

# 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 493—2017

---

## 酶学参考实验室参考方法测量不确定度 评定指南

Guide to the estimation of the measurement uncertainty of reference methods in  
enzymology reference laboratories

2017-09-06 发布

2018-03-01 实施

---

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	2
5 测量不确定度 .....	2
5.1 误差和不确定度 .....	2
5.2 不确定度的来源 .....	3
5.3 不确定度的分类 .....	5
6 评定测量不确定度 .....	6
6.1 评定测量不确定度的一般步骤 .....	6
6.2 评定测量不确定度的过程 .....	6
7 评定测量不确定度的具体步骤 .....	7
7.1 规定被测量 .....	7
7.2 IFCC 参考方法测量酶催化活性浓度的测量程序和测量模型 .....	9
7.3 识别所有可能测量不确定度来源 .....	12
7.4 绘制测量过程因果(鱼骨)图和测量全过程不确定度计算公式 .....	16
7.5 列出每一输入量的量值 .....	17
7.6 计算每一输入量的标准不确定度和绘制预估表 .....	18
7.7 计算酶催化活性浓度量值( $\mu\text{kat/L}$ ) .....	25
7.8 评定测量全过程的合成标准不确定度 .....	25
7.9 计算扩展不确定度( $U$ )并确定合成因子( $k$ )和单位 .....	27
7.10 输入量对测量不确定度的贡献图和主要输入量 .....	27
8 不确定度的报告 .....	28
8.1 总则 .....	28
8.2 所需要的信息 .....	29
8.3 报告标准不确定度 .....	29
8.4 报告扩展不确定度 .....	29
8.5 与限值的符合性 .....	29
附录 A (资料性附录) 寻找测量不确定度的来源以及因果(鱼骨)图的绘制 .....	31
附录 B (资料性附录) 不确定度的常见来源和数值 .....	36
附录 C (资料性附录) 数据分布函数 .....	38

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：北京医院、北京航天总医院、江苏省南通医学院第一附属医院、广东省中医院、上海市临床检验中心、中国医学科学院北京协和医院、北京世纪坛医院。

本标准主要起草人：杨振华、陈宝荣、王惠民、黄宪章、汪静、居漪、邱玲、张曼。

# 酶学参考实验室参考方法测量不确定度 评定指南

## 1 范围

本标准规定了酶学参考实验室在运行参考方法时测量不确定度的来源、评定测量不确定度步骤及报告方式。

本标准适用于酶学参考实验室评定参考方法测量酶催化活性浓度的测量不确定度,也适用于采用分光光度原理测量的其他参考方法测量量值的测量不确定度评定,同时可供认可评审员在评审过程中使用。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

JJF 1001—2011 通用计量术语及定义

JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示

CNAS-GL06:2006 化学分析中不确定度的评定指南

## 3 术语和定义

JJF 1001—2011 界定的以及以下术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 样本 sample

从某系统中抽取的一个部件或较多部件,对其分析后可获取该系统的信息,通常为系统属性判定和系统形成提供参考。

示例 1:来源于较大量血清的一定量的血清。

示例 2:一组测量结果的一个无偏移或者随机选择的亚组。

### 3.2

#### 确认 validation

通过检查和提供客观证据,表明能够满足预期应用的特定要求的验证。

示例:通常用于测量水中氮浓度的测量程序,同样被确认为可测量人血清中氮浓度。

注:预期应用或用户需要是在测量系统以外并与其无关;但是工作性能是测量系统或测量程序的一部分,也就是它在测量系统之内(验证)。

### 3.3

#### 验证 verification

通过检查和提供客观证据表明某一规定项目能够满足特定要求。

示例:证明达到测量系统的工作性能或法规要求。

注 1:规定项目可以是过程、测量程序、物质、化合物或测量系统。

注 2:特定要求可以是达到厂家的技术性能。

注 3:化学中,所涉及实体的本质或者活性的验证,要求描述该实体或活性的结构或特性。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CV: 变异系数(coefficient of variation in percent)

IFCC: 国际临床化学和检验医学联合会(International federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

IQC: 室内质控(internal quality control)

IUPAC: 国际理论和应用化学联盟(International union of pure and applied chemistry)

SD: 标准(偏)差(standard deviation)

SOP: 标准操作程序(standard operating procedure)

## 5 测量不确定度

### 5.1 误差和不确定度

5.1.1 误差是单个数值,原则上已知误差的数值可以用来修正结果。不确定度是以一个区间的形式表示,为一个分析过程和所规定样品类型做评估时,可适用于其所描述的所有测量值。对大多数医学实验室的检测项目而言,测量不确定度大小与测量值高低相关,一般不能用不确定度数值修正测量结果。此外,误差和不确定度的差别还表现在:修正后的分析结果可能非常接近于被测量的数值,因此误差可以忽略。不确定度可能很大,因为分析人员对于测量结果的接近程度没有把握。测量结果的不确定度不可以解释为代表了误差本身或经修正后的残余误差。

注:误差是一个理想的概念,不可能被确切地知道。

5.1.2 通常认为误差含有两个分量,分别称为随机分量和系统分量,包括以下内容:

——随机误差通常产生于影响量的不可预测的变化。这些随机效应使得被测量的重复观察的结果产生变化。分析结果的随机误差不可消除,但是通常可以通过增加观察次数加以减少;

注:算术平均值或一系列观察值的平均值的实验标准差是由一些随机效应产生的平均值不确定度的度量,而不是平均值的随机误差。由这些随机效应产生的平均值的随机误差的准确值是不可知的。

——系统误差定义为在对于同一被测量的大量分析过程中保持不变或以可以预测的方式变化的误差分量。它是独立于测量次数的,因此不能在相同的测量条件下通过增加分析次数的办法使之减小。包括:

- 恒定的系统误差:例如定量分析中没有考虑到试剂空白,或多点设备校准中的不准确性,在给定的测量值水平上可能是恒定的,但是也可能随着不同测量值的水平而发生变化;
- 不恒定的系统误差:在一系列分析中,影响因素在量上发生了系统的变化,例如由于试验条件控制得不充分会产生不恒定的系统误差。

示例 1:在进行化学分析时,一组样品的温度在逐渐升高,可能会导致结果的渐变。

示例 2:在整个试验的过程中,传感器和探针可能存在老化影响,可能引入不恒定的系统误差。

5.1.3 误差的另一个形式是假误差或过错误差。这种类型的误差使测量无效,它通常由人为失误或仪器失效产生。记录数据时数字进位、光谱仪流通池中存在的气泡或试样之间偶然的交叉污染等是这类误差的常见原因。包括以下内容:

——假误差并不总是很明显。当重复测量的次数足够多时,通常应采用异常值检验的方法检查这组数据中是否存在可疑的数据。所有异常值检验中的阳性结果都应该小心对待,可能时应向实验者核实。通常情况下,不能仅根据统计结果就剔除某一数值。

——过错误差的测量不确定度是不可接受的,不可将此类误差计算到测量不确定度中。然而,因数字进位产生的误差可进行修正,特别是当这种误差发生在首位数字时。

5.1.4 测量结果的所有已识别的显著的系统影响都应修正。测量仪器和系统通常需要用测量标准或标准物质进行调节或校准,以修正系统影响。与这些测量标准或标准物质有关的不确定度及修正过程中存在的不确定度应加以考虑。

5.1.5 用本文件获得的不确定度并没有考虑出现假误差或过错误差的可能性。

## 5.2 不确定度的来源

### 5.2.1 通常来源

在实际工作中,结果的不确定度可能有很多来源,例如定义不完整、取样、基体效应和干扰、环境条件、质量和容量仪器的不确定度、参考值、测量方法和程序中的估计和假定、随机变化等。

### 5.2.2 酶学参考实验室不确定度主要来源

#### 5.2.2.1 测量前阶段

##### 5.2.2.1.1 抽样和样本准备

酶学参考实验室主要工作是给委托的样本赋值,一般不存在取样问题。但如还接受评定样本间变异、样本稳定性等工作时,此时内部或外部取样是规定程序的组成部分,例如不同样品间的随机变化以及取样程序存在的潜在偏差等影响因素构成了影响最终结果的不确定度分量。本文件对此暂不加以讨论。

液体样本,常需深低温(如 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ )保存,测量前需加以融冻。应严格控制融冻条件,如规定放置在 $18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴。此外在融化后应加以混匀,要严格控制混匀方式、时间和强度等,以控制不确定度来源。

冻干粉末样本测量前需加蒸馏水复溶。应严格控制所加蒸馏水质量,应为实验室一级用水。有可能时应用称重法控制加水的量并规定复溶后混匀方法。通过这些措施减小样本准备时产生的测量不确定度。

##### 5.2.2.1.2 存储条件

若测试样品在分析前要储存一段时间,则存储条件可能影响结果。因此,存储时间以及存储条件也被认为是不确定度来源。

酶学参考实验室应注意某些酶是冷变性而非热变性。如低温保存样本,会加速乳酸脱氢酶变性,从而产生不确定度。

##### 5.2.2.1.3 仪器的影响

下列仪器会影响酶催化活性浓度的测量结果,包括:

- 分光光度计:主要不确定度来源有波长准确度、半波宽、读数的正确性、噪音和漂移等;
- 移液器:最大允许误差(MPE)和重复性;
- 天平:最大允许误差等。

酶学参考实验室应使用最高级别的分析仪器,使用前应检查仪器性能,确保性能在规定的参数内。可按厂家声称的参数评定不确定度。

#### 5.2.2.1.4 试剂

配制酶反应试剂时有多种不确定度来源,即使配制试剂的原材料已被检测过,因为检测过程存在着某些不确定度,如某些情况下不能知道滴定溶液浓度。许多有机指示剂,纯度并不是 100%,可能含有异构体和无机盐。对于这类物质的纯度,制造商通常只标明不低于规定值。关于纯度水平的假设将会引进一个不确定度分量。

反应混合液中各种成分浓度变化有可能是测量不确定度的来源:酶促反应速度受各种物质浓度的影响,有底物、激活剂、抑制剂、缓冲物等。当使用酶偶联反应测量酶活性浓度时,需使用各种工具酶(指示酶、辅助酶)和相应底物。参考方法已对试剂中各种物质做了最适浓度的研究和规定。在配制试剂时,只要正确地应用高级别天平称量,浓度变化很小,常可忽略不计,不计算它们的标准不确定度。但注意在称量很小时,如 ALT 和 AST 测量试剂中的磷酸吡哆醛、CK 测量试剂中 5'AMP,最好通过实验验证这些物质由于称量误差能否引起较大的测量不确定度。

试剂的老化和不同批次配制也会引起测量不确定度,如在每个批次测量前重新配制试剂,则测量结果包含了配制试剂引起的不确定度并除去了试剂老化的影响。

微量的杂质有可能抑制或激活酶的催化活性,这可能是产生测量不确定度一个很重要的来源。有必要对配制酶测量试剂的原材料制定更严格的要求,如 L-丙氨酸中 D-丙氨酸含量,双甘肽中甘氨酸含量等。

#### 5.2.2.1.5 测量原理——假设的化学反应定量关系

当假定分析过程按照特定的化学反应定量关系进行时,可能有必要考虑偏离所预期的化学反应定量关系,或反应的不完全或副反应。

#### 5.2.2.2 测量阶段

##### 5.2.2.2.1 测量时环境条件

容量玻璃仪器一般在与校准温度不同的环境温度下使用。总的温度影响应加以修正,但是液体和玻璃温度的不确定度应加以考虑。同样,当材料对湿度的可能变化敏感时,湿度也是重要的,此时湿度影响也应加以修正。

##### 5.2.2.2.2 样品的影响

复杂基体的被分析物的回收率或仪器的响应可能受基体成份的影响。被分析物的物种会使这一影响变得更复杂。由于改变的热力情况或光分解影响,样品(被分析物)的稳定性在分析过程中可能会发生变化。当用“加料样品”来估计回收率时,样品中的被分析物的回收率可能与加料样品的回收率不同,因而引进了需要加以考虑的不确定度。

##### 5.2.2.2.3 空白修正

空白修正的值和适宜性都会有不确定度,在痕量分析中尤为重要。

##### 5.2.2.2.4 其他重要不确定度来源

###### 5.2.2.2.4.1 最终反应混合液的 pH

酶催化反应速度受 pH 变化影响,一般而言,每个酶都有其最适反应 pH,并随 pH 变化反应速度上升或下降。评定测量不确定度时应考虑此分量。不同酶对 pH 反应不一致。在评定测量不确定度时往

往要计算灵敏系数。

配制同一 pH 的缓冲液常可使用多种化学物质,应选择合适的原料。此时不仅要考虑原料的 pKa 值,以保证有足够的缓冲能力,还要考虑原料本身是否具有抑制或激活酶催化活性的作用。

#### 5.2.2.2.4.2 酶催化反应时的温度

温度对酶催化活性浓度有明显的影响,一般而言,温度升高会加速反应,但超过一定温度后,由于酶蛋白变性而反应速度变慢。在评定测量不确定度时往往要计算温度影响的灵敏系数。

#### 5.2.2.3 测量后阶段

在计算酶活性浓度时需使用摩尔消光系数,应考虑此系数的不确定度。有些仪器选用直线回归,按斜率计算结果,有时会导致较差的拟合,因此引入较大的不确定度。

修约能导致最终结果的不准确,但这些是很少能预知的,所以建议不要在计算过程中,而在计算的最后进行修约,这样可能无必要考虑修约引起的不确定度。

#### 5.2.2.4 其他

##### 5.2.2.4.1 实验室条件的影响

5.2.2.4.1.1 温湿度:测量时实验室的温湿度通常对测量有一定的影响,尤其对酶学测量,不同温湿度条件对加样、分光光度计的散热、天平称量等多个与测量有关的环节影响量不同,通常也可产生一定的测量不确定度,但目前尚未找到有效的评定方法,应尽量保持测量时实验室温湿度一致是有效控制测量不确定度的方法。

5.2.2.4.1.2 磁场、噪声与振动:由于酶学项目通常采用分光光度计测量,强磁场、噪声与振动会干扰温度、吸光度等基于电子信号模式和工作原理的测量,测量区域应远离强磁场、噪声与振动区。

##### 5.2.2.4.2 操作人员的影响

不论在何阶段,操作人员有很大影响,有可能是测量不确定度的重要来源。为查出和减小此分量的测量不确定度,应对操作人员进行严格培训、考核。不同批次测量由不同技术人员进行。

##### 5.2.2.4.3 随机影响

在所有测量中都有随机影响产生的不确定度。在评定测量不确定度时,该项应作为一个不确定度来源包括在列表中。

### 5.3 不确定度的分类

5.3.1 当用标准偏差表示时,测量不确定度分量称为标准测量不确定度。如果各分量间存在相关性,应考虑协方差。可以评价几个分量的综合效应,这可以减少评估不确定度的总工作量。如果上述综合考虑的几个不确定度分量存在相关,只需在综合时考虑采用协方差,在最后合成时,无需另外考虑其相关性。

5.3.2 对于测量结果  $y$ ,其不确定度称为合成标准测量不确定度,记做  $u_c(y)$ ,是一个标准偏差估计值,它等于运用不确定度传播律将所有测量不确定度分量(无论是如何评价的)合成为总体方差的正平方根。

5.3.3 在报告测量结果时,往往要用到扩展测量不确定度  $U$ ,扩展不确定度是指被测量的值以一个较高的置信水平存在的区间宽度。 $U$  由合成标准不确定度  $u_c(y)$  乘以包含因子  $k$  得到。选择包含因子  $k$



时应根据所需要的置信水平,对于大约 95% 的置信水平而言, $k$  值为 2。

报告扩展不确定度时应注明包含因子  $k$ ,因为只有如此才能复原被测量值的合成标准不确定度,以备在可能需要用该量进行其他测量结果的合成不确定度计算时使用。

## 6 评定测量不确定度

### 6.1 评定测量不确定度的一般步骤

#### 6.1.1 第一步:规定被测量

清楚地说明需要测量什么,包括被测量和被测量所依赖的输入量(例如被测数量、常数、校准标准值等)的关系。并以标准操作程序(SOP)或其他方法描述中给出测量有关的技术资料。

#### 6.1.2 第二步:识别不确定度的来源(参见附录 A)

列出不确定度的可能来源。包括在第一步中所规定的测量模型关系式中所含参数的不确定度来源,但也要考虑可能还有其他的来源。应包括那些由化学假设所产生的不确定度来源。

#### 6.1.3 第三步:不确定度分量的量化(参见附录 A)

绘制因果(鱼骨)图和不确定度计算公式;对第二步识别和列出的每一个不确定度来源列出量值并计算相关的不确定度分量大小。通常可能评估或确定与大量独立来源有关的不确定度的单个分量。还有一点很重要的是要考虑所列出的数据是否反映所有的不确定度来源。常需计划其他的实验和研究来保证不确定度来源都得到了充分的考虑。

#### 6.1.4 第四步:计算合成不确定度和扩展不确定度

在第三步中得到的信息,只是不确定度的一些量化分量,它们可能与单个来源有关,也可能与几个不确定度来源的合成影响有关。这些分量应以标准偏差的形式表示,并根据不确定度传播律有关规则进行合成,以得到合成标准不确定度,并应选择适当的包含因子来给出扩展不确定度。

### 6.2 评定测量不确定度的过程

评定测量不确定度的过程见图 1。

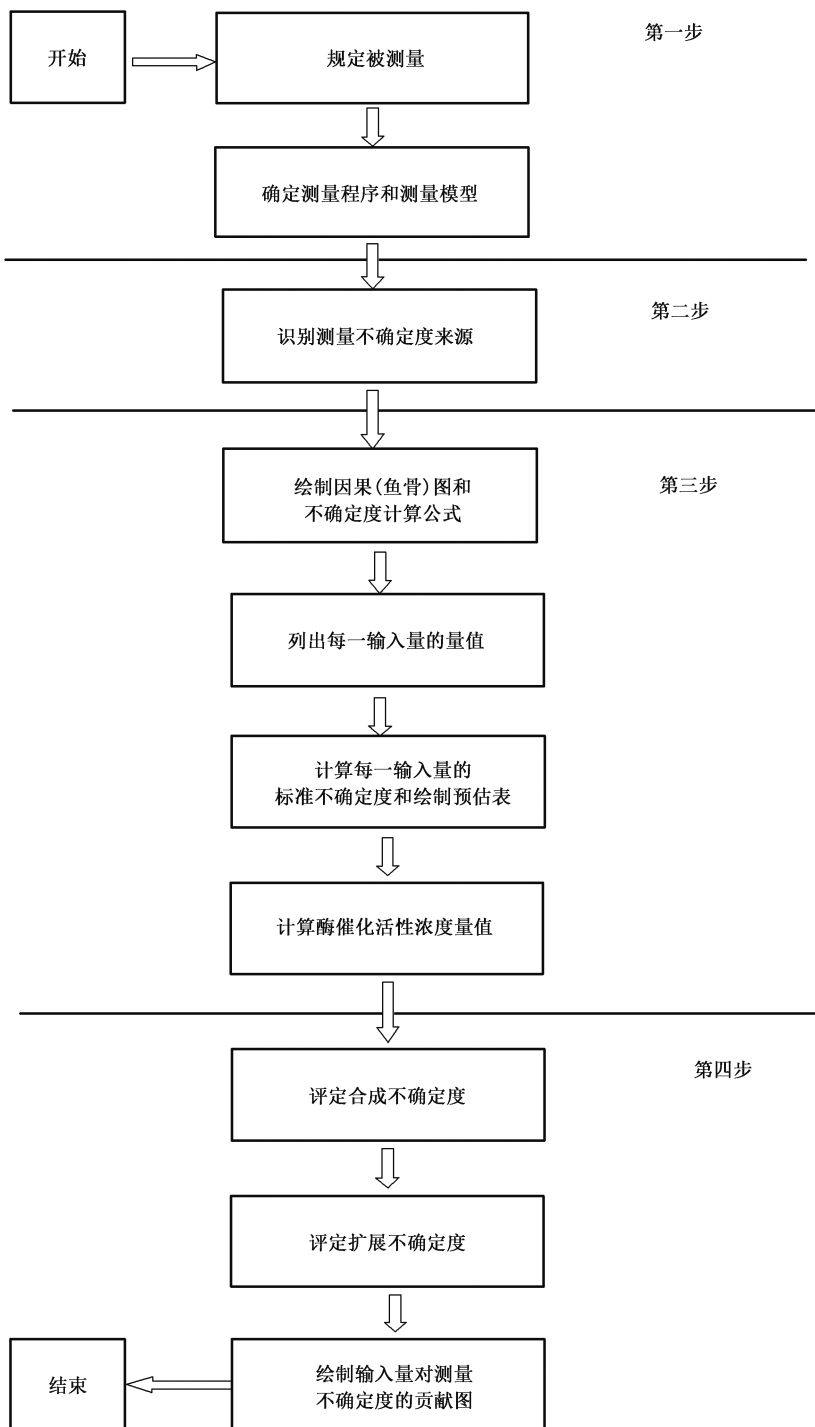


图 1 评定测量不确定度的过程

## 7 评定测量不确定度的具体步骤

### 7.1 规定被测量

#### 7.1.1 规定酶活性浓度测量的被测量

按照 IUPAC/IFCC 规定的格式,医学实验室中被测量的名称为“系统—组分;量的种类”。

示例：血浆(血液)——钠离子；对特定的人在特定时间内的物质的量浓度等于 143 mmol/L。

规定被测量的要素包括：含被测量组分的系统，如人血清、全血、血浆、脑脊液等；被测量组分，如丙氨酸氨基转氨酶(ALT)；被测量的量，如物质质量浓度、物质质量活性、数量浓度。

按模式“系统(说明)—组分(说明)；量(说明)”给出被测量诸要素，见表 1。

表 1 酶催化活性浓度测量中被测量的诸要素

序号	被测量	单位	测量程序
1	系统	kat/L	IFCC 参考方法(37 °C)
2	组分		
3	量		

### 7.1.2 定义不确定度

表 1 可清楚说明有明确结构的小分子，如钠和尿素等一类的被测量，但是对酶类大分子被测量，上述说明常不完整。在确定酶的被测量往往出现“定义不确定度”。

VIM 将术语“定义不确定度”叙述为“由于被测量定义中细节量有限所引起的测量不确定度分量”，所以在 QUAM 文件中，在评定被测量的测量不确定度时，不是首先列出测量模型，进行具体计算，而是要求应第一步明确被测量，找出由于被测量定义中细节量有限而引起的不确定度分量。

在确定酶类被测量时，定义不确定度还可能有以下来源：

——被测量的组分结构不一，大多数酶存在多种同工酶，有些同工酶还可进一步分为若干亚型。不同同工酶、亚型最适反应条件常有区别。所用参考方法选用条件不当，有可能引起测量结果变化。

示例：目前 IFCC 推荐的碱性磷酸酶(ALP)参考方法选用的缓冲液，不同 ALP 同工酶反应不一，有可能引起不同样本测量结果的不一致。比较而言日本 ALP 参考方法的缓冲液更适合各不同的同工酶组分。同一样本用此两种参考方法测 ALP 活性，测量结果常出现较大差异。

——测量原理不完善。当假定分析过程按照特定的化学反应定量关系进行的，可能有必要考虑偏离所预期的化学反应定量关系，或反应的不完全或副反应。在某些酶学测量中由于上述原因可引起结果的不可靠。

示例 1：测量转氨酶的酶偶联试剂还同时测谷氨酸脱氢酶活性。

示例 2：用单一试剂测转氨酶，会由于过量丙酮酸引起假性转氨酶升高。

——样本受系统中其他因素影响，主要有溶血、黄疸和乳糜血。

示例 1：血清中由于红细胞溶解，红细胞中酶进入血清，引起假性升高或下降。

示例 2：脂血症或黄疸血使空白吸光度读数升高，有可能干扰结果。

——由 IRMM(Institute for Reference Materials and Measurements)制备的 ERM(有证参考物质)中，各种酶来源于非人源组织，与常规酶学测量的样本(人血清)缺乏良好的互换性，如直接应用校准常规酶学测量方法则存在明显的基质效应。

——治疗和(或)诊断药物干扰。不少药物是酶的抑制剂或激活剂，有可能干扰酶活性浓度的测量，不同酶产生定义不确定度的原因不一样，可分别在表 2 的“符号”栏中划“√”注明，同时用文字说明。

示例：使用巴比妥药物治疗 Gilbert 综合征时，可引起谷氨酰转氨酶(GGT)活性升高，停药后恢复正常。

表 2 引起定义不确定度的各种因素

符号	定义不确定度来源	说明
	被测量结构不一致	
	测量原理不完善	
	溶血、黄疸、脂血干扰	
	基体效应	
	药物干扰(可单独列为一项)	
	其他	

## 7.2 IFCC 参考方法测量酶催化活性浓度的测量程序和测量模型

### 7.2.1 测量程序

#### 7.2.1.1 测量前阶段

##### 7.2.1.1.1 样本准备

根据样本来源不同,准备方法有所区别:

——干粉样本:以天平称量需加入的蒸馏水量,复溶、保存,待测;

——深低温 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存样本:按 SOP 文件要求放置在特定温度下水浴融化、混匀、保存,待测;

——新鲜样本:按 SOP 文件要求保存,待测。

准备好的样本需在规定时间内测量完毕(每个项目 SOP 文件应作出明确规定)。

##### 7.2.1.1.2 试剂准备

按 IFCC 参考方法制备测量所需试剂,按要求保存。记录缓冲液 pH,是否达到参考方法要求。当试剂保存条件与 IFCC 保存方法不一致时,实验室应有足够证据表明实验室选用的保存方法优于原保存方法。

##### 7.2.1.1.3 仪器准备

仪器的检定(校准)证书不一定能代表实验时仪器的状态,在重要实验前,实验室应进行内部校准,包括但不限于以下内容:

——分光光度计:验证分光光度计波长准确度、比色杯光径是否符合 IFCC 参考方法要求;

——移液器:检查所用移液器是否符合 1 级品要求;

——天平:检查所用天平的性能,至少应满足国家计量检定规范的要求;

——pH 计:使用前应按照计量规范用有证标准缓冲液进行校准;

——温度计:点温度计使用前应计量。应使用水银温度计校准,其应能满足 IFCC 参考方法要求。

##### 7.2.1.1.4 人员准备

包括但不限于以下内容:

——参考方法测量质量与人员的技术水平密切相关,在进行赋值前应考核相关人员能力是否能满足参考方法测量要求;

- 在参考实验室工作期间,应不定期地接受培训,并有详细完整的培训记录;
- 准确加样是参考实验室工作人员基本技能之一,为客观评价实验室技术人员的加样技能,实验室应有类似技能规定:如 200 μL 加样 10 次变异(CV)应小于 0.3%。

### 7.2.1.2 测量阶段

7.2.1.2.1 参考方法能力验证:尽可能用 IFCC 参考方法测量有证参考物质,测量结果在赋值± $U(k=2)$ 或按式(1)进行验证。

$$E_n = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $E_n$  ——效能函数;
- $x_{lab}$  ——参考实验室对有证参考物质的测量值;
- $x_{ref}$  ——有证参考物质的给定测量值;
- $U_{lab}$  ——参考实验室对有证参考物质的测量扩展不确定度;
- $U_{ref}$  ——有证参考物质的给定扩展不确定度( $k=2$ )。

$E_n \leq 1$ ,表明正确度符合要求。在此基础上,进行精密度评定,应满足 SOP 文件要求后方可开始测量待测样本。

7.2.1.2.2 质量控制程序制定:实验室应依据精密度评定结果制定本次实验质控程序。

7.2.1.2.3 测量:对每一待赋值样本应至少进行 3 个以上批次测量,每个批次至少 3 次。每个批次应测量新制备的样本。有可能,每个批次宜重新配制试剂,特别是不稳定的试剂。每个批次同时测量 1 种~2 种浓度质控品。只有当质控品结果在控制限内(如 3SD),才能认为测量结果有效。同时检查反应曲线,只有当反应曲线符合线性时,认定合格。计算测量合格样本的结果。

### 7.2.1.3 测量后阶段

7.2.1.3.1 按测量方程计算每次测量的酶催化活性浓度。

注:在计算中不能进行数值修约。只对最后结果修约,避免引起测量不确定度。

7.2.1.3.2 制定除去异常值(3SD)规则,删除数据不应超总数据的 10%。

7.2.1.3.3 严格按 GUM 的“自下而上”方法计算合成不确定度和扩展不确定度。

### 7.2.1.4 酶催化活性浓度测量全过程步骤图

酶催化活性浓度测量全过程步骤见图 2。

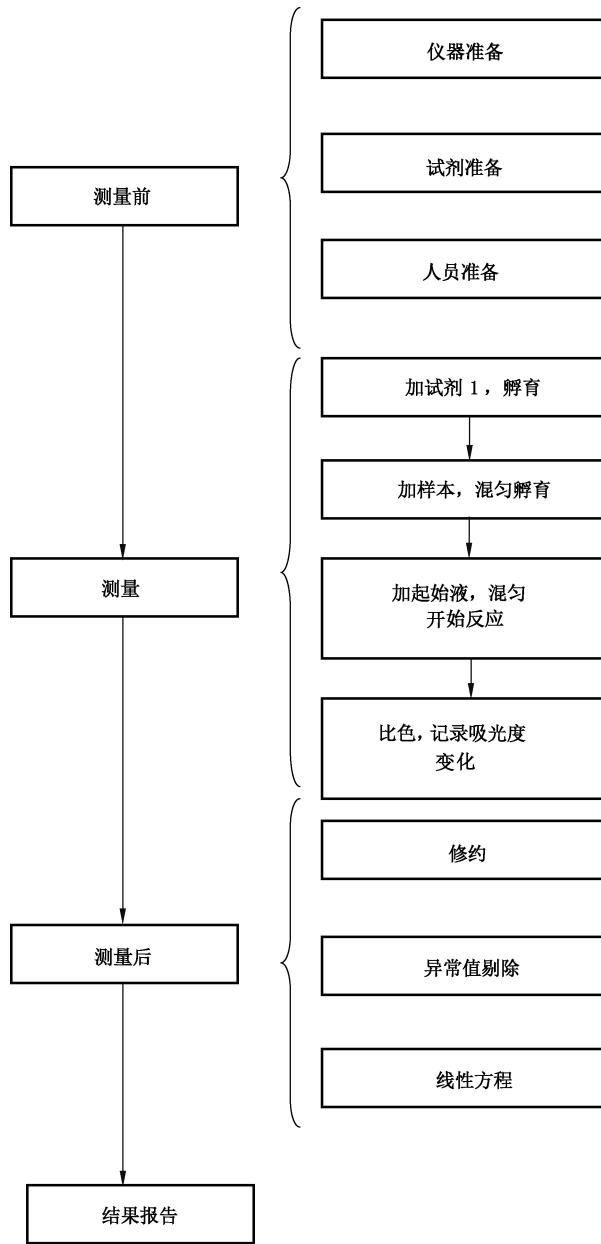


图 2 酶催化活性浓度测量全过程步骤图

7.2.2 测量模型

酶催化活性浓度计算见式(2)。

$$c_{enz} = \frac{1}{\epsilon \times L} \frac{V_{sample} + V_{start} + V_{reaction}}{V_{sample}} \frac{\Delta A}{\Delta T} A \times 10^6 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- $c_{enz}$  ——酶催化活性浓度,单位为凯塔尔每升(kat/L);
- $\Delta A/\Delta T$  ——反应速率,单位为吸光度每分(A/min);
- $V_{sample}$  ——样本体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );
- $V_{start}$  ——起始试剂溶液体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );
- $V_{reaction}$  ——反应溶液体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );

$\epsilon$  ——摩尔消光系数,单位为升每摩尔每厘米(L/mol/cm);

$L$  ——光径,单位为毫米(mm)。

在 IFCC 参考方法中,还需要同时测量试剂空白管,见式(3)。

$$c_{enz} = c_{mea} - c_{bla} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$c_{mea}$  ——测量管的酶催化活性浓度,单位为凯塔尔每升(kat/L);

$c_{bla}$  ——试剂空白管的酶催化活性浓度,单位为凯塔尔每升(kat/L)。

将式(2)中的  $\Delta A/\Delta T$  展开计算,则式(2)演化为式(4)。

$$c_{enz} = \frac{1}{\epsilon \times L} \frac{V_{sample} + V_{start} + V_{reaction}}{V_{sample}} \frac{A_{sample\_end} - A_{sample\_start} - (A_{blank\_end} - A_{blank\_start})}{t_{end} - t_{start}} \times 10^6 \dots(4)$$

式中:

$A_{sample\_end}$  ——样本终止吸光度,即测量样本在  $t_n$  时的吸光度读数,单位为毫安(mA);

$A_{sample\_start}$  ——样本起始吸光度,即测量样本在  $t_0$  时的吸光度读数,单位为毫安(mA);

$A_{blank\_end}$  ——空白终止吸光度,即试剂空白样本在  $t_n$  时的吸光度读数,单位为毫安(mA);

$A_{blank\_start}$  ——空白起始吸光度,即试剂空白样本在  $t_0$  时的吸光度读数,单位为毫安(mA);

$t_{end}$  ——终止时间,即测量反应开始时间,单位为分(min);

$t_{start}$  ——起始时间,即测量反应开始时间,单位为分(min)。

注:  $t_{end}$  和  $t_{start}$  为时间,目前使用石英钟,其误差为十万分之一,测量不确定度极小,可忽略不计。

## 7.3 识别所有可能测量不确定度来源

### 7.3.1 列出测量过程中的测量不确定度来源

7.3.1.1 按式(4)列出与计算公式有关的测量不确定度来源。

7.3.1.2 从影响酶催化活性浓度的 5 个影响因素中寻找可能的输入量。影响酶催化活性浓度的 5 个影响因素包括测量温度、测量 pH、底物浓度、效应剂(抑制剂/激活剂)以及样本的容积分量,其影响包括:

- 温度和 pH 是不确定度的重要来源,几乎所有酶均应考虑由这两个分量引起的测量不确定度;
- 在进行酶催化活性浓度测量时,应保持样本容积分量的恒定,对某些酶,如 CK 尤为重要,有可能要计算由于样本容积分量变化引起的测量不确定度,但对大多数酶而言,可忽略不计;
- 底物浓度对酶反应速度有影响,但由于试剂配制时称量较大,天平称量误差很小。对绝大多数酶而言,底物称重不会引起明显变化;
- 对一些酶而言,抑制剂/激活剂浓度变化则可能是测量不确定度的重要来源。某些效应剂称量较小,但对酶催化活性浓度影响却不小,如磷酸吡哆醛称量常以 mg 计,浓度的变化有可能引起变异。

注:此处 5 个因素对酶活性浓度的影响不同于计算公式中各分量。要先计算各项的灵敏系数,再乘以相应的各分量的标准不确定度。后面 2 项变异发生在测量前配制试剂时,本导则将其列入测量前阶段。

7.3.1.3 从测量过程寻找不确定度来源,可有以下因素:

- 波长是酶催化活性浓度测量的重要参数。对某些酶,分光光度计波长的正确度会产生明显的测量不确定度,往往是由于所测化合物吸收峰宽度小或者比色波长未在吸收峰,如 GGT 被测化合物对硝基苯胺吸收峰为 405 nm,但比色波长为 410 nm。此时波长正确度和半波宽可能是不确定度的重要来源;
- 测量过程中的混匀步骤,实验证明其影响酶催化活性浓度测量,但目前很难用公式恰当表达其影响量,这在 ALP 参考方法测量时比较突出,以至于 IFCC 在研讨 ALP 参考方法时,鉴于“搅拌方式不同会引起吸光度读数不稳定、在空白管尤为明显”的现象,为减小测量变异,建议空白管测量 3 次,以均值计算结果。其他酶测量时同样存在此问题,是否也可考虑采用灵敏系数与

标准偏差的方式评定,还需进一步研究,但固定混匀速度和时间是有效降低混匀引入的不确定度的方法;

- 参考方法要求酶催化活性浓度测量在 37 °C 条件下进行,为使比色杯内温度保持在 37 °C,分光光度计比色舱多采用半导体或水浴控温,这会增加比色杯内液体的蒸发,测量过程中比色杯应全程闭盖测量,无法实现时将会带来明显的不确定度。

上述测量过程中各因素对酶催化活性浓度的影响也应考虑先计算各项的灵敏系数,再乘以相应各分量的标准不确定度。

### 7.3.2 列出测量前阶段不确定度来源

#### 7.3.2.1 样本准备

根据样本种类不同有所差异,对 RELA(IFCC 国际参考实验室环形比对计划)样本而言,可有下列分量:

- 称重法复溶时的称重差异;所用水的质量(如使用 1 级实验室纯水,可不考虑);复溶时温度;是否避光等;
- 复溶后样本的储存条件和使用期限。如果 SOP 文件对上述分量做了严格规定并得到遵守,则主要分量可能是称重复溶和复溶样本使用期限和储存条件。后者对 LDH 可能很重要,因为 LDH 属于冷变性,冰箱保存会导致活性下降。

#### 7.3.2.2 试剂配制

试剂配制可有下列分量:

- 原料纯度:这是尚待进一步探讨的问题。一般而言,使用著名厂家高纯度试剂可不考虑其测量不确定度。但目前已知某些酶所用原料,就是使用同一厂家但批号不同,配置试剂后结果还出现明显差异,例如不同批号的双甘肽原科可引起结果差异约 2.5%。不同批号 L-丙氨酸中 D-丙氨酸含量不同也可能引起 ALT 结果差异;
- 称量和容量器具差异引起的测量不确定度:在测量部分已讨论过配制底物和效应物时称量和容量器具差异引起的测量不确定度。要关注配制某些酶效应剂时,由于称重量变化引起差异。由于不同试剂对反应速度影响不一,一般需计算灵敏系数;
- 试剂老化:绝大多数酶催化活性浓度测量试剂如按 IFCC 规定储存条件放置并在规定期限内使用,一般说来,可不考虑其对测量结果影响。但是有个别试剂,例如磷酸吡哆醛、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)以及 ALP、GGT 底物不稳定。有可能要通过实验(A 类评定)了解其灵敏系数。必要时计算其测量不确定度。如果能在每批次测量前都从新配制试剂,则可去除试剂老化的影响。

#### 7.3.2.3 仪器准备

酶学参考测量主要使用 3 类仪器,即 1 级光栅型紫外可见分光光度计、1 级容量器和使用 1 级砝码级天平。在正式测量前,应检查这些仪器是否达到法定要求。可有如下分量:

- 分光光度计至少应考虑波长、半波宽、吸光度等分量。对某些酶,分光光度计波长的正确度会产生明显的测量不确定度。通常由于所测化合物吸收峰宽度小或者比色波长未在吸收峰,如 GGT 被测化合物对硝基苯胺吸收峰为 405 nm,但比色波长为 410 nm。此时波长正确度和半波宽可能是不确定度的来源。分光光度计读数吸光度主要分量为吸光度校准产生的偏移和重复性。(参见附录 B)分光光度计的上述参数可直接影响酶催化活性浓度测量,其对酶催化活性浓度测量的影响放入测量过程中评定。



- 容积量器有 3 个分量：正确度，重复性和温度。在下述条件，室温以及配制用水温度为容器校准温度 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，温度对不确定度贡献不大。主要分量为前二者。酶催化活性浓度测量时由于加液量小(相对偏移增大)且次数多，计算时用 4 个容积量值，因此不可忽视加液对测量不确定度的贡献。
- 称重的分量多达 7 项(参见附录 B)。在酶催化活性浓度测量中，称重对测量不确定度贡献与其他输入量相比较小，计算时只需考虑校准时的偏移(正确度)和重复性。

#### 7.3.2.4 人员准备

酶学参考方法是手工方法，因此操作人员素质和操作熟练程度会影响测量结果。但如参考实验室注意此点，重视工作人员的培训和资格认定，在评定测量不确定度时可不考虑此分量。

### 7.3.3 列出测量后阶段不确定度来源

#### 7.3.3.1 异常值的删除

首先应识别由于仪器故障，明显环境条件变化引起的“大错”，例如分光光度计光源灯不稳、光栅陈旧引起的吸光度不正常变化。不应认可此时的测量结果。应建立在正常情况下，删除异常值的规定。参考实验室是否可以考虑超出 3 个标准偏差(3SD)值即可删除，但删除值不应超过测量总数的 10%。如参考实验室有严格规定并得到执行，可不考虑此输入量对测量不确定度的贡献。

#### 7.3.3.2 修约

在酶学测量中，从方程式可看出有多次乘除计算，如每次计算都修约，则可能出现不小的测量不确定度。但如不每次修约，只对最后结果进行修约，则可忽略不计修约对测量不确定度的贡献。

#### 7.3.3.3 应用线性方程

在计算酶活性浓度时，除用  $\Delta A/\Delta T$  外，也可计算单位时间吸光度变化线性方程，用其斜率计算酶催化活性浓度。此时可用多种办法计算斜率的测量不确定度。

### 7.3.4 其他测量不确定度

有些因素如实验室温度、湿度等虽然不能直接影响酶催化活性浓度的测量，也很难通过有效的数学公式评定其对测量不确定度的影响，但实际工作中发现这些因素也会导致酶催化活性浓度测量结果变化，其评定方法还有待进一步研究。

### 7.3.5 所有输入量说明表

所有输入量说明见表 3。

表 3 所有输入量说明表

时段	选择	输入量	符号	单位	说明
测量过程	O	酶催化活性浓度	$c_{\text{enz}}$	$\mu\text{kat/L}$	酶活性浓度
	O	反应速率	$\Delta A/\Delta T$	A/min	单位时间吸光度变化
	O	样本起始吸光度	$A_{\text{sample\_start}}$	mA	测量样本在 $t_0$ 时的起始吸光读读数
	O	样本终止吸光度	$A_{\text{sample\_end}}$	mA	测量样本在 $t_n$ 时的吸光读读数
	O	空白起始吸光度	$A_{\text{blank\_start}}$	mA	试剂空白样本在 $t_0$ 时的起始吸光度

表 3 (续)

时段	选择	输入量	符号	单位	说明
测量过程	O	空白终止吸光度	$A_{\text{blank\_end}}$	mA	试剂空白样本在 $t_n$ 时的吸光度
	O	反应溶液体积	$V_{\text{reaction}}$	$\mu\text{L}$	反应溶液体积变化
	O	起始试剂溶液体积	$V_{\text{start}}$	$\mu\text{L}$	起始试剂溶液体积变化
	O	样本体积	$V_{\text{sample}}$	$\mu\text{L}$	样本体积变化
	O	样本的体积分量	—	—	—
	O	摩尔消光系数	$\epsilon$	$\text{m}^2/\text{mol}$	被测物的摩尔消光系数
	O	光径	$L$	mm	使用不同比色杯
	O	酸碱度	pH		最终反应混合液的 pH 变化
	O	温度	$t$	$^{\circ}\text{C}$	最终反应混合液的摄氏温度变化
	O	反应物浓度	$E_{\text{ffactor}}$	mmol/L	抑制剂/激活剂称量误差引起反应速度变异
	O	波长	$\lambda$	nm	分光光度计波长的正确性
	O	半波宽	$b$	nm	固定分光光度计半波宽
	O	试剂蒸发	$e$	%	最终反应混合液的体积变化
	O	混匀	$Mix$	G	严格固定搅拌方式、时间和强度
	O	精密度	$S_{\text{Rw}}$	%	实验室内复现性
测量前	O	水称重溶解样本	$w_{\text{water}}$	mg	溶解冻干样本蒸馏水用量
	O	用水质量	$w_{\text{quality}}$	mg	应使用一级实验室用水
	O	复溶温度	$W$	$^{\circ}\text{C}$	严格控制可避免测量不确定度
	O	不同厂家试剂	$R_{\text{fac}}$	—	不同厂家生产的同一试剂
	O	同一厂家不同货号试剂	$R_{\text{pro}}$	—	同一厂家生产的不同货号的试剂
	O	试剂原料批号	$R_{\text{lot}}$	—	相同货号不同批号的试剂
	O	试剂老化	$R_{\text{aging}}$	—	所配试剂放置时间
	O	试剂配制称重	$R_{\text{weight}}$	—	称量试剂原料引起的变异
测量后	O	数值修约	$N.R.$	无	如只在计算最终修约,可忽略不计
	O	异常值删除	$A.E.$	无	
	O	线性方程	$L.E.$	无	如不使用线性方程进行计算,可不考虑
其他	O	实验室温湿度			
	O	实验室磁场、噪声与振动			
注: 如按反应速率计算酶催化活性浓度,有多种办法计算线性方程的测量不确定度。本文件按 $\Delta A/\Delta t$ 评定 specified value 测量不确定度,暂不计算。					

### 7.3.6 识别不确定度分量对合成不确定度的贡献

在评定所有可能的不确定度分量时,应充分认识到不是所有的不确定度分量对合成不确定度均构成显著贡献,实际上,只有很少的分量才会有显著影响。对于酶学参考方法而言,在识别所有不确定度

来源的基础上,应对每一个不确定度来源引入的分量对合成不确定度的贡献进行初步评估,去掉那些小于最大分量十分之一的分量,这样有助于简化评定过程。

### 7.4 绘制测量过程因果(鱼骨)图和测量全过程不确定度计算公式

#### 7.4.1 绘制测量过程的因果(鱼骨)图

##### 7.4.1.1 将测量过程的输入量作为分支划出初步因果图

先将计算公式每一乘除项做为一个输入量分支绘图。也就是先将式(4)中 2 个加减项各合并为一个分支,再将其他可能输入量做为一个函数列为一个分支,见图 3。

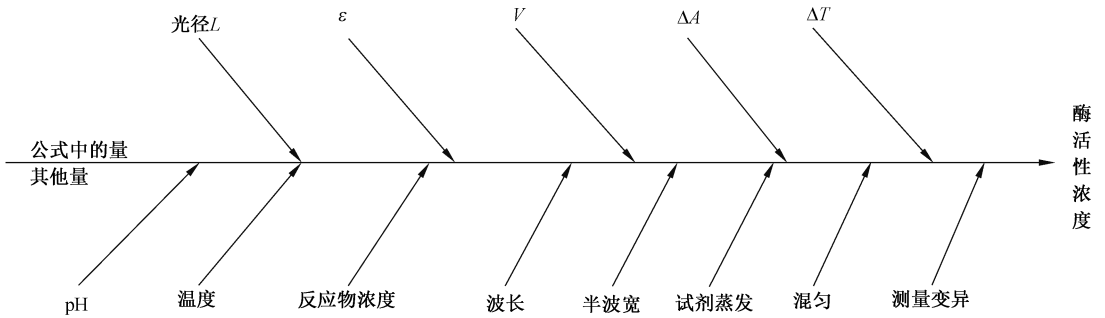


图 3 初步因果图

##### 7.4.1.2 列出每个分支中的主要分量

进一步对每一输入量细分对其有影响的组分。一般而言,除个别分支外,按附录 B,均可对每一分支添加 2 个分量,即由系统效应导致的分量(正确度)和随机效应导致的分量(精密度)。然后根据不同情况,酌情添加或删除分量,见图 4。

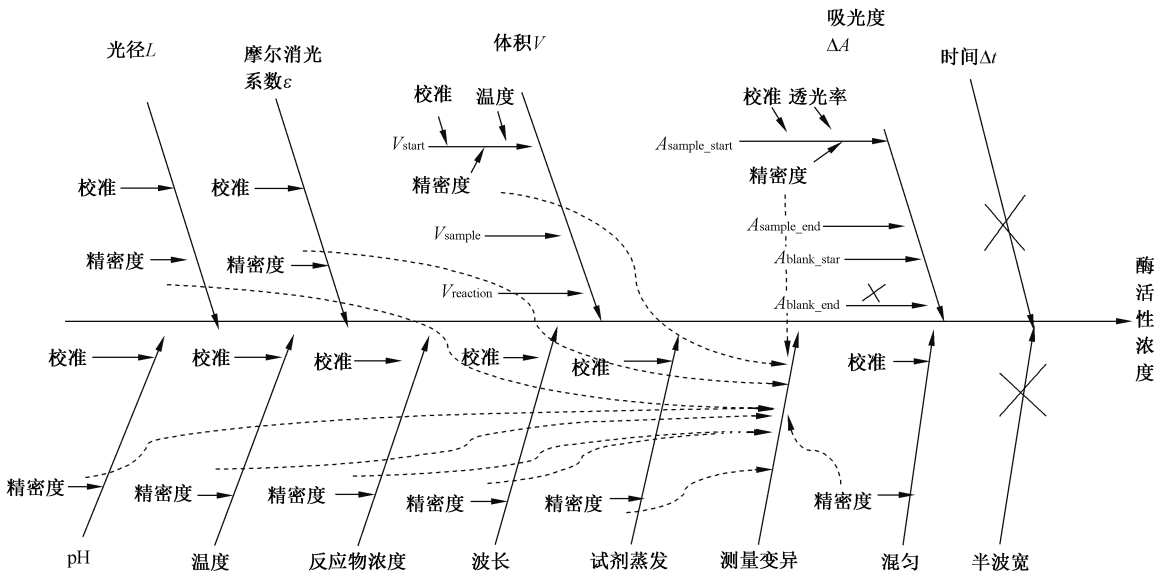


图 4 修正因果图

7.4.1.3 完成按属性分类的因果图

本文件介绍的方法可将众多输入量的复杂分量按属性分类,简化了评定测量不确定度的过程。将各分支中精密度抽出合并为一支“实验室内复现性( $S_{Rw}$ )”。用 A 类办法评定,通过精密度实验求出其标准不确定度。如:在 RELA 测试中,参考实验室可在每个工作日开启一瓶样本,复溶后重复测量 3 次~5 次,测量 4 个工作日。从此 12 次~20 次测量结果求出本校准实验室内复现性精密度  $S_{Rw}$ 。建议每个工作日测量时应重新配制试剂,如能由不同技术人员操作可能评定结果更客观。

对各输入量中正确度分量可分别用 A 类或 B 类办法进行评定。见图 5。

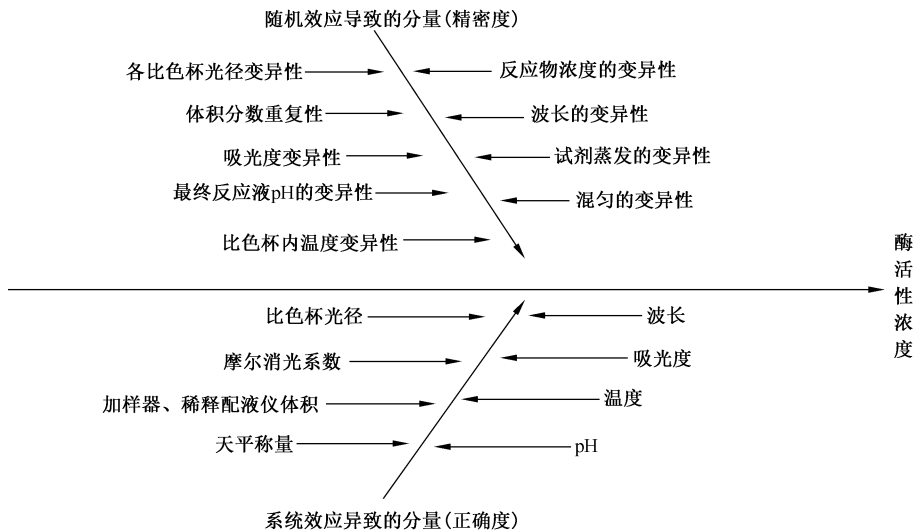


图 5 按属性分类的因果图

7.4.2 测量全过程不确定度计算公式

测量全过程不确定度计算见式(5)。

$$u_{c(\text{total})}^2 = u_{c(\text{premeas})}^2 + u_{c(\text{meas})}^2 + u_{c(\text{postmeas})}^2 + u_{c(\text{other})}^2 \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- $u_{c(\text{total})}$  ——测量全过程合成标准不确定度;
- $u_{c(\text{premeas})}$  ——测量前过程合成标准不确定度;
- $u_{c(\text{meas})}$  ——测量过程合成标准不确定度;
- $u_{c(\text{postmeas})}$  ——测量后过程合成标准不确定度;
- $u_{c(\text{other})}$  ——其他因素合成标准不确定度。

7.5 列出每一输入量的量值

分别在表 4 中填入测量、测量前和测量后过程及其他中的每一个输入量的量值。

表 4 每一输入量的量值表

输入量	量值	单位	说明
$c_{\text{enz}}$		$\mu\text{kat/L}$	酶活性浓度
$A_{\text{sample\_start}}$		mA	测量样本在 $t_0$ 时的起始吸光读读数
$A_{\text{sample\_end}}$		mA	测量样本在 $t_n$ 时的吸光读读数

表 4 (续)

输入量	量值	单位	说 明
$A_{\text{blank\_start}}$		mA	试剂空白样本在 $t_0$ 时的起始吸光度
$A_{\text{blank\_end}}$		mA	试剂空白样本在 $t_n$ 时的吸光度
$V_{\text{reaction}}$		$\mu\text{L}$	反应溶液体积
$V_{\text{start}}$		$\mu\text{L}$	起始试剂溶液体积
$V_{\text{sample}}$		$\mu\text{L}$	样本体积
$\epsilon$		$\text{m}^2/\text{mol}$	被测物的摩尔消光系数
$L$		mm	光径
$S_{\text{Rw}}$		$\mu\text{kat/L}$	实验室内复现性
pH		pH	最终反应混合液的 pH
$t$		$^{\circ}\text{C}$	最终反应混合液的温度
$W_{\text{effector}}$		mmol/L	抑制剂/激活剂称量误差引起反应速度变异
$\lambda$		nm	分光光度计的波长
蒸发		%	反应液蒸发百分量
混匀		G	混匀转速 $\times$ 时间
$w_{\text{water}}$		mg	溶解冻干样本蒸馏水用量
$R_{\text{lot}}$		—	从相同原料不同配制试剂
数值修约		—	如只在计算最终修约,可忽略不计
线性方程		—	如不使用线性方程进行计算,可忽略不计

## 7.6 计算每一输入量的标准不确定度和绘制预估表

### 7.6.1 计算实验室内复现性( $S_{\text{Rw}}$ )

从因果图中可发现一个重要分支,即实验室内复现性。应用 A 类评定方法通过多批次测量,可以得到实验室内复现性  $S_{\text{Rw}}$ 。为了使数据具有代表性,应该多批次,有可能应进行 3 个批次以上测量,每个批次测量 3 次以上,这样测量总数超过 9 次。按照 CLSI EP5-A2 文件方法分别计算批内和批间方差,最后得到实验室内复现性( $S_{\text{Rw}}$ )。

为了能包括更多可能的不精密度来源,最好每批次测量时,从新制备样本和配置稳定性差的试剂开始,如有可能还应换用不同的操作者。

此法比用 B 类评定每个输入量的不精密度可能更为简单、实用,结果也更可靠。

### 7.6.2 评定各输入量正确度(偏移)有关的标准不确定度

#### 7.6.2.1 评定测量过程各输入量与偏移相关的标准不确定度

##### 7.6.2.1.1 第一步:评定计算公式中各输入量与偏移相关的标准不确定度(灵敏系数为 1)

##### 7.6.2.1.1.1 吸光度

恰当地计算吸光度的测量不确定度对评定酶活性浓度测量不确定度非常重要。从 B.1 中可以看到

此输入量读数的不确定度有两个来源：

- a) 重复性变化,在本评定办法中已通过 A 类办法评定,可不予考虑。
- b) 仪器校准,QUAM 专门指出此处不是指吸光度读数对浓度的校准,而是指对标准吸光度的误差。参考实验室多应用光栅式 A 类分光光度计进行参考测量,如检定证书给出的正确度为  $\pm 0.3\%$  透光率。吸光度为典型矩形分布(数据分布类型参见附录 C),其相对标准不确定度为:

$$\frac{0.3\%}{\sqrt{3}} = 0.173\ 2$$

由于吸光度(A)和透光率( $\tau$ )存在如下关系:

$$A = -\lg\tau \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

A ——吸光度;

$\tau$  ——透光率, %。

在不同吸光度时,透光率 0.173 2% 相应的吸光度变化是不一样的。吸光度愈高,变化愈大。

示例:以计算  $u_c(A_{\text{sample\_start}})$  为例进行说明。当 A 为 1.522 88 时,相当于透光率 3%。在此处透光率变化 0.173 2% 相当吸光度变化了  $-0.024\ 38\ A$  和  $+0.025\ 82\ A$ , 即 24.4 mA 和 25.8 mA。建议按最大值计算。

另一个为读数四舍五入引起的不确定度。如最后一位是 1 mA,由读数四舍五入引起的公差为  $\pm 0.5\ \text{mA}$ ,如仍考虑为矩形分布,得:

$$\frac{0.5\ \text{mA}}{\sqrt{3}} = 0.29\ \text{mA}$$

按播散律,得:  $u_c(A_{\text{sample\_start}}) = \sqrt{25.8^2 + 0.29^2} = 25.8\ \text{mA}$

从上式也可看出,实际工作中,只有在吸光度很低情况外,才能不考虑舍位引起的测量不确定度。

注 1: 通过评定吸光度正确度对测量不确定度的贡献后,不难理解下降反应(起始吸光度  $> 1.0$ )的测量不确定度往往大于上升反应(起始吸光度  $< 0.5$ ),也可以理解为什么不建议测酶催化活性浓度时起始吸光度  $> 1.5$ 。

注 2: 按计算公式,共需计算 4 次吸光度测量不确定度。如使用线性方程,计算次数更多。所以吸光度读数常是评定酶催化活性浓度测量结果不确定度的重要分量。

由于计算酶催化活性浓度的公式比较复杂,既有乘除项,又有加减项,按 QUAM 规定,此类复杂情况应:先评定计算公式 2 个加减项的合成标准不确定度,即:

$$u_c^2(\Delta A) = u_c^2(A_{\text{sample\_end}}) + u_c^2(A_{\text{sample\_start}}) + u_c^2(A_{\text{blank\_end}}) + u_c^2(A_{\text{blank\_start}}) \quad \dots\dots\dots(7)$$

式中:

$u_c(\Delta A)$  ——吸光度变化引入的合成标准不确定度;

$u_c(A_{\text{sample\_end}})$  ——样本终止吸光度引入的合成标准不确定度;

$u_c(A_{\text{sample\_start}})$  ——样本起始吸光度引入的合成标准不确定度;

$u_c(A_{\text{blank\_end}})$  ——空白样本终止吸光度引入的合成标准不确定度;

$u_c(A_{\text{blank\_start}})$  ——空白样本中值吸光度引入的合成标准不确定度。

#### 7.6.2.1.1.2 移液体积

移液可能引起较大的不确定度。在酶催化活性浓度测量中有 3 次移液,计算时还要增加总体积,所以移液是一个重要分量。

QUAM 提出在计算体积测量不确定度时有 3 个分量:一是重复性变化,与吸光度相同,此处可不考虑;二是温度对体积影响,由于酶学参考实验室需严格控制室温,与校准温度相差不大,可考虑不计;剩下一项为体积准确度,可从制造厂商规格声明中转换为标准偏差,例如:实验室使用 Hamilton 稀释配液仪,2 000  $\mu\text{L}$  处的公差为 40  $\mu\text{L}$ ,考虑为三角分布,得

$$\frac{40 \mu\text{L}}{\sqrt{6}} = 16.33 \mu\text{L}$$

由于计算酶催化活性浓度的公式比较复杂,既有乘除项,又有加减项,按 QUAM 规定,此类复杂情况应:先评定计算公式 2 个加减项的合成标准不确定度,即:

$$u_c^2(V_{\text{total}}) = u_c^2(V_{\text{sample}}) + u_c^2(V_{\text{reagent}}) + u_c^2(V_{\text{start}}) \dots\dots\dots (8)$$

式中:

- $u_c(V_{\text{total}})$  ——总体积引入的合成标准不确定度;
- $u_c(V_{\text{sample}})$  ——样本体积引入的合成标准不确定度;
- $u_c(V_{\text{reaction}})$  ——反应溶液体积引入的合成标准不确定度;
- $u_c(V_{\text{start}})$  ——起始试剂溶液体积引入的合成标准不确定度。

注:很难用 Hamilton 稀释配液仪移取起始液( $V_{\text{start}}$ ),可使用各种类型移液器,可用 A 类或 B 类办法计算标准不确定度。本导则建议用 A 类评定不确定度方法。因为此类移液器的正确度会随技术人员的操作方式和习惯而出现差异。

### 7.6.2.1.1.3 摩尔消光系数

此常数存在误差,文献值为 $<1\%$ ,考虑为矩形分布,其相对标准不确定度为:

$$\frac{1\%}{\sqrt{3}} = 0.58\%$$

注:来源 Bergmeyer HU et al :Methods of Enzymatic Analysis 3EditionVol 1;286。

### 7.6.2.1.1.4 光径

根据参考方法要求,对(比色杯)光径要求为  $10.00 \pm 0.01 \text{ mm}(k=2)$ ,其标准不确定度为

$$\frac{0.01 \text{ mm}}{2} = 0.005 \text{ mm}$$

相对标准不确定度为:  $\frac{0.005 \text{ mm}}{10 \text{ mm}} \times 100\% = 0.05\%$

将上述测量公式中各输入量标准不确定度输入表 5。

表 5 测量公式中各输入量标准不确定度表

输入量(符号)	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度/%
$c_{\text{enz}}$		$\mu\text{kat/L}$					
$S_{\text{Rw}}$		$\mu\text{kat/L}$		正态			
$A_{\text{sample\_start}}$		mA		矩形			
$A_{\text{sample\_end}}$		mA		矩形			
$A_{\text{blank\_start}}$		mA		矩形			
$A_{\text{blank\_end}}$		mA		矩形			
$\Delta A$		mA		矩形			
$V_{\text{reaction1}}$		$\mu\text{L}$		三角			
$V_{\text{start}}$		$\mu\text{L}$		三角			
$V_{\text{sample}}$		$\mu\text{L}$		三角			

表 5 (续)

输入量(符号)	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度/%
$V_{\text{total}}$		$\mu\text{L}$		三角			
$\epsilon$		$\text{m}^2/\text{mol}$		矩形			
$L$		mm		矩形			

## 7.6.2.1.2 第二步:评定测量过程其他输入量与偏移相关的标准不确定度(需计算灵敏系数)

## 7.6.2.1.2.1 温度

温度对不同酶促反应速度影响并不一致,见表 6。

表 6 德国 Hannover 大学酶学参考实验室测量不同酶的温度变化灵敏系数

酶(Enzyme)	$\Delta b_{\text{rel}}/\Delta T$
ALT	5.05 %/k
AMY	4.62 %/k
AST	5.30 %/k
CK	5.28 %/k
GGT	3.20 %/k
LDH	6.80 %/k

根据参考方法要求,对反应温度要求为  $37.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $k=2$ ),其标准不确定度为:

$$\frac{0.1\text{ }^{\circ}\text{C}}{2} = 0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$$

温度对不同酶促反应速度影响并不相同,应通过实验求出当温度变化  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,反应速度变化值(灵敏系数  $\delta_x/\delta_y$ );或者从文献资料中查出灵敏系数。例如从上表可查出相差  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,LDH 反应速度变化 6.8%。根据灵敏系数评定结果的标准不确定度,如以 LDH 温度为例,公式为:LDH 温度标准不确定度  $\times$  温度系数 = LDH 测量结果的标准不确定度。

LDH 温度的最大允许为  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $k=2$ )。灵敏系数为  $6.80\%/k$ 。代入上式为:

$$\frac{0.1}{2} \times 6.8\%/k = 0.34\%$$

## 7.6.2.1.2.2 pH

pH 对不同酶促反应速度影响并不一致,各实验室可确定实验室内的灵敏系数,也可参考德国 Hannover 大学酶学参考实验室的实验数据,详细见表 7。



表 7 德国 Hannover 大学酶学参考实验室测量不同酶的 pH 变化灵敏系数

酶(Enzyme)	$\Delta b_{\text{rel}}/\Delta\text{pH}$
ALT	0.23%/ΔpH 0.05
AMY	2.47%/ΔpH 0.03
AST	0.25%/ΔpH 0.05
CK	0.90%/ΔpH 0.05
GGT	0.22%/ΔpH 0.05
LDH	0.09%/ΔpH 0.05

根据参考方法要求,对反应 pH 要求为最适 pH±0.05( $k=2$ ),其标准不确定度为

$$\frac{0.05\text{pH}}{2} = 0.025\text{pH}$$

与温度计算一致,根据表 7 可计算出对 AMY 而言 0.03pH 可引起 2.47% 相对速率的改变。

#### 7.6.2.1.2.3 波长

波长正确度有可能影响测量结果。酶催化活性浓度测量一般都选最高吸光度的波长处进行测量,波峰愈宽,波长变化对吸光度影响愈小。对大多数酶催化活性浓度测量影响不大,可忽略不计。但在测量 GGT 和 ALP 时,分析物(对硝基酚、对硝基苯胺)吸收峰为 405 nm,而 IFCC 参考方法测量波长为 410 nm。此时波长正确度稍有变化,有可能影响测量结果。波长对不同酶促反应速度影响并不相同,各实验室可确定实验室内的灵敏系数,也可参考德国 Hannover 大学酶学参考实验室的实验数据,详见表 8。

表 8 德国 Hannover 大学酶学参考实验室测量不同酶的波长变化灵敏系数

酶(Enzyme)	$\Delta b_{\text{rel}}/\Delta\lambda$
ALT	0.13%/1 nm
AMY	0.40%/1 nm
AST	0.20%/1 nm
CK	0.28%/1 nm
GGT	3.25%/1 nm
LDH	0.08%/1 nm

酶学参考实验室所用分光光度计准确度高,为±1 nm( $k=2$ ),其标准不确定度为:

$$\frac{1 \text{ nm}}{2} = 0.05 \text{ nm}$$

与温度计算一致,根据表 8 可计算出对 GGT 而言 1 nm 可引起 3.25% 相对速率的改变。

将上述输入量的标准不确定度输入表 9。

表 9 测量过程其各输入量标准不确定度表

输入量	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度
$f(\text{pH})$		pH		矩形			
$f(t)$		°C		矩形			
$f(E_{\text{factor}})$		mmol/L		矩形			
波长(Wavelength)		nm		矩形			
蒸发		%		矩形			
混匀		G		矩形			

## 7.6.2.2 评定测量前过程各输入量与偏移相关的标准不确定度

表 4 显示了酶催化活性浓度测量前过程中的主要输入量,以测量 RELA 样本为例,包括以下内容:

a) 复溶样本时所加水的量( $W_{\text{water}}$ )和水的质量:

在酶学参考实验室,为减少样本复溶的误差,常使用天平称重法复溶,如使用 1 级实验室用水,可不考虑后者对不确定度的贡献;按 QUAM 介绍计算称重引起的不确定度有不少测量不确定度来源:天平校准不确定度、线性、日偏移、可读性、重复性变化、水密度影响。在本导则中,有意义的是天平校准不确定度。一般可用 B 类评定测量不确定度办法,例如,称量 1 g 水复溶样本时,如其最大允许误差(MPE)为 $\pm 0.05$  mg,考虑为矩形分布,其标准不确定度为:

$$\frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.028 \text{ mg}$$

相对标准不确定度为:  $\frac{0.028}{1\ 000} = 0.28\%$

注:当水温过高,应考虑不同温度水体积的差。

在酶活性浓度测量中,除对复溶样本用水称量外,还有很多次称量。例如配制每种试剂时称量多种原料。如考虑参考实验室使用高精度天平,与所称原料重量相比,大多数称量的微小重量变化很难产生显著的测量不确定度。只在称量微量的抑制剂/激活剂时,有可能产生较大测量不确定度。此时,往往要计算灵敏系数。

## b) 试剂配制的批号和老化:多次重复配制可出现差异。如每个批次测量前,能重新配制和使用新试剂测量酶活性浓度,不仅包括不同批次引起的不确定度,还不会出现试剂老化引起的变异。建议根据不同试剂采取不同解决办法。对不稳定试剂如磷酸吡哆醛,应每个批次测量前配制。进行重要测量,如给参考物质赋值都应从新配制所有试剂,避免试剂老化引起的变异;

## c) 原料差异:不同厂家和同一厂家不同货号以及同一货号不同批号的原料已成为酶活性浓度测量不确定度的主要来源。但如要真正解决此问题,要了解各种原料中所含不纯物,如双甘肽中甘氨酸,L-氨基酸中 D-氨基酸以及 NADH 中抑制剂等等对酶促反应速度影响。然后制定原料纯度标准,选用高纯度原料,有可能较好解决此问题。单纯比较 2、3 个批号试剂很难判断此因素对测量不确定度的贡献。

将上述各输入量的标准不确定度输入表 10。

表 10 测量前过程各输入量标准不确定度表

输入量	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度
$W_{\text{water}}$		mg		矩形			
$f(R_{\text{lot}})$				矩形			

## 7.6.2.3 评定测量后过程输入量与偏移相关的标准不确定度

测量后过程不确定度来源一般不多,也不十分重要。一般可能要考虑下列几点:

- 修约:所有酶催化活性浓度测量都能遇到修约问题。有实验证明如在每一步计算时都进行修约,有可能引起不小的差异。反之如只在计算最后一步进行修约,则对测量不确定度贡献不大;
- 拟合直线斜率:计算结果除了用  $\Delta A/\Delta t$  来评定测量不确定度外,也可以酶反应的拟合直线中的斜率来计算。本导则暂不考虑用此法;
- 异常值(离群值)的剔除规则:参考实验室应建立异常值(离群值)的剔除规则。剔除规则松或严会影响最后测量不确定度的大小。一般而言,较严的剔除规则,如  $2SD$  容易得到较小的测量不确定度。此时应严格限制剔除数据总量。由于很难具体计算,一般不将其做为计算不确定度的输入量。

## 7.6.2.4 其他与偏移相关的标准不确定度

实验室温、湿度,磁场、振动及噪声等均可能是测量不确定度的来源,但目前评定存在一定的困难。实验室应尽量控制这些因素以减少其对测量的影响。

将上述输入量的标准不确定度输入表 11。

表 11 测量后过程和其他各输入量标准不确定度表

输入量	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度
数值修约							
线性方程							
其他							

## 7.6.3 绘制(相对)标准不确定度预估表

将上述表 5、表 9、表 10 和表 11 的内容输入表 12。

表 12 总的(相对)标准不确定度预估表

输入量(符号)	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度 %
$c_{\text{enz}}$		$\mu\text{kat/L}$					
$S_{\text{Rw}}$		$\mu\text{kat/L}$		正态			
$A_{\text{sample\_start}}$		mA		矩形			

表 12 (续)

输入量(符号)	输入量值	单位	灵敏系数	分布	评定类型	标准不确定度	相对标准不确定度 %
$A_{\text{sample\_end}}$		mA		矩形			
$A_{\text{blank\_start}}$		mA		矩形			
$A_{\text{blank\_end}}$		mA		矩形			
$V_{\text{reaction}}$		$\mu\text{L}$		三角分布			
$V_{\text{start}}$		$\mu\text{L}$					
$V_{\text{sample}}$		$\mu\text{L}$					
$\epsilon$		$\text{m}^2/\text{mol}$		矩形			
$l$		mm		矩形			
$f(\text{pH})$		pH		矩形			
$f(T)$		$^{\circ}\text{C}$		矩形			
$f(E_{\text{factor}})$		mmol/L		矩形			
波长		nm		矩形			
蒸发		%		矩形			
混匀		G		矩形			
$W_{\text{water}}$		mg		矩形			
$f(R_{\text{lot}})$				矩形			
数值修约							
线性方程 <sup>a</sup>							
其他							

<sup>a</sup> 线性方程有专门评定测量不确定度方法,本文件不予讨论。

此文件介绍了评定计算公式和因果图中一些输入量的标准不确定度的方法。各参考实验室可根据具体情况,自行选用 A 类或 B 类评定标准不确定度办法评定各输入量的标准不确定度,不必局限于本文件建议的方法。最后应列出本实验室评定测量不确定度的预估表。为简化计算,低于最大不确定度分量十分之一的不确定度分量无需合成到合成标准不确定度中。

7.7 计算酶催化活性浓度量值( $\mu\text{kat/L}$ )

将数值代入式(2)、式(3)得酶催化活性浓度量值( $\mu\text{kat/L}$ )。

7.8 评定测量全过程的合成标准不确定度

7.8.1 评定测量过程的合成标准不确定度

按式(9)计算酶催化活性浓度。

$$c_{\text{enz}} = \frac{1}{\epsilon \times L} \frac{V_{\text{sample}} + V_{\text{start}} + V_{\text{reaction}}}{V_{\text{sample}}} \frac{A_{\text{sample\_end}} - A_{\text{sample\_start}} - (A_{\text{blank\_end}} - A_{\text{blank\_start}})}{t_{\text{end}} - t_{\text{start}}} \times f(\text{pH})f(\text{temperature})f(\dots) \dots\dots\dots(9)$$

此公式比较复杂,既有乘除项,又有加减项。按 QUAM 规定,在此类复杂情况,应先评定计算公式

3 个加减项的合成标准不确定度,即:

——第 1 个加减项为:  $V_{\text{total}} = V_{\text{reagent}} + V_{\text{sample}} + V_{\text{start}}$

按播散律合成标准不确定度计算公式,见式(8)。

——第 2 个加减项为:  $\Delta A = A_{\text{sample\_end}} - A_{\text{sample\_start}} - A_{\text{blank\_end}} + A_{\text{blank\_start}}$

按播散律合成标准不确定度计算公式见式(7)。

——第 3 个加减项为:  $\Delta t = t_{\text{end}} - t_{\text{start}}$ ,其合成标准不确定度可忽略不计。

式(9)演化为式(10)。

$$c_{\text{enz}} = \frac{1}{\epsilon L} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{sample}}} \times \Delta A \times f(\text{pH})f(\text{temperature})f(\dots) \dots\dots\dots(10)$$

式中:

$f(\text{pH})$  ——pH 对酶催化活性浓度的函数;

$f(\text{temperature})$  ——温度对酶催化活性浓度的函数;

$f(\dots)$  ——其他因素对酶催化活性浓度的函数。

根据有乘除项的传播律规则 2,可按式(11)评定测量过程合成标准不确定度。

$$u_{\text{rel(meas)}} = \sqrt{u_{\text{rel}(l)}^2 + u_{\text{rel}(\epsilon)}^2 + u_{\text{rel(volfract)}}^2 + u_{\text{rel(absorb)}}^2 + u_{\text{rel(pH)}}^2 + u_{\text{rel(temp)}}^2 + u_{\text{rel(conc)}}^2 + u_{\text{rel(wl)}}^2 + u_{\text{rel(evapor)}}^2 + u_{\text{rel(mix)}}^2 + u_{\text{rel(CV)}}^2} \dots\dots\dots(11)$$

式中:

$u_{\text{rel(meas)}}$  ——测量过程的相对合成标准不确定度;

$u_{\text{rel}(l)}$  ——光径引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}(\epsilon)}$  ——摩尔消光系数引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(volfract)}}$  ——样本体积分数引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(absorb)}}$  ——吸光度引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(pH)}}$  ——pH 引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(temp)}}$  ——温度引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(conc)}}$  ——反应液浓度引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(wl)}}$  ——波长引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(evapor)}}$  ——蒸发引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(mix)}}$  ——混匀引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel(CV)}}$  ——样本测量变异引入的相对标准不确定度。

### 7.8.2 评定测量前过程的合成标准不确定度

按式(12)计算。

$$u_{\text{rel(pre meas)}} = \sqrt{u_{\text{rel}(W_{\text{water}})}^2 + u_{\text{rel}(R_{\text{lot}})}^2 + u_{\text{rel}(R_{\text{aging}})}^2 + \dots\dots\dots(12)}$$

式中:

$u_{\text{rel(pre meas)}}$  ——测量前过程的相对合成标准不确定度;

$u_{\text{rel}(W_{\text{water}})}$  ——复溶时加入水的重量引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}(R_{\text{lot}})}$  ——试剂批号引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}(R_{\text{aging}})}$  ——试剂老化引入的相对标准不确定度。

### 7.8.3 评定测量后过程合成标准不确定度

按式(13)计算。

$$u_{\text{rel(post meas)}} = \sqrt{u_{\text{rel}(N.R.)}^2 + u_{\text{rel}(A.E.)}^2 + u_{\text{rel}(L.E.)}^2 + \dots\dots\dots(13)}$$

式中：

$u_{\text{rel}}(\text{postmeas})$  ——测量后过程的合成相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(N.R.)$  ——数字修约引入的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(A.E.)$  ——异常值剔除引入的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(L.E.)$  ——线性方程引入的相对标准不确定度。

#### 7.8.4 计算其他输入量的相对标准不确定度

建议实验室应严格控制实验室温、湿度、噪声、振动、磁场等测量条件，当存在上述影响因素又必须进行实验时，可参考波长等因素对测量不确定度影响的评定方法进行计算。

#### 7.8.5 合成测量全过程的相对合成标准不确定度

将 7.8.1~7.8.4 中的 4 个相对标准不确定度按传播律规则 1，按式(14)计算测量全过程的相对合成标准不确定度。

$$u_{\text{rel}}(y) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\text{premeas}) + u_{\text{rel}}^2(\text{meas}) + u_{\text{rel}}^2(\text{postmeas}) + u_{\text{rel}}^2(\text{other})} \dots\dots\dots (14)$$

式中：

$u_{\text{rel}}(y)$  ——测量全过程的相对合成标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(\text{premeas})$  ——测量前过程的相对合成标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(\text{meas})$  ——测量过程的相对合成标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(\text{postmeas})$  ——测量后过程的相对合成标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(\text{other})$  ——其他输入量的相对标准不确定度。

#### 7.9 计算扩展不确定度( $U$ )并确定合成因子( $k$ )和单位

计算扩展不确定度( $U$ )按式(15)计算。

$$U = k \times u_{\text{rel}}(y) \times \bar{x} \dots\dots\dots (15)$$

式中：

$U$  ——扩展不确定度；

$k$  ——包含因子；

$u_{\text{rel}}(y)$  ——测量全过程的合成标准不确定度；

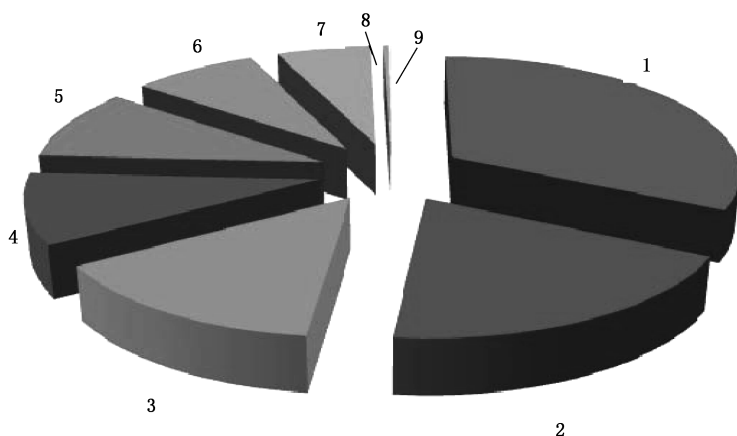
$\bar{x}$  ——测量平均值。

注：在选择包含因子  $k$  的数值时，需要考虑很多问题，包括：所需的置信水平、对基本分布的了解、对于评估随机影响所用的数值数量的了解。大多数情况下，推荐  $k$  为 2。

#### 7.10 输入量对测量不确定度的贡献图和主要输入量

##### 7.10.1 输入量对测量不确定度的贡献图

本标准建议绘制各输入量对测量不确定度的贡献图，如图 6。



说明：

1——实验室内复现性精密度；

2——摩尔消光系数；

3——波长；

4——分光光度计吸光度；

5——pH；

6——测量温度；

7——样本体积分数；

8——光径；

9——样本复溶。

注：上图中的输入量仅限于已经明确评定了的分量。其他如试剂不同来源、混匀等输入量的相对不确定评定方法还在研究中，此图中未标示。

图 6 各输入量对测量不确定度的贡献图

### 7.10.2 测量不确定度主要输入量

针对图 6，将测量不确定度主要输入量输入表 13。

表 13 合成不确定度中主要输入量

序号	主要输入量
1	实验室内复现性精密度
2	摩尔消光系数
3	波长
4	分光光度计吸光度
5	pH

注：依据具体评定情况，此表可续表。

## 8 不确定度的报告

### 8.1 总则

报告测量结果所需要的信息取决于其预期的用途。报告结果：

- 提供足够的信息以便有新的信息或数据时重新评价结果；
- 如有可能应尽可能提供所有信息；
- 当测量的详细情况包括如何确定不确定度，主要来自已出版的文件时，应保证所使用的文件是最新的，并且与所使用的方法一致。

## 8.2 所需要的信息

### 8.2.1 测量结果的完整报告

应包括，或者引用包括下列信息的文件：

- 根据实验观察值及输入数据进行测量结果及其不确定度计算的方法描述；
- 在计算和不确定度分析中使用的所有修正值和常数的数值和来源；
- 所有不确定度分量的清单，包括每一个分量是如何评价的完整文件。

当需要详尽的报告，包括中间输入数值时，报告应包括：

- 给出每一个输入值的数值及其标准不确定度和获取方法的描述；
- 给出结果和输入值之间的关系式及其任何偏导数、协方差或用来说明相关性影响的相关系数；
- 给出每个输入值的标准不确定度的自由度的评估值(评估自由度的方法见 ISO 指南 CNAS-GL06:2006 第 37 页)。

### 8.2.2 数据和分析的表达方式

应能在必要时重复所有重要步骤并重复计算结果。

### 8.2.3 报告日常分析的结果

应给出扩展不确定度的数值和  $k$  值。

## 8.3 报告标准不确定度

当不确定度是以标准不确定度  $u_c$  的形式表达时(即一个标准偏差)，宜采用下面的形式：“(结果)： $x$  (单位)[和]标准不确定度  $u_c$  (单位)。其中，该标准不确定度是国际计量学基本和通用术语词汇表(第二版，ISO 1993 年)所定义的标准不确定度，相当于一个标准偏差。

注 1：当使用标准不确定度时，不建议使用  $\pm$  符号，因为该符号通常与高置信水平的区间有关。

注 2：括号 [ ] 中的术语根据需要可以忽略或精简。

示例：总氮含量：3.52% 质量分数；标准不确定度：0.07% 质量分数，相当于一个标准偏差。

## 8.4 报告扩展不确定度

除非另有要求，结果应跟使用包含因子  $k=2$  计算的扩展不确定度  $U$  一起给出。推荐采用以下形式：“(结果)： $(x \pm U)$  (单位)。其中，报告的不确定度所定义的扩展不确定度]计算时使用的包含因子为 2，[其给出了大约 95% 的置信水平]”。

注：括号 [ ] 中的术语可以适当省略或精简。当然，包含因子应加以调整以反映实际使用的数值。

示例：总氮量：(3.52±0.14)% (质量分数) 中报告的不确定度是扩展不确定度，使用的包含因子是 2，对应的置信水平大约是 95%。

结果及不确定度的数值表示中，不可给出过多数字位数。无论是给出扩展不确定度  $U$ ，还是标准不确定度  $u_c$ ，通常不确定度的有效数字不应多于两位。测试结果应根据所给出的不确定度进行适当修约。

## 8.5 与限值的符合性

8.5.1 被测量(例如：有毒物质的含量)：法规通常要求被证明在规定限值内。本文中的测量不确定度



有解释分析结果的含义,特别是以下情况:

- 评价符合性时可能需要考虑分析结果的不确定度;
- 限值中可能已经给出不确定度的允许量。

8.5.2 在评估中需考虑以上两个因素,下面给出了常规的做法,假定限值设定时没有给出不确定度的允许值,对于与上限的符合性情况明显有四种情形(见图 7):

- 结果高出限值超过一个扩展不确定度,通常解释为完全不符合;
- 结果高出限值,但不超过一个扩展不确定度,通常需要根据与数据用户的协议分别考虑;
- 测量结果低于限值,但不超过一个扩展不确定度,通常需要根据与数据用户的协议分别考虑;
- 结果低于限值超过一个扩展不确定度,通常解释为符合。

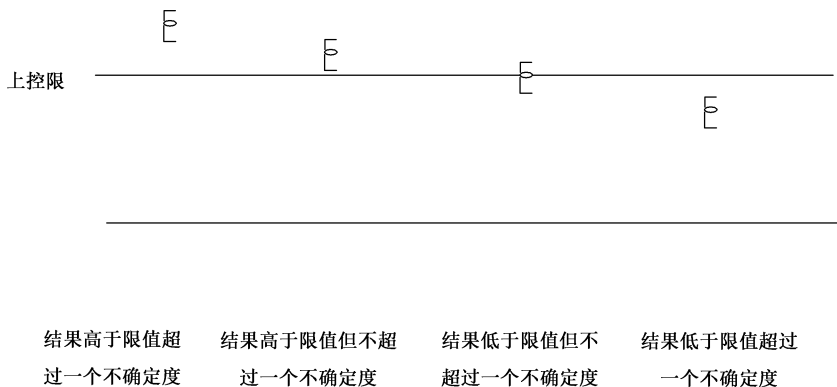


图 7 不确定度和符合性限值

8.5.3 当已知或相信设定限值时已考虑到不确定度的允许量时,符合性判断有理由只对给出的允许量进行。当符合性检查是对照在指定的环境中操作的规定方法时,将产生例外的情况。在该要求中蕴含着一个假设,即该规定方法的不确定度,或至少是复现性,是足够小以至在实际中可以忽略。在这种情况下,如果提供了适当的质量控制,通常只对特定结果的数值报告符合性。这通常会在采用本方法的标准中声明。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 寻找测量不确定度的来源以及因果(鱼骨)图的绘制

### A.1 概述

在评定酶催化活性浓度的测量不确定度时,有必要分析整个测量过程有关的所有不确定度来源,并加以记录。将这一过程系统化通常是有用的,既可保证考虑的全面性,又可避免重复评定。下面的步骤提供了一种合适地、系统地分析不确定度产生原因的方法。

### A.2 方法的基本思路

#### A.2.1 第一步:充分识别影响测量结果的所有可能因素

首先要仔细研究测量过程的不确定度来源。通过测量方程很容易找出主要测量不确定度来源,这正是 QUAM 和 TrainMic 提出寻找不确定度来源的主要办法。在酶催化活性浓度测量中还存在计算公式中没有的不确定来源(底物浓度、抑制剂和激活剂以及样本的分量)。其中有实际影响的为温度、pH。对某些酶,抑制剂和激活剂也可能是不确定度的一个来源。

在酶催化活性浓度测量中,除了测量过程外,测量前和测量后过程中也可能存在有意义的不确定度来源。在酶催化活性浓度测量的测量前过程中,样本准备、试剂配制和应用以及仪器校准中都可能存在不确定度来源;测量后过程中数值修约是一个普遍存在的不确定度来源。在计算时,如使用线性回归,它往往有较大的测量不确定度。实际上,通过使用因果图(Ishikawa 或“鱼骨”图)可以进行此类必要的系统分析。

#### A.2.2 第二步:简化并解决重复的情况

将第一步列出的不确定度来源精简并且保证没有重复列出影响因素。

### A.3 因果分析的步骤

#### A.3.1 绘制因果图

A.3.1.1 写出计算结果的完整公式,该公式中的参数构成因果图的主要分支,有必要增加一个总不精密度,通常以实验室内复现性( $S_{Rw}$ )表现修正的主要分支。宜在评定酶催化活性浓度的测量不确定度时增加此分支。

A.3.1.2 考虑测量过程中计算公式以外的有意义的测量不确定度来源,添加到因果图中。

A.3.1.3 考虑测量前和测量后的每一步骤,并且从主要影响因素之外考虑,在因果图上进一步增加其他因素,如环境、基体的影响。

A.3.1.4 对每一个分支,增加有贡献的影响因素,最重要的为精密度和正确度。

A.3.1.5 解决重复问题,并重新安置,澄清影响因素,将有关的不确定度来源编成组。如在单独的精密度分支上集合所有精密度内容。

#### A.3.2 对因果分析的最后步骤要求进一步说明

对每个输入参数的贡献量进行详细分析时,会产生重复性问题。因此,本文件规定了图 A.1~

图 A.3 的附加规则(虽然它完全等同的适用于任何系统列出的影响因素):

- a) 取消影响因素:两者均要去掉。例如,在差减称量中,称量两次,两次均受天平“零偏差”的影响,“零偏差”将由于重量差而消除。因此,可在分别列出的称量有关分支中取消。
- b) 类似的影响因素:合成一个单一输入量。例如:许多输入量的重复性变化能合成一个总的重复性精密度“分支”。尤其需要注意,每一次测量单独操作间的变异性可以合成,而对整批次操作间的变异性(例如仪器校准)只有用批次间精密度度量时才能观测到。
- c) 不同的情况:重新标注。通常会发现类似命名的影响因素实际上是指类似测量的不同情况。在进行下一步之前,应清楚区分,这种类型的分析不会导致单一结构的列表。在目前的例子中,温度既可视作所测密度的直接影响因素,也可视为是对此比重瓶中的物质所测质量的影响因素,两者均可成为首次结构内容。实际上这不影响方法的使用性。假如所有重要的影响因素在列表的某个地方只出现过一次,总的一套方法仍然有效。

### A.3.3 因果图分析完成后

回到结果的原始公式,并增加任何新的项(例如温度)到公式中。

## A.4 举例

### A.4.1 举例 1:乙醇密度的测量

#### A.4.1.1 测量模型

本例通过参照简化了的直接密度测量例子来说明。通过称量合适的带刻度容器的皮重  $m_{\text{tare}}$  和加入乙醇后的毛重  $m_{\text{gross}}$  来获得已知体积乙醇的质量,密度按式(A.1)计算。

$$d(\text{EtOH}) = \frac{m_{\text{gross}} - m_{\text{tare}}}{V} \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

式中:

- $d(\text{EtOH})$  ——乙醇密度;
- $m_{\text{gross}}$  ——加入乙醇后的毛重;
- $m_{\text{tare}}$  ——容器的皮重;
- $V$  ——加入乙醇的体积。

#### A.4.1.2 因果分析

为了清晰,仅考虑三个影响因素:仪器校准、温度和每次测量的精密度。因果图由一个结果的分支结构组成,其最终只导致一个结果。对目前的目的而言,该结果就是具体的分析结果[图 A.1 的“ $d(\text{EtOH})$ ”]。指向该结果的“各分支”是贡献因素,包括具体的中间测量结果和其他因素,诸如环境或基体影响。每一个分支接着又有自己的贡献因素。这些“因素”包含影响结果的各种因素,无论是变量或常数。这些因素的不确定度都明显地对结果的不确定度有贡献。图 A.1~图 A.3 用图表的方式说明了这过程。

图 A.1 显示了应用步骤 A.3.1 直接获得的一种可能的图表。主要分支是公式中的参数,对各参数的影响因素由次分支来表示。共有两个“温度”影响因素、3 个精密度影响因素和 3 个“校准”影响因素。

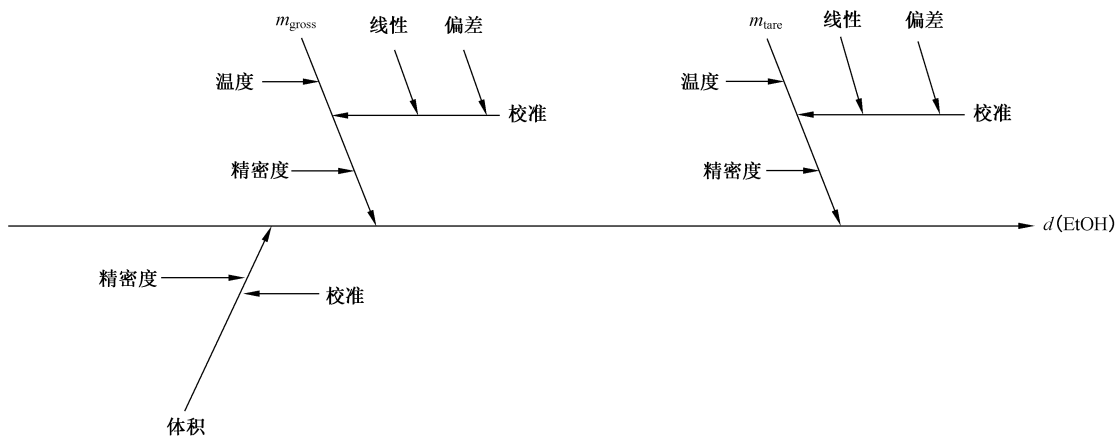


图 A.1 首次列表

图 A.2 显示了按照步骤 A.3.2b) 规则(相同影响因素/时间)将精密度和温度各自组合在一起。温度可作为影响密度的单一因素,而每次测量的变异性均贡献给整个方法的重复实验所观测到的变异性。

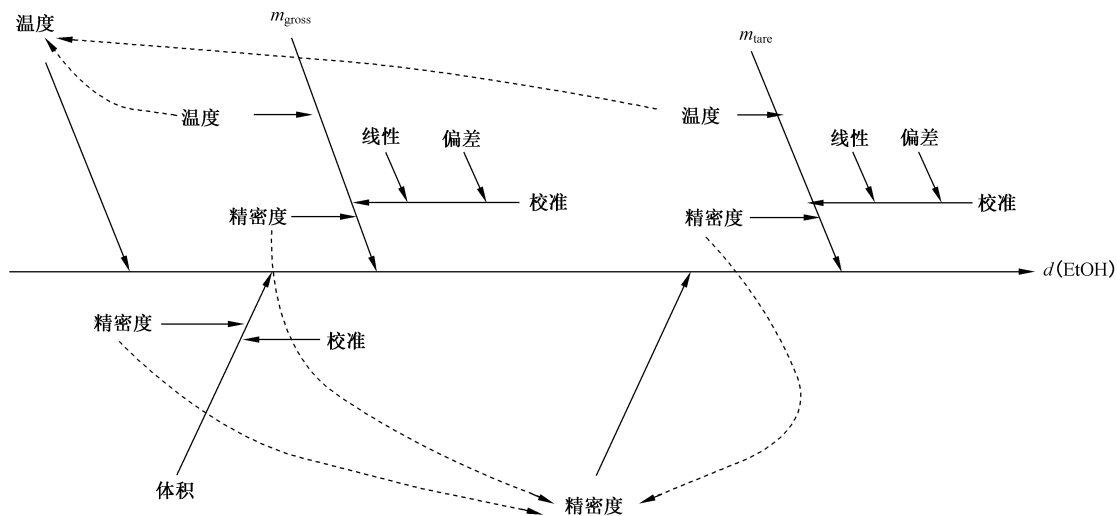


图 A.2 类似影响因素组合

图 A.3 显示了按照 A.3.1a) 规则,两个称量的校准偏差相互抵消,可去除。最后,余下的校准分支需要分成两个(不同)分量,一个可能是由于天平响应的非线性,另一个是与体积测量有关的校准不确定度;

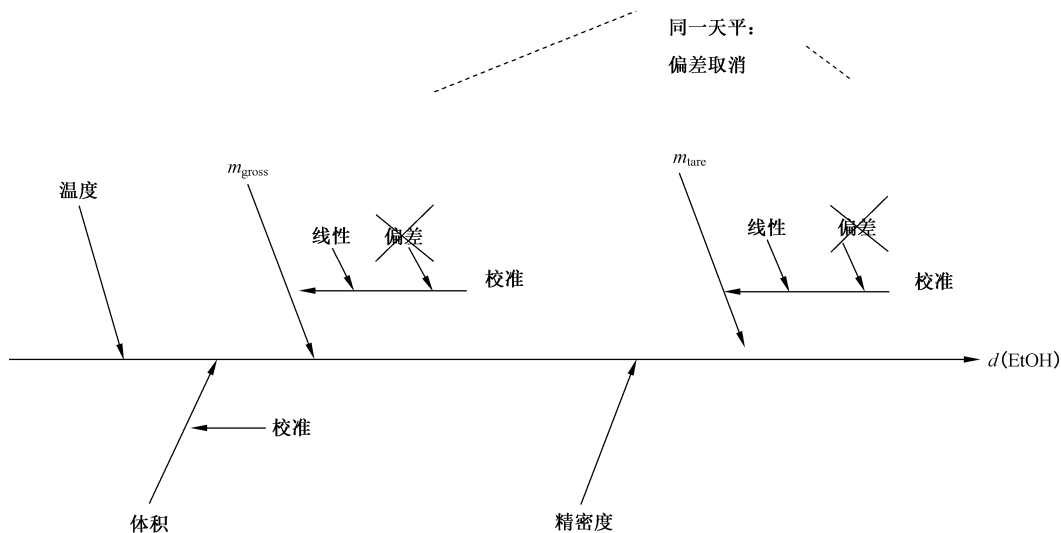


图 A.3 取消

A.4.2 举例 2: 滴定分析不确定度分量分析

A.4.2.1 测量程序和测量模型

A.4.2.1.1 测量程序

本步骤通过参照简化了的滴定分析例子来说明。其测定程序为：

实验室样品 → 检验样品 → 样品处理(溶解或消化等) → 定容 → 分取样品处理液 → 滴定

A.4.2.1.2 数学模式(量方程)

数学模型见式(A.2)。

$$\omega = \frac{c(V - V_0)M}{m \frac{V_2}{V_1}} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

- ω —— 试样中待测成分的质量分数；
- c —— 标准溶液的浓度；
- V —— 试样处理液消耗标准溶液的体积；
- V<sub>0</sub> —— 试剂空白消耗标准溶液的体积；
- M —— 摩尔质量；
- m —— 试样的质量；
- V<sub>1</sub> —— 样品处理液体积；
- V<sub>2</sub> —— 测定时分取样品处理液体积。

A.4.2.2 因果分析

因果图由一个结果的分支结构组成,其最终只导致一个结果。对目前的目的而言,该结果就是具体的分析结果(图 A.4 的“ω”)。指向该结果的“各分支”是贡献因素,包括计算公式中各个因素。每一个分支接着又有自己的贡献因素。例如标准溶液消耗体积 V 的各种因素有滴定管最大允许误差 MPE 和

观察者的分散性,依次列出各分支中的贡献量。

根据数学模型可首先列出因果图 A.4,然后修改为图 A.5。

图 A.4 显示了应用步骤 A.3.1 直接获得的一种可能的图表。主要分支是计算公式中的参数,对各参数的影响因素由次分支来表示。注意,每一分支中的贡献都可分别归纳到“随机效应导致的分量”或“系统效应导致的分量”两大类。

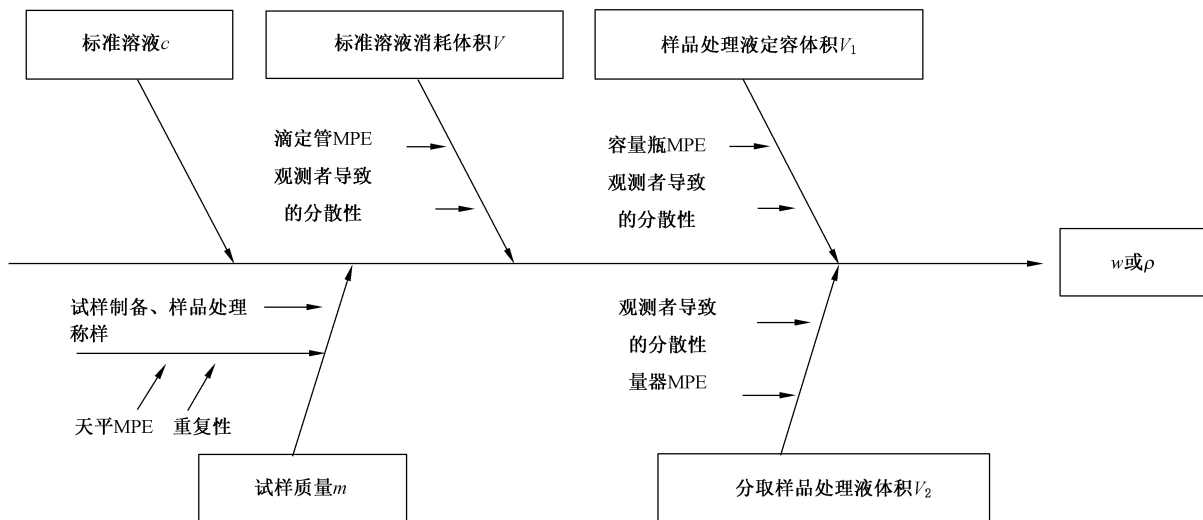


图 A.4 化学实验室测量不确定度-滴定分析中结果的不确定度来源

图 A.5 显示了按照步骤 A.3.2 第二条规则(相同影响因素/时间)将不精密度和正确度各自组合在一起。常用 A 类方法评定不精密度的标准不确定度(实验标准偏差),这样无需分别计算因果图上每个分支的不精密度标准不确定度。对临床实验室而言,使用日常 IQC 数据就可,既简单又方便。然后可用 A 类 B 类方法评定各分支与偏移相关的标准不确定度,一般说来用 B 类方法既方便又可靠。在此例中可根据天平和各种容器的 MPE 计算出与偏移相关的标准不确定度,无需通过重复称重实验,用 A 类方法计算出各种容器的不确定度。

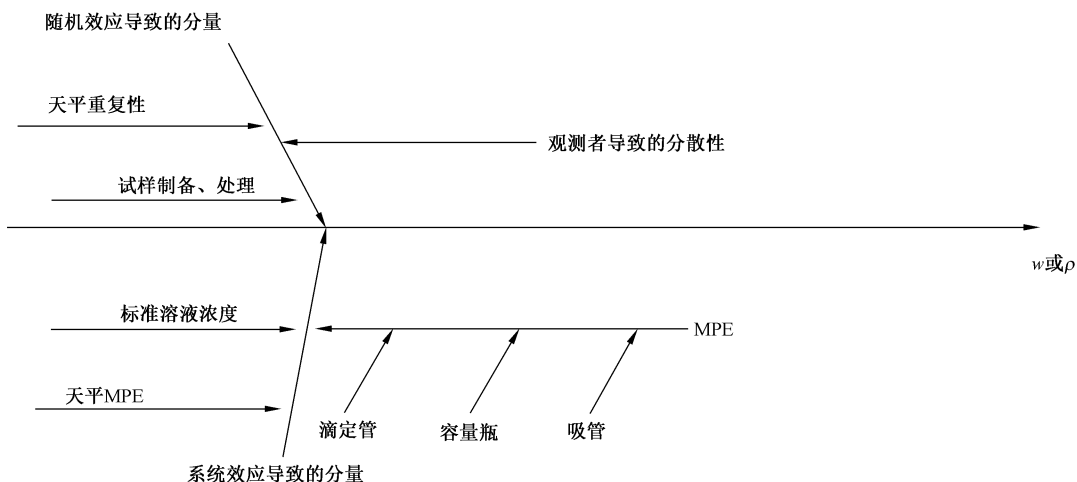


图 A.5 化学实验室测量不确定度-按属性分类的不确定度来源

## 附录 B

(资料性附录)

## 不确定度的常见来源和数值

## B.1 吸光度

吸光度对酶催化活性浓度的具体影响见表 B.1。

表 B.1 吸光度对酶催化活性浓度测量的影响

测量	不确定度分量	原因	测量方法	示例	数值
吸光度	仪器校准 <sup>a</sup>	校准的有限准确度	校准证书给出的作为限值,然后转换为标准偏差		证书限值/ $\sqrt{3}$
	重复性变化	不同	重复测量的标准偏差或 QA 性能	7 个吸光度读数的平均, $s = 1.63$	$1.63/\sqrt{7} = 0.62$

<sup>a</sup> 该分量是指相对于标准吸光度的吸光度读数,而不是以吸光度的读数对浓度校准。

## B.2 移液体积

移液体积对酶催化活性浓度的具体影响见表 B.2。

表 B.2 移液体积对酶催化活性浓度测量的影响

测量	不确定度	原因	测量方法	典型值	
				示例	值
体积(液体)	校准不确定度	校准有限的准确度	制造商规格所声明的转换为标准偏差对 ASTM 体积为 V 的 A 类玻璃仪器,限值约为 $V^{0.6}/200$	10 mL(A 类)	$0.02/\sqrt{3} = 0.01 \text{ mL}^a$
	温度	与校准温度不同引起的与在标准温度下的体积的差别	$\Delta T \cdot \alpha / (2\sqrt{3})$ 给出相对标准偏差,其中 $\Delta T$ 是可能的温度范围, $\alpha$ 是液体的体积膨胀系数,对于水, $\alpha$ 约为 $2 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ ;对于有机液体为 $3 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$	100 mL 水	在规定的操作温度 $3 \text{ }^\circ\text{C}$ 内进行测试为 $0.03 \text{ mL}$
	重复性变化	不同	连续核查排出的体积的标准偏差(通过称量决定)	25 mL 移液管	重复充满/称量 $s = 0.009 \text{ 2 mL}$

<sup>a</sup> 假设矩形分布。

## B.3 天平称重

天平称重对酶催化活性浓度的具体影响见表 B.3。

表 B.3 天平称重对酶催化活性浓度测量的影响

测量	不确定度分量	原因	测量方法	典型值	
				示例	数值
质量	天平校准不确定度	校准的有限准确度	将校准证书上声明的值转换为标准偏差	4 位天平	0.5 mg
	线性	—	i) 在有证砝码范围内实验 ii) 制造商的规格	—	约 $0.5 \times$ 最后一位有效数字
	日偏移	不同, 包括温度	长期核查称量的标准偏差。必要时计算成 RSD	—	约 $0.5 \times$ 最后一位有效数字
	可读性	显示器或刻度的有限分辨率	来自最后一位有效数字	—	$0.5 \times$ 最后有效位 $\sqrt{3}$
	重复性变化	不同	连续样品或核查称量的标准偏差	—	约 $0.5 \times$ 最后一位有效数字
	密度影响 (通常情况下) <sup>a</sup>	校准块/样品密度不配引起空气浮力效应的不同	从已知或假设的密度和典型的空气条件来计算	钠、镍、铝 有机固体、水、烃	1 × ppm 20 × ppm 50 × ppm ~ 100 × ppm 65 × ppm 90 × ppm
	密度影响 (在真空中)	校准块/样品密度不配引起空气浮力效应的不同	计算空气浮力影响并从校准块减去浮力影响	100 g 水 10 g 镍	+0.1 g(效应) <1 mg(效应)

<sup>a</sup> 对于基本常数或 SI 单位定义, 通过称量测定质量通常修正到真空中的重量。在大多数其他实际场合中, 引用的重量是基于 OIML 所定义的常规情况。这个常规是引用在空气密度为  $1.2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  和样品密度为  $8\,000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  的重量。相当于在正常大气条件下处于海平面称量钢。当样品密度为  $8\,000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  或空气密度为  $1.2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  时, 对常规质量的浮力修正是零。因为空气密度通常非常接近后者, 对常规质量的修正通常可忽略。表中所给出的在常规条件下称量的与密度有关的影响所产生的标准不确定度数值。对于在海平面常规情况下称重, 且未考虑修正浮力的初步估计是足够的。然而, 在常规情况下测得的质量与“真实质量”(在真空中) 相差 0.1% 或更多(见表中最后一行的影响因素)。



附 录 C  
(资料性附录)  
数据分布函数

### C.1 分布函数

如何根据两个最重要的分布函数的参数来计算标准不确定度,并给出它们能被使用的环境,详见表 C.1、表 C.2 和表 C.3。

表 C.1 矩形分布的判断及不确定度评定

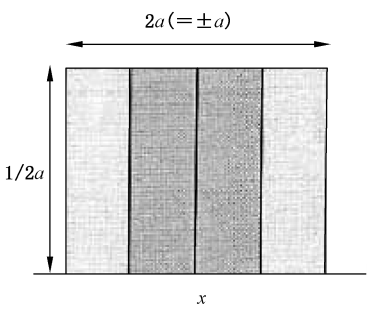
矩形分布		
图形	在下述情况使用	不确定度
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 证书或其他技术规定给出了界限,但无规定置信水平(例如: 25 mL±0.05 mL)。</li> <li>2) 估计值是以最大区间(±a)形式给出的,但没给出分布的形状</li> </ol>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$
<p><b>示例:</b>一位化学家估计一个影响因素不小于 7 或不大于 10,并感到具体数值位于这个区间的任何地方,但不知道是否区间的任何部分比另一部分更加可能。这是描述了区间 <math>2a=3</math>(半宽 <math>a=1.5</math>)的矩形分布函数的情况。使用下面矩形分布的函数,标准不确定度的估计值可计算出来。使用上面的区间, <math>a = 1.5</math>,标准不确定度的结果 <math>0.873(a=1.5)</math>。</p>		

表 C.2 三角分布的判断及不确定度评定

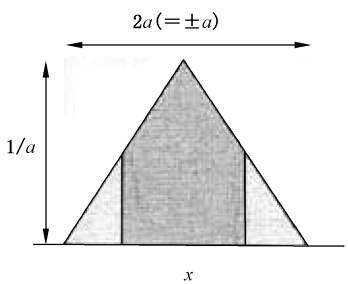
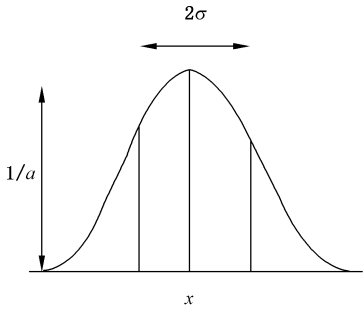
三角形分布		
图形	在下述情况使用	不确定度
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 所获得的有关 <math>x</math> 的信息不仅限于矩形分布。靠近 <math>x</math> 的数值比接近两边界的更加可能。</li> <li>2) 估计值是以最大区间(±a)形式作出,并具有对称分布</li> </ol>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}}$

表 C.3 正态分布的判断及不确定度评定

正态分布		
图形	在下述情况使用	不确定度
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 估计值是对随机变化过程的重复测量作出的。</li> <li>2) 不确定度是以标准偏差 <math>S</math>，相对标准偏差 <math>S/\bar{x}</math> 或方差系数 <math>CV\%</math> 给出，未给出分布。</li> <li>3) 不确定度以 95% (或其他) 置信水平，区间为 <math>x \pm c</math> 给出，未规定分布</li> </ol>	$u(x) = s$ $u(x) = s$ $u(x) = s \cdot (s/\bar{x})$ $u(x) = \frac{CV\%}{100} \cdot x$ $u(x) = c/2$ (95% 置信水平) $u(x) = c/3$ (99.7% 置信水平)

## C.2 实际应用

在评定测量不确定度时，需要了解每个分量数据的分布情况。在 C.1 介绍正态分布、三角分布和矩形分布选择一类即可。矩形分布虽不多见，主要为电磁信号引起读数误差。但在无法判定数据分布情况时，建议按矩形分布计算。