

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ РСФСР ПО ДЕЛАМ НАУКИ И ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ

МОСКОВСКИЙ ИНСТИТУТ ТОНКОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

УДК 543.0:547.928

КАРИНОВА Ирина Николаевна

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПОГРЕШНОСТИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ХОЛЕСТЕРИНА
ПЛАЗМЫ КРОВИ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
И СПОСОБЫ ИХ УМЕНЬШЕНИЯ

02.00.02 - Аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 1991



00778700 (Т)

Работа выполнена в с
 дов исследований Институт
 Всесоюзного научно-иссле
 медицины МЗ СССР.

Научные руководители:

доктор биологических наук В.Н.Малахов
 кандидат химических наук В.И.Дворкин

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор И.А.Василенко
 кандидат химических наук, старший научный сотрудник С.Н.Ланин

Ведущая организация - Институт элементоорганических соединений
 им. акад. А.Н.Несмеянова.

Защита состоится "19" июня 1991 г. в 14 часов на заседа-
 нии специализированного совета К 063.41.04 в Московском институте
 тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова (117571, Москва,
 пр-кт Вернадского, 86).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им.
 М.В.Ломоносова (119831, Москва, Малая Пироговская, 1).

Автореферат разослан "17" мая 1991 г.

Ученый секретарь
 специализированного совета
 кандидат химических наук

В.А.Ефимова

ЛНБ ім. В. Стефаніка
 АН України

В-30.428
Постановка задачи. В настоящее время в широких масштабах проводятся популяционные исследования так называемых факторов риска (повышенное артериальное давление, повышенный уровень общего холестерина¹ в крови, курение и т. д.) у людей, отобранных случайным образом из населения (при этом образуются группы, называемые выборками из популяций). Наличие факторов риска увеличивает вероятность возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и уровень смертности от них.

Один из важнейших факторов риска - содержание общего холестерина в сыворотке крови обследуемых: очень малые изменения его среднего содержания в сыворотках крови выборки вызывают резкое изменение в смертности от сердечно-сосудистых заболеваний у обследуемых этой выборки. Поэтому важно точно выявлять различия между параметрами распределений содержаний общего холестерина исследуемых выборок. Между тем из-за больших масштабов исследований (число сывороток в одном исследовании может достигать десятков тысяч) анализ общего холестерина проводят в разных лабораториях упрощенными и разными методами, имеющими отличные друг от друга систематические погрешности, что является одной из главных причин артефактных различий в формах распределений полученных результатов и смещения их средних друг относительно друга. Это приводит к неправильным выводам при интерпретации результатов, полученных из разных лабораторий. Осуществляемые при проведении популяционных исследований меры по стандартизации применяемых методов (использование единого образца сравнения, контроль качества и т.п.) позволяют ограничить различия в систематических погрешностях, вызванных многими причинами, но не влиянием присутствия мешающих компонентов.

Одно из важнейших отличий популяционных биохимических исследований от принятых в аналитической химии исследования совокупности объектов состоит в том, что в популяционных биохимических исследованиях, как правило, не обязательно получать точные значения держаний основного вещества в индивидуальных объектах, а достаточно установить параметры распределения общего холестерина в выборке.

Кроме того, в популяционных биохимических исследованиях трудно использовать стандартные способы устранения влияния мешающих компонентов в каждой сыворотке, определение которых само по себе

1. Холестерин содержится в сыворотке крови в свободной и этерифицированной формах. Общий холестерин - суммарное содержание свободного и этерифицированного холестерина.



сложно и дорого.

Актуальность темы определяется, таким образом, специфичностью объекта и задач популяционных биохимических исследований. Актуальным является учет и уменьшение различий в результатах определения холестерина, возникающих из-за применения разных методов его определения для выборок с различными распределениями содержаний мешающих компонентов, изучаемых в рамках одного популяционного исследования. Сходные задачи возникают и в других областях аналитической химии биологических объектов, биохимии и т.д.

Актуальной является также разработка методических подходов к оценке влияний тех мешающих компонентов, традиционные способы оценки которых оказываются неприменимы к такому специфическому объекту, как сыворотка крови.

Цель и задачи исследования: целью настоящей работы являлась разработка способов уменьшения систематических погрешностей методов определения общего холестерина в сыворотке крови, обусловленных применением разных методов, при популяционных исследованиях.

Достижение указанной цели потребовало решения следующих задач:

(а) - разработка способа уменьшения систематических погрешностей при определении содержания общего холестерина в популяционных исследованиях, основанного на внесении поправок в ходе градуировки методик;

(б) - разработка способа сопоставления результатов массовых определений общего холестерина, полученных разными методиками;

(в) - определение содержания общего холестерина в выборке из популяции методиками, наиболее часто используемыми в популяционных исследованиях, и оценка значимости различий полученных распределений содержаний;

(г) - определение содержаний компонентов сыворотки крови, мешающих определению общего холестерина, и оценка значимости и величины их влияния;

В этой части работы (г) решались методические задачи:

- разработка методики определения 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека с целью оценки влияния его присутствия на методы определения общего холестерина;

- разработка методики определения холестерина и его эфиров в присутствии триацилглицеридов высокой концентрации на основе ВЭЖХ.

Научная новизна работы:

I. Впервые разработана методика одновременного определения хо-

лестерина и его эфиров в присутствии значительных количеств триацилглицеридов с помощью ВЭЖХ, включающая обработку образцов сыворотки крови триглицеридлипазой, на которую получено авторское свидетельство.

2. Разработана и апробирована методика определения 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека на основе ВЭЖХ. Показано, что содержание этого вещества в сыворотке крови человека невелико и практически не влияет на определение общего холестерина.

3. Впервые для оценки влияния мешающих компонентов на результаты анализа применен способ многомерного линейного регрессионного анализа со случайными регрессорами, основанный на результатах исследования большого числа сывороток. С помощью этого способа оценено влияние различных компонентов сыворотки крови (эфиров холестерина, общего белка, билирубина, триацилглицеридов, глюкозы) на определение общего холестерина разными методиками.

4. Впервые обнаружено, что присутствие холестерина в сыворотке крови в форме эфира арахидоновой кислоты занижает результаты определения общего холестерина химическими методами, не предусматривающими гидролиза эфиров холестерина, основанными на реакции Либермана-Бурхарда, в отличие от известного завышения результатов из-за присутствия холестерина в форме эфиров других кислот. Показано, что присутствие триацилглицеридов занижает результаты определения общего холестерина изученными ферментными методами.

Практическая ценность работы состоит в следующем:

1. Методика определения холестерина и его эфиров может использоваться при определении этих веществ в сыворотках крови с высоким содержанием триацилглицеридов.

2. Методика определения 7-дегидрохолестерина может использоваться при определении этого вещества в сыворотках крови человека.

3. Разработанный подход к оценке влияния мешающих компонентов на определение содержания основного вещества, основанный на использовании многомерного линейного регрессионного анализа со случайными регрессорами данных анализа большого числа объектов, может быть применен для оценки влияний в объектах, для которых приготовление образцов известного состава затруднено. В частности, он был применен в лаборатории биофизических методов диагностики НИИ физико-химической медицины МЗ РСФСР для выяснения мешающих влияний при определении суммарного содержания общего холестерина и триацилглицеридов разработанным в этой лаборатории флуоресцентным методом.

4. Предложен простой способ сопоставления результатов массовых определений общего холестерина, полученных двумя разными методиками (I и 2), в двух выборках (A и B) с неконтролируемым распределением содержаний мешающих компонентов.

Способ включает: а) определение содержаний общего холестерина одной из методик (2) в малой подвыборке из выборки (A), проанализированной другой методикой (I); б) нахождение с помощью регрессионного анализа уравнения связи между результатами, полученными этими методиками, по данным измерения общего холестерина обеими методиками в малой подвыборке; в) последующий пересчет по найденному уравнению связи остальных результатов определения общего холестерина в выборке B.

Способ может быть использован в различных областях аналитической химии и биохимии для сопоставления данных, полученных разными методами. В частности, он был использован при сопоставлении содержаний гормонов крови, измеренных в лаборатории биохимии факторов риска НИЗ ВНИГ ЧМ МЗ СССР и Медицинской академии в Кракове.

5. Предложен экспрессный способ уменьшения систематических погрешностей методик определения общего холестерина, используемых в одном популяционном исследовании, основанный на введении расчетного поправочного коэффициента или использовании для градуировки образца сравнения на основе сыворотки крови с контролируемым содержанием общего холестерина и мешающих компонентов. Способ может применяться в лабораториях, проводящих массовые определения общего холестерина.

На защиту выносятся:

1. Методика одновременного определения холестерина и его эфиров в сыворотке крови человека с помощью ВЭЖХ в присутствии многократного избытка триацилглицеридов, включающая предварительный ферментативный гидролиз триацилглицеридов.

2. Методика определения 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека, основанная на предварительном концентрировании, отделении с помощью ВЭЖХ более полярных органических компонентов и последующем фотометрировании раствора в УФ-области.

3. Применение способа многомерного линейного регрессионного анализа со случайными регрессорами для оценки влияния мешающих компонентов на результаты анализа веществ, для которых невозможно получить адекватные стандартные образцы состава.

4. Простой статистический способ сопоставления результатов мас-

совых популяционных определений общего холестерина разными методами в двух выборках с неконтролируемым содержанием мешающих компонентов, основанный на статистическом исключении влияния различия методик и неконтролируемых мешающих компонентов.

5. Экспрессный градуировочный способ уменьшения систематических погрешностей методик массовых определений общего холестерина, основанный на введении расчетного поправочного коэффициента или использовании для градуировки образца сравнения на основе сыворотки крови контролируемого состава.

Апробация работы и публикации: результаты работы были доложены на международном симпозиуме "Хроматография в биологии и медицине" (Москва, 1986 г.), на Всесоюзных совещаниях по стандартизации биохимических методов исследования (Фрунзе, 1985 г., Нальчик, 1989 г.), семинаре отдела стандартизации биохимических методов исследований; межотделеческой конференции Института профилактики неинфекционных заболеваний ВНИЦПМ МЗ СССР; семинаре кафедры аналитической химии Московского института тонкой химической технологии (1991 г.). Основное содержание работы представлено в 9 публикациях, список которых приведен в конце автореферата.

Структура и объем работы: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, выводов и приложения. Диссертация изложена на 137 стр., содержит 33 рисунков и 13 таблиц. Библиография включает 188 наименований работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая выборка состояла из 374 сывороток крови одной из типичных популяций.

В качестве образцов сравнения использовали растворы холестерина в безводном этаноле или изопропаноле (ОС) и слитые донорские сыворотки крови (ОСС), приготовленные и аттестованные в отделе стандартизации биохимических методов исследований ВНИЦ ПМ МЗ СССР.

Определение общего холестерина в сыворотках проводили методами:

1. Метод экстракционный химический с гидролизом эфиров холестерина (Duncan I.W., Mather A., Cooper G.R., 1980). Выбор его был обусловлен тем, что метод обладает высокими правильностью и воспроизводимостью и является общепринятым для получения действительных значений (далее обозначен МС).

2. Прямой (без предварительной обработки образца) химический, основанный на реакции холестерина с серной кислотой в присутствии уксусной кислоты и уксусного ангидрида (Ilca S., 1962), с градуи-

ровкой по ОС (Метод А1) и по ОСС (Метод А2).

3. Экстракционный (с предварительной обработкой образца изопропанолом) химический на автоанализаторе "Technicon" (согласно инструкции к автоанализатору ААII), градуированный по ОС (Метод В1) и по ОСС (Метод В2).

4. Ферментный на автоанализаторе "Hitachi", градуированный по ОСС (метод С2). Значения, принятые в качестве полученных методом С1 (градуировка по ОС), рассчитывали по данным независимого эксперимента.

5. Ферментный на автоанализаторе "Centrifichem", градуированный по водным ОС (Метод D1) и по ОСС (Метод D2).

Ферментные методы основаны на гидролизе эфиров холестерина и окислении образующегося холестерина с помощью ферментов и последующем определении выделяющегося пероксида водорода по реакции с 4-аминоантипирином и фенолом.

Выбор методов А-Д ("рутинных") определялся тем, что их обычно используют при массовых определениях общего холестерина.

Определение содержания мешающих компонентов проводили: свободного холестерина, триацилглицеридов и глюкозы - ферментными методами на автоанализаторе "Hitachi-705" (наборы реагентов фирмы "Wako"); билирубина - фотометрированием щелочного азопигмента (Fog J., 1958); общего белка - биуретовым методом (Henry R.J., 1964); индивидуальных эфиров холестерина - методом ВЭЖХ на обращенной фазе С-18 (образцы с повышенным содержанием триацилглицеридов анализировали согласно разработанной нами методике); 7-дегидрохолестерин - с помощью разработанной нами методики на основе ВЭЖХ.

Расчеты проводили на ЭВМ "IBM PC-XT" (с использованием статистических программ "SPSS PC+", "Statgraphic") и "Реалите 2000".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Разработка новых аналитических методик:

Методика определения 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека состоит в гидролизе эфиров водно-спиртовым раствором КОН, экстракции гексаном, отборе и высушивании органической фазы, растворении осадка в малом количестве изопропанола и хроматографировании на колонке с обращенной фазой С-18, с фотометрированием при 282 нм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил-изопропанол-35:65 (по объему). Предел обнаружения метода составляет 0,05 мкМ, относительное стандартное отклонение - 0,04.

Методика определения холестерина и его эфиров в присутствии

триацилглицеридов в высокой концентрации, заключается в обработке образца сыворотки крови триглицеридлипазой с целью гидролиза триацилглицеридов, экстракции изопропанолом, центрифугировании и хроматографировании надосадка с фотометрированием при 205 нм. Использовали те же условия хроматографирования, что и в методике определения 7-дегидрохолестерина. На методику получено авторское свидетельство.

2. Результаты определения общего холестерина разными методами в сыворотках крови. Характеристики полученных распределений содержаний общего холестерина в исследуемой выборке приведены в табл. I. В случае каждого из методов распределения оказались близкими к нормальному, что дало возможность применения разработанной для нормальных распределений статистических методов обработки.

Таблица I

Характеристики распределений содержаний общего холестерина, полученных исследуемыми методами.

пара- метры метод	C, ммМ	σ, ммМ	асим- метрия	экс- цесс	α	p
MC	5,66	1,06	0,63	2,15	> 5%	<0,0001
AI	5,73	1,08	0,60	1,71	> 20%	<0,0001
A2	5,50	1,03	0,50	1,19	> 20%	<0,0001
BI	5,98	1,11	0,48	0,52	> 5%	<0,0001
B2	5,50	1,00	0,52	0,96	> 5%	<0,0001
C2	5,60	1,09	0,58	1,92	> 20%	0,0024
DI	5,29	0,96	1,34	-2,25	> 20%	<0,0001
D2	5,25	0,96	-0,20	-3,23	> 20%	<0,0001

Здесь C - среднее значение распределения содержаний; σ - стандартное отклонение; α - уровень значимости выполнения гипотезы о нормальности распределения (гипотеза принималась при α > 5%); p - вероятность того, что средняя величина распределения не отличается от действительной.

Средние величины результатов определения общего холестерина, полученных рутинными методиками, отличаются от среднего действительных значений содержания общего холестерина и друг от друга статистически значимо, т.е. каждая из этих методик имеет систематические погрешности, без учета которых сравнение результатов, полученных

разными методиками, некорректно. Кроме того, распределения различаются по форме, т.е. имеют разные асимметрии и эксцессы.

Результаты расчетов коэффициентов уравнений линейной регрессии вида $C_0 = aC_j + b$ (где C_0 и C_j - действительное и измеренное рутинным методом j содержание общего холестерина, соответственно) приведены в табл.2. Линейность зависимости подтверждена анализом остатков.

Таблица 2.

Результаты расчета уравнений линейной регрессии между значениями общего холестерина, полученными рутинными методами и МС[#]

Метод	S_r	r	a	$b, \text{мМ}$
A1	0,063	0,939	1,061	-0,42
A2	0,031	0,967	1,053	-0,13
B1	0,052	0,896	1,053	-0,63
B2	0,026	0,950	1,096	-0,37
C1	0,062	-	1,034	-0,06
C2	0,038	0,939	1,021	-0,06
D1	0,034	0,888	1,128	-0,26
D2	0,022	0,913	1,090	-0,10

[#] S_r МС составляло 0,017.

3. Способ оценки влияния мешающих компонентов на результаты определения общего холестерина разными методами. Предложен способ оценки влияния мешающих компонентов на методы определения основного вещества, заключающийся в предварительном определении в большом числе образцов содержания общего холестерина рутинным методом j (C_j), МС (C_0) и мешающих компонентов (C_i) и последующем нахождении зависимости:

$$D_j = C_j - C_0 = \sum_{i=1}^I k_{ij} C_i + d_j \quad (I)$$

где d_j - величина, связанная с присутствием в пробе неизвестных мешающих компонентов, коэффициент k_{ij} (ниже называется коэффициентом влияния) показывает величину влияния i -го мешающего компонента на метод j .

Коэффициенты k_{ij} и d_j определяли методом многомерного линейного регрессионного анализа со случайными регрессорами. Одновременно проверяли принятые гипотезы о взаимной независимости C_i и о линейности связи величин C_i и D_j (анализом остатков и другими

способами), а также оценивали погрешности определения величин k_{ij} .

В отличие от известных способов нахождения коэффициентов k_{ij} (Бернштейн И.Я., Каминский Ю.Л., 1986), предусматривающих изготовление образцов известного состава, применение такого способа позволяет определять коэффициенты k_{ij} и d_j в случаях, когда приготовить образцы известного состава затруднительно (например, в случае сыворотки крови).

4. Мешающие компоненты и их влияние на результаты определения общего холестерина. Мешающие компоненты были отобраны в основном по литературным данным: общий белок, билирубин, триацилглицериды, глюкоза, эфиры холестерина, 7-дегидрохолестерин.

Проведенные измерения показали, что содержание 7-дегидрохолестерина в сыворотках крови человека мало, и влияние этого вещества на методы определения общего холестерина незначимо.

Содержание остальных перечисленных мешающих компонентов измерили во всех сыворотках исследованной выборки.

Методом многомерного линейного регрессионного анализа получены следующие уравнения вида (I) для исследуемых методов:

$$D_{AI} = 11,1C_{\text{бил}} + 3,7P_{\text{пкс}} - 1,9P_{\text{ахс}} - 0,11 \quad (2)$$

$$D_{BI} = 1,9 \cdot 10^{-2} C_{\text{бел}} + 10,3C_{\text{бил}} - 7,3 \cdot 10^{-2} C_0 - 3,0P_{\text{ахс}} + 1,1P_{\text{лкс}} + 2,5P_{\text{олкс}} - 1,16 \quad (3)$$

$$D_{CI} = 7,1 \cdot 10^{-3} C_{\text{бел}} - 7,4C_{\text{бил}} + 1,3P_{\text{лкс}} - 1,3 \cdot 10^{-2} C_0 - 1,04 \quad (4)$$

$$D_{DI} = 2,1P_{\text{ахс}} + 1,7P_{\text{лкс}} + 2,2P_{\text{олкс}} - 0,05C_0 - 4,3 \cdot 10^{-3} C_{\text{тг}} - 0,77 \quad (5)$$

где $C_{\text{бил}}$, C_0 и $C_{\text{тг}}$ - содержание билирубина, общего холестерина и триацилглицеридов, соответственно, в мм, $C_{\text{бел}}$ - содержание белка в г/л, $P_{\text{ахс}}$, $P_{\text{лкс}}$, $P_{\text{олкс}}$, $P_{\text{пкс}}$ - соответственно отношения содержания эфиров холестерина: арахионата, линолеата, олеата и пальмитата к содержанию общего холестерина. Содержание эфиров холестерина рассматривали в преобразованной форме - в виде отношения к содержанию общего холестерина, - поскольку между ними и содержанием общего холестерина существует линейная зависимость, что противоречит принятому для математических расчетов предположению о независимости регрессоров.

В уравнения включены составляющие с коэффициентами, отличающи-

мися от 0 достоверно ($p > 0,90$). Влияние глюкозы оказалось незначимым для всех методов в исследованном диапазоне содержаний.

Гипотеза о линейном характере связи D_j с величинами C_0 , $C_{бил}$, $C_{бел}$, $R_{ахс}$, $R_{пхс}$, $R_{олхс}$, $R_{лхс}$ хорошо выполняется, что было проверено анализом остатков при регрессионном анализе.

Уравнения (2-5) содержат новую информацию о мешающих компонентах: а) присутствие холестерина в виде эфира арахидоновой кислоты занижает результаты определения общего холестерина исследованными химическими методами, в отличие от присутствия его в виде эфиров других кислот; б) присутствие триацилглицеридов оказывает влияние на исследованные ферментные методы; в) индивидуальные эфиры холестерина влияют на ферментные методы.

В то же время известные из литературы коэффициенты влияния (например, билирубина и общего белка) совпали с рассчитанными нами.

Б. Способ сопоставления результатов, полученных разными методами. Для сопоставления результатов определения общего холестерина в выборках, проанализированных разными методами, предложен способ приведения распределений всех полученных данных к сопоставимым, т.е. либо пересчет всех распределений результатов к тем, которые были бы получены МС, либо аналогичный пересчет распределений определенных разными методами значений общего холестерина друг к другу.

Для этого необходимо провести определение содержания общего холестерина C_0 МС (или сравниваемым рутинным методом) в случайной малой подвыборке из анализируемой рутинным методом j выборки, найти вид зависимости:

$$C_0 = f(C_j) \quad (6),$$

где C_j - значения общего холестерина, полученные методом j , и пересчитать результаты определения общего холестерина рутинным методом к действительным (или полученным другим рутинным методом) по этой формуле. Зависимость (6) находили с помощью регрессионного анализа с учетом случайных ошибок измерений как C_j , так и C_0 .

После пересчета выборки можно сравнивать с применением обычных статистических методов.

С использованием описанного способа нами был проведен пересчет распределений содержаний общего холестерина, полученных рутинными методами, в исследованной выборке, к действительному по формуле (6). Объем подвыборки составлял 100 проб. Распределения значений содержания общего холестерина, полученных рутинными методами, и

пересчитанных к действительным по формулам вида $C_D = f(C_j)$, совпали с распределением значений общего холестерина, полученных МС, в широком диапазоне содержаний. Результаты такого пересчета проиллюстрированы на рисунке на примере метода ДІ.

Зависимость погрешности пересчета от объема подвыборки для подбора его в конкретной задаче нашли с помощью математического моделирования.

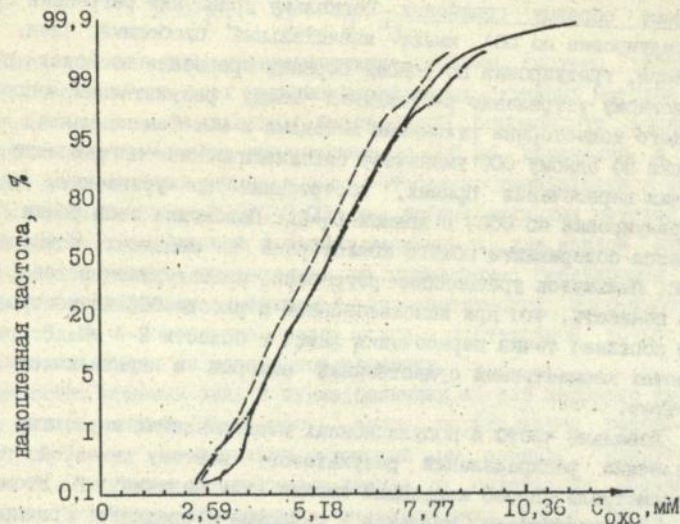


Рисунок. Сравнение нормализованных распределений содержания общего холестерина, полученных МС, методом ДІ и пересчитанных по (6) значений.

— — — МС
 - - - - метод ДІ
 - - - - распределение значений содержания общего холестерина, полученных методом ДІ и пересчитанных к действительным по (6).

Предложенный способ позволяет сравнивать значения общего холестерина, полученные разными методами, в выборках с любыми распределениями мешающих компонентов и общего холестерина.

6. Способы градуировки, позволяющие уменьшить систематические погрешности методов определения общего холестерина. Для близких по содержанию мешающих компонентов и общего холестерина популяций можно уменьшить систематические погрешности рутинных методов определения общего холестерина, градуируя эти методы определенным

образом.

При определении содержания общего холестерина в массовых исследованиях часто используется градуировка по одному образцу сравнения, например, в большинстве методов с применением автоанализаторов, однако целенаправленный выбор состава матрицы образца сравнения при этом не проводится.

6.1. Градуировка методов определения общего холестерина по одному образцу сравнения. Поскольку уравнения регрессий $C_0 = aC_j + b$ (градуировка по ОС) имеют значительный свободный член, вообще говоря, градуировка по одному образцу сравнения не может привести к полному устранению расхождений между результатами определения общего холестерина рутинными методами и МС. Тем не менее, градуировка по одному ОС уменьшает систематические погрешности вблизи точки пересечения прямых, построенных по уравнениям регрессии (градуировка по ОС) с прямой $C_j = C_0$. Положение этой точки определяется содержанием общего холестерина и мешающих компонентов в ОС. Пользуясь уравнениями регрессии, приведенными в табл. 2, легко показать, что при использованном в работе ОС (неконтролируемого состава) точка пересечения лежит в области 2-4 мм. В других областях концентраций существенный выигрыш в правильности отсутствует.

Довольно часто в популяционных исследованиях изучаются средние величины распределений результатов, поэтому в этой главе мы рассмотрели способ коррекции именно этих величин. В этом случае целью градуировки является смещение среднего распределений значений общего холестерина, полученных рутинным методом, к среднему распределению действительных величин.

Пусть C_j - среднее значение результатов определения общего холестерина, полученных рутинным методом, в выборке; C_0 - среднее действительных значений общего холестерина в той же выборке. Тогда для пересчета C_j к C_0 можно в процессе градуировки умножить все C_j на коэффициент

$$a_j = C_0 / C_j \quad (7)$$

соответствующий данному методу анализа.

Описанный способ пересчета с применением коэффициента a_j можно осуществлять по меньшей мере в двух вариантах:

а) В первом варианте способа следует приписать ОС концентрацию

$$C_{ОС}^* = a_j C_{ОС} \quad (8)$$

где $C_{ОС}$ - действительное содержание общего холестерина в ОС.

Вычисленные по (7) коэффициенты α_j и их стандартные отклонения для исследованных методов J для исследованной выборки имеют следующие значения: метод AI - 0,987 ($v=0,007$); BI - 0,948 ($v=0,006$); CI - 1,025 ($v=0,004$); DI - 1,071 ($v=0,004$).

б) Во втором варианте способа предлагается использовать для градуировки ОСС с заранее заданным составом матрицы, для которого выполняется услови.

$$\sum_{i=1}^I k_{1j} C_i + d_j = C_0 \frac{I - \alpha_j}{\alpha_j} \quad (9)$$

Варианты состава ОСС, удовлетворяющие решению системы уравнений (9), пригодны для всех четырех исследуемых рутинных методов.

С точки зрения уменьшения межсерийной погрешности анализа предпочтительно применение градуировки по ОСС по сравнению с ОС (по нашим данным, межсерийные о.с.о. достоверно уменьшаются в этом случае с 0,034-0,063 до 0,020-0,026 для разных рутинных методов).

Очевидно, что в реальной ситуации величины α_j для каждой вновь исследуемой популяции неизвестны, и применение градуировки по образцам сравнения для уменьшения систематических погрешностей возможно только в том случае, когда можно с достаточной точностью оценить эти величины до начала исследования.

Проще всего принять одну и ту же величину α_j для широкого круга исследуемых популяций. Возможность этого определяется разбросом величин α_j между популяциями, который мы оценил следующим образом. Были собраны литературные данные о содержании мешающих компонентов и общего холестерина в сыворотках крови различных популяций (число популяций составляло от II до 80 для разных параметров); рассчитаны межпопуляционные средние значения для каждого мешающего компонента и общего холестерина, их стандартные отклонения (средние значения для каждой популяции при этом рассматривали как единичные измерения). На основе этих данных и ранее найденных коэффициентов $k_{1,j}$ и d_j оценили средние коэффициенты α_j ($\bar{\alpha}_{j,p}$) и их стандартные отклонения для совокупности популяций белого взрослого населения (табл. 3)

2. Поправку к результатам можно вносить как в предложенной мультипликативной, так и в других формах (например, аддитивной). В случае незначительной коррекции ($(C_j - C_0)/C_0 \ll 0,1$) форма поправки не существенна. В противном случае мультипликативная коррекция лучше соответствует логнормальному распределению определяемого компонента в популяции.

Были сделаны приближенные оценки величин α_j для других, кроме описанных выше, популяций. Для детских популяций они мало отличались от найденных нами $\bar{\alpha}_{j,p}$. Для популяций обследуемых с заболеваниями, приводящими к сильному изменению содержания одного из мешающих компонентов, значения α_j значительно отличаются от $\bar{\alpha}_{j,p}$.

Таблица 3.

Величины $\bar{\alpha}_{j,p}$ и стандартные отклонения для них.

метод	AI	BI	CI	DI
$\bar{\alpha}_{j,p}$	0,986	0,923	1,002	1,055
σ	0,017	0,029	0,039	0,036

6.2. Градуировка по нескольким образцам сравнения. Способы уменьшения систематических погрешностей при градуировке по нескольким ОСС аналогичны использованным в 6.1 с той разницей, что в случае нескольких ОСС коррекция возможна во всем диапазоне концентраций общего холестерина. Правда, во многих случаях целью исследования является лишь оценка средних значений распределений, для чего применение одного ОСС вполне достаточно. Коэффициент $\beta_j(C)$, аналогичный α_j для случая одного ОСС, имеет вид:

$$\beta_j(C) = f(C_j)/C_j \quad (10)$$

а) первый вариант компенсации систематических погрешностей в ходе градуировки (без учета состава ОСС) заключается в приписывании каждому ОС содержания общего холестерина $C_{oc,n}^*$:

$$C_{oc,n}^* = \beta_j(C_{oc,n}) \cdot C_{oc,n} \quad (11)$$

где $C_{oc,n}$ - действительное содержание общего холестерина в n-ом ОС.

б) второй вариант способа заключается в нахождении составов матриц ОСС, для которых выполняются условия:

$$\sum_{i=1}^I k_{ij} C_i + d_j = C_{oc} \cdot \frac{\beta_j(C_{oc,n}) - 1}{\beta_j(C_{oc,n})} \quad (12)$$

В случае линейной зависимости $C_0 = f(C_j)$ достаточно двух ОС (ОСС) для компенсации систематических погрешностей, связанных с различиями в методах определения общего холестерина.

Расчеты не показали достоверного снижения межсерийной вариации результатов по сравнению с градуировкой по одному ОСС.

Предложенным способом уменьшения систематических погрешностей следует пользоваться с осторожностью - только для сходных по содержанию мешающих компонентов и общего холестерина популяций. Если имеются сомнения относительно близости распределений мешающих компонентов в сравниваемых популяциях, надежнее пользоваться сопоставлением результатов с помощью пересчета.

Несмотря на указанные ограничения использования способа уменьшения систематических погрешностей в ходе градуировки, он может найти широкое применение, так как: а) значительно чаще других при популяционных исследованиях факторов риска изучают однотипные популяции; б) градуировка по одному и тому же ОСС может использоваться для компенсации систематических погрешностей двух или более рутинных методов, если для них удастся найти сочетание концентраций мешающих компонентов и общего холестерина, удовлетворяющих уравнениям (9).

Основные результаты работы

1. Разработаны новые методики анализа:

- методика одновременного определения холестерина и его эфиров в присутствии значительных количеств триацилглицеридов с помощью ВЭЖХ, отличающаяся от существующих предварительным ферментативным гидролизом триацилглицеридов. Предел обнаружения 0,04 мМ, относительное стандартное отклонение - 0,04.

- методика определения 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека с помощью ВЭЖХ после предварительного концентрирования. Предел обнаружения - 0,05 мкМ, относительное стандартное отклонение - 0,04.

2. Разработан способ оценки влияния мешающих компонентов на определение основного вещества с использованием линейно-регрессионного анализа. Проведена оценка влияния различных компонентов сыворотки крови на определение общего холестерина. Показано, что значимым является влияние эфиров холестерина, общего белка, билирубина, триацилглицеридов.

3. Показано, что содержание 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека невелико и практически не влияет на результаты определения общего холестерина.

4. Предложен простой статистический способ сопоставления результатов массовых определений общего холестерина разными методиками в выборках с неконтролируемым содержанием мешающих компонентов.

5. Предложен экспрессный способ уменьшения систематических



погрешностей методик массовых определений общего холестерина - для случая близких по концентрациям общего холестерина и мешающих компонентов популяций, - в ходе градуировки.

6. Показано, что градуировка методов определения общего холестерина по сывороточному образцу сравнения приводит к значительному (по сравнению с градуировкой по раствору чистого холестерина) уменьшению межсерийной погрешности анализа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Хроматографическое определение содержания нейтральных липидов в крови / Вавкушевская И.Н., Дворкин В.И., Золотов Н.Н., Малахов В.Н. // Международный симпозиум "Хроматография в биологии и медицине": Тез. докл. - М., 1986. - С. 77-78.
2. А. с. 1377733 СССР, МКИ⁴ G 01 33/48. Способ определения липидов в сыворотке или плазме крови / Вавкушевская И.Н., Дворкин В.И., Золотов Н.Н., Малахов В.Н. (СССР). - 4 с.
3. Дворкин В.И., Каримова И.Н. Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови прямым химическим методом с применением сыворотки крови в качестве образца сравнения // Ж. аналит. химии. - 1990. - Т. 45, № I. - С. 181-187.
4. Каримова И.Н., Дворкин В.И., Золотов Н.Н. Определение содержания холестерина и его эфиров методом ВЭЖХ в сыворотке крови с высоким содержанием триацилглицеридов // Ж. аналит. химии. - 1989. - Т. 44, № II. - С. 2104-2107.
5. Каримова И.Н., Дворкин В.И. Хроматографическое определение 7-дегидрохолестерина в сыворотке крови человека // Ж. аналит. химии. - 1989. - Т. 44, № 10. - С. 1902-1905.
6. Дворкин В.И., Каримова И.Н., Айду Ф.А. Сравнение выборок, проанализированных разными методами, при биохимических исследованиях. - М., 1990. - 28 с. - Деп. в ВИНИТИ 04.04.90, № 2079-В90.
7. Дворкин В.И., Каримова И.Н. Методы определения холестерина // Ж. аналит. химии. - 1990. - Т. 45, № 5. - С. 837-857.
8. Дворкин В.И., Каримова И.Н. Уменьшение систематических погрешностей популяционных биохимических исследований при градуировке на примере определения холестерина. - М., 1991. - 27 с. - Деп. в ВИНИТИ 24.01.91, № 400-В91.
9. Karimova I.N., Dvorkin V.I. Estimation of influences some substances on the results of determination of the sum (TC+TG) by the fluorescence method /Physico-chemical Aspects of Medicine Reviews.- V.3.- Part 1.- Harwood Acad. Publ., 1991.- P. 66-72.

Зак. № 35с

Тир. 100

Тип. Информторга

AB 30.428

AB 30.428

Книжка № 30.428