

以响应面设计为基础提高果糖胺试剂盒检测性能

张宝华¹,王军峰²(1.上海市虹口区江湾镇街道社区卫生服务中心 200434;
2.上海执诚生物技术有限公司 201204)

【摘要】 目的 通过研究影响果糖胺试剂盒检测性能的因素来提高产品质量。**方法** 首先使用 Plackett-Burman 试验设计对可能影响果糖胺试剂盒分析性能的因素进行筛选,然后通过爬坡试验探索出关键因素的响应区域,最后通过响应面试验完成试剂盒配方的优化。**结果** 试剂优化的配方为:pH=10.3,氯化硝基四氮唑蓝(NBT)0.26 mmol/L,叠氮化钠 0.55 g/L,碳酸盐 0.1 mol/L,氯化钠 0.1 g/L,表面活性剂 1.1 mL/L。使用该配方的果糖胺试剂盒与某进口试剂盒检测结果差异无统计学意义。**结论** NBT 和表面活性剂对试剂的质量有明显影响,说明该研究方法能够有效地提高果糖胺试剂盒质量。

【关键词】 果糖胺; 试剂盒,诊断; 响应面设计

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)18-2196-03

Promoting performance of fructosamine kit based on response surface methodology ZHANG Bao-hua¹,WANG Jun-feng² (1. Sanitary Service Center of Jiangwan Community in Hongkou District, Shanghai 200434, China; 2. Shanghai Zhicheng Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201204, China)

【Abstract】 Objective To optimize the fructosamine liquid agent quality by analyzing the influencing factors of kit performance. **Methods** A series of experiments design methodologies, including Plackett-Burman (PB) experiment design, steepest ascent, response surface methodology(RSM), were employed to study the kit components about its influences on measurement linearity. **Results** The optimized reagent formula was 0.1 mol/L NaCO₃, 0.26 mmol/L NBT, 1.1 mL/L surfactant, 0.55 g/L NaN₃, and pH of the liquid was 10.3. It was proved that the kit with the above formula had excellent measurement performance as the given imported kit. **Conclusion** The two factors affecting the kit quality remarkably are the concentration of NBT and surfactant. The results reveal that the proposed methods could be employed to promote the quality of the in vitro diagnosis (IVD) product efficiently.

【Key words】 fructosamine; reagent kits, diagnostic; response surface methodology

糖化血清蛋白(glucosylated serum proteins, GSP)测定又称果糖胺测定^[1],自 1983 年 Johnson 等^[2]建立还原法测定果糖胺之后,现在临床多用此法测定血清果糖胺的含量来监测 GSP 的含量。关于 GSP 测定的临床意义目前已有较多报道^[3-5],但少有使用响应面设计方法优化试剂盒检验性能的研究。试验设计具有计算简便、试验次数少、可靠性高、适用面广等特点,因此成为现代获取信息的通用工具,是目前优化和应用数学领域中最活跃、应用成果最显著的分支之一^[6]。近年来各种试验软件的推出,使试验设计更加高效和方便,目前常用的试验设计软件包括 SAS、SPSS、minitab 和 Design expert 等。本文使用 Design expert 软件完成试验的设计和结果分析。Plackett-Burman(PB)试验是筛选影响因子的试验设计,主要针对因子数较多,且未确定众因子相对于响应变量的显著性时采用的试验设计方法。响应面设计(response surface methodology, RSM)是数学和统计学的完美结合,是模型化和数据分析有用的工具^[7]。爬坡试验主要是根据试验的一次回归结果,确定响应值增加的最陡方向(切线方向),一步一步沿着这个方向做验证试验,确定出后面的二次回归的中心点(只有当回归设计的中心点在响应面附近时,二次回归方程拟合的效果才更好)。从这个意义上看,爬坡试验其实相当于响应面试验的预试验,为响应面试验探索影响因子的水平范围。本文首先通过使用 PB 试验设计完成析因分析,然后通过爬坡试验确定 RSM 试验的水平范围,最后通过 RSM 确定果糖胺试剂盒的配方。

1 材料与方

1.1 材料与仪器 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、胆酸钠、尿酸酶等。岛津 UV 2450 分光光度计;日立 7170 生化分析仪。

1.2 测量方法 取冷藏混合样本进行梯度稀释,使样本中 GSP 相对浓度为 1.0、0.5、0.25、0.125。将 3 mL 试剂加入比色皿后,再将比色皿放到岛津 UV2450 分光光度计检测槽中 37℃温浴 10 min,然后取 100 μL 样本加入到上述比色皿中,再用移液枪抽吸 10 次混匀,然后立即在 550 nm 波长下进行动力学分析。取 5 min 结束时的吸光度值与开始时的吸光度值的差值作为相应样品的检测结果,然后以吸光度值和相对浓度进行线性相关分析,以相关系数(r)作为响应值。体外诊断试剂最重要的一个指标是准确度,对于定标曲线呈线性的果糖胺试剂而言,线性相关是准确度高的保证条件,因此本文使用线性相关系数作为优化的靶值。

1.3 PB 试验 目前影响果糖胺试剂质量的关键因素是缓冲液特性、NBT、表面活性剂及抗菌剂加量等。本文先根据文献确定了 NBT 加量为 0.25 mmol/L^[8],再试验不同缓冲液对试剂检测线性的影响,试剂保质期可以用 37℃加速试验进行估计,将 7 d 后的线性 r 作为筛选标准。

2 结 果

2.1 不同缓冲液对 GSP 测定线性的影响 见表 1。由表 1 可知,碳酸盐缓冲液和 Tris 缓冲液线性接近,磷酸盐线性较差。本文选择碳酸盐作为缓冲液主成分,

表 1 不同缓冲液对 GSP 测定线性的影响

缓冲液	200%	100%	50%	25%	12.5%	r ²
磷酸盐缓冲液	0.032 2	0.020 8	0.012 7	0.005 3	0.004 3	0.972 8
碳酸盐缓冲液	0.051 1	0.032 1	0.018 2	0.008 8	0.006 4	0.984 2
Tris 缓冲液	0.040 4	0.025 3	0.015 2	0.007 1	0.005 2	0.982 5

2.2 析因分析 确定了缓冲液主成分后,缓冲液其他组成都可能对试剂的质量产生影响,因此需要通过 PB 试验确定显著因素,即做析因分析,PB 试验设计因素水平见表 2、3。

表 2 PB 试验设计因素水平表

因素列*	因素名称	水平 1	水平 2
A	缓冲液(pH)	10.0	10.5
B	NBT(mmol/L)	0.15	0.26
C	叠氮化钠(g/L)	0.5	1.0
E	胆酸盐(g/L)	0.0	15.0
F	尿酸酶(U)	0.0	1 000.0
G	表面活性剂(ml/L)	1.0	2.0
I	氯化钠(g/L)	0.1	1.0

注:*表示 D、H J K 列为虚拟项。

表 3 PB 试验设计表

run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	响应值*
1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.825
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.825
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.861
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	0.825
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.879
6	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.624
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.951
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.834
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.825
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.842
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	0.618
12	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.801
13	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.914
14	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0.981
15	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.776
16	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.980

注:*表示以 r 的 10 次方作为响应值。run 表示试验序号。A、B、C、D、E、F、G 为因素名称代码;D、H、J、K 为虚拟项(见表 2)。

按照因素水平表配制试剂,然后计算出线性系数,再使用 Design expert 软件计算出 3 个因素之间的关系模型(见公式 1)。 $Y=0.836\ 3+0.049\times B-0.042\times C-0.065\times G$ (公式 1)。

根据方差分析可知 NBT 和表面活性剂是显著因素。另外,分析结果表明模型显著($P=0.009\ 9$),但是失拟(lack of fit $P=0.001\ 2$)也显著,说明 PB 试验线性模型拟合不足,可能因为目前线性模型并不能完全表征数据间的关系,需要进行非线性拟合^[6]。

叠氮化钠(NaN_3)对结果影响不显著,但是比另外几项因素影响略显著,在 PB 设计精确度不高的情况下,在模型中考虑这一因素可以避免漏取显著项。

2.3 爬坡设计 在进行响应面试验之前不仅需要确定显著因素,而且也需要将这些因素缩小到一个合适的搜索区域(响应区域),本文通过爬坡试验来确定这 3 个因素的响应区域(表 4)。

表 4 爬坡试验因素水平表

因素浓度	试验序号					
	1	2	3	4	5	6
NBT(mmol/L)	0.250	0.260	0.270	0.280	0.290	0.300
NaN_3 (g/L)	0.700	0.550	0.400	0.250	0.100	0.000
表面活性剂(ml/L)	1.200	1.100	1.000	0.900	0.800	0.700
r^2	0.993	0.996	0.991	0.971	0.953	0.922

通过本次试验确定了响应面试验中的因素和水平,NBT 为 25~27 mmol/L; NaN_3 为 0.4~0.7 g/L;表面活性剂为 1.0~1.2 mL/L。

2.4 响应面试验设计 通过 RSM 对配方中 NBT、 NaN_3 和表面活性剂水平作进一步研究,其他条件保持不变:pH=10.3,碳酸盐 0.1 mol/L,氯化钠 0.1 g/L。根据响应面调序及响应值设计(表 5)完成试验。 $Y=6.505+0.16a+0.401b-0.657c-0.982a^2=1.407b^2-3.319c^2$ (公式 2)。

表 5 响应面设计及响应值

run	A	B	C	响应值 Y*
1	1	1	-1	2.6
2	-1	-1	-1	2.1
3	1	-1	1	1.6
4	0	0	-1.682	-2.6
5	-1	1	1	1.5
6	0	0	0	5.5
7	0	-1.682	0	0.5
8	1.682	0	0	1.6
9	1	-1	-1	2.8
10	0	0	1.682	-5.5
11	0	0	0	7.1
12	-1	-1	1	0.0
13	1	1	1	3.5
14	0	0	0	6.8
15	0	0	0	5.1
16	-1	1	-1	3.2
17	0	0	0	8.6
18	-1.682	0	0	2.5
19	0	1.682	0	1.2

注:run 表示试验序号。*响应值 $Y=(r^2-0.99)\times 1\ 000$ 。 r^2 是线性相关系数。A、B、C 表示因素名称代码(表 2)。

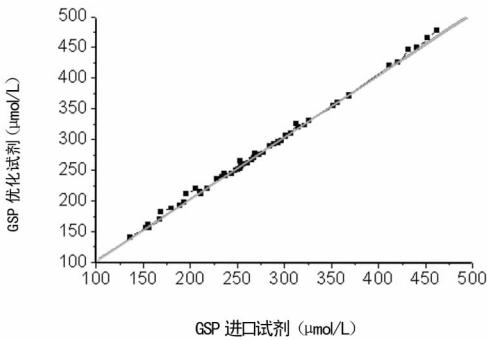


图 1 与进口试剂比对结果

方差分析显示模型显著,失拟不显著,通过模型计算,得到的最高值与 5 个中心点的线性平方和的平均值一致,因此中心点基本是最优点。

2.5 与国外试剂比对分析 按照 pH=10.3,NBT 0.26 $\mu\text{mol/L}$, NaN_3 0.55 g/L,碳酸盐 0.1 mol/L,氯化钠 0.1 g/L,表面活性剂 1.1 mL/L 配制试剂,然后在日立 7170 生化分析仪上与某国外同类试剂进行比对分析:样本量 4 μL ,结果见图 1。

3 讨 论

3.1 PB 试验设计

3.1.1 缓冲液 pH 在 10.0~10.5 水平以下,对试剂的线性和

热稳定性没有显著影响。

3.1.2 NBT 和表面活性剂对线性和热稳定性有显著影响, NaN_3 对结果影响不显著, 但是比另外几项因素影响略显著。本次 PB 试验模型显著, 但是失拟现象也比较严重, 因此需要进一步拟合, 在这种精确度不高的情况下, 应该在 PB 及以后的试验中考虑 NaN_3 的影响。

3.2 响应面试验结果表明 (1) 在当前考查水平内, 3 个因素之间没有显著的交互作用, 模型为二次非线性模型。(2) NaN_3 主要的作用是抗菌剂, 可防止试剂中有微生物繁殖, 优化后的加量为 0.55 g/L, 本实验通过无菌培养, 没有发现试剂中有微生物, 因此这个加量是可行的。(3) 不同配方检测结果的线性 r 很接近, 为了使响应变化更明显, 本实验在 PB 设计和响应面设计时对响应值进行了不同的处理。PB 设计时, 响应值取线性 r 的 10 次幂, 在响应面设计时, 响应值 $Y = (r^2 - 0.99) \times 1000$ 。(4) 在实验过程中发现是否添加胆酸盐和尿酸酶效果不显著, 因此本实验在响应面设计过程中没有添加这两个因子, 但这两个因子或许对试剂的其他方面有影响, 这将在以后的试验中进行分析 and 验证。(5) 从反应原理看, 关键反应物是 NBT, 其添加量达到完全反应的加量后, 不应该对试剂的线性产生影响, 但是本试验却证明, 当其添加量超过某一数值时, 平方项的影响将越来越明显, 使试剂的线性下降, 导致这一现象的原因可能是多方面的, 如底物抑制等。

3.3 比对分析 通过与国外某试剂进行比对分析, 结果表明, 经过配方调整的试剂检测结果与进口试剂有很高的相关性 ($r=0.998$), 证明用优化的配方配制的试剂在某些检测性能上达到了同类产品的要求。

综上所述, 本产品属于体外诊断试剂, 要保证其分析方法和分析过程的高特异性、高准确性、可重复性及长期稳定性, 仍

需要进行长期和大量的实验研究。本次实验使果糖胺试剂盒的检测线性明显提高, 说明利用 PB、爬坡和 RSM 等试验设计可以提高工作效率和保证试验结果的可靠性。

参考文献

- [1] 韩志钧, 黄志峰, 卢业成, 等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2005.
- [2] Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine; a new approach to the estimation of serum glycosylprotein; an index of diabetic control[J]. Clin Chim Acta, 1983, 127 (1): 87-95.
- [3] 钟飞燕, 余斌杰, 曲颖蓓, 等. 果糖胺测定方法影响因素探讨[J]. 中山医科大学学报, 1994, 15(4): 311-315.
- [4] 钟飞燕, 余斌杰, 陈志勇. 自动化测定果糖胺实验条件与方法学评价[J]. 中山医科大学学报, 1994, 15(2): 146-149.
- [5] 李洪臣, 沈轶, 朱双珠, 等. 血清果糖胺的试验研究及临床应用[J]. 综合临床医学, 1993, 9(4): 201-203.
- [6] 任露泉. 回归设计及其优化[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 15.
- [7] Montgomery DC. Design and anyalysis of experiments[M]. USA: Wiley, 2004: 405.
- [8] 张秀云, 徐辉, 李才. 果糖胺测定标准参照物的合成及果糖胺测定的临床意义[J]. 吉林医学, 2003, 24(3): 217-218.

(收稿日期: 2011-04-18)

(上接第 2195 页)

3.4 行为学测试 CUMS 模型小鼠主要表现为快感缺失, 但研究表明, CUMS 模型小鼠在其他方面也有抑郁行为, 如探索性行为减少、睡眠障碍^[8]以及行动迟缓等^[9]。因此, 造模后的小鼠, 在开场测试、强迫游泳实验和悬尾实验中的行为与正常未造模小鼠有明显差异。

根据对穴位注射 SNAP 有效性的探究实验, 在造模后、治疗前, 三组造模小鼠之间差异无统计学意义。在此前提下分别对三组造模小鼠进行 5 周 SNAP 治疗、麻醉、生理盐水注射, 结果三者在开场测试、强迫游泳实验、悬尾实验中差异均无统计学意义。因此, 可以得出结论, 在百会、双侧肾俞、心俞、后三里、内关、三阴交 11 个穴位进行 5 周注射相应剂量(三阴交、内关注射 SNAP 实验, 3 μL , 其余穴位注射 5 μL)的 SNAP 对 CUMS 抑郁模型小鼠无治疗效果, 即该实验证明穴位处产生 NO 不是针刺治疗抑郁症的机制。

(此实验全部在上海交通大学生命科学技术学院李胜天副教授的实验室完成, 指导老师是李胜天和王婷。其中关于穴位治疗的部分因为需要较深的专业知识和技能, 所以是由王婷老师完成。在此表示感谢!)

参考文献

- [1] 郭章华. 刘公望教授针灸治疗抑郁症经验[J]. 上海针灸杂志, 2008, 27(5): 1-2.
- [2] 程坤, 颜红, 段可杰. 针灸治疗抑郁症的临床与机理研究进展[J]. 中国针灸, 2005, 25(3): 48-50.
- [3] 张志军. 一氧化氮、活性氧与针灸治疗——针灸刺激引起

的细胞应激应答与基因转录调节[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2001, 23(5): 272-277.

- [4] Blokland A, Lieben C, Deutz NE. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat[J]. J Psychol, 2002, 16(1): 39-49.
- [5] 王艳, 刘继文, 连玉龙. 抑郁模型大鼠海马 S100 β 蛋白的表达研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(1): 16-18.
- [6] Mao QQ, Xian YF, Sui PL, et al. Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain[J]. Behav Brain Res, 2010, 210: 171-177.
- [7] 朱小波, 沈莉. 卡介菌多糖核酸穴位注射对反复呼吸道感染患儿 120 例临床疗效观察[J]. 河北医学, 2006, 12(12): 1298-1299.
- [8] Cheeta S, Ruigt G, van Proosdij J, et al. Changes in sleep architecture following chronic mild stress[J]. Biol Psychiatry, 1997, 41: 419-427.
- [9] D'Aquila PS, Brain P, Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression[J]. Physiol Behav, 1994, 56: 861-867.

(收稿日期: 2011-03-10)