文章编号：1000-5404(2010)22-2455-02

技术方法

应用 EP7-A2 文件对无机磷测定的干扰评价

赵笔辉　(315806 浙江 宁波，浙江省宁波市北仑区人民医院检验科)

【摘要】 目的 对紫外直接法测定血清无机磷进行抗干扰评价，深入完整地掌握 CLSI 制订的 EP7-A2 文件。**方法** 依据 EP7-A2 文件要求的“配对-差异”实验对干扰物进行筛选、确认。若确定该物质产生干扰，则进一步利用“剂量-效应”实验对干扰物浓度与干扰程度之间的关系进行分析。**结果** 溶血干扰为负干扰，相关系数 $r^2=0.998\ 8$，回归方程为 $y=-0.394\ 4x-0.018$；黄疸干扰为负干扰，相关系数 $r^2=0.999\ 8$，回归方程为 $y=-0.004\ 5x+0.034\ 4$；脂浊干扰为正干扰，相关系数 $r^2=0.993\ 6$，回归方程为 $y=0.079\ 3x+0.068\ 7$。**结论** 设置了双波长的紫外直接法无法消除溶血、黄疸、脂浊等因素的严重干扰，建议对受干扰的标本进行血清 +1 试剂空白(对于单试剂的检测应采取血清 + 无主反应物的试剂空白)，以消除干扰物光吸收本底的影响。

【关键词】 无机磷；紫外直接法；干扰实验；配对-差异；剂量-效应
【中图法分类号】 R446.112；Q582　　**【文献标志码】** B

血清无机磷测定是临床生化检验的常规项目，是离子测定的重要组成部分，在临床上应用较为广泛。目前临床实验室对血清无机磷的测定方法有磷钼酸法(紫外分光光度法)[1]、钼蓝法及干化学法等，其中紫外分光光度法是最为常用的血清无机磷测定方法，该法的各种市售试剂盒一般均为单试剂型。磷钼酸法的反应起动快速，因而在自动生化分析仪上不易读取空白光密度，受到溶血、黄疸、脂浊等因素的严重干扰[2]，以往的实际工作经验也意识到这些干扰的存在。本研究通过严格应用美国临床实验室标准化委员会(clinical and laboratory standards institute，CLSI)制定的评价方案中 EP7-A2 文件的标准化操作[3]，对磷钼酸法测定血清无机磷的干扰情况作出分析与评价。

1　材料与方法

1.1　仪器及试剂

1.1.1　仪器　OLYMPUS AU640 全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司)。

1.1.2　试剂　无机磷测定试剂盒(紫外直接法)(批号 20090712，上海科华生物工程股份有限公司生产)，校准品应用 c. f. a. s 多项校准品(由罗氏公司提供)，室内质控品应用由美国贝克曼公司生产的多项目临床化学定值质控血清，2 个水平。

1.2　方法

1.2.1　无机磷测定主要参数　测定方法为一点终点法，测光点 16，主/副波长 340 nm/410 nm，样本/试剂量 4 μl/200 μl。

1.2.2　溶血干扰物的制备(血红蛋白储存液)　严格按照 EP7-A2 标准程序，取新鲜无溶血、无黄疸、无脂浊的肝素抗凝血，将离心分离的血球，经 3 次离心洗涤后，加去离子水并经低温冷冻过夜。解冻后离心，取上层血红蛋白液为血红蛋白储存液，血红蛋白浓度为 112 g/L。

1.2.3　黄疸干扰物的制备(胆红素储存液)　用胆红素纯品配制成高浓度胆红素溶液，胆红素浓度为 13 350 μmol/L。

1.2.4　脂浊干扰物的制备(甘油三酯储存液)　直接用 20% 脂肪乳剂注射液(英脱利匹特)作为甘油三酯储存液，甘油三酯浓度为 475.05 mmol/L。

1.2.5　制备基础样本　选取我院健康体检者的无溶血、无黄疸、无脂浊的新鲜混合血清，并用磷酸二氢钠调整无机磷浓度到医学决定水平(EP-A2 文件推荐的分析物测试浓度)。

1.2.6　对照样本和干扰样本的制备　溶血干扰样本为25 ml 基础样本 +1 168 μl 血红蛋白储存液，其血红蛋白干扰物浓度为 5 g/L；对照样本为 25 ml 基础样本 +1 168 μl 去离子水。黄疸干扰样本为 25 ml 基础样本 +1 350 μl 胆红素储存液，其胆红素干扰物浓度为 684 μmol/L；对照样本为 25 ml 基础样本 + 1 350 μl 去离子水。脂浊干扰样本为 24 ml 基础样本 +2 000 μl 甘油三酯储存液，其甘油三酯干扰物浓度为 37 mmol/L；对照样本为 24 ml 基础样本 +2 000 μl 去离子水。

1.2.7　“剂量-效应”(dose-response)样本的配制　EP7-A2 文件要求制备一系列不同浓度的干扰测试样本，通常 5 个浓度足够确定 1 个线性的剂量效应关系。把 1.2.6 制备的对照样本定为低值样本，干扰样本定为高值样本，按不同配比配制成 5 个浓度，见表 1。

表 1　“剂量-效应”样本的配制

测试混合液	配制方法	血红蛋白终浓度(g/L)	胆红素终浓度(μmol/L)	甘油三酯终浓度(mmol/L)
1 号(低值样本池)	低值样本 4 ml	0	7.6	1
2 号(25% 值样本池)	低值样本 3 ml + 高值样本 1 ml	1.25	176.7	10
3 号(中值样本池)	低值样本 2 ml + 高值样本 2 ml	2.50	345.8	19
4 号(75% 值样本池)	低值样本 1 ml + 高值样本 3 ml	3.75	514.9	28
5 号(高值样本池)	高值样本 4 ml	5.00	684.0	37

【通信作者】 赵笔辉，电话：(0574)86116017，E-mail：13706848875@139.com

在同一分析批之内检测5个样本的浓度，第1组按照升序测定各样本，第2组按降序测定，第3组按照升序，平均系统漂移影响。

1.2.8 “配对-差异”(paired-difference)

1.2.8.1 临床可允许的最大干扰范围的确定 根据分析物的生理变异确定无机磷的总误差(TE)为10.2%[1]，建立有临床意义差别的可接受标准(d_{max})定为1/4 TE即2.55%。

1.2.8.2 计算实验需要重复测定的次数 根据EP7-A2文件提供双侧检验的实验重复次数公式 $n=2[(z_{1-\alpha/2}+z_{1-\beta})s/d_{\max}]^2$ (s为无机磷重复标准差，n为测定次数)[3,4]。

1.2.8.3 干扰结果的判断 根据EP7-A2文件计算d_{obs}、d_c。d_{obs}是干扰、对照样本分析物平均值的差值，公式为 $d_{obs}=Interference=\bar{x}_{test}-\bar{x}_{control}$，在双侧检验中，$d_c=\frac{d_{null}+sz_{1-\alpha/2}}{\sqrt{n}}$。当$d_{obs}$绝对值小于或等于$d_c$时，不拒绝无效假设，认为检测物质不是干扰物质；当$d_{obs}$绝对值大于$d_c$时，拒绝无效假设，接受备择假设，认为检测物质是干扰物质[3,4]。

2 结果

2.1 干扰物对无机磷的干扰判断结果

对测得的干扰样本和对照样本结果进行数据分析，并根据1.2.8.3公式进行干扰判断，结果见表2。

表2 干扰样本和对照样本的测定结果与干扰判断

干扰类别	干扰样本均值(mmol/L)	对照样本均值(mmol/L)	d_{obs}	d_c	s	干扰判断
溶血干扰	0.12	2.09	-1.97	0.02	0.024	干扰
黄疸干扰	-1.00	2.06	-3.06	0.02	0.024	干扰
脂浊干扰	5.01	2.14	2.87	0.02	0.024	干扰

2.2 干扰效果评价结果

溶血、黄疸、脂浊干扰无机磷测定的剂量效应曲线均呈线性关系，溶血干扰为负干扰，回归方程为 $y=-0.394\ 4x-0.018$，相关系数 $r^2=0.998\ 8$；黄疸干扰为负干扰，回归方程为 $y=-0.004\ 5x+0.034\ 4$，相关系数 $r^2=0.999\ 8$；脂浊干扰为正干扰，回归方程为 $y=0.079\ 3x+0.068\ 7$，相关系数 $r^2=0.993\ 6$。回归线斜率代表每单位干扰物的偏倚，y轴上的截距表示干扰浓度的校正，通过回归方程使得干扰物浓度水平的干扰程度都可被估计。

3 讨论

近年来干扰对于检验结果的影响越来越受到关注，国内外针对干扰因素对不同分析项目影响的基础研究，包括其原理、影响途径等已有比较详细的探讨，但对干扰评价方法尚未能标准化地应用于临床实验室的日常检验工作。EP7-A2是标准干扰评价方法，该评价方案可广泛适用于临床实验室的检测方法、仪器以及各种类型标本，对临床很多可疑干扰物进行分析。本研究通过临床常见标本干扰因素对血清无机磷测定的干扰评价，建议对一般临床化学检验项目，可先利用“配对-差异”实验在较高浓度下对系列可能的干扰物作初步筛选，在确定某种物质为干扰物质后，可进一步利用“剂量-效应”实验评估干扰物浓度与干扰程度的关系。

一般说来，双波长测定能消除试样溶液的背景吸收干扰和浑浊干扰，不受共存的干扰组分影响，可提高测定的准确度[5]。然而对紫外直接法检测无机磷来说，虽设置了410 nm副波长，但不能有效消除溶血、黄疸、脂浊的干扰。本研究比较干扰标本和对照标本的反应曲线和反应光密度，发现在溶血、黄疸干扰时，干扰样本的副波长光密度增大明显大于主波长处的光密度，表明血红蛋白、胆红素在副波长410 nm处有较大的吸收，而在主波长340 nm处几乎没吸收。仪器根据主波长与次波长光密度差来计算时就多减去了血红蛋白、胆红素在副波长410 nm处上升的光密度，使得参与计算的反应光密度变得很小，所以造成干扰样本的结果偏低，甚至出现负值。对于脂浊标本往往在340 nm波长处的光密度增高，但不会明显增高副波长410 nm处光密度，这是脂浊样本造成无机磷测定正干扰使测定结果偏高的原因。紫外直接法测定血清无机磷，灵敏度高、反应速度快、适合自动化分析，双波长的设置又增加了检测数据的稳定性，但在遇到实验室最常见的溶血、黄疸、脂浊等内源性干扰物干扰时，产生极大的偏差。

本实验结果显示，不合理使用双波长不仅不能消除干扰，反而会使干扰幅度增强，干扰方向变得混乱，这与文献[6]报道一致。因此为保证日常检测结果的准确性，建议对有溶血、黄疸、脂浊的标本可另外测定一个试剂空白，以消除干扰物光吸收本底的影响。

参考文献：

[1] 叶应妩，王毓三，申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第3版. 南京：东南大学出版社，2006：80，387-388.

[2] 王元彬，叶昌斌，董玲. 血清无机磷紫外光度法双通道测定[J]. 现代检验医学杂志，2006，21(3)：4-5.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry；Approved Guideline-Second Edition[R]. Wayne：CLSI document EP7-A2，2005.

[4] 吕赛平，伍志杰，邹学森. 临床化学检验中干扰物质的筛选[J]. 江西医学检验，2007，25(6)：610-612.

[5] 陈惠黎. 生物化学检验技术[M]. 北京：人民卫生出版社，1988：14.

[6] 程正江. 血红蛋白和胆红素干扰临床化学分析的机理初探[J]. 国外医学：临床生物化学与检验学分册，2004，25(6)：488-491，493.

(收稿 2010-05-26 修回 2010-08-25)

(编辑 吴培红)