

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 349—2011

α -淀粉酶催化活性浓度测定参考方法

Reference procedure for the measurement of
catalytic activity concentration of α -amylase

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	15
4.11 参考区间	15
4.12 报告	15
4.13 质量保证	15
附录 A (规范性附录) 不同温度下溶液的 pH 值	17
附录 B (规范性附录) 测定 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度	20
附录 C (规范性附录) EPS 中 G7-4-NP 质量比的控制	24
附录 D (资料性附录) 试剂原料详细信息	25
附录 E (资料性附录) α -淀粉酶 IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较	28
参考文献	31

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准修改采用由国际检验医学溯源联合委员会(JCTLM)批准的《IFCC 37 °C 酶催化活性浓度测定原级参考方法 第 8 部分:α-淀粉酶催化浓度测定参考方法》,将原参考方法试剂中磷酸吡哆醛去掉,重新建立依据本标准的参考区间,并参考 ISO 15193:2009《体外诊断器具 生物源样品中量的测定 参考测定程序的表述》适当增加内容。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录,附录 D、附录 E 为资料性附录。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准起草单位:上海市临床检验中心。

本标准主要起草人:居漪、胡晓波、张锦锋。

α-淀粉酶催化活性浓度测定参考方法

1 范围

本标准规定了在临床医学应用中,测定 α-淀粉酶(AMY)催化活性浓度的参考方法。

本标准主要适用于参考实验室,作为 α-淀粉酶催化活性浓度测定的溯源,也可作为与酶催化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:如果不需预处理,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

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,适用于评定由同类量的其他测定方法获得的被测定量值的测定正确度。

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。

AMY: α -淀粉酶(α -amylase)

EPS:4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)- α -(1->4)-D-麦芽七糖(4,6-ethylidene(G1)-4-nitrophenyl(G7)- α -(1->4)-D-maltoheptaoside)

G: α -(1- \rightarrow 4)-D-吡喃葡萄糖苷(α -(1- \rightarrow 4)-D-glucopyranosyl)

4-NP: 4-硝基苯酚(4-nitrophenoxide)

G7-4-NP: 4-硝基苯- α -(1- \rightarrow 4)-D-麦芽七糖(4-nitrophenyl- α -(1- \rightarrow 4)-D-maltoheptaoside)

IRMM: 参考物质与参考测定研究院(institute for reference materials and measurement)

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



本标准采用 4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)- α -(1- \rightarrow 4)-D-麦芽七糖(EPS)作为 α -淀粉酶测定底物,在 α -淀粉酶催化下,水解为 4-硝基苯糖苷,再经 α -葡萄糖苷酶催化,水解为 4-硝基苯酚(4-NP)和葡萄糖。4-硝基苯酚的生成量与 α -淀粉酶催化活性浓度成正比,在 37 °C, 405 nm 波长下测定 4-硝基苯酚摩尔消光系数,计算 α -淀粉酶催化活性浓度。

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	N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙基磺酸	HEPES
	4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)- α -(1- \rightarrow 4)-D-麦芽七糖	EPS
	α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)	无
	氯化钠	无
	氯化钙, 二水合物	无
	氢氧化钠	无
	牛血清白蛋白, Fraction V	牛白蛋白
	氯化钠溶液(0.154 mol · L ⁻¹)	无
溶剂	质量与双蒸水类似的高纯度水 (电导率 < 2 μ S · cm ⁻¹ , pH 6~7, 硅酸盐 < 0.1 mg · L ⁻¹)	无
参考物质	JCTLM(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 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	

α -淀粉酶测定所用每个试剂原料详细信息见附录 D。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浓度,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。以下两种试剂需要注意安全:

- a) 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。

- b) 氯化钙,二水合物:属中等毒性类。对鼻、口、喉和皮肤有刺激作用。侵入途径:粉尘吸入,食入。健康危害:粉尘会灼烧、刺激鼻腔、口、喉,还可引起鼻出血和破坏鼻组织;干粉会刺激皮肤,溶液会严重刺激甚至灼伤皮肤。禁忌物:三氟化溴、碳酸与石灰的混合物。防护措施:戴防护镜或面具;穿戴全身工作服及橡胶手套。急救措施:眼睛接触:用大量清水冲洗至少15 min,就医;皮肤接触:用清水冲洗5 min,必要时就医;吸入:将患者移至新鲜空气处,若感不适,就医;食入:若患者清醒,可给饮水或牛奶,立即就医;其他:消防选用适合周围火源的灭火剂。储藏和运输:存于密闭容器中,置于阴凉、干燥处,远离禁忌物;运输无特殊要求。安全和处理:使用本品要加强通风。发生泄漏时,需穿防护用具进入现场;用最安全、简便的方法收集泄漏粉末至密封容器内。

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 $\leq 1.5\%$ 。称量时显示的值与靶值的差异不应超过 $\pm 0.5\%$ 。

4.3.2.2 溶液 1

称量6.14 g 氯化钙(二水合物),将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约80 mL水中;
- 转移至100 mL容量瓶中;
- 将容量瓶和水平衡至20℃;
- 加水(20℃)至容量瓶的刻度线。

最终配制的溶液中氯化钙浓度为 $417.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液20℃稳定性为3个月。

4.3.2.3 溶液 2

称量3.10 g *N*-2-羟基乙基哌嗪-*N'*-乙基磺酸、1.26 g 氯化钠,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约200 mL水中;
- 加入0.75 mL 溶液 1;
- 用 $0.2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH溶液调节pH至7.00(37℃);
- 转移至250 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*N*-2-羟基乙基哌嗪-*N'*-乙基磺酸浓度为 $52.10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化钠浓度为 $86.13 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液2℃~8℃稳定性为5周。

4.3.2.4 酶试剂稀释液

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 °C；
- 加水(20 °C)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 °C~8 °C 稳定性至少 1 个月。

4.3.2.5 溶液 3

按以下步骤配制：

- 用 4.3.2.4 中的酶试剂稀释液稀释 α-葡萄糖苷酶储存液，使 α-葡萄糖苷酶催化活性浓度在 37 °C 时为 16.9 mkat · L⁻¹(1 014 kU · L⁻¹)，按公式(1)计算稀释 α-葡萄糖苷酶储存液所需酶试剂稀释液体积：

$$V_{\text{dilution}} = \frac{V_{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}_{\text{stock}}} \times (c_{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}_{\text{stock}}} - 1\ 014)}{1\ 014} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- V_{dilution} ——稀释 α-葡萄糖苷酶储存液所需酶试剂稀释液体积，单位为毫升(mL)；
- $V_{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}_{\text{stock}}}$ ——α-葡萄糖苷酶储存液体积，单位为毫升(mL)；
- $c_{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}_{\text{stock}}}$ ——α-葡萄糖苷酶储存液中 α-葡萄糖苷酶催化活性浓度，单位为毫凯塔耳每升(mkat · L⁻¹)或千单位每升(kU · L⁻¹)。

示例：见附录 B。

- 将上述酶溶液以 0.25 mL 分装，置于 -25 °C 冰冻保存。该溶液 -25 °C 稳定至少 6 个月。

4.3.2.6 反应溶液

分别移取 25 mL 溶液 2、0.25 mL 溶液 3，充分混匀。该溶液 2 °C~8 °C 稳定性为 2 周。

4.3.2.7 起始试剂溶液

称量 1.01 g 4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)-α-(1->4)-D-麦芽七糖、0.310 g N-2-羟基乙基哌嗪-N'-乙基磺酸，将上述物质按以下步骤处理：

- 溶在约 20 mL 水中；
- 用 0.2 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.00(37 °C)；
- 转移至 25 mL 容量瓶；
- 将容量瓶和水平衡至 20 °C；
- 加水(20 °C)至刻度线。

最终配制的溶液中 4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)-α-(1->4)-D-麦芽七糖浓度为 31.00 mmol · L⁻¹、N-2-羟基乙基哌嗪-N'-乙基磺酸浓度为 52.10 mmol · L⁻¹。该溶液 2 °C~8 °C 稳定性为 2 周。

4.3.3 温度对缓冲溶液 pH 的影响

4.3.3.1 pH 计的校准

指示剂摩尔消光系数明显依赖于 pH 值。因此，应准确地校准 pH 计和调整溶液 2 和起始试剂的 pH 值。使用至少两种标准缓冲液进行校准，标准缓冲液的定值应包括 pH6 至 pH8 的范围和试剂溶液需调整的 pH 值。pH 标准缓冲液的不确定度应 ≤ 0.01 pH。

注 1：推荐使用磷酸二氢钾(无水)和磷酸氢二钠(无水)制备 pH 标准缓冲液。商品化的可溯源至国家或国际标准的有证标准缓冲液已有出售。

注 2：指示剂摩尔消光系数明显依赖于(4-硝基苯)pH 值，pH 值降低 0.01 会引起约 1% 动力学的改变，因此，pH 值必需调得很准确。

4.3.3.2 pH 值的调节

当温度偏离 37 ℃ 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 A 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 2、起始试剂溶液时,需根据不同温度调整 pH 值。参阅附录 A 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	405±1(k=2)
	带宽/nm	≤2
	光径/mm	10.00±0.01(k=2)
pH 计	pH 值	7.00±0.03(k=2)
点式温度计	温度/℃	37.0±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样本,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 α-淀粉酶收检样本要求

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	<input type="checkbox"/> 冻干粉 <input type="checkbox"/> 液体 <input type="checkbox"/> 冰冻 <input type="checkbox"/> 其他
基质类型说明	<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 ℃ <input type="checkbox"/> -20 ℃ <input type="checkbox"/> -70 ℃ <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"/> 氧化钬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有效期内 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)

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

α -淀粉酶参考方法测定样本主要有:

- 参考物质(RM);
- 质控品;
- 室间比对样本;
- 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

α -淀粉酶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 $<0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)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 α -淀粉酶催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	$37.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}^a$
波长	$405 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}^a$
带宽	$\leq 2 \text{ nm}$
光径	$10.00 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}^a$
孵育时间	60 s
延迟时间	180 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 0.6 mL)起始试剂溶液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下平衡,剩余的起始试剂应保存在 $2 \text{ }^\circ\text{C} \sim$

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(α-淀粉酶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
0.080 mL	样本 充分混合并孵育 60 s。在孵育结束时,反应杯中的溶液温度应达到 37 °C
0.400 mL	起始试剂溶液 充分混合,等候 180 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 $\leq 1\%$ 。

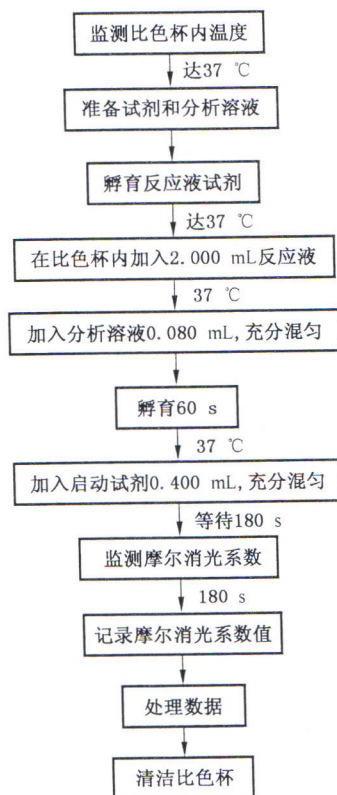


图 1 α-淀粉酶参考方法测定流程图

4.7.3 最终完全反应混合物的浓度

见表 15。

表 15 α -淀粉酶催化活性浓度测定最终完全反应混合物的浓度

参 数	指 标
<i>N</i> -2-羟基乙基哌嗪- <i>N'</i> -乙基磺酸	50 mmol · L ⁻¹
pH(37 °C)	7.00±0.03
4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)- α -(1->4)-D-麦芽七糖	5 mmol · L ⁻¹
氯化钠	70 mmol · L ⁻¹
氯化钙	1 mmol · L ⁻¹
α -葡萄糖苷酶(37 °C)	135 μ kat · L ⁻¹ (8 100 U · L ⁻¹) ^a
样本体积比	0.032 3(1 : 31)
注：如果以 9 g · L ⁻¹ (154 mmol · L ⁻¹)氯化钠作为样本，则可测出最终反应混合液中 α -葡萄糖苷酶活性浓度。 (没有被样本基质所抑制)；除表 15 所列物质，最终反应混合液含有 0.1 g · L ⁻¹ 白蛋白，是溶液 3 原先的成分。在反应溶液和最终反应混合液中存在的白蛋白稳定了 α -葡萄糖苷酶。	
^a 未抑制的活性浓度。	

4.7.4 试剂空白率测定

采用 9 g · L⁻¹(154 mmol · L⁻¹)氯化钠溶液代替样本作为试剂空白。按上述步骤进行操作。起始摩尔消光系数不能超过 0.35，试剂空白摩尔消光系数变化应小于 $3.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (0.002 min⁻¹)。否则，应该确认和排除唾液淀粉酶污染的来源或重新评价试剂纯度。

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 4.7.2。

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 α -淀粉酶催化活性浓度时不予考虑。如果样本空白率超过总 α -淀粉酶的 1%时，应发出警告该物质不适宜作校准用。

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。

注 3：去除起始试剂意味着去除了构成指示剂的底物。因此，不能反映样本基质效应对指示剂的干扰。

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、测定室间比对样本等)，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 α -淀粉酶催化活性浓度：

$$b_{\alpha\text{-淀粉酶}} = F \times (\Delta A / \Delta t)_{\alpha\text{-淀粉酶}} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

$b_{\alpha\text{-淀粉酶}}$ —— α -淀粉酶催化活性浓度，单位为微凯塔尔每升(μ kat · L⁻¹)或单位每升(U · L⁻¹)；

F ——系数,等于 3.063(在 405 nm 波长测定时, $\epsilon_{405}(4\text{-NP})=1.012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$);

$(\Delta A/\Delta t)_{\alpha\text{-淀粉酶}}$ ——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 $\text{n kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 单位表示的催化活性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 α -淀粉酶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 $3.33 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($200 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 时宜小于 1.0%。

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 $3.33 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($200 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 样本的重复性精密度宜小于 0.5%,实验室内复现性精密度宜小于 1.0%。

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 $0.04 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.5 线性范围

线性范围 $< 21.02 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1261.1 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.6 误差的来源

反应液中 α -葡萄糖苷酶的催化活性浓度能被所测样本中的一些特殊基质抑制(见附录 C),因此,确定每个待测样本中 α -葡萄糖苷酶活性基质抑制物是必需的(见附录 C)。钙结合剂会抑制基本组分的有效浓度,使测定值降低。唾液淀粉酶的污染(如用手接触溶液或盛溶液容器的内部)会使 α -淀粉酶活性假性增加或者使试剂空白率增加。

4.10 通过实验室间比对进行确认

α -淀粉酶催化活性浓度参考方法由检验医学国际权威学术组织 IFCC 提出,经多个参考实验室认真评估后经 JCTLM 批准。早在 20 世纪 70 年代,IFCC 经过实验和讨论,公布了 30 °C 测定本酶的参考方法,并应用于临床,鉴于临床生化分析仪广泛应用 37 °C,IFCC 在 2002 年颁布了取代 30 °C 的 37 °C 的 α -淀粉酶原级参考方法。2002 年得到 JCTLM 批准成为正式国际参考方法。

JCTLM 在 2003 年的国际参考实验室能力比对计划[RELA]中将本酶列为比对项目之一。从历年比对结果看,大多数参加实验室测定结果都在均值 $\pm 5.25\%$ 内,可确认此参考方法适合预期临床使用。经过广泛确认可达到临床医学特定应用的需要。

中国从 2006 年开始有 6 个实验室参加此酶的 RELA 比对计划,2009 年增至 14 个实验室。测定结果和国际一致。证实此参考方法可用于我国临床常规方法测定结果的溯源。

4.11 参考区间

两个不同的参考实验室通过测定两个参考人群(146 个男性与 89 个女性)的血清样本中的 α -淀粉酶得到了初步的参考区间。参考人群的血清样本来自于进行一年一次健康体检的员工(第一群)与献血志愿者(第二群),而参考人群血清样本中如果有下列项目(CK, GLU, ALT, AST, GGT(和/或 ALP), Lipase(仅限于第二人群))中的至少一项超出了参考区间的上限,则此血清样本弃去不用。在两个参考人群或男性与女性之间参考区间未见显著差异(t 检验, $p < 0.05$)。

IFCC 调查了男性与女性(≥ 17 岁)的初步参考区间:

下限(第 2.5 百分位的 90%可信区间为): $0.52 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.42 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.60 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)
 $31 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($25 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 36 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)

上限(第 97.5 百分位的 90%可信区间为): $1.78 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1.71 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 2.00 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)
 $107 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($103 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 120 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)

注 1: 上下限分别为参考人群的 97.5 与 2.5 百分位,括号内的范围为 97.5 百分位与 2.5 百分位的 90%可信区间。

注 2: 中国 α -淀粉酶催化活性浓度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 °C 下测定 AMY 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: α -淀粉酶;
 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 $k=2$ 时;
- 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

定期参加 IFCC 和国内参考实验室能力比对,结果应符合要求。当出现不符合情况时,应认真查找原因,建立失控及失控跟踪记录。

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)
不同温度下溶液的 pH 值

A.1 不同温度下溶液 2 的 pH 值

见表 A.1。

表 A.1 不同温度下溶液 2 的 pH 值

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
15.00	7.254	21.25	7.180	27.75	7.105
15.25	7.251	21.50	7.177	28.00	7.102
15.50	7.248	21.75	7.174	28.25	7.099
15.75	7.245	22.00	7.171	28.50	7.096
16.00	7.242	22.25	7.168	28.75	7.093
16.25	7.239	22.50	7.165	29.00	7.090
16.50	7.236	22.75	7.162	29.25	7.087
16.75	7.233	23.00	7.159	29.50	7.085
17.00	7.230	23.50	7.154	29.75	7.082
17.25	7.227	23.75	7.151	30.00	7.079
17.50	7.224	24.00	7.148	30.25	7.076
17.75	7.221	24.25	7.145	30.50	7.073
18.00	7.218	24.50	7.142	30.75	7.070
18.25	7.215	24.75	7.139	31.00	7.068
18.50	7.212	25.00	7.136	31.25	7.065
18.75	7.209	25.25	7.133	31.50	7.062
19.00	7.206	25.50	7.130	32.00	7.056
19.25	7.203	25.75	7.128	32.25	7.053
19.50	7.200	26.00	7.125	32.50	7.051
19.75	7.197	26.25	7.122	32.75	7.048
20.00	7.194	26.50	7.119	33.00	7.045
20.25	7.192	26.75	7.116	33.25	7.042
20.50	7.189	27.00	7.113	33.50	7.039
20.75	7.186	27.25	7.110	33.75	7.036
21.00	7.183	27.50	7.107	34.00	7.034

表 A.1 (续)

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
34.25	7.031	36.25	7.008	38.25	6.986
34.50	7.028	36.50	7.006	38.50	6.983
34.75	7.025	36.75	7.003	38.75	6.981
35.00	7.022	37.00	7.000	39.00	6.978
35.25	7.020	37.25	6.997	39.25	6.975
35.50	7.017	37.50	6.994	39.50	6.972
35.75	7.014	37.75	6.992	39.75	6.969
36.00	7.011	38.00	6.989	40.00	6.967

A.2 不同温度下起始试剂溶液的 pH 值

见表 A.2。

表 A.2 不同温度下起始试剂溶液的 pH 值

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
15.00	7.270	19.25	7.218	23.75	7.162
15.25	7.267	19.50	7.215	24.00	7.158
15.50	7.264	19.75	7.212	24.25	7.155
15.75	7.261	20.00	7.209	24.50	7.152
16.00	7.258	20.25	7.206	24.75	7.149
16.25	7.255	20.50	7.203	25.00	7.146
16.50	7.252	20.75	7.199	25.25	7.143
16.75	7.249	21.00	7.196	25.50	7.139
17.00	7.246	21.25	7.193	25.75	7.136
17.25	7.243	21.50	7.190	26.00	7.133
17.50	7.240	21.75	7.187	26.25	7.130
17.75	7.237	22.00	7.184	26.50	7.127
18.00	7.234	22.25	7.181	26.75	7.124
18.25	7.231	22.50	7.177	27.00	7.120
18.50	7.227	22.75	7.174	27.25	7.117
18.75	7.224	23.00	7.171	27.50	7.114
19.00	7.221	23.50	7.165	27.75	7.111

表 A.2 (续)

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
28.00	7.108	32.25	7.055	36.25	7.008
28.25	7.105	32.50	7.052	36.50	7.006
28.50	7.102	32.75	7.049	36.75	7.003
28.75	7.099	33.00	7.046	37.00	7.000
29.00	7.095	33.25	7.043	37.25	6.997
29.25	7.092	33.50	7.040	37.50	6.994
29.50	7.089	33.75	7.037	37.75	6.992
29.75	7.086	34.00	7.034	38.00	6.989
30.00	7.083	34.25	7.032	38.25	6.986
30.25	7.080	34.50	7.029	38.50	6.984
30.50	7.077	34.75	7.026	38.75	6.981
30.75	7.074	35.00	7.023	39.00	6.978
31.00	7.071	35.25	7.020	39.25	6.976
31.25	7.068	35.50	7.017	39.50	6.973
31.50	7.064	35.75	7.014	39.75	6.970
32.00	7.058	36.00	7.011	40.00	6.968

附录 B

(规范性附录)

测定 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度

B.1 测定试剂

B.1.1 辅助试剂

4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷($C_{12}H_{15}NO_8$), $M_r = 301.26$

B.1.2 试剂制备

B.1.2.1 溶液 A

称量 1.24 g *N*-2-羟基乙基哌嗪-*N'*-乙基磺酸、0.419 g 氯化钠,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约 80 mL 水中;
- 加入 0.25 mL 用于 α -淀粉酶测定的溶液 1(氯化钙贮存液);
- 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 至 7.00(37 °C);
- 转移至 100 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 *N*-2-羟基乙基哌嗪-*N'*-乙基磺酸的浓度为 $52.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化钠的浓度为 $71.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C~8 °C 稳定性为 5 周。

B.1.2.2 溶液 B

称量 0.900 g 氯化钠,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶在约 80 mL 水中;
- 转移至 100 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);

最终配制的溶液中氯化钠的浓度为 $154.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

B.1.2.3 测定 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度的反应液

称量 0.039 2 g 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷,将上述物质按以下步骤处理:

- 转移至 25 mL 容量瓶中,用 20 mL 溶液 A 溶解;
- 将容量瓶和溶液 A 平衡至 20 °C;
- 加溶液 A 至容量瓶的校准刻度线(20 °C);

最终配制的溶液中氯化钠的浓度为 $5.208 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C~8 °C 稳定性为 5 d。

B.1.2.4 α -葡萄糖苷酶的制备

B.1.2.4.1 称取约 10 mg 冻干 α -葡萄糖苷酶(记录称量的质量: m 葡萄糖苷酶),用 1 000 μL 酶试剂稀释液按照 α -淀粉酶测定程序溶解。

B.1.2.4.2 稀释步骤 1:用 1 000 μL 酶试剂稀释液稀释 50 μL 复溶的酶试剂。第一步的稀释比例是

1 : 21。

B.1.2.4.3 稀释步骤 2:用 1 000 μL 酶试剂稀释液稀释 50 μL 第一步的酶试剂。将此溶液当作样本,测定 α -葡萄糖苷酶活性。第一步和第二步总稀释比例是 1 : 441。

注:步骤 1 和步骤 2 的稀释方法适用于含量为 $0.40 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \sim 1.65 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($25 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \sim 100 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) 的冻干 α -葡萄糖苷酶。冻干 α -葡萄糖苷酶的准备可能需要其他的稀释倍数,稀释因子根据稀释倍数作相应改变。

B.2 测定条件

B.2.1 最终完全反应混合物的浓度

见表 B.1。

表 B.1 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度测定终完全反应混合物的浓度

参 数	指 标
<i>N</i> -2-羟基乙基哌嗪- <i>N'</i> -乙基磺酸	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
pH(37 $^{\circ}\text{C}$)	7.00 ± 0.03
4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
氯化钠	$70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
氯化钙	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
样本体积比	0.032 0(1 : 31.25)

B.2.2 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度测定条件

见表 B.2。

表 B.2 α -葡萄糖苷酶催化活性浓度测定条件

参 数	指 标
温度	$37.0 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}^{\circ}$
波长	$405 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}^{\circ}$
带宽	$\leq 2 \text{ nm}$
光径	$10.00 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}^{\circ}$
孵育时间	60 s
延迟时间	180 s
测定时间	180 s
读数(测定点)	≥ 6
^o 扩展不确定度($k=2$)。	

B.3 测定步骤

α -葡萄糖苷酶催化活性浓度测定的反应条件非常接近于 α -淀粉酶催化活性浓度测定方法。反应是

用被稀释的 α-葡萄糖苷酶溶液开始的。按表 B.3 的顺序和量,将试剂和样本加入比色杯。

表 B.3 α-葡萄糖苷酶催化活性浓度测定步骤

体 积	测 定 步 骤
2.400 mL	葡萄糖苷酶反应液 平衡到 37 °C
0.080 mL	溶液 B 充分混匀,孵育 60 s。孵育结束时,比色杯中溶液温度应达到 37 °C
0.020 mL	用酶试剂稀释液稀释的 α-葡萄糖苷酶溶液 充分混匀,等待 180 s 后,再连续监测 180 s 的摩尔消光系数
注:此反应中溶液 B 代替了 α-淀粉酶测定方法中的样本。	

B.3.1 试剂空白率

用酶试剂稀释液代替稀释的 α-葡萄糖苷酶溶液来测定试剂空白,按上述步骤进行操作。

B.4 结果计算

作回归分析(最小二乘法)计算摩尔消光系数变化率(摩尔消光系数是时间倒数的函数)。扣除试剂空白速率(s^{-1})后,校正摩尔消光系数变化率(s^{-1})用于计算催化物质的浓度。α-葡萄糖苷酶冻干粉的催化物质浓度按公式(B.1)计算:

$$b_{\text{冻干}} = \frac{F_{\text{稀释}} \times 12\,350 \times \frac{\Delta A}{\Delta t}}{1\,000 \times m} \dots\dots\dots (B.1)$$

注:此公式仅适用于复溶酶稀释液的体积为 1 000 μL(见步骤 1 α-葡萄糖苷酶准备)。

式中:

$b_{\text{冻干}}$ ——冻干物中 α-葡萄糖苷酶的活性质量浓度,单位为微凯塔尔每毫克($\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$);

$F_{\text{稀释}}$ ——稀释倍数(上述例子中为 441);

12 350 ——计算因子(在 405 nm 测定, ϵ_{405} (4-硝基苯酚)=1 012 $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$);

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ ——扣除试剂空白后摩尔消光系数变化率,单位为每秒(s^{-1});

1 000 ——本例中复溶酶稀释液的体积为 1 000 μL(见步骤 1 α-葡萄糖苷酶准备);

m ——需复溶的 α-葡萄糖苷酶的质量,单位为毫克(mg)。

乘以系数 $f=60$ 可以将酶活性质量浓度的单位从 $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ 换算成 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

同样的步骤也可用来测定一些 α-淀粉酶样本基质引起的对 α-葡萄糖苷酶的相对抑制,有如下两种测定:一种是使用溶液 B,另一种是测定时用 α-淀粉酶样本替代溶液 B。在这两种测定中,将 α-葡萄糖苷酶溶液用酶试剂稀释液稀释至活性浓度为 $8 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 33 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($500 \text{U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 2\,000 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为反应开始试剂。

B.5 样本基质对 α-葡萄糖苷酶抑制的计算

在最终反应混合液中由样本基质引起的 α-葡萄糖苷酶活性浓度的相对抑制(%)可通过有被测样本和无被测样本获得的转换速率计算得到,按公式(B.2)计算:

$$Inh = 100 \left[1 - \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{样品}}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{溶液 B}}} \right] \dots\dots\dots (B.2)$$

式中：

$\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{样品}}$ —— 在被测样本替代溶液 B 方法中摩尔消光系数的变化率，单位为每秒 (s^{-1})；

$\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{溶液 B}}$ —— 使用溶液 B 的摩尔消光系数的变化率，单位为每秒 (s^{-1})；

Inh —— 最终反应混合液中由样本基质引起的 α -葡萄糖苷酶活性浓度的相对抑制 (%)。

注：如果由测定样本引起的 α -葡萄糖苷酶活性浓度的相对抑制超过 45%，则引起的滞后在延滞时间内不能完成。

这种物质是不能做校准品或质控品的。

附 录 C

(规范性附录)

EPS 中 G7-4-NP 质量比的控制

C.1 α -淀粉酶参考方法中的溶液 3 用酶试剂稀释液稀释(1:4),所得稀释液与起始试剂溶液以1:100比例混合,另一部分起始试剂溶液用酶试剂稀释液以相同比例混合。两种混合液于室温避光孵育 1 h。

C.2 测定 37 °C 条件下含有 α -葡萄糖苷酶的起始试剂溶液在 405 nm 处的摩尔消光系数,不含 α -葡萄糖苷酶的起始试剂溶液作为参照。

如果摩尔消光系数值 ≤ 0.32 ,则说明 EPS 中所含有 G7-4-NP 的污染 $\leq 0.1\%$ 。

注:摩尔消光系数值 0.32 是基于 100%EPS 含量,如果某批 EPS 含量 $<100\%$,则应做校正。

附 录 D
(资料性附录)
试剂原料详细信息

D.1 试剂原料详细信息

见表 D.1~表 D.7。

表 D.1 试剂详细内容表

试剂系统名 N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙基磺酸 通用名 HEPES

信 息 指 标	内 容
CAS,CARN 注册号	7365-45-9
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_8H_{18}N_2O_4S$
相对分子质量	238.31
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

表 D.2 试剂详细内容表

试剂系统名 4,6-亚乙基(G1)-4-硝基苯(G7)- α -(1->4)-D-麦芽七糖 通用名 EPS

信 息 指 标	内 容
CAS,CARN 注册号	
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_{50}H_{77}NO_{38}$
相对分子质量	1 300.1
纯度	
特定合格要求(如有)	如果被 4-硝基苯- α -D-麦芽七糖(G7-4-NP)污染可能使延滞期延长,从而干扰 α -淀粉酶活性浓度的测定, EPS 中 G7-4-NP 的质量比应限制在 0.001 以下,如果不知其质量比, G7-4-NP 的质量浓度应该被确定(见附录 C)
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 D.3 试剂详细内容表

试剂系统名 α-葡萄糖苷酶

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	9001-42-7
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)	只有裂解 α-淀粉酶全部葡萄糖苷键的 α-葡萄糖苷酶制剂才能使用 (例如,嗜热芽胞杆菌)
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 D.4 试剂详细内容表

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	7647-14-5
失效期	

表 D.5 试剂详细内容表

试剂系统名 氯化钙,二水合物

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	10035-04-8
生产厂家	
货号/批号	
分子式	CaCl ₂ · 2H ₂ O
相对分子质量	147.02
纯度	
特定合格要求(如有)	Xi,R36,S22/24
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 D.6 试剂详细内容表

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 D.7 试剂详细内容表

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	68000
纯度	
特定合格要求(如有)	V级,牛血清白蛋白在厂商的说明书中应有特别说明是不含蛋白酶的。
危险度	S24/25
贮存要求	9048-46-8
失效期	

附 录 E
(资料性附录)

α -淀粉酶 IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较

E.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。

E.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 E.1。

表 E.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	注 解
测定样本		
校准品,质控品和人血清	人血清	参考程序主要用于质控品和校准品的测定
最终反应混合液的 pH		
最适 pH 值为 7.00	最适 pH 值为 7.10	最适 pH 值依赖于测定温度
溶液 2 的 pH 值		
与反应混合液的 pH 值没有差异	与反应混合液的 pH 值有 0.02 个单位的差异	30 °C 测定时在最终反应混合液中加入 EPS 会降低 pH 值
pH 值调节允许的误差		
pH \pm 0.03	无特殊要求	
温度调节的允许误差		
不确定度 \leq 0.1 °C ($k=2$)	偏倚:小于 \pm 0.05 °C 不精密度:小于 \pm 0.1 °C	带有温度调节和控制装置的高质量的分光光度计可使温度测定($k=2$)的不确定度 \leq 0.1 °C
孵育时间		
60 s	至少 300 s	如果缓冲液与样本在 37 °C 预温则不需要长达 300 s 的孵育时间。样本与缓冲液之间的接触不需要这么长时间
测定时间		
180 s	至少 300 s	37 °C 下,较高的信号可以缩短测定时间而不增加测定结果的不精密度
α -葡萄糖苷酶活性浓度		
8 100 U \cdot L ⁻¹	4 800 U \cdot L ⁻¹	30 °C 和 37 °C 下,使用相同量的 α -葡萄糖苷酶,温度越高,酶的活性浓度越高

表 E.1 (续)

37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	注 解
起始试剂溶液的准备		
起始试剂溶液是用 HEPES 进行缓冲的, pH 值必需调到 7.00, 溶液 2 的 pH 值也应调到 7.00	起始试剂溶液是用溶液 2 (pH7.12) 进行溶解的, 由于 EPS 的酸性, 最终反应混合液的 pH 值为 7.10	EPS 的酸性可能会因批号不同而不同, 因此, 溶液 2 与起始试剂溶液的 pH 值必需分开调节
样本基质对 α -葡萄糖苷酶抑制的确定		
确定样本基质引起 α -葡萄糖苷酶活性浓度相对降低的见文中所述, 所允许的最大允许抑制也如文中所定义	不需要处理样本基质对 α -葡萄糖苷酶进行抑制的问题	α -葡萄糖苷酶活性浓度相对降低 0~60% 是可以观察到的 (通过 Schumann 与 Klauke 的 17 个质控品校准品及 11 个人血清调查所得)
EPS 中 G7-4-NP 质量比的控制		
G7-4-NP 污染限制在 0.1% 以下, 测定程序与文中所述参考程序一致	不需要处理底物的 G7-4-NP 污染问题	EPS 如果被 G7-4-NP 污染会引起滞后时间延长使延滞时间增加而影响 α -淀粉酶活性浓度增加而影响 α -淀粉酶活性浓度测定, EPS 中 G7-4-NP 的污染应限制在 0.1% 以下
酶活性浓度单位		
$\mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	$\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 在临床化学中为一常用单位, $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 则是基于 SI 系统
酶试剂稀释液及反应液的准备		
牛血清白蛋白和氯化钠水溶液用来制备 α -葡萄糖苷酶贮存液, 贮存在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 直到使用, 吸取 0.25 mL α -葡萄糖苷酶贮存液加入 25 mL 溶液 2 配成反应液	用冻干 α -葡萄糖苷酶制备反应液, 制备 100 mL 反应液需在微量天平上称取质量相当于约 600 U 的冻干 α -葡萄糖苷酶	37 °C 的程序相对简单些, 制备低于 100 mL 的反应液是不会损失酶含量的精密度的, α -葡萄糖苷酶溶液可以长期稳定 ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定 6 个月)
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, 因此, 如果校准品和质控品的定值中含有样本空白率, 则该校准品和质控品只能用于常规测定
使用前起始试剂溶液的温度		
使用前起始试剂溶液的温度应达到 37 °C	没有关于温度的资料	使用置于室温的起始试剂溶液会降低反应杯内的温度
数据采集		
读数次数 ≥ 6	没有关于测定点数的资料	读数点 ≥ 6 可以确保测定结果足够精密度

表 E.1 (续)

37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	注 解
斜率确定(摩尔消光系数/时间)		
最小二乘法的回归分析	无资料	需要一个明确的统计学方法以确保斜率计算的重复性
参考区间		
女性与男性: $0.52 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.78 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($31 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 107 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)	女性: $0.41 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.08 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($24.4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 64.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 男性: $0.42 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.10 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($25.2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \sim 66.0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)	30 °C 测定时的女性与男性参考区间是分开统计的
反应混合液中硝基苯酚的摩尔消光系数		
摩尔消光系数的测定: $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1\,012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ϵ : 不依赖于样本中的蛋白质含量	30 °C 时反应液中, $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1\,056.8 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ 如果含总蛋白浓度为 $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \sim 77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样本加入至反应混合液中则 $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 975 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$	导致此差异的部分解释是 30 °C 与 37 °C 测定时反应混合液的 pH 值不同。但 30 °C 的蛋白质影响的原因却无法解释。 IRMM IFCC 推荐使用 $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1\,012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

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 α -Amylase. 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
-