

文章编号 1006-8147(2022)04-0436-06

论 著

# 尿游离皮质醇萃取方法的改良及其检测相关影响因素的分析

吴祝圆<sup>1</sup>, 黄毅文<sup>1</sup>, 贾子超<sup>1</sup>, 胡志东<sup>1</sup>, 罗微<sup>1,2</sup>

(1.天津医科大学总医院检验科, 天津 300052, 2.天津医科大学医学技术学院, 天津 300023)

**摘要** 目的:改良24 h尿游离皮质醇(urinary free cortisol, UFC)的萃取方法,分析标本留置时间、蛋白尿及潜血尿对结果的影响。方法:取2019年12月—2020年12月天津医科大学总医院检验科的23例不同结果的24 h UFC标本,其中8例低值、8例中值、7例高值。采用二甲氯烷萃取—化学发光法检测UFC。在萃取步骤中用恒速回旋振荡(改良法)替代触碰式涡旋振荡(原方法);改良后设置不同标本留置时间,配制蛋白及潜血尿,检测UFC,分析这些干扰因素对检测的影响。结果:改良法与原方法对比,效率更高且萃取成功率提升至100%,两种方法检测结果无差异( $P>0.05$ )且相关系数 $R^2=0.998\ 9$ ,改良法能提升检测精密度[变异系数(CV) $<25\%$ ]与准确度( $>80\%$ );与液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)相比差异无统计学意义( $P>0.05$ ),相关系数 $R^2=0.992\ 2$ 。尿标本不同留置时间对结果影响差异无统计学意义( $P>0.05$ ),尿蛋白及潜血干扰实验的平均回收率分别为95.85%及89.85%,但尿血红蛋白(Hb)达4 mg/L时会导致UFC检测误差大于该项目的实验允许总误差(TEA, 25%)。结论:恒速回旋振荡萃取可替代触碰式涡旋振荡萃取法,可提高工作效率且不影响检测结果。标本留置时间、蛋白尿对检测结果影响不大,但尿潜血会使检测值偏低。

**关键词** 尿游离皮质醇;萃取;改良;二氯甲烷;影响因素

中图分类号 R331.1

文献标志码 A

## Improvement of extraction method and analysis of the interferences in the detection of urinary free cortisol

WU Zhu-yuan<sup>1</sup>, HUANG Yi-wen<sup>1</sup>, JIA Zi-chao<sup>1</sup>, HU Zhi-dong<sup>1</sup>, LUO Wei<sup>1,2</sup>

(1.Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2.School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300023, China)

**Abstract Objective:** To improve the extraction method and analyze the interferences such as the sample retention time, urine protein, occult blood and urine output in the detection of 24 h urinary free cortisol (UFC). **Methods:** A total of 23 24-hour UFC samples with different results from the Department of Clinical Laboratory of the General Hospital of Tianjin Medical University were collected. Samples with low ( $n=8$ ), medium ( $n=8$ ) and high ( $n=7$ ) UFC concentration in original method were selected, and redetected by modified dichloromethane extraction method with chemiluminescence immunoassay. At the same time, vortex oscillator with contact type in original extraction method was changed into shaker oscillator with a constant-speed cyclotron oscillating (improved method). After changing to the improved method, UFC with different interferences such as storage time, urine protein, occult blood and urine output were detected after artificial setting. **Results:** Compared with the original method, the improved constant speed extraction method improved the extraction success rate, and there was no statistical difference in the detection results ( $P>0.05$ ) and the correlation coefficient  $R^2$  was about 0.998 9. The improved method could improve detection precision (coefficient of variation  $<25\%$ ) and accuracy ( $>80\%$ ). Compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), there was also no difference ( $P>0.05$ ) and the correlation coefficient  $R^2$  was about 0.992 2. Different retention time of urine specimens had no effect on the results ( $P>0.05$ ). The average recovery of urine protein and urine occult blood interference experiments were 95.85%, 89.85%, respectively. But when urine hemoglobin (Hb) reached 4 mg/L, the error would be greater than the total error allowable (TEA, 25%) of UFC detection. **Conclusion:** The improved shaker constant speed oscillation extraction method can replace the original touch vortex oscillation method and does not affect the detection results. Urine specimen retention time and proteinuria have little effect on the test results, but occult blood urine will decrease the values.

**Key words** urinary free cortisol; extraction; improvement; dichloromethane; influencing factors

皮质醇检测是评估肾上腺功能的重要指标。血

液中的皮质类固醇会与类固醇结合蛋白结合,仅有10%为游离状态且能发挥生物学功能。尿皮质醇是血游离的皮质醇经肾小球过滤而来,其含量与血液中发挥生理功能的游离皮质醇浓度及其变化呈正相关。24 h尿游离皮质醇(urinary free cortisol, UFC)

基金项目 国家自然科学基金(81701968)

作者简介 吴祝圆(1990-),女,硕士在读,研究方向:内分泌免疫诊断;通信作者:胡志东, E-mail: huzhidong27@163.com; 罗微, E-mail: weiluo1028@tmu.edu.cn。

测定相对不受昼夜节律变化影响,更能精准反映肾上腺皮质功能,也是诊断库欣综合征的可靠指标<sup>[1]</sup>。虽然 UFC 检测最先进检测技术是液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[2]</sup>,但该方法因设备耗材成本高检测通量低,尚未广泛使用及验证<sup>[3]</sup>。虽然新观点认为二甲氯烷萃取-化学发光法检测尿皮质醇受萃取、复溶等步骤干扰,应逐渐用 LC-MS/MS 替代;但仍有很多实验室还以二甲氯烷萃取-化学发光分析法为主,关键是它仍然保持成本低、通量高、重复性好等诸多优点<sup>[4]</sup>。

化学发光法(CLIA)检测 UFC 需要提前对尿标本进行萃取,这一过程暂未实现自动化,萃取过程难免受诸多影响因素干扰,对结果造成一定影响,目前临床也尚无公认的理想萃取方法。本实验室自该项目开展以来,一直采用较为传统的二甲氯烷液相萃取-化学发光检测法<sup>[5]</sup>。其萃取步骤大致为:(1)取 24 h 尿 0.5 mL 加二甲氯烷 1 mL 于干净的玻璃管中。(2)涡旋振荡仪上振荡 5 min,离心 5 min (3 000 r/min)。(3)取下层 400  $\mu$ L 于玻璃空管中水浴锅内挥发蒸干。(4)加 200  $\mu$ L 生理盐水复溶样本后 CLIA 检测。

原方案中涡旋振荡仪仅适合 10 个以内检测/次,常因受力不均容易使得混合物呈晶状体致萃取过程本该出现的液面分层消失,导致一定概率的萃取失败。为适应日益增长的标本量及标准化需求,本研究将对方案进行改良。同时本研究也将探讨目前尚未见报道的尿标本留置时间、蛋白尿、潜血尿这三大因素是否对 UFC 的萃取及检测存在干扰,以期临床检验提供更多科学参考。

## 1 材料与方法

1.1 样本及分组 取 2019 年 12 月—2020 年 12 月天津医科大学总医院检验科的 23 例不同结果的 24 h UFC 标本,其中 8 例低值、8 例中值、7 例高值。低中高值的分组标准为:参照本实验室的 UFC 检测参考范围是 30~110  $\mu$ g/24 h (尿皮质醇浓度乘以 24 h 尿量)。0~50  $\mu$ g/24 h 纳入低值组、50~110  $\mu$ g/24 h 纳入中值组,> 220  $\mu$ g/24 h 纳入高值组。取其中低、中、高各 5 例用于改良萃取法与传统方法检测结果的比较。再取低、中、高各 1 例用于精密度评估。另取低、中、高各 1 例用于分析不同标本保存时间对结果的影响。1 例低值标本作为基质掺入皮质醇(Cor)质控品用于准确度验证实验。最后 1 例中值标本作为基质用于尿蛋白及尿潜血干扰实验。因实际临床工作中同一标本的量无法满足不同实验的

多次要求,因而不同实验选择了不同标本。

1.2 试剂与仪器 分析纯二甲氯烷(天津市化学试剂三厂)、皮质醇测定试剂盒(化学发光)(英国西门子医学诊断产品有限公司)、漩涡混合器 XW-80A (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、HY-5A 回旋式振荡器(江苏金坛市环宇科学仪器厂)、全自动化学发光免疫分析仪 IMMULITE 2000(德国西门子有限公司)、日立 7180 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司)、全自动血细胞分析仪(希森美康 XN-2000+PA-990)。液相色谱-串联质谱仪 AB SCIEX Triple Quad™4500MD(美国 SCIEX 公司)。

1.3 原理与方法 UFC 的检测采用化学发光法,西门子公司 IMMULITE 2000 全自动免疫化学发光自动分析仪的原理是患者尿标本中的皮质醇与发光剂吖啶酯标记的皮质醇竞争结合固相上的多克隆兔抗皮质醇抗体,它以共价形式连接至磁颗粒上,皮质醇含量与仪器测得相对光单位量之间成反比关系。其试剂详情可见说明书。为保证检测性能最佳,按照 IMMULITE 2000 操作手册进行日常维护、检验前的准备、设置、质控等。尿皮质醇的提取采用二甲氯烷萃取法,详情如上文所述。改良之处为上文所述的步骤(2)替换成 HY-5A 回旋式振荡器并设定转速为 250 r/min,振荡时间 5 min。在改良的基础上进一步探讨标本留置时间、蛋白尿、潜血尿的 UFC 萃取及检测的干扰。在标本留置时间的实验中,自初次检测后,连续间隔 24 h 再作检测,标本储存条件为 4℃冷藏,不添加防腐剂。在尿蛋白及潜血干扰实验中,选取 1 份尿蛋白及反复冻融后的血常规上清标本与 1 例已知 UFC 值的样本配制成不同浓度的尿蛋白样本及尿潜血样本,上机检测 Cor 值,计算实测值与理论值的偏差。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析,正态分布计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料采用%表示,两样本均数间采用 Student's *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患者资料 本研究按随机原则取低、中、高值的 UFC 检测标本 23 例,其中男性 10 例、年龄均数为  $(44.60 \pm 14.27)$  岁;女性 13 例、年龄均数为  $(50.77 \pm 18.99)$  岁,具体信息、分组情况及 24 h 尿量见表 1。

2.2 改良萃取法与原方法的萃取后分层效果比较 改良法(恒速回旋振荡)的萃取分层与原方法(涡旋振荡后)的分层效果对比如图 1 所示,A 管为改良法,B 管为原萃取法中常出现的混合物结晶不

分层现象(其发生概率据本实验室工作的统计不低于 10%)。二氯甲烷所萃取的 Cor(正常如图 1 中 A 管底部,非正常如 B 管底部)若出现晶状体将出现无法自然挥发现象,即使在 65℃水浴锅中也无法挥发。C 管为原萃取法成功案例的分层效果图,但普遍可见仍有部分晶状体现象。现采用改良法后再未出现晶状体带过宽的现象,即提升萃取成功率至 100%。

表 1 患者的临床特征参数

Tab 1 Clinical characteristics of patients					
组别	患者 序列	性别	年龄 (岁)	24 h 尿量 (mL)	临床诊断
L	No.1	女	76	1 400	肾上腺肿物
	No.2	女	48	1 850	高血压、甲减
	No.3	女	60	2 100	糖尿病
	No.4	男	40	1 000	脑垂体瘤
	No.5	女	19	1 000	闭经、甲减
	No.6	男	34	1 300	高血压
	No.7	女	44	2 100	糖尿病
	No.8	女	55	1 200	糖尿病
M	No.9	男	71	3 300	低钠血症
	No.10	女	35	3 400	慢性胃炎
	No.11	女	72	4 300	肾上腺肿物、高血压
	No.12	男	47	2 500	肢端肥大症、垂体瘤
	No.13	女	31	3 000	甲亢
	No.14	女	43	1 500	眩晕
	No.15	男	37	1 100	系统性红斑狼疮
	No.16	男	32	4 000	糖尿病
H	No.17	男	30	6 100	鞍区病变、低钠血症
	No.18	男	66	2 800	高血压、糖尿病
	No.19	女	85	1 900	肾炎、心脏病、泌尿道感染
	No.20	女	30	2 600	库欣综合征、骨质疏松
	No.21	男	57	3 100	低钠血症
	No.22	女	62	1 500	肾上腺肿物
	No.23	男	32	4 000	糖尿病

注:L、M、H 分别代表低、中、高值组;甲减:甲状腺功能减退症;甲亢:甲状腺功能亢进症

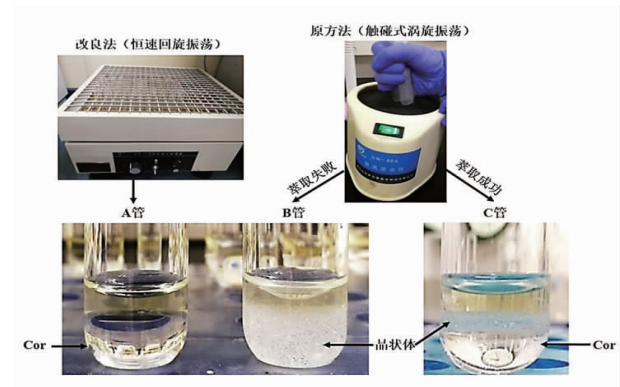


图 1 改良法与原方法的 Cor 萃取分层效果对比图  
Fig 1 Comparison of Cor extraction layering effect between improved method and original method

2.3 改良法与原方法的检测结果比对及质量控制指标的分析 改良法与原方法的各组检测结果并无统计学差异;其中低值组差异  $P=0.667$ ,中值组差异  $P=0.693$ ,高值组差异  $P=0.967$ ,不同水平组  $P$  均大于 0.05,合计时  $P>0.05$ 。两种检测方法的具体结果见表 2。两种方法检测的结果相关性分析见图 2 所示,其相关性系数为  $R^2=0.998\ 9$ 。

表 2 两种萃取方法的结果比较( $\mu\text{g}/24\ \text{h}$ )

Tab 2 Comparison of the results of the two extraction methods ( $\mu\text{g}/24\ \text{h}$ )				
样本	原方法	改良法	差异值	$P$
L1	24.80	27.16	2.36	>0.05
L2	40.70	30.16	-10.54	
L3	32.76	35.28	2.52	
L4	15.30	18.00	2.70	
L5	29.30	28.70	-0.60	
M1	77.40	79.92	2.52	>0.05
M2	66.99	56.43	-10.53	
M3	51.34	49.30	-2.04	
M4	79.12	92.88	13.76	
M5	127.25	135.50	7.75	
H1	3 050.00	2 934.10	-115.90	>0.05
H2	336.00	394.80	58.80	
H3	437.00	389.50	-47.50	
H4	1 175.20	1 190.80	15.60	
H5	282.56	259.84	-22.72	
合计				>0.05

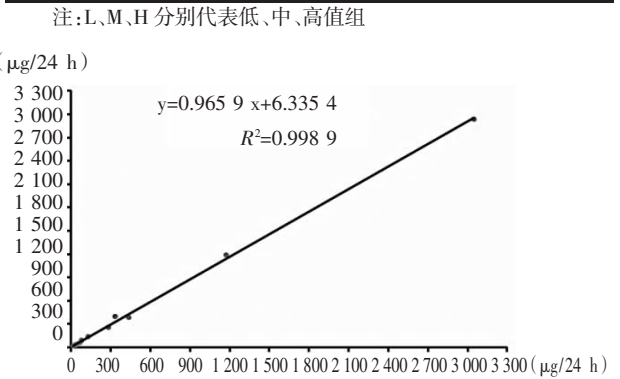


图 2 两种方法学检测值的相关性分析  
Fig 2 Correlation analysis of detection values between two methods

2.4 改良法提升检测精密度 从 UFC 临床标本中选取低( $L=30\ \mu\text{g}/24\ \text{h}$ )、中( $M=112\ \mu\text{g}/24\ \text{h}$ )与高( $H=914\ \mu\text{g}/24\ \text{h}$ )3 个不同浓度的样本,用两种方法分别同时检测 20 次,计算批内变异系数(coefficient of variation, CV);将 3 个浓度的样本连续检测 10 d,每天测定 2 次,计算批间 CV,详情见表 3 所示。结果显示原方法的批间精密度在低、中值上 CV 均大于了 25%,而改良法批内和批间 CV 均低于原方法。



表3 两种萃取方法的精密度评估( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab 3 Precision evaluation of two extraction methods( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ , $\bar{x}\pm s$ )						
	浓度	次数	原方法	CV(%)	改良法	CV(%)
批内	L	20	27.99 $\pm$ 5.30	18.95	31.76 $\pm$ 4.28	13.48
	M	20	99 $\pm$ 16.49	16.65	93.96 $\pm$ 8.38	8.92
	H	20	981.72 $\pm$ 78.17	7.96	920.59 $\pm$ 44.70	4.86
批间	L	20	33.05 $\pm$ 8.48	25.65	34.00 $\pm$ 5.46	16.07
	M	20	123.87 $\pm$ 34.88	28.16	105.5 $\pm$ 12.65	11.98
	H	20	937.44 $\pm$ 119.57	12.76	900.05 $\pm$ 76.70	8.52

注:L、M、H 分别代表低、中、高值组;CV:变异系数

2.5 改良法提升检测准确度 准确度的评估采用 Cor 质控品(伯乐免疫多项质控,批号 40363)和尿基质(1 例临床 UFC 标本,用过量二氯甲烷萃取除去 Cor)按比例自行配制成 5 例覆盖低中高值的样品(值分别为 12、75、107、165、210  $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ),以 Cor 检测行规所规定的 1/4 总 TEA 为差异判读标准来判断各检测值是否符合,采用两种萃取方法处理后同时检测,以检测值在 1/4 总 TEA 内即为合格,5 例样本中 80%合格则判读为该方法准确度评估通过。检测结果显示,原方法中两例与理论值中 TEA 超过 25%。未能通过准确度验证,而改良法通过准确度评估。

表4 两种方法的准确度验证( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )

Tab 4 Accuracy verification of the two methods( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )				
理论值	原方法	原方法 vs.理论值/ (25%总 TEA 范围)	改良法	改良法 vs.理论值/ (25%总 TEA 范围)
12	14.8	23.33%/是	10.1	15.83%/是
75	35.3	52.93%/否	75.5	0.60%/是
107	76.6	28.41%/否	138.0	28.98%/否
165	203.0	23.03%/是	148.0	10.30%/是
210	233.0	10.95%/是	218.0	3.80%/是
通过		否		是

2.6 改良法与 LC-MS/MS 法的比对 本研究对 15 例标本同时送检广州金域检验公司,采用 LC-MS/MS 法检测,仪器型号如上文所述,操作方法按相应说明书进行,根据反馈的实验结果进行差异值及相关性分析。其结果详情如表 5 所示。两种方法下各水平间无统计学差异(均  $P>0.05$ )。

将两种方法学比较下的 3 个不同检测水平的值(来源于上表)合并后做了相关性分析,其结果如下图所示。两种方法间相关性好,相关系数  $R^2$  值可达 0.992 2。

2.7 标本留置时间对检测结果的影响 取一组低、中、高值标本留样 1 周,间隔 24 h 检测,所有 UFC 标本重复检测 3 次,其结果的变化见图 4,统计分析

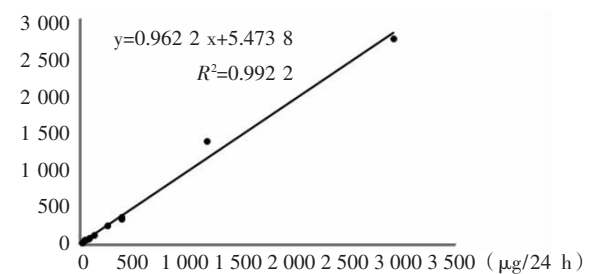
发现不同组别、不同留置时间与原值相比差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。结果发现并未出现值的下降,4℃封盖冷藏条件下,尿 Cor 检测值稳定,受标本留置时间影响较小。

表5 改良法与 LC-MS/MS 的结果差异( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )

Tab 5 Difference of the results between improved method and LC-MS/MS( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )				
样本	改良法	LC-MS/MS	差异值	P 值
L1	27.16	25.80	1.36	>0.05
L2	30.16	35.72	-5.56	
L3	35.28	31.51	3.77	
L4	18.00	16.30	1.70	
L5	28.70	21.80	6.90	
M1	79.92	71.40	8.52	>0.05
M2	56.43	61.99	-5.56	
M3	49.30	53.34	-4.04	
M4	92.88	89.12	3.76	
M5	135.50	121.25	14.25	
H1	2 934.10	2 750.10	184.00	$P>0.05$
H2	394.80	335.00	59.80	
H3	389.50	357.00	32.50	
H4	1 190.80	1 375.20	-184.40	
H5	259.84	242.51	17.33	

注:LC-MS/MS:液相色谱-串联质谱法;L、M、H 分别代表低、中、高值组

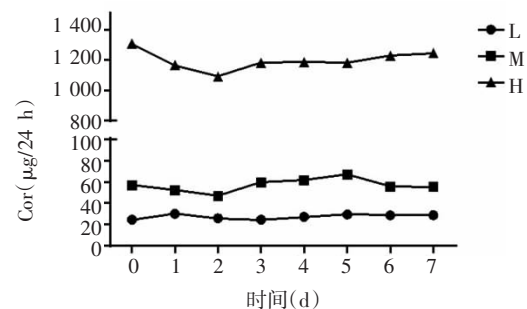
( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )



注:LC-MS/MS:液相色谱-串联质谱法

图3 改良法与 LC-MS/MS 检测值的相关性分析

Fig 3 Correlation analysis of improved method and LC-MS/MS



注:Cor:皮质醇

图4 尿 Cor 标本不同留置时间的检测结果

Fig 4 Detection results of urine Cor specimens with different in-dwelling times

2.8 尿蛋白对检测结果的影响 取 1 例 UFC 已知值(100  $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )标本,同时检测其尿蛋白=150  $\text{mg}/24\text{ h}$ ,以其作为尿基质添加胎牛血清(BSA)蛋白干粉,配制成不同浓度的蛋白尿(命名为 P1~5)。按改良法萃取后上机检测,观察各自检测值与期望值的差异,计算各浓度水平的回收率,结果显示平均回收率为 95.85%,初步揭示尿蛋白对 Cor 检测的影响较小,见表 6。

表 6 尿蛋白对尿 Cor 干扰性分析

Tab 6 Analysis of the interference of urine protein on Cor

标本 序列	尿蛋白浓度 ( $\text{mg}/\text{dL}$ )	期望值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	实测值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	差异值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	回收率 (%)
P1	10.00	100	102.50	2.50	102.50
P2	40.00	100	94.10	5.90	94.10
P3	200.00	100	91.00	9.00	91.00
P4	400.00	100	98.15	1.85	98.15
P5	233.30	100	93.70	6.30	93.70
均值	176.66	100	95.89	5.11	95.89

注:Cor:皮质醇;基质尿蛋白浓度 TP=10  $\text{mg}/\text{dL}$ ,24 h 尿量 1 500 mL,24 h 总尿蛋白=150  $\text{mg}/24\text{ h}$ ,Cor=6.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,总 UFC=100  $\mu\text{g}/24\text{ h}$

2.9 尿潜血对检测结果的影响 本研究取临床血常规标本 1 例(离心后去上清,得 1 例 Hb 检测高值标本 250  $\text{g}/\text{L}$ ),经反复冻融裂解红细胞离心后取溶血标本上清与尿蛋白干扰实验中的尿基质 Hb 为 0 且已知 UFC 的标本配制成不同梯度浓度 Hb 值潜血尿标本(命名为 H1~5),其检测分析结果见表 7。同理也仅计算平均回收率。在本干扰实验中,其平均回收率为 89.85%。尿 Hb 浓度在 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时会出现下降 10%左右(89.4%),尿 Hb 达 4 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时会出现显著性下降(65.1%)。

表 7 血红蛋白浓度对尿 Cor 干扰性分析

Tab 7 Analysis of the interference of urine Hb on Cor

标本 序列	血红蛋白 浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	期望值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	实测值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	差异值 ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	回收 率(%)
H1	250	100	99.00	1.00	99.00
H2	500	100	92.85	7.15	92.85
H3	1 000	100	102.90	2.90	102.90
H4	2 000	100	89.40	10.60	89.40
H5	4 000	100	65.10	34.90	65.10
均值	1 550	100	89.85	11.54	89.85

注:Hb:血红蛋白;Cor:皮质醇;基质尿 Hb=0  $\text{g}/\text{L}$ ,24 h 尿量 1 500 mL,Cor = 6.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,总 UFC=100  $\mu\text{g}/24\text{ h}$

3 讨论

目前检测 UFC 最为经济、便捷的方法仍是萃取 24 h 尿的化学发光免疫分析法。我国多家知名医院

仍还采用此方法,所介绍的萃取步骤中均使用的是漩涡混合器,甚至部分实验室所提及的漩涡混合器与本实验室原方案中该仪器同型号(XW-80A)<sup>[6-8]</sup>。

本实验室原方案中,涡旋混合会导致 1/10 萃取失败率如二氯甲烷萃取后液面不分层,出现晶体状物质,更换不同的实验员也不可避免。漩涡混合(XW-80A)没有参数设置,效果取决于试管与软垫的压触程度及时间,易导致乳化现象使萃取失败。为提高效率,原方案常 10 管/捆把进行涡旋震荡,加剧了萃取失败的概率,未见到相关文献报道。本研究设想采用 HY-5A 回旋式振荡器替代漩涡混合器(XW-80A)。该回旋式振荡器具有转速可调、通量高优势,但涡旋效果稍不如前者;二氯甲烷萃取 UFC 是否需要如此剧烈和时长的涡旋震荡?改用此温和振荡方法是否影响检测结果?改良法能改善 UFC 萃取后的分层效果,但对检测结果是否存在影响?笔者在低、中、高 3 组合计 15 例临床标本中进行了两种方法学的比对分析。结果证实,改用 HY-5A 回旋式振荡器(设定转速 250  $\text{r}/\text{min}$ ,5  $\text{min}$ )满足萃取需求提升了工作效率,两方法的相关系数高达  $R^2=0.998\ 9$ 。检测结果显示差异并无统计学意义且相关性较好,为排除偶然性误差影响,考虑到改良仅针对萃取步骤,可能改变实验的稳定性及重复性,本研究进一步对质量控制中的评价指标进行了考察。结果提示,改良法批内和批间 CV 均低于原方法,具有更高的精密度和准确度。准确度的评估方面存在一些困难,主要是暂无 UFC 溯源化的标准品,但本研究采用 Cor 质控品和尿基质自行配制的方法加以了解决。对改良法与 LC-MS/MS 法的检测结果进行了比较,结果发现两者检测结果差异无统计学意义且相关系数可达  $R^2=0.992\ 2$ ,改良法不仅使得萃取失败现象消失而且使日常检测工作变得更高通量(可达 80 个/次)。LC-MS/MS 是现阶段最先进的方法,因 LC-MS/MS 检测的成本较高导致送检的例数偏少,使得本研究存在一定局限性,但提示改良法几乎等同于 LC-MS/MS 的检测效能。总体来说,改良法提高了萃取成功率、检测通量并提升了方法学的精密度与准确度。

在临床工作中会出现检测值与临床预判不符的现象,因而常需要对保留的标本进行复查,标本留置时间过久是否影响复查?尿皮质醇未见报道;库欣综合征患者约 3/4 会出现高血压,继而可能引起肾脏损伤出现蛋白尿,蛋白尿是否会影响 UFC 的萃取及检测也尚未见报道;尿标本潜血对结果影响也未见文献报道。本研究结果证实标本在 4℃冷藏

保留 8 d 及高蛋白尿对检测结果影响微乎其微;在尿蛋白干扰实验中所配制的尿蛋白浓度 $\geq 3.5 \text{ g/24 h}$  (大量尿蛋白定义,P5 干扰蛋白的浓度乘以尿量),在潜血干扰实验中所配制的血红蛋白尿的 Hb 浓度大于了  $3\ 840 \mu\text{g/mL}$  (血皮质醇检测干扰下限),最大限度地证明了这些干扰因素的不会产生影响。但潜血尿会使检测值与理论值偏低,特别是当尿 Hb 达  $4\ 000 \mu\text{g/mL}$  时会导致检测误差大于 Cor 检测所规定 25% 的 TEA 值。总体来说,这些结果证实皮质醇的稳定性好,二氯甲烷萃取-化学发光免疫分析法受标本留置时间、高蛋白尿的因素影响基本可忽略不计。但血尿标本可能对萃取或检测环节存在影响,不建议对尿路出血或其他原因所致的严重潜血尿做 UFC 检查。

综上所述,本研究首次改良了现有的 UFC 萃取方法并对标本留置时间、尿蛋白及潜血这 3 个潜在的检测干扰因素进行分析。方法学的改进提升了萃取效率及检测结果的精密性与准确度,干扰因素的分析为临床标本收集、复查及结果分析提供了重要的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] CECCATO F, BOSCARO M. Cushing's syndrome: screening and diagnosis[J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2016, 23(3): 209-215.
- [2] LUO A, EL GIERARI ETM, Nally L M, et al. Clinical utility of an ultrasensitive urinary free cortisol assay by tandem mass spectrometry[J]. Steroids, 2019, 146: 65-69.
- [3] ALEXANDRAKI K I, GROSSMAN A B. Is urinary free cortisol of value in the diagnosis of Cushing's syndrome? [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2011, 18(4): 259-263.
- [4] YATSCOFF R W, CHAPELSKY L, MORRISH D. Analytical and clinical evaluation of an automated cortisol assay on the ACS:180[J]. Clin Biochem, 1996, 29(4): 315-319.
- [5] KOWALSKI A, PAUL W. A simple extraction procedure for the determination of free (unconjugated) cortisol in urine by radioimmunoassay[J]. Clin Chem, 1976, 25: 1152-1158.
- [6] 林瑶, 黄志基, 胡尧, 等. 电化学发光免疫分析 24 小时尿游离皮质醇的方法学验证[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(3): 306-309.
- [7] 熊中云, 马怡, 施绍瑞, 等. 盐酸对 24 小时尿游离皮质醇测定的影响[J]. 华西医学, 2010, 25(6): 1114-1116.
- [8] 张殿喜, 李乃适, 黎明, 等. 影响用化学发光免疫法测定尿游离皮质醇的重要因素[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(7): 1564-1565.

(2021-12-05 收稿)

(上接第 435 页)

- [5] 罗鸿, 张福洲, 王文轩, 等. 普美显增强 MRI 对原发性肝癌诊断和鉴别诊断的临床价值分析[J]. 影像研究与医学应用, 2020, 4(9): 13-15.
- [6] 陈莉玲, 梁雪梅, 贺小红, 等. 普美显 2 种注射方法对 MRI 增强扫描的图像质量影响及护理分析[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(24): 3838-3841.
- [7] 许晓亮, 李新瑜, 鲁果果. CT 与 MRI 增强扫描肝癌患者应用普美显的临床价值分析[J]. 医学影像学杂志, 2020, 30(3): 515-518.
- [8] 何琨. 普美显磁共振增强成像用于鉴别肝硬化结节与结节型肝癌价值探析[J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(8): 52-53.
- [9] 《中华肝脏病杂志》编辑委员会, 中华医学会肝病学分会肝癌学组. 肝细胞癌前病变的诊断和治疗多学科专家共识(2020 版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(3): 514-519.
- [10] 张艳, 刘影. 普美显动态增强 MRI 和动态增强 CT 对肝细胞肝癌血供的评估与病理对照分析[J]. 临床放射学杂志, 2021, 40(7): 1334-1339.
- [11] GOODWIN M D, DOBSON J E, SIRLIN C B, et al. Diagnostic challenges and pitfalls in MR imaging with hepatocyte-specific contrast agents[J]. Radiographics, 2011, 31(6): 1547-1568.
- [12] CHOL J W, LEE J M, KIM S J, et al. Hepatocellular carcinoma: imaging patterns on gadoxetic acid-enhanced MR Images and their value

as an imaging biomarker[J]. Radiology, 2013, 267(3): 776-786.

- [13] RAMAN S S, LEARY C, BLUEMKE D A, et al. Improved characterization of focal liver lesions with liver-specific gadoxetic acid disodium-enhanced magnetic resonance imaging: a multicenter phase 3 clinical trial[J]. J Comput Assist Tomogr, 2010, 34(2): 163-172.
- [14] TANIMOTO A, LEE J M, MURAKAMI T, et al. Consensus report of the 2nd international forum for liver MRI[J]. Eur Radiol, 2009, 19(1): S975-S989.
- [15] 韩玉娟, 于长路, 贾科峰, 等. 不同注射流率及动脉期期相选择对肝脏普美显增强 MRI 图像质量的影响[J]. 临床放射学杂志, 2016, 35(1): 138-142.
- [16] 王家友, 赵勇, 伍小勇, 等. 普美显磁共振对早期肝硬化合并小肝癌的诊断价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2019, 17(8): 92-95.
- [17] 曾凌宇. 普美显磁共振增强成像鉴别诊断小肝癌与肝硬化结节的应用价值[J]. 现代医用影像学, 2020, 29(8): 1503-1505.
- [18] 蒋逆立, 汤伟, 何浩强, 等. 优化屏气方案对普美显增强动脉期图像的价值[J]. 影像研究与医学应用, 2021, 5(11): 12-14.
- [19] KANATA N, YOSHIKAWA T, OHNO Y, et al. HCC-to-liver contrast on arterial-dominant phase images of EOB-enhanced MRI comparison with dynamic CT[J]. Magn Reson Imaging, 2013, 31(1): 17-22.

(2021-12-04 收稿)