

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 417—2013

γ -谷氨酰基转移酶催化活性浓度测定 参考方法

Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of
 γ -Glutamyltransferase

2013-07-16 发布

2013-12-01 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了国际检验医学溯源联合委员会(JCTLM)批准的《IFCC 在 37 °C 酶催化活性浓度测定原级参考方法 第 6 部分:γ-谷氨酰基转移酶催化浓度测定参考方法》。

本标准起草单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院、卫生部临床检验中心、北京协和医院。

本标准主要起草人:张曼、迟珊、王京、贾汝静、沈默、张传宝、邱玲、杨振华。

γ-谷氨酰基转移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 γ-谷氨酰基转移酶(γ-GT)催化活性浓度的参考方法。

本标准适用于参考实验室和临床实验室作为 γ-谷氨酰基转移酶活性浓度测定的溯源标准,也适用于与酶活性浓度检验有关的仪器和试剂生产企业、有关评价单位及质量管理部门。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

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。

2.2

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。

2.3

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。

2.4

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。

2.5

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。

2.6

(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份。

2.7

参考测定方法 reference measurement 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。

2.8

被测量 measurand

拟测定的量。

示例 1: 用较小内阻的电压表测定电池两端之间的电位差, 开路电位差可从电池和电压表的内阻计算得到。

示例 2: 在平衡到环境温度 23 °C 时钢棒长度与在特定温度 20 °C 时测定得到的长度有差别, 这种情况下应加以修正。

示例 3: 在化学中, “分析物”或者物质或化合物的名称有时被称作“被测量”。这种用法是错误的, 因为这些术语并不涉及到量。

注 1: 对被测量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, 被测量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。

2.9

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。

2.10

校准品 calibrator

用于校准的测定标准。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

GUM: 测量不确定度表示指南(Guide to the expression of uncertainty in measurement)

IFCC: 国际临床化学与检验医学联合会(International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine)

QUAM: 分析测量中不确定度的量化(Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement)

SOP: 标准操作程序(Standard Operation Procedure)

γ -GT: γ -谷氨酰基转移酶(γ -Glutamyltransferase)

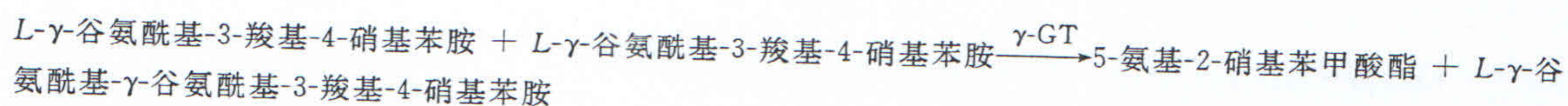
4 参考方法描述

4.1 测定原理和方法

L - γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺 + 甘氨酰甘氨酸 $\xrightarrow{\gamma\text{-GT}}$ 5-氨基-2-硝基苯甲酸酯 + L - γ -谷氨酰基-甘氨酰甘氨酸

上述反应中 5-氨基-2-硝基苯甲酸酯的生成速率与 γ -谷氨酰基转移酶活性成正比, 在 37 °C, 410 nm 波长下测定 5-氨基-2-硝基苯甲酸酯的吸光度变化率, 可计算 γ -谷氨酰基转移酶催化活性。

注: 总底物中大约有 1% 按下列方式自动转化:



4.2 检查列表

4.2.1 试剂列表

所用试剂见表1。

表1 γ -GT 试剂列表

分 类	系 统 名 称	通 用 名 称, 缩 略 语
试剂	N-甘氨酸甘氨酸	$C_4H_8N_2O_3$
	L- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺	$C_{12}H_{12}N_3O_7 \cdot NH_4 \cdot H_2O$
	氢氧化钠	NaOH
	氯化钠	NaCl
溶剂	质量与双蒸馏水类似的高纯度水(电导率 $<2 \mu S/cm$, pH6~7, 硅酸盐 $<0.1 mg/L$)	无
参考物质	JCTLM 规定的参考物质	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〕,见表2。

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

4.3.1.1 按表3详细填写试剂原料信息。

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	
分子量	
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	
贮存要求	
失效期	

4.3.1.2 γ -GT 测定所用每个试剂原料详细信息见附录 A, 应该使用最高纯度的试剂。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, 必须进行进一步的研究, 例如, 比较不同厂家和不同批号的产品。建议使用在对比试验中已经鉴定或认可的试剂。

4.3.1.3 根据 IFCC 参考方法(30 °C), 底物 *N*-甘氨酸甘氨酸中所含杂质甘氨酸应该小于 0.001(质量比), *L*- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺中所含 *L*- α -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺应该小于 0.005(质量比), 所含 5-氨基-2-硝基苯甲酸应小于 0.001(质量比)。如果 *N*-甘氨酸甘氨酸和 *L*- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺的生产厂商不能提供上述物质的相关信息, 试剂应该经参考方法(IFCC, 30 °C)中所述色谱分析法进行检测。

4.3.1.4 使用氢氧化钠需要注意以下事项:

a) 氢氧化钠特性:

- 1) 氢氧化钠有强烈刺激和腐蚀性;
- 2) 粉尘或烟雾会刺激眼和呼吸道, 腐蚀鼻中隔;
- 3) 皮肤和眼与氢氧化钠直接接触会引起灼伤;
- 4) 误服氢氧化钠可造成消化道灼伤, 粘膜糜烂、出血和休克;
- 5) 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。分解产物可能产生有害的毒性烟雾。

b) 防护措施:

- 1) 呼吸系统防护: 必要时佩带防毒口罩;
- 2) 眼睛防护: 戴化学安全防护眼镜;
- 3) 防护服: 穿工作服(防腐材料制作);
- 4) 手防护: 戴橡皮手套。

4.3.2 试剂溶液

4.3.2.1 一般要求

配制试剂的试剂原料的纯度应为 100%, 如果试剂原料含量不足 100%(例如, y), 按公式(1)计算实际含量:

$$W_{\text{实际}} = \frac{W_{\text{理论}}}{y} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$W_{\text{实际}}$ ——实际称重量;

$W_{\text{理论}}$ ——理论称重量;

y ——试剂纯度, %。

溶液的制备应使用质量与双蒸水类似的高纯度水(电导率 $< 2 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH 6~7, 硅酸盐 $< 0.1 \text{ mg}/\text{L}$)。

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 反应溶液(溶液 1)

称量 2.73 g *N*-甘氨酸甘氨酸, 游离碱, 将上述物质按以下步骤处理:

- 溶解于约 80 mL 水中;
- 用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH(37 °C) 到 7.7;
- 转移于 100 mL 容量瓶中;
- 把容量瓶和水的温度平衡到 20 °C;
- 将水(20 °C)加至容量瓶的校准刻度。

最终配制的溶液中 *N*-甘氨酸甘氨酸, 游离碱浓度为 206.3 mmol/L, 该溶液 2 °C~8 °C 稳定性为 2 周。

4.3.2.3 起始试剂溶液(溶液 2)

称量 0.229 g *L*- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺, 单铵盐, 一水化合物, 将上述物质按以下步骤处理:

- 溶解于约 15 mL 水中;
- 转移于 20 mL 容量瓶中;
- 把容量瓶和水的温度平衡到 20 °C;
- 将水(20 °C)加至容量瓶的校准刻度。

最终配制的溶液中 *L*- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺, 单铵盐, 一水化合物浓度为 33.00 mmol/L, 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 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。在校准、控制和调节 pH 的过程中, 搅拌速度要一致, pH 电极必须位于被搅拌溶液的中心。

必须考虑到在调节 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。

配制溶液 1 时, 应遵照附录 B 的规定根据不同温度调节溶液的 pH。

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	$7.65 \pm 0.05 (k=2)$
点温计	温度/°C	$37.0 \pm 0.1 (k=2)$

4.5 采样和样本

4.5.1 通则

参考实验室不自行采血,主要接受外检标本,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 γ -GT 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 °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

测定前,按已制定的 SOP 文件对分光光度计进行检查,并填写表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
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效期内: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 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"/> 国家标准溶液检查吸光度准确度
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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.2 点温计准备

测定前,按已制定的 SOP 文件对点温计进行检查,并填写表 7。

表 7 点温计准备

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"/> 点温计温度探头正常
组合	<input type="checkbox"/> 主机与点温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"/> 查看校准有效期未到期
仪器性能检查	核实是否在国家计量机构检定合格效期内: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.3 恒温水浴箱准备

测定前,按已制定的 SOP 文件对恒温水浴箱进行检查,并填写表 8。

表 8 恒温水箱测定系统的准备

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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.4 稀释配液仪准备(实验室若有)

测定前,按已制定的 SOP 文件对稀释配液仪进行检查,并填写表 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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.5 移液器准备

测定前,按已制定的 SOP 文件对移液器进行检查,并填写表 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"/> 定期校准 <input type="checkbox"/> 定期校准

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.6 天平准备

测定前,按已制定的 SOP 文件对天平进行检查,并填写表 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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.1.7 pH 计准备

测定前,按已制定的 SOP 文件对 pH 计进行检查,并填写表 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	<input type="checkbox"/> 每次应用前性能保证 <input type="checkbox"/> 更换电极内液和电极外液进行电极激活 <input type="checkbox"/> 采用 pH 标准溶液进行校准
预防性维护	<input type="checkbox"/> 应用前更换电极内液和电极外液:电极激活 <input type="checkbox"/> 应用后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

各实验室可根据自己的实际情况设计操作流程图。

4.6.2 分析部分的准备

4.6.2.1 分析样本的类型

γ -GT 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

γ -GT 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体状态,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程序处理后,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 $<2 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH 6~7,硅酸盐 $<0.1 \text{ mg}/\text{L}$)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程序和记录。

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

γ -GT 催化活性浓度测定条件见表 13。

表 13 γ -GT 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	$410 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$
带宽	$\leq 2 \text{ nm}$
光径	$10.00 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}^a$
孵育时间	180 s
延迟时间	60 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

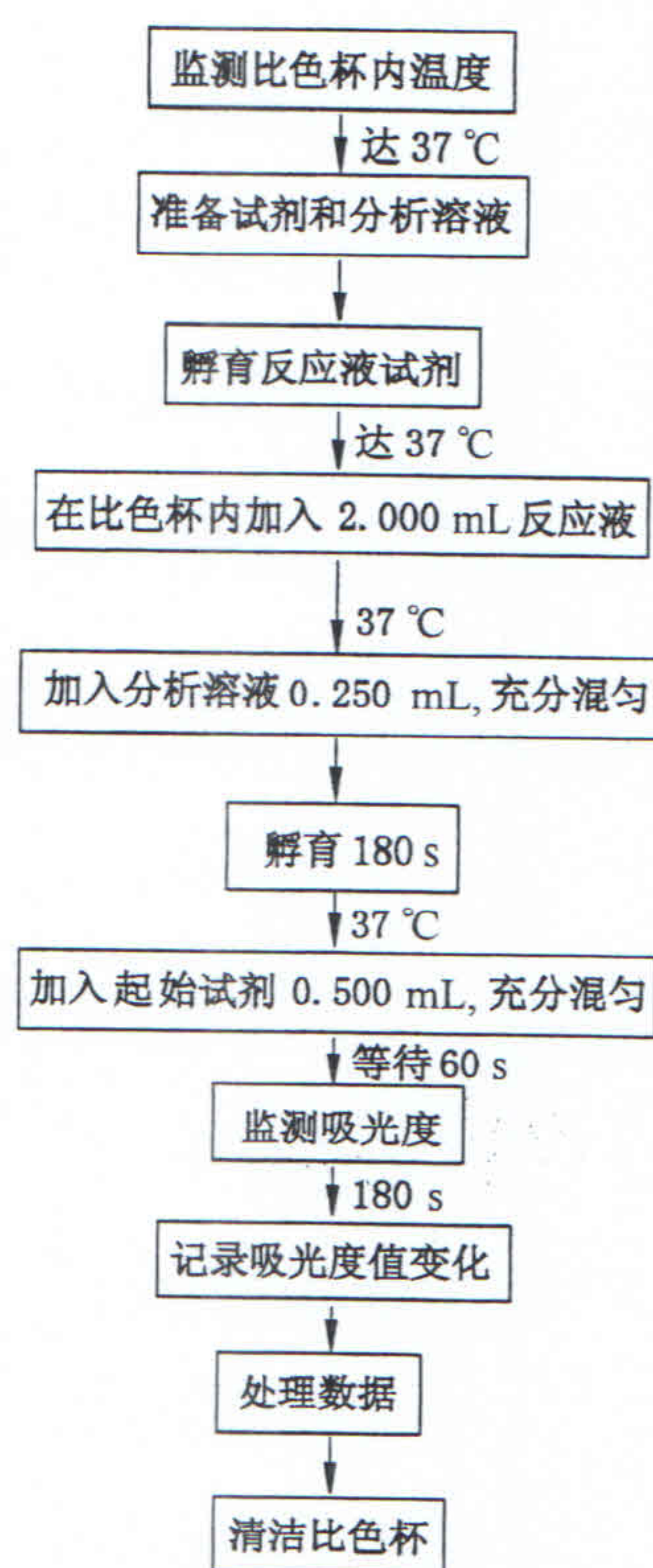
4.7.2.1 监测比色杯内温度,达到要求时开始准备试剂和分析溶液。

4.7.2.2 将一份适当体积(约 0.8 mL)起始试剂溶液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下平衡,剩余的起始试剂必须保存在 $2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.7.2.3 将表 14 中所列试剂体积按图 1 的流程进行加样及测定。

表 14 γ -GT 的分析系统

体 积	测 定 步 骤
2.000 mL	反应溶液 平衡到 37 °C
0.250 mL	样本(平衡到接近 37 °C) 充分混合并孵育 180 s。在孵育期末,比色杯中溶液温度应达到 37 °C
0.500mL	起始试剂溶液 充分混合,静置 60 s,监测之后 180 s 内时间和吸光度的变化
动力学比色测定的扩展不确定度($k=2$)(正态分布)不应超过 1%(不包括波长调节的不确定度)。 样本体积分数的扩展不确定度($k=2$)(正态分布)应 \leq 1%。	

图 1 γ -GT 参考方法测定流程图

4.7.3 终反应混和液浓度

终反应混和液浓度见表 15。

表 15 γ -GT 催化活性浓度测定终反应混合液物的浓度

参 数	指 标
甘氨酸甘氨酸	150 mmol/L
pH(37 °C)	7.70±0.05 ^a
L- γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺	6 mmol/L
样本体积分数	0.090 9(1 : 11)
^a 扩展不确定度($k=2$)。	

4.7.4 试剂空白率测定

用 9 g/L (154 mmol/L) NaCl 溶液代替样本进行试剂空白率的测定。测定过程同上。一旦试剂空白率超过 $1.7 \times 10^{-5}/S(0.001/\text{min})$ 或出现负值,应该重复测定,必要时须弃去试剂溶液。

4.7.5 样本空白率

测定样本空白率用 9 g/L (154 mmol/L) NaCl 溶液代替起始反应液,以测定样本空白率。测定过程同上。

注 1: 样本空白率虽然可测定并记录,但在计算质控血清和校准品 γ -GT 催化浓度时,不考虑样本空白率。一旦样本空白率超过总 γ -GT 的 1%,则警告有关物质不适宜做校准用。

注 2: 由于反应混合物中 γ -谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺可被忽略,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

以监测时间为 X 轴,吸光度为 Y 轴作线性回归分析(最小二乘法)后计算吸光度变化率(吸光度是时间倒数的函数)。测定样本吸光度变化率减去试剂空白吸光度变化率后得到实际的测定样本吸光度变化率,再乘以系数 F ,具体计算按公式(2)。

$$b_{\gamma\text{-GT}} = F \left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\gamma\text{-GT}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$b_{\gamma\text{-GT}}$ —— γ -GT 催化浓度;

$F=1\ 382$ (在 410 nm 测定, ϵ_{410} (5-氨基-2-硝基苯甲酸)=796 m^2/mol);

$\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\gamma\text{-GT}}$ ——实际的测定样本吸光度变化率(min^{-1})。

注: γ -GT 催化浓度用 $\mu\text{kat/L}$ 单位来计算,将催化活性浓度的单位 $\mu\text{kat/L}$ 乘以系数 $f=60$,可换算成 U/L 的形式。

4.8.1.2 数据处理

4.8.1.2.1 数据剔除:各实验室应按照适当的规则进行数据剔除,如:若测定结果超过整组数据的均值

±3SD,可以剔除。但剔除的测定结果数量应小于总测定次数的5%;如果测定次数为10次~20次,则最多只能剔除1个数据,否则应重新测定。

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kat/L,使用时常出现多位小数,目前常以 $\mu\text{kat/L}$ 或 nkat/L 表示,但临床医学中仍习惯于使用U/L。换算关系如下:

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

4.9 分析可靠性

4.9.1 概念、价值及其应用

依据不确定度、精密度、线性范围、检出限等来评估 $\gamma\text{-GT}$ 参考测定方法的分析可靠性。相关文献及参考方法的实验室测定数据表明本参考测定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。 $\gamma\text{-GT}$ 参考方法测定结果的相对合成标准不确定度在浓度 $1.67\mu\text{kat/L}$ (100U/L)时宜 $<2.0\%$ 。

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 $1.67\mu\text{kat/L}$ (100U/L)样本的重复性精密度宜 $<1.5\%$,实验室内复现性精密度宜 $<2.0\%$ 。

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 $0.08\mu\text{kat/L}$ (5.0U/L)。

4.9.5 线性范围

线性范围: $<4.56\mu\text{kat/L}$ (273.6U/L)。

4.9.6 误差的来源

由于血清和起始反应液的高体积分数,因此只有样本和底物溶液的温度适当时,才能在测定开始时达到所需的测定温度。一些质控样本,如果在测定前已稀释,测定中所测 $\gamma\text{-GT}$ 催化浓度会偏高。因此样本是否经过预稀释应该预先说明。

4.10 实验室间比对进行确认

$\gamma\text{-GT}$ 催化活性浓度参考测定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 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 测定本酶的参考测定方法,并应用于临床,鉴于临床生化分析仪广泛应用 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,IFCC在2002年颁布了取代 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $\gamma\text{-GT}$ 原级参考测定方法,2002年得到JCTLM批准成为正式国际参考测定方法。关于 $\gamma\text{-GT}$ IFCC $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 参考测定方法与 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 参考测定方法的比较参见附录C。

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±5.25% 内,可确认此参考测定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。证实此参考测定方法可用于我国临床常规方法测定结果的溯源。

4.11 初步参考值

IFCC 初步调查了男性($n=407$)和女性($n=420$)成年人群(≥ 17 岁)的初步参考区间,见表 16。

表 16 γ -GT 催化活性浓度参考区间

性 别	参考值上限 ^a	参考值上限的 90%可信区间
男	0.92 μ kat/L(55 U/L)	0.89 μ kat/L ~ 0.96 μ kat/L(53 U/L ~ 58 U/L)
女	0.63 μ kat/L(38 U/L)	0.62 μ kat/L ~ 0.65 μ kat/L(37 U/L ~ 39 U/L)
^a 参考人群的 97.5 百分位。		

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;
- 测定所使用的参考程序:IFCC 在 37 °C 下测定 γ -GT 催化活性浓度的原级参考方法;
- 被测量的名称: γ -GT;
- 测定结果数字值;
- 测定单位: μ kat/L 或 U/L;
- 评定测定不确定度的结果: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。质控品可选用校准品,建立包括质控规则、操作步骤的室内质控 SOP 文件及评价记录。

4.13.2 室间质量控制

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。

附 录 A
(资料性附录)
试剂原料详细信息

试剂原料详细信息见表 A.1~表 A.4。

表 A.1 N-甘氨酸甘氨酸详细信息表

试剂系统名 N-甘氨酸甘氨酸

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	61499-00-1
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_4H_8N_2O_3$
相对分子质量	132.1
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S24/25
贮存要求	
失效期	

表 A.2 L-γ-谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺详细信息表

试剂系统名 L-γ-谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺

信息指标	内 容
CAS,CARN 注册号	9046-27-9
生产厂家	
货号/批号	
分子式	$C_{12}H_{12}N_3O_7 \cdot NH_4 \cdot H_2O$
相对分子质量	346.3
纯度	
特定合格要求(如有)	
危险度	S22,S24/25
贮存要求	
失效期	

表 A.3 氢氧化钠详细信息表

试剂系统名 氢氧化钠 通用名 NaOH

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	R35,S24/25,S37/39,S45
贮存要求	
失效期	

表 A.4 氯化钠详细信息表

试剂系统名 氯化钠 通用名 NaCl

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)

不同温度下反应溶液的 pH

不同温度下反应溶液的 pH, 见表 B. 1。

表 B. 1 不同温度下反应溶液的 pH

温度℃	pH	温度℃	pH	温度℃	pH
15.00	8.286	23.50	8.041	32.00	7.820
15.25	8.278	23.75	8.034	32.25	7.813
15.50	8.271	24.00	8.027	32.50	7.807
15.75	8.263	24.25	8.021	32.75	7.801
16.00	8.256	24.50	8.014	33.00	7.795
16.25	8.248	24.75	8.007	33.25	7.789
16.50	8.241	25.00	8.000	33.50	7.783
16.75	8.234	25.25	7.993	33.75	7.777
17.00	8.226	25.50	7.987	34.00	7.771
17.25	8.219	25.75	7.980	34.25	7.765
17.50	8.211	26.00	7.973	34.50	7.759
17.75	8.204	26.25	7.967	34.75	7.753
18.00	8.197	26.50	7.960	35.00	7.747
18.25	8.190	26.75	7.954	35.25	7.741
18.50	8.182	27.00	7.947	35.50	7.735
18.75	8.175	27.25	7.940	35.75	7.729
19.00	8.168	27.50	7.934	36.00	7.724
19.25	8.161	27.75	7.927	36.25	7.718
19.50	8.153	28.00	7.921	36.50	7.712
19.75	8.146	28.25	7.914	36.75	7.706
20.00	8.139	28.50	7.908	37.00	7.700
20.25	8.132	28.75	7.901	37.25	7.695
20.50	8.125	29.00	7.895	37.50	7.689
20.75	8.118	29.25	7.889	37.75	7.683
21.00	8.111	29.50	7.882	38.00	7.678
21.25	8.104	29.75	7.876	38.25	7.672
21.50	8.097	30.00	7.870	38.50	7.666
21.75	8.090	30.25	7.863	38.75	7.661
22.00	8.083	30.50	7.857	39.00	7.655
22.25	8.076	30.75	7.851	39.25	7.649
22.50	8.069	31.00	7.844	39.50	7.644
22.75	8.062	31.25	7.838	39.75	7.638
23.00	8.055	31.50	7.832	40.00	7.633
23.25	8.048	31.75	7.826	—	—

附 录 C
(资料性附录)

γ-GT IFCC 37 °C 参考测定方法与 30 °C 参考测定方法的比较

一级参考方法是源自 IFCC 参考方法,该参考方法为 γ-GT 催化活性浓度的测定提供了最佳条件。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,见表 C.1。此外,如果与 30 °C 的参考方法进行比较时,为提高测定的高标准化,需要更准确的说明,此附录也加以叙述。

表 C.1 γ-GT IFCC 方法在 37 °C 和 30 °C 测定温度下的比较

项 目	37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	解 释
测定标本	校准品、质控品和人血清	人血清	参考方法主要用于校准品和质控品的测定
pH	最适 pH 为 7.70	最适 pH 为 7.90	最适 pH 随温度的变化与缓冲液中 pH 的变化恰好一致。因此在 30 °C 和 37 °C 时可用相同的试剂液
pH 调节的不确定度	$\Delta\text{pH} \pm 0.05$	无特别要求	
测定温度调节的不确定度	不确定度 ≤ 0.1 °C ($k=2$)	偏倚: < 0.05 °C 不精密度: < 0.1 °C	带有温度调节和控温装置的高质量分光光度计可使温度测定的不确定度 ($k=2$) ≤ 0.1 °C
反应的起始	从底物起始	从血清起始	底物起始允许一段孵育时间,使比色皿内温度达到平衡
孵育时间	180 s	无孵育时间,从血清起始	由于样本体积分数大,故需用 180 s 的时间平衡比色皿内温度
延迟时间	60 s	未规定延迟时间	延迟时间使温度进一步达到平衡,以获得线性反应速率
测定区间	180 s	接近 300 s	温度越高,酶的催化活性浓度越高,光度计的信号也越强。因此,可使用较短的测定区间
试剂溶液体积	100 mL N-甘氨酸甘氨酸缓冲溶液 20 mL L-γ-谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺溶液	1 000 mL N-甘氨酸甘氨酸缓冲溶液 100 mL L-γ-谷氨酰基-3-羧基-4-硝基苯胺溶液	不用准备大体积的试剂溶液,因为每次测定时均需配制新鲜试剂溶液
使用前起始试剂溶液的温度	底物启动:使用前,起始试剂的温度应为 37 °C	血清启动:未叙述血清平衡温度	应用室温的起始试剂溶液会降低比色皿内温度

表 C.1 (续)

项 目	37 °C 参考方法	30 °C 参考方法	解 释
数据采集	读数次数 ≥ 6	记录吸光度的变化	现代分光光度计使用数码数据处理系统, 读数次数 ≥ 6 可以保证其测定结果足够精确, 不再使用连续监测装置
斜率的确定 (时间对吸光度)	最小二乘法的回归分析方法	无资料	明确的统计学方法以确保斜率计算的可重复性并允许进行不确定度估计
参考区间上限	女性 $\leq 0.63 \mu\text{kat/L}$ ($\leq 38 \text{ U/L}$) 男性 $\leq 0.92 \mu\text{kat/L}$ ($\leq 55 \text{ U/L}$)	该方法无参考区间数值	男性和女性的参考区间为独立测定的分析结果

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 GGT. 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
-