

• 论 著 •

基于微型光谱仪多指标干试剂急诊快速检测的应用研究*

白 晓¹, 蒲晓允^{2△}, 李 玲³, 张 红¹, 曾宪飞¹

(1. 武警陕西省总队医院检验科, 西安 710054; 2. 第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037; 3. 中国人民解放军二四六医院检验科, 太原 030001)

摘要:目的 探讨多指标干试剂应用于微型光谱仪的可行性。方法 将配制的多指标液体试剂用不同的程序冻干于检测杯中, 封存。加入标本和稀释液后, 经磁力搅拌、加热 10 min 后, 用微型光谱仪同步检测吸光度值, 并进行性能的评价。结果 各指标线性范围、准确性及精密度均基本达到检测要求, 抗干扰性能良好。各指标测定结果与干化学分析仪 Vitros-250 具有良好的相关性($r \geq 0.97$)。结论 多指标干试剂在微型光谱仪上的测定应用结果准确可靠, 检测过程简便, 能够进一步为急救便携式生化分析仪的研发奠定基础。

关键词: 研究; 微型光谱仪; 干试剂; 快速检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)17-1918-02

Application study on the multi-index determination based on minispectrometer with dry reagent*

Bai Xiao¹, Pu Xiaoyun^{2△}, Li Ling³, Zhang Hong¹, Zeng Xianfei¹

(1 Department of Laboratory Medicine, Shaanxi People's Armed Police Forces Hospital, Xi'an 710054, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

3. Department of Laboratory Medicine, Chinese People's Liberation Army 264th Hospital, Taiyuan 030001, China)

Abstract: **Objective** To establish a new assay for the rapid determination of multi-index based on minispectrometer with dry reagent. **Methods** The reagent for multi-index determination was dried in determination-well by different programs and was sealed with smooth plastic film before use. Determination was performed on minispectrometer, after samples and diluents were added into determination-well with dry reagent and were magnetic agitated and incubated at 37 °C for 10 minutes. **Results** The linear range, accuracy and precision of all indexes could meet the demand for clinical analysis, with fine anti-interference performance. There was fine correlation of detection results between constructed system and Vitros-250 analyzer ($r \geq 0.97$). **Conclusion** The constructed detection system could be accurate, reliable and convenient, which might contribute to the field of emergency medicine.

Key words: research; Minispectromete; dry reagent; POCT

为适应突发情况下对伤员的救治保障需要, 满足野外环境下急救设备便携、机动的需求^[1-3], 笔者基于低电压启动的微型光谱仪进行多指标试剂的同步检测, 检测指标包括血红蛋白、葡萄糖、钾、钠、氯、二氧化碳, 并将这几项指标组合在一起, 形成急诊多指标功能检测单元, 通过一次检测获得 6 项检测结果。本文通过对改良后多指标冻干试剂在微型光谱仪上的应用, 对其同步检测的可行性进行探讨, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取第三军医大学新桥医院临床患者血清标本共 30 份。

1.2 主要仪器 采用微型光谱分析仪(重庆大学研制), 波长范围在 360~780 nm, 吸光度线性测定范围为 0.000~3.000; ModulyoD-230 冷冻干燥机(美国 Thermo 公司); 37 °C 恒温箱(上海沪沁设备有限公司); 干化学分析仪 Vitros-250(美国强生公司)。

1.3 主要试剂 参考表 1 及《全国临床检验操作规程》自行配制^[4]。

1.4 试剂的干燥及密封^[5] 选取一套用于微型光谱仪的自制检测杯(试剂杯), 光径为 7 mm。先分别按比例加入化学试剂, 置于-70 °C 冰箱过夜, 于第 2 天加入其余酶试剂, 继续预冻。待其结晶后, 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^[6-7], 于 83 mbar 时取出, 将干燥好试剂

的检测杯用塑胶加热法密封, 并置于放入硅胶的密封袋内保存。

1.5 方法 按比例(见表 2)用微量定量加样器吸取被检测样品, 置于已加入稀释液的试管内。混匀后, 取出干燥好试剂的检测杯, 从上述溶液中吸取试剂终体积 300 μL 到检测杯内进行复溶。将加入标本后的检测杯推入卡槽, 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, 使其恒温 37 °C, 孵育 10 min 后, 各指标自动在指定波长进行检测。

表 1 试剂原理及成分一览表

指标	原理	主要成分
钾	蛋白水解酶法	四苯硼锂, 蛋白水解酶, 氢氧化钠, 添加剂
钠	β-半乳糖苷酶法	β-半乳糖苷酶, 缓冲液及添加剂等
氯	硫氰酸汞法	硫氰酸盐试剂, 赋形剂等
二氧化碳	碳酸酐酶法	碳酸酐酶, 指示剂及添加剂等
葡萄糖	葡萄糖氧化酶法	酶试剂, 自制色原 TBHBA, 添加剂
血红蛋白	氰化高铁血红蛋白法	高铁氰化钾, 氰化钾及离子表面活性剂等

1.6 结果计算 将测定好的标准曲线数据录入微型光谱仪的微处理系统软件中, 自行对应浓度, 打印报告输出。

1.7 统计学处理 实验数据依据性能评价实验, 用百分

* 基金项目: 总装预研课题(51308050223)。 △ 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。

率(%)表示变异系数、回收率及干扰率,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。本实验方法学比较采用的是回归分析,配对 *t* 检验数据统计分析运用 SPSS 11.5 统计软件处理。

表 2 各指标检测波长及样品稀释液比例

指标	波长 (nm)	光径 (mm)	温度 (°C)	稀释液: 样品(μ L)	孵育时间 (min)	磁力混匀 时间(s)
钾	620	7	37	1 500 : 62	3	5
钠	405	7	37	1 500 : 43	1;2*	5
氯	456	7	37	1 500 : 15	5	5
二氧化碳	546	7	37	1 500 : 50	5	5
葡萄糖	505	7	37	1 500 : 8	10	5
血红蛋白	540	7	37	1 500 : 12	—	5

*: 钠离子检测采用速率法,1 min 时测定 A1,2 min 时测定 A2。
—: 无数据。

2 结 果

2.1 检测线性范围测定 参照《全国临床检验操作规程》方法,以临床健康体检者的混合血清为基质,配制成各生化指标高浓度标准液,在 Vitros-250 型干化学分析仪器上测定 10 次取均值;血红蛋白取高值标本,以血细胞五分类仪器重复测定 10 次取均值^[8]。将其依次稀释成相应浓度梯度标准液,分别进行各指标线性范围的确定。测定结果显示各指标回归方程及相关系数为:钾 $Y=0.161 3X+0.007 6, r=0.992 6$;钠 $Y=0.003 9X-0.186 4, r=0.973 0$;氯 $Y=0.003 3X+0.108 3, r=0.974 8$;二氧化碳 $Y=0.011 8X+0.014 7, r=0.963 5$;葡萄糖 $Y=0.080 6X+0.024 0, r=0.994 0$;血红蛋白

$Y=0.004 4X+0.033 6, r=0.992 6$,均能满足临床测定需求。

2.2 准确性测定 分别使用正常范围标准品或质控品作为中值浓度真值;自配低、高浓度定值血清,在 Vitros-250 型干化学分析仪器上测定 10 次取均值,血红蛋白以血细胞五分类仪器重复测定 10 次取均值,作为真值进行测定。每份样本同时测定 3 次,取均值与真值比较计算偏倚系数。实验测定结果显示,各指标测定结果偏倚系数分别为:钾低值 7.47%,中值 4.53%,高值 3.54%;钠低值 6.81%,中值 4.12%,高值 3.99%;氯低值 7.21%,中值 3.17%,高值 5.09%;二氧化碳低值 6.33%,中值 3.59%,高值 9.91%;葡萄糖低值 5.00%,中值 4.26%,高值 4.13%;血红蛋白低值 6.75%,中值 6.87%,高值 2.96%;总体偏倚系数均在 10%以内,低值及高值的偏倚系数相对较大,正常参考值内偏倚系数较小。

2.3 精密度测定 取正常范围标准品或质控品连续测 10 次,表示记录结果并计算其批内变异系数。取正常值标准品或质控品和自配高、低值浓度混合血清标本各一份,分装冷冻,每天取出一份进行测定,连续 10 d,计算其批间变异系数。多项指标干试剂批内变异系数分别为:钾 3.76%,钠 2.95%,氯 3.05%,二氧化碳 4.42%,葡萄糖 2.80%,血红蛋白 2.92%,具有较好的批内重复性;批间变异系数分别为:钾 4.20%,钠 4.76%,氯 3.48%,二氧化碳 6.96%,葡萄糖 4.17%,血红蛋白 4.08%;仅二氧化碳超过 5%,其余指标重复性良好。

2.4 方法对比试验 分别使用干化学分析仪 Vitros-250(血红蛋白由血细胞五分类仪测定标本 30 份)和本方法进行测定,配对 *t* 检验显示本方法与干化学分析仪 Vitros-250 的结果差异无统计学意义($P>0.05, r \geq 0.97$),具有较好的一致性,结果见表 3。

表 3 方法对比试验结果* (mmol/L, $\bar{x} \pm s, n=30$)

方法	钾	钠	氯	二氧化碳	葡萄糖	血红蛋白
干化学仪	4.78±0.97	139.60±4.59	100.61±12.97	24.37±6.55	6.31±3.43	124.91±41.94
本方法	4.72±1.00	139.94±4.80	99.78±12.15	24.78±6.68	6.34±3.47	125.56±42.86

*: 血红蛋白浓度单位为 g/L,与血细胞五分类进行结果对比;本法与对照组干化学分析仪 Vitros-250 测定结果比较, $P>0.05$ 。

2.5 干扰性试验 对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的试验组^[9]。每组样品同时测定 3 次,计算均值进行比较。干扰率在 $\pm 3\%$ 内时视为无干扰。当胆红素在 175.60 μ mol/L 时,二氧化碳的干扰率为 5.88%,其余多数指标在胆红素浓度为 290.4 μ mol/L 时出现明显干扰偏差;当三酰甘油浓度在 5.62 mmol/L 时,血红蛋白的干扰率为 3.80%,三酰甘油浓度为 11.20 mmol/L 时,钾离子测定结果出现明显干扰,其余多数指标均在 15.81 mmol/L 时,出现较大偏差。因此,根据表 15、16 结果与对照组进行比较显示,当血清内胆红素小于 175.60 μ mol/L 以及三酰甘油小于 5.62 mmol/L 时,各项指标干扰百分率在 $\pm 3\%$ 内,未见明显干扰。

3 讨 论

目前,中国临床常用的针对急诊生化项目的测定分析仪器多以美国强生公司的 Vitros-250 为代表^[10]。Vitros 是美国强生公司的干化学分析技术,该技术弥补了传统湿化学分析的不足,具有 40 多种检验项目,虽能为临床提供迅速而准确的报告,但仪器体积太大,不适于野外环境使用。其他一些通过电极法或干式法进行检测的仪器,虽然快速、操作简单、干扰因素少,但电极寿命极短;干式法参比液要经常更换,准确性有待于改善^[11],而且仪器和试剂较昂贵,特别是试剂国内目前还无法

生产,难以实现普及应用。本研究旨在实现上述急救指标检测单元在微型光谱仪上的检测,以达到小型便携式仪器多项目指标测定,并能运用于突发事件的急救现场^[12]。

在本研究中,就干试剂各指标的线性范围而言,钾离子在 2~8 mmol/L,钠离子在 80~180 mmol/L,氯离子在 70~140 mmol/L,二氧化碳在 10~38 mmol/L,葡萄糖在 2~20 mmol/L,血红蛋白在 20~200 g/L,范围内线性良好,其广度均基本覆盖了临床测定需求范围;而就准确性而言,偏倚系数基本在 10%内,虽不够理想,但鉴于实验中一些配件,如自制检测杯,仅初步设计完毕且由厂家手工制作而成,同时在目前的实验中一些必不可少的手工操作步骤,也为实验不可避免地带来一些人为误差,但是在正常参考范围的测定结果准确性相对较高,相信在以后进一步的实验和完善中其准确性定会有所提高。在重复性测定中,各指标批内及批间各指标重复性 CV 均在 5%内,仅二氧化碳批间重复性较差。可能是由于标本易与空气中的二氧化碳达到平衡,pH 测定的不稳定性,以及复溶后的试剂也易发生干扰等因素,造成了二氧化碳检测指间重复性较差。在以后的实验中,如果仪器增加 340 nm 波长的测定,可以对二氧化碳试剂重新选择,从而避免现有试剂以 pH 值进行测定带来的不稳定性等因素。在干扰实验中,(下转第 1922 页)

异性较高的 GA 测定方法,不仅大大简化了测定过程,也提高了检测效率、降低了运作成本^[8]。但临床应用中发现,对于输注高能量氨基酸的患者,检测结果升高。为此,在原有技术基础上开发出液态试剂(GA-L),在提高产品稳定性的同时,加用糖化氨基酸消去体系去除内源性糖化氨基酸对检测结果的影响,同时在血清清蛋白的测定上也进行优化,即利用对氧化性清蛋白特异性更高的 BCP 替代溴甲酚红蓝(BCG),减少球蛋白对测定结果的影响^[9]。然后利用 GA 与血清清蛋白的百分比表示 GA 的水平,从而去除了血清清蛋白水平对检测结果的影响,更适用于低蛋白血症患者。GA 和 HbA1c 均能体现近期的 BG 变化水平,而 GA 所能反应的 BG 变化时间更近,因此可认为 GA 能在 BG 变化最显著时更确切和及时地反映 BG 水平,尤其适用于 BG 波动较大的初诊患者应用降糖治疗时的疗效观察。

本研究显示, Lucica GA-L 试剂盒测定血清 GA 水平,不仅具有良好的精密度(批内 CV<2%,批间 CV<5%)及稀释直线性($r=0.9987$),且干扰因素少,能很好地区分 DM 和非 DM 患者($P<0.001$),同时表现出与 HbA1c、FPG 和 2hBG 良好的相关性($P<0.001$),试验结果显示 GA、HbA1c 与 FPG、2hBG 的 r 分别为 0.745、0.739 和 0.612、0.608。通过对 78 例健康志愿者 GA 的测定,得出 Lucica GA-L 法测定成人 GA 的参考范围为(14.48±2.12)%。综上所述, Lucica GA-L 法测定 GA 不仅简便、快速,且准确、可靠,适用于监测高危人群和 DM 患者近期整体 BG 水平,具有重要临床价值。本研究为能否通过 GA 检测提供早期干预治疗,使 DM 并发微血管病变早期得以控制提供了新的研究方向。

参考文献

[1] American Diabetes Association. Standards of medical care in dia-

(上接第 1919 页)

由于钾离子检测受溶血因素干扰较大,因此笔者仅进行了黄疸及脂血的干扰实验。以测定结果进行干扰率的换算,结果显示,脂血因其散色作用对试剂的干扰较大,在血红蛋白测定中三酰甘油浓度超过 5.62 mmol/L 及在钾离子测定中三酰甘油浓度超过 11.20 mmol/L 时的干扰尤为明显。而胆红素干扰实验结果显示,对二氧化碳测定的干扰较为明显,当其浓度在 175.60 μmol/L 时,二氧化碳测定干扰率为 5.88%,其余指标偏差不大,总体来看试剂的抗干扰性能良好。同时在方法对比实验中,测定结果与干化学分析仪 Vitros-250 具有很好的相关性($r\geq 0.97$),说明本方法是可靠的。

在整体检测过程中,笔者采用了干试剂冻干于微型光谱仪配套的一次性使用自制检测杯内进行测定,使用蒸馏水统一作为稀释液进行样品稀释,并根据所需取相应量已冻干于检测杯中的试剂,直接以检测杯作为比色池进行透射式比色测定。整套系统的检测耗时不超过 15 min,并在测定过程中由系统自动进行磁力混匀及孵育,于指定波长下进行检测,通过电脑微处理快速得出结果,整套装置检测时间短,测定结果有效可靠,能够满足野外急救、现场快速检验需求^[13],同时为进一步研发急救便携式生化分析仪奠定了基础。

参考文献

[1] 蒲晓允. 现场快速检验[M]. 重庆:重庆出版社,2003:2-4.
 [2] 陈水泳. 临床检验仪器的发展趋势[J]. 医疗装备,2008,21(4):5-6.

betes[J]. Diabetes Care,2004,27(Suppl1):S15-35.
 [2] Schleicher ED, Gerbitz KD, Dolhofer R, et al. Clinical utility of non-enzymatic glycosylated blood proteins as an index of glucose control[J]. Diabetes Care,1984,7(6):548-556.
 [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-P User comparison of quantitative clinical laboratory using patient samples: proposed guideline[S]. Wayne,PA:NCCLS,1986.
 [4] Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, et al. Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2005, 68(4): 1554-1561.
 [5] Amore A, Cirina P, Conti G, et al. Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(1): 53-60.
 [6] Cohen MP, Lautenslager GT, Hud E, et al. Inhibiting albumin glycation attenuates dysregulation of VEGFR21 and collagen IV sub-chain production and the development of renal insufficiency[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(2): 789-795.
 [7] Shima K, Ito N, Abe F, et al. High-performance liquid chromatographic assay of serum glycated albumin[J]. Diabetologia, 1988, 31(8): 627-631.
 [8] 吴建华, 刘庆. 糖化血清蛋白(GSP)的自动化测定及临床意义[J]. 微循环学杂志, 2003, 13(2): 26-27.
 [9] 贾珂珂, 李国权, 张捷. 酮胺氧化酶法测定糖化白蛋白的评价[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(10): 1620-1623.

(收稿日期:2011-05-20)

[3] 王前, 郑磊, 张鹏. 战地快速检验的现状和发展趋势[J]. 人民军医, 2005, 48(2): 118-119.
 [4] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社, 1997: 125.
 [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, 2008, 10(33): 1262-1264.
 [6] 赵鹤皋. 冷冻干燥技术与设备[M]. 武汉:华中科技大学出版社, 2005: 10-15.
 [7] Anhorn MG, Mahler HC, Langer K. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients[J]. Int J Pharm, 2008, 363(1-2): 162-169.
 [8] 叶解明. 基质效应及定标方式对氯电极测定的影响[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(1): 16-18.
 [9] 李桂云. 标本溶血对 15 项生化检验结果的影响及分析[J]. 检验医学与临床, 2006, 3(4): 164-165.
 [10] 吴俊琪, 徐瑞龙, 杜忠明, 等. VITROS-250 干式生化分析仪测定结果的比对校正[J]. 检验医学, 2006, 21(3): 285-287.
 [11] Grabowska I, Stadnik D, Chudy M, et al. Architecture and method of fabrication PDMS system for uric acid determination[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 121(20): 445-451.
 [12] 潘德刚. 基层部队半自动生化分析仪使用现状及建议[J]. 医疗卫生装备, 2006, 27(1): 76.
 [13] 管文军. 便携式医学检测仪器的设计[J]. 中国医疗器械杂志, 2002, 26(5): 323-328.

(收稿日期:2011-05-20)