

干式生化膜片的制备及其应用

杨惠宇 张 昊 徐美玲 干高龙 陈克乐 于源华*

(长春理工大学生命科学与技术学院 长春 130022)

摘 要 建立了一种快速检测血液中二氧化碳结合力($\text{CO}_2\text{-CP}$)、葡萄糖(GLU)、尿酸(UA)含量的干式生化分析方法。筛选出合适的膜材料作为干片载体,制备干片,用干式生化分析仪检测干片,建立了测定血液中 $\text{CO}_2\text{-CP}$ 、GLU、UA含量的标准曲线,对所建立的方法进行加标回收实验、稳定性实验、批间、批内重复性实验、方法学比较。此法制备的干片颜色梯度明显、显色均匀,测定 $\text{CO}_2\text{-CP}$ 、GLU、UA的线性范围较宽;批间与批内变异系数均小于5%,重复性良好;与临床湿化学检测相比具有良好的相关性,相关系数大于0.99,可应用于临床检测。

关键词 干化学;干片;临床检测;干式生化分析方法

中图分类号:O652; R446

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2015)08-0963-06

DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2015.08.140358

目前,干化学^[1-4]检测技术是现场快速检测^[5]的主要支撑技术,在检验医学中有广阔的应用空间,已作为常规方法在临床检验^[6-7]中广泛应用。早在16世纪人们已经使用石蕊试纸检测液体的酸碱性,这是干化学法的最早应用,18世纪初,英国化学家 Williamprout 使用干式化的试剂检测尿液的pH值,这是干化学试剂在生物体液检测中的最早应用。本文制备的干片为基于反射光度法干片,采用高分子膜材料为试剂载体,通过吸附试剂来制备干片,与传统的湿化学检验方法相比具有操作简单、试剂易保存、检测速度快等优点,数分钟即可检测并报告结果,故适用于急诊标本检测等领域,有取代湿化学法检测的可能性。现在市场上生产干化学分析系统的厂家主要有日本京都爱克来、富士、瑞士罗氏和美国强生。其中市场份额占有最大的是强生,而国内除比较简单的干化学尿液试纸和分析仪外,还没有更多的干化学仪器^[9-10]和试剂载体产品出现,多数依赖进口。

为解决上述问题,本文研究了检测一系列指标的多层膜^[11]生化干片的制备方法,如葡萄糖(GLU)、尿酸(UA)、二氧化碳结合力($\text{CO}_2\text{-CP}$)3种试剂干片,建立了一种快速检测血液中葡萄糖、尿酸、二氧化碳结合力的干式生化检验方法。为干化学分析技术在国内的推广和应用提供方法和技术基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

干式生化分析仪(利用反射光原理自制的全光谱仪器)、日立7180型全自动生化分析仪(日本日立公司);HPX-9162 MBE型电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SPH-211B型恒温培养摇床(上海世平实验设备有限公司);DF-1型集热式磁力搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);MX-F型旋涡混合器(美国SCILOGEX公司);FYY25001-RO型基础应用型纯水机(青岛富勒姆科技有限公司); $\text{CO}_2\text{-CP}$ 、GLU、UA测定试剂盒均购于长春汇力生物技术有限公司;膜材料Grade 17 Chr(层析滤纸)、Grade40、Grade2(whatman公司)、膜材料N6、NLB-045(海宁市正大过滤设备有限公司)、膜材料NLW-100、NLW-80、SSWP(美国密理博(MILLIPORE)公司);标准血清。

1.2 实验方法

1.2.1 高分子膜材料的筛选 通过对膜材料的载水量、通透性、流体扩散速度来进行膜材料的筛选。

2014-10-21 收稿,2015-03-10 修回,2015-05-04 接受

吉林省科技厅资助项目(20140204019SF)

通讯联系人:于源华,教授;Tel:0431-85583025;E-mail:yuyuanhua8888@126.com;研究方向:生物分析检测

1)载水量:载水量的研究主要是计算待筛选的膜单位面积内的饱和载水量,检测方法如下:首先将高分子膜材料裁成 10 mm × 10 mm 大小的正方形,将其完全浸入去离子水中,吸附饱和后取出用滤纸吸干高分子膜材料表面多余的水分,分别称量高分子膜吸饱水前后的质量 $m_{\text{前}}$ 和 $m_{\text{后}}$,计算质量差 Δm ,根据水的密度以及膜的面积可得到高分子膜材料单位面积的饱和载水量。测量 3 次取平均值。

2)流体扩散速度:流体扩散速度即为水在 高分子膜材料中的扩散速度,主要是计算滴加的水扩散到整张膜所需要的时间,滴加的去离子水的量为膜的饱和载水量,判断标准为水扩散到高分子膜的整个表面又没有溢出。根据高分子膜材料的面积和测量时间即可得到单位时间内去离子水在膜中的扩散速度。测量 3 次取平均值。

3)膜通透性:膜材料的通透性即为当高分子膜已经处于饱和水状态下,继续滴加水后,计算一定体积的去离子水透过高分子膜材料所需的时间 t ,测量 3 次取平均值。

1.2.2 干片的制备 CO_2 -CP 检验原理为样品中的二氧化碳结合力在碳酸酐酶作用下,使碳酸氢根分解,引起 pH 值发生变化,借助联合指示剂显色。GLU 检验原理为血清中的葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下,生成过氧化氢,用过氧化物酶将过氧化氢分解出氧的游离基,它将 4-氨基安替比林和酚氧化为红色的醌型化合物。UA 检验原理为血清中的尿酸在尿酸氧化酶的作用下,生成过氧化氢,用过氧化物酶将过氧化氢分解出氧的游离基,它将 4-氨基安替比林和酚氧化为红色的醌型化合物。

正常人体中二氧化碳结合力、葡萄糖、尿酸的浓度范围分别为 23 ~ 29 mmol/L、3.9 ~ 6.2 mmol/L、208 ~ 428 $\mu\text{mol/L}$ 。只要不在这个范围内无论是偏高还是偏低均属于病变浓度。

干片的制备采用逐次滴加的方式,不同种类干片制备过程中各参数也不同,制备 CO_2 -CP 干片时,试剂加样量为 40 μL ,干燥温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,加样次数为 5 次;制备 GLU 干片时,试剂加样量为 40 μL ,干燥温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,加样次数为 6 次;制备 UA 干片时,试剂加样量为 40 μL ,干燥温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,加样次数为 8 次。

1.2.3 干片标准色阶的制备 将二氧化碳结合力、葡萄糖、尿酸标准液按浓度梯度滴加到干片上,显色后用数码相机拍摄,图像经 photoshop 软件处理后分别得到标准色阶。

1.2.4 干式生化分析方法标准曲线的建立 使用全光谱干式生化分析仪测量二氧化碳结合力、葡萄糖、尿酸标准梯度溶液与各自干片反应后的反射光相对强度值,分别建立与反射光相对强度之间的函数关系,作为测量 3 种待测物质浓度的依据。

1.2.5 方法学评价 方法学评价主要包括加标回收实验、稳定性实验、重复性实验(批间和批内)和方法学比较。

2 结果与讨论

2.1 高分子膜材料的筛选

对层析滤纸、Grade2(定量滤纸)、Grade40(无灰级定量滤纸)、N6(尼龙膜)、SSWP 滤膜(混合纤维

表 1 膜性能总结
Table 1 Summary of film properties

Flim	Aperture/ μm	Capacity/($\mu\text{L}\cdot\text{mm}^{-2}$)	Speed/($\text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	Permeability			
				$T_{\text{single}}/\text{s}$	$T_{\text{double}}/\text{s}$	$T_{\text{NLW-80}}/\text{s}$	$T_{\text{NLW-100}}/\text{s}$
Grade40	8	0.177	0.018	2.09	3.07	1.36	1.23
Grade2	8	0.178	0.025	1.68	2.13	1.66	1.50
N6	6	0.076	0.46	8.05	16.58	6.93	3.21
NLW-045	0.45	0.083	0.17	5.59	11.13	4.21	3.66
SSWP	3	0.153	0.106	2.53	5.98	6.15	5.38
Grade17Chr	—	0.76	0.02	2.785	4.49	3.43	2.38
NLW-80	80	—	—	1.22	2.21		
NLW-100	100	—	—	1.055	2.03		

Note: $T_{\text{NLW-80}}$ 、 $T_{\text{NLW-100}}$ represent the different films covered with NLW-80 and NLW-100; T_{single} 、 T_{double} represent the permeability of the single film and the double file.

素酯)、NLB-045(尼龙表面膜)、NLW-80、NLW-100(尼龙网状膜主要用来帮助试剂扩散)等几种膜材料的载水量、流体扩散速度、通透性的研究如表 1 所示。

高分子膜材料的筛选一般在载水量较高的前提下,选择水扩散速度较快、通透性较好得膜材料,因为膜的载水量越高吸附试剂越多,能检测到待测物的浓度越低,所制备的干片越灵敏;水在膜中的扩散速度越快,说明样品在膜中的扩散速度越快,使用这种膜制备的干片反应越迅速;处于水饱和状态下的高分子膜,继续向其上滴加蒸馏水,渗透得越快表示通透性越好。综合以上 3 种因素,考虑选择层析滤纸为反应层,NLW-100 为扩散层制作 CO₂-CP、GLU、UA3 种干片。

2.2 干片的标准色阶

图 1 为 3 种干片的标准色阶图。从图 1 可以看出,3 种干片显色均匀、色差明显,达到前期应用的目的。

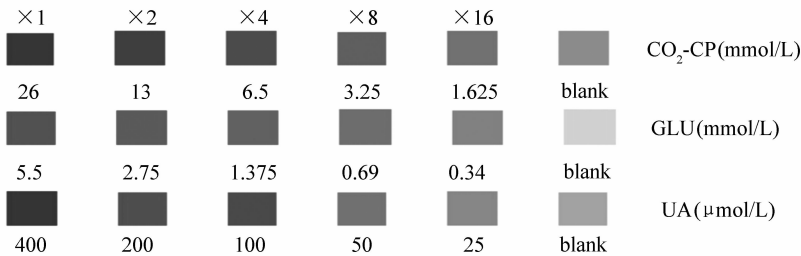


图 1 二氧化碳结合力、葡萄糖和尿酸标准色阶
Fig. 1 Standard color class of the CO₂-CP, GLU and UA dry slide

2.3 干式生化分析法的标准曲线

此法制备干片的标准曲线横坐标为待测指标浓度,纵坐标为反射光强度,CO₂-CP、GLU、UA 所用标准品浓度分别为 26、5.5 和 400 μmol/L;检测 3 种不同指标所选择的波长分别为 580、490 和 580 nm;测量温度均为 37 ℃;检测时间分别为 60、60 及 20 s。图 2 即为干式生化分析方法测定标准曲线。标准曲线的建立是以标准品为样本进行检测,建立标准品浓度与反射光强度之间的函数关系,由于与传统的透射光检测不同,干片的检测方法为反射光度法,因此所建立的标准曲线为对数标准曲线。

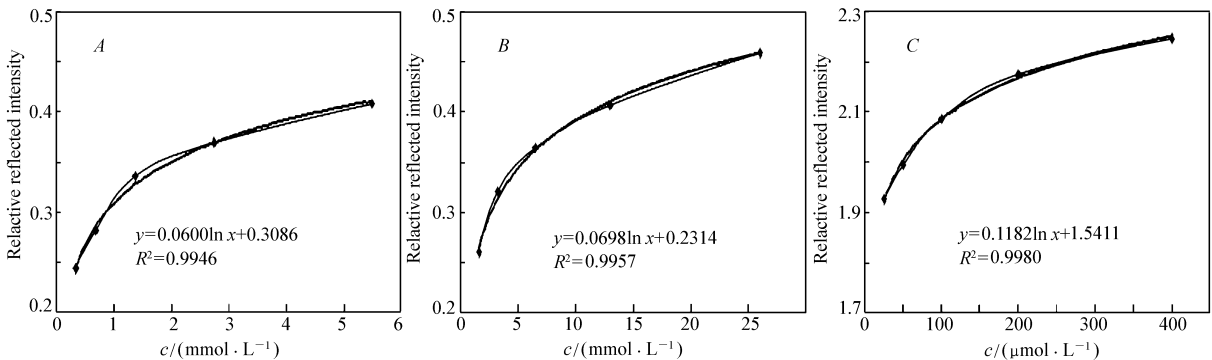


图 2 干式生化分析法测定 GLU(A)、CO₂-CP(B)、UA(C)的标准曲线
Fig. 2 Standard curve of analysis of GLU(A), CO₂-CP(B) and UA(C) by dry chemistry method

2.4 方法学评价

2.4.1 加标回收率及相对标准偏差 以全自动生化分析仪测定阴性血清为样本,做加标回收实验,结果如表 2 所示,干式生化分析法测定 CO₂-CP 加标回收率为 101% ~ 105%,相对标准偏差(RSD)在 3.77% ~ 4.89%;测定 GLU 加标回收率为 102% ~ 104%,相对标准偏差(RSD)在 3.80% ~ 4.96%;测定 UA 加标回收率为 101% ~ 104%,相对标准偏差(RSD)在 3.14% ~ 4.61%,表明该方法具有可行性。

表 2 干式生化分析法加标回收率和标准偏差 (RSD)
Table 2 Recoveries and RSD of dry chemistry method for CO₂-CP, GLU and UA

Serum sample	Measured concentration/ (mmol·mol ⁻¹)	Spiked concentration/ (mmol·L ⁻¹)	Average measured concentration/(mmol·L ⁻¹)	Recovery/%	RSD/% (n=3)
CO ₂ -CP	5.78	5	11.53	115	3.77
		10	15.95	102	4.89
		15	20.96	101	4.58
GLU	1.03	0.5	1.54	102	3.80
		1.0	2.05	102	4.96
		3.0	4.14	104	4.61
UA	61.34×10 ⁻³	50×10 ⁻³	112.07×10 ⁻³	101	4.61
		100×10 ⁻³	165.66×10 ⁻³	104	4.38
		200×10 ⁻³	267.43×10 ⁻³	103	3.14

2.4.2 稳定性 以日立 7180 全自动生化分析仪测定血清为样本, 分别在第 1、15、30 d 用干化学法测定 1 次, 评价所制备的干片在一个月内是否稳定。测得 CO₂-CP、GLU、UA 浓度的平均值分别为 25.37、4.78 和 0.325 mmol/L, 标准差为 1.2178、0.1802、0.0130, 变异系数为 4.8%、3.7%、4.0%, 均小于 5%, 证明本方法在一个月内稳定性良好。

2.4.3 批内、批间重复性 用建立的干化学法对高、低值标准血清重复测定 20 次, 计算浓度均值、标准差、变异系数, 见表 3, 该方法测定 CO₂-CP、GLU、UA 高值、低值的批间、批内变异系数均小于 5%, 在允许范围内。

表 3 批内、批间重复性实验结果
Table 3 Reproducibility test of intra and inter assay

Serum sample	Intra/inter average concentration/(mmol·L ⁻¹)	Intra/inter SD (n=20)	Intra/inter CV/%
CO ₂ -CP high-values	43.71/29.86	1.9397/1.0749	4.1/3.6
CO ₂ -CP low-values	32.47/22.83	1.2046/0.8847	3.71/3.7
GLU high-values	8.35/6.09	0.264/0.2801	3.2/4.6
GLU low-values	7.31/4.58	0.2193/0.1694	3/3.7
UA high-values	0.514/0.436	0.018/0.0281	3.5/5
UA low-values	0.364/0.237	0.0094/0.00924	2.6/3.9

2.4.3 方法学比较 分别对干化学法与全自动生化分析仪检测数据比较, 每个样品测定 5 次, 取其均值。将测定的各项的反射光相对强度值代入相应的标准曲线中, 得到浓度值, 再计算其平均值, 即得到干化学法的浓度平均值。全自动生化分析仪测定 CO₂-CP、GLU、UA 三项指标选择的波长分别为 546、510、505 nm, 反应温度均为 37℃, 样品加样量分别为 5、3、8 μL。对比数据见图 3。

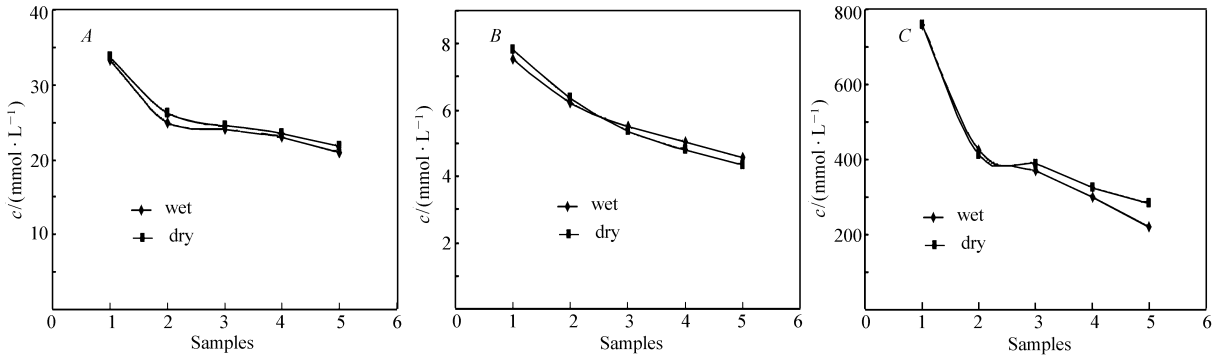


图 3 临床检验与干化学法测定 CO₂-CP(A)、GLU(B)、UA(C) 的比较结果图
Fig. 3 Comparison results between clinical examination and dry chemistry for analysis of CO₂-CP(A), GLU(B) and UA(C)

综上,由于干化学检测方法为半定量检测方法,精密程度无法与医院大型仪器相比,由图可知,干化学法与医院临床日立 7180 全自动生化分析仪的检测结果显示趋势大体一致,相关系数均大于 0.99,因此可以达到前期的应用目的。

3 结 论

干化学与湿化学相比具有简便、快捷、样本用量少等优点,干片可用于医院、战场、边远山区等,操作简单,无需医护人员即可使用。本文研究了 CO₂-CP、GLU、UA 3 种干片的膜材料筛选、制备方法并建立了一种测定人体中 CO₂-CP、GLU、UA 三项指标浓度的干式生化分析方法。结果显示此法显色均匀、颜色梯度明显、线性范围较宽、稳定性良好、批内批间精密度均在允许范围内,与湿化学方法^[12-14]相比具有良好的相关性,可广泛的应用于临床,具有很好的应用前景。关于成本问题,目前只是建立初步的方法学,技术成熟以后可进行批量生产,将进一步降低成本。本法使用的检测试剂盒是市场上技术成熟的检测试剂盒,是针对本实验的检测项目而购买,该检测试剂盒在生产的过程中已经进行了相应的防干扰措施,除了检测项目,其他物质并不会与该检测试剂发生反应,因此并不会对本实验产生任何干扰影响。

参 考 文 献

[1] Bowden R G, Kingery P M, Long L. Precision of a Dry-chemistry Method of Lipid Screening [J]. *Public Health*, 2006, **120** (6):572-576.

[2] Yamada T, Nishino S, Takayuki Takubo T. Simple High-Density Lipoprotein Cholesterol Assay Based on Dry Chemistry [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, **320**:79-88.

[3] Flatland B, Breickner L C, Fry M M. Analytical Performance of a Dry Chemistry Analyzer Designed for in-clinic Use[J]. *Vet Clin Pathol*, 2014, **43**(2):206-217.

[4] Arimoto S, Kamei A, Yasukawa T, et al. Development of Highly Sensitive Electrochemical Measurement on Dry Chemistry Measuring Electrode Potential Shift[J]. *Electrochim Acta*, 2013, **108**:776-780.

[5] Krska R, Molinelli A. Rapid Test Strips for Analysis of Mycotoxins in Food and Feed[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, **393** (1):67-71.

[6] Sutton A, Dawson H, Hoff B, et al. Analyte Comparisons Between 2 Clinical Chemistry Analyzers[J]. *Can Vet J*, 1999, **40** (4):55-60.

[7] Casas-Hernández A M, Aguilar-Caballos M P, Gómez-Hens A. Application of Time-resolved Luminescence to Dry Reagent Chemical Technology[J]. *Anal Chim Acta*, 2002, **452**(2):169-175.

[8] Hagren V, Crooks S R, Elliott C T, et al. An All-In-One Dry Chemistry Immunoassay for the Screening of Coccidiostat Nicarbazin in Poultry Eggs and Liver[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, **52**(9):2429-2433.

[9] DING Honghui. A Comparative Study on the Detection of Blood Biochemical Item by the Method of Dry Reagent Chemistry and Full-automatic Enzyme[J]. *Zhejiang Prev Med*, 2005, **17**(3):14-15 (in Chinese).
丁红辉. 干化学试纸法与全自动生化分析仪酶法生化项目检测的比较分析[J]. *浙江预防医学*, 2005, **17**(3):14-15.

[10] Capitán-Vallvey L F, Arroyo Guerrero E, Berenguer Merelo C, et al. A Test Strip for Chloride Analysis in Environmental Water[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **381**(5):1101.

[11] PENG Yousheng, CAI Pingjin, CHEN Siying, et al. Multi-layer Dry Slides Method in the Determination of Serum Alcohol [J]. *Mod Prev Med*, 2007, **7**(34):1341-1344 (in Chinese).
彭又生, 蔡平金, 陈思颖, 等. 多层膜干片法测定血清酒精浓度的方法学探讨[J]. *现代预防医学*, 2007, **7**(34):1341-1344.

[12] SUN Jian, JIANG Tingwang, CAO Xian. Comparative Analysis on Blood Results Between Dry Chemical Method and Liquid Chemical Method[J]. *Lab Med Clin*, 2013, **12**(10):24 (in Chinese).
孙健, 蒋廷旺, 曹娴. 干湿化学法检测血糖结果的对比分析[J]. *检验医学与临床*, 2013, **12**(10):24.

[13] Lanevski A, Kramer J W. Comparison of Two Dry Chemistry Analyzers and a Wet Chemistry Analyzer Using Canine Serum [J]. *Vet Clin Path*, 1996, **25**(1):10-13.

[14] ZHU Bo, ZHOU Jiehua, XUE Qi, et al. Study on Rapid-Detection of Lead in Fresh and Lively Seafood by Test Paper[J]. *Chinese J Health Lab Technol*, 2010, **20**(10):2417-2419 (in Chinese).
祝波, 周杰华, 薛琦. 试纸法快速检测鲜活海产品中铅的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, **20**(10):2417-2419.

Preparation and Application of the Dry Type Biochemical Film

YANG Huiyu, ZHANG Hao, XU Meiling, GAN Gaolong, CHEN Kele, YU Yuanhua *

(*School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China*)

Abstract A dry biochemical method for simple and rapid measurement of carbon dioxide-combining capacity, glucose and uric acid in the blood was developed. Appropriate polymeric membrane materials were selected as dry slide carrier. Standard curves were established for the quantization of carbon dioxide-combining capacity, glucose and uric acid by using the dry biochemical analyzer. The dry biochemical analysis method was evaluated by linear test, stability experiment, repetitive experiment and the comparison with wet chemistry method. The three dry slides prepared above have obvious color gradient and color uniformity. The linear range of dry biochemical method established is wide. This method also has a good repeatability as its interassay and intraassay coefficient of variation are all less than 5%. The dry chemistry method and wet chemistry method shows good correlation with the correlation coefficient more than 0.99. The dry slide can be applied to the clinical detection.

Keywords dry chemistry; dry slide; clinical detection; dry biochemical method

Received 2014-10-21; Revised 2015-03-10; Accepted 2015-05-04

Supported by Jilin Provincial Science and Technology Department of Funding Project(No. 20140204019SF)

Corresponding author: YU Yuanhua, professor; Tel: 0431-85583025; E-mail: yuyuanhua8888@126.com; Research interests: biological analysis and detect