

文章编号: 1006-4710(2011)01-0112-04

生化分析仪的误差分析与建模

陈清海^{1,2}, 黎海文¹, 吴一辉¹, 郝鹏¹

(1. 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 为了明确影响生化分析仪精度的四大误差源即定位误差、光学系统噪声、加样误差、温度波动与仪器精度之间的关系,以生化分析仪对 TP(总蛋白)项目的测试为例,对这四大误差源与测试误差之间的关系一一进行了分析,发现定位误差对吸光度的影响极小,最后建立了仪器总误差的合成模型和仪器光学系统允许噪声的模型。

关键词: 生化分析仪; 吸光度; 误差分析; 光学系统波动

中图分类号: TH789 文献标志码: A

The Error Analysis and Modeling of Automatic Chemistry Analyzer

CHEN Qinghai^{1,2}, LI Haiwen¹, WU Yihui¹, HAO Peng¹

(1. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;

2. Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: In order to find out the relationships among the four error sources, namely, locating error, noises of optics system, sampling error and temperature fluctuations, and the accuracy of the instrument, the TP test is taken as a clue, each relationship of them is analyzed and it is found that the affection of the locating error is too small and can be ignored. The total error model and the model of the allowed noise of the optics system of the instrument are established in this paper.

Key words: chemistry analyzer; absorbance; error analysis; optics system fluctuations

全自动生化分析仪是将生化分析中的取样、加试剂、混合、保温、比色、结果计算等步骤组合在一起自动进行操作的分析仪器。全自动生化分析仪广泛地应用于医药、食品、环境医学、临床等领域,尤其在临床中,它通过对血液或其他体液中总蛋白、尿素氮、血红蛋白、葡萄糖等数十种生化指标浓度的测定,对器官功能做出正确的评价,从而为治疗方案的制定提供依据。

生化分析仪的精度决定了分析结果的准确性。现代对生化分析仪精度的分析大多是采用试验测定从而估计影响因素的方式,鲜有系统性的理论依据。本文从理论分析入手,结合实验,对生化分析仪的误差进行详细的分析,得出估算结果总误差的计算模型。

1 原理及系统方案

生化分析仪的原理是基于比尔定律,该定律的数学公式描述为:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon b C \quad (1)$$

式中 A 为吸光度, I_0 为入射光强度, I 为透射光强度, ε 为摩尔吸光系数, b 为光程, C 为摩尔浓度。可见,溶液的吸光度与溶液的浓度是成正比的,这就是生化分析仪定量分析最基础、最根本的依据。

采用三维软件 Solidworks 建立的生化分析仪系统结构模型如图 1 所示,比色杯放置在比色杯架中,光源置于比色杯架中心,其射出的光经准直后透过比色杯进入光谱仪,数据处理系统采集并处理光强

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: 国家 863 计划基金资助项目(2006AA04Z367); 国家 863 计划重点基金资助项目(2007AA042102)。

作者简介: 陈清海(1984-),男,湖北天门人,硕士生。E-mail: qh_chen2011@126.com。吴一辉(1965-),女,浙江温州人,博士,研究员,博导,研究方向为应用光学。E-mail: Yihuiwu@ciomp.ac.cn。

数据,最后得出吸光度,进而得出溶液浓度。

医药行业标准规定,临床项目 TP(总蛋白)的批内精密度要求是:用规定的样本和试剂重复测定 20 次,所得 20 次的吸光度的变异系数不大于 2.5%^[2]。变异系数的计算公式如下:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$, \bar{X} 为吸光度 20 次测量值的平均值, X_i 为每次的实测吸光度值, n 为测定的次数(此处为 20), i 为测定的序号。

由于隔热圈在光谱仪和光源之间的部位有一个通光孔,导致此处散热较其他地方剧烈,造成位于隔热圈内部各处的比色杯里的溶液温度不一致,为了消除温度差异带来的影响,比色杯架在采样之外的时间处于旋转状态,这样会引入定位误差,即同一个比色杯重复多次定位在测试位时其位置不尽相同,存在偏差。

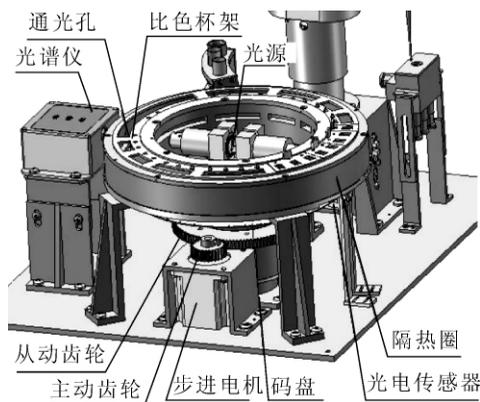


图 1 生化分析仪三维实体模型

Fig. 1 3D entity model of the biochemical analyzer

2 系统的误差分析

对于生化分析仪来说,结果的偏差来自于多个方面,如偶然误差、人为误差、试剂的方法学误差以及机器的因素等,其中机器本身的因素即物理误差是影响分析结果的主要因素。对机器因素各方面误差的分析,主要是通过研究其对吸光度的影响来进行的。

由式(1)可知,影响吸光度准确性的物理因素有:①光程 b (由比色杯架的定位误差决定);②光强 I_0 和 I (由光学系统决定),具体包括光源、CCD(电荷耦合器件)和 ADC(模数转换器)等;③溶液浓度 C (由进样误差决定),若进样量与规定的

进样量不同,则相当于使样本浓度相对于理论值增加或减小;此外,生化反应需要在一定温度范围内进行,因此温度波动也是一个重要的影响因素。据此,现主要分析比色杯架定位误差、光学系统噪声、加样误差以及温度波动对仪器分析结果的影响。

2.1 比色杯架的定位误差

比色杯架定位误差的存在对吸光度的影响主要体现在光程上。如图 2 所示,定位不准确时,光线非垂直入射,造成光程增加,从而使得吸光度增加,影响测试结果的准确性。

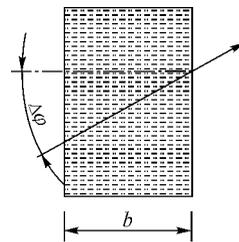


图 2 定位误差对光程影响图

Fig. 2 Positioning error's effect on optical path

由式(1)及图 2 知,由定位误差引起的吸光度的变化率为:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta b}{b} = \frac{b' - b}{b} = \frac{b}{\cos \Delta \varphi} - b = \frac{1}{\cos \Delta \varphi} - 1 \quad (3)$$

式中, $\Delta \varphi$ 为由总定位误差转换成的比色杯架的转角误差。

比色杯架的定位是由光电传感器的信号来控制的,当需要定位的定位点的狭缝达到光电传感器处时,传感器检测到光信号,然后发送信号给单片机,单片机接收到信号后停止发送脉冲信号给驱动器,这样步进电动机停止转动进入保持状态。这种方式的定位由码盘和光电传感器做反馈控制,定位误差与传动系统中码盘前的环节(电机、齿轮、轴系)无关。定位时,有两种极端情况,一种是码盘上的狭缝刚过光电传感器光信号接收面的边缘,传感器接收信号,步进电机停止转动;另一种是定位前的一个脉冲时码盘的狭缝刚好在光电传感器光信号接收面的边缘,需再多走一个脉冲。

本系统所用电机为 SERVODYNAMICS 公司生产的 MT57STH52-3008A 型步进电机,其固有步距角为 1.8° ,为使电机转动更平稳,将固有步距角进行 64 细分。于是定位误差的最大值为步进电机转过 1 个步距角时相应码盘的转角,即 $\Delta \varphi = \frac{1.8^\circ}{64 \times i}$ (i 为传

动比) 此值极小, 代入公式(2) 后得到的吸光度相对误差几乎为零。因此, 由定位误差引起的吸光度误差可以忽略不计。

2.2 光学系统噪声的影响

光学系统的噪声主要包含光源电源的电压波动、光电转换元件 CCD(电荷耦合器件) 的噪声、ADC(模数转换器) 电压基准的波动以及 ADC 转换误差等, 是光学系统本身固有的特征。

由式(1) 可知:

$$\Delta A = \frac{1}{\ln 10} \left(\frac{\Delta I_0}{I_0} - \frac{\Delta I}{I} \right) \quad (4)$$

式中 ΔI_0 与 ΔI 即为光学系统的波动(噪声), 显然它们服从同一正态分布 $N(0, \sigma_{\text{lamp}}^2)$, 且相互独立, 则 ΔA 服从正态分布 $N\left(0, \left(\frac{1}{I_0^2} + \frac{1}{I^2}\right) \left(\frac{\sigma_{\text{lamp}}}{\ln 10}\right)^2\right)^{[3]}$, 其标准差为:

$$\sigma_1(A) = \frac{\sigma_{\text{lamp}}}{I_0 \ln 10} \sqrt{1 + 10^{2A}} \quad (5)$$

式中 $\sigma_1(A)$ 即为光学系统的噪声引起的吸光度误差的标准差, σ_{lamp} 为相对光强标准差。

式(5) 表明, 增大 I_0 有助于减小误差。实际测试时 I 为加入样本反应后透过比色杯和反应液的出射光强; 而 I_0 指的是试剂的空白光强, 即未加入样本前透过试剂和比色杯的出射光强。因此可以通过挑选透射率高的比色杯增加 I_0 , 从而减小 $\sigma_1(A)$ 。

2.3 加样误差及其对测试结果的影响

生化分析仪工作时测试参数中样本和试剂的量是按特定反应设置好的, 如果量本身不准, 结果的重复性也就无从谈起, 因此机器加样的准确性是至关重要的。如式(1) 所示, 溶液的吸光度是由溶液浓度决定的, 由于进样误差的存在, 溶液浓度较理论值发生了变化, 光的透过率也随之变化, 即吸光度较理论值发生了改变, 亦即引起吸光度误差。由式(1) 得:

$$\Delta A = \varepsilon b \Delta C \quad (6)$$

又因为 $\Delta C = \frac{\Delta V}{V} C$, $C = \frac{A}{\varepsilon b}$, 所以:

$$\Delta C = \frac{A}{\varepsilon b} \times \frac{\Delta V}{V}$$

将上式代入式(6) 得:

$$\Delta A = \frac{A}{V} \Delta V$$

于是有:

$$\sigma_2(A) = \frac{A}{V} \sigma(V) \quad (7)$$

式中 $\sigma_2(A)$ 即为由加样误差引起的吸光度误差的

标准差, V 为规定的加样量, ΔV 为加样误差, 单位为 μL , A 为理想情况下的吸光度。

式(6) 表明, 由加样误差引起的吸光度误差与加样误差呈正比关系。

2.4 温度波动的影响

由于生物化学反应需要在一定的温度下进行, 故恒温系统的稳定性、准确度直接影响测试结果。

假定在一个较小的温度范围内, 反应后溶液的吸光度与温度有如下关系:

$$A = A_0 + k \Delta T \quad (8)$$

式中 A_0 为 37°C 下反应液的吸光度, ΔT 为相对于 37°C 的温度变化量, k 为吸光度随温度变化的平均斜率(可能是常数也可能是变化的数, 取决于吸光度与温度的关系, 当吸光度与温度呈线性关系时 k 为常数, 除此以外 k 为非常数)。

由式(8) 可知, 吸光度波动为 $\delta_{\text{lim}_3}(A) = k \Delta T$ 。假定温度波动服从均匀分布^[4], 则吸光度波动的标准差为:

$$\sigma_3(A) = \frac{k \Delta T}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

3 误差的合成与分析

由上述分析可得由定位引起的吸光度误差可忽略不计, 因此, 系统的误差来源于光学系统的噪声、加样误差以及温度波动。

对于光学系统噪声引起的吸光度误差可由式

$$(5) \text{ 来给出, 即 } \sigma_1(A) = \frac{\sigma_{\text{lamp}}}{I_0 \ln 10} \sqrt{1 + 10^{2A}}.$$

对于加样误差引起的吸光度误差, 可由式(7)

$$\text{来给出, 即 } \sigma_2(A) = \frac{A}{V} \sigma(V).$$

对于温度波动引起的吸光度误差可由式(9) 来

$$\text{给出, 即 } \sigma_3(A) = \frac{k \Delta T}{\sqrt{3}}.$$

由于光学系统的噪声、加样误差和温度波动三者相互独立, 则可将三种误差按标准差合成为系统的总吸光度误差的标准差:

$$\sigma(A) = \sqrt{\sigma_1^2(A) + \sigma_2^2(A) + \sigma_3^2(A)}$$

即:

$$\sigma(A) =$$

$$\sqrt{\left(1 + 10^{2A}\right) \frac{\sigma_{\text{lamp}}^2}{I_0^2 \ln^2 10} + \left(\frac{A}{V} \sigma(V)\right)^2 + \frac{k^2 (\Delta T)^2}{3}} \quad (10)$$

式(10) 即为仪器测试误差标准差的合成模型, 此模

型也适用于其他同类仪器。

4 实验验证

针对 $\mu\text{BC-100}$ 型全自动生化分析仪,以 TP 项目的测试为例,对以上误差合成公式进行验证。在自动进样、重复定位、自动温控的条件下,对 TP 项目重复做 10 次测试,实验结果如下。

表 1 10 次 TP 项目测试结果
Tab.1 Test results of ten times TP

测试次数	吸光度			
1 ~ 5	0.266 01	0.267 20	0.268 15	0.269 48
6 ~ 10	0.261 21	0.259 12	0.266 39	0.255 58
平均值	0.263 55	标准差	0.006 42	变异系数 2.44%
I_0	1 840.42	理论值	0.265 60	

由实验测得,本生化分析仪的各个误差项的标准差如表 2 所示。

表 2 各个误差项的标准差
Tab.2 Standard deviation of errors

误差项	光学系统的噪声	进样误差 / μL	温度波动 / $^{\circ}\text{C}$
标准差	0.87	0.186	0.448 8

对 TP 项目,实验测得吸光度随温度变化的系数 $k = 0.006 4$ 。

由以上三项误差按照总误差的合成公式合成的总误差 $\sigma(A) = 0.005 2$,与由实验结果算得的标准差 0.006 42 相差不大,占到了实际标准差的 81%,说明总误差的合成公式基本合理。

另外,生化分析仪的行业标准对生化分析仪的加样误差和温度波动都有明确的要求^[2],但是对于光学系统的噪声却没有一个明确的规定,而是隐含在其他要求中,这样就造成了仪器设计者对仪器光学系统的允许噪声性能指标的模糊。

为了改变这一现象,使仪器设计者对所要设计的仪器的光学系统的允许噪声水平有一个清楚直观的认识,给设计者在光学系统电路的设计过程中提供理论依据,缩短开发时间,降低开发成本,现利

用式(11)对光学系统噪声进行反求。

由式(10)得:

$$\sigma_{\text{lamp}} = I_0 \ln 10 \sqrt{\frac{\left(\frac{\sigma(A)}{A}\right)^2 - \left(\frac{\sigma(V)}{V}\right)^2 - \frac{k^2(\Delta T)^2}{3A^2}}{\frac{1 + 10^{24}}{A^2}}} \quad (11)$$

若式(11)中, $\frac{\sigma(A)}{A}$ 、 $\frac{\sigma(V)}{V}$ 、 ΔT 都在行业标准的规定值以内,则 σ_{lamp} 即为光学系统的允许噪声的标准差。

5 结论

1) 使用码盘和光电传感器做反馈控制,将固有步距角为 1.8° 的步进电机进行 64 细分的条件下,比色杯架的定位误差对测试结果影响极小,可以忽略。

2) 给出了光学系统噪声、进样误差以及温度波动各自与其引起的吸光度误差之间的关系。

3) 分别建立了吸光度总误差和光学系统的允许噪声的数学模型。误差分析结果及数学模型的建立对掌握生化分析仪器的性能,进而为仪器改进提供了可靠的理论依据,亦为同类分析仪器的设计提供有利的参考。

参考文献:

- [1] 李昌厚. 紫外可见分光光度计 [M]. 北京: 化学工业出版社 2005.
- [2] 国家食品药品监督管理局. YY/T 0654-2008 中华人民共和国医药行业标准 [S]. 北京: 中国标准出版社 2008.
- [3] 盛骤, 谢式千, 潘承毅. 概率论与数理统计 [M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社 2001.
- [4] 毛英泰. 误差理论与精度分析 [M]. 北京: 国防工业出版社, 1982.

(责任编辑 王卫勋)