

前 言

本标准是在《中华医学会检验学会血脂测定推荐方法》的基础上参考美国胆固醇教育计划实验室标准化专题组的“提高胆固醇测定质量的建议”制定的。

本标准的附录 A 是标准的附录。

本标准的附录 B 和附录 C 是提示的附录。

本标准从 2000 年 5 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位：卫生部北京老年医学研究所。

本标准主要起草人：李健斋、陈文祥、李培英、王抒、董军。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

血清总胆固醇的酶法测定

WS/T 120—1999

Guidelines for enzymatic measurements of blood serum total cholesterol

1 范围

本标准规定了血清总胆固醇的酶法测定及其质量保证的基本原则。

本标准适用于临床实验室和流行病学及营养调查中的血清总胆固醇测定。生产厂商制备胆固醇测定试剂盒也应参照使用。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 一级参考物质 primary reference material

胆固醇纯度标准物质,用于参考方法(见 2.2)的校准。

2.2 参考方法 reference method

经充分论证具有高度精密性和准确性的方法,用于二级参考物质(见 2.3)和校准物质(见 2.5)的定值及常规方法的评价。

2.3 二级参考物质 secondary reference material

用一级参考物质和参考方法定值的、与样品基质相同或足够相似的参考物质,用于参考方法和常规测定方法之间的准确性转移,亦可用作校准物质(见 2.5)。

2.4 参考系统 reference system

由一级参考物质、参考方法和二级参考物质组成的系统,是常规测定的准确性基础。

2.5 校准物质 calibration material, calibrator

在常规测定中作校准用的物质。

2.6 质控物质 quality control material

具有一定胆固醇浓度的冰冻或冻干血清,样品测定时穿插在样品序列中顺次测定,用以控制测定质量。

2.7 基质效应 matrix effect

样品基质的物理与化学变化对胆固醇的准确测定的影响。

3 方法原理

以胆固醇酯酶水解血清胆固醇酯为胆固醇,以胆固醇氧化酶氧化胆固醇生成 4-烯胆甾烷酮和过氧化氢,检测胆固醇氧化产物以测定胆固醇含量。应用最广的检测反应是特林德尔(Trinder)的过氧化氢显色反应,在过氧化物酶的作用下,过氧化氢与酚类化合物及 4-氨基安替比林或其类似物发生氧化、缩合反应,产生最大吸收波长为 470~550 nm 的醌亚胺类化合物。在一定浓度范围内,醌亚胺类化合物的浓度与吸光度符合比尔定律,且与总胆固醇浓度成正比。上述各种酶和显色剂一般组成单一试剂,与血

中华人民共和国卫生部 1999-12-09 批准

2000-05-01 实施

清混合并反应后进行光度分析。

4 试剂和材料

4.1 酶试剂

4.1.1 酶试剂的制备和对酶试剂的质量要求

制备酶试剂应严格选择原料和配方,使成品试剂满足以下质量要求(酶试剂制备举例见附录 B):

- a) 能水解 99% 以上的血清胆固醇酯;
- b) 对冻干或冰冻混合血清的作用与对新鲜血清的作用相似,无明显基质效应;
- c) 特异性高,干扰因素少;
- d) 在 37℃ 下,与血清反应达终点所需时间小于 5 min,终点时吸光度能稳定至少 60 min;
- e) 在血清胆固醇浓度 0 mmol/L~12.9 mmol/L(0 mg/dL~500 mg/dL)范围内,吸光度与浓度呈通过原点的直线关系;
- f) 试剂溶液在测定波长下的吸光度小于 0.05;
- g) 原装试剂能在 2~8℃ 下保持稳定 1 年,干粉酶试剂配制后能在 25℃ 下保持稳定 24 h,2~8℃ 保持稳定 1 周;
- h) 试剂反应活性的批间差小于 1%。

4.1.2 酶试剂使用前准备

干粉酶试剂用指定溶剂溶解后使用,若需贮存应在 2~8℃ 密闭保存。

4.2 校准物质

4.2.1 校准物质的制备和对校准物质的质量要求

制备校准物质应严格选择原料、工艺和定值方法,使校准物质满足如下要求(校准物质制备举例见附录 B):

a) 在所选用的试剂条件下能使新鲜样品测定结果可溯源到胆固醇参考系统(见附录 A),有以下两种情况:

1) 校准物质在所选用的试剂条件下无基质效应,其定值可来源于参考方法,校准物质本身的可溯源性使样品分析结果具有可溯源性,应首选此类常规校准物质;

2) 校准物质在所选用的试剂条件下有基质效应,其定值应根据基质效应的大小进行校正,使样品分析结果具有可溯源性,此类校准物质不可在其他试剂条件下使用;

注:一般冰冻新鲜混合人血清基质效应最小。冻干血清基质效应的大小依原料血清和冻干工艺而定。非血清物质的使用、动物血清的使用、血清中加入脂蛋白成分、原料血清陈旧、冻干和冰冻是造成基质效应的因素。

b) 胆固醇浓度在我国人血清胆固醇水平高低划分界限(见附录 C)附近;

c) 融化或复溶后的常规校准物质均匀、无明显混浊。

4.2.2 校准物质的贮存和使用前准备

4.2.2.1 冰冻校准物质的贮存和准备

贮存于 -20℃ 以下,用时使融化并使其温度升至室温,充分混匀。融化后的校准物质可于 2~8℃ 贮存 3 天,不可反复冻融。

4.2.2.2 冻干校准物质的贮存和准备

贮存于 8℃ 以下,用时精确加入规定量的蒸馏水使溶解,充分混匀。复溶后的校准物质可于 2~8℃ 贮存 3 天,不可反复冻融。

4.3 质控物质

4.3.1 质控物质的制备和对质控物质的质量和技术要求

至少应制备两个不同胆固醇浓度的质控物质。制备质控物质应认真选择原料和工艺,使质控物质满足如下要求(质控物质制备举例见附录 B):

- a) 具有与样品相同或相似的物理、化学性质；
- b) 融化或复溶后的质控物质均匀、无明显混浊；
- c) 胆固醇浓度在我国人血清胆固醇水平高低划分界限(见附录 C)附近,两个质控物质的胆固醇浓度相差约 1.29 mmol/L(50 mg/dL)。

4.3.2 质控物质的贮存和使用前准备

4.3.2.1 冰冻质控物质的贮存和准备

贮存于 -20°C 以下,用时使融化并使其温度升至室温,充分混匀。融化后的质控物质可于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 贮存 3 天,不可反复冻融。

4.3.2.2 冻干质控物质的贮存和准备

贮存于 8°C 以下,用时精确加入规定量的蒸馏水使溶解,充分混匀。复溶后的质控物质可于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 贮存 3 天,不可反复冻融。

5 仪器和设备

可选用自动生化分析仪,亦可选用光度计配合移液和恒温设备。所选用的仪器设备应满足以下要求:

- a) 光度分析系统在 $0.1\sim 0.8(500\text{ nm})$ 吸光度范围内的测定不精密度(CV)小于 1%；
- b) 移液系统的移液不精密度(CV)小于 1%；
- c) 恒温系统在 $25\sim 37^{\circ}\text{C}$ 范围内温度变异小于 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

6 样品

6.1 血液样品的采取

6.1.1 受试者准备

让受试者做如下准备:

- a) 取血前两周保持平时饮食习惯；
- b) 近期内无急性病、外伤、手术等异常情况；
- c) 取血前数天至数周停用影响血脂的药物,否则记录用药情况；
- d) 取血前 24 h 不饮酒、不做剧烈运动；
- e) 若样品同时用于其他血脂测定,取血前禁食 12 h；
- f) 除卧床患者外,取血前至少静坐 5 min。

6.1.2 取血方法

取前臂静脉血,止血带的使用不超过 1 min,避免溶血。

6.1.3 取血次数

应以 1 周以上 2 月以内的时间间隔对同一受试者取血 2~3 次。

6.2 血液样品的处理、贮存和测定前准备

6.2.1 血清的制备和分离

血液样品采取后室温下静置 30~45 min 使凝固,避免溶血,离心后即时吸出血清,置试管中密闭。

6.2.2 血清的贮存和测定前准备

分出的血清可于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 贮存 1 周。若需更长时间的贮存,则应贮存于 -20°C 以下,用时使融化并使其温度升至室温,充分混匀。不可反复冻融。

注:亦可制备血浆用于胆固醇测定,用乙二胺四乙酸二钠作抗凝剂,血液中抗凝剂浓度为 1 g/L 时血浆胆固醇浓度比血清低约 3%。

7 测定步骤

7.1 安全措施

血清样品和来源于血液的参考物质、质控物质、校准物质有可能含致病微生物,须避免吞入或与皮肤接触。

7.2 测定前准备

取酶试剂(见 4.1.2)、校准物质(见 4.2.2)、质控物质(见 4.3.2)和样品(见 6.2.2),若曾于 2~8℃ 贮存,使其温度升至室温后混匀。

准备或开启仪器设备。

7.3 测定操作

按试剂说明书(市售试剂)规定的样品-试剂比例、反应温度和时间及光度测定条件,自动或手工进行样品-试剂混合、温育和吸光度测定。应注意以下事项:

- 尽量选择能提高测定特异性的空白试验方式和测定方式;
- 校准物质的重复测定数至少为 2;
- 保留用过的酶试剂、校准物质、质控物质和样品至测定质量评价(见 8.2)以后。

8 测定结果的表述和测定结果的有效性判断

8.1 血清胆固醇浓度计算

按式(1)计算样品和质控物质的胆固醇浓度。

$$c_{\text{样品}} = [(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{校准}} - A_{\text{空白}})] \cdot c_{\text{校准}} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: $c_{\text{样品}}$ —— 样品或质控物质的胆固醇浓度, mmol/L;

$c_{\text{校准}}$ —— 校准物质的胆固醇浓度, mmol/L;

$A_{\text{样品}}$ —— 样品或质控物质的吸光度;

$A_{\text{校准}}$ —— 校准物质的吸光度;

$A_{\text{空白}}$ —— 空白的吸光度。

所得结果应表示至 2 位小数。

8.2 测定结果的有效性判断

质控值应在质控限(见 10.3.1)以内,否则应分析原因后重新测定。

9 方法的灵敏度、精密度和特异性

9.1 灵敏度

本方法在胆固醇浓度为 5 mmol/L 时的吸光度不低于 0.35。

9.2 精密度

本方法批内变异系数小于 1%,批间变异系数小于 2.5%。

9.3 特异性

血清中的乳糜颗粒、胆红素、抗坏血酸等还原性物质、血红蛋白等有色物质及非胆固醇甾醇为本方法的干扰物质。生理水平的上述物质对本方法的干扰不明显。某些试剂的配方设计和测定方式可不同程度地减小上述物质的干扰。

10 测定质量保证

选用的分析系统(试剂、校准物质和仪器)应在评价并保证其精密度和准确度之后用于病人样品分析;应用中的分析系统应监测和保持其精密度和准确度。

10.1 精密度评价及其指标

10.1.1 评价方法

以选用的分析系统测定拟用作质控物质(见 4.3)的血清 20~30 次,计算测定结果的变异系数。

10.1.2 评价指标

测定结果的变异系数应小于 3%。

10.2 准确度评价及其指标

10.2.1 评价方法

10.2.1.1 应用二级参考物质

适用于对冰冻或冻干血清无明显基质效应的分析系统。

以选用的分析系统测定胆固醇浓度在 2.59 mmol/L~7.76 mmol/L(100 mg/dL~300 mg/dL)范围内、浓度相差约 1.29 mmol/L(50 mg/dL)的三种二级参考物质(见附录 A1.3)三次,每次每种血清的重复测定数为 2,计算测定平均值与参考物质定值之间的相对偏差。

10.2.1.2 应用参考方法

适用于对冰冻或冻干血清有明显基质效应的分析系统。

收集六种胆固醇浓度在 2.59 mmol/L~7.76 mmol/L(100 mg/dL~300 mg/dL)之间的新鲜血清,分别以选用的分析系统和参考方法(附录 A1.2)测定其胆固醇浓度三次,每次每种血清的重复测定数为 2,计算选用的分析系统的测定结果与参考方法测定结果之间的相对偏差。

10.2.2 评价指标

测定结果的相对不准确度(相对偏差)小于 $\pm 3\%$ 。

10.3 测定质量的监测和保持

10.3.1 质控限的建立和应用

在精密度和准确度评价结果符合要求后利用本标准中 10.1.1 中获得的数据按一定的质控方法建立质控限,用以判断样品测定结果的有效性(见 8.2)和监测测定质量的长期保持情况。

10.3.2 精密度和准确度的再评价

在质控值保持正常的情况下应每年至少进行一次准确度评价。

在以下情况下应进行精密度或准确度评价:

- a) 改变试剂、校准物质或仪器设备的种类;
- b) 质控值持续出现超出质控限的随机误差或系统误差。

10.4 参加室间质评

从事血清胆固醇测定的实验室都应参加国家或地方室间质评计划。

附录 A
(标准的附录)
胆固醇参考系统

A1 参考系统的组成

A1.1 一级参考物质

胆固醇纯度标准物质 GBW 09203a [纯度: (99.8 ± 0.1)%] 或 GBW 09203b [纯度: (99.7 ± 0.1)%]。

A1.2 二级参考物质

血清胆固醇标准物质 GBW 09138 及其他由原始参考物质和参考方法定值的冰冻混合人血清。

A2 参考系统的应用

胆固醇参考系统主要应用于以下方面:

- a) 分析系统的质量评价;
- b) 酶试剂的制备及质量评价;
- c) 校准物质的制备及质量评价;
- d) 新常规方法的发展及评价;
- e) 室间质评计划中的靶值确定;
- f) 协作研究中血脂分析的质量保证。

A3 参考系统的应用方式

应用二级参考物质(见 10.2.1.1)或应用参考方法(见 10.2.1.2)。

附录 B
(提示的附录)

胆固醇测定酶试剂、校准物质和质控物质制备举例

B1 胆固醇测定酶试剂制备举例

B1.1 原料试剂及其纯度

B1.1.1 胆固醇酯酶(EC 3.1.1.13): 来源于微生物(如假单胞菌属, 念珠菌属), 葡萄糖氧化酶与尿酸酶含量小于 0.01%, 不含过氧化氢酶, 比活性约 100 kU/g 酶蛋白(25℃, 胆固醇油酸酯为底物)。

B1.1.2 胆固醇氧化酶(EC 1.1.1.6): 来源于微生物(如诺卡氏菌, 球孢链霉菌), 葡萄糖氧化酶与尿酸酶含量小于 0.01%, 不含过氧化氢酶, 比活性约 45 kU/g 酶蛋白(37℃, 胆固醇为底物)。

B1.1.3 过氧化物酶(EC 1.11.1.9): 来源于辣根, 纯度值(Reinheitszahl 比值, $A_{403\text{ nm}}/A_{275\text{ nm}}$)约为 3.0, 比活性 1 000 kU/g 酶蛋白[25℃, 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)为底物]。

B1.1.4 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100): 不含过氧化物。

B1.1.5 磷酸盐、胆酸钠、4-氨基安替比林及苯酚均为分析纯试剂。

B1.2 酶试剂配方和应用条件

B1.2.1 试剂配方见表 B1。

表 B1 血清胆固醇测定酶试剂配方

组分	浓度
胆固醇酯酶	≥800 U/L
胆固醇氧化酶	≥400 U/L
过氧化物酶	≥1 000 U/L
4-氨基安替比林	0.5 mmol/L
苯酚	3.5 mmol/L
胆酸钠	4 mmol/L
聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)	3 g/L
磷酸盐缓冲体系, pH 7.7	0.3 mol/L

剂型可以是液体或冻干品,亦可将酶和显色剂分装或制成单一粉剂,用时用含其他组分的磷酸盐缓冲液溶解。

B1.2.2 上述试剂的应用条件如下:

- a) 血清-试剂比例:1:100;
- b) 温育温度和时间:37℃,10 min;
- c) 光度分析波长:500 nm。

B2 校准物质制备举例

B2.1 原料血清收集和贮存

收集胆固醇浓度为 3.9 mmol/L~6.5 mmol/L(150 mg/dL~250 mg/dL)、澄清且无溶血和黄疸(700 nm 吸光度小于 0.4)、人类免疫缺陷病毒抗体和乙型肝炎表面抗原阴性的新鲜人血清,密封贮存于-20℃以下。

B2.2 制备

将收集的血清融化、混合,经粗滤后用 0.22 μm 孔径的滤器过滤,混匀后分装于适当的密封容器内,尽快于-20℃以下冰冻和贮存。在过滤和分装过程中避免微生物污染。

B2.3 均匀性检验和定值

用参考方法(A1.2)测定分装后的校准物质 12 次,每次测定随机抽取两个包装,每个包装的重复测定数为 2。若所得 48 个结果的变异系数小于 1%,取其平均值作校准物质的定值。

B3 质控物质制备举例

原料血清收集和贮存及制备过程同校准物质(B2.1, B2.2)。分装后的质控物质用所选用的分析系统检验其均匀性。

附录 C

(提示的附录)

我国人血清胆固醇水平高低划分方案

我国人血清胆固醇水平高低划分方案(根据中华医学会心血管病专家组制定的“血脂异常防治对策”,1997)见表 C1。

表 C1 我国人血清胆固醇水平高低划分方案

合适水平	≤ 5.17 mmol/L (200 mg/dL)
边缘性升高	5.20 mmol/L~5.66 mmol/L (201 mg/dL~219 mg/dL)
升高	≥ 5.69 mmol/L (220 mg/dL)

注：不同地区不同人群的血清胆固醇参考值因环境与遗传因素而异，不能笼统地指定所谓“正常值及正常范围”。胆固醇水平高低的划分方案根据冠心病流行病学研究资料及临床经验制定。