CRM při implementaci referenčních metod pro stanovení glukosy, celkové bílkoviny a bilirubinu v krevním séru
CRM and implementation of reference methods for glucose, total protein and bilirubin

Luděk Dohnal[1], Paul Faigl[2]
[1]Referenční laboratoř pro klinickou biochemii MZ ČR, ÚKBLD 1.LF UK a VFN, Karlovo nám. 32, 12111 Praha 2, ludek.dohnal@lf1.cuni.cz
[2]Res. Phys. Chem., LOCcomposites, University of Southern Queensland campus, block P5, Hendley/Baker St., Toowoomba, Qld. 4350, Australia, pfaigl@loccomposites.com.au

Abstract

Paper describes usage of certified reference materials NIST - SRM 965a, SRM 927d and SRM 916a. These materials are intended primarily for use in clinical chemistry on determinations of glucose, total protein and bilirubin. Their properties and fitness for given purposes were compared and evaluated. By means of these materials was verified the traceability and esimated the uncertainty for reference mehods of analyts mentioned above.

Motto:
Dí jemu Pilát: "Co jest pravda?" (10)

1. Úvod

V klinické biochemii patří stanovení glukosy, celkové bílkoviny a celkového biliruibinu v krevním séru (plasmě) celá desetiletí k základním rutinně prováděným analysám. V Referenční laboratoři pro klinickou biochemii byly postupně zavedeny referenční metody ke stanovení těchto tří analytů. Hexokinasová metoda pro stanovení glukosy (11), biuretová metoda dle Doumase pro stanovení celkové bílkoviny (2) a metoda Jendrassika-Grófa v provedení dle Doumase pro stanovení bilirubinu (4). Výsledky zmíněných metod jsou postupně navazovány na certifikované referenční materiály (CRM) a určovány příslušné nejistoty. Byly použity materiály z produkce NIST a to SRM 965a, SRM 927d a SRM 916a. Každý z nich má svá specifika. Toto sdělení se snaží nejprve podrobně analysovat údaje z jejich certifikátů a kriticky je zhodnotit. Po získání experimentálních dat stanovením jednotlivých analytů v příslušných RM pak určit celkové nejistoty těchto výsledků, zhodnotit příspěvky jednotlivých složek nejistot, možnosti jejich snížení a kriticky zhodnotit použité RM.

2. Údaje o SRM 965a, 927d a 916a z certifikátů NIST a jejich vyhodnocení

2.1. SRM 965a - glucose in frozen human serum

Použití: hodnocení správnosti postupů užívaných ke stanovení glukosy v lidském séru.
Balení: zmrazené lidské serum zatavené ve skleněných ampulích, 4 různé koncentrace, od každé 2x2 ml, tedy celkem 8 zatavených skleněných ampulí.
Materiál: směsné lidské sérum, filtrace, přídavky monohydrátu D-glukosy, pH nastaveno na 7.5 při 37°C, filtrace sterilním filtrem 0.22 µm.
Skladování: -50°C ve tmě (-20°C po dobu jednoho týdne).
Certifikované parametry: jsou uvedeny v tab. 1. Koncentrace glukosy jsou uvedeny s rozšířenou kombinovanou nejistotou pro hladinu spolehlivosti 95%, faktor pokrytí = 2.

Tab. 1

koncentrační úroveň	koncentrace (mmol/l)	nejistota (mmol/l)

úroveň 1	1.918	0.020
úroveň 2	4.357	0.048
úroveň 3	6.777	0.073
úroveň 4	16.24	0.19

Necertifikované parametry: žádné.
Expirace: 4 roky od certifikace.
Použité analytické postupy: ID/GC/MS (isotopové zředění/plynová chromatografie/hmotová spektrometrie -absolutní metoda).
Hodnocení: Je to matricový RM určený pro glukosu v lidském séru. Jedná se o směsné lidské sérum s eventuelním přídavkem glukosy a materiál je dodáván ve zmrazeném stavu. Rozsahem koncentrací (4 úrovně) přibližně pokrývá dolní polovinu koncentrací glukosy, které jsou slučitelné se životem. K použití stačí obsah skleněné ampule rozmrazit, vytemperovat a promíchat.

2.2. SRM 927d - bovine serum albumin (7% solution) - total protein standard

Použití: standardisace postupů používaných při klinických stanoveních celkové sérové bílkoviny, pro kritické posouzení pracovních kalibračních a kontrolních materiálů používaných v těchto postupech a jako referenční materiál pro stanovení celkové bílkoviny spektrometricky ve viditelné oblasti (biuretová reakce).
Balení: 10 zatavených skleněných ampulí, v každé 2.2 ml vodného roztoku hovězího albuminu.
Materiál: hovězí albumin rozpuštěn v 0.02 mol/l chloridu sodném, pH nastaveno roztokem NaOH 1.0 mol/l na 6.5 až 6.8, sterilisováno membránovou filtrací a testováno na sterilitu.
Skladování: 2 až 8°C.
Certifikované parametry: koncentrace hovězího albuminu analysou aminokyselin (s kombinovanou rozšířenou nejistotou pro hladinu spolehlivosti 95% a faktorem pokrytí = 2) je 65.41 ± 0.82 g/l.
Necertifikované parametry: koncentrace bílkoviny biuretovým činidlem (s kombinovanou rozšířenou nejistotou pro hladinu spolehlivosti 95% a faktorem pokrytí = 2) je 70.10 g/l ± 0.74 g/l.
Expirace: 4 roky od certifikace.
Použité analytické postupy: necertifikovaná koncentrace bílkoviny je stanovena referenční biuretovou metodou (2). Certifikovaná koncentrace hovězího albuminu je vypočtena z výsledků dvou nezávislých metod pro stanovení aminokyselin. První metoda ID-LC/MS/MS (isotopové zředění, kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektrometrie) je absolutní metodou stanovení aminokyselin. V hydrolysátu (HCl) se stanovuje fenylalanin, prolin a valin. Druhá metoda je postavena na komerčním analysátoru aminokyselin (ionexová chromatografie, derivatisace ninhydrinem a spektrometrická detekce při 570 a 440 nm), zde se stanovují v HCl-hydrolysátu aminokyseliny alanin, leucin, lysin a kyselina asparagová/asparagin. Uvedená měření byla kalibrována na SRM 2389.
Hodnocení: Jedná se o nematricový RM určený ke standardisaci při stanovení celkové sérové bílkoviny v klinických vzorcích. Materiálem je roztok hovězího albuminu ve vodě s přídavkem NaCl a pH nastaveným na 6.5 až 6.8 v kapalném stavu. Obsahuje jedinou úroveň koncentrace 70.1 g/l, která je přibližně ve spodní třetině fysiologických hodnot. Uvedená koncentrace není certifikována (!). K použití stačí obsah skleněné ampule vytemperovat a promíchat.

2.3. SRM 916a - bilirubin

Použití: kalibrace a standardisace postupů užívaných ke stanovení bilirubinu v klinických vzorcích a pro rutinní hodnocení pracovních kalibračních a kontrolních materiálů používaných v těchto postupech.
Balení: jedna lahvička obsahující 100 mg krystalického bilirubinu pod argonem. Lahvička je zatavena v polyesterovém obalu, který je rovněž naplněn argonem.
Materiál: bilirubin je isolován z prasečí žluči a vykrystalisován jako kyselina, je posléze čištěn pomocí chloroformu a síranu sodného (3) a následně z chloroformu rekrystalisován.
kladování: po otevření musí být materiál uchováván v pevně uzavřené lahvičce při 2 až 8 °C a chráněn před světlem. Standardní roztoky bilirubinu v roztoku albuminu chráněné před světlem a uchovávané při -20 °C vykazují pokles koncentrace o cca 1.5% a při -70°C o cca 1% za měsíc (4).
Certifikované parametry: čistota bilirubinu jako hmotnostní zlomek = 98.3% ± 0.3% (nejistota je cca 0.3 relativních procent), preparát obsahuje cca 1.2% chloroformu.
V tab. 2 jsou uvedeny necertifikované parametry: molární absorptivity stanovené v 6 laboratořích, rozšířené nejistoty jsou uvedeny pro hladinu spolehlivosti 95% s faktorem pokrytí 2.57 a směrodatnou odchylkou zahrnující přesnost "between-lab", "within-lab" a následně i čistotu.

Tab. 2		
měřený systém, nm	**molární absorptivita**	**nejistota**

	(litr . mol^{-1} . cm^{-1})	(litr . mol^{-1} . cm^{-1})
alkalické azobarvivo, 598	76641	631
neutrální azobarvivo, 530	57079	765
bilirubin v kofeinovém činidle, 432	50091	891
bilirubin v kofeinovém činidle, 457	49241	466

Expirace: 4 roky od certifikace.
Použité analytické postupy: charakterisace a určení stupně čistoty byly provedeny v Centru analytické chemie NIST gravimetrií, TLC, HPLC, NMR, MS a VIS spektrometrií, měření molární absorptivity bylo provedeno spektrometricky v šesti účastnických laboratořích.
Hodnocení: Jedná se o nematricový RM v substanci určený ke kalibraci a standardisaci stanovení bilirubinu v klinických vzorcích. Materiálem je substance s certifikovaným hmotnostním zlomkem bilirubinu v pevném stavu (krystaly). K použití dle (4) je třeba přesně odvážit přibližně 40 mg substance do 200 ml odměrné baňky a rozpustit v roztoku hovězího albuminu 40 g/l. Tento základní roztok je třeba pro použití přesně zředit roztokem hovězího albuminu 40 g/l. Např. k získání roztoku cca 40 mg/l (trojnásobek horní fysiologické meze koncentrace v séru) je třeba do 50 ml odměrné baňky odměřit 10.0 ml základního roztoku a doplnit albuminem 40 g/l. Roztoky bilirubinu je třeba pečlivě chránit před světlem. Hotové k použití, rozplněné v nádobkách z plastické hmoty a skladované ve tmě při teplotě -70°C jsou stabilní 6 měsíců. Z popsaných operací vyplývá, že použití je pracné a komplikované.Při přípravě k použití pak dále vzniká dodatečná nejistota ve výsledné koncentraci bilirubinu.

3. Navázání výsledků na RM a určení celkových nejistot

Za podmínek reprodukovatelnosti byla uvedenými metodami pro daný analyt získána sada výsledků koncentrace v RM. Pro glukosu byl použit SRM 965a úroveň 3 a pro celkovou bílkovinu SRM 927d.
Z důvodů dosud nedostatečné přesnosti výsledků nebyl pro bilirubin použit materiál SRM 916a, nýbrž necertifikovaný obdobný RM Bilirubin AppliChem A1393,0250, hmotnostní zlomek bilirubinu min. 98%, bal. 250 mg. Byly vypočteny střední hodnoty a směrodatná odchylka. S použitím referenční hodnoty RM byla spočtena vychýlení (bias) a s použitím standardních nejistot koncentrací v RM byly spočteny rozšířené kombinované nejistoty. Výsledky uvádí tab. 3.

3.1. Použité symboly a výpočty

prum(c) - střední hodnota výsledků stanovení v RM

s(r) - směrodatná odchylka

syst(bias) - bias (vychýlení)

u(k) - standardní nejistota koncentrace RM

u(c) - kombinovaná nejistota výsledku stanovení v RM

U(c) - rozšířená kombinovaná nejistota výsledku stanovení v RM

k - faktor pokrytí či rozšíření (coverage factor); pro cca 95% spolehlivost použijeme k = 2

Pro předpokládané rovnoměrné rozdělení platí: $syst^2(bias) = bias^2/3$

Platí zákon šíření chyb: $^2(c) = s^2(r) + syst^2(bias) + u^2(k)$

Platí definiční rovnice U(c) = k . u(c)

3.2. Výsledné statistiky a diskuse

Tab. 3

statistika	glukosa	celková bílkovina	bilirubin
s(r)	0.127 mmol/l	0.412 g/l	1.678 mg/l

$s^2(r)$	0.0161	0.1697	2.816
syst(bias)	0.313 mmol/l	2.7 g/l	-2.0 mg/l
$syst^2(bias)$	0.0327	2.43	1.33
u(k)	0.0365 mmol/l	0.37 g/l	0.28 mg/l
$u^2(k)$	0.00133	0.1369	0.0784
$u^2(c)$	0.0501	2.7366	4.2244
u(c)	0.2239 mmol/l	1.654 g/l	2.06 mg/l
U(c)	0.448 mmol/l	3.309 g/l	4.12 mg/l
prum(c)	7.09 mmol/l	72.8 g/l	38.6 mg/l

U glukosy je nejistota koncentrace v RM vzhledem k ostatním složkám zanedbatelná. Na celkové nejistotě 6.6% se nejvíc podílí vychýlení a ve srovnatelné míře též přesnost. Vhodnou korekcí vychýlení lze celkovou nejistotu snížit odhadem o 2%.
U celkové bílkoviny se na celkové nejistotě nejvíc podílí vychýlení. Jeho vhodnou korekcí lze celkovou nejistotu 4.7% snížit odhadem o 2%. Vzhledem k problematické standardisaci (12) používáním samotného hovězího nebo lidského albuminu k přípravě RM existuje patrně další složka nejistoty související s tím, že lidské sérum obsahuje kromě cca 60% albuminu řadu dalších bílkovin.
U bilirubinu se také na celkové nejistotě 10.1% podílí především vychýlení. Jeho vhodnou korekcí lze nejistotu snížit odhadem o 4%. Dalšího snížení celkové nejistoty je (snad) možno docílit zlepšením přesnosti . Relativní směrodatná odchylka je 4%. Poněvadž RM pro bilirubin je substance s definovanou čistotou, z níž je třeba nejprve pomocí vážení a odměřování objemů připravit roztok k analyse (viz odst. 2.3), je standardní nejistota u(k) koncentrace roztoku RM dána kromě nejistoty hmotnostního zlomku bilirubinu v substanci rovněž nejistotou vážení a nejistotou odměřování. Zatímco relativní rozšířenou nejistotu hmotnostního zlomku uvažujeme cca 0.3% (relativních !), je relativní rozšířená nejistota koncentrace RM cca 1.4% (100 . 2 . u(k) / 40.6).

4. Závěr

Zmíněné RM byly analysovány citovanými referenčními metodami a dále byly určeny střední hodnoty výsledků a jejich nejistoty. U všech tří analytů je možno podstatně snížit nejistotu vhodnou korekcí vychýlení.

U glukosy, pokud by byly použity i zbývající 3 úrovně SRM 965a s obdobným výsledkem, by výsledky byly spolehlivě navázány v rozsahu koncentrací 2 až 16 mmol/l. RM má příslušné hodnoty ce rtifikovány, je matricový a rozšířené nejistoty jeho koncentrací jsou cca 1%.

U celkové bílkoviny jsou výsledky spolehlivě navázány v okolí koncentrace 70 g/l. Vzhledem k fysiologickému rozmezí celkové bílkoviny cca 66 až 87 g/l a s přihlédnutím k rozmezí hodnot slučitelných se životem je žádoucí použít také RM s koncentrací kolem 50 g/l a kolem 100 g/l, které bohužel nebyly k disposici. V SRM 927d koncentrace celkové bílkoviny není certifikována, materiál není matricový. Při stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí v séru vlastně stanovujeme směs látek - sérový albumin, směs sérových glykoproteinů a lipoproteinů a imunoglobuliny. Standardisace tohoto stanovení je přinejmenším diskutabilní a pravděpodobně brzy dozná podstatných změn (12). Z důvodů historických a také proto, že koncentrace celkové bílkoviny v séru je klinicky významná a analyticky relativně snadno a levně dostupná, bude navzdory problémům patřit ještě dlouho mezi rutinní stanovení.

U bilirubinu je žádoucí zlepšit přesnost, relativní směrodatná odchylka je 4%. RM je substance s definovanou čistotou, z níž se nejprve pomocí vážení a odměřování objemů připraví roztok k analyse (viz odst. 2.3). Standardní nejistota u(k) koncentrace roztoku RM je pak dána kromě nejistoty hmotnostního zlomku bilirubinu v substanci rovněž nejistotou vážení a odměřování objemů. Rozšířená nejistota hmotnostního zlomku je certifkována. Relativní rozšířená nejistota u(k) koncentrace RM, která je cca 1.4% (100 . 2 . u(k) 40.6), však certifikovaná není a je závislá na způsobu přípravy (navážka, rozpouštění a ředění). Alternativou je použití jiného CRM (matricového, bez dodatečné nejistoty přípravy).

5. Použité zkratky

RM - referenční materiál

CRM - certifikovaný referenční materiál

NIST - National Institute of Standards and Technology = Americký standardisační institut.

SRM - standard reference material. Tuto zkratku používá NIST pro své CRM, aby po americkém způsbu odlišil americké CRM od neamerických.

6. Literatura

1) White V.E., Welch M.J., Sun T., Sniegosky L.T., Schaffer R., Hertz H.S., Cohen A.: The accurate determination of serum glucose by isotope dilution mass spectrometry - two methods. Biomed. Mass Spectrom. 9, 395-405 (1982)
Doumas B.T., Bayse D.D., Carter R.J., Peters T. Jr., Schaffer R.: Reference method for the determination of total protein in serum. Clin. Chem. 27, 1642-1650 (1981)
3) Fog J.: Bilirubin-purification-purity. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 49-54 (1964)
4) Doumas B.T., Kwok-Cheung P.P., Perry B.W., Jendrzejczak B., McComb R.B., Schaffer R., Hause L.L.: Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: Development and validation. Clin. Chem. 31, 1779-1789 (1985)
5) SRM 965a - certifikát NIST, https://srmors.nist.gov/certificates/965A.pdf (18.09.2008)
6) SRM 927d - certifikát NIST, https://srmors.nist.gov/certificates/927D.pdf (18.09.2008)
7) SRM 916a - certifikát NIST, https://srmors.nist.gov/certificates/916A.pdf (18.09.2008)
8) Bičovský K., Dempír J., Dohnal L., Friedecký B., Kratochvíla K., Kučera J., Plzák Z.: Používání referenčních materiálů v chemické analýze - metodická příručka. Kvalimetrie 14, Eurachem-ČR, Praha 2004
9) Dohnal L.: Vyjádření nejistoty měření. Klin. Biochem. Metab., 6 (BCB 27), 103-108 (1998)
10) Biblí česká šestidílná, Jan 18:38, http://www.etf.cuni.cz/~rovnanim/bible/6/J18.php (14.8.2008)
11) Neese J.W., Duncan P., Bayse D., Robinson M., Cooper T., Stewart C.: Development and evaluation of a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose Reference Method. HEW Publication No. (CDC) 77-8330, Washington, DC 20402, US Govt. Printing Office, 1976
12) Novosád L.: Vliv kalibrace a kalibrátorů na stanovení celkové sérové bílkoviny a na referenční interval. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university v Brně, duben 2008, http://is.muni.cz/th/78105/prif_m/Diplomka_Novosad_Lukas.txt (13.10.2008)