

• 论 著 •

## 6 个酶学参考方法不确定度的研究

陈 明, 赖文泉, 王英国, 蔡锦刚

(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 广东深圳 518057)

**摘要:**目的 建立酶学参考方法不确定度研究模型, 系统地对丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、 $\alpha$ -淀粉酶(AMY)、谷氨酰基转移酶(GGT)和肌酸激酶(CK)6 个酶学参考方法的不确定度影响因素进行研究, 以明确各参考方法影响的关键因素, 更好地指导参考方法的建立和运行。方法 参照 JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》、JJF1135-2005《化学分析测量不确定度评定》、CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》和 CNAS-CL33《检测和校准实验室能力认可准则在临床酶学参考测量领域的应用说明》, 采用理论评估和实验设计相结合的方法对 6 个酶学参考方法不确定度进行评定。结果 建立的酶学不确定度评定模型为  $C = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{L} \cdot \frac{V_1 + V_2 + V_S}{V_S} \cdot f_T \cdot f_p \cdot H \cdot f_\lambda \cdot f_{\text{试剂}} \cdot f_{\text{测试结果}}$ 。结论 建立了酶学参考方法不确定度的评定模型, 并成功运用于 6 个酶学参考方法不确定度的评定。

**关键词:**酶学参考方法; 不确定度; 不确定度评定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0077-03

## Study on uncertainty of six enzymological reference methods

Chen Ming, Lai Wenquan, Wang Yingguo, Cai Jingang

(Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518057, China)

**Abstract: Objective** To develop an uncertainty study model of the enzymological reference method to systematically research the uncertainty influencing factors of 6 enzymological reference methods ALT, AST, LDH, AMY, GGT and CK for determining the key factors influencing the reference method and better guiding the establishment and operation of the enzymological reference methods. **Methods** The uncertainty of the six enzymological reference methods was evaluated by the theoretical evaluation combined with the experiment design according to series of standards including JJF1059-1999 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement, JJF1135-2005 Evaluation of Uncertainty in Chemical Analytical Measurement, CANA-GL06 Guidance on Evaluating the Uncertainty in Chemical Analysis and CNAS-CL33 Guidance on the Application of Testing and Calibration Laboratories Competence Accreditation Criteria in the Field of Clinical Enzymology Reference Measurement. **Results** The established enzymological uncertainty study model was  $C = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{L} \cdot \frac{V_1 + V_2 + V_S}{V_S} \cdot f_T \cdot f_p \cdot H \cdot f_\lambda \cdot f_{\text{试剂}} \cdot f_{\text{测试结果}}$ . **Conclusion** The uncertainty evaluation model is set up and successfully applied in the uncertainty evaluation of the six enzymological reference methods.

**Key words:** enzymological reference method; uncertainty; uncertainty evaluation

不确定度评定在参考测量领域受到越来越多的关注, 然而, 关于系统性的研究 6 个酶学参考方法不确定度的报道还较为少见。本文参照 JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》、JJF1135-2005《化学分析测量不确定度评定》、CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[3]</sup>、CNAS-CL33《检测和校准实验室能力认可准则在临床酶学参考测量领域的应用说明》等标准文件和陈宝荣等<sup>[1]</sup>、陈文祥等<sup>[2]</sup>的研究成果, 建立了酶学参考方法不确定度评定模型, 并对 ALT、AST、LDH、AMY、GGT、CK 6 个酶学参考方法的不确定度进行了系统研究, 确定了各酶学参考方法影响的关键因素, 为酶学参考方法的建立和运行提供了指导作用。

## 1 方 法

根据 JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》、JJF1135-2005《化学分析测量不确定度评定》、CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》等标准文件提出的不确定度评估步骤, 可将临床酶学活性测量不确定度的评定分为 4 个步骤: (1) 规定被测量, (2) 识别不确定度来源, (3) 不确定度分量量化, (4) 计算合成不确定度。本方法依据此步骤建立酶学参考方法不确定度的评定方法。

**1.1 酶学被测量** 临床酶学被测量为酶的催化活性, 使用的测量方法为 IFCC 推荐参考方法, 根据测量原理, 测试结果的数学表达式为:

$$C = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{L} \cdot \frac{V_1 + V_2 + V_S}{V_S}$$

C——酶催化活性浓度, 也称酶活性浓度, 单位为  $\mu\text{kat/L}$ ; $\Delta A$ ——反应监测时间内吸光度的变化, 单位为安(A); $\Delta t$ ——反应监测时间, 单位为秒(s); $\epsilon$ ——显色剂的摩尔消光系数, 单位为  $\text{m}^2/\text{molL}$ ;

L——比色杯光径, 单位为毫米(mm);

 $V_1$ ——反应液体积, 单位为微升( $\mu\text{L}$ ); $V_2$ ——启动液体积, 单位为微升( $\mu\text{L}$ ); $V_S$ ——样本体积, 单位为微升( $\mu\text{L}$ );

**1.2 不确定度来源识别** 识别酶学参考方法的不确定度时, 要根据参考方法的测量原理、测量程序的具体步骤和测量结果的计算公式综合分析其影响因素, 然后制定各影响因素不确定度的评定方案并进行各分量不确定度的评定, 最后计算合成不确定度和扩展不确定度。随着近年来酶学参考方法研究的深入, 影响其准确测量的主要因素基本达成共识, 并形成了具有

代表性的酶学参考方法测量影响因素鱼骨图,见图 1。

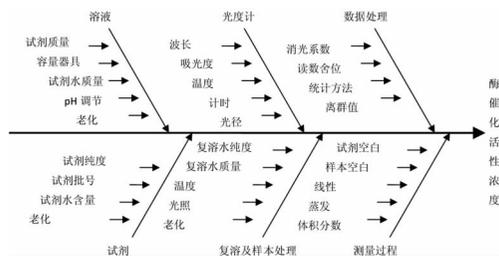


图 1 酶催化活性浓度测量参考方法 不确定度来源的鱼骨图

根据 GUM 和 QUAM 理论,将影响因素与酶学参考方法测量程序综合分析,可认定酶学催化活性参考测量的主要不确定度来源为吸光度、时间、摩尔消光系数、比色杯光径、样本体积分数、温度、pH 值、波长、试剂浓度和测量结果变异共 10 个主要因素。在进行酶学催化活性不确定度的评定时,将上述 10 个因素引入的不确定度分量量化、合成即可得到该方法的测量不确定度。

1.3 不确定度模型建立 根据参考测试结果的数学表达式和不确定度来源分析,可设定酶学参考测量不确定度评定的数学模型为:

$$C = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{L} \cdot \frac{V_1 + V_2 + V_s}{V_s} \cdot f_T \cdot f_p H \cdot f_\lambda \cdot f_{\text{试剂}} \cdot f_{\text{测试结果}}$$

不确定度评定数学模型确定后,可按照数学模型逐项评定不确定度分量。

## 2 结 果

2.1 吸光度 酶学测量是基于在规定监测时间内,吸光度呈线性变化来计算测试结果的,因此,吸光度的不确定度来自两个方面:一是仪器检定时透射比标准滤光片的不确定度;二是线性拟合时引入的不确定度。透射比标准滤光片的不确定度可参考检定证书,证书显示标准滤光片的不确定度为 0.3% (k=2),因此,其标准相对不确定度为 0.15%。大多数情况下,线性拟合的相关系数大于 0.999,因此,线性拟合引入的不确定度基本可以忽略,因此,在评定吸光度引入的不确定度时,考虑透射比标准滤光片的不确定度即可。按照此原则,可评定出吸光度的不确定度为 0.15%。

2.2 时间 时间引入的不确定度包括 3 个方面:孵育时间、延迟时间和监测时间,其中孵育时间采用秒表手动计时,延迟时间和监测时间是采用软件计时。延迟时间和监测时间用电脑软件计时,引入的不确定度较小,可以忽略,因此,孵育时间引入的不确定度即可代表时间引入的不确定度。孵育时间引入的不确定度采用实验设计的方法进行评定,评定方法如下:(1)准备中浓度的样本,样本量至少满足 10 次测试。(2)将样本测试时孵育时间分别设定为 240 s、300 s 和 360 s,然后严格按照参考方法的要求在上述孵育时间下测试中浓度样本各三次,以均值作为各孵育时间测试结果。(3)以 300 s 测试结果作为 100.00%,将 240 s 和 360 s 测试结果转化为 300 s 测试结果的相对浓度,然后以孵育时间为横轴,相对浓度为纵轴进行二次拟合,然后计算 300 s 处相对浓度对孵育时间的导数,此值即为孵育时间引入不确定度的灵敏系数。(4)根据经验,酶学参考方法运行时孵育时间的不确定度可控制在 10 s 内,按照矩形分布,孵育时间的标准不确定度为 5.8 s,将此标准不确定度乘以灵敏系数,即可得到孵育时间引入的不确定度。

表 1 AST 参考方法孵育时间引入不确定度研究数据

孵育时间(s)	$\bar{x} \pm s$ (U/L)	变异系数(%)	相对浓度(%)
240	121.65 ± 0.57	0.47	99.44
300	122.32 ± 0.09	0.07	100.00
360	123.07 ± 0.53	0.43	100.60

按照此方法,可得到 6 个酶学参考方法时间引入的不确定度分量,如表 2 所示。

表 2 6 个酶学参考方法孵育时间引入不确定度结果(%)

项目	灵敏系数(s <sup>-1</sup> )	引入不确定度
AST	0.010	0.06
ALT	0.005	0.03
AMY	0.003	0.02
LDH	0.003	0.02
GGT	0.002	0.02
CK	0.006	0.04

2.3 摩尔消光系数 摩尔消光系数是常数,根据有关报道,摩尔消光系数的不确定度小于 1%,按照矩形分布,摩尔消光系数引入的相对不确定度为:u=1%/1.732=0.58%。

2.4 比色杯光径 根据 IFCC 酶学参考方法的要求,比色杯光径要求为(10 ± 0.01)mm,按照矩形分布,比色杯光径引入的标准不确定度为:0.01/√3=0.006 mm,相对不确定度为 0.006/10 × 100%=0.06%。

2.5 样本体积分数 样本体积分数表达式为:V<sub>s</sub>% =  $\frac{V_s}{V_1 + V_2 + V_s}$ ,各体积的不确定度可根据校准证书得到,因此在计算 V<sub>s</sub>% 不确定度时,可根据 QUAM 原则,用分子和分母的相对不确定度进行合成。考虑到分子和分母是正相关,因此,还需要考虑相关项。参照汪静等<sup>[7]</sup>对体积分数不确定度的研究方法,可计算出体积分数引入的不确定度为 0.30%。由于各体积移取均采用对应量程的移液器,不同体积对应的不确定度基本相当,经计算,6 个酶学参考方法由体积分数引入的不确定度均为 0.30%。

2.6 温度 温度引入的不确定度可参照孵育时间引入不确定度的评定方法,测量同一样本在 36、37、38 °C 的酶活,然后计算灵敏系数。由于 IFCC 方法要求温度的不确定度为 0.1 °C,按照矩形分布,温度的标准不确定度为 0.06 °C,将此标准不确定度乘以灵敏系数,即可得到温度引入的不确定度。

按照此方法,可得到 6 个酶学参考方法温度引入的不确定度分量,如表 3。

表 3 6 个酶学参考方法温度引入不确定度结果(%)

项目	灵敏系数(°C <sup>-1</sup> )	引入不确定度
AST	4.86	0.29
ALT	4.82	0.28
AMY	4.61	0.27
LDH	7.17	0.42
GGT	3.27	0.19
CK	5.44	0.32

2.7 pH 值 pH 值引入的不确定度同样参照孵育时间引入不确定度的评定方法,测量同一样本在 pH 值为 (pH<sub>0</sub> - 0.15)、pH<sub>0</sub> 和 (pH<sub>0</sub> + 0.15) 时的酶活 (pH<sub>0</sub> 为 IFCC 方法要求的 pH 值),然后计算灵敏系数。由于 IFCC 方法要求 pH 值

的不确定度小于 0.05 (AMY 小于 0.03), 按照矩形分布, pH 值的标准不确定度为 0.029, 将此标准不确定度乘以灵敏系数, 即可得到 pH 值引入的不确定度。

按照此方法, 可得到 6 个酶学参考方法 pH 引入的不确定度分量, 如表 4。

表 4 6 个酶学参考方法 pH 引入不确定度结果 (%)

项目	灵敏系数(pH <sup>-1</sup> )	引入不确定度
AST	1.92	0.06
ALT	4.45	0.13
AMY	75.27	1.30
LDH	16.62	0.48
GGT	3.08	0.09
CK	3.40	0.10

**2.8 波长** 波长引入的不确定度也采用和孵育试剂不确定度评定相同的方法, 测试同一样本在 ( $\lambda_{0-2}$ )、 $\lambda_0$  和 ( $\lambda_{0+2}$ ) 波长下的酶活 ( $\lambda_0$  为 IFCC 方法要求的酶活), 然后计算灵敏系数。根据光度计校准结果, 光度计波长的不确定度为 0.4 nm (k=2), 其标准不确定度为 0.2 nm, 将此标准不确定度乘以灵敏系数, 即可得到波长引入的不确定度。

按照此方法, 可得到 6 个酶学参考方法波长引入的不确定度分量, 如下表所示:

表 5 6 个酶学参考方法波长引入不确定度结果 (%)

项目	灵敏系数(nm <sup>-1</sup> )	引入不确定度
AST	0.12	0.03
ALT	0.51	0.11
AMY	0.25	0.05
LDH	0.06	0.02
GGT	3.46	0.70
CK	0.08	0.02

**2.9 试剂浓度** 试剂浓度是酶学参考方法不确定度的又一重要来源, 研究试剂浓度引入不确定度时主要考察对象为底物浓度、显色剂浓度、激活剂浓度等, 每个试剂浓度引入不确定度的考察同样采用实验设计的方法。将 IFCC 方法规定的试剂浓度定为 100%, 然后分别配制浓度为 90%、100% 和 110% 浓度的试剂, 然后严格按照方法规定的程序进行样本测试。数据处理方式按照温度、pH 等不确定度处理方式。得到每一研究试剂引入的不确定度后, 将其合成可得到试剂浓度引入的总不确定度。按照此方法, 可得到 6 个酶学参考方法试剂浓度引入的不确定度分量, 如表 6。

表 6 6 个酶学参考方法试剂浓度引入不确定度结果 (%)

项目	引入不确定度
AST	0.09
ALT	0.07
AMY	0.02
LDH	0.12
GGT	0.12
CK	0.02

**2.10 测试结果** 测试结果的精密度对不确定贡献较大, 应用 A 类评定的方法进行多次测定, 一般可分 3 批测试, 每批测试 3 次, 然后计算测试结果的不精密度, 将不精密度除以测试次数的平方根即可得到重复性引入的不确定度分量。本实验室在运行参考方法时, 不精密度基本可以控制在 1.0% 以内, 按照正态分布, 引入的不确定度为 0.50%。

**2.11 不确定度结果汇总** 按照上述方法对各不确定度分量进行评定后, 将各分量进行合成, 可得到 6 个酶学参考方法的合成不确定度。取 k=2 时, 可得到扩展不确定度, 结果表 7。

表 7 6 个酶学参考方法不确定度结果汇总 (%)

不确定度来源	AST	ALT	LDH	AMY	GGT	CK
吸光度	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
时间	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04
摩尔消光系数	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
比色杯光径	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
样本体积分数	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
温度	0.29	0.28	0.42	0.27	0.19	0.32
pH 值	0.06	0.13	0.48	1.30	0.09	0.10
波长	0.03	0.11	0.02	0.05	0.70	0.02
试剂浓度	0.09	0.07	0.12	0.02	0.12	0.02
测试结果	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
合成不确定度	0.90	0.91	1.06	1.57	1.12	0.91
扩展不确定度(k=2)	1.80	1.82	2.12	3.14	2.24	1.82

在不确定度主要分量中, 摩尔消光系数、测试结果、吸光度和样本体积分数基本都是主要分量, 除测试结果不确定度可能有微小变化外, 其它因素在参考方法运行时引入的不确定度基本不可改变, 因此, 要保证参考方法运行的可靠性, 必须严格控制 pH 值、温度、波长等因素。如 AST、ALT 和 CK 参考方法, 温度影响尤为突出。而 LDH 和 AMY 参考方法, pH 值的影响更明显。对于 GGT 参考方法, 波长的影响又是所有因素中最突出的。因此, 在建立和运行酶学参考方法时, 可根据各参考方法的特点加以控制, 从而确保参考方法运行的可靠性, 保证测试结果的有效性。

### 3 讨论

本文基于本实验室的测定程序及仪器情况, 结合实验设计方法及 GUM 和 QUAM 评定不确定度的方法, 建立了 6 个酶学参考方法不确定度的评定模型。该模型可操作性强, 通过此模型评定参考方法的不确定度可进一步明确各参考方法的关键因素, 为参考方法的建立和运行提供了指导意义。

### 参考文献

[1] 陈宝荣, 孙慧颖, 邵燕, 等. 基于“实验设计”的临床酶学参考方法测量不确定度评定模型的建立[J]. 临床检验杂志, 2011, 05(5): 327-330.

[2] 汪静, 郭健, 陈文祥, 等. 国际临床化学联合会(IFCC)酶学参考方法测定血清 ALT 活性浓度的不确定度评定[J]. 中国计量, 2009, 09(9): 75-78.