating group and make the value of uric acid closed to true level, the uric acid reagents with vitamin C oxidase concentration $\geq 400 \text{ U/L}$ is supposed to be chosen.

Key words: ascorbic acid; uric acid; indicators and reagents

维生素 C 是人体内最主要的抗氧化物质^[1]。在用尿酸酶法测定尿酸时通过还原过氧化氢和苯醌亚胺而干扰尿酸的测定^[2], 出现检测结果比真实值降低的情况。而维生素 C 氧化酶可以与标本中存在的维生素 C 反应, 降低抗坏血酸对检测结果的干扰^[3]。本文主要考察在用尿酸酶法测定尿酸时维生素 C 氧化酶用量与维生素 C 的量效关系。

1 资料与方法

1.1 临床标本来源 收集经全生化分析仪测定的尿酸血清标本(尿液维生素 C 试验阴性), 总体积 35 mL。尿酸浓度水平 200 $\mu\text{mol/L}$ 左右, 黄疸、溶血、脂血标本不得选用。

1.2 主要试剂 维生素 C(重庆鼎国), 维生素 C 氧化酶(SIGMA), 尿酸酶(SIGMA), 过氧化物酶(重庆鼎国), N-乙基-N-3-甲基苯胺(上海研拓), 4-氨基安替吡啉(天津博迪), 维生素 C 氧化酶活性测定试剂盒(苏州科铭), 牛血清清蛋白(重庆鼎国), 其余试剂为国产分析纯。

1.3 仪器设备 紫外可见分光光度计 UV-7504(上海欣茂), 37 °C 恒温箱(上海博讯)。

1.4 方法

1.4.1 维生素 C 氧化酶活性测定 用维生素 C 氧化酶活性

测定试剂盒, 按说明书操作步骤对所购维生素 C 氧化酶进行活性检测。

1.4.2 尿酸双试剂各物质浓度 R1(PBS7.8), HRP: 8.1 U/mL(5.4 U/mL), Uricase: 1.8 U/mL(0.6 U/mL), R2(PBS7.8), 4-AAP: 0.45 mmol/L(0.3 mmol/L); Toos: 4.2 mmol/L(1.4 mmol/L); HRP: 过氧化物酶; uricase: 尿酸酶; 4-AAP: 4-氨基吡啉; Toos: N-乙基-N-3-甲基苯胺。测定尿酸时 R1 试剂 600 μL 与 R2 试剂 300 μL 混合, 括号内为混合后最终浓度。

1.4.3 不同维生素 C 氧化酶浓度试剂配制 将已经测定出活性的维生素 C 氧化酶按照不同比例加入到上述已制的尿酸双试剂 R1 中, 使混合后反应体系最终维生素 C 氧化酶浓度依次为 400、200、100 和 0 U/L。

1.4.4 不同干扰物浓度标本的配制 5%牛血清清蛋白生理盐水溶液 50 mL 加入 56.4 mg 维生素 C, 混匀溶解, 浓度为 6.4 mmol/L。之后用 5%牛血清清蛋白生理盐水溶液倍比稀释, 浓度依次为 6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 和 0 mmol/L。再将临床收集到的 35 mL 混合血清标本分成 7 份, 每份 4.5 mL(余下弃去), 对应加入上述不同维生素 C 浓度的牛血清清蛋白生理盐水溶液 500 μL (1:10 稀释, 混匀), 混合后所有标本中尿酸

理论浓度均一致(200 μmol/L),而维生素 C 浓度依次为 0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02 和 0 mmol/L。

1.4.5 测定方法 波长 546 nm,加入 R1 试剂 600 μL 和样本 18 μL 混匀,以试剂空白加生理盐水调零,37 ℃ 保温 5 min 后读取吸光度,再加入 R2 试剂 300 μL,37 ℃ 保温 2 min,再次读取吸光度。两次吸光度差值即为 A。每份标本重复测定 3 次,取均值(CV<5%),选用中生北控的标准品和质控品(批号 110351、101581)。尿酸浓度计算公式:尿酸浓度(μmol/L)=A 样品/A 校准×校准浓度(297 μmol/L)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,实验数据重复测定 3 次取均值,保留小数点后一位,计算出 s。每组数据以未加维生素 C 组标本实测值为标本真实值,其余标本所测值与标本真实值相减,即为干扰值。当干扰值小于 ±1.96 s 则视为该干扰物浓度对检测结果没有明显干扰^[4]。

2 结 果

2.1 不同浓度维生素 C 氧化酶抗干扰能力比较 尿酸试剂含不同浓度维生素 C 氧化酶(0~400 U/L),对维生素 C 的干扰能力见图 1。从图中可以明显看出,维生素 C 氧化酶的加入量与干扰维生素 C 的能力成正比。随着维生素 C 氧化酶浓度的逐渐增大,维生素 C 对于尿酸测定值的影响不断减少。反之,当反应体系中维生素 C 氧化酶浓度下降时,对临床尿酸测定有明显的负干扰。

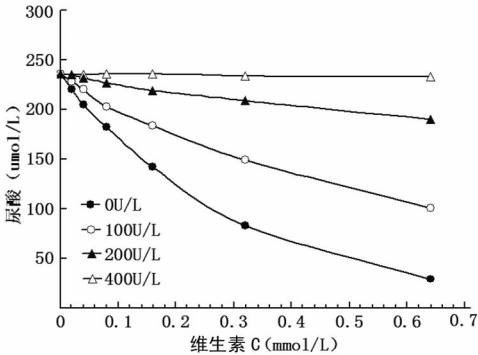


图 1 不同浓度维生素 C 氧化酶抗干扰能力比较图

2.2 不同浓度维生素 C 氧化酶对尿酸实测值的影响 维生素 C 对尿酸测定的实际值影响值见表 1。反应体系中维生素 C 氧化酶含量为 200 U/L,标本中维生素 C 浓度小于或等于 0.04 mmol/L 时,对尿酸检测结果没有明显干扰(干扰值-4.2 μmol/L<±1.96s)。在反应体系中维生素 C 氧化酶浓度增加到 400 U/L,即使标本中维生素 C 浓度升高至 0.64 mmol/L,对检测结果也没有显著干扰(干扰值-3.0 μmol/L<±1.96s)。但是维生素 C 氧化酶含量维持在 100 U/L 时,对标本中存在的维生素 C 没有抗干扰能力,见表 1。

表 1 不同维生素 C 氧化酶浓度下对尿酸测定值的影响

抗坏血酸 (mmol/L)	维生素 C 氧化酶(U/L)							
	0		100		200		400	
	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值
0.02	3.0	-16.3	4.1	-8.2	4.8	-1.0*	3.0	-0.5*
0.04	5.2	-31.3	3.4	-16.5	5.2	-4.2*	3.0	-0.7*
0.08	4.1	-54.1	4.0	-33.2	4.1	-9.5	4.2	-1.2*
0.16	5.0	-94.8	4.0	-52.1	5.0	-17.3	5.0	-1.5*

续表 1 不同维生素 C 氧化酶浓度下对尿酸测定值的影响

抗坏血酸 (mmol/L)	维生素 C 氧化酶(U/L)							
	0		100		200		400	
	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值	1.96s	干扰值
0.32	3.4	-153.0	4.9	-87.6	3.4	-27.6	4.1	-2.8*
0.64	4.0	-207.4	3.4	-135.9	5.3	-46.0	4.0	-3.0*

*: 干扰值小于±1.96s。

3 讨 论

维生素 C 是人体血浆中含量最高的水溶性维生素。因其在增强机体抵抗力、降低血脂和胆固醇等方面有重要作用^[4-8],所以在临床上得到了广泛应用。但同时维生素 C 也是一种强抗氧化物质,会干扰有 Trinder 反应加入的临床生化项目测定和尿酸、血糖、三酰甘油、总胆固醇等^[9-10]。维生素 C 氧化酶能与维生素 C 反应,显著降低其对测定结果的影响,所以众多体外诊断试剂生产厂家在尿酸试剂中加入了维生素 C 氧化酶。但加入维生素 C 氧化酶与维生素 C 之间的量效关系国内未见相关报道。本文参考了市场其他尿酸试剂盒的组成成分并加入不同浓度的维生素 C 氧化酶,以此分析两者之间的关系。

当反应体系中没有加入维生素 C 氧化酶时,对常见维生素 C 浓度均没有抗干扰作用(所有干扰值大于±1.96s),引起相应尿酸检测结果的严重负干扰,易造成临床高尿酸血症的漏检。据国内相关文献报道健康人群体内血清中维生素 C 浓度均值是 0.04 mmol/L^[11]。实验结果证明:只有反应体系中维生素 C 氧化酶达到 200 U/L 时,才不会对健康人群尿酸测定结果有明显影响(干扰值-4.2 μmol/L<±1.96s)。伴随着维生素 C 在临床上的普遍使用,治疗后最大浓度高达 0.37 mmol/L。如果是功能障碍患者,不利于维生素 C 的排除,可能血液中维生素 C 浓度更高。实验中维生素 C 氧化酶加至 400 U/L,对高达 0.64 mmol/L 的维生素 C 仍有较强抗干扰能力(干扰值-3.0 μmol/L<±1.96s)。

综上所述,因为维生素 C 的抗氧化作用,在尿酸酶法测定尿酸时会产生严重负干扰,所以临床实验室需选用含有维生素 C 氧化酶的尿酸双试剂。同时维生素 C 氧化酶含量应大于或等于 400 U/L,对使用维生素 C 治疗后的人群尿酸测定结果才不会有显著干扰。维生素 C 氧化酶价格昂贵,稳定性差,很多生产厂家在试剂出厂时可以达到 400 U/L。但随着试剂保存时间的延长,可能在临床使用之前维生素 C 氧化酶已达不到上述要求,必然会对检测结果产生影响。建议临床试剂使用前对维生素 C 氧化酶活性行测定,才能有效防止维生素 C 对尿酸检测结果的影响。

参考文献

[1] Frei B,Englang L,Ames BN. Ascorbate is an out-standing antioxidant in human blood plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(16):6377-6381.
[2] 刘奉亭. 维生素 C 对尿酸测定的干扰及机制研究[J]. 华北煤炭医学院学报,2001,3(1):3-4.
[3] Inam KV,Rag KG. Five treatment procedures evaluated for the elimination of ascorbate interference in the enzymatic determination of urinary oxalate[J]. Clin Chem,2007,54(6):864-868.
[4] Marc P. The efficacy of vitamin C supplementation(下转第 212 页)

2.4.2 个体生物学差异 CV% 转移前后区间差异的百分率小于 CV%，转移区间所造成的差异小于个体生物学差异。

2.4.3 随机抽样验证 在随机抽取的 40 例样本中，肌酐、淀粉酶均有大于 95% 的数据处于转移后的区间范围内。

3 讨 论

肌酐是判断肾功能损坏的特异性指标，影响因素少，结果稳定可靠，是反映肾功能指标之一^[6]。目前国内实验室主要采用苦味酸法和酶法测定血清肌酐。苦味酸法测定血清肌酐为非特异性反应，易受假肌酐化合物干扰，批内重复实验与酶法一致。由于该法不能全部消除非肌酐色素的干扰，测定高胆红素标本时，结果与胆红素浓度呈负相关。酶法线性范围宽，抗胆红素干扰能力强，批间重复性检测优于苦味酸法，对仪器无腐蚀性，与苦味酸法相关性良好，但价格昂贵，不利于中小型医院开展^[7]。而酶法与苦味酸法各有明显恒定偏倚^[8]，因此实验室建立自己的参考值时，要考虑健康人性别、年龄、检测仪器、方法和标本类型等。

淀粉酶测定是胰腺疾病最常用的实验室诊断方法，当患胰腺疾病，或有胰腺外分泌功能障碍时都可引起其活性升高或降低，有助于胰腺疾病的诊断^[9]。但不同底物血清淀粉酶测定结果存在明显差异，其临床参考区间应根据使用方法不同而分别制定^[10]。

不同仪器、不同方法间肌酐、淀粉酶的结果差异有统计学意义($P<0.05$)，因此需要分别建立各自的参考区间。据文献报道^[11-12]，肌酐、淀粉酶在成年人同性别之间随年龄增长逐渐增高，但男性各年龄组之间差异无统计学意义($P>0.05$)；不同性别之间同年龄组差异有统计学意义($P<0.01$)，与体形、肌肉总量、内分泌等有关，女性 61 岁以上高于其他成年女性($P<0.05$)，这可能与女性在绝经后体内激素调节紊乱和由于血管的硬化和肾脏的萎缩，肾血流量下降，肾小球滤过功能下降有关。故本文建立参考区间时按性别分组，而年龄因素不予考虑。

不同的检测系统之间，其检测结果不尽相同，这就决定了理论上使用统一的参考区间应该不可行，而建立每一个检测系统的参考区间是一项庞大的工程，对于大多数临床实验室来说是不现实的，因此本文考虑系统间的参考区间转移问题。相比于测定大批量样本建立本实验参考区间，根据两种不同系统间数据的可比性，进行参考区间的转移，再通过小样本随机抽样验证所得区间的适用性，是十分有意义的。

检测系统的多样性必然导致检测结果的差异，实现不同检测系统检测结果的可比性是成为临床检验标准化和规范化必须解决的问题和最终质量目标。实验室认可的 2 个国际标准

ISO/ ISE17025 和 ISO/15189 都对检验结果的可比性和溯源性提出了明确要求，强调比对试验是实现患者标本检验结果可比性和实现准确度溯源的重要途径。在所得数据中，肌酐罗氏向奥林巴斯转移的回归方程中斜率 a 不趋近于 1，截距 b 相比于均值大，固定系统误差大，所得结果应总误差大，转移结果不好，但实际结果差异不大，分析原因为检测对象均为健康人群，所得数据均是在一个相对狭窄的范围内，数据拟合过程中可能相互抵消，数值折中。肌酐罗氏向贝克曼转移的回归方程中斜率 a 趋近于 1，截距 b 相比于均值小， $r^2>0.975$ ，区间结果差异不大。淀粉酶罗氏向奥林巴斯、贝克曼转移的回归方程中斜率 a 不趋近于 1，截距 b 相比于均值小， $r^2>0.975$ ，数据之间固定误差小，数据之间高度成比例相关，结果差异不大。故不同检测系统间肌酐、淀粉酶结果参考区间转移可行。

参考文献

[1] 王诚,余红岚,何伶俐,等. 两种不同评价方案对不同检测系统结果正确度的验证及方法比较[J]. 检验医学与临床,2012,9(10): 1222-1224.

[2] 梁瑞莲,周远青,谢丽明,等. 同室不同生化检测系统测定结果的比对和偏倚评估[J]. 检验医学与临床,2009,6(14):1159-1162.

[3] 张兴宗,林云,邹映东,等. 两台生化分析仪同一检测项目结果比对和偏差评估[J]. 中外健康文摘,2012,9(2):153-154.

[4] Zhong K,Wang ZG,Wang W,et al. The introduction of reference intervals-some theoretical considerations[J]. J Lab Med,2011,32(4):526-527.

[5] 钟堃,王治国,王薇,等. 临床检验参考区间的转换和验证[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(4):140-143.

[6] 彭可君,彭素萍,孟芳,等. 健康成人血清肌酐参考值范围调查[J]. 吉林医学,2010,30(19):3039-3039.

[7] 孔凡斌. 酶法、苦味酸法及干化学法测定血清肌酐的方法学分析[J]. 中国社区医师:医学专业,2010,12(3):112-113.

[8] 张传洽. Jaffe 速率法、电极法和酶法测定肌酐结果的比较[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(3):283-284.

[9] 郭连坤,王晓红. 淀粉酶、脂肪酶测定在胰腺疾病中的诊断意义[J]. 长春中医药大学学报,2006,22(1):56-56.

[10] 袁洁. 血清 α -淀粉酶不同底物测定方法结果对比[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(4):378,380.

[11] 卢燕君,石汉振,林莲英,等. 健康成年人血浆肌酐生物参考区间调查[J]. 现代检验医学杂志,2006,21(1):35-36.

[12] 崔婷,马建锋. 尿淀粉酶与尿肌酐比值正常参考区间建立[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,(10):1469-1470.

(收稿日期:2013-09-18)

(上接第 209 页)

on reducing total serum cholesterol in human subjects:a review and analysis of experimental trial[J]. J Chir Med,2006,5(1):2-12.

[5] Gokce N,Keaney JF,Frei B,et al. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease[J]. Circulation,2008,99(25):3234-3240.

[6] Ting HH,Timini FK,Boles KS,et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. J Clin Invest,1996,97(1):22-28.

[7] 向光大,韩芳. 维生素 C 对 II 型糖尿病患者血管内皮功能的影响[J]. 医药导报,2006,25(10):1019-1022.

[8] 苏东东,向光大. 维生素 C 对葡萄糖负荷后血管内皮功能的保护作用[J]. 华南国防医学杂志,2008,22(2):38-42.

[9] Mart F,Luiz E. Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameters:in vivo and in vitro studies[J]. Clin Biochem,2006,39(4):396-403.

[10] Mart F,Luiz E. Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide to generate Chromophore[J]. Clin Chim Acta,2006,373(1):108-116.

[11] 黎明新,张惠敏. 维生素 C 对 Trinder 反应结果的影响评价. 中国冶金工业医学杂志,2007,24(5):616-617.

(收稿日期:2013-09-15)