维普资讯 http://www.cqvip.com

脲酶电极测定尿素的方法学探讨

医学检验系临床生化教研室 林良方

第三军医大学野战外科研究所 王厚行

提 要 本文用聚氯乙烯（PVC）固定化脲酶电极，对测定血浆尿素（尿素氮）进行了较系统的方法学评价。证明脲酶电极法与脲酶—Berthelot法及萘乙烯二胺法均呈良好相关，相关系数分别为r=0.9982和r=0.9964。测得尿素线性范围0.2—10m mol/L。重复性和回收率也获得满意结果

关键词 脲酶电极法；脲酶—Berthelot法

中图分类号 O657.15

脲酶电极法测定尿素（尿素氮）是目前世界上较为先进的方法，它的出现为尿素测定方法展示了新的方向。国外虽然有多种脲酶电极报导，但方法繁杂。国内已研制成功，用聚氯乙烯固定化脲酶膜于231型玻璃电极上[1-2]，这种脲酶电极全部用国产试剂和器材制作，测定方法灵敏、准确，操作方便。现将初步结果报告如下。

仪器和材料

1. 脲酶电极制备[2]

溶80mg pvc（上海化工厂）于1.0ml四氢呋喃（AR，宜兴县第二化学试剂厂）制成PVC胶液。然后加入脲酶(四川省校办企业公司生化试剂一厂。5μ/mg)，制成120mg/ml·PVC胶液，连续两次涂于231型玻璃电极泡（上海电光器件厂）上，室温干燥30min，即制成脲酶电极。用酸度计或电位计检测。

2. 232型甘汞电极（上海电光器件厂）

3. BNF-1型通用数字浓度分析仪（江苏宜兴县分析仪器厂）

4. 试剂

（1） PH7.7、10m mol/L组氨酸—1.0m mol/L EDTA缓冲液

（2） 10、25、50、100、200m mol/L尿素标准液（用试剂(1)配制，使pH为7.7）

（3） 脲酶—Berthelot法试剂盒（卫生部上海生物制品研究所）

原理和方法

1. 测定原理[3]

当脲酶电极浸入含有底物（尿素）的样品(pH<9.3)中时，发生如下反应：

$$\begin{matrix}H_2N\\ \\ H_2N\end{matrix}\!\!>\!C=O+2H_2O+H^+\xrightarrow{\text{脲酶}}2NH_4^++HCO_3^-$$

用玻璃电极测定[H^+]的变化 [H^+]对数值与相应的电位变化值符合Nernst方程式。根据电位值的变化，测定尿素浓度。

2. 测定方法

将脲酶电极和甘汞电极同置于1.0ml、pH7.7

维普资讯 http://www.cqvip.com

的10m mol/L组氨酸—1.0m mol/L EDTA缓冲液中，在pH—mv计上读取基线电位值。然后加入标准尿素液或血浆标本，搅拌、观察电位值变化，直到稳定电位值（五min达稳定）。根据电位值变化之差（Δmv），在校正曲线上查得相应的尿素浓度。也可按下式计算：

$$\text{尿素(m mol/L)}=\text{antilog}\left[\frac{d-c}{b-a}\cdot(\Delta mv-a)+C\right]\cdot e$$

a为校正曲线上线性范围起点mv数

b为校正曲线上线性范围终点mv数

c为校正曲线上线性范围起点尿素浓度对数值

d为校正曲线上线性范围终点尿素浓度对数值

Δmv为标本测得电位变化值

e为稀释倍数

结果和讨论

1. 校正曲线绘制

以尿素标准液浓度的对数值为横坐标，以Δmv值为纵坐标，绘制校正曲线（图1）。测得的结果见表1。

直线回归方程 $\hat{y}=46.93x-6.34$ 与文献[2]报导斜率为49.8较为接近，相关系数$r=0.9987$，$P<0.01$。尿素线性范围在0.2—10 m mol/L，与文献报导线性范围（0.24—5.0m mol/L）相比，其下限略有降低，其上限增加一倍。故二次连续涂膜法更好。Carr.P.W.[7]指出，酶膜厚度增加，线性范围增加，与本实验相符。正常人血浆尿素浓度为3—7m mol/L，因测定时血浆被缓冲液稀释11倍(1.0ml缓冲液+0.1ml标本)，故可检测的尿素浓度范围为2.2—110m mol/L（尿素氮6.16—308mg/dl），适合临床使用。

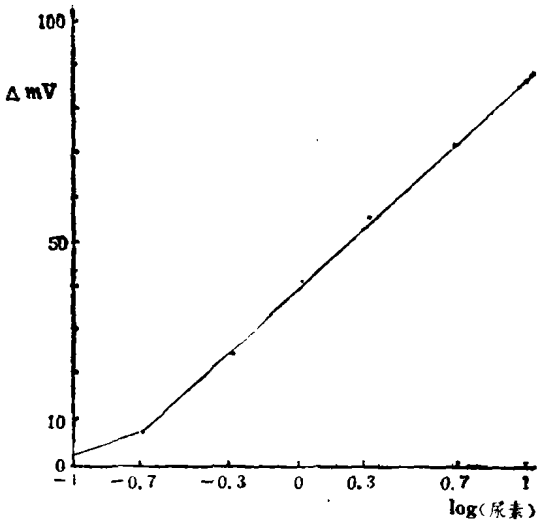


图1 脲酶电极法的尿素校正曲性

2. 重复性试验

同一份血浆标本重复测定17次，均值$\bar{x}=4.64$m mol/L，标准差SD=0.20m mol/L，CV值为4.3%，结果与文献[2]报导一致，精密度较好。

3. 回收试验

取血浆标本0.9ml，分别加入0.1ml不同浓度的尿素标准液，空白加无氨蒸馏水，依法测定含量，计算回收率，结果见表2。

高浓度时，回收率偏高，这是由于浓度高时，达到平衡电位快，五分钟后读数已嫌时间稍长，引起Δmv数值偏高。

4. 方法对比试验

取30例病人标本，用脲酶电极法与脲酶—Berthelot法[4-6]进行比较测定。测定范围在4.24—27.91m mol/L，回归方程$\hat{y}=0.95x+0.42$，相关系数$r=0.9982$，$P<0.01$，二者相关有高度显著性（见图2）。此

表1 尿素浓度与ΔmV值

尿素浓度 m mol/L	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10
尿素浓度对数值	−1	−0.7	−0.3	0	0.3	0.7	1.0
五分钟ΔmV值	2.4	7.8	24.6	41.7	57	72.3	87.1

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 回收率试验

加入尿素标准液 m mol/L数	实测尿素 m mol/L数	回收量 m mol/L	回收率 %
0	3.28		
2.5	5.66	2.38	95.2
5.0	8.20	4.92	98.4
10	13.77	10.49	104.9
20	24.65	21.37	106.8

外，还与萘乙烯二胺法进行了比较，回归方程$y=1.01x-0.43$，相关系数$r=0.9964$，$P<0.01$，二者相关也非常显著（见图3）。脂血，溶血对测定结果没有影响。故用脲酶电极法测定尿素的结果是可靠的。

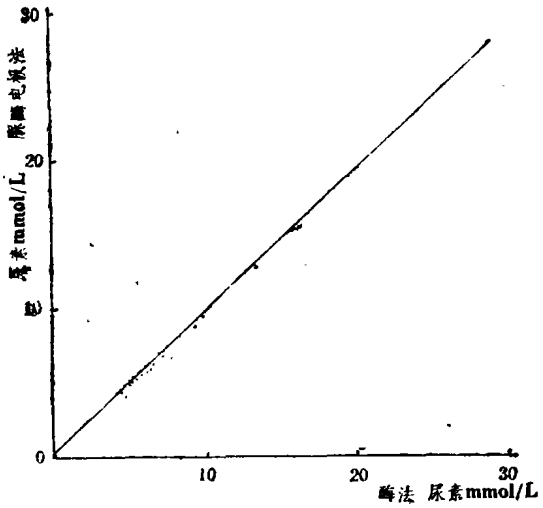


图2 脲酶电极法与酶法测定尿素回归曲线

5. 保存时间

在21天中测定131次。不用时，室温保存在pH7.7，10m mol/L组氢酸—1.0m mol/L EDTA—0.1%NaN_3缓冲液中，电极的酶活性与斜率基本保持不变（第一次测得斜率为46.93，21天后测得斜率为46.84）。

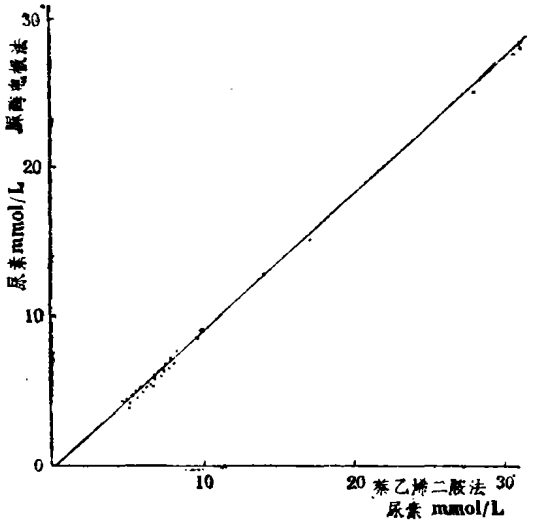


图3 脲酶电极法与萘乙烯二胺法测定尿素的回归曲线

上述结果表明；脲酶电极法的电极制作容易，操作简便，方法灵敏、准确，标本用量小，能直接测定，不需要特殊处理等许多优点。

参 考 文 献

[1] 王厚行.第三军医大学学报，1988；10(5)，400
[2] 王厚行.生物工程学报，1988；4(4)，331
[3] 王厚行.生物化学与生物物理进展，1988；15(3)，204
[4] 王厚行.临床检验，1988；6(2)：66
[5] 刘泽民.临床检验，1986；4(3)：134
[6] Berthelot M. Rep Chim Appl，1959；1：284
[7] Carr, P.W, et al. Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry, John wiley & Sons, 1980; 220

(收稿日期1990-01-11)