

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 22. 007

尼泊金丁酯用于 24 h 尿液标本生化项目测定的研究^{*}

吴思湟^{1,2}, 姜 巧³, 陈 翹^{1,2}, 孙卫民², 彭 亮^{4△}

(1. 广州医科大学金城检验学院, 广州 510182; 2. 广州医科大学附属第二医院检验科, 广州 510260; 3. 广东三九脑科医院神经重症监护病区, 广州 510510; 4. 广州医科大学附属第五医院检验科, 广州 510700)

摘 要:目的 研究尼泊金丁酯作为防腐剂对 24 h 尿液标本生化项目测定结果的影响。方法 收集新鲜无菌或有菌尿液标本各 20 份, 每份分成 4 组。一组作为处理前原始标本组, 定量检测尿液标本中微量总蛋白、葡萄糖、钾、钠、氯、钙、磷离子, 以及肌酐、尿素的水平, 同时进行细菌培养及菌落计数; 其余 3 组为尼泊金丁酯组、甲苯组、无防腐剂组, 均放置 24 h 后定量检测上述指标。结果 原始标本为无菌尿液时: 4 组间葡萄糖水平及其他生化指标差异均不明显。原始标本为有菌尿液时: 尼泊金丁酯组菌量与原始标本组相比明显减少 ($P < 0.05$); 甲苯组、无防腐剂组与原始标本组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 尼泊金丁酯组的葡萄糖水平与处理前的原始标本组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而未加防腐剂组、甲苯组的葡萄糖水平与原始标本比较明显下降 ($P < 0.05$); 尼泊金丁酯组、甲苯组、无防腐剂组的其余生化指标包括离子、肌酐、尿素、微量总蛋白, 与原始标本组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 尼泊金丁酯作为防腐剂在 24 h 尿液生化检查中, 对离子、微量总蛋白、肌酐及尿素结果无明显影响。且对尿标本中的病原菌有较强的抑制能力, 可防止葡萄糖的分解, 维持该指标的稳定性。

关键词: 24 小时尿液标本; 尼泊金丁酯; 防腐剂; 生化检测

中图法分类号: R446.12

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)22-3345-04

The effects of butylparaben used as a preservative on the biochemical determination of 24-hour urine specimen^{*}

WU Sihuang^{1,2}, JIANG Qiao³, CHEN Qiao^{1,2}, SUN Weimin², PENG Liang^{4△}

(1. KingMed College of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 3. Neurointensive Care Unit, Guangdong 999 Brain Hospital, Guangzhou, 510510, China; 4. Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510700, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of butylparaben used as a preservative on the biochemical determination of 24-hour urine specimen. **Methods** Fifteen fresh urine specimens of the out patients or in inpatients were collected. Each sample was divided into 4 parts. One part of the original specimen was used to examine the contents of microdose albumin (M. Pr), glucose (GLU), ions of potassium (K), sodium Na, chlorine (Cl), calcium (Ca), and phosphorus (P), urea nitrogen (UREA), creatinine (CREA), and bacteria number. The rest were divided into three groups as follows, toluene-treated group, butylparaben-treated group, without preservative-treated group. After 24 hours, all the groups were quantitatively detected the items of M. Pr, GLU, K, Na, Cl, Ca, P, UREA, CREA, and bacteria (or fungus) number. **Results** The biochemical indexes including ions (K, Na, Cl, Ca, P), UREA, CREA, M. Pr, were both no difference between the four groups ($P > 0.05$). There was no difference for the glucose between the butylparaben-treated group and the original specimen. However, the glucose level of the toluene-treated group or without preservative-treated group was significantly lower than that of the original group ($P < 0.05$). The bacteria number of butylparaben group was significantly less than that of the original specimen, the toluene group and no preservative group ($P < 0.05$). **Conclusion** Butylparaben as a powerful bacteriostatic agent, has a good effect on inhibition of glucose fermentation and no effect on the results of ions (K, Na, Cl, Ca, P), M. Pr, UREA and CREA in 24-hour urine specimen. Our report

^{*} 基金项目: 广州市卫生计生科技一般引导项目(20171A011300); 广州市高校创新创业训练项目(20172224207)。

作者简介: 吴思湟, 女, 技师, 主要从事临床生化研究。 △ 通信作者, E-mail: pl_206@126.com。

suggests that butylparaben has the potential to be a new preservative used for 24-hour urine biochemical examination.

Key words: twenty-four hour urine specimen; butylparaben; preservative; biochemical examination

24 h 尿液生化检查可获得反映糖代谢、肾功能、酸碱代谢平衡等指标的检测数据,对于临床疾病的诊断和病情的判断有重要的帮助^[1-3]。24 h 尿液标本的留取,需收集患者 24 h 内的全部尿液。由于时间较长,为抑制微生物的生长、防止葡萄糖的分解,以及保持尿液中待测物质的稳定性,通常需要在留取标本时加入防腐剂。

不同项目的检测选用的防腐剂不同,如浓盐酸用于 24 h 尿液儿茶酚胺、17-羟皮质类固醇和 17-酮类固醇、钙、磷等定量测定;冰乙酸适用于 24 h 尿液醛固酮测定;麝香草酚适用于尿液显微镜检查,尤其是尿液浓缩结核分枝杆菌的检查;而甲苯适用于尿蛋白等生化项目的测定^[4-6]。由于肌酐、尿素和蛋白质等指标对于肾功能判断尤为重要,目前检验科常以甲苯作为 24 h 尿液生化检查的防腐剂。然而甲苯具有许多缺点,如高度易燃、易挥发,有刺激性气味,可经吸入、食入及皮肤接触导致中毒,对患者及检验工作者的健康危害较大。另外,甲苯对生化仪器中的比色杯还具有一定的腐蚀性^[7-8]。因此,寻找新的防腐剂替代品是非常有必要的。尼泊金酯系列(主要包括尼泊金甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、戊酯、庚酯)作为防腐剂多用于食品、医药、化妆等行业^[9]。已有少量研究发现,尼泊金乙酯的防腐性能较甲苯好,且对尿液肌酐、尿素、蛋白的测定没有影响^[3-4]。由于抑菌效果和毒性等性质受构成 R 烷基的碳原子数的影响,随着碳原子数的增加,尼泊金酯的抑菌效果越好、毒性越小^[10]。而尼泊金丁酯作为防腐剂用于 24 h 尿液标本生化检测还未见报道,且尼泊金酯系列对于尿液标本离子检测是否有影响也少有资料可查。故本研究拟将尼泊金丁酯作为防腐剂,分析其对 24 h 尿液标本中病原菌,以及微量总蛋白、葡萄糖、离子(钾、钠、钙、氯、磷)、肌酐和尿素的影响,探讨其作为防腐剂用于部分生化项目测定的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料 收集门诊或住院部患者的新鲜尿液标本共 40 份(有菌尿和无菌尿标本各 20 份)。每份标本

分成 4 组,包括原始标本组、无防腐剂组、甲苯组、尼泊金丁酯组。

1.2 仪器与试剂 采用 10% 尼泊金丁酯乙醇溶液:称取 100 mg 尼泊金丁酯,加入 1 mL 无水乙醇中,使其充分溶解。尼泊金丁酯购自 Target Mol 公司。分析纯甲苯购自天津科密欧化学试剂有限公司。生化项目检测仪器:自动生化仪日立 7600。

1.3 方法

1.2.1 标本处理及生化检测 原始标本组:采用全自动生化仪日立 7600 检测微量总蛋白、葡萄糖、离子(钾、钠、氯、磷、钙)、肌酐和尿素。无防腐剂组:不添加任何防腐剂。甲苯组:取 10 μ L 甲苯加入 1 mL 尿液^[11]。尼泊金丁酯组:结合文献并进行条件优化,取 5 μ L 10% 尼泊金丁酯乙醇溶液加入 1 mL 尿液中,终浓度为 0.5 g/L^[12-14]。无防腐剂组、甲苯组、尼泊金丁酯组标本常温放置 24 h 后参照原始标本组方法检测。

1.2.2 菌量计数 4 组尿液标本均取一定量进行梯度稀释(共 8 梯度:1 : 10⁻¹、1 : 10⁻²、1 : 10⁻³、……、1 : 10⁻⁸),在血平板上涂布,待尿液干透后,倒置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养。24 h 后观察细菌(或真菌)的有无及生长情况,并进行菌落计数,换算出尿液中的菌含量,并将数据转化为以 10 为底的对数形式。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;非正态分布的则用中位数(四分位数间距)表示,采用非参数检验(Mann-Whitney)分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尼泊金丁酯对肌酐、尿素、微量总蛋白检测结果的影响 甲苯组、尼泊金丁酯组及无防腐剂组标本放置 24 h 后与原始标本组比较,肌酐、尿素、微量总蛋白差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1、2。

2.2 尼泊金丁酯对离子(钾、钠、氯、磷、钙)检测结果的影响 甲苯组、尼泊金丁酯组及无防腐剂组标本放置 24 h 后与原始标本组比较,钾、钠、氯、磷、钙离子的结果差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 3、4。

表 1 无菌尿液标本肌酐、尿素、微量蛋白检测结果

组别	<i>n</i>	肌酐(μ mol/L)	尿素(mmol/L)	微量总蛋白(mg/L)
原始标本组	20	3 898.50(3 122.50)	177.88(73.43)	76.50(35.25)
无防腐剂组	20	3 839.00(2 657.25) *	175.13(72.89) *	76.00(36.25) *
甲苯组	20	3 826.50(2 700.75) *	177.37(77.50) *	74.50(41.25) *
尼泊金丁酯组	20	3 845.00(2 792.00) *	176.84(71.39) *	74.00(43.25) *

注:与原始标本组比较,* *P* > 0.05;检测结果以中位数(四分位数间距)表示

表 2 有菌尿液标本肌酐、尿素、微量蛋白检测结果

组别	<i>n</i>	肌酐(μ mol/L)	尿素(mmol/L)	微量总蛋白(mg/L)
原始标本组	20	4 826.50(4 260.00)	193.86(87.65)	99.00(59.25)
无防腐剂组	20	4 774.50(4 172.75)*	197.78(97.60)*	96.50(63.75)*
甲苯组	20	4 851.00(4 302.00)*	195.88(99.62)*	98.00(53.50)*
尼泊金丁酯组	20	4 805.00(4 288.50)*	196.26(96.96)*	97.00(60.00)*

注:与原始标本组比较,**P*>0.05;检测结果以中位数(四分位数间距)表示

表 3 无菌尿液标本钾、钠、氯、磷、钙离子检测结果($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	钾	钠	氯	磷	钙
原始标本组	20	26.69±12.56	94.79±33.29	98.46±15.92	10.53±4.51	2.91±1.07
无防腐剂组	20	27.14±12.36*	94.67±32.98*	98.56±16.14*	10.47±4.49*	2.90±1.06*
甲苯组	20	27.20±12.49*	95.68±33.46*	98.81±15.76*	10.62±4.53*	2.87±1.05*
尼泊金丁酯组	20	27.10±12.56*	95.12±32.49*	98.35±16.17*	10.62±4.50*	2.89±1.06*

注:与原始标本组比较,**P*>0.05

表 4 有菌尿液标本钾、钠、氯、磷、钙离子检测结果($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	钾	钠	氯	磷	钙
原始标本组	20	24.34±10.10	98.11±25.58	93.89±34.76	12.05±5.46	3.04±1.89
无防腐剂组	20	24.64±9.60*	101.42±27.95*	95.10±34.13*	12.02±5.38*	3.06±1.71*
甲苯组	20	24.49±9.68*	100.76±27.43*	95.73±34.35*	12.09±5.50*	3.08±1.72*
尼泊金丁酯组	20	24.66±9.72*	100.65±28.01*	95.63±34.33*	12.05±5.41*	3.05±1.74*

注:与原始标本组比较,**P*>0.05

2.3 尼泊金丁酯对尿液中病原菌的生长及葡萄糖分解的影响 有菌尿液标本加入尼泊金丁酯后,尿液标本中的细菌含量明显低于原始标本组(*P*<0.05)。甲苯组和无防腐剂组的菌量,与原始标本组相比,差异无统计学意义(*P*>0.05)。无菌尿液标本 4 组均未见明显病原菌生长(数据未展示)。另外,无菌尿液标本中由于葡萄糖未受病原菌的分解,24 h 后与原始标本组葡萄糖水平比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。而有菌尿液标本中,甲苯组及无防腐剂组的尿液放置 24 h 后,葡萄糖水平较原始标本组均明显降低(*P*<0.05);尼泊金丁酯组与原始标本组比较,葡萄糖水平无明显变化(*P*>0.05)。见表 5。

表 5 有菌尿液标本菌落计数及有菌、无菌尿液标本中葡萄糖水平检测

组别	<i>n</i>	菌落数 ($\bar{x}\pm s$,lgN)	葡萄糖(mmol/L)	
			有菌尿标本	无菌尿标本
原始标本组	20	5.89±2.38	0.46(2.15)	0.11(1.77)
无防腐剂组	20	6.33±1.93*	0.03(0.10) [#]	0.09(1.10)*
甲苯组	20	5.47±1.52*	0.06(0.26) [#]	0.11(1.79)*
尼泊金丁酯组	20	2.86±1.55 [#]	0.44(1.86)*	0.11(1.80)*

注:与原始标本组比较,**P*>0.05,[#]*P*<0.05;葡萄糖结果以中位数(四分位数间距)表示

3 讨 论

尼泊金酯系列作为防腐剂用于检验的研究目前较少,有研究认为尼泊金乙酯用于尿液标本的防腐具

有效果好、无毒性、不易挥发的优越性。尼泊金乙酯比甲苯具有更好的抑菌防腐功效;能够很好地防止尿液中葡萄糖被微生物酵解,同时不会干扰尿液中蛋白质、尿素、肌酐等化学成分的测定^[12-13]。尼泊金丁酯的抗菌作用比尼泊金乙酯更强,多作为防腐剂用于食品、化妆品等行业^[10-14]。而其在尿液防腐中的作用国内尚未见报道,因此本项目对尼泊金丁酯用于 24 h 尿液生化标本的防腐效果进行了研究。

本研究显示,尼泊金丁酯组的葡萄糖水平与处理前的原始标本组差异无统计学意义(*P*>0.05)。而无防腐剂组和甲苯组葡萄糖水平与原始标本组相比,差异有统计学意义(*P*<0.05),表明这两组葡萄糖均有不同程度的分解,主要原因为微生物的消耗、利用。其余生化指标离子(钾、钠、氯、钙、磷)、肌酐、尿素、微量总蛋白,4 组结果差异无统计学意义(*P*>0.05)。防腐作用方面,对于有菌尿液标本,甲苯组、无防腐剂组的菌量与原始标本组差异无统计学意义(*P*>0.05),与邓敬仪等^[15]的研究结果一致。甲苯作为防腐剂,其原理主要是在标本表面形成一层甲苯薄膜,阻止尿液与空气接触,达到防腐效果。但如果标本本身已存在大量微生物(如尿路感染患者尿标本),则甲苯对其抑制作用并不明显。而尼泊金丁酯组与处理前的菌量差异有统计学意义(*P*<0.05),说明病原菌生长受到明显抑制。

尿液中含有的细菌等微生物会消耗尿液中的葡萄糖,加入防腐剂的作用是抑制尿液中病原菌的生长,从而使葡萄糖不易被分解。尼泊金酯亦称对羟基苯甲酸酯,由于它具有酚羟基结构,所以抗菌性能比苯甲酸、山梨酸都强。其作用机制是破坏微生物的细胞膜,使细胞内的蛋白质变性,并可抑制微生物细胞的呼吸酶系与电子传递酶系的活性。尼泊金酯的抑菌活性主要是分子态起作用,且其分子内的羟基已经酯化,不再电离,所以它在 pH 3.0~8.0 均有很好的抑菌效果。尿液在平常饮食条件下,尿液 pH 值为 4.6~8.0,平均为 6.0,在此环境下,尼泊金丁酯能较好地发挥其防腐性能。值得注意的是,有研究表明尼泊金丁酯对于芽孢杆菌的抑制作用较弱^[14]。

有文献指出,对于 24 h 尿液标本,尿液蛋白、尿素、肌酐和电解质在不加防腐剂的情况下并无明显影响,不同项目检测的标本留取是否需要加入防腐剂,各实验室应结合当地实际情况(地域、气候等)综合考虑,根据实验结果的侧重性及目的性选择更适合的防腐剂^[2,15-17]。本研究结果也进一步证实了该结论。尼泊金丁酯作为防腐剂在 24 h 尿液标本生化检查中,在不影响离子(钾、钠、氯、钙、磷)、微量总蛋白、肌酐及尿素结果准确性的情况下,对病原菌有较强的抑制能力,可有效防止菌尿标本中葡萄糖的分解,减小该指标检测的误差。需要提出的是,24 h 尿液葡萄糖检测在肾功能判断中的价值存在一定局限性。因此,后续研究可进一步观察尼泊金丁酯对 24 h 尿液其他项目检测的影响。另外,如何促进尼泊金丁酯在尿液标本中的溶解度也值得继续探索。

参考文献

- [1] ALLEN N B, ZHAO L H, LORIA C M, et al. The validity of predictive equations to estimate 24-hour sodium excretion: the mesa and CARDIA urinary sodium study[J]. Am J Epidemiol, 2017, 186(2): 149-159.
- [2] 顾娟. 24 小时尿样使用防腐剂对尿酸及钙、镁、磷检测的影响[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 309-310, 313.
- [3] 程恩荷, 姚红萍, 陈伟, 等. 持续质量改进在 24 小时尿标本留取中的应用[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2014, 13(2): 61-62.
- [4] 刘成玉. 临床检验基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 38.
- [5] 张建强, 邹正平, 谢江燕, 等. 临床常见防腐剂对尿液电导率测定的影响[J]. 中国医药指南, 2015, 13(1): 12-13.
- [6] 王修全, 兰慧, 吴孟轩. 24 小时尿蛋白定量检测样本保存方法的探讨[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(23): 97-98.
- [7] 张卫娟, 陈洁, 王明. 职业性急性甲苯中毒性脑病 6 例临床分析[J]. 中国职业医学, 2015, 42(4): 406-407.
- [8] 胡金川, 张立敏, 董洪方, 等. 不加防腐剂尿液保存方法对 24h 尿蛋白定量测定的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(5): 689-690.
- [9] 胡毓元. 尼泊金乙酯(丁酯)合成研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [10] 侯艳冰. 长链尼泊金酯类防腐剂的合成与抗菌性能的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
- [11] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [12] 林延鹏, 王民玉, 靳仙宝, 等. 尼泊金乙酯用于防腐剂定量测定尿液化学成分的研究[J]. 医学检验与临床, 2013, 24(4): 30-31.
- [13] 姜朝新, 潘开拓, 冯杰娥, 等. 0.3% 尼泊金乙酯对尿液中尿酸及清蛋白检测结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(21): 2828-2828, 2830.
- [14] 李永飞, 许敏燕, 沈良等. 关于尼泊金酯等防腐剂对 3 种细菌抑制作用的研究[J]. 中国酿造, 2003, 22(6): 18-20.
- [15] 邓敬仪, 董慧敏, 李小嫩, 等. 甲苯在 24 h 尿液中的防腐效果[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(4): 526-528.
- [16] 王会平, 王小亚, 李岩, 等. 防腐剂对 24 h 尿蛋白定量检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(7): 858-859.
- [17] 余琳, 乡洁莹, 高月亭, 等. 甲苯对 24 h 尿总蛋白和清蛋白检测结果的影响[J]. 广州医药, 2017, 48(3): 64-67.
- [11] SHIMADA H, TAKIGUCHI N O, SODA H, et al. High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2010, 13(3): 170-176.
- [12] 冯然, 刘涛, 刘静芹, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞的比值与糖尿病肾病的关系[J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(4): 356-359.
- [13] KAO K T, SABIN M A. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents[J]. Aust Fam Physician, 2016, 45(6): 401-406.

(收稿日期: 2018-03-24 修回日期: 2018-05-28)

(上接第 3344 页)

- [8] 刘清杏, 黄金华, 李荣东, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞的比值、胰岛素抵抗对早期糖尿病肾病的预测价值[J]. 广东医学, 2016, 37(9): 1325-1327.
- [9] AFSAR B. The relationship between neutrophil lymphocyte ratio with urinary protein and albumin excretion in newly diagnosed patients with type 2 diabetes[J]. Am J Med Sci, 2014, 347(3): 217-220.
- [10] ULU S M, DOGAN M, AHSAN A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a quick and reliable predictive marker to diagnose the severity of diabetic retinopathy[J]. Diabetes Technol Ther, 2013, 15(11): 942-947.

(收稿日期: 2018-03-22 修回日期: 2018-06-17)