

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 351—2011

碱性磷酸酶(ALP)催化活性浓度测定 参考方法

Reference procedure for the measurement of catalytical activity concentration of
alkaline phosphatase (ALP)

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	6
4.5 采样和样本	6
4.6 测定系统和分析部分的准备	7
4.7 酶催化活性浓度测定	10
4.8 测定结果处理	13
4.9 分析可靠性	13
4.10 通过实验室间比对进行确认	14
4.11 初步参考值	14
4.12 报告	14
4.13 质量保证	15
附录 A (资料性附录) 试剂原料详细信息	16
附录 B (规范性附录) 不同温度下反应液的 pH 值	19
附录 C (资料性附录) ALP IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较	20
参考文献	22

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 9 部分:碱性磷酸酶催化浓度测定参考方法》,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:北京航天总医院。

本标准主要起草人:陈宝荣、邵燕、孙慧颖、胡滨、陈琦。

碱性磷酸酶(ALP)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,测定碱性磷酸酶(ALP)催化活性浓度的参考方法。

本标准主要适用于参考实验室,作为碱性磷酸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供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,导致被测定的量可能与定义的被测定不同。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。

4-NPP:磷酸对硝基苯酚(4-nitrophenylphosphate)

ALP:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)

4-NP:对硝基苯酚(4-nitrophenol)

AMP:2-氨基-2-甲基-1-丙醇(2-amino-2-methyl-1-propanol)

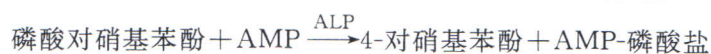
IFCC:国际临床化学与检验医学联合会(international federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

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

本法以磷酸对硝基苯酚(4-NPP)为底物,2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)为磷酸酰基的受体物质,增进酶反应速率,在ALP催化下,4-NPP分裂出磷酸基团,生成游离的对硝基苯酚(4-NP),后者在碱性溶液中转变成醌式结构,呈现较深的黄色。反应式如下:



在37℃、405 nm波长下监测摩尔消光系数上升速率,反应中4-NP的生成速度与ALP活性呈正比。

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	2-氨基-2-甲基-1-丙醇	无
	六水磷酸对硝基苯酚二钠盐	无
	醋酸镁	无
	硫酸锌	无
	N-(2-羟乙基)-乙二胺-N',N',N'-三乙酸三钠盐	HEDTA
	盐酸	无
	氯化钠	无
溶剂	质量与双蒸水类似的高纯度水(电导率 $<2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH6~7 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 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	

ALP 测定所用每个试剂原料详细信息见附录 A。宜使用最高纯度的试剂。试剂的质量应由供应商提供分析证明。如果怀疑某一种化学物质中含有影响分析物的催化活性的不纯物,应进行进一步的检测,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、牙龈出血,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。操作人员应经过专门培训,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。

硫酸锌健康危害:本品对眼有中等度刺激性,对皮肤无刺激性。误服可引起恶心、呕吐、腹痛、腹泻等急性胃肠炎症状,严重时发生脱水、休克,甚至可致死亡。急救措施:皮肤接触:脱去污染的衣着,用流动清水冲洗。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。若误食应用水漱口,饮牛奶或蛋清,并立即就医。

N-(2-羟乙基)-乙二胺-*N,N',N'*-三乙酸三钠盐:操作后洗手、洗衣服。在通风的环境中,操作时尽量减少 HEDTA 粉尘的产生和聚集。避免直接与眼睛、皮肤、衣物接触。存放 HEDTA 的容器要盖紧。避免误吞和吸入。防护:戴眼罩、脸罩、手套、穿防护服。

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 0.878 g HEDTA、0.367 g 硫酸锌及 0.547 g 醋酸镁,将上述物质按以下步骤处理:

- 将 0.878 g HEDTA 溶于约 70 mL 水中;
- 加入硫酸锌;
- 硫酸锌完全溶解后加入醋酸镁;
- 醋酸镁溶解后,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 HEDTA 浓度为 $25.50 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸锌浓度为 $12.75 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、醋酸镁浓度为 $25.50 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 3 个月。

4.3.2.3 反应溶液

称量 8.52 g 2-氨基-2-甲基-1-丙醇,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约 70 mL 水中;
- 用 25% 盐酸调节 pH 值至 37 °C 时 10.3 ~ 10.5;
- 加入 10 mL 溶液 1;
- 用 $2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 值至 37 °C 时为 10.2;
- 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 2-氨基-2-甲基-1-丙醇浓度为 $956.3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶液 2 °C ~ 8 °C 稳定性为 3 个月。

4.3.2.4 起始试剂溶液

称量 0.757 g 六水磷酸对硝基苯酚二钠盐,将上述物质按以下步骤处理:

- 溶于约 15 mL 水中；
- 转移至 25 mL 容量瓶；
- 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)。

最终配制的溶液中六水磷酸对硝基苯酚二钠盐浓度为 81.6 mmol · L⁻¹。该溶液 2 °C ~ 8 °C 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。

必应考虑到在调节 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 B 调整 pH 靶值。同样的方法也适用于 pH 计的温度补偿调节。

配制反应液时,需根据不同温度调整 pH 值。参阅附录 B 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	10.20 ± 0.05 (k=2)
点式温度计	温度/°C	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 ALP 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

表 5 (续)

要求指标	内 容
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

表 12 (续)

准 备 事 项	具 体 内 容
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

ALP 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

ALP 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 ALP 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	405 nm ± 1 nm ^a
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm ^a
孵育时间	60 s
延迟时间	90 s
测定时间	120 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 将实验所需的反应溶液进行脱气处理。可采用的脱气的方法是:采用温度为 35 °C 的真空炉或将溶液加热至 35 °C,在真空干燥器中储存 1 h,同时进行磁力搅拌。如果脱气溶液当天不能用完,下次使用前应再次脱气。

4.7.2.3 将一份适当体积(约 0.7 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。

4.7.2.4 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(ALP 催化反应速率和空白率)

体 积	测 定 步 骤
2.00 mL	反应液 平衡至 37 °C
0.050 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
0.500 mL	起始试剂溶液 充分混合,等候 90 s,监测另外 120 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 ≤ 1%。

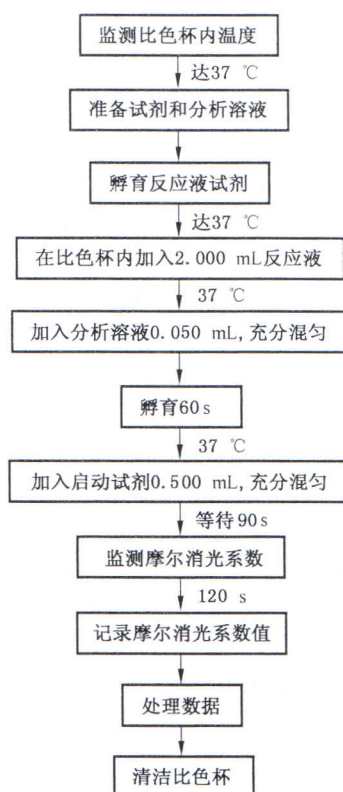


图 1 ALP 参考方法测定流程图

4.7.3 最终完全反应混和物的浓度

见表 15。

表 15 ALP 催化活性浓度测定最终完全反应混合物的浓度

参 数	指 标
2-氨基-2-甲基-1-丙醇	750 mmol · L ⁻¹
pH(37 °C)	10.20 ± 0.05 ^a
磷酸对硝基苯酚	16 mmol · L ⁻¹
硫酸锌	1 mmol · L ⁻¹
醋酸镁	2 mmol · L ⁻¹
HEDTA	2 mmol · L ⁻¹
样本体积比分	0.019 6(1 : 51)
^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。

注 1: 试剂空白的反应呈非线性动力学,所以允许的试剂空白摩尔消光系数的绝对变化值应小于 3.0×10^{-5} s (0.001 8 min⁻¹)。

注 2: 由于动力学的非线性,试剂空白重复性较差。建议重复测量 3 次,采用 3 次测量的平均值参与计算。

4.7.5 样本空白率测定

采用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氯化钠溶液代替起始试剂溶液测定样本空白率。按上述步骤进行操作。

注 1: 样本空白率可被测定和记录,但在计算质控血清和校准品中 ALP 催化活性时不考虑。一旦样本空白率超过 ALP 总催化活性的 1%,则警告有关物质不适宜作校准用。

注 2: 样本空白的试剂空白率用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氯化钠溶液取代起始试剂溶液和样本进行测定。

注 3: 由于反应混合液中无 4-NPP,因此不考虑样本基质对指示剂反应的影响。

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(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 [$\text{s}^{-1} (\text{min}^{-1})$]。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(1)计算 ALP 催化活性浓度:

$$b_{\text{ALP}} = F \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{ALP}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

b_{ALP} ——ALP 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($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$);

F ——系数,等于 2 729(在 405 nm 波长测定时, $\epsilon_{405}(4\text{-NP})=1\ 869 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$,为 IFCC 与 IRMM 推荐);

$(\Delta A / \Delta t)_{\text{ALP}}$ ——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(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($f=0.016\ 67$)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 ALP 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 2.0%。

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 $1.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 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 $0.17 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($10 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.5 线性范围

线性范围 $< 11.37 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($682.3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.9.6 误差的来源

误差主要包括以下几个来源：

- ALP 测定的线性期很短。样本的基质和 ALP 的催化活性影响测定线性。偏离了参考方法中规定的延迟时间和测定时间导致测定结果与原参考方法结果不一致；
- 当质控品和校准品 pH 值与参考方法中描述的 pH 值差别较大时，可导致 ALP 测定不确定度增加；
- 空气中的 CO_2 会改变反应液的 pH 值，因此反应液容器应密封。溶液 1 应至少每周监测一次 pH 值；
- 某些质控品在贮存期间 ALP 的催化活性会增加，应注意识别；
- 试剂溶液粘度较大，混匀不当，会对结果造成影响。

4.10 通过实验室间比对进行确认

ALP 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 年准备颁布 37°C 的 ALP 原级参考方法时，日本人提出其缓冲体系应进行修改，关于缓冲体系的争论持续多年后，今年我们得到 IFCC 公布的最新版 ALP 催化活性浓度参考方法，此法仍保留原缓冲体系。

IFCC 已在 2010 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。

4.11 初步参考值

初步调查男性与女性的参考区间。

男性 (≥ 20 岁): $0.55 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.63 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($33 \text{ U/L} \sim 98 \text{ U/L}$)

女性 (18 岁 ~ 49 岁): $0.72 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.92 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ($43 \text{ U/L} \sim 115 \text{ U/L}$)

ZHUIFCC 中国 ALP 催化活性浓度参考值尚在调查中。

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 ALP 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：ALP
 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

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
(资料性附录)
试剂原料详细信息

A.1 试剂原料详细信息

见表 A.1~表 A.7。

表 A.1 试剂原料详细信息

试剂系统名 2-氨基-2-甲基-1-丙醇 通用名 AMP

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	124-68-5
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_4H_{11}NO$
相对分子质量	89.14
纯度	
特定合格要求(如有)	AMP 中可能含有 ALP 的抑制剂。应使用厂商声称适合 ALP 测定的物质
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 A.2 试剂原料详细信息

试剂系统名 六水磷酸对硝基苯酚二钠盐

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6H_2O$
相对分子质量	371.14
纯度	
特定合格要求(如有)	磷酸对硝基苯酚转化为对硝基苯酚的水解率应 $>98\%$; $25\text{ }^\circ\text{C}$ 311 nm 波长下, $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中磷酸对硝基苯酚的摩尔消光系数为 $986.7\text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \pm 7.6\text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$; 磷酸对硝基苯酚中对硝基苯酚的含量必须小于 0.03% (摩尔百分数); 磷酸对硝基苯酚中无机磷酸盐的含量必须小于 1% (摩尔百分数)
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 A.3 试剂原料详细信息

试剂系统名 醋酸镁

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	142-72-3
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
相对分子质量	214.46
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 A.4 试剂原料详细信息

试剂系统名 硫酸锌

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	7446-20-0
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
相对分子质量	287.54
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S26;S39;S61;
贮存要求	
失效期	

表 A.5 试剂原料详细信息

试剂系统名 N-(2-羟乙基)-乙二胺-N',N',N'-三乙酸三钠盐 通用名 HEDTA

信息指标	内容
CAS,CARN 注册号	150-39-0
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_7$
相对分子质量	344.20 (无水)

表 A.5 (续)

信息指标	内容
纯度	
特定合格要求(如有)	商品化的 HEDTA 含水量不同。应使用有含水百分率证书的 HEDTA, 在制备离子缓冲液时根据证书中含水量配制试剂
危险度	
贮存要求	
失效期	

表 A.6 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)	25%
危险度	C, R34, R37, S26, S45
贮存要求	
失效期	

表 A.7 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	

附录 B

(规范性附录)

不同温度下反应液的 pH 值

不同温度下反应液的 pH 值,见表 B.1。

表 B.1 不同温度下反应液的 pH 值

温度 ℃	pH	温度 ℃	pH	温度 ℃	pH
15.00	10.906	23.50	10.619	32.00	10.352
15.25	10.897	23.75	10.611	32.25	10.344
15.50	10.889	24.00	10.603	32.50	10.337
15.75	10.880	24.25	10.595	32.75	10.329
16.00	10.871	24.50	10.587	33.00	10.321
16.25	10.862	24.75	10.579	33.25	10.314
16.50	10.854	25.00	10.571	33.50	10.306
16.75	10.845	25.25	10.563	33.75	10.298
17.00	10.836	25.50	10.555	34.00	10.291
17.25	10.828	25.75	10.547	34.25	10.283
17.50	10.819	26.00	10.539	34.50	10.276
17.75	10.811	26.25	10.531	34.75	10.268
18.00	10.802	26.50	10.523	35.00	10.260
18.25	10.794	26.75	10.515	35.25	10.253
18.50	10.785	27.00	10.507	35.50	10.245
18.75	10.777	27.25	10.500	35.75	10.238
19.00	10.768	27.50	10.492	36.00	10.230
19.25	10.760	27.75	10.484	36.25	10.223
19.50	10.751	28.00	10.476	36.50	10.215
19.75	10.743	28.25	10.468	36.75	10.208
20.00	10.735	28.50	10.460	37.00	10.200
20.25	10.726	28.75	10.453	37.25	10.192
20.50	10.718	29.00	10.445	37.50	10.185
20.75	10.710	29.25	10.437	37.75	10.177
21.00	10.701	29.50	10.429	38.00	10.170
21.25	10.693	29.75	10.421	38.25	10.162
21.50	10.685	30.00	10.414	38.50	10.155
21.75	10.677	30.25	10.406	38.75	10.147
22.00	10.668	30.50	10.398	39.00	10.140
22.25	10.660	30.75	10.390	39.25	10.132
22.50	10.652	31.00	10.383	39.50	10.125
22.75	10.644	31.25	10.375	39.75	10.117
23.00	10.636	31.50	10.367	40.00	10.110
23.25	10.628	31.75	10.360		

附录 C

(资料性附录)

ALP IFCC 37 °C 参考方法与 30 °C 参考方法的比较

C.1 目前的 SOP 源自 IFCC 参考方法,该参考方法为 ALP 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。

C.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,这些在此也有描述。参见表 C.1。

表 C.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
温度调节的允许误差		
不确定度 ≤ 0.1 °C ($k=2$)	偏倚:小于 0.05 °C 不精密度:小于 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的不确定度 ≤ 0.1 °C ($k=2$)
孵育时间		
60 s	无孵育时间	60 s 对补偿加样和混匀过程导致的温度散失是必要的
延迟时间		
60 s	无相关资料	加入起始试剂溶液后试剂空白率呈非线性
测定时间		
120 s	300 s	反应速率呈非线性,随时间延长和 ALP 催化活性的增高非线性程度成比例增加。测定时间越短,提示线性越好
最终反应混合液中 AMP 的浓度		
750 mmol · L ⁻¹	350 mmol · L ⁻¹	在参考程序中,750 mmol · L ⁻¹ AMP 是最适缓冲浓度;缓冲溶液的缓冲浓度越低,pH 值下降越快;AMP 的浓度越高,缓冲溶液越稳定
反应的开始		
反应的开始 溶液 R 2 000 μ L 血清 50 μ L 起始溶液 200 μ L	溶液 R 2 500 μ L 血清 50 μ L	在 30 °C 程序中,反应从血清开始;在 37 °C 程序中,反应从底物开始。因此,试剂溶液的浓度随着新的体积比而改变(样本体积比从 1 : 51 变为 1 : 45)
使用前起始试剂溶液的温度		
从底物开始,起始试剂溶液使用前应达到 37 °C	从血清开始,没有描述血清的温度平衡	使用室温的起始试剂溶液会降低比色杯温度

表 C.1 (续)

37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	解 释
斜率确定(摩尔消光系数/时间)		
读数次数 ≥ 6	监测摩尔消光系数的增加	现代分光光度计运用数字数据处理过程。读数点 ≥ 6 可以确保测定结果足够精密。持续监测的设备不再使用
酶催化活性单位		
$\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	$\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 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
样本空白率		
测定, 但不考虑	减去	在常规方法中通常不减样本空白率。但如果校准品和质控品的定值中已标有样本空白率, 则该校准品和质控品只能用于常规测定

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 ALP
- [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
-