

• 检验技术与方法 •

# 血清总胆红素参考方法的建立及其不确定度评估

吴立山, 沈敏, 徐峰, 王圣康

(宁波美康生物科技股份有限公司参考实验室, 浙江宁波 315104)

**摘要:**目的 建立血清总胆红素(T-BIL)参考方法, 评价其性能, 并评估其测量结果不确定度。方法 根据国际医学检验溯源联合委员会(JCTLM)公布的相关文献建立参考实验室内部的血清总胆红素参考方法, 对方法的线性、精密度和准确度进行评估, 测量结果不确定度参照 GUM 文件进行评估。结果 总胆红素标准曲线线性方程为:  $Y=0.00750X-0.00308$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性范围 0~200 mg/L; 测量血清样本的相对标准偏差(CV)小于 1.0%; 测量 IFCC-RELA 样本, 结果在等效范围内, 相对标准不确定度[urep(c)]小于 2.0%。结论 成功建立了血清总胆红素参考方法, 可用于血清总胆红素项目的量值溯源和标准化, 为血清总胆红素常规检测系统向参考方法/参考物质溯源提供有效途径。

**关键词:**胆红素; 实验室技术和方法; 分光光度法, 紫外线

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0205-03

## Establishment and uncertainty evaluation of reference methods of serum total bilirubin

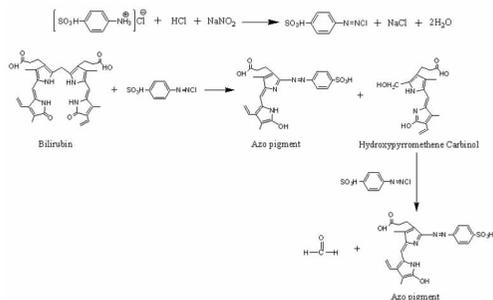
Wu Lishan, Shen Min, Xu Feng, Wang Shengkang

(Reference Laboratory, Meikang Biotechnology Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang 315104, China)

**Abstract:** Objective To establish the reference methods of serum total bilirubin(T-Bil), and evaluate its analytical performance and uncertainty for measurement results. Methods According to the relative literatures of JCTLM, the reference method was established. The linearity, precision, and accuracy of the methods were evaluated and the uncertainty of the result was evaluated according to the GUM 2000. Results The calibration curve for total bilirubin was linear in the concentration range from 0—200 mg/L with a correlation coefficient of 0.9999 under the optimum experimental conditions(the linear equation was  $Y=0.00750X-0.00308$ ,  $R^2=0.9999$ ) and the imprecision was less than 1.0%. The results of the method were located within the limits of equivalence in the IFCC ring trail for reference laboratories and the relative expanded uncertainty was less than 2.0%. Conclusion The reference method of total bilirubin was successfully established and can be used for traceability and standardization. It may provide an effective way for routine testing of total bilirubin traceable to the reference method/reference material.

**Key words:** bilirubin; laboratory techniques and procedures; spectrophotometry, ultraviolet

血清总胆红素(T-BIL)分直接胆红素和间接胆红素, 是由衰老红细胞被破坏后产生出来的血红蛋白衍化而成, 在肝内经过葡萄糖醛酸化的称为直接胆红素, 未在肝内经过葡萄糖醛酸化的称为间接胆红素<sup>[1]</sup>。T-BIL 检测是临床重要检测项目, 对诊断肝脏或胆道疾病具有重要作用<sup>[2]</sup>。人们通过改进 Jendrassik-Grof 法建立了血清总胆红素测定的新方法<sup>[3-4]</sup>。该法主要原理是在咖啡因试剂存在的情况下, 胆红素与重氮苯磺酸反应生成偶氮胆红素。该反应发生在胆红素分子 B 环和 C 环之间的亚甲基碳原子上, 形成一分子的偶氮胆红素和 Hydroxypyromethene Carbinol, 与重氮苯磺酸之间进一步反应形成第二分子的偶氮胆红素。最后加入碱性酒石酸溶液, 使颜色不稳定的紫红色偶氮胆红素(530 nm)在咖啡因存在下转化为稳定的蓝色偶氮胆红素(598 nm)。反应方程如下<sup>[5]</sup>。



该法后来被国际医学检验溯源联合委员会(JCTLM)认定为参考方法, 用于胆红素项目的量值溯源。因此, 在参考实验

室内建立血清总胆红素参考方法, 对实现临床检测结果的准确性和可比性具有非常重要的意义<sup>[6-7]</sup>。本研究根据 JCTLM 的要求建立血清总胆红素参考方法, 对方法的性能和测量结果不确定度进行评估, 以期用于 T-BIL 项目的量值溯源和标准化。

### 1 材料与方法

**1.1 仪器** Cary 100 紫外可见分光光度计(Agilent, USA)、1524 型点温计(FLUKE, USA)、XS205DU 型分析天平(METTLER TOLEDO, Switzerland)、移液器(Eppendorf AG, Germany)、棕色容量瓶(ASONE, Japan)。所用仪器均通过相关部门鉴定或参照参考实验室内部文件校准。

**1.2 试剂** 胆红素(SRM916a)购自美国国家标准与技术研究院(NIST); 浓盐酸、氢氧化钠、碳酸钠、牛血清清蛋白(BSA)组分五、二甲基亚砜、Tris-Base、亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、酒石酸钾钠、醋酸钠、苯甲酸钠、EDTA 二钠盐、咖啡因等均购自 Sigma 公司; 国际参考实验室室间比对样本(两个浓度水平: RELA-A 和 RELA-B)由 IFCC 提供。实验室用水为超纯水。

### 1.3 方法

**1.3.1 试剂的配制** 依据参考文献<sup>[4]</sup>要求配制所需的试剂, 包括咖啡因试剂、碱性酒石酸、亚硝酸钠溶液(5 g/L)、对氨基苯磺酸溶液(5 g/L)、重氮试剂、Tris-base 缓冲液(0.1 mol/L)、BSA 溶液(40 g/L)。

**1.3.2 标准的配制** 胆红素标准空白: 将 2.0 mL 的二甲基亚砜和 4.0 mL 0.1 mol/L 的碳酸钠溶液混匀, 转移至 200 mL 容量瓶内。平衡容量瓶和 40 g/L 的 BSA 溶液至 20 °C, 加

40 g/L 的 BSA 溶液(20 ℃)至刻度线。贮存于 2~8 ℃, 稳定 3 d。

胆红素标准溶液(200 mg/L): 准确称取 40 mg 胆红素标准物质于 10 mL 小烧杯内, 加入 2.0 mL 的二甲基亚砜, 避光条件下轻轻地摇晃使之均匀分散开来。在胆红素粉末分散开后加入 4.0 mL 0.1 mol/L 的碳酸钠溶液, 充分混匀。当溶液变为暗红色透亮时转移至 200 mL 棕色容量瓶内。平衡容量瓶和 40 g/L 的 BSA 溶液至 20 ℃, 加 40 g/L 的 BSA 溶液(20 ℃)至刻度线。避光贮存于 2~8 ℃, 稳定 3 d。

工作标准液: 将胆红素标准溶液和胆红素标准空白在室温平衡 30 min, 分别移取 0.0、1.0、2.5、5.0、7.5 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 用标准空白定容至刻度。配制成浓度为 0.0、20.0、50.0、100.0、150.0、200.0 mg/L 的标准工作液。

1.4 测定程序 样本测定步骤如表 1 所示。

1.5 结果计算 样本测试前按 1.4 程序测定胆红素工作标准液, 可得到胆红素浓度和校正吸光度  $Y(A_{test}-A_{blank})$  的工作曲线  $Y=a+bX$  ( $a$  为截距,  $b$  为标准曲线的斜率), 将待测样本的校正吸光度  $A$  代入上述工作曲线中即可得到待测样本中 T-BIL 的浓度。测量结果的不确定度参照 GUM 文件进行评

估<sup>[5]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 T4BIL 参考方法的性能评价

2.1.1 线性 根据 1.4 节方法测定工作标准液, 结果如表 2 所示。从表中可以看出, 各浓度工作标准检测浓度与理论浓度的差值均小于 2.0 mg/L, 符合 Doumas 参考方法的要求。以理论浓度为横坐标, 校正吸光度  $A$  为纵坐标作图(见图 1), 标准曲线的线性方程  $Y=0.00750X-0.00308$ ,  $R^2=0.9999$ 。斜率  $b$  在 0.00749~0.00771 之间, 截距  $a < \pm 0.005$ ,  $R^2 > 0.999$ , 符合 Doumas 参考方法的要求。

表 1 样本吸光度的测定步骤

| 试剂                                       | Test 管(mL) | Blank 管(mL) |
|--|------------|-------------|
| 咖啡因试剂                                    | 4.0        | 4.0         |
| 标准/样本                                    | 0.5        | 0.5         |
| 碱性酒石酸                                    | 3.0        | 3.0         |
| 置于玻璃试管中封口, 充分混匀                          |            |             |
| 重氮试剂                                     | 1.0        | /           |
| 对氨基苯磺酸溶液                                 | /          | 1.0         |
| 轻轻混匀后室温静置 60 min(避光), 立即在 598 nm 处检测吸光度。 |            |             |

表 2 总胆红素标准曲线测定结果

| 标准浓度(mg/L) | 空白吸光度   | 测定吸光度   | 校正吸光度   | 检测浓度(mg/L) | 浓度差值(mg/L) | 参考方法要求(mg/L) | 结果 |
|------------|---------|---------|---------|------------|------------|--------------|----|
| 0          | 0.033 2 | 0.035 1 | 0.001 9 | 0.66       | +0.66      | < 2.0        | 合格 |
| 20         | 0.034 7 | 0.181 6 | 0.146 9 | 20.01      | +0.01      | < 2.0        | 合格 |
| 50         | 0.034 7 | 0.403 0 | 0.368 3 | 49.54      | -0.46      | < 2.0        | 合格 |
| 100        | 0.036 0 | 0.776 2 | 0.740 2 | 99.15      | -0.85      | < 2.0        | 合格 |
| 150        | 0.037 1 | 1.161 5 | 1.124 4 | 150.40     | +0.40      | < 2.0        | 合格 |
| 200        | 0.038 4 | 1.536 4 | 1.498 0 | 200.24     | +0.24      | < 2.0        | 合格 |

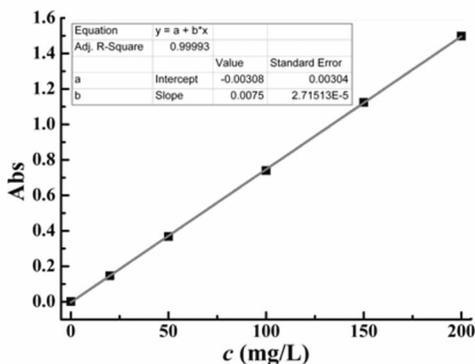


图 1 胆红素标准曲线

2.1.2 精密度 取 4 份不同梯度的新鲜血清, 平行测定 9 次, 实验结果表明 4 份血清的相对标准偏差(CV)均小于 1.0%, 说明该方法测定血清样本具有良好的精密度。

表 3 2011 年 IFCC-RELA 实验对比结果<sup>c</sup>

| 样本            | 测定次数 | 测定结果(mg/L) <sup>a</sup> | 参考结果(mg/L) <sup>b</sup> | 结果 |
|---------------|------|-------------------------|-------------------------|----|
| 2011 年 RELA-A | 10   | 38.82±0.92              | 38.85±2.14              | 合格 |
| 2011 年 RELA-B | 10   | 22.65±0.88              | 21.94±1.21              | 合格 |
| 2012 年 RELA-A | 10   | 45.80±1.09              | 44.96±2.47              | 合格 |
| 2012 年 RELA-B | 10   | 27.10±0.95              | 27.53±1.51              | 合格 |

<sup>a</sup>: 测量均值±扩展不确定度; <sup>b</sup>: 国际参考实验室均值, 等效限±5.50%, 由 IFCC 提供; <sup>c</sup>: 摘自 IFCC-RELA 主页(宁波美康:087): <http://www.dgkl-rfb.de>; 81/。

2.1.3 准确度 采用上述方法测定 2011 年和 2012 年 RELA

样本(连续测定 2 d, 每天测定 5 次。结果见表 3)。IFCC-RELA 是由国际临床化学联合会(IFCC)主办、德国临床化学和实验医学协会(DGKL)承办的全球最具权威的参考实验室能力验证<sup>[16]</sup>。从表 4 可以看出, 本实验室建立的参考方法测定 RELA 样本结果均在合格范围内, 表明本实验室建立的参考方法符合 Doumas 参考方法要求。

### 2.2 测量结果的不确定度评估

2.2.1 被测量的数学模型 血清总胆红素的含量  $c$ (mg/L) 按下列公式计算:

$$c = \frac{(A_1 - A_0) - b_0}{k} \times f_c$$

式中,  $A_1$ : 样本未校正的吸光度;  $A_0$ : 样本空白的吸光度;  $b_0$ : 校正曲线的截距;  $k$ : 校正曲线的斜率;  $f_c$ : 标准溶液浓度修正因子。

设  $A = A_1 - A_0$ , 则最终得到的被测量的数学模型为:

$$c = \frac{A - b_0}{k} \times f_c$$

2.2.2 不确定度的来源 测量不确定度的来源有样本的吸光度( $A_1$ )、样本空白的吸光度( $A_0$ )、校正曲线拟合(包括斜率  $k$ 、截取  $b_0$  和拟合引起的吸光度不确定度)、标准溶液浓度(包括标准物质称量、定容、稀释、再定容)和测量重复性。由于温度效应影响极小, 可以忽略。取样体积、时间等因素已在重复性中体现, 故不单独考虑这些因素。

2.2.3 量化不确定度 根据本实验室内部文件进行计算, 得出各样本测量结果的不确定度和扩展不确定度。使用电子表格计算方法<sup>[11]</sup> 计算每个分量对测量结果的不确定度的相对贡献。图 2 使用直方图表示了 RELA-A 和 RELA-B 两个样本中

各分量的相对贡献,从图中可以得知,吸光度、标准曲线的斜率和截距是影响血清总胆红素测量不确定度的主要分量。

2.2.4 合成标准不确定度 血清总胆红素的合成标准不确定度如下合成:

$$u_c(\bar{c}) = \sqrt{u_{cb}^2(\bar{c}) + u^2(\text{rep})}$$

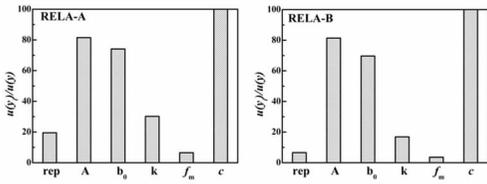


图 2 样本中各分量的相对贡献

### 3 讨论

本研究建立血清总胆红素参考方法,以实现常规检测系统的溯源性。对建立的参考方法的线性、精密度和准确度进行评估,通过参加国际室内质量评价(IFCC-RELA)进行能力验证,以 IFCC-RELA 对该项目的等效限作为合格指标。本研究测定 2011 年和 2012 年 RELA 样本结果均在等效限内,表明该方法符合参考方法的要求。

本研究依据 GUM<sup>[11]</sup> 文件对建立的 TBIL 参考方法进行不确定度评估,通过建立不确定度评估模型,探讨不确定度各分量对测量结果不确定度的相对贡献。通过 RELA-A 和 RELA-B 样本各分量的相对贡献分析可知,吸光度、标准曲线的斜率和截距是影响血清总胆红素测量不确定度的主要分量。因此,对标准溶液的配制和测定应严加控制,确保测量结果具有较小的不确定度。这也是建立血清总胆红素参考方法的难点<sup>[12]</sup>。

综上所述,本实验室依据 JCTLM 推荐方法建立的血清总胆红素参考方法,方法性能符合要求,测定结果通过 RELA 参考实验室能力评估,同时建立了血清总胆红素测量结果不确定度评估模型,可应用于血清总胆红素项目的量值溯源和标准化,为血清总胆红素常规检测系统向参考方法/参考物质溯源

提供有效途径。

### 参考文献

- [1] Bhutani VK, Johnson LH. Urgent clinical need for accurate and precise bilirubin measurements in the United States to prevent kernicterus[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 477-480.
- [2] Bian WW, Zhang N, Wang L. Spectrofluorometric determination of total bilirubin in human serum samples using tetracycline-Eu3+[J]. Anal Sci, 2010, 26(6): 785-789.
- [3] Perry BW, Doumas BT, Bayse DD, et al. A candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: test for transferability[J]. Clin Chem, 2008, 60(2): 297-301.
- [4] Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, et al. Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation[J]. Clin Chem, 2008, 25(16): 1779-1789.
- [5] Watson D. Analytic methods for bilirubin in blood plasma[J]. Clin Chem, 2006, 7(5): 603-625.
- [6] Bhutani VK, Johnson LH. Urgent clinical need for accurate and precise bilirubin measurements in the united states to prevent kernicterus[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 477-480.
- [7] White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry[J]. Ann Clin Biochem, 2011, 48(2): 393-409.
- [8] 徐建华, 庄俊华, 郑松柏, 等. 常规方法检测血清总胆红素的正确度评价[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(8): 946-949.
- [9] 邵燕, 孙慧颖, 胡滨, 等. 血清总胆红素常规系统测量结果的正确度评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(2): 266-268.
- [10] Kessler A, Siekman N, Weykamp C, et al. External Quality Assessment Scheme for reference laboratories-review of 8 years' experience[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(8): 977-1005.
- [11] Eurochem/CITAC Guidelines. Quantifying uncertainty in analytical measurement[M]. 2nd ed. Eurochem, 2000.
- [12] 邵燕, 胡滨, 孙慧颖, 等. Doumas 血清总胆红素参考方法标准曲线的复现[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(2): 139-141.

(收稿日期: 2013-09-07)

(上接第 204 页)

作简单, 适宜于临床检测推广。

### 参考文献

- [1] Seideman J, Peritt D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 microsphere system[J]. J Immunol Methods, 2002, 267(2): 165-171.
- [2] Dunbar SA. Applications of LuminexR xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 71-82.
- [3] Croft H, Malinowski T, Krizbai L, et al. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus[J]. J Virol Methods, 2008, 153(2): 203-213.
- [4] Giavedoni LD. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using Luminex technology [J]. J Immunol Methods, 2005, 301(1/2): 89-101.
- [5] 姚见儿. Luminex 高通量检测技术的应用和挑战[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 250-251.
- [6] 张保强, 张晓. Luminex 液态芯片在临床及科研中的应用[J]. 当代医学, 2012, 18(1): 18-20.

- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods [S]. EP10-A2, NCCLS, 2002.
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach[S]. EP6-A2, NCCLS, 2003.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; proposed guide line[S]. EP7-P, NCCLS, 1986.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. EP9-A, NCCLS, 1995.
- [11] Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, et al. Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel[J]. Anticancer Res, 2009, 29(2): 573-576.
- [12] Desai N, Wu H, George K, et al. Simultaneous measurement of multiple radiation-induced protein expression profiles using the Luminex(TM) system[J]. Adv Space Res, 2004, 34(6): 1362-1367.

(收稿日期: 2013-09-12)