

# 酶法与碱性苦味酸法测定尿肌酐值的差异及相关性研究

史善富<sup>1</sup>, 陶松宁<sup>2</sup>

(1. 南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210042 2. 中国医学科学院皮肤病医院, 江苏 南京 210042)

**摘要:** 目的 研究酶法和碱性苦味酸法测定尿肌酐值的差异及相关性, 探讨酶法测定肌酐值用于职业接触汞的生物限值的报告。方法 将 123 名受检者尿液分为两组, 分别用 0.9% 的生理盐水作 1:10 及 1:20 稀释, 用肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法测定两组尿肌酐值, 分析两法测定尿肌酐值的差异及相关性。结果 1:10 稀释组尿液肌酐均值苦味酸法低于酶法 ( $P < 0.01$ ), 相关系数  $r = 0.9955$  回归方程  $Y_{\text{苦味酸法}} = 0.5726X_{\text{酶法}} + 392$  1:20 稀释组尿液肌酐均值苦味酸法低于酶法 ( $P < 0.01$ ), 相关系数  $r = 0.9977$  回归方程  $Y_{\text{苦味酸法}} = 0.5723X_{\text{酶法}} + 602$  结论 两种方法测定的尿液肌酐值差异有统计学意义但具有良好的相关性, 可以酶法测定的尿肌酐值计算成苦味酸法测定的尿肌酐值用于职业接触汞的生物限值的报告。

**关键词:** 尿; 肌酐; 酶法; 苦味酸法; 汞

**中图分类号:** R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2011)04-0256-04

Study on discrepancy and correlation of urinary creatinine levels between enzymic method and Jaffe kinetic creatinine assay

SHI Shan-fu\*, TAO Song-ning

(\*: Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** Objective To compare the enzymic method and Jaffe kinetic creatinine assay for the determination of creatinine in urine and discuss whether using the levels of creatinine by enzymic method to report on biological limits for occupational exposure to mercury. Methods A total of 123 conscript persons were selected as study subjects, they were further divided into two groups, their urine were diluted into 1:10 and 1:20 respectively by 0.9% physiological saline. The levels of urine creatinine were determined by enzymic method and Jaffe kinetic creatinine assay, their difference and correlation were analyzed statistically. Results The creatinine concentrations in urine determined by the Jaffe kinetic creatinine assay were significantly lower than those by enzymic method in 1:10 group ( $P < 0.01$ ) and correlation coefficient  $r = 0.9955$  regression equation  $Y_{\text{Jaffe kinetic creatinine assay}} = 0.5726 X_{\text{enzymic method}} + 392$ . The creatinine concentrations in urine determined by the Jaffe kinetic creatinine assay were significantly lower than those by enzymic method in 1:20 group ( $P < 0.01$ ) and correlation coefficient  $r = 0.9977$  regression equation  $Y_{\text{Jaffe kinetic creatinine assay}} = 0.5723 X_{\text{enzymic method}} + 602$ . Conclusion There was significant difference in creatinine concentrations in urine between two methods but there was good correlation. The creatinine concentrations in urine determined by enzymic method can be converted to those by the Jaffe kinetic creatinine assay used to report on biological limits for occupational exposure to mercury.

**Key words:** urine; creatinine; enzymic method; kinetic creatinine assay; mercury

肌氨酸氧化酶法(简称酶法)与碱性苦味酸速率法(简称苦味酸法)测定血清肌酐值差异情况的文献报道较多, 相关研究也比较深入, 但这两种方法测定尿肌酐结果比较的研究较少见, 为了配合《中华人民共和国卫生部卫生行业标准(WS/T 65-2006)》的实施, 本文对酶法与碱性苦味酸法测定尿肌酐值的差异情况及相关性进行了研究, 探讨以酶法测定肌酐值用于职业接触汞的生物限值的报告。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源及处理

选取本所健康体检人员 123 人, 男 67 人、女 56 人,

年龄 18~67 岁, 一次性试管留取尿样, 尿常规检测结果正常。将 123 份尿液样本分成 2 组, 第一组 63 份, 用 0.9% 的生理盐水作 1:10 稀释; 第二组 60 份, 用 0.9% 的生理盐水作 1:20 稀释, 测定肌酐含量, 2 h 内检测完毕。

### 1.2 仪器与方法

HACH7020 全自动生化分析仪用于苦味酸法测定尿肌酐含量, 当测定值大于方法的线性上限 ( $880 \mu\text{mol/L}$ ) 时, 加大稀释倍数重新测定。HACH7080 全自动生化分析仪用于酶法测定尿肌酐含量。测定过程及参数设置均按试剂盒说明书及仪器说明书进行。

### 1.3 试剂与校准品

苦味酸法试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司提供, 线性范围为  $44 \sim 880 \mu\text{mol/L}$ , 肌酐校准液溯源于 ROCHE 公司的 Calibrator for automated systems

收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-13

作者简介: 史善富 (1957-), 男, 副主任检验师, 主要从事职业病临床检验工作

中的肌酐校准液。酶法试剂盒由日本和光纯药工业株式会社提供, 线性范围为 7 ~ 8 800  $\mu\text{mol/L}$ 。肌酐校准液由和光公司提供, 溯源至 SRM 914 a National Institute of Standards and Technology。

### 1.4 质量控制

对样本采集及检测前、检测中、检测后的质量控制均按照《医院检验科建设管理规范》相关要求, 选用英国 LANDOX 公司冻干粉定值质控品, 检测前 1 加蒸馏水复溶成质控液, 低值批号 559  $\mu\text{g}$  高值批号 396  $\mu\text{g}$ 。检测每批调查样本时均同时对质控液进行检测, 误差均在  $\bar{x} \pm s$  之内。

### 1.5 统计学分析

在质控良好的状态下, 分别用两种方法检测 123 份稀释后的尿液标本, 剔除 2 份没有结果的标本, 对两种方法检测的 121 组数据做显著性检验, 同时作散点图, 并做相关回归分析, 计算回归方程。

## 2 结果

### 2.1 苦味酸法检测结果

第一组中的 27、28 号两份样本没有结果, 得 61 个检测数据, 其中 21 份样本的检测结果大于方法的线性上限 (880  $\mu\text{mol/L}$ )。实际从第一组 1:10 稀释的尿液样本中获得 40 个有效检测数据。从 123 份原始样本中找出第一组中超出线性上限的 21 份样本, 用 0.9% 的生理盐水作 1:20 稀释, 重新测定肌酐含量, 检测结果全部在该方法的线性范围内。第二组 60 份样本中有 2 份样本检测结果大于方法的线性上限 (880  $\mu\text{mol/L}$ )。从 123 份原始样本中找出第二组超出线性上限的 2 份标本, 用 0.9% 的生理盐水作 1:40 稀释, 重新测定肌酐含量, 检测结果全部在该方法的线性范围内。实际获得 1:20 稀释样本 79 个有效检测数据 (第一组 21 个、第二组 58 个), 实际获得 1:40 稀释样本 2 个有效检测数据。结果见表 1、表 2。

### 2.2 酶法检测结果

将苦味酸法检测过的两组尿稀释液样本再用酶法测定其肌酐含量, 第一组中的 27、28 号 2 份样本仍没有结果, 余下的 61 个样本及第二组样本的所有检测结果均在方法的线性范围内, 实际获得 1:10 稀释样本 61 个有效检测数据及 1:20 稀释样本 60 个有效检测数据。结果见表 1、表 2。

表 1 两种检测方法实际检测值线性范围比较

稀释度	样本数	苦味酸法超出	酶法超出
		880 $\mu\text{mol/L}$ 样本数	8 800 $\mu\text{mol/L}$ 样本数
1:10	61	21	0
1:20	60	2	0

表 2 两种检测方法测定结果按稀释比例计算后的肌酐值比较

稀释度	苦味酸法			酶法				
	例数	最低值	平均值	最高值	例数	最低值	平均值	最高值
1:10	40	1 890	5 022	8 240	61	2 810	8 087	14 940
1:20	79	2 240	9 303	17 240	60	3 440	15 472	31 100
1:40	2	—	—	—				

注: 1:10 及 1:20 稀释尿液酶法与苦味酸法肌酐均值相比  $P < 0.01$

### 2.3 制作酶法、苦味酸法测定值散点图

以酶法测定肌酐值为横坐标, 以苦味酸法测定肌酐值为纵坐标, 以设定稀释度的实际测定值作散点图, 分析方法的线性范围, 见图 1、图 2。以两个稀释度在检测方法线性范围内的实际测定值及两种方法测定结果按稀释比例计算还原后的肌酐值作散点图, 为分析两种方法尿液肌酐值的相关系数及回归方程做准备, 见图 3~图 5。

### 2.4 两种方法测定尿液肌酐值的显著性检验及相关回归分析

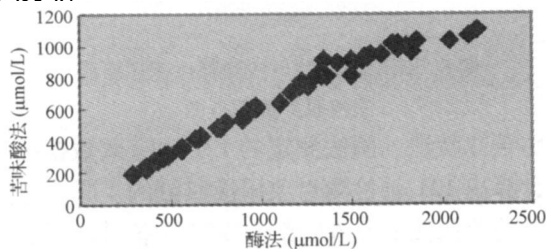


图 1 两种方法测定 1:10 稀释尿液肌酐值散点图

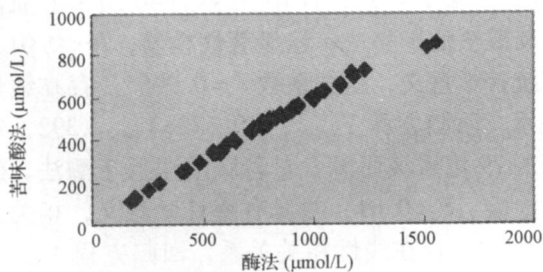


图 2 两种方法测定 1:20 稀释尿液肌酐值散点图

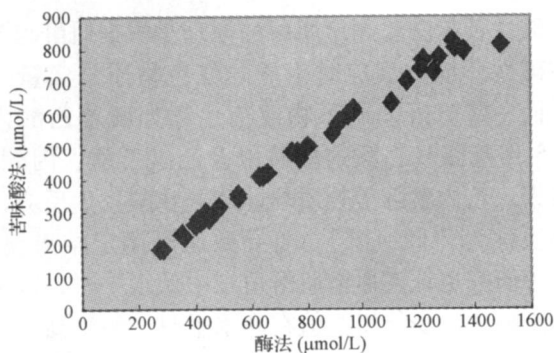


图 3 两种方法测定 1:10 稀释尿液肌酐值散点图

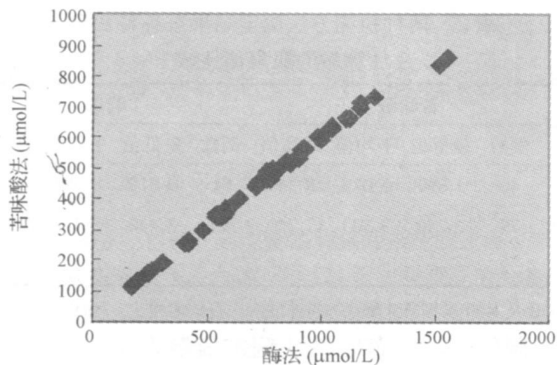


图 4 两种方法测定 1:20 稀释尿液肌酐值散点图

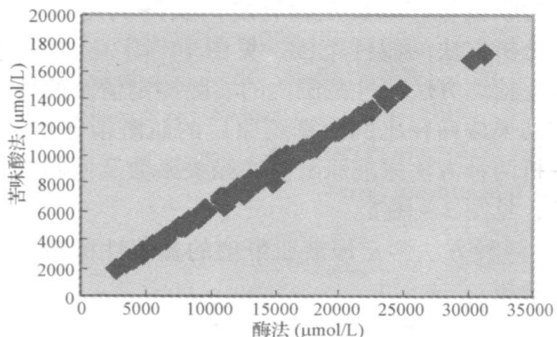


图 5 两法测定结果按稀释比例还原后尿液肌酐值散点图

将苦味酸法、酶法测定的 121 组有效数据按稀释比例计算出 121 例检测对象尿液肌酐的实际含量，苦味酸法约为酶法的 0.63 倍（各实验室因试剂、仪器及检测环境的差异，这个数值可能会有微小变化，仅供参考）。表 2 显示，1:10 稀释的 40 组尿液肌酐含量苦味酸法低于酶法，经显著性检验， $P < 0.01$ ，差异有统计学意义，相关系数  $r = 0.9955$  存在线性相关关系，回归方程  $Y_{\text{苦味酸法}} = 0.5726 X_{\text{酶法}} + 392$ 。1:20 稀释的 79 组尿液肌酐含量苦味酸法低于酶法，经显著性检验， $P < 0.01$ ，差异有统计学意义，相关系数  $r = 0.9977$  存在线性相关关系，回归方程  $Y_{\text{苦味酸法}} = 0.5723 X_{\text{酶法}} + 602$ 。

### 3 讨论

碱性苦味酸法测定肌酐的原理是根据肌酐与苦味酸在碱性环境中反应时生成的红色物质来定量分析的，而一些肌酐的同系物或衍生物如胍基乙酸内酰胺、5 甲基胍基乙酸内酰胺以及乙酰乙酸、丙酮酸、胆红素、乙内酰脲等物质均能和苦味酸发生反应，这些物质称为“假肌酐”，可导致肌酐测定结果偏高。高静等研究也证实血清肌酐值在中低水平时，苦味酸法高于酶法，血清肌酐值在高水平时，酶法高于苦味酸法<sup>[1]</sup>，原因是血清肌酐值在中低水平时受“假肌酐”的影响而增高，在高水平时由于其方法的线性

范围窄而使高值检测不出来（低、中、高水平的具体数值由于试剂的生产厂家及实验设计的差异，诸多文献报道略有不同）。酶法测定的原理是利用肌酐在肌酐氨基水解酶、肌酸脒基水解酶、肌氨酸氧化酶、过氧化物酶等酶及显色剂和氧的共同作用下生成醌亚胺（红色）来定量分析的，其主要干扰物质为样品中的肌酸，可采用双试剂除去肌酸的干扰。尿液肌酐的检测方法与血清肌酐检测方法相同，所不同的只是对尿液标本进行了适当的稀释而已。本文研究显示，尿液肌酐含量无论在中低水平，还是在高水平，苦味酸法均低于酶法，经相关回归分析，两法的测定值存在直线相关关系，可能是因为所选尿液样本皆是尿常规检查阴性（干扰物质少）且经稀释后干扰物质浓度又大大降低，不象血清标本那样产生明显的干扰反应而使测定值假性增高。但值得注意的是，由于大量的“假性肌酐”存在于红细胞中，所以，不论是红细胞血尿，还是隐性血尿，都会影响苦味酸法测量尿液肌酐含量的准确度，而对酶法则没有明显影响。

关于尿液肌酐检测中尿液稀释度的选择，不同文献建议的值差异较大<sup>[2-4]</sup>，WS/T97 中尿液的稀释度采用 1:10 比例。朱广忠等也认为尿液 1:10 的稀释比例时测定结果的变异系数和相对偏差都较小<sup>[5]</sup>。但本文表 1 显示，苦味酸法线性范围较窄（44 ~ 880  $\mu\text{mol/L}$ ），第一组 1:10 稀释的 61 个检测结果中就有 21 个超出 880  $\mu\text{mol/L}$ 。图 1 也显示这 21 个检测结果不同程度上偏离了直线分布，需要重新稀释、重新检测的标本达第一组标本总数的 1/3，大大增加了实际工作的困难。表 1 还显示，第二组 1:20 稀释的 60 个检测结果及第一组重新按 1:20 稀释的 21 个检测结果中仅 2 个超出方法的线性范围，图 2 也显示，1:20 稀释的 81 个检测结果中 79 个在方法线性范围内，且其线性分布较好，只有 2 个检测结果超出方法线性上限而偏离线性分布。表 1 还显示，酶法的线性范围宽（7 ~ 8 800  $\mu\text{mol/L}$ ），第一组 1:10 稀释的 61 个检测结果和第二组 1:20 稀释的 60 个检测结果全部在方法的线性范围内。因此建议，如果用苦味酸法检测尿液肌酐，尿液稀释度宜选择 1:20 的比例，如果用酶法检测尿液肌酐，则尿液稀释度选择 1:10 或 1:20 皆可。

本次研究中苦味酸法检测的个别尿液样本的肌酐值小于 2 652  $\mu\text{mol/L}$ ，实际工作中这样的样本不适宜做重金属检测，应查明肌酐值偏低的原因，是否受检者蛋白摄入太少，还是另有原因，可考虑采用其他校正方法（如比重法）。

（下转第 291 页）

透过胎盘进入子代体内并蓄积,致乙酰胆碱水平降低,从而抑制神经肌肉接点处的兴奋传导,影响神经细胞生长、分化和脑的正常功能,最终导致子代神经系统发育延缓,学习记忆水平下降,部分揭示了 NP 的神经毒作用机制。另外,联合染毒高低剂量组血清睾酮降低、雌激素水平升高,孕 9~15 d 正是胎鼠神经系统发育关键期,体内内分泌系统脆弱,在该期暴露 NP 和  $E_2$  其与下丘脑和垂体前叶的雌激素受体结合,可干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节功能,改变下丘脑 GnRH 和垂体 LH、FSH 的释放,影响外周性腺的功能,改变仔鼠体内的性激素代谢的平衡,使雄激素合成下降、雌激素水平升高,激素水平的改变与学习记忆水平下降之间是否有因果关系有待进一步深入研究。

与以往研究相比,本研究为 NP 与  $E_2$  联合暴露,时间缩短至胎鼠神经系统器官形成关键期孕 9~15 d 采用一组行为毒理学的测试方法,观察到联合暴露对仔鼠的神经系统毒作用。本研究还发现,除了联合染毒组与对照组及单独染毒组之间的毒作用差异之外,染毒组之间也存在差异,同种物质染毒,高剂量毒性强于低剂量,两种毒物混合染毒的毒性强于一种毒物单独染毒。这说明壬基酚和雌二醇的联合毒性表现为相加作用。本研究结果可为探讨母体  $E_2$  和 NP 联合暴露对子代神经毒性和孕期干预提供实验依据。

随着工业化的发展,环境雌激素的污染已对人类健康构成较大的威胁,关系着人类的生存繁衍。因此对该类物质可能造成的危害进行全面彻底的研究已成为当务之急。本研究对 NP 和 OP 致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤联合作用的评价仅是初

步的,如何全面正确评价烷基酚类其他物质的联合作用,并进一步阐明烷基酚类物质的整体危害效应,是毒理学者下一步应该认真研究的课题。目前,环境雌激素的毒性实验多集中于动物模型,缺乏对人类直接影响的流行病学资料,因此,今后需要进一步进行这方面的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Xu Jie, Yu Jie, Wang Yang, et al. Immune effects of nonylphenol on offspring of rats exposed during pregnancy [J]. Human and Ecological Risk Assessment, 2010, 16 (2): 444-452
- [2] 卢宁,俞捷,许洁,壬基酚对仔代脑组织 AChE 和 ChAT 活性的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34 (9): 1221-1223.
- [3] 许洁,汪洋,张恒,等.壬基酚对仔鼠脑组织脂质过氧化损伤的研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2010, 23 (2): 48-50
- [4] Xu Jie, Wang Yang, Yu Jie, et al. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats [J]. Birth Defects Research (Part B), 2010, 83: 1-11
- [5] 许洁,汪洋,卢林,等.壬基酚对雄性仔代学习记忆和海马超微结构的影响 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19 (1): 18-20
- [6] 许洁,汪洋,俞捷,等.经胎盘暴露壬基酚对仔鼠神经行为发育的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28 (4): 13-16
- [7] 李勇,张大东.发育毒理学研究方法和实验技术 [M]. 北京:北京医科大学出版社, 2000: 183-194
- [8] Uryu S, Tokuhito S, Murasugi T, et al. A novel compound R5178 specifically inhibits neuronal cell death mediated by beta amyloid induced macrophage activation in vitro [J]. Brain Res, 2002, 946 (2): 298-306

(上接第 258 页)

酶法和苦味酸法测定血清肌酐含量相关性的研究报道很多,相关系数大多在 0.99 以上<sup>[6-8]</sup>,本文图 3、图 4 显示,在方法的线性范围内,苦味酸法与酶法检测的 1:10 及 1:20 稀释尿液的肌酐值相关系数分别为 0.9955 和 0.9977,与血清肌酐测定研究的结果相近,均成直线相关关系。在实际工作中,检验科医师在用酶法检测出尿液肌酐含量后,可根据相应的回归方程计算成苦味酸法肌酐含量,再按照 WS/T 265-2006 标准报告职业接触汞的生物限值,既可提高工作效率,又能保证报告的可比性和可靠性。

GBZ 289-2007《职业性汞中毒诊断标准》规定用苦味酸法测定尿液肌酐含量,根据本实验室的研究结果,将酶法尿液肌酐值乘以 0.63 (本研究样本量不大,此值仅供参考)即为苦味酸法尿液肌酐值。为了方便临床医师应用酶法测定的尿液肌酐含量的汞报告代替苦味酸法测定的尿液肌酐含量的汞报告,也可以 GBZ 289-2007 为依据,经过换算近似认为酶法尿液肌酐的尿汞正常参考值为  $1.42 \mu\text{mol}/\text{mol}_{\text{肌酐}}$  或  $2.5 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{肌酐}}$ ,当酶法尿液肌酐的尿汞高于其生物接

触限值  $13 \mu\text{mol}/\text{mol}_{\text{肌酐}}$  或  $22 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{肌酐}}$ ,可认为长期从事作业劳动者尿汞增高,尿汞正常者经驱汞试验,用 5% 二巯丙磺钠 5 ml 一次肌内注射,酶法尿液肌酐的尿汞  $> 0.141 \mu\text{mol}/\text{d}$  提示有过量汞吸收存在,对诊断有参考意义。

#### 参考文献:

- [1] 高静,董振南,田亚平,等.酶法与苦味酸法测定血清肌酐水平的转换方法 [J]. 军医进修学院学报, 2005, 12: 342-343.
- [2] 叶应妩. 全国临床检验操作规程 [M]. 南京:东南大学出版社, 1990: 182-190
- [3] 林其燧主译. 临床生物化学方法大全 [M]. 北京:北京大学出版社, 1991: 64-69
- [4] 李影林. 中华医学检验全书 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 701-704
- [5] 朱广忠,杨焕涛.尿肌酐测定中尿液稀释比例对测定结果的影响 [J]. 实用医技杂志, 2008, 10: 4182-4183.
- [6] 陈筱菲,倪甘甜.酶法与碱性苦味酸法测定肌酐清除值的差异情况研究 [J]. 检验医学, 2010, 4: 272-274
- [7] 孙艳虹,高玲,钟方毅,等.三种肌酐测定方法偏倚的比较 [J]. 实用医学杂志, 2004: 324-326
- [8] 马超.血清肌酐肌氨酸氧化酶法与苦味酸动力学法检测结果的比较 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 6: 561.