

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 345—2011

血清尿素测定参考方法

Reference procedure of the measurement of urea in serum

2011-09-30 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准修改采用由国际检验医学溯源联合委员会(JCTLM)批准的《CDC 人血清尿素参考方法(分光光度法)》，并参考 ISO 15193:2009《体外诊断器具 生物源样品中量的测定 参考测定程序的表述》适当增加内容。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准起草单位：卫生部临床检验中心。

本标准主要起草人：杨振华、陈宝荣、邵燕、陈琦、孙慧颖、胡滨。

血清尿素测定参考方法

1 范围

本标准规定了在临床医学应用中,测定血清尿素浓度的参考方法。

本标准主要适用于参考实验室,作为血清尿素测定的溯源,也可作为与血清尿素检验有关的仪器和试剂生产企业的溯源,可供有关认可单位及质量管理部门应用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 15193-2:2009 体外诊断器具 生物源样本中量的测定 参考方法的表述

3 术语和缩略语

3.1 术语

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

原始样本 primary sample

最初从一个系统中取出的一个或几个部分的集合物,旨在提供该系统的信息或作为对该系统做出决定的基础。

注:在某些情况下,所提供的信息可以适用于一个较大的系统或一组系统,此时取样系统是这些系统的组成部分。

3.1.2

实验室样本 laboratory sample

准备送到实验室或实验室接收的用于测定的原始样本或原始样本的分样本。

3.1.3

分析样本 analytical sample

自实验室样本制备的、可从中取出分析部分的样本。

注:在取出分析部分之前,分析样本可经过各种处理。

3.1.4

分析部分 analytical portion

从分析样本中取出的用于实际测定和观察的物质部分。

注:如果不需预处理,分析部分直接从原始样本或实验室样本中取出。某些情况下,需将分析部分溶解成分析溶液再上机测定。

3.1.5

分析溶液 analytical solution

将分析部分溶解在气体、液体或固体中而制备的溶液,溶解过程中可以有反应发生或无反应发生。

3.1.6

(某一物质系统的)基质 matrix (of a material system)

一个物质系统中除被分析物之外的所有成分。

3.1.7

参考方法 reference procedure

在校准或表征标准物质时为提高测定结果所采用的测定方法,适用于评定由同类量的其他测定方法获得的被测定量值的测定正确度。

3.1.8

测定系统的灵敏度 sensitivity of a measuring system

简称灵敏度(sensitivity)

测定系统的示值变化除以相应的被测定值变化所得的商。

注1:测定系统的灵敏度可能与被测定的量值有关。

注2:所考虑的被测定值的变化必须大于测定系统的分辨力。

3.1.9

分析特异性 analytical specificity

测定方法只测定可测定的量的能力。

3.1.10

分析干扰 analytical interference

由一个影响量引起的系统测定误差,该影响量自身在测定系统中不产生信号,但它会引起示值的增高或降低。

3.1.11

影响量 influence quantity

被测定以外的可影响测定结果的量。

3.1.12

被测量 measurand

拟测定的量。

注1:对被测定的说明要求了解量的种类,以及含有该量的现象、物体或物质状态的描述,包括有关成分及所涉及的化学实体。

注2:在VIM第二版和IEC 60050-300:2001中,被测定定义为受到测定的量。

注3:测定包括测定系统和实施测定的条件,它可能会改变研究中的现象、物体或物质,使被测定的量可能不同于定义的被测定。在这种情况下,适当的修正是必要的。

3.1.13

检出限 detection limit, limit of detection

由给定测定方法获得的测得值,其声称的物质成分不存在的误判概率为 β ,声称物质成分存在的误判概率为 α 。

注1:国际理论和应用化学联合会(IUPAC)推荐 α 和 β 的默认值为0.05。

注2:有时使用缩写词LOD。

注3:不要用术语“灵敏度”表示“检出限”。

3.1.14 **校准品 calibrator**

用于校准的测定标准。

3.2 **缩略语**

下列缩略语适用于本文件。

GLDH:L-谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase)

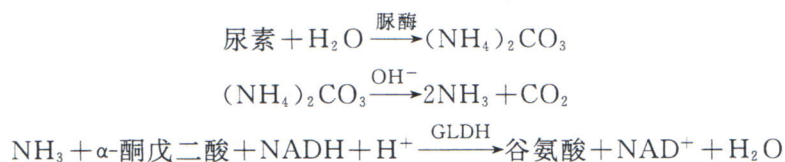
NADH:还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β -nicotinamide-adenine-dinucleotide, reduced form)

IFCC:国际临床化学与检验医学联合会(international federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

SOP:标准操作方法(Standard Operation Procedure)。

4 测定原理

尿素在脲酶催化下,水解生成氨和 CO_2 ,氨在 α -酮戊二酸和还原性辅酶 I 存在下,经谷氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸,同时,还原性辅酶 I 被氧化成氧化型辅酶 I,反应式如下:



在还原性辅酶 I 转化成氧化型辅酶 I 同时伴有 340 nm 处吸光度的下降,吸光度下降的程度与样本中尿素含量成正比,测定反应 30 min 后,339 nm 处吸光度变化即可测定样本中尿素含量。

5 测定样品

标准物质、校准品、质控品、血清。

6 测定试剂

6.1 警示与安全注意事项

6.1.1 氢氧化钡:高毒类物质,吸入及接触可引起中毒,表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻、脉缓、进行性肌麻痹、心律紊乱、血钾明显降低等。接触高温溶液可造成皮肤灼伤。称量及配制试剂时应进行有效防护,带防护眼镜、橡胶手套,穿隔离服。

6.1.2 硫酸锌:对眼睛有中度刺激性,对皮肤无刺激性,误服可引起急性胃肠炎,严重可引起休克至死亡,称量及配制试剂时应进行有效防护,带防护眼镜、橡胶手套,穿隔离服。

6.2 试剂原料

本方法使用下列试剂。

6.2.1 3,3-双(4-羟基苯基)-1(3H)-异苯并咪唑酮(酚酞, $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$),相对分子质量=318.33。

6.2.2 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),相对分子质量=287.56。

6.2.3 氢氧化钡[$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$],相对分子质量=315.46。

6.2.4 L-谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GLDH),来源于牛肝脏,要求高纯度。

6.2.5 2-氨基-2-羟基-1,3-丙二醇(Tris-HCl)($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$),相对分子质量=157.60。

6.2.6 三羟甲基氨基甲烷(Tris-Base)[$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$],相对分子质量=121.14。

6.2.7 脲酶(Urease),来源于刀豆,要求高纯度。

6.2.8 α -酮戊二酸($\text{NaOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),相对分子质量,相对分子质量=226.09。

6.2.9 还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸二钠盐(NADH)($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{Na}_2\text{O}_{14}\text{P}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$),相对分子质量=709.40。

6.2.10 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),相对分子质量=372.24。

6.2.11 5'-二磷酸腺嘌呤单钾盐(ADP)($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{KN}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),相对分子质量=501.32。

6.3 试剂性能要求

6.3.1 宜使用最高纯度的试剂。

- 6.3.2 GLDH: 试剂纯度 $\geq 70\%$, 每毫克蛋白酶含量 ≥ 20 单位。
- 6.3.3 Urease: 试剂含量每克固体酶含量为(15 000~50 000)单位。
- 6.3.4 牛血清白蛋白, 五级, 相对分子质量=68000。

6.4 试剂制备

6.4.1 试剂原料含量

试剂的原料纯度应为 100%, 如果试剂原料含量小于 100% [例如, $x(\%)$], 按公式(1)计算实际含量:

$$W_{\text{实际}} = \frac{W_{\text{理论}}}{y} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$W_{\text{实际}}$ —— 实际称量;

$W_{\text{理论}}$ —— 理论称量;

y —— 试剂原料纯度, %。

注: 每次称量过程中的扩展不确定度($k=2$) (包括物质纯度的不确定度) 应 $\leq 1.5\%$, 称量时显示的值与靶值的差异不应超过 0.5%。

6.4.2 试剂制备用水

6.4.2.1 纯水

宜使用高纯度的水(导电性 $< 2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH6~7, 硅酸盐 $< 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)制备试剂。

6.4.2.2 无 CO₂ 水

试剂水在敞口的容器中煮沸 15 min, 密闭冷却至使用前。

6.4.2.3 无氨水

试剂水在敞口的容器中煮沸 15 min, 密闭冷却至使用前。

6.4.3 血清尿素试剂

6.4.3.1 0.5% 酚酞指示剂

准确称取 0.125 g 酚酞, 放入烧杯内, 用 20 mL 95% 乙醇溶解后转移至 25 mL 容量瓶内, 用 95% 乙醇补足至刻度线。密闭玻璃瓶 2 °C~8 °C 保存。稳定 1 个月。

6.4.3.2 22 g · L⁻¹ 的 ZnSO₄ 溶液

准确称取 22 g ZnSO₄ · 7H₂O, 放入烧杯内, 用 800 mL 热的无 CO₂ 水(水温大于 50 °C)溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶内, 用无 CO₂ 水补足至刻度线。密闭玻璃瓶室温保存。稳定 1 个月。

6.4.3.3 饱和 Ba(OH)₂ 溶液

准确称取 80 g Ba(OH)₂ · 8H₂O, 放入烧杯内, 用 800 mL 热的无 CO₂ 水(水温大于 50 °C)溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶内, 用无 CO₂ 水补足至刻度线。需至少 24 h 后使用。采用带有碱石灰帽的玻璃瓶密闭室温保存, 碱石灰帽中的碱石灰每两天更换 1 次。稳定 1 个月。

6.4.3.4 0.11 mol · L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液

6.4.3.4.1 用无 CO₂ 水稀释 245 mL 饱和 Ba(OH)₂ 溶液→1 000 mL。密闭玻璃瓶室温保存, 稳定 1 d。

6.4.3.4.2 0.11 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液的检查方法:

- 用中和滴定法检查该溶液的摩尔浓度;
- 在清洁干燥的烧杯中准确加入 10 mL 的 ZnSO₄ 溶液;
- 在烧杯中加入 2 滴 0.5% 的酚酞溶液作为指示剂;
- 准确吸取 10 mL 0.11 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液进行滴定,至淡粉色为终点;
- 结果判断:如果消耗 0.11 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液在 10 mL±0.1 mL 范围内,说明配制的溶液符合要求;如果消耗 0.11 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液 >10.1 mL 或 <9.9 mL,说明 0.11 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液当量浓度过高或过低,应按公式(2)计算补偿量:

$$c_{\text{稀释}} = \frac{c_{\text{ZnSO}_4} \times V_{\text{ZnSO}_4}}{V_{\text{Ba(OH)}_2}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- c——浓度,单位为摩尔每升(mol·L⁻¹);
- V——体积,单位为毫升(mL)。

6.4.3.5 105 mmol·L⁻¹ 的 Tris-HCl

准确称取 1.654 8 g Tris-HCl,放入烧杯内,用 80 mL 无氨水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。使用电子天平、清洁干燥的烧杯、容量瓶及称量杯配制。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.6 105 mmol·L⁻¹ Tris-Base

准确称取 1.272 0 g Tris-Base,放入烧杯内,用 80 mL 试剂水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周

6.4.3.7 溶液 2(pH7.8, 105 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液)

100 mL 的 105 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 倒入烧杯内,用 105 mmol·L⁻¹ Tris-Base 调节 pH 值至 7.8。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.8 210 mmol·L⁻¹ 的 Tris-HCl

准确称取 3.309 6 g Tris-HCl,放入烧杯内,用 80 mL 无氨水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。密闭试剂瓶 28℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.9 210 mmol·L⁻¹ Tris-Base

准确称取 3.309 6 g Tris-Base,放入烧杯内,用 80 mL 无氨水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.10 pH7.8, 210 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液

100 mL 的 105 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 倒入烧杯内,用 105 mmol·L⁻¹ Tris-Base 调节 pH 值至 7.8。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.11 溶液 1

准确称取 1.068 2 g α-酮戊二酸和 1.172 5 g EDTA,放入烧杯内,用 200 mL 溶液 2(105 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液)溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-HCl 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.12 溶液3

准确称取 0.789 6 g ADP,放入烧杯内,用 200 mL 105 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-HCl 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.13 溶液4

准确称取 0.178 8 g NADH,放入烧杯内,用 200 mL 105 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-HCl 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.14 0.2%牛血清白蛋白溶液

准确称取 0.5 g 牛血清白蛋白,放入烧杯内,用 200 mL 无氨水溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

6.4.3.15 756 000 U · L⁻¹ GLDH 溶液

采用称量法依据 L-谷氨酸脱氢酶测定的含量获得总活性为 37 800 U L-谷氨酸脱氢酶,放入烧杯内,用 40 mL 0.2%牛血清白蛋白溶液溶解后转移至 50 mL 容量瓶内,用 0.2%牛血清白蛋白溶液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 1 周。

6.4.3.16 100 800 U · L⁻¹ Urease 溶液

采用称量法依据脲酶测定的含量获得总活性为 37 800 U 脲酶,放入烧杯内,用 40 mL 0.2%牛血清白蛋白溶液溶解后转移至 50 mL 容量瓶内,用 0.2%牛血清白蛋白溶液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 1 周。

6.4.3.17 空白试剂

按以下步骤配制:

——准确移取等量的 756 000 U · L⁻¹ GLDH 溶液及 pH 7.8,210 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液,进行混合备用;

——准确移取 10 mL 溶液1 10 mL 溶液2 5 mL 溶液4 2.5 mL 混合后的 GLDH 溶液及 2.5 mL pH7.8,105 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液,并进行混合制备为空白试剂。

6.4.3.18 反应试剂

按以下步骤配制:

——准确移取等量的 756 000 U · L⁻¹ GLDH 溶液及 pH7.8,210 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液,进行混合备用;

——准确移取等量的 100 800 U · L⁻¹ Urease 溶液及 pH7.8,210 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液,进行混合备用;

——准确移取 10 mL 溶液1 10 mL 溶液2 5 mL 溶液4 2.5 mL 混合后的 GLDH 溶液及 2.5 mL 混合后的 Urease 溶液,并进行混合制备为反应试剂。

6.5 标准液的制备

6.5.1 尿素标准原液(100 mmol · L⁻¹)的配制

准确称取 0.600 6 g SRM 912a 标准物质,放入清洁干燥经过灭菌处理的烧杯内,加入 80 mL 无氨

水进行溶解,溶解后转移至 100 mL A 级容量瓶中,用无氨水多次冲洗烧杯,将烧杯内的尿素溶液全部转移至容量瓶,用无氨水补足,密闭颠倒混匀至少 10 次,每一次颠倒后旋转倒置容量瓶 10 s。配制完成后进行分装,每 15 mL 一份,放入带有螺旋盖的硼硅酸盐的瓶中,盖紧并标记,注明日期,保存在 4 °C 或 -20 °C。如无污染,标准原液可以长期稳定。建议每 6 个月重新配制。

注 1: SRM 912a 的称量误差应控制在 ± 0.0002 g 以内。

注 2: 尿素标准原液($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的配制也可采用其他国际或国家标准物质。

6.5.2 工作标准液的配制

将尿素标准原液和无氨水在室温平衡 30 min,按表 1 配制工作标准液。

表 1 工作标准液配制方法

原液 mL	无氨水 mL	用无氨水稀释的最终体积 mL	最终尿素浓度 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
0	10.00	10	0
0.50	9.50	10	5.00
1.00	9.00	10	10.00
1.25	8.75	10	12.50
1.50	8.50	10	15.00
1.75	8.25	10	17.50
2.00	8.00	10	20.00
3.00	7.00	10	30.00

配制好的工作标准液应贮存于聚乙烯螺旋帽瓶中,4 °C 稳定期不超过 1 个月。

注: 工作标准液贮存瓶必须清洁干燥且经过无菌化处理。

7 测定条件

7.1 仪器

7.1.1 紫外可见分光光度计

7.1.1.1 环境条件

温度: 5 °C ~ 35 °C, 湿度: 45% ~ 85%, 避光, 不能直接放在风口, 防震, 外围禁放热源, 放置场所周围不能有大容量变压器等强磁场, 周围环境宜清洁无尘, 电压稳定, 避免共用电源设备的频繁开关。应有接地线, 接地电阻大于 100 Ω , 仪器两侧各应有大于 20 cm 空间。

7.1.1.2 数据测定范围

ABS - 3.000 ~ 3.000 或 0.0%T ~ 200.0%T。

7.1.1.3 测定模式

ABS; T(%); Conc。

7.1.1.4 技术指标

应符合下列要求：

- 波长：190 nm~1 100 nm；
- 波长准确度： ± 0.2 nm；
- 波长重现性： ± 0.1 nm；
- 吸光度准确性： $\pm (0.002\sim 0.004)$ ；
- 吸光度重现性： $\pm (0.001\sim 0.002)$ ；
- 噪声： $\leq 0.000 2$ Abs；
- 基线稳定性： $\leq 0.000 3$ Abs/h；
- 基线平稳度： ± 0.001 A；
- 光谱带宽： ≤ 1.5 nm；
- 光学精度： ± 0.005 A；
- 杂散光： $\leq 0.05\%$ T。

7.1.1.5 校准情况

每年至少进行一次校准；大型实验前应进行校准。

7.1.2 点式温度计

7.1.2.1 环境条件

温度 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $< 90\%$ 。

7.1.2.2 数据测定范围

$0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.1.2.3 测定模式

摄氏度($^{\circ}\text{C}$)。

7.1.2.4 技术指标

应符合下列要求：

- 分辨率： $0.001\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- 准确度： $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- 重复性： $\pm 0.005\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- 解析度： $\pm 0.000 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.1.2.5 校准情况

每年至少进行一次校准；大型实验前应进行校准。

7.1.3 pH计

7.1.3.1 环境条件

温度 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $5\%\sim 85\%$ 。

7.1.3.2 基本性能特征

应符合下列要求：

- pH 范围：-1.000~14.000；
- pH 分辨率：0.002/0.01；
- 准确度：±0.002；
- 斜率：80%~120%；
- 温度范围：-5℃~105℃；
- 温度分辨率：±0.3℃。

7.1.3.3 校准情况

7.1.3.3.1 pH 标准缓冲液的选择与使用

应符合以下要求：

- 应使用至少两种标准缓冲液进行校准，标准缓冲液应包含 pH6~pH8 的范围，即应包含需调整的测定试剂的 pH 值；
- pH 标准缓冲液的不确定度应≤0.01 pH；
- 所用标准缓冲液应能溯源至国际或国家参考物质。

7.1.3.3.2 pH 计校准

按标准物质证书制备 pH 标准缓冲液：将 pH 标准溶液温度调整至 25℃，按 pH 计使用说明书进行校准。

7.1.4 电子分析天平

7.1.4.1 环境条件

温度 5℃~35℃，湿度 45%~85%。

7.1.4.2 技术指标

应符合下列要求：

- 准确度级别：特种准确度级；
- 最大允许误差：±0.000 5 g。

7.1.4.3 校准情况

每年一次进行校准；必要时可增加校准。

7.1.5 电子天平

7.1.5.1 环境条件

温度 5℃~35℃，湿度 45%~85%。

7.1.5.2 技术指标

应符合下列要求：

- 准确度级别：高准确度级；

——最大允许误差： ± 0.05 g。

7.1.5.3 校准情况

每年至少进行一次校准；大型实验前应进行校准。

7.1.6 加样器

7.1.6.1 技术指标

应符合下列要求：

——容量允许误差：JJG 646—2006 计量性能标准；

——测定重复性：JJG 646—2006 计量性能标准。

7.1.6.2 校准情况

每三个月进行一次校准；实验前应进行校准。

7.1.7 容量瓶

7.1.7.1 技术指标

应符合下列要求：

——材质、外观、结构、密合性：JJG 196—2006 通用技术标准；

——容量允许误差：JJG 196—2006 计量性能标准。

7.1.7.2 校准情况

实验前进行校准。

7.2 最终反应混合液的浓度

7.2.1 血清尿素最终完全反应混合液(空白液)的浓度

见表 2。

表 2 血清尿素最终完全反应混合液(空白液)的浓度

参 数	指 标
Tris	$100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
pH(30 °C)	7.8 ± 0.05^a
GLDH	$30\,000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($500 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)
α -酮戊二酸	$6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
EDTA	$4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
ADP	$2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
NADH	$0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
样品与反应混合物体积比	0.05(1 : 20)
^a 扩展不确定度($k=2$)。	

7.2.2 血清尿素最终完全反应混合液(反应液)的浓度

见表 3。

表 3 血清尿素最终完全反应混合液(反应液)的浓度

参 数	指 标
Tris	100 mmol · L ⁻¹
pH(30 °C)	7.8 ± 0.05 ^a
GLDH	30 000 U · L ⁻¹ (500 μkat · L ⁻¹)
α-酮戊二酸	6 mmol · L ⁻¹
EDTA	4 mmol · L ⁻¹
ADP	2 mmol · L ⁻¹
NADH	0.2 mmol · L ⁻¹
Urease	4 000 U · L ⁻¹ (66 μkat · L ⁻¹)
样品与反应混合物体积比	0.05(1 : 20)
^a 扩展不确定度(k=2)。	

7.3 血清尿素测定条件

见表 4。

表 4 血清尿素测定条件

参 数	指 标
温度	30.0 °C ± 1 °C ^a
波长	339 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	30 min
测定时间	孵育后立即测定
^a 扩展不确定度(k=2)。	

7.4 校准的扩展不确定度

如果校准的扩展不确定度等于或小于原参考测定程序中规定的该参数允许范围,且校准的不确定度范围重叠于规定的允许区间,则温度、pH、光径和波长的参数遵从规定允许范围。

8 测定

8.1 无蛋白滤液的制备

按表 5 所列顺序和量,将试剂和工作标准液/样品加入离心管中。

表 5 无蛋白滤液的制备步骤

Ba(OH) ₂ (0.11 mol·L ⁻¹)	5.0 mL
工作标准液/样品	0.5 mL
充分混匀 5 s~10 s,立即加入 ZnSO ₄	
ZnSO ₄	5.0 mL
剧烈振荡 10 s,充分混匀,立即按 1 000g·min ⁻¹ 离心 10 min,离心后上清液即为工作标准液/样品的无蛋白滤液。	

8.2 试剂准备

测定前,将足量的空白试剂、反应试剂和样本(无蛋白滤液)在 30 ℃下平衡 20 min。其余空白试剂和反应试剂应贮存于 2 ℃~8 ℃。

8.3 标准曲线制作

8.3.1 工作标准液滤液吸光度的测定

按表 6 所列顺序和量,将工作标准液无蛋白滤液和试剂进行混合孵育后加入比色杯。

表 6 工作标准液吸光度测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
空白试剂	5.0 mL	0 mL
反应试剂	0 mL	5.0 mL
工作标准液无蛋白滤液	0.25 mL	0.25 mL
轻轻颠倒混匀,孵育 30 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀,将各管液体依次倒入比色杯内约 3 mL,340 nm 处测定吸光度。		

8.3.2 制备标准曲线

工作标准液的吸光度值经过空白校正后,得到实际吸光度值。将实际吸光度值按最小二乘法计算,制作标准曲线。比较每个浓度标准的实际测定浓度与它的理论浓度差值,按下列标准进行判断:

——工作标准液浓度在 0 mmol·L⁻¹~17.5 mmol·L⁻¹范围内,则|实际测定浓度-理论浓度|应 ≤0.5 mmol·L⁻¹;

——工作标准液浓度 >17.5 mmol·L⁻¹,则|实际测定浓度-理论浓度|应 ≤1.0 mmol·L⁻¹;

——8 个浓度 16 个工作标准液实际浓度与理论浓度之差最多有 3 个不在范围内。

如果超出以上要求,则标准曲线无效,需重新制备。

8.4 测定方法

按表 7 所列顺序和量,将试剂和样品进行混合孵育后加入比色杯。

表 7 血清尿素测定步骤

试剂/样品	反 应 管	空 白 管
空白试剂	5.0 mL	0 mL
反应试剂	0 mL	5.0 mL
样品无蛋白滤液	0.25 mL	0.25 mL
轻轻颠倒混匀,孵育 30 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀,将各管液体依次倒入比色杯内约 3 mL,340 nm 处测定吸光度。		
注: 应使用符合测定性能的分光光度计和高准确度容量设备,分光光度测定的不确定度和样品体积的不确定度宜用已知标准不确定度的测定程序确定;分光光度测定的吸光度扩展不确定度($k=2$)不应超过 1%;样品体积部分的扩展不确定度($k=2$)应该 $\leq 1\%$ 。		

8.5 测定范围

血清尿素测定参考方法的线性为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

8.6 误差的来源

8.6.1 测定过程中器材和去离子水等如果受到氨离子的污染,干扰血清尿素的测定,引起结果假性偏高。

8.6.2 高浓度氟化物会抑制尿素酶,引起血清尿素测定结果假性偏低。

8.6.3 溶血(血红蛋白含量 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、黄疸(胆红素含量 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)干扰本法测定,结果影响大于 2%。

8.7 测定样品要求

8.7.1 校准品、质控品、标准物质应严格按照运输条件和贮存条件运输和保存。

8.7.2 静脉采血应空腹 10 h~14 h,采血 3 mL,室温 2 h 内离心分离血清,离心速度 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心时间 10 min。

9 结果计算

9.1 计算实际吸光度值

每份样本的测定包括样本吸光度值和空白吸光度值,经过空白校正的吸光度值为实际吸光度值,按实际吸光度值=测定吸光度值-空白吸光度值。

9.2 标准曲线的制作

用最小二乘法获得标准曲线斜率 b 和截距 a ,每个单独的吸光度作为非独立变异因素给出,浓度作为独立因素使用,16 个吸光度值和 16 个浓度用于 8 组数据分析。

设定倍增系数(F)= $1/b$;校正因数(C)= a/b

16 个标准液的每一个实际测定浓度按公式(3)计算:

$$C_{\text{标准液}} = A_{\text{标准液}} \times F - C \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- $c_{\text{标准液}}$ —— 标准液实际测定浓度,单位为毫克每分升($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$);
- $A_{\text{标准液}}$ —— 标准液实际吸光度值;
- F —— 倍增系数,等于 $1/b$;
- C —— 校正因数,等于 a/b 。

9.3 样品测定结果的计算

标准曲线符合通过标准后,按公式(4)计算样品浓度:

$$c_{\text{样品}} = A_{\text{样品}} \times F - C \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中：

- $c_{\text{样品}}$ —— 样品测定结果,单位为毫摩尔($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $A_{\text{样品}}$ —— 样品实际吸光度值;
- F —— 倍增系数,等于 $1/b$;
- C —— 校正因数,等于 a/b 。

9.4 单位换算

以 $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 单位表示的血清尿素浓度可通过乘以系数($f=0.167$)转化成 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

附录 A

(规范性附录)

L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度测定

A.1 测定试剂

A.1.1 补充试剂原料

氯化铵(NH_4Cl),相对分子质量=53.49。

A.1.2 试剂制备

A.1.2.1 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl

准确称取 1.970 g Tris-HCl,放入烧杯内,用 80 mL 无氨水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。稳定 2 周。

A.1.2.2 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Base

准确称取 1.5143 g Tris-Base,放入烧杯内,用 80 mL 试剂水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。稳定 2 周。

A.1.2.3 pH7.8, $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液

100 mL 的 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 倒入烧杯内,用 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Base 调节 pH 值至 7.8。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。稳定 2 周。

A.1.2.4 溶液 A

准确称取 0.0848 g α -酮戊二酸、0.0089 g NADH、0.0931 g EDTA、0.0627 g ADP 分别用 5 mL pH 7.8、 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液溶解后转移至 50 mL 容量瓶中,用 Tris-HCl 缓冲液充分冲洗烧杯,使溶解成分全部转移至容量瓶中,用 Tris-HCl 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存,稳定 2 d。

A.1.2.5 反应试剂

准确称取 0.3343 g NH_4Cl ,用溶液 A 充分溶解后转移至 25 mL 容量瓶中,用溶液 A 充分冲洗烧杯,使溶解成分全部转移至容量瓶中,用溶液 A 补足至刻度线。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存,稳定 2 d。

A.1.2.6 $31500 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ GLDH 溶液

采用称量法依据 L-谷氨酸脱氢酶厂家声明的含量获得总活性为 63U L-谷氨酸脱氢酶,放入烧杯内,用 2 mL 0.2% 牛血清白蛋白溶液完全溶解。密闭试剂瓶 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。稳定 1 d。

A.1.2.7 L-谷氨酸脱氢酶的稀释(使用前进行)示例

A.1.2.7.1 在 2.8 mL 0.2% 牛血清白蛋白溶液中加入 0.1 mL L-谷氨酸脱氢酶原液,充分混匀。第一步的稀释比例是 1:28。

A.1.2.7.2 将步骤 A.1.2.7.1 中的 0.1 mL 最终溶液加入到 2.8 mL $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 0.2% 牛血清白

蛋白溶液中,充分混匀。第二步的稀释比例是 1 : 28。第一步和第二步总稀释比例是 1 : 841。

A.2 测定条件

A.2.1 最终反应混合液的浓度

见表 A.1。

表 A.1 L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度测定最终反应混合液的浓度

参 数	指 标
Tris	100 mmol · L ⁻¹
pH(30 °C)	7.8±0.05 ^a
α-酮戊二酸	6 mmol · L ⁻¹
EDTA	4 mmol · L ⁻¹
ADP	2 mmol · L ⁻¹
NADH	0.2 mmol · L ⁻¹
NH ₄ Cl	200 mmol · L ⁻¹
样品与反应混合物体积比	0.20(1 : 5)
^a 扩展不确定度(k=2)。	

A.2.2 L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度测定条件

见表 A.2。

表 A.2 L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	30.0 °C ± 0.1 °C ^a
波长	339 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	90 s
测定时间	连续监测孵育后 120 s
^a 扩展不确定度(k=2)。	

A.3 测定

A.3.1 试剂准备

将 5 mL 反应试剂、0.6 mL L-谷氨酸脱氢酶稀释液和 0.6 mL 生理盐水放在 30 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中大约 10 min,使液体达到预定温度。

A.3.2 测定方法

按表 A.3 的顺序和量,将试剂和样品加入比色杯。

表 A.3 L-谷氨酸脱氢酶稀释液催化活性浓度测定步骤

反应液	2.000 mL
平衡到 30 °C	
步骤 A.1.2.7.2 L-谷氨酸脱氢酶溶液	0.500 mL
充分混匀,孵育 90 s。再连续监测 120 s 的吸光度。	

A.3.3 试剂空白

采用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氯化钠溶液代替 L-谷氨酸脱氢酶溶液测定试剂空白,按上述步骤进行操作。

A.4 结果计算

通过回归分析(最小二乘法)计算吸光度随时间的改变 [$\text{s}^{-1} (\text{min}^{-1})$]。减去试剂空白率后,即 GLDH 储存液稀释液的吸光度变化率。按公式(A.1)计算储存酶溶液中 GLDH 催化活性浓度:

$$GLDH_{\text{stock}} = F \times F_{\text{dilution}} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{GLDH}} \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

注:此公式仅适用于按上述方法稀释与测定 L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度。

式中:

$GLDH_{\text{stock}}$ ——酶原液中 L-谷氨酸脱氢酶催化活性浓度,单位为微凯塔尔每升 ($\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$) 或单位每升 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$);

注:单位 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1 000 可得 $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 单位 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1 000 可得 $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

F ——系数,等于 794(在 339 nm 波长测定, $\epsilon_{339}(\text{NADH}) = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 为 IFCC 与 IRMM 推荐);

F_{dilution} ——GLDH 储存液的稀释因子, A.1.2.7 中为 841;

$(\Delta A / \Delta t)_{\text{GLDH}}$ ——测定样品的实际吸光度变化率,单位为每秒 (s^{-1}) 或每分 (min^{-1})。

附 录 B
(规范性附录)
脲酶催化活性浓度测定

B.1 测定试剂

B.1.1 试剂制备

B.1.1.1 125 mmol · L⁻¹的 Tris-HCl

准确称取 1.970 g Tris-HCl,放入烧杯内,用 80 mL 无氨水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用无氨水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

B.1.1.2 125 mmol · L⁻¹ Tris-Base

准确称取 1.514 3 g Tris-Base,放入烧杯内,用 80 mL 试剂水溶解后转移至 100 mL 容量瓶内,用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

B.1.1.3 pH7.8,125 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液

100 mL 的 125 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 倒入烧杯内,用 125 mmol · L⁻¹ Tris-Base 调节 pH 值至 7.8。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 2 周。

B.1.1.4 溶液 B

准确称取 0.084 8 g α-酮戊二酸、0.008 9 g NADH、0.093 1 g EDTA、0.062 7 g ADP、0.375 3 g Urea 分别用 5 mL pH 7.8、125 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液溶解后转移至 50 mL 容量瓶中,用 Tris-HCl 缓冲液充分冲洗烧杯,使溶解成分全部转移至容量瓶中,用 Tris-HCl 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存,稳定 2 d。

B.1.1.5 反应试剂

采用称量法依据 L-谷氨酸脱氢酶厂家测定的含量获得总活性为 937 U L-谷氨酸脱氢酶,用溶液 B 充分溶解后转移至 25 mL 容量瓶中,用溶液 B 充分冲洗烧杯,使溶解成分全部转移至容量瓶中,用溶液 B 补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存,稳定 2 d。

B.1.1.6 4 200 U · L⁻¹脲酶溶液

采用称量法依据脲酶厂家声明的含量获得总活性为 8.4 U 脲酶,放入烧杯内,用 2 mL 0.2%牛血清白蛋白溶液完全溶解。密闭试剂瓶 2℃~8℃保存。稳定 1 d。

B.1.1.7 脲酶原液的稀释(使用前进行)示例

B.1.1.7.1 在 1.3 mL 0.2%牛血清白蛋白溶液中加入 0.1 mL 脲酶原液,充分混匀。第一步的稀释比例是 1:14。

B.1.1.7.2 将步骤 B.1.1.7.1 中的 0.1 mL 最终溶液加入到 1.3 mL 0.2%牛血清白蛋白溶液中,充分混匀。第二步的稀释比例是 1:14。第一步和第二步总稀释比例是 1:196。

B.2 测定条件

B.2.1 最终反应混合液的浓度见表 B.1。

表 B.1 脲酶催化活性浓度测定最终反应混合液的浓度

参 数	指 标
Tris	100 mmol · L ⁻¹
pH(30 ℃)	7.8±0.05 ^a
α-酮戊二酸	6 mmol · L ⁻¹
EDTA	4 mmol · L ⁻¹
ADP	2 mmol · L ⁻¹
NADH	0.2 mmol · L ⁻¹
GLDH	30 000U · L ⁻¹
Urea	100 mmol · L ⁻¹
样品与反应混合物体积比	0.20(1 : 5)
^a 扩展不确定度($k=2$)。	

B.2.2 脲酶催化活性浓度测定条件见表 B.2。

表 B.2 脲酶催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	30.0 ℃ ± 0.1 ℃ ^a
波长	339 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	90 s
测定时间	连续监测孵育后 120 s
^a 扩展不确定度($k=2$)。	

B.3 测定

B.3.1 试剂准备

将 5 mL 反应试剂、0.6 mL 脲酶稀释液和 0.6 mL 生理盐水放在 30 ℃ ± 0.2 ℃ 的水浴箱中大约 10 min,使液体达到预定温度。

B.3.2 测定方法

按表 B.3 的顺序和量,将试剂和样品加入比色杯。

表 B.3 脲酶稀释液催化活性浓度测定步骤

反应液	2.000 mL
平衡到 30 °C	
步骤 B.1.1.7.2 脲酶溶液	0.500 mL
充分混匀, 孵育 90 s。再连续监测 120 s 的吸光度。	

B.3.3 试剂空白

采用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氯化钠溶液代替脲酶溶液测定试剂空白, 按上述步骤进行操作。

B.4 结果计算

通过回归分析(最小二乘法)计算吸光度随时间的改变 [$\text{s}^{-1} (\text{min}^{-1})$]。减去试剂空白率后, 即 GLDH 储存液稀释液的吸光度变化率。按公式(B.1)计算储存酶溶液中脲酶催化活性浓度:

$$U_{\text{stock}} = F \times F_{\text{dilution}} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{U}} \quad \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

注: 此公式仅适用于按上述方法稀释与测定脲酶催化活性浓度。

式中:

U_{stock} —— 酶原液中脲酶催化活性浓度, 单位为微凯塔尔每升 ($\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$) 或单位每升 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$);

注: 单位 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1000 可得 $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 单位 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1000 可得 $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

F —— 系数, 等于 794 (在 339 nm 波长测定, $\epsilon_{339} (\text{NADH}) = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 为 IFCC 与 IRMM 推荐);

F_{dilution} —— 脲酶储存液的稀释因子, B.1.1.7.2 中为 196;

$(\Delta A / \Delta t)_{\text{U}}$ —— 测定样品的实际吸光度变化率, 单位为每秒 (s^{-1}) 或每分 (min^{-1})。