技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)08-1063-03

微通道化学芯片流动注射化学发光测定尿酸

易 钢,钟 梁

(重庆医科大学检验系、临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:寻求在微通道化学芯片上采用流动注射化学发光分析法快速测定临床样品中尿酸含量。方法:自制的微通道化学芯片,在选定实验条件下,利用尿酸对亚铁氰化钾 - 铁氰化钾 - 鲁米诺化学发光体系的增强作用实现血清中尿酸的分析。结果:尿酸浓度在 $2.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-2}$ g/L 范围内与发光强度增加值线性关系良好;检测限(3σ)为 4.6×10^{-7} g/L;精密度试验的 RSD 为 3.09%;加标回收率分别为 94.0%、99.7%、107.8%。结论:微通道化学芯片制作方法简单,对血清尿酸含量的流动注射测定灵敏度高,简便快速。

【关键词】微通道化学芯片;流动注射;化学发光;尿酸

【中国图书分类法分类号】R0657.39 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

Flow injection chemiluminescence determination of uric acid with micropipe-chip

YI Gang, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a flow injection chemiluminescence determination method with micropipe-chip for speedy determination of uric acid in clinical samples. *Methods*: Basing on the rule that uric acid can greatly enhance the chemiluminescence emission intensity of $K_4Fe(CN)_6$- $K_3Fe(CN)_6$-luminol system, the prepared micropipe-chip was used to analyze the uric acid in serum under the selective conditions. *Results*: The enhancing chemiluminescence intensity was proportional to uric acid concentration over a range $2.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-2}$ g/L. The detection limit(3σ) was 4.6×10^{-7} g/L. The relative standard deviation(RSD) was 3.09% and the recovery test results were 94.0%, 99.7%, and 107.8%. *Conclusion*: The manufacture technique of micropipr-chip is simple but the proposed determination method of uric acid in human serum is sensitive, fast and convenient.

【Key words】Micropipe-chip; Flow injection; Chemiluminescence; Uric acid

作为嘌呤类的终末代谢产物,血清和尿液中尿酸的检测,对痛风症、自发性尿酸血、肾功能减退、慢性白血病、多发性骨髓瘤及中毒性肝病等多种疾病诊断具有重要作用[1,2]。目前,测定尿酸的方法有毛细管电泳法[3]、液相色谱法[4]等。采用化学发光法测定尿酸也有报道[5-7]。

Manz 和 Widmer 于 20 世纪 90 年代初提出微全分析系统(Micro total analysis system,μTAS)概念[8],目前微全分析已经发展成为世界上最前沿的科技领域之一,其核心技术是以微流控技术为基础的微流控芯片[9,10]。μTAS 的微型化能够有效减少试剂及样品消耗、降低分析成本、降低分析过程产生的废物对环境的污染。本文采用自制的微通道化学芯片,结合流动注射技术,利用尿酸对亚铁氰化钾-铁氰化钾-鲁米诺化学发光体系的增强作用实现了血清中尿酸的测定,方法灵敏度高,简便快速,微通道化学芯片制作简单,为临床样品中尿酸的检测提供了一种备选方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

MPI-B 型多参数化学发光测试系统(西安瑞迈科技股份有限公司);电子分析天平(日本岛津);PMMA 有机玻璃;芯片加工套装工具;pHS-3CW 型酸度计(上海理达仪器厂)。

亚铁氰化钾溶液(0.10 mol/L):称取 18.417 5 g $K_4Fe(CN)_6$,用双蒸馏水溶解,定容至 500 ml,摇匀,测定时用蒸馏水稀释

作者介绍:易 钢(1964-),男,副教授,硕士,研究方向:生物分析化学。

基金项目:重庆医科大学校办课题(XB2004-06)。

为 100 mmol/L;铁氰化钾储备溶液(5 mmol/L):称取 0.823 2 g $K_3Fe(CN)_6$,用双蒸馏水溶解,定容至 500 ml,摇匀,测定时用蒸馏水稀释为 50 μ mol/L;鲁米诺储备溶液(0.010 mol/L):称取 0.886 g 鲁米诺,用 0.40 mol/L NaOH 溶液溶解,定容至 500 ml,测定时用 0.40 mol/L NaOH 溶液稀释为 0.20 mmol/L;尿酸标准储备溶液(5.0×10^{-2} g/L):称取5 mg 尿酸,用双蒸馏水溶解,定容至 100 ml 摇匀,应用时用双蒸馏水稀释至所需浓度。

1.2 *实验方法*

1.2.1 微通道化学芯片制作 用 2 块厚度为 4 mm、直径 50 mm 的圆形有机玻璃片分别作为芯片基板和盖板,用双蒸馏水、乙醇反复清洗后待用;将直径为 200 μ m 铜丝制作的微通道模型置于玻璃片上,把芯片基板置于上面,再盖上另外一块玻璃片,施加 10 kg 压力并在 100℃烘箱中恒温 20 min,即可在芯片基板上印制所需微通道。在芯片盖板上根据芯片基板对应的样品、载液、试剂和废液的进出口所在位置打出直径为 2 mm 的孔,即完成芯片盖板制作;将四氢呋喃均匀涂覆芯片盖板上,立即将芯片盖板与芯片基板粘合,置于两平整玻璃片中,施加压力并在 40℃烘箱中恒温 10 min 取出,待完全冷却后,即完成微通道芯片的制作。微通道芯片结构如图 1、图 2 所示。

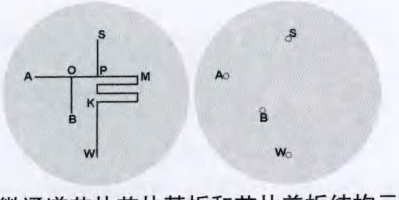


图 1 微通道芯片芯片基板和芯片盖板结构示意图

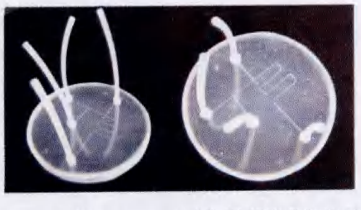


图 2 直径 200μm 制作的微通道芯片照片

1.2.2 化学发光强度测定 以外径 2 mm、内径 200 μ m 的硅胶管作为微通道化学芯片外接口由蠕动泵导入溶液,接口处用 AB 胶密封。其中:接口 A 导入浓度为 50 μ mol/L 的铁氰化钾溶液,接口 B 导入浓度为 100 mmol/L 亚铁氰化钾和 0.2 mmol/L 鲁米诺混合溶液(体积比 1:1),接口 S 由六通阀切换导入载液和样品溶液,接口 W 导出反应废液。微通道化学芯片用黑色胶布遮盖 P 点前的通道,仅以 PW 段通道作为发光检测区,置于 MPI-B 型多参数化学发光测试系统检测舱中,由光电倍增管检测化学发光信号,以化学发光峰强度定量。检测器负高压为 600 V,A、B、S 3 个导入口蠕动泵转速均为 20 r/min。

2 结 果

2.1 标准曲线

按上述实验方法,于 S 接口导入不同浓度的尿酸标准溶液,测定相应化学发光强度。以尿酸浓度(C)为横坐标,化学发光强度增加值(ΔF)为纵坐标绘制标准曲线。结果表明,尿酸在 2.0×10^{-5}~1.0×10^{-2} g/L 范围内与发光强度增加值有良好线性关系,其回归方程为:$\Delta F=9878.5C+13.04$,$r=0.9996$,根据 IUPAC 推荐,计算得检测限(3σ)为 4.6×10^{-7} g/L。

2.2 *方法学考察*

2.2.1 精密度试验 用 5.0×10^{-4} g/L 的尿酸标准品溶液连续进样 6 次,测定发光强度增加值,结果显示 RSD 为 3.09%。

2.2.2 血清样品测定 取人混合血清样品 1.0 ml,用蒸馏水稀释 100 倍,按上述实验方法测定 6 次,结果显示人混合血清尿酸平均浓度为 0.028 4 g/L,RSD 为 3.87%。

2.2.3 回收试验 取人混合血清样品 1.0 ml 3 份,分别加入 2.0×10^{-2} g/L 尿酸标准溶液 1.0、1.5、2.0 ml,用蒸馏水稀释至 100 ml,按上述实验方法测定,每份重复测定 3 次,计算加标回收率,结果见表 3。

3 讨 论

μTAS 的核心是微流控芯片,本文利用加工成型方便、价格便宜、具有良好透明性的 PMMA 有机玻璃材料,采用热压法制作微通道化学芯片,芯片

表 1 精密度实验结果(n=6)

编号	发光强度增加值	测得浓度(g/L)	相对标准偏差 RSD%
1	18.2	5.22×10^{-4}	3.09
2	17.9	4.92×10^{-4}	
3	18.1	5.12×10^{-4}	
4	18.1	5.12×10^{-4}	
5	17.9	4.92×10^{-4}	
6	17.8	4.82×10^{-4}	

表 2 人血清样品测定结果（n=6）

编号	发光强度增加值	血清尿酸浓度（g/L）	浓度平均值（g/L）	相对标准偏差 RSD%
1	15.8	0.027 9	0.0284	3.87
2	15.7	0.026 9		
3	16.0	0.030 0		
4	15.8	0.027 9		
5	15.9	0.029 0		
6	15.9	0.029 0		

表 3 加标回收实验结果（n=3）

样品中尿酸含量（g/L）	加入尿酸标准量（g/L）	平均发光强度增加值	测定含量（g/L）	回收率%
0.028 4	0.020 0	17.7	0.047 2	94.0
0.028 4	0.030 0	18.8	0.058 3	99.7
0.028 4	0.040 0	20.1	0.071 5	107.8

表 4 不同方法测定尿酸的比较

分析方法	线性范围（g/L）	检测限（g/L）	参考文献
高效毛细管区带电泳	$2.0\times10^{-3}\sim8.0\times10^{-2}$	–	3
高效液相色谱法	$3.2\times10^{-6}\sim1.0\times10^{-1}$	3.0×10^{-6}	4
流动注射化学发光	$1.0\times10^{-4}\sim1.0\times10^{-1}$	4.0×10^{-5}	5
化学发光	$1.7\times10^{-8}\sim1.2\times10^{-3}$	1.8×10^{-9}	6
本方法	$2.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-2}$	4.6×10^{-7}	

制作工艺简单；结合流动注射技术，利用尿酸对亚铁氰化钾-铁氰化钾-鲁米诺化学发光体系的增强作用实现了血清中尿酸的测定，方法学评价表明，尿酸在 $2.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-2}$ g/L 范围与发光体系发光强度增加值良好的线性关系，回归方程为：$\Delta F=9878.5C+13.04$，$r=0.9996$；检测限（3σ）为 4.6×10^{-7} g/L；精密度试验的 RSD 为 3.09%；人混合血清 6 次测定的尿酸平均浓度为 0.0284 g/L，RSD 为 3.87%；加标回收率分别为 94.0%、99.7%、107.8%。

与目前已经报道的分析方法相比，本方法具有线性范围较宽，灵敏度高，简便快速等特点，见表 4。由于本方法反应及检测均在微通道芯片上完成，所用试剂及样品消耗量小，分析成本低，能够降低分析过程产生的废物对环境的污染，可为临床样品中尿酸的检测提供一种备选方法。

参 考 文 献

[1] 周爱儒，查锡良. 生物化学[M].北京：人民卫生出版社，2002. 192~203.

[2] 周 新，涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M].北京：人民卫生出版社，2003.64-69.

[3] 周继红.高效毛细管区带电泳法测定人尿液中尿酸、肌酐和伪尿核苷含量[J].色谱，1998，16(2)：176-178.

[4] 宋燕西，张海霞.体液直接进样高效液相色谱法测定尿中肌酐和尿酸[J].分析化学，1999，27(2)：243-245.

[5] 翟 鹏.反向流动注射抑制化学发光法测定尿酸[J].理化检验-化学分册，2004，40(8)：470-472.

[6] 刘二保，卫洪清.化学发光法测定尿酸[J].光谱学与光谱分析，2005，25(8)：1213-1215.

[7] 张建道，黄玉明.流动注射化学发光测定尿酸[J].分析化学，2001，29(4)：446-449.

[8] Anz A，Graber N，Widmer H M. Miniaturized total chemical analysis systems：a novel concept for chemical sensing[J]. Sens Actuators B，1990，1：244-248

[9] 方肇伦. 微流控分析芯片的制作及应用[M].北京：化学工业出版社，2005.1-30.

[10] 鞠熀先，邱宗荫. 生物分析化学[M].北京：科学出版社，2007. 199~240.

（责任编辑：冉明会）