



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 419—2013

参考物质中酶活性浓度的赋值

The values of enzymatic activity concentrations assigned
for the reference materials

2013-07-16 发布

2013-12-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：卫生部临床检验中心、北京航天总医院、清华长三角研究院、卫生部北京医院。

本标准主要起草人：杨振华、陈文祥、申子喻、陈宝荣、谭爱国、王治国、李晓鹏、张传宝、汪静、胡卫江。

引 言

酶活性浓度测量是临床实验室重要工作之一,可为临床医师、患者提供大量有价值的诊断信息,也是临床化学的重要工作。根据《医疗机构临床实验室管理办法》(以下简称《管理办法》)的要求,临床实验室所用的方法、仪器等应能保证测量结果的准确可靠。临床实验室应对所用的各项测量结果进行溯源,以保证测量结果准确。

根据酶活性浓度测量的特性,不能用天平称重法直接称量酶的活性,只能通过测量酶催化的化学反应速度变化间接求得酶活性,但化学反应速度又与测量环境、条件如反应温度、反应物浓度等密切相关。因此,酶参考物质的值只能溯源到参考方法而非一级参考物质。本文件中的参考物质是指各级参考物质、校准品和质控品。根据 ISO 18153 要求,在给酶参考物质赋值时,为避免不同条件对赋值结果的影响,通常由多个参考实验室采用同一种国际或国家公认的参考方法进行测量,最后经统计学方法分析得出酶参考物质的赋值和其不确定度。这符合 ISO 指南 34 中介绍的给参考物质赋值的方法之一,由参考实验室网络取得的数学均值作为酶参考物质的赋值。

为尽可能避免不同参考实验室测量结果的不一致,各参考实验室应能溯源至同一国际(国家)酶参考物质。在我国,参加酶学参考实验室网络的实验室应有文件证明能溯源至欧共体制备的欧洲参考物质(ERM)或其他国家制备的一级标准物质,并有文件证实测量每一步骤严格遵循检验医学溯源联合委员会(JCTLM)认定的国际参考方法。网络实验室的组织者应选择此类实验室为酶参考物质赋值。

作为测量的参考物质,不论是国际级或国家级的参考物质,还是厂家的产品校准品,都应能溯源至相应的参考方法。早在 20 世纪 80 年代,国际上就开始用实验室网络对参考物质中酶活性浓度进行赋值和评定其不确定度。在 20 世纪 90 年代后期,我国有实验室研制并申报国家酶活性浓度测量参考物质,但至今我国尚无此类标准,本标准依据 ISO 指南 35 和其他国际标准并结合我国临床实验室现状起草。

参考物质中酶活性浓度的赋值

1 范围

本标准规定了使用参考实验室网络对参考物质中酶活性浓度进行赋值和评定其不确定度时应遵循的方法和步骤。

本标准适用于通过参考实验室网络对参考物质中酶活性浓度进行赋值和评定其不确定度。鼓励临床实验室采用按照此标准赋值的酶活性浓度参考物质,核查本实验室常规检验项目的溯源性和正确度。

本标准不适用于单个参考实验室对所测量结果的不确定度进行评定。

2 规范性引用文件

下列文件对本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅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。

JJG 1006—1994 一级标准物质计量技术规范
标准物质管理办法 国家计量局 1987

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

参考物质 reference material; RM

标准物质

具有足够均匀和稳定的特定特性的物质,其特性被证实适用于测量中或标称特性检查中的预期用途。

注 1: 标称特性的检查提供一个标称特性值及其不确定度。该不确定度不是测量不确定度。

注 2: 赋值或未赋值得标准物质都可用于测量精密度控制,只有赋值的标准物质才可用于校准或测量正确度控制。

注 3: “标准物质”既包括具有量的物质,也包括具有标称特性的物质。

示例 1: 具有量的标准物质举例:

- a) 给出了纯度的水,其动力学黏度用于校准粘度计;
- b) 含胆固醇但没有其物质的量浓度赋值的人血清,仅用作测量精密度控制;
- c) 阐明了所含二恶英的质量分数的鱼尾形纸巾,用作校准物。

示例 2: 具有标称特性的标准物质举例:

- a) 一种或多种指定颜色的色图;
- b) 含有特定的核酸序列的 DNA 化合物;
- c) 含有 19-雄(甾)二酮的尿。

注 4: 标准物质有时与特制装置是一体化的。

示例 1: 三相点瓶中已知三相点的物质。

示例 2: 置于透射滤光器支架上已知光密度的玻璃。

示例 3: 安放在显微镜载玻片上尺寸一致的小球。

注 5: 有些标准物质量值溯源到 SI 制外的某个测量单位。这类物质包括量值溯源到由世界卫生组织指定的国际单位(IU)的疫苗。

注 6: 在某个特定测量中,所给定的标准物质只能用于校准或质量保证两者中的一种用途。

注 7: 对标准物质的说明应包括该物质的追溯性,指明其来源和加工过程。

注 8: 国际标准化组织/标准物质委员会有类似定义,但采用术语“测量过程”意指“检查”,它既包含了量的测量,也包含了标称特性的检查。

[JJF 1001—2011,8.14]

3.2

有证标准物质 **certified reference material; CRM**

附有由权威机构发布的文件,提供使用有效程序获得的具有不确定度和溯源性的一个或多个特性量值的标准物质。

示例:在所附证书中,给出胆固醇浓度赋值及其测量不确定度的人体血清,用作校准器或测量正确度控制的物质。

注 1:“文件”是以“证书”的形式给出(见 ISO 指南 31:2000)。

注 2:有证标准物质制备和颁发证书的程序是有规定的(例如 ISO 指南 34 和 ISO 指南 35)。

注 3:在定义中,“不确定度”包含了测量不确定度和标称特性值得不确定度两个含义,这样做是为了一致和连贯。

“溯源性”既包含量值的计量溯源性,也包含标称特性值得追溯性。

注 4:“有证标准物质”的特定量值要求附有测量不确定度的计量溯源性。

[JJF 1001—2011,8.15]

3.3

(参考物质或有证参考物质)适用期 **shelf time(of a RM/CRM)**

参考物质或有证参考物质生产者保证其稳定性的时间区间。

注:同 ISO 指南 31,使用期等于证书有效的期限。

[ISO 指南 35,3.13]

3.4

(参考物质)使用期 **life time(of a RM)**

参考物质可能使用的时间区间。

[ISO 指南 35,3.12]

3.5

测量程序 **measurement procedure**

根据一种或多种测量原理及给定的测量方法,在测量模型和获得测量结果所需计算的基础上,对测量所做的详细描述。

注 1:测量程序通常要写成充分而详尽的文件,以便操作者能进行测量。

注 2:测量程序可包括有关目标测量不确定度的陈述。

注 3:测量程序有时被称作标准操作程序,缩写为 SOP。

注 4:参考测量程序(reference measurement procedure)【VIM 2.7】是在校准或表征标准物质时为提供测量结果所采用的测量程序,它适用于评定由同类量的其他测量程序获得的被测量量值的测量正确度。

注 5:原级参考测量程序(primary reference measurement procedure)或原级参考程序(primary reference procedure)【VIM 2.8】是用于获得与同类量测量标准没有关系的测量结果所用的参考测量程序。物质的量咨询委员会-化学计量(CCQM)对于这个概念使用术语“原级测量方法”。两个下级概念的术语“直接原级测量程序”和“比例原级参考测量程序”的定义由 CCGM 给出(第五次大会,1999)。

示例:测量在 20 °C 时从 50 mL 吸液管放出的水量,对由吸液管流到杯中的水称重,取加水后杯子的质量减去起始空杯的质量,并按实际水温对质量差进行修正,用体积质量(质量密度)得到被测的水量。

[JJF 1001—2011,4.6]

3.6

测量方法 **method of measurement**

对测量过程中使用的操作所给出逻辑性安排的一般性描述。

注:测量方法可用不同方式表述,如替代测量法、微差测量法、零位测量法、直接测量法、间接测量法。

[JJF 1001—2011, 4.5]

3.7

参考测量程序 reference measurement procedure

是在校准或表征标准物质时为提供测量结果所采用的测量程序,它适用于评定由同类量的其他测量程序获得的被测量量值的测量正确度。

[JJF 1001—2011, 4.6 注 4]

3.8

原级参考测量程序 primary reference measurement procedure**原级参考程序** primary reference procedure

是用于获得与同类量测量标准没有关系的测量结果所用的参考测量程序。物质的量咨询委员会-化学计量(CCQM)对于这个概念使用术语“原级测量方法”。两个下级概念的术语“直接原级测量程序”和“比例原级参考测量程序”的定义由 CCGM 给出(第五次大会,1999)。

[JJF 1001—2011, 4.6 注 5]

3.9

校准 calibration

在规定条件下的一组操作,其第一步是确定由测量标准提供的量值与相应示值之间的关系,第二步则是用此信息确定由示值获得测量结果的关系,这里测量标准提供的量值与相应示值都具有测量不确定度。

注 1: 校准可以用文字说明、校准函数、校准图、校准曲线或校准表格的形式表示。某些情况下,可以包含示值的具有测量不确定度的修正值或修正因子。

注 2: 校准不应与测量系统的调整(常被错误称作“自校准”)相混淆,也不应与校准的验证相混淆。

注 3: 通常,只把上述定义中的第一步认为是校准。

[JJF 1001—2011, 4.10]

3.10

基质 matrix

一个物质系统除分析物以外的所有成分。

[ISO 15194, 3.3]

3.11

基质效应 matrix effect

用特定测量程序测量被测量,被测量以外的样品特性对测量的影响以及由此引起的对测量值的影响。

注 1: 一个明确的基质效应原因是一个影响量。

注 2: “基质效应”有时被错误地用于表示缺乏互换性,后者由变性的分析物或加入的用于模拟分析物的非真正成分(代用分析物)引起。

[ISO 15194, 3.4]

3.12

基质物质 matrix material

从自然、工业产品或其他取样的物质。

示例:土壤、水、空气。

[ISO 指南 35, 3.8]

3.13

物质的互换性 commutability of a material

用两种某特定量的测量程序测量某给定物质所得测量结果的数字关系,与用这些程序测量常规样品结果的数字关系的一致程度。

[ISO 15194,3.5]

3.14

瓶间均匀性 between-bottle homogeneity

参考物质在瓶间特性的差异。

注：“瓶间均匀性”还隐含用于其他类型的包装(例如安瓿)以及其他物理样式和检测部块。

[ISO 指南 35,3.5]

3.15

长期稳定性 long-term stability

参考物质生产者在特定贮存条件下参考物质特性的稳定性。

[ISO 指南 35,3.11]

3.16

短期稳定性 short-term stability

在特定运输条件下运送时,参考物质特性的稳定性。

[ISO 指南 35,3.10]

3.17

测量精密度 precision of measurements

精密度 precision

在规定条件下,对同一或类似被测对象重复测量所得示值或测得值间的一致程度。

注1:测量精密度通常用不精密程度以数字形式表示,如在规定测量条件下的标准偏差、方差或变差系数。

注2:规定条件可以是重复性测量条件,期间精密度测量条件或复现性测量条件。

注3:测量精密度用于定义测量重复性,期间测量精密度或测量复现性。

注4:术语“测量精密度”有时用于指“测量准确度”,这是错误的。

[JJF 1001—2011,5.10]

3.18

测量不确定度 uncertainty of measurement

不确定度 uncertainty

根据所用到的信息,表征赋予被测量量值分散性的非负参数。

注1:测量不确定度包括由系统影响引起的分量,如与修正量和测量标准所赋量值有关的分量及定义的不确定度。

有时对估计的系统影响未作修正,而是当作不确定度分量处理。

注2:此参数可以是诸如称为标准不确定度的标准偏差(或其特定倍数),或是说明了包含概率的区间半宽度。

注3:测量不确定度一般由若干分量组成。其中一些分量可根据一系列测量值的统计分布,按测量不确定度的A类评定进行评定,并可用标准差表征。而另一些分量则可根据基于经验或其他信息所获得的概率密度函数,按测量不确定度的B类评定进行评定,也用标准偏差表示。

注4:通常,对于一组给定的信息,测量不确定度是相应于所赋予被测量的值的。该值的改变将导致相应的不确定度的改变。

注5:本定义是按2008版VIM给出的。而在GUM中的定义是:表征合理地赋予被测量之值的分散性,与测量结果相联系的参数。

[JJF 1001—2011,5.18]

3.19

赋值 value assignment

全称酶活性浓度参考物质的特性鉴定 characterization

酶活性浓度参考物质的特性就是该物质中酶活性浓度的量值。对其特性的鉴定(characterization)

过程实际上就是对酶RM赋予酶活性浓度的量值,在本文件中,特性的鉴定常简称为赋值。

[ISO 指南 35,3.4]

4 符号

下列符号适用于本文件。

MS :均方(方差分析)。

S_{bb} :瓶间均匀性的标准差。

S_{lts} :长期稳定性的标准差。

S_r :重复性标准差。

S_{sts} :短期稳定性的标准差。

SS :平方和。

u_{CRM} :有证参考物质赋值的合成标准不确定度。

U_{CRM} :有证参考物质赋值的扩展不确定度。

u_{char} :定值的标准不确定度。

u_{bb} :由瓶间均匀性引入的标准不确定度。

u_{lts} :由长期稳定性引入的标准不确定度。

u_{sts} :由短期稳定性引入的标准不确定度。

5 对参考物质中酶活性浓度赋值的一般过程

5.1 赋值参考实验室网络的组织和合作

5.1.1 参考实验室网络组织者的认定

通过参考实验室网络对参考物质中酶活性浓度赋值首先涉及到赋值参考实验室网络的组织和合作。组织者应由有资质、有权威的校准(参考)实验室承担。该实验室应通过中国合格评定国家认可委员会(CNAS)医学参考测量实验室认可并在卫生系统具有较高的学术水平。

5.1.2 参考实验室网络组织者的职责

5.1.2.1 制定对参考物质赋值和评定其不确定度的实施方案,组织对方案的实施。

5.1.2.2 对从参加网络实验室得到的大量数据,按制定好的方案进行统计和计算。

5.1.2.3 当完成参考物质赋值和评定其不确定度后,将结果提交国家认定的发证机构评审,最后成为有证参考物质(CRM)。

5.1.3 组织者选择和认定参加赋值工作的实验室

组织者应选择参加赋值工作的参考实验室,其资质原则上应通过中国合格评定国家认可委员会(CNAS)医学参考测量实验室认可,也可由组织者确认并报相关单位批准。

5.1.4 参考物质中酶活性浓度赋值方案的制定

5.1.4.1 赋值方案由组织者制定并经参与者讨论。

5.1.4.2 制定方案应重点考虑以下内容:

- 进一步确认待赋值参考物质的定义与特性,内容包括:参考物质拟申报等级、基质、简单制备过程、特性(酶活性浓度量值)、期望赋值和赋值不确定度能达到的水平及其他相关研究资料等;
- 待赋值参考物质的运输和包装方法的设计;
- 必要时进行可行性研究(非必需);

- 样品制备程序和抽样的设计；
- 用于参考物质赋值的测量方法的选择和程序的设计；
- 均匀性实验的设计；
- 稳定性实验的设计；
- 实验室网络为参考物质定值实验的设计；
- 参考物质赋值不确定度评定方法的设计；
- 报告方式与格式的设计。如申请国家发证,按国家规定书写报告。

5.1.5 参考物质中酶活性浓度赋值方案的实施

参考物质中酶活性浓度赋值方案的实施推荐按以下顺序进行：

- a) 测量样品抽样；
- b) 均匀性实验；
- c) 稳定性实验；
- d) 参考实验室网络对酶参考物质定值。

5.1.6 赋值数据的处理

由组织者指定实验室按方案对实验数据进行统计和计算,给出参考物质中酶活性浓度赋值和不确定度。

5.2 赋值报告

由组织者指定实验室完成赋值报告。

6 赋值

6.1 运输

6.1.1 运输时的包装与方法:应选择适宜的包装材料和方法,并按国家规定和要求进行包装、标记和运输,避免引发生物安全问题。

6.1.2 运输周期:应满足酶学测量要求。

6.1.3 运输条件:可选择常温、冰袋或干冰保存等条件。还应注意运输时紫外线、其他光线及湿度的影响。

6.1.4 运输方式:可选择直接送货、邮寄、快运、空运等方式。应选择可靠有信誉的运输公司。

6.2 可行性研究

6.2.1 研究的可行性确认

在进行赋值前应确定是否需进行大规模赋值工作,包括对参考物质的均匀性、稳定性和互换性等基本特性的研究。若参考物质的均匀性和稳定性不满足《标准物质管理办法》中对申报参考物质基本条件的规定或缺乏互换性,就应考虑是否有必要进行大规模赋值工作。

6.2.2 研究中应考虑的问题

6.2.2.1 参考物质中酶的来源

6.2.2.1.1 最佳来源

近年来提倡使用基因工程技术从人细胞中获得各种酶制品,用此类酶制品制备的参考物质易于保

证不同批号产品的一致性,还可能有较好的互换性。

6.2.2.1.2 推荐来源

将从动物组织中提纯的酶制品加入适当的基质中得到酶参考物质。这种方法比较简单,但所加入动物组织酶的特性,如米氏常数、最适反应条件等往往与临床测量人样品中的酶不完全相同,用此法制备的酶参考物质常缺乏互换性。

6.2.2.2 酶参考物质的基质

宜采用人来源的体液。但人来源的体液获取途径有限,不能广泛应用。考虑到牛血清白蛋白与人血清白蛋白结构类似,所以可用牛血清白蛋白溶液代替人来源的体液使用。

6.2.2.3 制备原料

酶制品,非酶纯品。

6.2.2.4 制备方法

将酶制品配成溶液作为酶学测量的二级参考物质,用公认的参考方法进行测量和赋值。

注:在酶活性浓度测量中,目前不可能用酶纯品通过经典的称重法去定量,制成一级参考物质。

6.3 酶参考物质的准备

6.3.1 酶参考物质的适用期和使用期

6.3.1.1 生产者的声称

通常适用期应短于使用期。

6.3.1.2 期望适用期

期望适用期至少1年~2年。

6.3.1.3 延长有效期的方法

6.3.1.3.1 减少水分含量,如:真空冷冻干燥。但应注意过分干燥时,少数样品可能更不稳定。

6.3.1.3.2 灭菌或添加抗生素防止微生物生长。

6.3.1.3.3 -70°C 以下低温冷冻保存。

6.3.1.3.4 使用稳定剂。由于稳定剂可能会改变酶特性,或者产生基质效应,应尽量不使用。但某些特殊情况下须使用稳定剂才能达到要求时,可考虑添加少量稳定剂。

6.3.2 赋值所需参考物质的量

准备足够量的酶参考物质样品,包括如下几项:

——可行性实验所需样品量;

——均匀性实验所需样品量;

——稳定性实验所需样品量(包括适用期频繁监测所需样品量);

——参考实验室网络联合定值所需样品量。

6.4 测量方法的选择

6.4.1 均匀性实验

6.4.1.1 最佳方法:JCTLM 或国家批准的参考方法。

6.4.1.2 推荐方法:自动生化分析仪上使用根据参考方法建立的具有良好精密度的常规方法。

6.4.2 稳定性实验

6.4.2.1 最佳方法:JCTLM 或国家批准的参考方法。

6.4.2.2 推荐方法:自动生化分析仪上使用根据参考方法建立的具有良好精密度的常规方法。

6.4.3 网络联合定值实验

6.4.3.1 定值方法

JCTLM 或国家批准的参考方法。

6.4.3.2 各实验室测量结果的溯源性保证

6.4.3.2.1 所有仪器须经过检定/校准合格。

6.4.3.2.2 赋值项目须参加国际或国家实验室室间能力比对活动并合格。

6.5 均匀性实验

6.5.1 设计

6.5.1.1 预期目标:应根据酶参考物质定义中的参考物质级别确立瓶间变异系数的允许变异范围。一般情况下酶参考物质的瓶间变异系数(CV)应 $\leq 0.5\%$ 。厂家的产品校准品瓶间 CV 应 $\leq 1.0\%$,商品质控品瓶间 CV 应 $\leq 2.0\%$ 。

6.5.1.2 应进行均匀性实验的参考物质类型:固态参考物质、液态参考物质。

6.5.1.3 实验室数量:一个或几个实验室。

6.5.1.4 进行均匀性实验的方法的选择:能满足预期要求的精密度良好的测量方法。不要将测量方法引起的不确定度估计过低,特别是当只能使用精密度较差的方法时。

6.5.1.5 抽样方式、抽样量与测量次数:应按 JJG 1006—1994 的规定进行抽样。每瓶测量次数应不少于 2 次。

6.5.1.6 均匀性实验模式常用的均匀性实验模式见图 1。

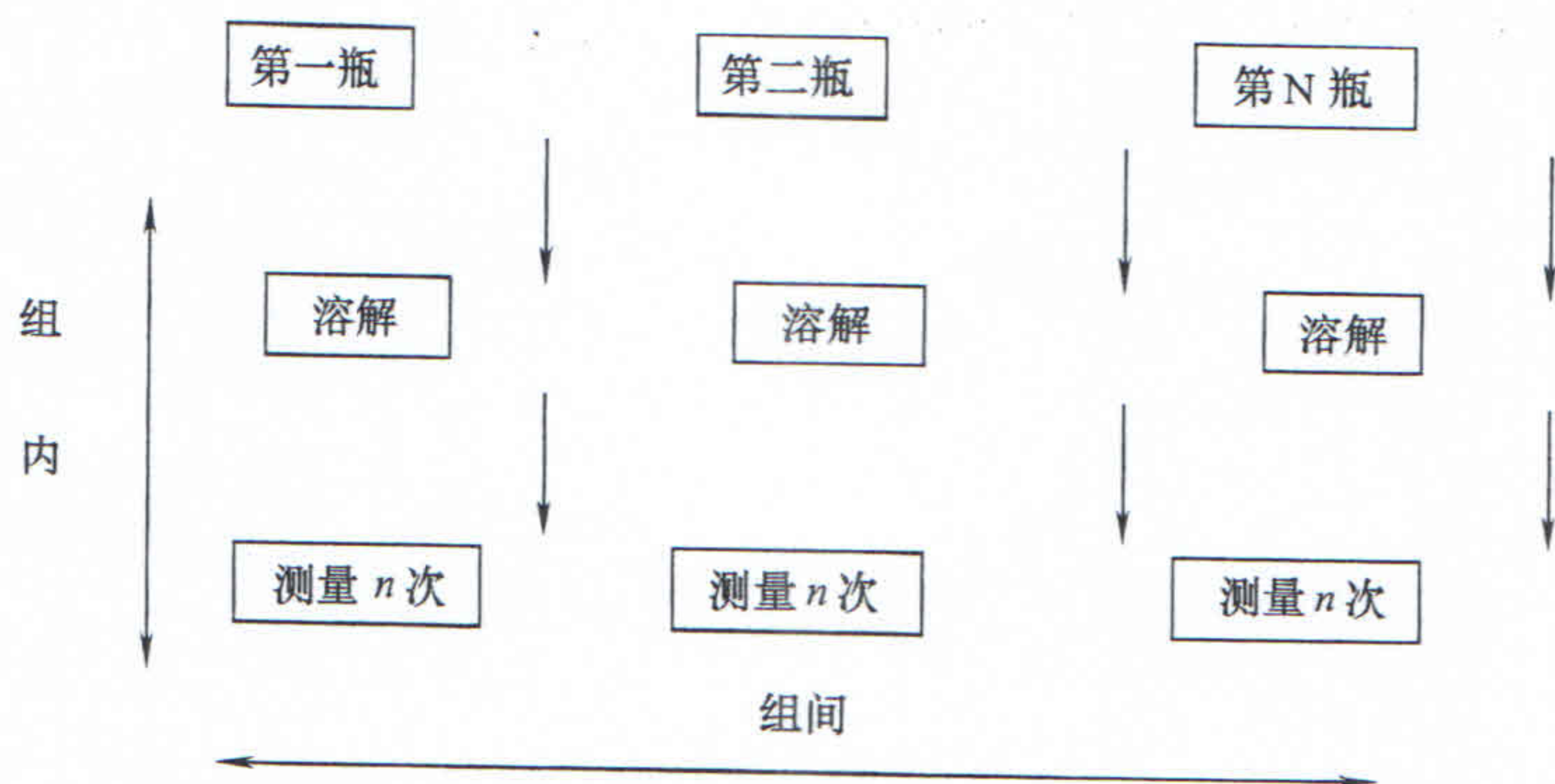


图 1 参考物质均匀性实验模式

6.5.1.7 均匀性实验数据有效性检验基本公式见式(1)。

$$x_{iy} = u + A_i + \epsilon_{iy} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

x_{iy} ——均匀性实验的每个测量值;

- u ——所有 x_{ij} 的数学均值(每瓶均值的均值),如果测量无偏移,则此值即为真值;
- A_i ——瓶间均匀性引起的误差,其方差即瓶间变异;
- ϵ_{ij} ——偶然误差,其方差即重复性变异;
- $i=1\cdots a$ ——抽样瓶序号;
- $j=1\cdots n_i$ 为测量次数的序号。

一般认为瓶间均匀性和测量重复性之间不存在相互影响,它们的误差是独立的。并假设 A_i 值是正态分布,其均值为零,方差为 σ_A^2 ; ϵ 值也是正态分布,其均值为零,方差为 σ^2 。

6.5.1.8 瓶间均匀性计算公式见式(2)。

$$S_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n_0}} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- S_{bb} ——瓶间均匀性的标准差;
- MS_{among} ——组间方差;
- MS_{within} ——组内方差;
- n_0 ——每瓶测量次数。

6.5.2 检验方法

6.5.2.1 抽样

6.5.2.1.1 抽样原则

应保证抽样有代表性。

6.5.2.1.2 抽样方法

6.5.2.1.2.1 抽样方法包括:随机、分层随机或系统抽样。

6.5.2.1.2.2 实际使用最多的抽样方法:随机和分层随机方法。

6.5.2.1.2.3 推荐使用的抽样方法:分层随机方法,能保证所采的样本均匀分布在整个批量中。

6.5.2.1.3 抽样量

6.5.2.1.3.1 计算抽样量时应考虑的因素:

- a) 该批参考物质的分装瓶数;
- b) 期望达到的批间不确定度;
- c) 所用测量方法的精密度大小。

6.5.2.1.3.2 抽样量应遵循 JJG 1006—1994 的规定,包括以下两种情况:

- a) 当样本总量少于 500 瓶时,抽样量不少于 15 瓶;当样本总量大于 500 瓶时,抽样量不少于 25 瓶。
- b) 对于均匀性好的样品,当样本总量少于 500 瓶时,抽样量不少于 10 瓶;当样本总量大于 500 瓶时,抽样量不少于 15 瓶。

6.5.2.2 测量

6.5.2.2.1 测量周期

应在一天一个批次内完成。

6.5.2.2.2 测量方法

6.5.2.2.2.1 最佳方法:JCTLM 或国家批准的参考方法。

6.5.2.2.2.2 推荐方法:自动生化分析仪上使用根据参考方法建立的具有良好精密度的常规方法。

6.5.2.2.3 校准方法

使用自动生化分析仪测量时应在测量前根据厂家说明书规定的方法进行校准。

6.5.2.2.4 室内质控

样本测量前后应分别进行室内质控样本测量。如出现室内质控失控或其他操作问题,则应将此批次数据弃去,另加一个批次测量。

6.5.2.2.5 样本测量次数

每瓶样本至少重复测量 2 次。

6.5.2.2.6 样本测量顺序

为避免在测量过程中出现倾向性误差,有效办法是随机测量,而不是按顺序对同一样本重复测量 2~3 次。若抽样量为 20 瓶,宜按以下顺序测量 2~3 次:

——第一次测量:1-3-5-7-9-11-13-15-17-19-2-4-6-8-10-12-14-16-18-20;

——第二次测量:20-19-18-17-16-15-14-13-12-11-10-9-8-7-6-5-4-3-2-1;

——第三次测量:2-4-6-8-10-12-14-16-18-20-1-3-5-7-9-11-13-15-17-19。

注:如果能证明所使用的自动生化分析仪在同一批次测量的短时间内不存在倾向性变化,也可以顺序对抽样样本进行 2 或 3 次测量。

6.5.2.2.7 测量结果的质量保证

6.5.2.2.7.1 分析批前后质控数据在控。

6.5.2.2.7.2 测量时样本量偏小会影响测量精密度,此时按比例同时加大样本和试剂用量,可明显提高测量的精密度。

6.5.2.3 数据处理

6.5.2.3.1 测量数据有效性判断

6.5.2.3.1.1 实验批质控数据确认:按室内质控规则评价数据有效性。

6.5.2.3.1.2 离群值判断标准:每瓶单次测量数据超出总均值 $\pm 4SD$ 。

6.5.2.3.1.3 数据剔除量:小于总测量数据量的 5%。

6.5.2.3.1.4 如果用分层随机抽样法,将实验数据按抽样前后排列,发现有倾向性变化,往往说明在分装过程有问题。

6.5.2.3.2 有效数据处理(实例参见附录 A)

6.5.2.3.2.1 将有效数据填入表 1。

表 1 瓶间均匀性实验测量数据

瓶号	结果 1 U/L	结果 2 U/L	结果 3 U/L

6.5.2.3.2.2 对表 1 数据进行计算, 求出每瓶 2~3 次测量的平均值、方差, 见表 2。

表 2 每瓶测量结果的均值、方差和测量次数

瓶号	均值 U/L	方差	测量次数

表 2 (续)

瓶号	均值 U/L	方差	测量次数

6.5.2.3.2.3 从表 2 计算出组间方差 MS_{among} 、组内方差 MS_{within} , 见表 3。

表 3 瓶间均匀性实验的 ANOVA 表

变异来源	SS	自由度	MS
瓶间变异			
瓶内变异			
总变异			

6.5.2.3.2.4 瓶间均匀性的标准差(S_{bb})和重复性标准差(S_r)的计算。

按公式(2)计算 S_{bb} 。

按公式(3)计算 S_r 。

$$S_r = \sqrt{MS_{within}} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

S_r ——重复性标准差;

MS_{within} ——组内方差。

6.5.2.3.2.5 由瓶间均匀性引入的标准不确定度(u_{bb}):如所选用测量方法有良好的批内精密度,例如变异系数 $\leq 1.0\%$,就不需对上述数据进行修正,此时按公式(4)计算。

$$u_{bb} = S_{bb} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

u_{bb} ——由瓶间均匀性引入的标准不确定度;

S_{bb} ——瓶间均匀性的标准差。

注:由于酶参考物质多以真溶液状态存在或在此基础上除去水分以冻干形式保存,一般不存在瓶内不均匀性的问题。

但要注意某些情况下,例如融冻后,如果混匀不充分时,会出现瓶内分布的不均匀。

6.6 稳定性实验

6.6.1 设计

6.6.1.1 目的

研究参考物质在制备后贮存在生产者规定条件下的稳定性,给使用者提供一个明确的使用该酶参考物质的期限。

6.6.1.2 内容

6.6.1.2.1 运输条件(短期)稳定性实验。

6.6.1.2.2 贮存条件(长期)稳定性实验,分两个阶段进行,包括早期稳定性实验和整个适用期稳定性的监测。

6.6.1.3 预期目标

6.6.1.3.1 短期稳定性

采用冷冻包装、快递运输的情况下至少四天。以计划运输到达使用者时间的2~4倍计算,即4 d~8 d。应设计3~5个监测时间点。

6.6.1.3.2 长期稳定性

6.6.1.3.2.1 早期稳定性:根据《标准物质管理办法》的规定,申报标准物质时稳定性要求为适用条件下贮存至少6个月。

6.6.1.3.2.2 整个适用期稳定性的监测:时间应覆盖从标准物质生产到使用完毕。大多可持续24个月~36个月。应设计5~6个监测时间点。

6.6.1.4 实验室数量

一个或几个实验室。

6.6.1.5 进行稳定性实验的方法的选择

能满足预期要求的精密度良好的测量方法。不应将测量方法引起的不确定度估计过低,特别是当只能使用精密度较差的方法时。

6.6.1.6 实验周期

6.6.1.6.1 短期稳定性实验:至少4 d,不少于3个监测点。

6.6.1.6.2 早期稳定性实验:至少6个月,不少于4个监测点。

6.6.1.6.3 适用期稳定性的监测:从标准物质生产到用完为止,大多可持续24个月~36个月,不少于5个监测点。

6.6.1.7 测量间隔时间、抽样方式、抽样量与测量次数

应根据统计学原理进行。每个时间点至少取2瓶,每瓶至少重复3次。

6.6.1.8 稳定性实验模式

6.6.1.8.1 短期稳定性实验:推荐采用同步等时(isochronous)稳定性实验模式。

6.6.1.8.2 长期稳定性实验要求如下:

- a) 宜采用经典稳定性实验模式;
- b) 有条件的实验室,例如,有液氮-150 °C特定贮存条件的前提下可采用同步等时(isochronous)稳定性实验模式。

注1: 经典稳定性实验模式:同一时期制备的同一批号参考物质贮存在生产者规定的相同条件下,经过不同时间后分别进行测量。虽由同一实验室进行测量,但却是在复现性、而不是在重复性条件下进行的,容易受到测量系统不稳定性的影响,导致不确定度较大。

注2: 同步等时稳定性实验模式:收集经历不同变化时间的参考物质样品,分别贮存在稳定的条件下,如-150 °C。待收集到最后一批参考物质样品时,同时用精密度良好的方法测量所有收集到的不同时间的样品。即所有测量在同一时间、同一批次、同一校准中进行的,是在重复性条件下进行的。此法可有效地减少不同时间测量时数据的变异,不能及时测量的样本应贮存在低温,如-70 °C或-150 °C,以保证样品的稳定。

注3: 同步等时稳定性实验模式的不确定度一般比经典稳定性实验模式的不确定度小,保证稳定性实验数据更具有“决定性”。但此法只适用于不同时间进行批量生产的酶参考物质,或者能保证在贮存条件下,酶参考物质不产生退变,例如在特定贮存条件(如液氮-150 °C)下其退变速度明显小于贮存条件(-70 °C或4 °C),否则需采用经典研究方法。

6.6.1.9 稳定性实验数据有效性检验基本公式

稳定性试验数据有效性检验基本公式见式(5)。

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \epsilon \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- Y —— 参考物质贮存不同时期后的赋值;
- β_0 —— 回归方程式的截距;
- β_i —— 回归方程式的斜率数;
- X_i —— 时间;
- ϵ —— 偶然误差。

观察数据是否有变化趋势。一般都假设参考物质的变化是逐步地、缓慢地,所以对稳定性实验数据进行线性分析。最后可通过 F-test 判断变化趋势是否有意义。

6.6.1.10 稳定性实验的结果判读

6.6.1.10.1 除已知有特定变化模式外,应采用线性方程式来判断。

6.6.1.10.2 线性方程式的两个重要参数:斜率和截距。

6.6.1.10.3 数据点:至少应有 3~4 点数据。若采用的变化函数有较多参数,则所采用的数据点也应更多。

6.6.1.11 稳定性计算

稳定性的计算见公式(6)。

$$S(b) = \frac{S}{\sqrt{S_{xx}}} \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

- S(b) —— 斜率的不确定度;
- S —— 直线上各点的标准差;
- $S_{(xx)}$ —— 时间偏差的平方和。

6.6.2 早期稳定性实验

6.6.2.1 抽样

6.6.2.1.1 抽样原则

参见 6.5.2.1.1。

6.6.2.1.2 抽样方法

参见 6.5.2.1.2。

6.6.2.1.3 抽样量

6.6.2.1.3.1 计算抽样量时应考虑的因素：

- 瓶间均匀性的标准差(S_{bb})和重复性标准差(S_r)；
- 期望的不确定度；
- 期望的贮存期；
- 变化趋势。

当 $S_{bb} < S_r$ 时,测量的瓶数和每瓶测量次数都可以较少；

当 $S_{bb} \geq S_r$ 时,测量的瓶数和每瓶测量次数应增加；

当 S_{bb} 和 S_r 均较大时,不宜对酶参考物质稳定性的不确定度给出正确评定。

6.6.2.1.3.2 抽样量的计算,每个时间点应不少于 2 瓶。

6.6.2.2 样本预处理(同步等时稳定性实验模式)

将样本从生产者声称的贮存条件中取出,做好标记,放入特定贮存条件(如液氮 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)中贮存。

注:按经典稳定性实验模式测量时不需进行样本预处理,只是按监测时间点直接测量即可。

6.6.2.3 测量

6.6.2.3.1 测量周期

至少 6 个月。

6.6.2.3.2 测量频数(时间点)

6.6.2.3.2.1 不少于 4 个监测点。

6.6.2.3.2.2 经典稳定性实验模式:每月将样本从贮存条件中取出,直接测量。

6.6.2.3.2.3 同步等时稳定性实验模式:每月将样本从贮存条件中取出,做好标记,放入特定贮存条件(如液氮 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)中保存,第 6 个月集中测量。

6.6.2.3.3 测量方法

6.6.2.3.3.1 最佳方法:JCTLM 或国家批准的参考方法。

6.6.2.3.3.2 推荐方法:自动生化分析仪上使用根据参考方法建立的具有良好精密度的常规方法。

6.6.2.3.4 校准方法

使用自动生化分析仪测量时应在测量前根据厂家说明书规定的方法进行校准。

6.6.2.3.5 室内质控

样本测量前后应分别进行室内质控样本测量。如出现室内质控失控或其他操作问题,则应将此批次数据弃去,另加一个批次测量。

6.6.2.3.6 样本测量次数

每瓶样本至少重复测量 3 次。

注:为尽早取得稳定性资料,可进行加速实验。如可将贮存在 4℃~8℃的冷冻干燥参考物质的贮存温度升高,例如放在 25℃或 37℃,时间常为 2 月,根据一定公式计算出 4℃~8℃的贮存期。但对在 -70℃度贮存的液态酶参考物质,目前尚无行业认可的加速实验的方法。

6.6.2.3.7 数据处理

6.6.2.3.8 测量数据有效性判断

6.6.2.3.8.1 实验批质控数据确认:按室内质控规则评价数据有效性。

6.6.2.3.8.2 离群值判断标准:每瓶单次测量数据超出总均值±4SD。

6.6.2.3.8.3 数据剔除量:小于总测量数据量的 5%。

6.6.2.3.9 有效数据处理(实例参见附录 B)

6.6.2.3.9.1 将有效数据填入表 4。

表 4 早期稳定性实验数据

时间 月	均值 U/L
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	

6.6.2.3.9.2 数据分析:对稳定性实验数据评估的第一步是观察数据是否有变化趋势。一般都假设参考物质的变化是逐步地、缓慢地,所以对稳定性实验数据进行线性分析。最后可通过 F-test 判断变化趋势是否有意义。

公式(7)表述了稳定性实验的基本模式。它设想参考物质贮存不同时期后,赋值 Y 变化应为:

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \epsilon \quad \dots\dots\dots(7)$$

式中:

Y ——参考物质贮存不同时期后的赋值;

β_0 ——回归方程式的截距;

β_i ——回归方程式的斜率;

X_i ——时间;

ϵ ——偶然误差。

6.6.2.3.9.3 按公式(8)计算斜率(b)。

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \dots\dots\dots (8)$$

式中:

- x_i —— 时间点;
- y_i —— 各时间点测量结果均值;
- n —— 测量频数(时间点);
- S_{xy} —— 各时间点时间偏差与测量结果偏差乘积之和;
- S_{xx} —— 时间偏差的平方和。

6.6.2.3.9.4 按公式(9)计算截距(a)。

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \dots\dots\dots (9)$$

式中:

- \bar{x} —— 时间的均值;
- \bar{y} —— 各时间点测量结果均值的均值;
- a —— 截距;
- b —— 斜率。

6.6.2.3.9.5 按公式(10)计算直线上各点的标准差(S)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - a - b x_i)^2}{n - 2}} \dots\dots\dots (10)$$

式中:

- S —— 直线上各点的标准差;
- x_i —— 时间点;
- y_i —— 各时间点测量结果均值;
- a —— 截距;
- b —— 斜率;
- n —— 测量频数(时间点)。

6.6.2.3.9.6 按公式(11)计算斜率的不确定度[$S(b)$]。

$$S(b) = \frac{S}{\sqrt{S_{xx}}} \dots\dots\dots (11)$$

式中:

- $S(b)$ —— 斜率的不确定度;
- S —— 直线上各点的标准差;
- S_{xx} —— 时间偏差的平方和。

6.6.2.3.10 结果判断

6.6.2.3.10.1 若 $|b| < t_{(0.05, n-2)} \times S(b)$, 可判断斜率稳定。

6.6.2.3.10.2 若 $|b| \geq t_{(0.05, n-2)} \times S(b)$, 可判断斜率不稳定。

注1: $t_{(0.05, n-2)}$ 从统计学书籍中查得。

注2: 根据所期望酶参考物质赋值的不确定度、所希望的适用期以及在此期间的变化趋势确定是否继续申请发证。

注3: 通过早期稳定性实验, 可初步判断此酶参考物质是否稳定, 是否已可用于实际溯源工作。

注4: 只有当测量方法的精密度很好以及瓶间变异较小时,其结果才是有意义的。可以将测量方法的精密度结果与均匀性实验以及参考物质赋值不确定度进行比较。当瓶间不均匀性较大,如 s_{bb} 等于或大于测量方法的标准差,则应在每一时间点,取更多瓶 RM 进行测量,以减少不均匀性的影响。

6.6.2.3.11 由早(长)期稳定性引入的标准不确定度(u_{lts})的计算

按公式(12)计算。

$$u_{lts} = S(b) \times t \quad \dots\dots\dots(12)$$

式中:

u_{lts} ——由早(长)期稳定性引入的标准不确定度;

$S(b)$ ——斜率的不确定度;

t ——早期稳定性实验的周期。

或者按公式(13)计算:

$$u_{lts} = \frac{RSD}{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}} \times T \quad \dots\dots\dots(13)$$

式中:

u_{lts} ——由早(长)期稳定性引入的标准不确定度;

y_i ——各时间点测量结果均值;

\bar{y} ——各时间点测量结果均值的均值;

T ——酶参考物质适用期;

RSD ——稳定性实验的相对标准差。

当由早(长)期稳定性引入的标准不确定度(u_{lts})成为酶参考物质赋值扩展不确定度的主要组成分量时,如 u_{lts} 比其他任何一个组成分量不确定度还大 30%,应考虑酶参考物质不稳定。

6.6.2.4 适用期的初步确定

若由早(长)期稳定性引入的标准不确定度 u_{lts} 仍在不确定度允许范围内,可初步确定该酶参考物质的适用期为实验的测量周期。

6.6.3 适用期内酶参考物质稳定性的监测

6.6.3.1 监测目的

6.6.3.1.1 通过对参考物质整个适用期间的实时监测,决定最终使用期或真正的失效期。

6.6.3.1.2 和早期稳定性实验不同,监测实验只说明证书提供的不确定度仍有效,一般没有必要根据实时监测实验结果重新计算不确定度。

6.6.3.1.3 如果监测结果达不到要求,说明此酶参考物质的赋值和(或)不确定度已有明显变化,不在证书给出的不确定度范围内,此时可有二个合理的选择:

- 取消该参考物质的证书;
- 重新认证,重新赋值。

6.6.3.2 抽样与样本预处理

抽样与样本处理见 6.6.2.1 和 6.6.2.2。

6.6.3.3 稳定性监测

6.6.3.3.1 监测周期:从标准物质生产到用完为止,大多可持续 24 个月~36 个月。

6.6.3.3.2 监测模式:宜采用同步等时稳定性实验模式。

- 6.6.3.3.3 测量频数(时间点):宜根据参考物质稳定性情况,不少于5个监测时间点。
6.6.3.3.4 测量方法、校准方法、室内质控、样本测量次数:参照6.6.2.3.3~6.6.2.3.6的步骤。

6.6.3.4 数据处理

6.6.3.4.1 测量数据有效性判断

- 6.6.3.4.1.1 实验批质控数据确认:按室内质控规则评价数据有效性。
6.6.3.4.1.2 离群值判断标准:每瓶单次测量数据超出总均值 $\pm 4SD$ 。
6.6.3.4.1.3 数据剔除量:小于总测量数据量的5%。

6.6.3.4.2 数据分析

将每个时间点的测量均值与早期稳定性实验中所得数据,进行趋势分析。如无明显变化趋势,可认为此酶参考物质可继续使用。参照6.6.2.3.9.2的步骤进行。

6.6.3.5 监测结果评估

应明确监测结果只是要证实证书声称的不确定度 U_{CRM} 无有意义的变化,而不是要改变它。

可按公式(14)进行判断:

$$|x_{CRM} - x_{meas}| \leq k \times \sqrt{u_{CRM}^2 + u_{meas}^2} \dots\dots\dots(14)$$

式中:

- x_{CRM} ——参考物质的赋值;
 x_{meas} ——某次监测该参考物质所得的量值;
 k ——含因子,一般取2,表明可信度为95%;
 u_{CRM} ——酶参考物质的标准不确定度;
 u_{meas} ——某次测量的标准不确定度。

注1:理想的情况是:进行监测实验室所用测量方法的不确定度 u_{meas} 应尽可能小,应小于 u_{CRM} 。由于是在不同时期进行测量,如何让重现性不精密度足够小,使 u_{meas} 小于 u_{CRM} 通常较难。

注2:在对酶参考物质进行监测时,不能用被监测的参考物质来证实测量的有效性。不可能同时在一个实验中核查两件事。

6.6.4 短期稳定性实验

6.6.4.1 抽样

6.6.4.1.1 抽样原则与抽样方法

抽样原则与抽样方法分别见6.6.2.1.1和6.6.2.1.2。

6.6.4.1.2 抽样量

- 6.6.4.1.2.1 均匀性实验证实无明显瓶间差的液态酶参考物质:每个时间点测量不少于2瓶。
6.6.4.1.2.2 冷冻干燥制品:每个时间点至少测量4瓶,最好为6~10瓶。

6.6.4.2 样本预处理(同步等时稳定性实验模式)

将样本从生产者声称的贮存条件中取出,做好标记,放入特定贮存条件(如液氮 $-150^{\circ}C$)中贮存。

6.6.4.3 测量

- 6.6.4.3.1 测量周期:不少于4d。

6.6.4.3.2 测量频数(时间点):不少于3个时间点。

6.6.4.3.3 测量方法、校准方法、室内质控、样本测量次数:参照6.6.2.3.3~6.6.2.3.6的步骤。

6.6.4.4 数据处理

参照早期稳定性实验的数据处理方法,计算各点测量数据的斜率和切距。用统计学方法计算是否有显著意义的变化趋势。若不存在明显变化,可认为短期稳定性的不确定度 u_{sts} 为零。

注:在进行短期稳定性实验时,应注意对酶参考物质互换性的影响,有可能参考物质中酶含量无显著变化,但酶的结构出现变化,从而影响了酶参考物质的互换性。此时有必要追加酶参考物质在运输后的互换性的验证实验。

6.7 网络联合定值

6.7.1 设计

6.7.1.1 预期目标

实验室间测量允许变异范围:测量总均值 $\pm 5.0\%$;实验室内测量变异 $\leq 2.0\%$ 。

6.7.1.2 定值实验室数目

依据所采用方法的复杂程度和成熟程度由参考物质生产者或委托权威机构制定。

6.7.1.3 参加网络定值实验室的要求和资格

6.7.1.3.1 应能运行 JCTLM 或我国批准的参考方法。

6.7.1.3.2 参考方法测量结果应能溯源至 JCTLM 或我国批准的参考物质。

6.7.1.3.3 实验室应参加 IFCC 组织的国际参考实验室或我国酶学参考实验室室间质量评价,测量结果应合格。

6.7.1.4 网络联合定值方法的选择

JCTLM 或我国批准的参考方法。

6.7.1.5 样本的运输、接收和贮存

严格按照参考物质生产者提供的有关参考物质运输条件、贮存条件说明进行。

6.7.1.6 测量日数、每日测量瓶数、每瓶重复测量次数

应至少测量2日,每日测量1~3瓶,每瓶样本至少重复测量3次。

6.7.1.7 各参考实验室测量数据的收集

各参考实验室将测量数据填入由组织者设计并发放的数据处理表中,并在规定时间内回报给组织者。

6.7.1.8 各参考实验室测量数据的评估,即离群值的剔除

利用统计学方法对无效的实验室数据和离群值进行剔除。

6.7.1.9 网络联合定值结果的计算

6.7.1.9.1 网络联合定值均值的计算

6.7.1.9.1.1 数据分布规则时,网络联合定值均值等于有效实验室测量结果均值的数学均值。

6.7.1.9.1.2 数据分布不规则时,应采用相关统计方法,如取中值或修饰均值作为最终的均值。

注:当满足下列两个假设时按 6.7.1.9.1.1 的方法计算:

- 各参考实验室给参考物质的赋值都具有可接受的准确性;
- 实验室的每个测量结果的差异仅限于统计学范畴。

6.7.1.9.2 网络联合定值(测量)不确定度的计算

按公式(15)计算。

$$u_{\text{char}} = \frac{SD_{\text{char}}}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots (15)$$

式中:

- u_{char} ——定值标准不确定度;
- SD_{char} ——每个实验室测量均值的标准差;
- n ——有效的网络实验室的数目。

或按公式(16)计算。

$$u_{\text{char}} = \sqrt{\frac{S_L^2}{n} + \frac{S_r^2}{nn_0}} \dots\dots\dots (16)$$

式中:

- u_{char} ——定值的标准不确定度;
- S_L ——实验室间标准差,按公式 $S_L = \sqrt{\frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n_0}}$ 计算。其中, MS_{among} :组间方差; MS_{within} :组内方差;
- S_r ——实验室内标准差,按公式(3)计算;
- n ——有效的网络实验室的数目;
- n_0 ——每个实验室测量次数。

6.7.2 定值

6.7.2.1 确定参加网络实验室的数目

6.7.2.1.1 与测量方法和程序有关:若方法和程序复杂,实验室数目宜增加。

6.7.2.1.2 测量方法成熟:2~3个。

注:常见于用原级参考方法对有基质效应的参考物质的赋值。指由一个参考实验室赋值,由其他 1~2 个参考实验室验证。

6.7.2.1.3 方法和程序复杂,但每个参加实验室的结果在计量学和技术上均有效:5~8个。

6.7.2.1.4 如不可避免地出现某些参考实验室的结果在统计学上或技术上无法接受:至少 10 个,最好 15 个。

6.7.2.2 样本发放

6.7.2.2.1 发放量:每个实验室应至少 3 瓶。

6.7.2.2.2 运输条件:按照短期稳定性实验确定的条件运输。

6.7.2.3 测量

6.7.2.3.1 测量周期

测量周期应不少于 2 d。

6.7.2.3.2 测量方法

JCTLM 或我国批准的参考方法。

6.7.2.3.3 室内质控

样本测量前后应分别进行室内质控样本测量。如出现室内质控失控或其他操作问题,则应将此批数据弃去,另加一个批次测量。

6.7.2.3.4 每日测量瓶数

每日测量至少一瓶。

6.7.2.3.5 每瓶样本测量次数

每瓶样本至少重复测量 3 次。

6.7.2.4 数据处理(实例参见附录 C)

6.7.2.4.1 组织者收集网络中各实验室回报的测量结果

每个参加实验室应将测量结果统一填入组织者发放的结果回报表中,并在规定期限内回报给组织者。结果回报表可参考表 5~表 7 设计。

表 5 测量方法正确度验证表

实验室编号 _____ 实验室名称 _____
 测量方法 _____ 参考物质生产者 _____
 参考物质名称 _____ 分析物名称 _____

正确度验证 用标准物质	结果 1 U/L	结果 2 U/L	结果 3 U/L	结果 4 U/L	结果 5 U/L	结果 6 U/L	均值 U/L	标准差 U/L	CV %
CRM									

表 6 测量期间室内质控表

实验室编号 _____ 实验室名称 _____
 测量方法 _____ 参考物质生产者 _____
 参考物质名称 _____ 分析物名称 _____

项目	第 1 日室内质控		第 2 日室内质控	
	测量前	测量后	测量前	测量后
第一次 U/L				
第二次 U/L				
均值 U/L				
标准差 U/L				
CV%				
当日均值 U/L				
当日标准差 U/L				
当日 CV%				

表 7 参考物质测量结果表

实验室编号 _____ 实验室名称 _____
 测量方法 _____ 参考物质生产者 _____
 参考物质名称 _____ 分析物名称 _____

	第 1 日	第 2 日
结果 1/U/L		
结果 2/U/L		
结果 3/U/L		
结果 4/U/L		
结果 5/U/L		
当日均值/U/L		
当日标准差/U/L		
当日 CV%		
两日均值		
两日标准差		
两日 CV/%		
扩展不确定度($k=2$)		

6.7.2.4.2 单一实验室测量数据有效性判断

6.7.2.4.2.1 实验日质控数据确认:按室内质控规则评价数据有效性。

6.7.2.4.2.2 离群值判断标准:每瓶单次测量数据超出总均值 $\pm 4SD$ 。

6.7.2.4.2.3 数据剔除量:小于总测量数据量的 5%。

6.7.2.4.3 各实验室有效测量结果汇总

汇总表可参考表 8 设计。

表 8 实验室参考物质有效测量结果汇总表

测量方法 _____ 参考物质生产者 _____
 参考物质名称 _____ 分析物名称 _____

	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 n^a
单一实验室均值/(U/L)				
总均值/(U/L)				
总标准差/(U/L)				
总 CV/%				
^a 所有实验室数目。				

6.7.2.4.4 各实验室均值的分布图

通常组织良好的实验室网络的数据结果呈正态分布。数据分布情况对参考物质赋值和不确定度的

评定影响较小,若数据不是明显偏态,可直接应用。若出现二个甚至更多的群(clusters)(峰),应根据出现的原因重新设计赋值方案并赋值。

6.7.2.4.5 无效实验室剔除标准

- 6.7.2.4.5.1 单一实验室结果的变异系数明显比其他实验室大,超出组织者规定的允许范围。
- 6.7.2.4.5.2 单一实验室的结果明显不同于其他实验室。若单一实验室测量均值超出所有实验室总均值±4SD,该实验室的所有结果剔除。
- 6.7.2.4.5.3 兼有 6.7.2.4.5.1 和 6.7.2.4.5.2 两种情况的实验室。

注:本标准建议可按照 IFCC RELA 计划提出的标准(单一实验室均值偏离总均值±5%左右)或单一实验室测量变异系数>2%时,在计算赋值和不确定度时,可将这些实验室剔除。此标准低于美国 CDC 胆固醇测量网络实验室标准(偏倚≤1%,变异系数≤1%)。

6.7.2.4.6 有效数据处理

6.7.2.4.6.1 实验室网络联合定值结果(x_{char})按公式(17)计算。

$$x_{char} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n} \dots\dots\dots(17)$$

式中:

- x_{char} ——实验室网络联合定值结果的均值;
- n ——有效的网络实验室数目;
- \bar{x}_i ——单一实验室测量均值。

6.7.2.4.6.2 定值的标准不确定度(u_{char})按公式(18)计算。

$$u_{char} = \frac{SD_{char}}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots(18)$$

式中:

- u_{char} ——定值的标准不确定度;
- SD_{char} ——实验室网络联合定值结果的标准差;
- n ——有效的网络实验室的数目。

或按公式(19)计算。

$$u_{char} = \sqrt{\frac{S_L^2}{n} + \frac{S_r^2}{nn_0}} \dots\dots\dots(19)$$

$$S_L = \sqrt{\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n_0}}$$

式中:

- u_{char} ——定值的标准不确定度;
- S_L ——实验室间标准差;
- MS_{among} ——组间方差;
- MS_{within} ——组内方差;
- S_r ——实验室内标准差,按公式(3)计算;
- n ——有效的网络实验室的数目;
- n_0 ——每个实验室测量次数。

6.8 参考物质赋值不确定度的评定

6.8.1 不确定度主要分量来源

不确定度主要分量来源有：

- 由瓶间均匀性引入的不确定度；
- 由早(长)期稳定性引入的不确定度；
- 由短期稳定性引入的不确定度；
- 由网络联合定值引入的不确定度。

6.8.2 不确定度分量计算

6.8.2.1 由瓶间均匀性引入的相对标准不确定度： $u_{rel}(bb)$

$u_{rel}(bb)$ 按公式(20)计算。

$$u_{rel}(bb) = \frac{u_{bb}}{x_{bb}} = \frac{\sqrt{\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n_0}}}{x_{bb}} \dots\dots\dots(20)$$

式中：

- $u_{rel}(bb)$ ——由瓶间均匀性引入的相对标准不确定度；
- x_{bb} ——均匀性实验测量结果的均值；
- MS_{among} ——组间方差；
- MS_{within} ——组内方差；
- n_0 ——每瓶测量次数。

6.8.2.2 由早(长)期稳定性引入的相对标准不确定度： $u_{rel}(lts)$

$u_{rel}(lts)$ 按公式(21)计算。

$$u_{rel}(lts) = \frac{u_{lts}}{x_{lts}} = \frac{S(b) \times t}{x_{lts}} \dots\dots\dots(21)$$

式中：

- u_{lts} ——由早(长)期稳定性引入的相对标准不确定度；
- x_{lts} ——早期稳定性实验测量结果的均值；
- $S(b)$ ——斜率的不确定度；
- t ——早期稳定性实验的周期。

或者按公式(22)计算。

$$u_{rel}(lts) = \frac{u_{lts}}{x_{lts}} = \frac{\frac{RSD}{\sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}} \times T}{x_{lts}} \dots\dots\dots(22)$$

式中：

- u_{lts} ——由早(长)期稳定性引入的相对标准不确定度；
- x_{lts} ——早期稳定性实验测量结果的均值；
- y_i ——各时间点测量结果均值；
- \bar{y} ——各时间点测量结果均值的均值；
- T ——酶参考物质适用期；
- RSD ——稳定性实验的相对标准差。

6.8.2.3 由短期稳定性引入的相对标准不确定度： $u_{rel}(sts)$

$u_{rel}(sts)$ 按公式(23)计算。

$$u_{rel}(sts) = \frac{u_{sts}}{x_{sts}} = \frac{S(b) \times t_{sts}}{x_{sts}} \dots\dots\dots (23)$$

式中:

- u_{sts} ——由短期稳定性引入的相对标准不确定度;
 - x_{sts} ——短稳定性实验测量结果的均值;
 - $S(b)$ ——斜率的不确定度;
 - t_{sts} ——短期稳定性实验的周期。
- 或者按公式(24)计算。

$$u_{rel}(sts) = \frac{u_{sts}}{x_{sts}} = \frac{\frac{RSD}{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}} \times T_{sts}}{x_{sts}} \dots\dots\dots (24)$$

式中:

- u_{sts} ——由短期稳定性引入的相对标准不确定度;
- x_{sts} ——短期稳定性实验测量结果的均值;
- y_i ——各时间点测量结果均值;
- \bar{y} ——各时间点测量结果均值的均值;
- T_{sts} ——酶参考物质适用期
- RSD ——稳定性实验的相对标准差。

6.8.2.4 定值的相对标准不确定度: $u_{rel}(char)$

$u_{rel}(char)$ 按公式(25)计算。

$$u_{rel}(char) = \frac{u_{char}}{x_{char}} = \frac{SD_{char}}{x_{char} \times \sqrt{n}} \dots\dots\dots (25)$$

式中:

- $u_{rel}(char)$ ——定值的相对标准不确定度;
- x_{char} ——实验室网络联合定值结果的均值;
- SD_{char} ——实验室网络联合定值结果的标准差;
- n ——网络实验室的数目。

或按公式(26)计算:

$$u_{rel}(char) = \frac{u_{char}}{x_{char}} = \frac{\sqrt{\frac{S_L^2}{n} + \frac{S_r^2}{nn_0}}}{x_{char}} \dots\dots\dots (26)$$

式中:

- $u_{rel}(char)$ ——定值的相对标准不确定度;
- x_{char} ——实验室网络联合定值结果的均值;
- SD_{char} ——实验室网络联合定值结果的标准差;
- S_L ——实验室间标准差,按公式 $S_L = \sqrt{\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n_0}}$ 计算。其中, MS_{among} 为组间方差;
 MS_{within} :组内方差;
- S_r ——实验室内标准差,按公式(3)计算;
- n ——有效的网络实验室的数目;
- n_0 ——每个实验室测量次数。

6.8.3 相对合成标准不确定度 $[u_{rel}(CRM)]$ 的计算

$u_{rel}(CRM)$ 按公式(27)计算:

$$u_{\text{rel}}(\text{CRM}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\text{bb}) + u_{\text{rel}}^2(\text{lbs}) + u_{\text{rel}}^2(\text{sts}) + u_{\text{rel}}^2(\text{char})} \dots\dots\dots(27)$$

式中:

- $u_{\text{rel}}(\text{bb})$ ——由瓶间均匀性引入的相对标准不确定度;
- $u_{\text{rel}}(\text{lbs})$ ——由早(长)期稳定性引入的相对标准不确定度;
- $u_{\text{rel}}(\text{sts})$ ——由短期稳定性引入的相对标准不确定度;
- $u_{\text{rel}}(\text{char})$ ——定值的相对标准不确定度。

6.8.4 扩展不确定度(U_{CRM})的计算

6.8.4.1 包含因子(置信区间的选择)

6.8.4.1.1 通常根据数据分布特性和置信水平(一般取 95%)进行选择。如果数据是正态分布,宜取包含因子 $k=2$;如果数据非正态分布,则应说明其置信区间。

6.8.4.1.2 当自由度(有效)值低时,也可以 Student t-分布取代指定包含因子。

6.8.4.2 扩展不确定度(U_{CRM})

U_{CRM} 按公式(28)计算:

$$U_{\text{CRM}} = k \times u_{\text{rel}}(\text{CRM}) \times x_{\text{char}} \dots\dots\dots(28)$$

式中:

- k ——包含因子,一般取 $k=2$;
- $u_{\text{rel}}(\text{CRM})$ ——相对合成标准不确定度;
- x_{char} ——实验室网络联合定值结果的均值。

6.9 赋值报告

6.9.1 完成者

由组织者指定实验室完成。

6.9.2 结果表达方式

6.9.2.1 参考物质的赋值 x_{CRM} 用(29)式表示。

$$x_{\text{CRM}} = x_{\text{char}} \pm U_{\text{CRM}} \dots\dots\dots(29)$$

式中:

- x_{CRM} ——酶参考物质的赋值;
- x_{char} ——实验室网络联合定值结果的均值;
- U_{CRM} ——赋值的扩展不确定度。

6.9.2.2 结果应注明包含因子或置信区间。

附 录 A
(资料性附录)
瓶间均匀性实验有效数据处理实例

A.1 实例简述

本例中采用随机抽样原则,抽样 20 瓶,每瓶测量 2 次。

A.2 数据录入

将有效数据填入表 A.1。

表 A.1 瓶间均匀性实验测量数据

瓶号	结果 1 U/L	结果 2 U/L
1	241.2	240.9
2	238.6	239.1
3	241.5	240.0
4	241.3	243.1
5	241.9	241.9
6	238.8	241.5
7	238.3	242.7
8	237.1	239.8
9	240.4	241.4
10	239.1	242.1
11	239.1	239.6
12	237.4	239.1
13	238.0	241.8
14	238.5	242.4
15	237.2	238.4
16	239.1	240.9
17	238.7	239.5
18	237.5	239.9
19	237.4	239.6
20	238.0	238.7

A.3 由瓶间均匀性引入的标准不确定度(u_{bb})的计算

A.3.1 对表 A.1 数据进行计算

求出每瓶二次测量的平均值、方差,见表 A.2:

表 A.2 每瓶测量结果的均值、方差和测量次数

瓶号	均值 U/L	方差	测量次数
1	241.1	0.04	2
2	238.9	0.13	2
3	240.8	1.13	2
4	242.2	1.62	2
5	241.9	0.00	2
6	240.2	3.65	2
7	240.5	9.68	2
8	238.5	3.65	2
9	240.9	0.50	2
10	240.6	4.50	2
11	239.4	0.13	2
12	238.3	1.45	2
13	239.9	7.22	2
14	240.5	7.61	2
15	237.8	0.72	2
16	240.0	1.62	2
17	239.1	0.32	2
18	238.7	2.88	2
19	238.5	2.42	2
20	238.4	0.25	2

A.3.2 计算组间方差 MS_{among} 和组内方差 MS_{within}

从表 A.2 计算出组间方差和组内方差见表 A.3。

表 A.3 瓶间均匀性实验的 ANOVA 表

变异来源	SS	自由度	MS
瓶间变异	60.8	19	3.20
瓶内变异	49.5	20	2.48
总变异	110.3	39	

A.3.3 瓶间均匀性的标准差(S_{bb})和复现性标准差(S_r)

A.3.3.1 瓶间均匀性的标准差(S_{bb})

按公式(2)计算:

$$S_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n_0}} = \sqrt{\frac{3.20 - 2.48}{2}} = 0.6(\text{U/L})$$

A.3.3.2 重复性标准差(S_r)

按公式(3)计算:

$$S_r = \sqrt{MS_{\text{within}}} = \sqrt{2.48} = 1.57(\text{U/L})$$

A.3.4 由瓶间均匀性引入的标准不确定度(u_{bb})

按公式(4)计算: $u_{bb} = S_{bb} = 0.6(\text{U/L})$

附录 B

(资料性附录)

早期稳定性实验有效数据处理实例

B.1 实例简述

为某 CK 参考物质早期稳定性实验。共测量 6 个月,7 个时间点。

B.2 数据录入

将有效数据填入表 B.1。

表 B.1 早期稳定性实验数据

时间 月	均值 U/L
0	245.5
1	245.3
2	244.8
3	245.7
4	248.5
5	247.1
6	244.0

B.3 斜率不确定度的评定

B.3.1 根据公式(8)计算上述数据斜率(b)。

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i) (\sum_{i=1}^n y_i)}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i)^2} = \frac{5\,165.5 - 5\,162.7}{91 - 63} = \frac{2.8}{28} = 0.1$$

B.3.2 按公式(9)计算截距(a)。

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = 245.8 - 0.3 = 245.5(\text{U/L})$$

B.3.3 按公式(10)计算直线上各点的标准差(S)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{13.28}{5}} = 1.63(\text{U/L})$$

B.3.4 按公式(11)计算斜率的不确定度($S(b)$)。

$$S(b) = \frac{S}{\sqrt{S_{xx}}} = 0.31(\text{U/L})$$

B.4 结果判断

$$|b|=0.1$$

查表得：

$$t_{(0.05, n-2)} = t_{(0.95, 5)} = 2.571$$

$$t_{(0.05, n-2)} \times S(b) = 0.797(\text{U/L})$$

由 $|b| < t_{(0.05, n-2)} \times S(b)$ 可判断斜率稳定。

B.5 由早(长)期稳定性引入的标准不确定度(u_{ls})

按公式(12)计算：

$$u_{\text{ls}} = S(b) \times t = 0.31 \times 6 = 1.86 \text{ U/L}$$

B.6 适用期的初步确定

由早(长)期稳定性引入的标准不确定度 $u_{\text{ls}} = 1.86 \text{ U/L}$, 与参考物质酶活性 245.5 U/L 相比, 仍在不确定度允许范围内, 初步暂定其适用期为 6 个月。

附 录 C
(资料性附录)

酶参考物质赋值计算及不确定度评定实例

C.1 实例简述

国际临床化学联合会(IFCC)2002年组织对欧洲标准局(IRMM)酶参考物质ERM中 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)赋值结果及不确定度计算。

C.2 赋值方案

- C.2.1 样本准备:组织者给参加实验室运送7瓶冷冻干燥的酶参考物质以及质控品。
 C.2.2 相关文件准备:组织者给参加实验室酶提供《参考物质复溶程序》、《GGT的标准操作程序(SOP)》以及测量结果回报表等文件。
 C.2.3 实验周期、测量瓶数、每瓶测量次数:共测量2日,每日复溶3瓶,在复溶当日每瓶测量一次。
 C.2.4 测量方法:IFCC在2002年批准的37℃标准测量方法。
 C.2.5 测量结果回报:将测量结果在规定时间内回报给IFCC。

C.3 数据处理

C.3.1 数据筛查与分析

IFCC对数据进行出筛和分析,剔除了13个实验室中1个实验室数据。表C.1为12个合格实验室原始数据:

表 C.1 IFCC 实验室网络对 ERM 中 GGT 赋值的数据

实验室	实验结果						均值 IU/L	SD IU/L	RSD IU/L
	IU/L								
Lab01	118.1	118.9	119.0	118.1	118.1	119.2	118.6	0.5	0.4
Lab04	112.6	112.6	110.6	114.0	114.0	114.0	113.0	1.3	1.2
Lab05	111.9	113.7	110.3	112.4	113.0	11.9	112.0	1.3	1.1
Lab07	111.1	111.4	115.1	109.3	111.0	109.7	111.3	2.1	1.8
Lab08	113.0	115.0	112.6	112.6	113.7	113.1	113.3	0.9	0.8
Lab09	113.3	112.4	113.8	110.2	112.5	114.4	112.8	1.5	1.3
Lab10	114.0	115.3	114.9	113.7	114.3	112.8	114.2	0.9	0.8
Lab11	116.8	116.9	117.4	116.7	117.0	116.6	116.9	0.3	0.2
Lab13	112.6	113.0	113.7	111.7	113.6	111.0	112.6	1.1	1.0
Lab14	114.9	115.5	114.5	115.7	115.5	115.4	115.3	0.5	0.4
Lab15	117.1	118.6	117.9	116.4	117.7	118.4	117.7	0.8	0.7
Lab16	113.9	112.5	111.0	111.1	110.8	112.4	112.0	1.2	1.1
All Labs	—	—	—	—	—	—	114.12	2.43	2.1

检查表 C.1 中的数据分布:这些数据没有严重偏离正态分布。

C.3.2 酶参考物质赋值的计算

赋值是根据上述数据计算出来的未经过权重的均值,即:
按公式(17)计算网络联合定值结果的均值(x_{char})。

$$x_{char} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n} = \frac{1\ 369.5}{12} = 114.1(\text{U/L})$$

C.3.3 酶参考物质测量不确定度的评定

C.3.3.1 使用 one-way ANOVA 分析数据,得表 C.2

表 C.2 IFCC 实验室网络对 ERM 中 GGT 赋值的 one-way ANOVA 分析数据

变异的来源	SS	自由度	MS
组间变异	388.64	11	35.33
组内变异	76.45	60	1.27
总变异	465.09	71	

C.3.3.2 测量标准不确定度(u_{char})的计算

C.3.3.2.1 按公式(18)计算:

$$u_{char} = \frac{SD_{char}}{\sqrt{n}} = \frac{2.43}{\sqrt{12}} = 0.70(\text{U/L})$$

C.3.3.2.2 或者按公式(19)计算:

$$u_{char} = \sqrt{\frac{S_L^2}{n} + \frac{S_r^2}{nn_0}} = \sqrt{\frac{5.68}{12} + \frac{1.27}{72}} = 0.70(\text{U/L})$$

C.3.3.3 定值的相对标准不确定度 [$u_{rel}(char)$] 的计算

按公式(25)计算:

$$u_{rel}(char) = \frac{u_{char}}{x_{char}} = \frac{0.70}{114.1} = 0.61\%$$

C.3.3.4 相对合成标准不确定度($u_{rel}(CRM)$)的计算

按公式(27)计算:

$$\begin{aligned} u_{rel}(CRM) &= \sqrt{u_{rel}^2(bb) + u_{rel}^2(lts) + u_{rel}^2(sts) + u_{rel}^2(char)} \\ &= \sqrt{(0.29\%)^2 + (0.78\%)^2 + 0^2 + (0.61\%)^2} \\ &= 1.035\% \end{aligned}$$

C.3.3.5 扩展不确定度的计算

按公式(28)计算:

$$U_{CRM} = k \times u_{rel}(CRM) \times x_{char} = 2 \times 1.035\% \times 114.1 = 2.4\text{U/L}$$

C.4 IRMM 酶参考物质 ERM 中 GGT 赋值结果

$$x_{CRM} = x_{char} \pm U_{CRM} = 114.1 \pm 2.4 \text{ U/L} (k=2)$$

参 考 文 献

- [1] ISO Guide 35:2006 参考物质一定值的一般和统计原则
- [2] ISO 15194 :2002 体外诊断医学器械——生物源样品中量的测量——参考物质的说明
- [3] Schumann G, Borona R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PFH, et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentration of Enzymes at 37 °C. Part 7. Certification of Four Reference Materials for the Determination of γ -Glutamyltransferase, Lactate Dehydrogenase, Alanine Aminotransferase and Creatine Kinase according to IFCC Reference Procedures at 37 °C. Clin Chem Lab Med 2002;40(7):739-745
- [4] ISO. In Vitro diagnostic medical devices—Measurement of quantities in biological samples Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO 17511. Geneva: International Organization for Standardization; 2003
- [5] ISO. In Vitro diagnostic medical devices—Measurement of quantities in biological samples Metrological traceability of values assigned to catalytic concentration of enzymes in calibrators and control materials. ISO 18153. Geneva: International Organization for Standardization; 2003
- [6] Guide to the expression of uncertainty in measurement. BIPM; IEC, IFCC; ISO; IUPAC; IUPAP, OIML, 1993¹⁾
- [7] Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement—Second Edition. EURACHE/CITAC Guide CG4
- [8] EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition
- [9] EP14-A2 Evaluation of matrix effect. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000
- [10] ISO/IEC Guide 99 International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms(VIM), 1993
- [11] European Commission, “Guidelines for the production and certification of BCR reference materials—Part A: Guide to proposers of reference materials projects”, Doc. BCR/01/97, Brussels (B), 1 September 1997
- [12] European Commission, “Guidelines for the production and certification of BCR reference materials”, Doc. BCR/48/93, Brussels (B), 15 December 1994
-