

• 论 著 •

微型光谱仪干试剂法检测血清钾离子的研究*

傅灵媛, 吴杰红, 张志伦, 蒲晓允[△]

(第三军医大学第二附属医院检验科, 重庆 400037)

摘要: 目的 研究一种基于微型光谱仪和干化学试剂技术快速检测血清钾离子浓度的方法。方法 根据酶法制备干粉钾离子试剂, 研究其在微型光谱仪上的检测方法, 并对试剂及仪器的性能进行评价, 进行统计学分析。结果 制备的干试剂结构疏松、溶解性好, 90 d 内反应稳定。用 630 nm 波长检测, 其线性范围为 3~8 mmol/L, 批内变异系数(CV)<4%, 批间 CV<5%, 回收率为 98.5%~106.9%。当血清内胆红素小于 290.40 μmol/L, 三酰甘油小于 11.20 mmol/L 时, 无明显干扰。与全自动生化分析仪电极法结果的相关性良好($r=0.978$)。结论 微型光谱仪及干试剂法测定血清钾离子浓度结果准确可靠, 操作简便, 仪器携带方便, 可适用于现场或床旁的快速检测。

关键词: 微型光谱仪; 干试剂; 钾离子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)05-0533-03

Experimental study on the detection of potassium ion based on dry chemistry method with micro spectrometer

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

(Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a new method for rapid detection of potassium ion based on micro spectrometer and dry reagent. **Methods** The dry powder potassium ion reagent was prepared of enzymic method. To study the test method and statistics analysis in the micro spectrometer, and the reagent and the equipment of the two methods were evaluated. **Results** The prepared dry reagents of structures was rarefaction and good solubility, and the dry reagents had good reaction stability for 90 days after being lyophilized. The linear range of potassium ion was 3~8 mmol/L, detecting at 630 nm wave length. The intra-assay coefficient variation (CV) less than 4%, inter-assay CV less than 5%, and the recovery rate from 98.5% to 106.9%. No obvious interference was observed in the determination results under the circumstance that the serum TB was less than 290.40 μmol/L and the TG was less than 11.20 mmol/L. The detection results by this method were well correlated with that of automatic biochemistry analyzer electrodes method ($r=0.978$). **Conclusion** The method is accurate and reliable in determining the serum potassium ion, and its process is simple process and convenient to carry out. Therefore, it can satisfy the fast way to measure serum potassium ion on spot or point-of-care systems.

Key words: micro spectrometer; dry reagent; potassium ion

钾离子(K^+)浓度能直接反应体内的水、电介质的平衡状态, 是临床危重病诊治及现场急救必需开展的检测项目, 目前采用的离子选择电极法由于仪器复杂、检测条件要求高, 不适用于现场检验^[1]。微型光谱仪具有体积小、可低电压启动等优点, 本文对该仪器及其检测钾离子试剂进行研究, 旨在研制适用于现场或床旁的血清钾离子快速检验的仪器和试剂。

1 材料与方法

1.1 仪器与器材 微型光谱分析仪(重庆大学研制), 波长 360~780 nm, 吸光度(A)线性测定值 0.000~3.000。该微型光谱分析仪体积小(15 cm×8 cm×10 cm), 可低电压启动, 具有恒温控制及磁力混匀系统。ModulyoD-230 冷冻干燥机(美国 Thermo)。AU-2700 全自动生化分析仪(日本, Olympus)。

1.2 试剂 参考《全国临床检验操作规程》结合酶法自行配制。试剂主要成分为四苯硼锂、蛋白水解酶、氢氧化钠、添加剂。

1.3 方法

1.3.1 干试剂的制备 按比例将化学试剂和添加剂加入微型光谱仪的检测杯, 于冷冻干燥机真空抽干, 将含有干燥试剂的检测杯置于已放入硅胶的密封袋内 4 ℃保存。

1.3.2 添加剂的选择 直接冷冻干燥液体试剂, 再加入 4 种

添加剂(甘氨酸、木糖醇、右旋糖酐、聚乙二醇)分别进行冻干, 冻干后观察试剂的外观和反应性能。

将初筛选定的添加剂浓度由 10 g/L 加至 20、30、40 g/L, 冻干后加入样品稀释液, 观察效果和反应性。

1.3.3 检测方法 按比例稀释被测样品, 加入到干燥试剂的检测杯进行复溶, 放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, 在 630 nm 波长下进行检测, 10 min 后得到结果。

1.3.4 线性范围测定 将混合血清标准品用去离子水稀释, 配制成各种浓度: 3、4、5、6、7、8 mmol/L, 进行线性范围的测定并绘制标准曲线。

1.3.5 重复试验和回收试验 对高值(5.81 mmol/L)、中值(4.17 mmol/L)2 种浓度的钾离子质控品进行批内检测(每批测定 10 次)和批间检测(每天测定 1 次, 连续测定 10 d)。然后在 3 根试管中分别加入低、中、高 3 种浓度的标准溶液, 进行回收率的测定。

1.3.6 稳定性试验 试剂冻干取出后, 分别于 1、15、30、60、90 d 进行测定, 每次重复测定 10 次。

1.3.7 干扰性试验 建立对照组和试验组, 对照组取无溶血、黄疸、脂血的混合血清样本, 试验组取溶血、黄疸、脂血的血清

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

样本,重复测定 3 次,计算其均值,然后计算干扰值,分析干扰物的干扰程度。

1.3.8 方法学比较试验 收集临床测定为高值、中值、低值共 60 例标本,采集后取血清用-20℃低温保存,然后分别用微型光谱仪和全自动生化分析仪同时进行检测,判断两种方法的一致性。

1.3.9 统计学处理 试验数据用百分率(%)及($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 统计学软件进行配对 *t* 检验和回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 添加剂的优选 冻干后的试剂应具有检测性能,且具备较长保存期和易携带的特性。直接冻干的试剂易塌陷、水溶,不易保存。加入甘氨酸和右旋糖酐其干燥效果未见明显改善,试剂容易吸潮、塌陷。加入聚乙二醇的试剂冻干效果不明显,加入蒸馏水后呈细微颗粒悬浮于液体中,不能完全溶解。加入木糖醇冻干较为明显,能保持固有体积,不易潮解,外观呈白色结晶状,加入蒸馏水后溶解迅速,且加样后有明显浊度变化。

当木糖醇浓度在 20 g/L 时,成型效果好,且对试剂溶解性能没有形成干扰,在加入相应浓度样品后,试剂溶解迅速,对其吸光度进行测定,反应性能趋势良好。

2.2 干试剂的性能测试

2.2.1 稳定性试验 试剂反应性能在 3 个月内未出现明显升高或下降趋势,稳定性能良好,见表 1。

表 1 稳定试验结果 (mmol/L)

测定时间(d)	1	15	30	60	90
$\bar{x} \pm s$	4.99 ± 0.23	5.20 ± 0.15	5.05 ± 0.16	5.23 ± 0.19	5.08 ± 0.16

2.2.2 干扰性试验 当血清内胆红素小于 290.40 $\mu\text{mol/L}$ 及三酰甘油小于 11.20 mmol/L 时,未见明显干扰^[2]。

2.3 微型光谱仪的精密度与准确度测试

2.3.1 检测高、中浓度标准品的结果 批内、批间重复试验中微型光谱仪检测高、中浓度的结果,见表 2。

表 2 重复试验中微型光谱仪检测结果

待检浓度 (mmol/L)	批内(n=10)			批间(n=10)		
	均值 (mmol/L)	标准差 (mmol/L)	CV (%)	均值 (mmol/L)	标准差 (mmol/L)	CV (%)
4.17	4.20	0.09	3.76	4.12	0.20	4.19
5.81	5.83	0.15	2.98	5.78	0.34	4.24

CV: 表示变异系数。

2.3.2 回收率测定 回收试验中微型光谱仪检测低、中、高浓度标本的回收率,均值为 103.2%,见表 3。

表 3 钾离子的回收试验结果

试管	加入前浓度 (mmol/L)	加入后浓度 (mmol/L)	检测浓度 (mmol/L)	回收率(%)
A	0.00	0.00	3.20	—
B	3.36	0.24	3.43	98.5
C	4.17	0.48	3.70	104.2
D	5.81	0.58	3.82	106.9

—: 表示没有进行计算。

2.4 标准曲线 微型光谱仪检测血清 K^+ 的标准曲线,分别用浓度为 3、4、5、6、7、8 mmol/L 的 K^+ 标准液进行定标,其检测吸光度随加入浓度增加而上升的曲线,见图 1。

2.5 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 2。图 2 表示采用一致性分析所作图形的结果,2 种检测方法的相关性较好($r=0.978$)。

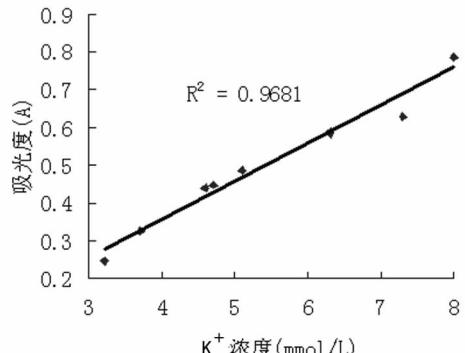


图 1 光谱仪干试剂检测的标准曲线

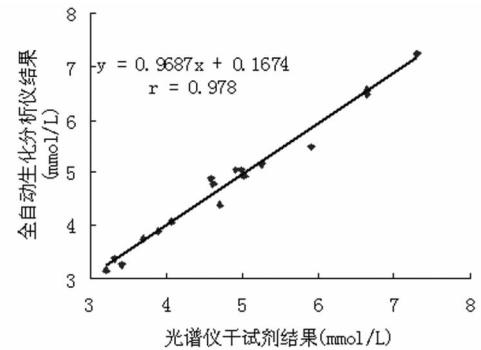


图 2 光谱仪干试剂与全自动生化分析仪的相关性

3 讨 论

K^+ 的主要生理功能是参与细胞内正常代谢,维持细胞内容量、离子、渗透压及酸碱平衡,维持神经肌肉的应激性,维持心肌的正常功能,对于临床十分重要。血中 K^+ 水平升高或降低都影响心肌功能,严重时导致心跳停止,危及生命。

电解质 K^+ 的检测是急救中重要的项目之一,临床现常用的方法是离子选择电极法,而电极法需要稳定的电压及常更换的电极^[3],受较多因素如溶液的 pH 值、离子强度、电极选择系数、干扰离子等的影响^[4],不适于现场快速检测。已有很多实验室逐步倾向使用酶法^[5],但对于实验室以外的钾离子单项目的现场快速检验以及大批测定就不适用^[6]。目前我国临床常用干化学分析技术测定急诊项目,如美国强生公司的 VITRO-250,但其体积太大,参比液要经常更换,准确性有待改善^[7-8],而且仪器和试剂较昂贵,难以达到普及状态。国内有小型的全自动生化分析仪的研制,体积小,具有一定的便携性,不足之处在于试剂不配套、针对性不强、不能做电解质等项目的测定^[9]。

从本试验构建的微型光谱仪干试剂测定可以看出,仪器体积小,具有一定的便携性^[10]。吸取湿化学法中吸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,操作简单。配套的干试剂针对性强,经过多次试验,逐步确定了试剂配制方法。针对直接冻干的试剂冻结不牢固,抽干不彻底,选用一定量的添加剂改善冻干试剂的外观和性能^[11],木糖醇作为添加剂对塌陷、吸潮、水溶问题的效果是比较理想的^[12],最后决定 20 g/L 的木糖醇作为合适的添加浓度,并对其反应性能进行了调试,最终采用干试剂冻于检测杯中进行检测,只需用稀释液对样品进行稀释,直接以检测杯作为比色杯进行透射式比浊测定,省去携带和添加各种液体试剂的麻烦,使测定过程更简化。整套系统在测定过程中由系统自动进行磁力混匀及孵育于预定波长下进行检测,通过电脑微处理快速得出结

果,检测时间短,满足现场快速检验需求^[13]。

重复试验可以反映一个检测方法的重复性,即精密度。本试验中,批内差异较小(表 1):2 个浓度的标准差小于 0.5,并且 2 个浓度的变异系数也均小于 4%;时间重复试验中,无论是标准差还是变异系数都较天内重复略大,标准差均小于 0.5,变异系数均小于 5%。

回收试验可用来衡量一个待检方法的准确度。其方法是将同 1 份未知浓度的样品等量分成 4 份,在第 1 份中加入一定体积的蒸馏水,在第 2、3、4 份中分别加入等体积的低、中、高 3 种浓度的标准 K⁺ 浓度溶液,从而计算出检测值与加入值之间的比值并用百分比表示。本试验中低(中)高 3 种 K⁺ 添加浓度的回收率都在 90%~110% 之间(分别为 98.5%、104.2%、106.9%),平均为 103.2%。

从 K⁺ 的标准曲线(图 1)中可看出,从低浓度开始,反应的吸光度与浓度的变化呈正相关。因此,在 3~8 mmol/L 的区域内,反应都呈一次函数增长模型($r^2=0.9681$),完全可以满足临床标本检测的要求。图 2 反映 2 种试验方法的一致性。图 2 中微型光谱仪干试剂测定与全自动生化分析仪相比较,图形显示大部分的点都存在于直线的两侧。采用一次函数进行曲线拟合^[14-15],所得 $r=0.978$,说明 2 种方法的相关性较好。

综上所述,通过对血清 K⁺ 微型光谱仪与传统的电极法的多方面指标进行方法学评价,可以观察到本研究使用的微型光谱分析仪具有体积小、耗能少、光谱宽、重复性好等优点,极大地克服了常规电极法所需器材昂贵、电极试剂费用较高、不适用于野战环境及场地,不能满足战地及偏远基层地区医疗急救所需的机动、便携的要求等缺点,能够满足检测的实用性和便携性。将干试剂技术应用于微型光谱仪,试剂样品用量少,检测时间短,能够满足现场快速检验。

参考文献

- [1] 张春旭,王伟祥,高锋. 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.
- [2] 罗梅, 朱晓玲, 张迎玖. 液体试剂与干粉试剂酶法测定血清总二氧化碳的实验对比[J]. 检验医学, 2004, 19(6): 511-513.
- [3] 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.
- [4] 顾光煜, 张葵. 离子选择电极分析中的若干问题[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(1): 3-5.
- [5] 传良敏, 黄文芳, 烧绍琴, 等. 内源性干扰物质对酶法测定钾钠氯结果的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(2): 39-40.
- [6] 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.
- [7] Suzuki H, Matsugi Y. Integrated microfluidic system for the simultaneous determination of ammonia, creatinine, and urea[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005, 108(1-2): 700-707.
- [8] 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(2): 445-451.
- [9] Watts P, Haswell SJ. Microfluidic combinatorial chemistry[J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7(3): 380-387.
- [10] 胡松, 温志渝, 梁玉前, 等. 基于连续光谱分析的微型生化分析仪及其相应的临床试验[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(9): 1769-1773.
- [11] 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.
- [12] 张松青, 游鹏程, 郑笈, 等. 木糖醇在医药领域的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(11): 1582-1584.
- [13] 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.
- [14] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 58-73.
- [15] 李平, 李耀峰. 生化检验目前存在问题及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 748-750.

(收稿日期:2010-06-10)

(上接第 532 页)

- [5] Tsuji-Akimoto S, Yabe I, Niiao S, et al. Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS[J]. Neurosci Lett, 2009, 452(1): 52-55.
- [6] Nagai A, Murakawa Y, Terashima M, et al. Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases[J]. Neurology, 2000, 55(12): 1828-1832.
- [7] Sanchez JC, Guillaume E, Lescuger P, et al. Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease[J]. Proteomics, 2004, 4(8): 2229-2233.
- [8] Hansson SF, Simonsen AH, Zetterberg H, et al. Cystatin C in cerebrospinal fluid and multiple sclerosis[J]. Ann Neurol, 2007, 62(2): 193-196.
- [9] Stejskala D, Vavrouskova J, Mares J, et al. Applications of new laboratory marker assays in neurological diagnoses-a pilot study[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005, 149(2): 265-266.
- [10] Kasper M, Braunwald E, Fauci AS, et al. The 16th edition Harrison's principles of internal medicine[M]. Chicago, USA: McGraw-Hill professional, 2005: 2339-2576.
- [11] 史玉泉. 实用神经病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 484-517.
- [12] 王维治, 郭玉璞. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 603-712.
- [13] Ogawa M, Watabe H, Teramoto N, et al. Understanding of cerebral energy metabolism by dynamic living brain slice imaging system with [18F]FDG[J]. Neurosci Res, 2005, 52(4): 357-361.
- [14] Smith D, Pernet A, Hallett WA, et al. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(6): 658-664.
- [15] Schurr A, Payne RS. Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study[J]. Neuroscience, 2007, 147(3): 613-619.
- [16] 王家驷, 舒仁明, 王廷杰, 等. 脑脊液胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 在常见颅内疾病的临床应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 486-487.

(收稿日期:2010-10-10)