

乳酸脱氢酶催化活性浓度测量的不确定度评定*

袁若愚¹, 季伙燕¹, 王建新¹, 孟舒婷¹, 王惠民^{1,2Δ} (1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学检验医学研究所, 江苏南通 226001)

【摘要】 目的 评定在乳酸脱氢酶(LDH)催化活性浓度测量中不同厂家或批号试剂的不确定度。方法 配制不同厂家或批号 LDH 试剂, 用国际临床化学联合会(IFCC)参考方法分别检测中值和高值两个浓度的混合血清, 对所得数据进行配对 *t* 检验, 计算不同厂家或批号试剂间的不确定度。结果 $P < 0.05$ 表示对不同厂家或批号 LDH 试剂, 所测 LDH 催化活性浓度结果差异有统计学意义。不同试剂批号对中值和高值混合血清的扩展不确定度 *U* 分别为 6.52% ($k=2$) 和 6.78% ($k=2$)。结论 不同厂家或批号试剂对 LDH 催化活性测量有影响, 因此, 在进行不确定度评定时, 应考虑不同厂家或批号试剂的影响。

【关键词】 LDH 催化活性浓度; 乳酸锂盐; N-甲基-D-葡糖胺; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)16-2304-03

Estimation on measurement uncertainty of lactate dehydrogenase catalytic activity concentration* YUAN Ruo-yu¹, JI Huo-yan¹, WANG Jian-xin¹, MENG Shu-ting¹, WANG Hui-min^{1,2Δ} (1. Department of Laboratory Medicine, Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Institute of Laboratory Medicine, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the measurement uncertainty of lactate dehydrogenase(LDH) catalytic activity concentration with different manufacturers or different lot numbers. **Methods** The LDH reagents with different manufacturers or different lot numbers were prepared. The pooled serum with low or high concentrations was measured by the reference method recommended by International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine(IFCC). The experimental data were analyzed by paired *t* test. The measurement uncertainty of lactate dehydrogenase with different manufacturers or different lot numbers was calculated. **Results** $P < 0.05$ indicated that the differences of detected LDH catalytic activity concentrations results for different manufacturers or lot numbers of LDH reagents had statistical significance. The expanded uncertainty (*U*) of different manufacturers or lot numbers of reagents were 6.52% ($k=2$) for low concentration and 6.78% ($k=2$) for high concentration. **Conclusion** Different manufacturers or different lot numbers of reagents have significant effect on the catalytic activity concentrations of LDH. Therefore, in the detection of measurement uncertainty, the impact of different manufacturers or different lot numbers of reagents should be considered.

【Key words】 LDH catalytic activity concentrations; lithium lactate; N-methyl-D-glucamine; nicotinamide adenine dinucleotide

国际临床化学联合会(IFCC)推荐的乳酸脱氢酶(LDH)催化活性浓度测量方法为手工法, 其所需试剂原材料为乳酸锂盐、N-甲基-D-葡糖胺、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、NAD 二水合锂盐, 但未规定所使用各试剂的生产厂家及批号。每年参加国际参考实验室间质量评价(RELA 计划)的国内外参考实验室或候选参考实验室达数十家, 各参考实验室均使用 IFCC 推荐的参考方法, 但对相同样本中 LDH 催化活性浓度的测量结果仍存在差异^[1-2]。本实验比较不同厂家或批号试剂对 LDH 催化活性浓度的影响, 评估其不确定度, 作为实验室评估测量结果不确定度时的参考^[3-4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据国际标准化组织(ISO)导则 34, 选取南通大学附属医院中、高 2 种浓度 LDH 混合血清(中值浓度范围为 100~235 U/L, 高值浓度范围为 360~800 U/L), 先后采

用 0.45 μm 孔径和 0.22 μm 孔径的醋酸纤维素滤膜过滤分装, 置 -70 °C 保存^[5-6]。

1.2 仪器与试剂 仪器: 日本日立公司 U-3310 紫外-可见分光光度计; 意大利 Hanna 公司 HI98183 型 pH 计; 美国 Fluke 公司 1521 点式温度计; 德国 Sartorius BT25S 电子天平; 德国 Eppendorf reference 移液器; 北京格瑞恩公司 DKB-501A 型超级恒温水槽。分光光度计、天平、pH 计、温度计和移液器均由南通市计量检定测试所检定, 分光光度计、天平、pH 计使用前均进行校正。试剂: 乳酸锂盐分别购自 Sigma 公司(批号 1 为 SLBC8966V, 批号 2 为 060M5441)、苏州亚科化学试剂股份有限公司(YK2014010801)、日本东京化成工业株式会社(TCI-WTTCL-LL)、国药集团化学试剂有限公司(批号 1 为 T20100310, 批号 2 为 T20110104)、德国 Applichem 公司(8R004802)。N-甲基-D-葡糖胺分别购自 Sigma 公司(批号 1

* 基金项目: 国家质检总局科研项目(201210066); 南通市科技项目(HS2012009)。

作者简介: 袁若愚, 女, 在读硕士, 主要从事生物化学及酶学检验方面的研究。 Δ 通讯作者, E-mail: whm_jyk@ntu.edu.cn。

为 SLBD8581V,批号 2 为 SLBD4908V)、阿拉丁试剂(中国)有限公司(34759)、日本东京化成工业株式会社(批号 1 为 34GFKPB,批号 2 为 A877EHL)。NAD 分别购自 Sigma 公司(021M7015V)、国药集团化学试剂有限公司(20131121)、阿拉丁试剂(中国)有限公司(39720)、美国 Amresco 公司(批号 1 为 0090C423,批号 2 为 1071C303)。NAD 二合水锂盐购自 Sigma 公司(SLBB8328V)。

1.3 方法 应用 IFCC 参考测量程序,在日立 U-3310 紫外-可见分光光度计的反应杯内加入 2.000 mL 反应液和 0.100 mL 混合血清标本,完全混合并孵育 180 s,在 180 s 末加入 0.200 mL 的起始反应液,延滞 90 s,测量 180 s 内吸光度变化率,计算 LDH 催化活性^[7]。用参考方法对上述收集的中值和高值混合血清分别进行测定,每个厂家或批号试剂分别测量中值和高值混合血清各 5 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行配对 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。不同厂家或批号试剂间的不确定度的计算参照下列公式进行。

$$u = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{相对不确定度 } u_{rel} = u/\bar{x} \times 100\%$$

$$\text{合成不确定度 } u_c = \sqrt{u_{rel1}^2 + u_{rel2}^2 + u_{rel3}^2}$$

$$\text{扩展不确定度 } U = k \cdot u_c$$

以不同乳酸锂盐厂家或批号间的不确定度计算为例: \bar{x} 是各厂家或批号乳酸锂盐检测的平均值; x_i 是不同厂家或批号乳酸锂盐检测值的均值; n 是不同乳酸锂盐的厂家或批号数目; u 是不同乳酸锂盐厂家或批号间的不确定度,具体评定方法参考文献[4,8],同时计算相对不确定度(u_{rel})。根据所得的相对不确定度,分别计算不同厂家或批号的 LDH 试剂对中值和高值混合血清的合成不确定度(u_c)及试剂所引起的扩展不确定度(U)。

2 结 果

2.1 不同厂家或批号试剂测定 LDH 活性统计结果比较 不同厂家或批号乳酸锂盐、N-甲基-D-葡糖胺与 NAD 测定 LDH 催化活性浓度值统计结果见表 1。

2.2 不同厂家或批号试剂配对 *t* 检验分析 为了判断各厂家或批号试剂对 LDH 催化活性浓度的影响是否具有统计学差异,采用 SPSS19.0 软件对上述结果进行配对 *t* 检验,测定 LDH 催化活性浓度的乳酸锂盐、N-甲基-D-葡糖胺与 NAD 厂家或批号的两两比较结果见表 2。

表 1 不同厂家或批号试剂测定 LDH 活性统计结果比较

成分	厂家	中值			高值		
		\bar{x} (U/L)	<i>s</i> (U/L)	CV(%)	\bar{x} (U/L)	<i>s</i> (U/L)	CV(%)
乳酸锂盐	Sigma 批号 1	173.53	1.71	0.98	523.26	3.03	0.58
	Sigma 批号 2	175.68	0.83	0.47	529.96	1.86	0.35
	苏州亚科	170.95	1.75	1.03	526.55	2.79	0.53
	TCI	173.78	0.44	0.25	528.40	1.37	0.26
	国药批号 1	173.56	1.11	0.64	517.84	1.74	0.34
	国药批号 2	173.59	0.70	0.40	525.81	2.22	0.42
	Applichem	181.57	0.50	0.27	546.51	3.71	0.68
	Sigma 批号 1	173.53	1.71	0.98	523.26	3.03	0.58
N-甲基-D-葡糖胺	Sigma 批号 2	174.08	1.24	0.71	508.08	3.44	0.68
	阿拉丁	178.23	1.21	0.68	533.69	3.25	0.61
	TCI 批号 1	173.54	1.06	0.61	525.66	2.36	0.45
	TCI 批号 2	172.38	0.86	0.50	524.50	1.18	0.22
	Sigma	173.53	1.71	0.98	523.26	3.03	0.58
NAD	国药	167.42	1.42	0.85	500.50	3.29	0.66
	阿拉丁	175.54	1.27	0.72	526.34	2.47	0.47
	Amresco 批号 1	175.13	1.11	0.63	528.99	4.65	0.88
	Amresco 批号 2	178.18	1.79	1.00	530.46	4.12	0.78

2.3 不同厂家或批号试剂间的不确定度评定结果 根据贝塞尔公式,分别计算不同厂家或批号乳酸锂盐的不确定度结果为 u (中值) 3.34 U/L 和 u (高值) 8.93 U/L,相对不确定度结果为 u_{rel} (中值) 1.91% 和 u_{rel} (高值) 1.69%;不同厂家或批号 N-甲基-D-葡糖胺的不确定度结果为 u (中值) 2.26 U/L 和 u (高值) 9.30 U/L,相对不确定度结果为 u_{rel} (中值) 1.29% 和 u_{rel} (高值) 1.78%;不同厂家或批号 NAD 的不确定度结果为 u (中值) 4.02 U/L 和 u (高值) 12.28 U/L,相对不确定度结果

为 u_{rel} (中值) 2.31% 和 u_{rel} (高值) 2.35%。根据以上所得的相对不确定度,计算不同厂家或批号的 LDH 试剂对中值和高值混合血清的合成不确定度和扩展不确定度。

中值:

$$u_c = \sqrt{(1.91\%)^2 + (1.29\%)^2 + (2.31\%)^2} = 3.26\%, U = 2 \times 3.26\% = 6.52\% (k=2)$$

高值:

$$u_c = \sqrt{(1.69\%)^2 + (1.78\%)^2 + (2.35\%)^2} = 3.39\%, U = 2 \times 3.39\% = 6.78\% (k=2)$$

表 2 不同厂家或批号试剂配对 *t* 检验分析

成分	厂家或批号	P(中值)	P(高值)
乳酸锂盐	Sigma 批号 1	Sigma 批号 2	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 1	苏州亚科	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 1	TCI	<0.05 >0.05
	Sigma 批号 1	国药批号 1	<0.05 >0.05
	Sigma 批号 1	国药批号 2	>0.05 >0.05
	Sigma 批号 1	Applichem	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 2	苏州亚科	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 2	TCI	>0.05 <0.05
	Sigma 批号 2	国药批号 1	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 2	国药批号 2	<0.05 <0.05
	Sigma 批号 2	Applichem	<0.05 <0.05
	苏州亚科	TCI	>0.05 <0.05
	苏州亚科	国药批号 1	<0.05 <0.05
	苏州亚科	国药批号 2	>0.05 <0.05
	苏州亚科	Applichem	<0.05 <0.05
	TCI	国药批号 1	<0.05 >0.05
	TCI	国药批号 2	>0.05 >0.05
	TCI	Applichem	<0.05 <0.05
国药批号 1	国药批号 2	<0.05 >0.05	
国药批号 1	Applichem	<0.05 <0.05	
国药批号 2	Applichem	<0.05 <0.05	
Sigma 批号 1	Sigma 批号 2	<0.05 >0.05	
Sigma 批号 1	阿拉丁	<0.05 <0.05	
Sigma 批号 1	TCI 批号 1	>0.05 >0.05	
Sigma 批号 1	TCI 批号 2	>0.05 >0.05	
N-甲基-D-葡萄糖胺	Sigma 批号 2	阿拉丁	<0.05 <0.05
Sigma 批号 2	TCI 批号 1	<0.05 >0.05	
Sigma 批号 2	TCI 批号 2	<0.05 <0.05	
阿拉丁	TCI 批号 1	<0.05 <0.05	
阿拉丁	TCI 批号 2	<0.05 <0.05	
TCI 批号 1	TCI 批号 2	>0.05 >0.05	
Sigma	国药	<0.05 <0.05	
Sigma	阿拉丁	>0.05 <0.05	
Sigma	amresco 批号 1	>0.05 >0.05	
Sigma	Amresco 批号 2	<0.05 <0.05	
NAD	国药	阿拉丁	<0.05 <0.05
国药	Amresco 批号 1	<0.05 <0.05	
国药	Amresco 批号 2	<0.05 <0.05	
阿拉丁	Amresco 批号 1	>0.05 >0.05	
阿拉丁	Amresco 批号 2	>0.05 <0.05	
Amresco 批号 1	Amresco 批号 2	>0.05 <0.05	

3 讨 论

目前国内外有关评定在 LDH 催化活性浓度测量中不同厂家或批号试剂的不确定度方面的研究还较少。本研究比较不同厂家或批号试剂对 LDH 催化活性浓度的影响,结果表明

对不同厂家或批号 LDH 试剂,所测 LDH 催化活性浓度结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。计算得到不同试剂批号对中值和高值混合血清的合成不确定度 u_c 分别为 3.26% 和 3.39%,扩展不确定度 U 为分别为 6.52% ($k=2$) 和 6.78% ($k=2$)。

本研究所得结果与德国临床化学与检验医学协会——参考实验室 2(DGKL-Rf2)所提供的试剂批号所引起的不确定度 1.24% 相比有所差异,可能是由于本实验室所用的试剂厂家及批号与 DGKL-Rf2 所用的不同所引起的。所以,本研究在评定不同厂家或批号试剂对 LDH 催化活性浓度所引起的不确定度时,应结合自身实验室的实际情况,不宜直接引用其他参考实验室的数据。

因此,在进行不确定度评定时,应考虑不同厂家批号试剂对其的影响;在进行校准和测量能力的评定时,也应考虑不同试剂厂家批号的影响。在今后工作中可以增加不同试剂厂家或批号数目,同时测量多个酶的催化活性浓度,进行长期研究,积累更多的数据,为参考实验室评估测量结果不确定度时提供参考^[9]。

参考文献

- [1] 迟珊,沈默,张曼. 谷氨酰基转移酶国际室间比对计划结果分析[J]. 检验医学, 2011, 26(8): 540-543.
- [2] 杨振华. 建设我国检验医学参考体系任重道远[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 734-736.
- [3] Mauris G, Lasserre V, Foulloy L. A fuzzy approach for the expression of uncertainty in measurement[J]. Measurement, 2001, 29(3): 165-177.
- [4] 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价模型的建立[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(5): 327-330.
- [5] Westwood S, King B, Noble B. Implementation of ISO Guide 34: Accreditation for reference material production. Accreditation Qual Assur, 2003, 8(9): 424-427.
- [6] 沈蕾,王建新,季伙燕,等. 常规法测定不同 GGT 催化活性的不确定度评定[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(9): 650-652.
- [7] Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6): 643-648.
- [8] BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) [M]. 1st ed. Switzerland: International Organization for Standardization, 2008: 1-7.
- [9] 汪静,张传宝,居漪,等. 国际临床化学联合会酶学测定参考方法实验室网络的初步建立[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(3): 258-263.