

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 352—2011

丙氨酸氨基转移酶催化活性浓度测定 (无磷酸吡哆醛)参考方法

Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of
alanine aminotransferase (No pyridoxal-5'-phosphoric acid)

2011-09-30 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和缩略语	1
3.1 术语和定义	1
3.2 缩略语	2
4 参考方法描述	3
4.1 测定原理和方法	3
4.2 检查列表	3
4.3 试剂	4
4.4 仪器	7
4.5 采样和样本	7
4.6 测定系统和分析部分的准备	8
4.7 酶催化活性浓度测定	11
4.8 测定结果处理	13
4.9 分析可靠性	14
4.10 通过实验室间比对进行确认	14
4.11 参考区间	14
4.12 报告	15
4.13 质量保证	15
附录 A (规范性附录) 测定储存酶溶液中 LD 催化活性浓度	16
附录 B (资料性附录) 试剂原料详细信息	19
附录 C (规范性附录) 不同温度下溶液 1、溶液 2 的 pH 值	23
附录 D (资料性附录) ALT IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较	25
参考文献	27

丙氨酸氨基转移酶催化活性浓度测定 (无磷酸吡哆醛)参考方法

1 范围

本标准规定了在临床医学应用中,测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)催化活性浓度(无磷酸吡哆醛)的参考方法。

本标准主要适用于参考实验室,作为丙氨酸氨基转移酶催化活性浓度(无磷酸吡哆醛)测定的溯源,也可作为与酶活性浓度检验有关的仪器和试剂生产企业的溯源,可供有关认可单位及质量管理部门应用。

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,仅所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。

ISO 15193:2009 体外诊断器具 生物源样本中量的测定 参考测定程序的表述

3 术语和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

原始样本 primary sample

最初从一个系统中取出的一个或几个部分的集合物,旨在提供该系统的信息或作为对该系统做出决定的基础。

注:在某些情况下,所提供的信息可以适用于一个较大的系统或一组系统,此时取样系统是这些系统的组成部分。

3.1.2

实验室样本 laboratory sample

准备送到实验室或实验室接收的用于测定的原始样本或原始样本的分样本。

3.1.3

分析样本 analytical sample

自实验室样本制备的、可从中取出分析部分的样本。

注:在取出分析部分之前,分析样本可经过各种处理。

3.1.4

分析部分 analytical portion

从分析样本中取出的用于实际测定和观察的物质部分。

注:如果无需预处理,分析部分直接从原始样本或实验室样本中取出。某些情况下,需将分析部分溶解成分析溶液再上机测定。

3.1.5

分析溶液 analytical solution

将分析部分溶解在气体、液体或固体中而制备的溶液,溶解过程中可以有反应发生或无反应发生。

3.1.6

(某一物质系统的)基质 matrix(of a material system)

一个物质系统中除被分析物之外的所有成分。

3.1.7

参考方法 reference procedure

是在校准或表征标准物质时为提高测定结果所采用的测定方法,它适用于评定由同类量的其他测定方法获得的被测量值的测定正确度。

3.1.8

测定系统的灵敏度 sensitivity of a measuring system

简称:灵敏度 sensitivity

测定系统的示值变化除以相应的被测定值变化所得的商。

注1:测定系统的灵敏度可能与被测定的量值有关。

注2:所考虑的被测定值的变化必须大于测定系统的分辨力。

3.1.9

分析特异性 analytical specificity

测定方法只测定可测定的量的能力。

3.1.10

分析干扰 analytical interference

由一个影响量引起的系统测定误差,该影响量自身在测定系统中不产生信号,但它会引起示值的增高或降低。

3.1.11

影响量 influence quantity

被测定以外的可影响测定结果的量。

3.1.12

被测量 measurand

拟测定的量。

注1:对被测定的说明要求了解量的种类,以及含有该量的现象、物体或物质状态的描述,包括有关成分及所涉及的化学实体。

注2:在VIM第二版和IEC 60050-300:2001中,被测定定义为受到测定的量。

注3:测定包括测定系统和实施测定的条件,它可能会改变研究中的现象、物体或物质,使被测定的量可能不同于定义的被测定。在这种情况下,适当的修正是必要的。

3.1.13

检出限 detection limit, limit of detection

由给定测定方法获得的测得值,其声称的物质成分不存在的误判概率为 β ,声称物质成分存在的误判概率为 α 。

注1:国际理论和应用化学联合会(IUPAC)推荐 α 和 β 的默认值为0.05。

注2:有时使用缩写词LOD。

注3:不要用术语“灵敏度”表示“检出限”。

3.1.14

校准品 calibrator

用于校准的测定标准。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ALT:丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase)

LD:乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)

NAD:氧化型β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-nicotinamide-adenine-dinucleotide, oxidized form)

NADH:还原型β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-nicotinamide-adenine-dinucleotide, reduced form)

P-5-P:5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal-5-phosphoric acid)

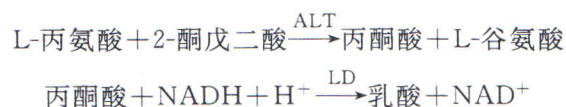
IFCC:国际临床化学与检验医学联合会(international federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

SOP:标准操作方法(standard operation procedure)

4 参考方法描述

4.1 测定原理和方法

本法采用偶联反应,L-丙氨酸和α-酮戊二酸在ALT催化下,生成丙酮酸和L-谷氨酸,丙酮酸在LD催化下生成乳酸,同时NADH被氧化成NAD⁺,反应式如下:



在339 nm下,监测NADH的氧化速率,摩尔消光系数的下降速率与ALT催化活性浓度呈正比。

4.2 检查列表

4.2.1 试剂列表

将所用试剂按表1列出。

表1 试剂列表

分 类	系 统 名 称	通用名称、缩略语
试剂	三羟甲基氨基甲烷	Tris
	L(+)-丙氨酸	丙氨酸
	2-酮戊二酸,二钠盐,二水合物	2-酮戊二酸
	β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,还原型,二钠盐	还原辅酶I, NADH
	无	乳酸脱氢酶, LD
	叠氮钠	无
	盐酸	无
	氢氧化钠	无
	氯化钠	无
	牛血清白蛋白, Fraction V	牛白蛋白
	丙酮酸一钠盐	无
溶剂	质量与双蒸水类似的高纯度水(电导率 $<2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 6~7 硅酸盐 $<0.1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	无
参考物质	JCTLM和(或)国家批准的参考物质	无
质控物质	常规系统校准品	无
指示剂	无	无

4.2.2 分光光度计和辅助仪器列表

参考实验室应在表 2 登记主要测定仪器(分光光度计)和主要辅助仪器(点式温度计、天平、pH 计、恒温水浴箱、稀释配液仪、移液器等)。

表 2 分光光度计和辅助仪器

仪器名称	生产厂家	型 号
分光光度计		
点式温度计		
天平		
pH 计		
恒温水浴箱		
稀释配液仪		
移液器		

4.3 试剂

4.3.1 试剂原料信息

按表 3 详细填写试剂原料详细信息。

表 3 试剂原料详细信息

试剂系统名 通用名

信 息 指 标	内 容
CAS,CARN 注册号	
生产厂家	
货号/批号	
分子式	
相对分子质量	
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	
贮存要求	
失效期	

ALT 测定所用每个试剂原料详细信息见附录 B。如怀疑一种化学药品含有不纯的物质影响了分析物的催化活性,应进行进一步的研究,例如,比较不同厂家和不同批号的产品。宜使用在对比试验中已经鉴定或认可的试剂。以下三种试剂需要注意安全:

盐酸健康危害:接触其蒸气或烟雾,可引起急性中毒,出现眼结膜炎,鼻及口腔黏膜有烧灼感,鼻衄、齿龈出血,气管炎等。误服可引起消化道灼伤、溃疡形成,有可能引起胃穿孔、腹膜炎等。眼和皮肤接触可致灼伤。慢性影响:长期接触,引起慢性鼻炎、慢性支气管炎、牙齿酸蚀症及皮肤损害。操作人员必须经过专门培训,严格遵守操作规程。操作人员宜佩戴自吸过滤式防毒面具(全面罩),穿橡胶耐酸碱服,戴橡胶耐酸碱手套。远离易燃、可燃物。

氢氧化钠有强烈刺激和腐蚀性。粉尘或烟雾会刺激眼和呼吸道,腐蚀鼻中隔;皮肤和眼与 NaOH 直接接触会引起灼伤;误服可造成消化道灼伤,黏膜糜烂、出血和休克。本品不会燃烧,遇水和水蒸气大量放热,形成腐蚀性溶液。与酸发生中和反应并放热。具有强腐蚀性。燃烧(分解)产物:可能产生有害的毒性烟雾。呼吸系统防护:必要时佩带防毒口罩。眼睛防护:戴化学安全防护眼镜。防护服:穿工作服(防腐材料制作)。手防护:戴橡皮手套。

叠氮钠:本品和氰化物相似,对细胞色素氧化酶和其他酶有抑制作用,并能使体内氧合血红蛋白形成受阻,有显著的降压作用。对眼和皮肤有刺激性。如吸入、口服或经皮肤吸收,可引起中毒死亡。高血压病人口服本品有显著降压作用。本品在有机合成中可有叠氮酸气体逸出,吸入中毒后出现眩晕、虚弱无力、视觉模糊、呼吸困难、昏厥感、血压降低、心动过缓等。呼吸系统防护:可能接触其粉尘时,应佩戴头罩型电动送风过滤式防尘呼吸器。紧急事态抢救或撤离时,宜佩戴自给式呼吸器。眼睛防护:呼吸系统防护中已作防护。身体防护:穿连衣式胶布防毒衣。手防护:戴橡胶手套。其他:工作现场禁止吸烟、进食和饮水。工作毕,淋浴更衣。单独存放被毒物污染的衣服,洗后备用。保持良好的卫生习惯。皮肤接触:脱去被污染的衣服,用肥皂水和清水彻底冲洗皮肤。眼睛接触:提起眼睑,用流动清水或生理盐水冲洗,就医。吸入:迅速脱离现场至空气新鲜处。保持呼吸道通畅。如呼吸困难,给输氧。如呼吸停止,立即进行人工呼吸。就医。若误食:饮足量温水,催吐,就医。

4.3.2 试剂溶液

4.3.2.1 一般要求

制备溶液时各成分给出的质量是指 100% 含量。如果化学物质的含量低于 100% [例如 $y(\%)$], 则应用因子: $F_{\text{content}} = 100/y$, 计算出与给出质量相当的某化学物质的质量。

溶液的制备应使用质量与双蒸水类似的高纯度水(电导率 $< 2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH6 ~ 7, 硅酸盐 $< 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

每次称重的扩展($k=2$)不确定度(包括物质纯度的不确定度)(正态分布),应 $\leq 1.5\%$ 。

4.3.2.2 溶液 1

称量 1.47 g Tris、5.61 g 丙氨酸(游离酸)及 0.052 g 叠氮钠,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约 80 mL 水中;
- 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 值(37 °C)至 7.15;
- 转移至 100 mL 容量瓶中;
- 将容量瓶和水平衡至 20 °C;
- 加水(20 °C)至容量瓶的刻度线。

最终配制的溶液中 Tris 浓度为 $121.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、丙氨酸(游离酸)浓度为 $630.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、叠氮钠浓度为 $8.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 3 个月。

4.3.2.3 溶液 2

称量 1.47 g Tris、0.052 g 叠氮钠,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约 80 mL 水中;
- 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 值(37 °C)至 7.15;
- 转移至 100 mL 容量瓶中;
- 将容量瓶和水平衡至 20 °C;
- 加水(20 °C)至容量瓶的刻度线。

最终配制的溶液中 Tris 浓度为 $121.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、叠氮钠浓度为 $8.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~

8℃稳定性为3个月。

4.3.2.4 溶液3

称量16.1 mg NADH二钠盐,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于2.00 mL溶液2中;
- 避光保存(如棕色瓶)。

最终配制的溶液中NADH二钠盐浓度为11.34 mmol·L⁻¹。该溶液2℃~8℃稳定性为1周。

4.3.2.5 酶试剂的稀释液

称量1.20 g牛血清白蛋白、0.90 g NaCl,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约80 mL水中;
- 转移至100 mL容量瓶;
- 将容量瓶和水平衡至20℃;
- 加水(20℃)至容量瓶刻度线。

最终配制的溶液中NaCl浓度为154 mmol·L⁻¹。该溶液2℃~8℃稳定性至少1个月。

4.3.2.6 溶液4

用4.3.2.5中的酶试剂稀释液稀释LD储存液,使LD催化活性浓度在37℃时为3.57 mkat·L⁻¹(214.2 kU·L⁻¹),按公式(1)计算稀释LD储存液所需酶试剂稀释液体积:

$$V_{\text{dilution}} = \frac{V_{LD_{\text{stock}}} \times (LD_{\text{stock}} - 214.2)}{214.2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

V_{dilution} ——稀释LD储存液所需酶试剂稀释液体积,单位为毫升(mL);

$V_{LD_{\text{stock}}}$ ——LD储存液体积,单位为毫升(mL);

LD_{stock} ——LD储存液中LD催化活性浓度,单位为毫凯塔尔每升(mkat·L⁻¹)或千单位每升(kU·L⁻¹)。

示例:见附录A。

最终配制的溶液中LD催化活性浓度在37℃时为3.57 mkat·L⁻¹(214.2 kU·L⁻¹)。该溶液2℃~8℃稳定性至少2 d。

4.3.2.7 反应溶液

分别移取10.0 mL溶液1、0.200 mL溶液3、0.200 mL水、0.100 mL溶液4,将上述溶液充分混匀、避光保存。该溶液2℃~8℃稳定性为1 d。

4.3.2.8 起始试剂溶液

称量0.407 g 2-酮戊二酸二钠二水化合物,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约6 mL水中;
- 转移至10 mL容量瓶;
- 将容量瓶和水平衡至20℃;
- 加水(20℃)至刻度线。

最终配制的溶液中2-酮戊二酸二钠二水化合物浓度为180.0 mmol·L⁻¹。该溶液2℃~8℃稳定性为1周。

4.3.3 温度对缓冲溶液 pH 的影响

当温度偏离 37 °C 时,调节 pH 值的方法:将温度计与 pH 电极同时浸入混合液中。然后将溶液边搅拌边滴定至表中列举在当前测定温度下的 pH 值。在校准、控制和调节 pH 的过程中,搅拌速度要一致。pH 电极应位于被搅拌溶液的中心。

应考虑到在调节 pH 的滴定过程中,温度是可能改变的因素。为此,接近靶值时应重新控制温度,如果需要,根据附录 C 调整 pH 靶值。同样的方法也适用于 pH 计的温度补偿调节。

配制溶液 1、溶液 2 时,需根据不同温度调整 pH 值。参阅附录 C 来调节溶液的 pH 值。

4.4 仪器

分光光度计及辅助仪器主要性能的要求,见表 4。

表 4 分光光度计、辅助仪器主要性能的要求

仪器名称	性能指标	IFCC 参考方法要求
分光光度计、配件	波长准确度/nm	$339 \pm 1 (k=2)$
	带宽/nm	≤ 2
	光径/mm	$10.00 \pm 0.01 (k=2)$
pH 计	pH 值	$7.15 \pm 0.05 (k=2)$
点式温度计	温度/°C	$37.0 \pm 0.1 (k=2)$

4.5 采样和样本

4.5.1 通则

参考实验室主要接受外检标本,不自行采血,一般不需考虑分析前因素对样本特性的影响。

4.5.2 对收检样本的要求

宜以表格形式记录样本的详细信息,见表 5。对不符合样本收检要求的样本应及时与委托方联系。

表 5 ALT 收检样本要求

要求指标	内 容				
可接受样本种类	<input type="checkbox"/> 血清	<input type="checkbox"/> 血浆	<input type="checkbox"/> 其他		
可接受样本类型 基质类型说明	<input type="checkbox"/> 冻干粉	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 冰冻	<input type="checkbox"/> 其他	
	<input type="checkbox"/> 人血清	<input type="checkbox"/> 牛血清	<input type="checkbox"/> 水	<input type="checkbox"/> 其他	
样本最低数量	支				
每支样本最低体积	每支	mL			
允许添加物					
运输条件	<input type="checkbox"/> 干冰	<input type="checkbox"/> 常温	<input type="checkbox"/> 冰袋	<input type="checkbox"/> 其他	
贮存条件	<input type="checkbox"/> 常温	<input type="checkbox"/> 4 °C	<input type="checkbox"/> -20 °C	<input type="checkbox"/> -70 °C	<input type="checkbox"/> 其他
稳定性					
危险性					
注意事项					

4.6 测定系统和分析部分的准备

4.6.1 测定系统的准备

4.6.1.1 分光光度计准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对分光光度计进行检查,填写表 6。

表 6 分光光度计准备

准备事项	具体内容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 接地 <input type="checkbox"/> 电脑 <input type="checkbox"/> 打印机 <input type="checkbox"/> 是否 24 h 开机 <input type="checkbox"/> 温度 <input type="checkbox"/> 湿度 <input type="checkbox"/> 机身清洁 <input type="checkbox"/> 比色仓清洁 <input type="checkbox"/> 比色窗清洁
组合	恒温装置: <input type="checkbox"/> 与分光光度计连接完整 <input type="checkbox"/> 提前开机 测温装置: <input type="checkbox"/> 电量 <input type="checkbox"/> 测温探头勿挤压、碰撞坚硬物体 搅拌装置: <input type="checkbox"/> 清洁 <input type="checkbox"/> 转速 比色杯: <input type="checkbox"/> 完整 <input type="checkbox"/> 清洁度
开机注意事项	光源灯: <input type="checkbox"/> 提前预热 比色杯: <input type="checkbox"/> 光径 <input type="checkbox"/> 比色杯间匹配
仪器性能检查	核实是否在国家计量机构检定合格有效期内 每日开机性能检查: <input type="checkbox"/> 波长准确度 <input type="checkbox"/> 波长重复性 <input type="checkbox"/> 基线平直度扫描 <input type="checkbox"/> 带宽测试 <input type="checkbox"/> 噪音测试 大型实验前性能检查: <input type="checkbox"/> 氧化钛玻璃检查波长准确度 <input type="checkbox"/> 国家标准溶液检查摩尔消光系数准确度
预防性维护	分光光度计: <input type="checkbox"/> 无明显振动 <input type="checkbox"/> 及时待机 <input type="checkbox"/> 无线电干扰 <input type="checkbox"/> UPS 辅助仪器: <input type="checkbox"/> 更换进、出水管 <input type="checkbox"/> 定期清洁 <input type="checkbox"/> 使用后清洁点温计探头、搅拌装置

各实验室可根据具体情况制定本实验室分光光度计准备流程图。

4.6.1.2 点式温度计准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对点式温度计进行检查,填写表 7。

表 7 点式温度计准备

准备事项	具体内容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 机身清洁 <input type="checkbox"/> 点式温度计温度探头是否正常
组合	<input type="checkbox"/> 主机与点式温度计温度探头连接完整
开机注意事项	电量: <input type="checkbox"/> 查看剩余电量 校准提示: <input type="checkbox"/> 查看校准有效期是否到期
仪器性能检查	核实是否在国家计量机构检定合格效期内 大型实验前性能检查: <input type="checkbox"/> 用计量合格的标准温度计检查温度的准确性
预防性维护	主机: <input type="checkbox"/> 机身清洁 温度探头: <input type="checkbox"/> 使用后及时清洁 <input type="checkbox"/> 保证直形、不弯曲

各实验室可根据具体情况制定本实验室点式温度计准备流程图。

4.6.1.3 恒温水浴箱准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对恒温水浴箱进行检查,填写表 8。

表 8 恒温水浴箱测定系统的准备

准备事项	具 体 内 容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 温度 <input type="checkbox"/> 湿度 <input type="checkbox"/> 机身清洁
组合	<input type="checkbox"/> 与分光光度计连接
开机注意事项	<input type="checkbox"/> 水量 <input type="checkbox"/> 进口水管 <input type="checkbox"/> 出口水管
仪器性能检查	<input type="checkbox"/> 温度校正 <input type="checkbox"/> 温度稳定性
预防性维护	<input type="checkbox"/> 定期更换进口水管 <input type="checkbox"/> 定期更换出口水管 <input type="checkbox"/> 清洗滤网 <input type="checkbox"/> 水箱内部消毒

各实验室可根据具体情况制定本实验室恒温水浴箱准备流程图。

4.6.1.4 稀释配液仪准备

实验室若有稀释配液仪,在测定工作前,按已制定的 SOP 文件对稀释配液仪进行检查,填写表 9。

表 9 稀释配液仪测定系统的准备

准备事项	具 体 内 容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 温度 <input type="checkbox"/> 湿度 <input type="checkbox"/> 机身清洁
开机注意事项	<input type="checkbox"/> 注射器 <input type="checkbox"/> 移液口 <input type="checkbox"/> 管路冲洗
仪器性能检查	<input type="checkbox"/> 加样量正确性 <input type="checkbox"/> 加样量精密度
预防性维护	<input type="checkbox"/> 定期更换注射器 <input type="checkbox"/> 定期更换移液管

各实验室可根据具体情况制定本实验室稀释配液仪准备流程图。

4.6.1.5 移液器准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对移液器进行检查,填写表 10。

表 10 移液器测定系统的准备

准备事项	具 体 内 容
应用前检查	<input type="checkbox"/> 温度 <input type="checkbox"/> 湿度 <input type="checkbox"/> 机身清洁 <input type="checkbox"/> 机械移动
仪器性能检查	<input type="checkbox"/> 加样量正确性 <input type="checkbox"/> 加样量精密度
预防性维护	<input type="checkbox"/> 定期进行保养 <input type="checkbox"/> 定期校准

各实验室可根据具体情况制定本实验室移液器准备流程图。

4.6.1.6 天平准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对天平进行检查,填写表 11。

表 11 天平准备

准备事项	具 体 内 容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 打印机 <input type="checkbox"/> 水平珠位置
开机自检	<input type="checkbox"/> 电量 <input type="checkbox"/> 零位显示
校准	核实是否在国家计量机构检定合格有效期内 大型实验前:标准砝码校准 每次应用前:仪器自带校准
开机注意事项	<input type="checkbox"/> 使用前清洁天平 <input type="checkbox"/> 电源充足

各实验室可根据具体情况制定本实验室天平准备流程图。

4.6.1.7 pH 计准备

测定工作前,按已制定的 SOP 文件对 pH 计进行检查,填写表 12。

表 12 pH 计准备

准备事项	具 体 内 容
开机前检查	<input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 接地 <input type="checkbox"/> 电脑 <input type="checkbox"/> 打印机 <input type="checkbox"/> 温度 <input type="checkbox"/> 湿度 <input type="checkbox"/> 机身清洁
组合	温度探头: <input type="checkbox"/> 与 pH 计连接完整 电极: <input type="checkbox"/> 与 pH 计连接完整 <input type="checkbox"/> 内液的量 <input type="checkbox"/> 外液的量 磁力搅拌器: <input type="checkbox"/> 电源 <input type="checkbox"/> 接地 <input type="checkbox"/> 转速 磁力搅拌子: <input type="checkbox"/> 完整 <input type="checkbox"/> 清洁度 <input type="checkbox"/> 磁力 pH 标准溶液: <input type="checkbox"/> 剩余量 <input type="checkbox"/> 有效期
仪器性能保证	每次应用前性能保证: 更换电极内液和电极外液进行电极激活 采用 pH 标准溶液进行校准
预防性维护	应用前: <input type="checkbox"/> 更换电极内液和电极外液:电极激活 应用后: <input type="checkbox"/> 更换电极内液和电极外液:电极保养 <input type="checkbox"/> 清洁温度探头、电极

各实验室可根据具体情况制定本实验室 pH 计准备流程图。

4.6.2 分析部分的准备

4.6.2.1 分析样本的类型

ALT 参考方法测定样本主要有:

- 参考物质(RM);
- 质控品;
- 检测实验室送检样本;
- 其他样本。

4.6.2.2 分析系列的结构

分析样本按下列顺序排列：

- 参考物质(RM)；
- 质控品；
- 空白样本,如:生理盐水；
- 被分析的“未知”物质。

上述样本重复测定可减小测定结果不确定度。从一个样本到下一个样本的携带污染应小于0.5%。

4.6.2.3 分析部分

ALT 参考方法测定的样本多为冻干粉或深低温的冰冻样本,测定前需处理为均匀的液状状态,分析部分应取自该液体样本。实验室需对待测的各种样本经过一定方法处理后,取出分析部分进行测定。

对每一类型实验室样本应制定详尽的样本处理 SOP 文件,并有记录证实操作达到预期要求。实验室样本若为冻干粉或干粉,应使用质量与双蒸水类似的高纯水(电导率 $<2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH6~7, 硅酸盐 $<0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)溶解;若为冷冻液体如冰冻血清等,应按 SOP 文件在严格控制条件下溶解。

应有处理参考物质的方法和记录。

测定过的样本有贮存待复查、销毁的文件和记录。

4.7 酶催化活性浓度测定

4.7.1 测定条件

见表 13。

表 13 ALT 催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	37.0 °C ± 0.1 °C ^a
波长	339 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	300 s
延迟时间	90 s
测定时间	180 s
读数(测定点)	≥ 6
^a 扩展不确定度(k=2)。	

4.7.2 测定步骤

4.7.2.1 监测比色杯内温度,达到要求时开始准备试剂和分析溶液。

4.7.2.2 将一份适当体积(约 0.4 mL)起始试剂溶液在 37 °C 平衡,剩余的起始试剂应保存在 2 °C ~ 8 °C。

4.7.2.3 将 4.3.2 中所列试剂体积按表 14 的顺序加入到反应杯中。

表 14 总体转换率测定的分析系统(ALT 催化反应速率和空白率)

体 积	测 定 步 骤
2.000 mL	反应液 平衡至 37 °C
0.200 mL	样本 充分混合并孵育 300 s。在孵育结束时,反应杯中的溶液温度应达到 37 °C
0.200 mL	起始试剂溶液 充分混合,等候 90 s,监测另外 180 s 的时间和吸光度

注:此动态光度测定的扩展($k=2$)合成不确定度(正态分布)不应超过 1%。(此不确定度不包括波长调整的不确定度)。样本体积分数的扩展($k=2$)合成不确定度(正态分布)应 $\leq 1\%$ 。

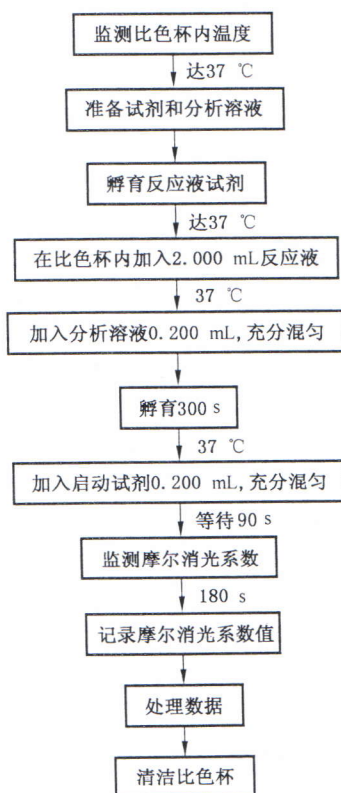


图 1 ALT 参考方法测定流程图

4.7.3 最终完全反应混和物的浓度

见表 15。

表 15 ALT 催化活性浓度测定最终完全反应混合物的浓度

参 数	指 标
三羟甲基氨基甲烷[Tris]	100 mmol · L ⁻¹
pH(37 °C)	7.15 ± 0.05 ^a
L-丙氨酸	500 mmol · L ⁻¹
NADH	0.18 mmol · L ⁻¹
LD(37 °C)	28.3 μkat · L ⁻¹ (1 700 U · L ⁻¹)
2-酮戊二酸	15 mmol · L ⁻¹
样本体积比	0.083 3(1 : 12)
^a 扩展不确定度(k=2)。	

4.7.4 试剂空白率测定

为了测定试剂空白率,用 9 g · L⁻¹ (154 mmol · L⁻¹) NaCl 溶液代替样本,测定方法同 4.7.2。如果试剂空白摩尔消光系数的绝对变化超过 3.3 × 10⁻⁵ s(0.002 min⁻¹), 反应液应丢弃。

4.7.5 样本空白率测定

测定样本空白率,用 9 g · L⁻¹ (154 mmol · L⁻¹) NaCl 溶液代替起始试剂溶液,测定方法同上。

注 1: 测定样本空白率并作记录,但在计算质控血清和校准品中 ALT 催化活性浓度时不予考虑。如果样本空白率超过总 ALT 的 1%时,应发出警告该物质不适合作校准用。

注 2: 样本空白率的试剂空白可用 9 g · L⁻¹ NaCl 溶液代替起始试剂溶液和样本进行测定。

4.7.6 结果确认

在进行重要测定前〔如给参考物质/校准品赋值、测定室间比对标本等〕,应先测定 JCTLM 和(或)国家批准的参考物质,测定结果应在“靶值 ± 不确定度”范围内,否则应确认建立方法的正确性。

实验室应有 SOP 文件和记录证实此活动。

4.8 测定结果处理

4.8.1 测定结果计算及数据处理

4.8.1.1 计算

通过回归分析(最小二乘法)计算摩尔消光系数随时间的改变[s⁻¹(min⁻¹)]。减去试剂空白率后,即校正后的样本摩尔消光系数变化率。按公式(2)计算 ALT 催化活性浓度:

$$b_{\text{ALT}} = F \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{ALT}} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

b_{ALT} —— ALT 催化活性浓度,单位为微凯塔尔每升(μkat · L⁻¹)或单位每升(U · L⁻¹);

F —— 系数,等于 1 905(在 339 nm 波长测定时,ε₃₃₉(NADH) = 630 m² · mol⁻¹);

(ΔA/Δt)_{ALT} —— 经过试剂空白率校正后的样本摩尔消光系数变化率,单位为每秒(s⁻¹)或每分钟(min⁻¹)。

4.8.1.2 数据处理

4.8.1.2.1 数据剔除:必要时,每个实验室应建立适当的数据剔除规则。

4.8.1.2.2 计算每批次测定值的均值、标准差,必要时应检查数据分布类型,计算均值的标准偏差(标准误)。

4.8.1.2.3 根据 GUM 和 QUAM 原则计算测定结果不确定度。

4.8.2 酶活性单位及换算关系

酶催化活性常用单位为 $\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,使用时常出现多位小数,目前常以 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示,但临床医学中仍习惯于使用 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。换算关系如下:

以 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 单位表示的催化浓度可通过乘以系数($f=0.01667$)转化成 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4.9 分析可靠性

4.9.1 概念、价值及其应用

应依据不确定度、精密度、线性范围、检出限等来评估 ALT 参考方法的分析可靠性。相关文献及参考方法的实验室测定数据表明本参考方法的分析性能优于临床酶活性浓度常规方法。适合于临床常规方法的溯源。

4.9.2 测定不确定度

应根据 GUM 和 QUAM 原则计算测定不确定度。本参考方法测定结果的相对合成标准不确定度在浓度 $1.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($100 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$) 时宜小于 2%。

4.9.3 精密度

应根据本实验室测定条件评估建立的参考方法的重复性、复现性精密度。本参考方法测定 $1.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($100 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$) 样本的重复性精密度宜小于 1.5%,实验室内复现性精密度宜小于 2.0%。

4.9.4 检出限

与分光光度计的最小分析信号有关。本参考方法测定的最低检出限为 $0.08 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($5.0 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.5 线性范围

线性范围 $< 4.76 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($285.8 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.6 误差的来源

在孵育过程中,样本中高浓度的丙酮酸将导致 NADH 大量消耗,这样会减少测定范围的上限,并大大降低测定结果。

4.10 通过实验室间比对进行确认

目前尚无 ALT 催化活性浓度测定(无磷酸吡哆醛)参考方法的实验室间比对活动。

4.11 参考区间

初步调查男性与女性(≥ 17 岁)的参考区间。

男性:

——下限(第 2.5 百分位): $0.21 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($12.6 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)

——上限(第 97.5 百分位): $0.75 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($44.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)

女性:

——下限(第 2.5 百分位): $0.15 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($9.2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)

——上限(第 97.5 百分位): $0.54 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($32.3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)

注:中国 ALT 催化活性浓度(无磷酸吡哆醛)参考区间尚在调查中。

4.12 报告

应设计适宜的测定结果报告格式,包括但不限于以下内容:

- 血清、血浆或其他;
- 取样日期和测定日期;
- 测定所使用的参考方法:IFCC 在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测定 ALT 催化活性浓度的原级参考方法;
- 被测定的名称、测定结果数字值和测定单位;
 - 被测定的名称:ALT
 - 测定单位: $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
- 评定测定结果的不确定度:一般取 $k=2$;
- 样本异常特性记录:如溶血、黄疸、乳糜等;
- 测定方法的异常情况或改变测定方法记录。

4.13 质量保证

4.13.1 室内质量控制

每个工作日开始正式测定样本前均测定质控品,当质控符合要求后才进入正式测定。应建立包括质控规则、操作步骤的室内质控 SOP 文件及记录。

4.13.2 室间质量控制评价

目前尚无 ALT 催化活性浓度测定(无磷酸吡哆醛)参考方法的实验室间比对活动。

4.13.3 质量日志

每个工作日完成工作日志及环境控制的质量记录。

附录 A

(规范性附录)

测定储存酶溶液中 LD 催化活性浓度

A.1 测定试剂

A.1.1 辅助试剂

A.1.1.1 一水 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphoric acid, monohydrate, P-5-P) ($C_8H_{10}O_6NP \cdot H_2O$), 相对分子质量 = 265.2。

A.1.1.2 丙酮酸一钠盐 ($C_3H_3O_3Na$), 相对分子质量 = 110.0。

A.1.2 试剂制备

A.1.2.1 5'-磷酸吡哆醛溶液

称量 16.7 mg 一水 5'-磷酸吡哆醛, 将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约 6 mL 溶液 2 中;
- 转移至 10 mL 容量瓶中;
- 将容量瓶和溶液 2 平衡至 20 °C;
- 加溶液 2 至容量瓶的校准刻度线 (20 °C);
- 避光保存 (如装在棕色瓶)。

最终配制的溶液中 5'-磷酸吡哆醛的浓度为 $6.300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 1 周。

A.1.2.2 测定 LD 催化活性浓度的反应液的组成

分别移取 10.0 mL 溶液 1、0.200 mL 5'-磷酸吡哆醛溶液、0.200 mL 溶液 3、0.100 mL 水, 将上述溶液充分混匀、避光保存。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 1 d。

A.1.2.3 测定 LD 催化活性浓度的起始试剂溶液

称量 0.099 0 g 丙酮酸一钠盐, 将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约 6 mL 水中;
- 转移至 25 mL 容量瓶中;
- 将容量瓶和水平衡至 20 °C;
- 加水至容量瓶的校准刻度线 (20 °C)。

最终配制的溶液中丙酮酸一钠盐的浓度为 $36.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 1 d。

A.1.2.4 LD 储存液的稀释 (使用前进行) 示例

A.1.2.4.1 在 10.0 mL 酶试剂稀释液中加入 0.050 mL LD 储存液, 充分混匀。第一步的稀释比例是 1 : 201。

A.1.2.4.2 将步骤 A.1.2.4.1 中的 0.050 mL 最终溶液加入到 10.0 mL 酶试剂稀释液中, 充分混匀。第二步的稀释比例是 1 : 201。第一步和第二步总稀释比例是 1 : 40 401。

注: 所用 LD 储存液催化活性浓度不同于上述步骤时, 稀释度不同, 需要对稀释因子 (F_{dilution}) 进行各自调整。

A.2 测定条件

A.2.1 最终完全反应混合物的浓度

见表 A.1。

表 A.1 LD 催化活性浓度测定最终完全反应混合物的浓度

参 数	指 标
三羟甲基氨基甲烷[Tris]	100 mmol · L ⁻¹
pH(37 °C)	7.15 ± 0.05 ^a
L-丙氨酸	500 mmol · L ⁻¹
NADH	0.18 mmol · L ⁻¹
5'磷酸吡哆醛	0.1 mmol · L ⁻¹
丙酮酸	3 mmol · L ⁻¹
与反应混合液体积比	0.083 3 (1 : 12)
^a 扩展不确定度(k=2)。	

A.2.2 LD 催化活性浓度测定条件

见表 A.2。

表 A.2 LD 催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	37.0 °C ± 0.1 °C ^a
波长	339 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	30 s
延迟时间	30 s
测定时间	90 s
读数(测定点)	≥ 6
^a 扩展不确定度(k=2)。	

A.3 测定步骤

A.3.1 试剂准备

将一份适当体积(约 0.4 mL)的起始试剂在 37 °C 下平衡,为测定做准备。剩余的起始试剂保存在 2 °C ~ 8 °C。

A.3.2 测定方法

按表 A.3 的顺序和量,将试剂和样本加入比色杯。

表 A.3 LD 催化活性浓度测定步骤

体 积	测 定 步 骤
2.000 mL	反应液 平衡到 37 °C
0.200 mL	步骤 A.1.2.4 配制的 LD 稀释液充分混匀,孵育 30 s。孵育结束时,比色杯中溶液温度应达到 37 °C
0.200 mL	起始试剂溶液充分混匀,等待 30 s 后,再连续监测 90 s 的摩尔消光系数

A.3.3 试剂空白

用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) NaCl 溶液代替 LD 溶液测定试剂空白,按上述步骤进行操作。

A.4 计算

计算方法与 ALT 催化活性浓度的计算方法相同。通过回归分析(最小二乘法)计算摩尔消光系数随时间的改变 [$\text{s}^{-1}(\text{min}^{-1})$]。减去试剂空白率后,即 LD 储存液稀释液的摩尔消光系数变化率。按公式(A.1)计算储存酶溶液中 LD 催化活性浓度:

$$LD_{\text{stock}} = F \times F_{\text{dilution}} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{LD}} \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

式中:

- LD_{stock} —— 储存酶溶液中 LD 催化活性浓度,单位为微凯塔尔每升 ($\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$) 或单位每升 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$),单位 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1 000 可得 $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$,单位 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 除以 1 000 可得 $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$;
- F —— 系数,等于 1 905(在 339 nm 波长测定时, $\epsilon_{339}(\text{NADH}) = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$);
- F_{dilution} —— LD 储存液的稀释因子,本例中为 40 401;
- $(\Delta A / \Delta t)_{\text{LD}}$ —— 经过试剂空白率校正后的 LD 储存液稀释液的摩尔消光系数变化率,单位为每秒 (s^{-1}) 或每分 (min^{-1})。

附 录 B
(资料性附录)
试剂原料详细信息

B.1 试剂原料详细信息

见表 B.1~表 B.11。

表 B.1 试剂原料详细信息

试剂系统名 三羟甲基氨基甲烷 通用名 Tris

信 息 指 标	内 容
CAS,CARN 注册号	77-86-1
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_4H_{11}NO_3$
相对分子质量	121.14
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	Xi,R36/37/38,S26,S37/39
贮存要求 失效期	

表 B.2 试剂原料详细信息

试剂系统名 L-丙氨酸

信 息 指 标	内 容
CAS,CARN 注册号	56-41-7
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_3H_7NO_2$
相对分子质量	89.09
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求 失效期	

表 B.3 试剂原料详细信息

试剂系统名 二水 2-酮戊二酸结晶二钠盐

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	305-72-6
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_5H_4O_5Na_2 \cdot 2H_2O$
相对分子质量	226.09
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

表 B.4 试剂原料详细信息

试剂系统名 还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸二钠盐 通用名 NADH

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	606-68-8
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$
相对分子质量	709.4
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

表 B.5 试剂原料详细信息

试剂系统名 乳酸脱氢酶 通用名 LD

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	9001-60-9
生产厂家	
货号/批号	
分子式	
相对分子质量	
纯度	
特定合格要求(如有)	来源于猪的骨骼肌,保存在甘油中
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 B.6 试剂原料详细信息

试剂系统名 叠氮钠

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	26628-22-8
生产厂家	
货号/批号	
分子式	NaN ₃
相对分子质量	65.01
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	T ⁺ ,N,R28,R32,R50/53,S28A,S45,S60,S61
贮存要求	
失效期	

表 B.7 试剂原料详细信息

试剂系统名 盐酸

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	7647-01-0
生产厂家	
货号/批号	
分子式	HCl
相对分子质量	36.47
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	C,R34,R37,S26,S45
贮存要求	
失效期	

表 B.8 试剂原料详细信息

试剂系统名 氢氧化钠

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	1310-73-2
生产厂家	
货号/批号	
分子式	NaOH
相对分子质量	40.00
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	C,R35,S24/25,S37/39,S45
贮存要求	
失效期	

表 B.9 试剂原料详细信息

试剂系统名 氯化钠

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	7647-14-5
生产厂家	
货号/批号	
分子式	NaCl
相对分子质量	58.44
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	R36,R22,S24/25
贮存要求	
失效期	

表 B.10 试剂原料详细信息

试剂系统名 牛血清白蛋白

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	9048-46-8
生产厂家	
货号/批号	
分子式	
相对分子质量	68 000
纯度	
特定合格要求(如有)	V 级
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

表 B.11 试剂原料详细信息

试剂系统名 一水 5'-磷酸吡哆醛 通用名 PAP

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	41468-25-1
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_8H_{10}O_6NP \cdot H_2O$
相对分子质量	265.16
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

附录 C
(规范性附录)

不同温度下溶液 1、溶液 2 的 pH 值

C.1 不同温度下溶液 1 的 pH 值

见表 C.1。

表 C.1 不同温度下溶液 1 的 pH 值

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
15.00	7.758	23.50	7.511	32.00	7.279
15.25	7.751	23.75	7.504	32.25	7.273
15.50	7.743	24.00	7.497	32.50	7.266
15.75	7.736	24.25	7.490	32.75	7.259
16.00	7.728	24.50	7.483	33.00	7.253
16.25	7.721	24.75	7.476	33.25	7.246
16.50	7.714	25.00	7.469	33.50	7.240
16.75	7.706	25.25	7.462	33.75	7.233
17.00	7.699	25.50	7.455	34.00	7.227
17.25	7.691	25.75	7.448	34.25	7.220
17.50	7.684	26.00	7.441	34.50	7.214
17.75	7.677	26.25	7.435	34.75	7.207
18.00	7.669	26.50	7.428	35.00	7.201
18.25	7.662	26.75	7.421	35.25	7.194
18.50	7.655	27.00	7.414	35.50	7.188
18.75	7.647	27.25	7.407	35.75	7.182
19.00	7.640	27.50	7.400	36.00	7.175
19.25	7.633	27.75	7.393	36.25	7.169
19.50	7.626	28.00	7.387	36.50	7.162
19.75	7.618	28.25	7.380	36.75	7.156
20.00	7.611	28.50	7.373	37.00	7.150
20.25	7.604	28.75	7.366	37.25	7.143
20.50	7.597	29.00	7.359	37.50	7.137
20.75	7.590	29.25	7.353	37.75	7.131
21.00	7.582	29.50	7.346	38.00	7.124
21.25	7.575	29.75	7.339	38.25	7.118
21.50	7.568	30.00	7.332	38.50	7.112
21.75	7.561	30.25	7.326	38.75	7.105
22.00	7.554	30.50	7.319	39.00	7.099
22.25	7.547	30.75	7.312	39.25	7.093
22.50	7.540	31.00	7.306	39.50	7.087
22.75	7.532	31.25	7.299	39.75	7.081
23.00	7.525	31.50	7.292	40.00	7.074
23.25	7.518	31.75	7.286		

C.2 不同温度下溶液 2 的 pH 值

见表 C.2。

表 C.2 不同温度下溶液 2 的 pH 值

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
15.00	7.758	23.50	7.508	32.00	7.277
15.25	7.750	23.75	7.501	32.25	7.271
15.50	7.743	24.00	7.494	32.50	7.264
15.75	7.735	24.25	7.487	32.75	7.258
16.00	7.728	24.50	7.480	32.00	7.251
16.25	7.720	24.75	7.473	33.25	7.245
16.50	7.713	25.00	7.466	33.50	7.238
16.75	7.705	25.25	7.459	33.75	7.232
17.00	7.698	25.50	7.452	34.00	7.225
17.25	7.690	25.75	7.445	34.25	7.219
17.50	7.683	26.00	7.438	34.50	7.213
17.75	7.675	26.25	7.432	34.75	7.206
18.00	7.668	26.50	7.425	35.00	7.200
18.25	7.660	26.75	7.418	35.25	7.194
18.50	7.653	27.00	7.411	35.50	7.187
18.75	7.646	27.25	7.404	35.75	7.181
19.00	7.638	27.50	7.397	36.00	7.175
19.25	7.631	27.75	7.390	36.25	7.168
19.50	7.624	28.00	7.384	36.50	7.162
19.75	7.616	28.25	7.377	36.75	7.156
20.00	7.609	28.50	7.370	37.00	7.150
20.25	7.602	28.75	7.363	37.25	7.143
20.50	7.594	29.00	7.357	37.50	7.137
20.75	7.587	29.25	7.350	37.75	7.131
21.00	7.580	29.50	7.343	38.00	7.125
21.25	7.573	29.75	7.337	38.25	7.119
21.50	7.565	30.00	7.330	38.50	7.113
21.75	7.558	30.25	7.323	38.75	7.107
22.00	7.551	30.50	7.317	39.00	7.101
22.25	7.544	30.75	7.310	39.25	7.094
22.50	7.537	31.00	7.303	39.50	7.088
22.75	7.530	31.25	7.297	39.75	7.082
23.00	7.523	31.50	7.290	40.00	7.076
23.25	7.515	31.75	7.284		

附录 D

(资料性附录)

ALT IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较

D.1 目前的 SOP 源自 IFCC 参考方法,该参考方法为 ALT 的催化活性浓度的测定提供了最佳条件。由 37 °C 取代 30 °C 作为测定温度,只需对某些测定参数进行微小的改变即可保留最适的测定条件。

D.2 附录中列出了修改并对其进行解释。另外,如果与 30 °C 参考方法比较时,为提高测定的高标准化而需要更准确的说明是必要的。参见表 D.1。

表 D.1 37 °C 和 30 °C 参考方法的比较

37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	解 释
测定样本		
校准物、质控品和人血清	人血清	参考方法主要用于校准物和质控品的测定
pH 值		
最适 pH7.15	最适 pH7.30	最适 pH 值随温度的变化与缓冲液中 pK 值的变化恰好一致。因此在 30 °C 和 37 °C 时可用相同的试剂溶液
pH 值调节的不确定度		
$\Delta\text{pH} \pm 0.05$	无特别要求	
温度调节的不确定度		
不确定度 $\leq 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ($k=2$)	偏差: 小于 $\pm 0.05 \text{ } ^\circ\text{C}$ 不精密度: 小于 $\pm 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$	带有温度调节和控制装置的高质量分光光度计可使温度测定的不确定度 ($k=2$) $\leq 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$
孵育时间		
300 s	至少 600 s	37 °C 300 s 的间隔时间足以保证 ALT 被磷酸吡哆醛饱和
测定时间		
180 s	至少 300 s	37 °C 下的最大信号可以缩短测定时间,而不增大测定的不精密度
乳酸脱氢酶催化浓度		
$28.3 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1\ 700 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)	$20 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1\ 200 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)	30 °C 和 37 °C 的乳酸脱氢酶用量相同。随反应温度的增高催化浓度增高
起始试剂		
2-酮戊二酸二钠盐溶液中不含三羟甲基氨基甲烷(Tris),所以提高了溶液 1 和溶液 2 中 Tris 浓度。事先不做 pH 调节	2-酮戊二酸(游离酸)水溶液中含有 Tris 溶液,要进行 pH 值调节	和 AST 叙述相同的组成。25 °C 时 2-酮戊二酸二钠盐溶液的 pH 值为 7.5,实际没有缓冲能力
试剂酶 LDH 的稀释		
牛血清白蛋白和氯化钠水溶液	甘油/水	已经观察到 LDH 在一些甘油-水混合物中的不稳定性

表 D.1 (续)

37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	解 释
样本空白率		
不考虑	减去	在常规方法中,常常不减去样本空白率,所以要使校准品和质控品适用于常规,它们的定值内包括了样本空白速率
试剂溶液体积		
100 mL Tris/盐酸 10.5 mL 反应溶液 10 mL 起始反应溶液	200 mL Tris/盐酸 105 mL 反应溶液 100 mL 起始反应溶液	没有必要配制大量试剂溶液,因为每次检测需要新鲜配制试剂溶液
用前起始试剂溶液的温度		
用前起始试剂溶液的温度应为 37 °C	未做规定	加入置于室温的起始溶液会降低整个反应体系的温度
数据采集		
读点次数 ≥ 6	连续监测摩尔消光系数的改变	新型的分光光度计一般使用数字式数据处理,读点数 ≥ 6 可以确保测定结果的精确度。连续监测的设备不再使用
斜率测定(时间对摩尔消光系数)		
最小平方差的回归分析方法	未做规定	良好的统计学方法可以确保斜率计算的重复性
参考范围		
女性 $\leq 0.57 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\leq 34 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 男性 $\leq 0.77 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\leq 45 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)	健康年轻人: $0.08 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.58 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	对男性和女性分别进行了研究

参 考 文 献

- [1] ISO 15193:2009 In vitro diagnostic medical devices-Measurement of quantities in samples of biological origin-Presentation of reference measurement procedures
- [2] JCTLM;IFCC reference measurement procedure(37 °C)for ALT. 2002
- [3] BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/IUPAP/OIML; Guide to the expression of uncertainty in measurement. GUM 1993
- [4] EURACHE/CITAC; Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. QUAM 2000
-