

## 胆碱酯酶德国参考方法基础性能研究

刘春龙, 金仁玲, 孙慧颖, 胡 滨, 陈宝荣<sup>△</sup>(北京航天总医院, 北京 100076)

**【摘要】 目的** 研究胆碱酯酶德国参考方法性能, 并对其进行确认试验和基础性能研究。**方法** 采用混合人血清为基质, 制备具有良好稳定性和互通性的不同浓度血清标本, 按德国参考方法配制试剂, 并在日立全自动生化分析仪 7170A 上进行精密度试验和线性分析试验。**结果** 精密度试验低值血清标本变异系数(CV)为 0.83%, 高值血清标本 CV 为 1.07%, 两种浓度标本所有测量结果均落在各自均值 $\pm 3\%$ 范围内; 线性分析试验直线回归函数方程为  $Y=2\ 659X+4\ 435$ ,  $r^2=0.998$ 。**结论** 胆碱酯酶德国参考方法性能良好, 可用于全自动生化分析仪胆碱酯酶试剂盒的研制及作为对胆碱酯酶参考方法研究开发的基础。

**【关键词】** 胆碱酯酶; 精密度试验; 线性分析试验; 确认试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.09.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)09-1184-02

**Basic performance validation of German reference method for the detection of cholinesterase** LIU Chun-long, Jin Ren-ling, SUN Hui-ying, HU Bin, CHEN Bao-rong<sup>△</sup>(Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China)

**【Abstract】 Objective** To validate the performance of German reference method for the detection of cholinesterase(CHE). **Methods** Mixed human serum were used to prepare samples with different concentrations of CHE and with good stability and interoperability. Reagents were prepared according to the German reference method and precision experiments and linear analysis experiments were performed by using Hitachi 7170A automatic biochemical analyzer. **Results** Precision experiment indicated that the coefficient of variation of serum sample with low CHE level was 0.83%, and that of serum sample with high CHE level was 1.07%. All detected results were within the range of mean  $\pm 3\%$ . The regression equation was  $Y=2\ 659X+4\ 435$ ,  $r^2=0.998$ , as indicated by linear regression analysis.

**Conclusion** The performance of German reference method for the detection of cholinesterase might be fine, which could be used for the development of reagents for the detection of CHE on automatic biochemical analyzer and used as foundation for the research and development of reference method.

**【Key words】** cholinesterase; precision experiment; linear analysis experiment; validation experiment

胆碱酯酶是临床检验重要的检测项目, 临床测定的胆碱酯酶主要是由肝细胞合成, 当肝细胞受损时, 胆碱酯酶合成减少, 血清中其活性降低程度与肝细胞受损程度相一致, 肝病越严重其下降幅度越大。胆碱酯酶是反映肝脏损伤灵敏、稳定的指标, 是肝脏病变后唯一下降的酶。为了使各医院和医学检验中心的胆碱酯酶检测结果互认和统一, 必须建立完善的参考体系, 使常规检验的结果溯源到参考体系<sup>[1-2]</sup>。本试验对胆碱酯酶参考方法的研究及胆碱酯酶试剂盒的开发研究具有重要的价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 仪器** 日立 7170A 全自动生化分析仪; LA120S 万分位电子天平(德国 Sartorius 公司); 艾科普纯水机; Cyber-scan1100 型 pH 计; Eppendorf 移液器。

**1.1.2 试剂** Pyrophosphate, tetrasodium salt, decahydrate(焦磷酸盐),  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 相对分子质量为 446.06(批号: MKBL8076V); Potassium hexacyanoferrate(Ⅲ)(六氰高铁酸钾),  $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 相对分子质量为 329.26(批号: D01X009); Citric acid, monohydrate(柠檬酸),  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 相对分子

质量为 210.14(批号: SLBD2800V); S-Butyrylthiocholine iodide(丁酰硫代胆碱),  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{SI}$ , 相对分子质量为 317.2(批号: 33408297); Sodium chloride, NaCl, 相对分子质量为 58.45(批号: S3014)。其中六氰高铁酸钾购自美国 Alfa 公司, 其余试剂均购自美国 Sigma 公司。

**1.1.3 校准品** 采用罗氏多项目校准品(c. f. a. s.)。

**1.1.4 参考质控品** 罗氏质控品。

**1.1.5 主要原材料** 北京航天总医院生化室不同浓度混合人血清标本。

### 1.2 标本准备及试剂配制过程

**1.2.1** 通过北京航天总医院检验科 LIS 系统查找信息, 收集生化室不同浓度血清标本, 并保存于一 80 ℃ 低温冰箱。精密度试验的标本, 按低值和高值两个浓度水平留取, 并尽可能将这两个浓度水平接近于医学决定水平处。线性分析试验的标本, 收集 1 周内极高值标本。对于所收集的血清标本, 进行酶活性稳定性处理, 冻存于一 80 ℃ 低温冰箱。

### 1.2.2 试剂配制

**1.2.2.1** 试剂 1-(色源物质/缓冲液) 六氰高铁酸钾(Ⅲ), 2.44 mmol/L; 焦磷酸, 91.5 mmol/L; pH=7.66(20 ℃)/7.6

(37 ℃); 柠檬酸, 23.0 mmol/L。使用去离子水溶解 10.2 g 焦磷酸和 200.7 mg 六氰高铁酸钾(Ⅲ), 使其总体积为 245 mL, 使用 2 mmol/L 柠檬酸调节溶液 pH=7.66(20 ℃), 将调节好的溶液定容至 250 mL。

**1.2.2.2 试剂 2-(基质)** 丁酰硫代胆碱, 91.5 mmol/L。使用去离子水溶解 1.451 g 丁酰硫代胆碱, 添加去离子水于 50 mL 容量瓶定容。

**1.2.2.3 试剂 3-(稀释液)** 使用去离子水溶解 0.9 g NaCl, 并于 100 mL 容量瓶定容。

**1.3 评价方法** 按德国参考方法参数设置日立全自动生化分析仪 7170A 参数, 测量前校准 7170A 全自动生化分析仪, 每批次检测前, 对其重新定标。测量标本前、后均测量质控品。

**1.3.1 精密度试验** 精密度试验需进行 5 d, 每天上午、下午各 1 个批次。将混合人血清标本充分混匀, 分装于炮弹管中, 于-80 ℃低温冰箱保存, 每天测量前取出复融。每一批次对各浓度标本分别重复测量 3 次。

**1.3.2 线性分析试验** 留取高浓度胆碱酯酶混合人血清标本和低浓度标本, 分别命名为标本 5 和标本 1。然后按下列方式制成 5 个浓度标本: 标本 1 为低浓度患者标本; 标本 2 为 3 份标本 1 与 1 份标本 5 混匀; 标本 3 为 2 份标本 1 与 2 份标本 5 混匀; 标本 4 为 1 份标本 1 与 3 份标本 5 混匀; 标本 5 为高浓度患者标本。每个标本各测量 3 次。

**2 结 果**

**2.1 胆碱酯酶德国参考方法精密度试验结果** 见表 1。

表 1 胆碱酯酶德国参考方法精密度试验结果(U/L)

项目	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天											
	第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 4 批	第 5 批	第 6 批	第 7 批	第 8 批	第 9 批	第 10 批										
	低值	高值																		
X <sub>1</sub>	6 954	15 572	6 870	15 405	6 797	15 348	6 919	15 373	6 791	15 138	6 793	15 086	6 878	15 293	6 881	15 518	6 795	15 088	6 793	15 246
X <sub>2</sub>	6 964	15 506	6 922	15 467	6 856	15 365	6 834	15 306	6 792	15 157	6 834	15 046	6 915	15 431	6 881	15 518	6 795	15 088	6 793	15 246
X <sub>3</sub>	6 902	15 543	6 784	15 369	6 887	15 315	6 884	15 412	6 739	15 208	6 841	15 045	6 886	15 562	6 817	15 511	6 824	15 249	6 777	15 182
$\bar{x}$	6 940	15 540	6 859	15 414	6 847	15 343	6 879	15 364	6 774	15 168	6 823	15 059	6 893	15 429	6 835	15 514	6 814	15 189	6 801	15 192
SD	33.29	33.08	69.69	49.57	45.72	25.42	42.72	53.61	30.32	36.20	25.93	23.39	19.47	134.52	40.50	3.79	16.20	87.75	28.84	49.31
CV(%)	0.48	0.21	1.02	0.32	0.67	0.17	0.62	0.35	0.45	0.24	0.38	0.16	0.28	0.87	0.59	0.02	0.23	0.58	0.42	0.32
QC	6 868	6 749	6 826	6 665	6 797	6 675	6 821	6 645	6 748	6 619	6 723	6 567	6 859	6 728	6 847	6 739	6 838	6 659	6 741	6 581
QCbias(%)	1.24	1.69	1.28	1.85	1.36	1.66	1.36	1.12	1.88	1.70										

**2.2 胆碱酯酶德国参考方法线性分析试验结果** 见表 2。质控: 试验前质控 QC=6 826, 试验后质控 QC=6 741; 质控偏倚 QCbias=1.25%。对结果进行直线回归分析, 见图 1。

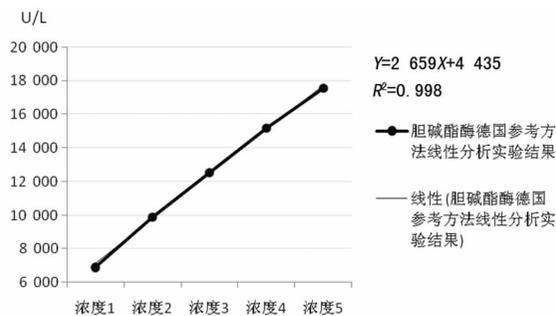


图 1 胆碱酯酶德国参考方法线性分析试验结果

表 2 胆碱酯酶德国参考方法线性分析试验结果(U/L)

项目	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5
X <sub>1</sub>	6 992	9 909	12 519	15 070	17 564
X <sub>2</sub>	6 799	9 869	12 500	15 154	17 513
X <sub>3</sub>	6 933	9 872	12 597	15 347	17 582
$\bar{x}$	6 908.0	9 883.3	12 538.7	15 190.3	17 533.0

**3 讨 论**

胆碱酯酶参考方法的研究是国际研究的一个热点内容<sup>[3]</sup>, 由于人体内存在两种胆碱酯酶, 一种为真性胆碱酯酶, 另一种为假性胆碱酯酶, 临床测定的主要为后者。血清胆碱酯酶活性

的下降程度与肝脏受损害的程度一致。肝硬化患者在治疗后, 如果出现胆碱酯酶持续下降, 则表示预后不良。有机磷中毒、营养不良、感染及贫血也能使胆碱酯酶降低<sup>[3-4]</sup>。随着连续检测法的发展, 更多测量方法被提出, 其中以德国临床化学协会提出的丁酰胆碱-六氰高铁酸钾(Ⅲ)连续监测法在临床实验室应用较为广泛。现在卫生部临床检验中心一直强调检验结果的互认与统一<sup>[5-6]</sup>, 一方面能够使患者不用重复检测, 减少看病费用, 另一方面也能使检验结果更为准确。作者对德国 1992 年建立的胆碱酯酶参考方法进行确认试验, 严格按照参考实验室的标准进行试剂配制, 严格控制“人、机、料、法、环”。试验过程完全符合临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证的行业标准的要求, 因此本试验对于胆碱酯酶商品定量试剂盒的研制开发具有很大的价值。本次德国参考方法确认试验, 共分为两部分, 分别为精密度试验和线性分析试验。精密度试验结果显示, 两种浓度标本所有测量结果均在各自均值±3%范围内。线性分析试验结果, 其直线回归方程为 Y=2 659X+4 435, r<sup>2</sup>=0.998。精密度试验和线性分析试验结果, 德国参考方法性能良好, 可用于全自动生化仪胆碱酯酶试剂盒的研制及作为对胆碱酯酶参考方法研究开发的基础。血清酶学测定的影响因素较多<sup>[7]</sup>, 实现真正意义上的标准化测量, 对德国参考方法的确认试验和性能验证试验仍有待进一步的完善, 对此参考方法还需考察其稳健性、选择性、试剂线性范围大小以及评估其测量不确定度的相关情况。

离脂肪酸可加重胰腺损害<sup>[7-8]</sup>。因此,检测 CRP、GLU、TG 能够有效地判断急性胰腺炎病情<sup>[9]</sup>。AMS 在急性胰腺炎发病后 3~12 h 后就开始升高,到 24~48 h 达到高峰,一般情况下 3~5 d 就恢复正常,AMS 是常用的鉴别诊断急性胰腺炎的指标,但特异性和敏感性均不高,因此临床检测诊断受到限制。

为此,在上述研究中,作者分析 CRP、GLU、TG、AMS 对急性胰腺炎的诊断价值,旨在为临床寻找能准确诊断胰腺炎并判断病情的指标。首先作者对比了发病后第 1、3、5 天时,胰腺炎患者与健康者外周血中上述标志物的水平,由结果可知:发病后,SAP 组和 MAP 组患者的 CRP、GLU、TG 水平均呈现第 1 天高于第 3 天及第 5 天;且在第 1、3、5 天时,CRP、GLU、TG 水平均为 SAP 组大于 MAP 组及对照组。这一方面说明 CRP、GLU、TG 水平呈动态变化,随着炎症得到控制,其水平逐步降低;另一方面还能说明 CRP、GLU、TG 水平与疾病的病变程度密切相关,严重程度越重、其水平越高<sup>[10]</sup>。进一步分析可以发现,AMS 虽然也表现出正相关,但相关性程度远低于 CRP、GLU、TG。薛彦菊<sup>[11]</sup>认为淀粉酶的表达水平实际与急性胰腺炎的预后及严重程度没有相关性。同时通过比较 SAP 组与 MAP 组患者的症状持续时间可知,SAP 组患者腹痛、恶心、呕吐、发热持续时间均高于 MAP 组。

由此可以初步推断,CRP、GLU、TG 水平与病情的严重程度密切相关,为了进一步明确 CRP、GLU、TG、AMS 水平与病情的相关性,作者通过以 CRP、GLU、TG、AMS 水平为自变量,腹痛、呕吐、高热的持续时间为应变量进行单因素回归分析可知,CRP、GLU、TG、AMS 水平与腹痛、呕吐、高热的持续时间呈正相关关系。这就说明 CRP、GLU、TG、AMS 水平与疾病症状的持续时间密切相关<sup>[12]</sup>,其水平越高、病情越重、症状持续时间越久。

综上所述,CRP、GLU、TG 的水平与急性胰腺炎的严重程度及症状持续时间密切相关,其水平越高、症状持续时间越长,可作为诊断疾病和判断病情的有效指标。

## 参考文献

[1] 林云,郭晓梅,张兴宗. 急性胰腺炎若干实验室诊断指标综合评价[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(4):25-27.

[2] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案)[J]. 中国消化内镜,2007,12(10):30-33.

[3] 谷志茨. C 反应蛋白、血糖、三酰甘油对诊断急性胰腺炎的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(2):228-229.

[4] 张东艳. 急性胰腺炎患者 C 反应蛋白、血糖变化及螺旋 CT 检查的临床意义[J]. 现代预防医学,2012,39(17):4588-4589.

[5] 李丽,刘文亮,张华. 急性胰腺炎患者血清三酰甘油及高密度脂蛋白胆固醇测定及其比值观察[J]. 检验医学与临床,2013,10(1):103-104.

[6] 邓小林. 高三酰甘油症为急性胰腺炎短期内复发的危险因素研究[J]. 中国医药指南,2013,11(17):16-17.

[7] Loret LC, Pelletier AL, Czernichow S, et al. Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia[J]. Pancreas, 2008, 37(1):12-17.

[8] 曾方银,刘杰,张鹏,等. 血清 C 反应蛋白早期预测重症急性胰腺炎的系统评价[J]. 检验医学,2010,25(3):200-206.

[9] 叶劲松. 急性胰腺炎患者血清 D-二聚体、红细胞压积及 C 反应蛋白变化的临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(35):91-93.

[10] 高鸿亮,王磊,姚萍. 体质量指数、血糖和血清三酰甘油与急性胰腺炎病情严重程度关系[J]. 胃肠病学,2012,17(1):27-29.

[11] 薛彦菊. 急性胰腺炎血清淀粉酶和脂肪酶的动态变化[J]. 医学检验与临床,2008,19(4):84-85.

[12] Mentula P, Kylänpää ML, Kempainen E, et al. Obesity correlates with early hyperglycemia in patients with acute pancreatitis who developed organ failure[J]. Pancreas, 2008, 36(1):e21-e25.

(收稿日期:2013-10-14 修回日期:2013-12-15)

(上接第 1185 页)

## 参考文献

[1] CLSI. Evaluation of the Linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; Approved guideline EP6-A[S]. Wayne, Pennsylvania, USA, CLSI, 2003.

[2] 沈伽弟. 胆碱酯酶的基础与临床研究进展[J]. 军事医学科学院院刊,2000,24(4):295-301.

[3] 朱建一,闻平. 血清胆碱酯酶和前清蛋白对肝脏合成功能监测的意义[J]. 临床检验杂志,2004,22(6):458.

[4] Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, et al. A new and

rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochemical Pharmacology, 1961, 7:88-95.

[5] 杨振华. 临床酶学展望与标准化[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(12):726-728.

[6] 徐国宾,吴南,王清涛. 要重视血清酶学测定的标准化工作[J]. 临床检验杂志,2007,25(3):161-164.

[7] 于嘉平,潘申波. 血清酶学测定标准化进展[J]. 2005, 28(12):1328-1330.

(收稿日期:2013-09-28 修回日期:2013-11-30)