

· 论 著 ·

干化学法检测氯离子的实验研究*

吴杰红, 傅灵媛, 张志伦, 蒲晓允[△]

(重庆第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究干化学试剂和微型光谱仪技术快速检测氯离子的方法。方法 将所配制的电解质氯离子液体试剂冻干于微型光谱仪配套的检测杯中, 运用冷冻干燥机真空抽干, 制备成干粉状试剂, 封存备用。测定时, 在配制好的干试剂检测杯中加入标本和稀释液后, 放入微型光谱仪的检测卡槽中, 经微型光谱仪的磁力搅拌系统混匀, 经加热系统孵育后, 运用速率法的反应原理, 于 405 nm 处进行氯离子的吸光度(A)值检测。并对试剂的性能进行评价, 将结果进行统计学分析。结果 该指标线性范围为 40~160 mmol/L, 冻干后 90 d 内反应稳定性良好。其批内变异系数(CV) < 4%, 批间 CV < 5%, 回收率为 96.5%~104.4%。当血清内胆红素(TB) < 280.0 μmol/L 以及三酰甘油(TG) < 12.0 mmol/L 时, 结果未见明显干扰。结果显示, 与全自动生化分析仪具有良好的相关性($r=0.9769$)。结论 以微型光谱仪干试剂法测定电解质氯离子结果准确可靠, 检测过程简便, 可用眼直接观察颜色变化, 避免漏检且仪器试剂携带方便, 符合战地救治、基层医疗的需要。

关键词:光谱分析; 电解质; 干试剂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0726-02

Experimental study on the detection of chloridion based on dry chemistry method

Wu Jiehong, Fu Lingyuan, Zhang Zhilun, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory of Xinqiao hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract: Objective To establish a new method for rapid detection of chloridion based on micro spectrometer and dry reagent. **Methods** The liquid chloridion reagent was lyophilized for the preparation of reagent in powder form, which was then sealed into a detector cup of micro spectrometer for later experiment. During determination, the detector cup, in which the specimens and diluents were added to the dry reagent, was put into the detector slot of micro spectrometer, the contents in the detector cup were then well mixed by the magnetic stirring system of micro spectrometer and incubated with the heating system. Afterwards, the A values of chloridion was detected respectively at 405nm following the reaction principles of turbidimetry method. Based on the findings of those detections mentioned above, the performance of the chloridion dry reagent was evaluated, and the results were then statistically analyzed. **Results** The linear range of chloridion could meet the demand for clinical analysis, and the dry reagents had good reaction stability for 60 days after being lyophilized, with the intra-assay coefficient variation(CV) less than 4%, inter-assay CV less than 5%, and the recovery rate from 96.5% to 104.4%. No obvious interference was observed in the determination results under the circumstance that the serum TB was less than 280 μmol/L and the TG was less than 12.0 mmol/L. The detection results by this method were well correlated with these of traditional liquid reagent enzymic method($r=0.9769$). **Conclusion** The method for rapid detection of chloridion based on micro spectrometer and dry reagent is easy and reliable, and can meet the clinical practice requirement in basic hospitals and battlefield treat and cure.

Key words: spectrum analysis; electrolytes; dry reagent

血清氯离子浓度能反应体内的电解质平衡状态, 对临床诊断具有一定的临床意义, 也是军事医学中战地救治研究的重要内容之一。由于目前适用于野战环境的便携式急救生化仪器非常少, 本组与重庆大学合作, 在微型光谱分析仪的基础上, 对光信号的采集、处理、分析软件进行了优化, 旨在研制适合野战、基层等小型医疗机构的便携式检测设备, 报道如下。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 微型光谱分析仪(重庆大学研制), 波长 405nm, 吸光度(A)线性测定值为 0.000~3.000。日本奥林巴斯 AU-2700 全自动生化分析仪。ModulyoD-230 冷冻干燥机(美国 Thermo 公司)。试剂为 α-Amylase(来自猪胰)、Gal-G2-α-CNP(TOYOBO 公司产品), EDTA2 Ca 和 MES(Sigma 公司产品), EDTA 和磷酸盐(国产分析纯)。应用试剂 I : Gal-G2-α-CNP 2 g, EDTA2 Ca 1.64 mmol/L, 溶于 900 mL MES 缓冲液(pH6.0, 50 mmol/L)中; 应用试剂 II : α-Amylase 20 kU,

EDTA 16 mmol/L 溶于 100 mL MES 缓冲液(pH6.0, 50 mmol/L)中。

1.2 试剂的干燥及密封

1.2.1 取 1 套用于微型光谱仪的自制检测杯(试剂杯), 口径为 5 mm, 预置搅拌子于底部。按比例加入化学试剂 I, 置于 -70℃ 冰箱过夜, 于第 2 天加入试剂 II, 防止两种试剂接触, 继续预冻。待两种试剂结晶后, 放入冷冻干燥机真空抽干 6 h, 并注意其真空度变化。经过升华、解吸附, 于 8.3 kPa 时取出, 将干燥好的试剂检测杯用塑胶加热法密封, 并置于已放入硅胶的密封袋内保存。

1.3 检测方法 按比例用微量定量加样器吸取被测样品, 置于已加入稀释液的试管内混匀备用。取出干燥好试剂的微型光谱仪检测杯, 吸取上述溶液 200 μL 加入该检测杯内。将此检测杯推入卡槽, 进入微型光谱仪的检测体系, 通过磁力搅拌混匀并对杯部加热, 使其维持恒温 37℃, 孵育 60 s, 在波长 405

* 基金项目:解放军总装备部预研基金(2007E056)。△ 通讯作者, E-mail: puxiaoyun@tmmu.com.cn.

nm 下进行检测, 读取第 1 点吸光度值(A1), 再孵育 5 min 后读取第 2 点吸光度值(A2), 共测 10 min。

1.4 评价方法

1.4.1 检测线性范围测定 配制高浓度氯离子标准液, 将其依次稀释成 70、80、90、100、110、120、130 mL 相应浓度梯度的标准液, 分别进行各指标线性范围的确定, 再经回归分析后记录结果。

1.4.2 精密度测定 取正常值质控品连续测 10 次, 进行批内重复性的测定; 取正常值质控品和自配高低值浓度混合血清标本各 1 份, 分装冷冻, 每天取出 1 份进行浓度测定, 连续 20 d, 计算其批间变异系数(CV)。

1.4.3 回收率测定 取 0.9 mL 低值基础混合血清, 分别加入 0.1 mL 含各待测指标的低、中、高值浓度标准液, 进行回收率的测定。

1.4.4 稳定性实验 该指标试剂冻干取出后, 分别于 1、15、30、60 min 进行起始 A 值和定值血清 A 值的测定。每次重复测定 10 次。

1.4.5 方法对比实验 选取临床送检标本(n=60), 分别应用全自动生化分析仪、微型光谱仪干试剂法同时进行测定, 判断两种方法的一致性。

1.5.6 干扰性实验 用患者混合血清进行测定, 建立对照组和加入不同浓度可疑干扰物质(胆红素, 血红蛋白和三酰甘油)的实验组。每组样品同时测定 3 次, 计算均值进行比较。

1.5 统计学处理 实验数据用百分率(%)及($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 11.0 统计学软件进行配对 t 检验和回归分析。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测线性范围 在 70~130 mmol/L 内线性反应良好, 且能覆盖临床上的参考值和医学决定水平, 该试剂与吸光度在此范围相关性(r)=0.987 2。

2.2 精密度测定 见表 1。

表 1 重复实验中微型光谱仪检测结果

待检浓度 (mmol/L)	天内(n=10)			天间(n=10)		
	均值 (mmol/L)	标准差	CV (%)	均值 (mmol/L)	标准差	CV (%)
79	80.6	1.31	1.63	77.6	2.39	3.08
127	128.4	2.53	1.97	124.9	4.25	3.40

CV 表示变异系数。

2.3 回收率测定 血清氯离子低、中、高值浓度标本的回收率分别为 99.40%、100.90%、98.35%, 其回收率均在有效评价范围内(95%~105%)。

2.4 稳定性实验 试剂在 90 d 内测定结果未见明显偏差, 测定结果未出现明显升高或下降趋势, 说明该试剂在 90 d 内稳定性良好。

表 2 氯离子检测试剂 90 d 内稳定性测定结果($\bar{x} \pm s$)

测定时间(d)	1	15	30	60	90
测定结果(mmol/L)	98.4±2.5	97.9±1.7	97.6±1.2	95.9.0±2.3	96.7±2.2

2.5 干扰性实验 当血清内胆红素小于或等于 586.40 μmol/L、血红蛋白小于或等于 10 g/L 以及三酰甘油小于或等于 12.30 mmol/L 时, 未见明显干扰。

2.6 方法学比较 微型光谱仪干试剂法与全自动生化分析仪

电极法的方法学比较, 见图 1。

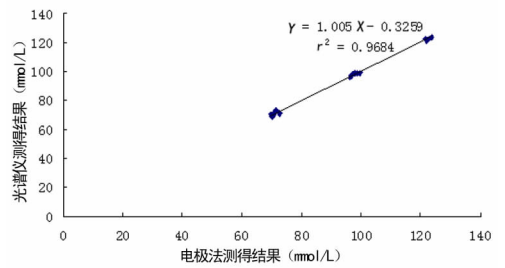


图 1 两种方法的相关性

3 讨论

本组在微型光谱分析仪基础上, 选用了干化学法, 结合自身研制的干试剂和一次性使用的干试剂检测杯(专利号 ZL200710078247.5, 2007-3-1), 建立了一套以干试剂为基础且体积小、耗能少、光谱宽、重复性好等优点的电解质快速检测装置。具有较强的实用性和便携性, 在满足现代战争中机动性、隐蔽性需求的同时, 能够为伤员早期的救治提供可靠、精炼的检验信息, 以加快创伤的转归, 减少人员伤亡。经过多次实验, 逐步确定了试剂配制方法, 并对其反应性能进行了调试。最终, 确立了采用干试剂冻干于检测杯中进行检测, 只需用水或成分简单的稀释液对样品进行稀释, 直接以一次性使用的干试剂检测杯作为比色杯进行透射式比色测定的检测方法。本研究吸取了湿化学法中吸收光度法简便可靠的优点和干化学法中干试剂易于保存及检测的优点, 将干试剂技术应用于微型光谱仪, 自动进行磁力混匀及加热, 孵育后由系统自动在指定波长下进行检测, 通过电脑微处理快速得出结果。该试剂样品用量少, 精密度高, 批内及批间各指标重复性(CV)均在 5% 内, 回收率均在 95%~105%, 且试剂稳定性较好, 检测时间短, 测定结果与全自动生化分析仪具有很好的相关性($r \geq 0.976 9$), 能够满足战场急救、现场快速检验的需求。并且可以用眼直接观察颜色变化, 避免漏检。整套装置微型简便, 是一种适用于战地及基层单位急救快速检测的新方法, 在军事医学中, 该方法极具推广应用的价值。

参考文献

- [1] 张海涛, 王玉萍, 郭晋. 酶法和离子选择电极法测定血清钾、钠的比较[J]. 检验医学, 2007, 32(2): 216-218.
- [2] 席云, 肖刚, 冉烈. 离子选择电极间接法与酶法测定血清钾、钠的比较[J]. 现代医学仪器与应用, 2004, 16(2): 5-6.
- [3] Hiroaki S, Yasuaki M. Integrated microfluidic system for the simultaneous determination of ammonia, creatinine, and urea[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005, 108(22): 700-707.
- [4] Watts P, Haswell SJ. Microfluidic combinatorial chemistry[J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7(3): 380-387.
- [5] 白晓, 李强, 吴杰红, 等. 基于微型光谱仪干化学法检测电解质的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(10): 1265-1267.
- [5] 张春旭, 王伟祥, 高峰. 酶法、化学法与电极法测定血清电解质的方法学对比与评估[J]. 检验医学, 2004, 19(3): 256-257.
- [7] 陈麟凤, 刘景汉. 常用细胞冻干保护剂的特性、作用机制及应用进展[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(6): 500-502.
- [8] Grabowska D, Stadnik M, Chudy J, et al. Architecture and method of fabrication PDMS system for uric acid determination[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 121(20): 445-451.