ICS 07.080
CCS A40

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

肝素酶活力的测定 分光光度法

Determination of the activity of heparin lyase — Spectrophotometric method

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

肝素酶活力的测定　分光光度法

1　范围

本文件描述了测定肝素酶活力的分光光度法。

本文件适用于生化试剂肝素酶Ⅰ、肝素酶Ⅱ、肝素酶III活力的测定。

2　规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 6682　分析实验室用水规格和试验方法

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肝素酶活力单位　heparin lyase activity unit

1 000 μL底物溶液（5.2.2、5.2.3、5.2.4）在30 ℃、pH 7.0的条件下，每分钟酶解产生1 μmol 4,5-不饱和糖醛酸所需的酶量。

注：酶活力单位以IU表示。1 IU = 1.667×10^{-8} mol/s。

4　原理

肝素酶催化底物肝素钠或硫酸乙酰肝素裂解，会生成裂解产物4,5-不饱和糖醛酸。4,5-不饱和糖醛酸在232 nm波长下具有特征吸收峰。通过测定232 nm下的吸光度值变化，结合4,5-不饱和糖醛酸在232 nm下的摩尔消光系数，计算酶活力。

5　试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1　试剂

5.1.1　肝素钠（CAS 号 9041-08-1）：纯度≥99%，或经国家认证并授予证书的标准物质/标准样品。

5.1.2　硫酸乙酰肝素（CAS 号 9050-30-0）：纯度≥99%，或经国家认证并授予证书的标准物质/标准样品。

5.1.3　盐酸（HCl）

5.1.4　三羟基甲基氨基甲烷（Tris）

5.1.5 氯化钙（$CaCl_2$）

5.1.6 氯化钠（NaCl）

5.2 试剂配置

5.2.1 盐酸溶液（6 mol/L）

准确量取盐酸（5.1.3）50 mL，置于100 mL容量瓶中，加水稀释定容至刻度，摇匀。

5.2.2 肝素酶Ⅰ反应底物溶液（肝素钠 8.3 g/L，氯化钙 1.2 mmol/L，氯化钠 200 mmol/L）

准确称取Tris（5.1.4） 0.121 g、$CaCl_2$（5.1.5）0.0067 g、NaCl（5.1.6）0.584 g、肝素钠（5.1.1）0.415 g，用水溶解并转移至50 mL容量瓶中，用盐酸溶液（5.2.1）调节pH至7.0，用水稀释定容至刻度，混匀。

5.2.3 肝素酶Ⅱ反应底物溶液（肝素钠 8.3 g/L，氯化钙 1.2 mmol/L，氯化钠 100 mmol/L）

准确称取Tris（5.1.4） 0.121 g、$CaCl_2$（5.1.5）0.0067 g、NaCl（5.1.6）0.292 g、肝素钠（5.1.1）0.415 g，用水溶解并转移至50 mL容量瓶中，用盐酸溶液（5.2.1）调节pH至7.0，用水稀释定容至刻度，混匀。

5.2.4 肝素酶Ⅲ反应底物溶液（硫酸乙酰肝素 16.7 g/L，氯化钙 1.2 mmol/L，氯化钠 50 mmol/L）

准确称取Tris（5.1.4） 0.121 g、$CaCl_2$（5.1.5）0.0067 g、NaCl（5.1.6）0.146 g、硫酸乙酰肝素（5.1.2）0.835 g，用水溶解并转移至50 mL容量瓶中，用盐酸溶液（5.2.1）调节pH至7.0，用水稀释定容至刻度，混匀。

6 仪器和设备

6.1 紫外-可见分光光度计：带控温比色皿槽，波长精度 1 nm，吸光度值分辨率 0.001。

6.2 分析天平：感量分别为 1 mg 和 0.1 mg。

6.3 pH 计：精度 0.01。

6.4 磁力搅拌器。

6.5 石英比色皿：具盖，1 cm。

6.6 容量瓶：50 mL、100 mL。

6.7 烧杯：50 mL、1 000 mL。

6.8 量筒：50 mL。

6.9 移液器：10 μL、100 μL、1 000 μL。

7 试验步骤

7.1 试样制备

按照样品标称酶活力，移取肝素酶液体样品或称取肝素酶固体样品（精确至0.000 1 g）适量，用水溶解并稀释至1.5 IU/mL～9.0 IU/mL之间，待测。

7.2 测定

准确移取1 000 μL反应底物溶液于石英比色皿（6.5）中，置于分光光度计的温控比色皿槽内，待温度稳定于30 ℃±1 ℃后，迅速加入10 μL待测液，加盖颠倒混匀后立即放入分光光度计，在232 nm下扫描20 min，保存吸光度曲线。

8 数据处理

8.1 每分钟吸光度变化

选取第一个曲线平滑、线性关系显著（R^2>0.99）的60 s区段，通过线性回归方程计算斜率。

$$k = \frac{A_1 - A_0}{t} \times 60 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

k ——每分钟吸光度变化（ΔA/min）；

A_0 ——选取区段的初始吸光度值；

A_1 ——选取区段的最终吸光度值；

t ——反应时间，单位为秒（s）。

计算结果保留三位有效数字。

8.2 酶活力

8.2.1 液体样品

试样中肝素酶活力按式（2）计算：

$$X_1 = \frac{(V_1+V_2) \times k \times D}{\varepsilon \times V_2} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_1 ——酶活力，单位为酶活力单位每毫升（IU/mL）；

V_1 ——反应底物溶液体积，单位为微升（μL）；

V_2 ——待测液体积，单位为微升（μL）；

k ——每分钟吸光度变化（ΔA/min）；

D ——稀释倍数；

ε ——232 nm下4,5-不饱和糖醛酸的摩尔消光系数，3.8 L/mmol·cm。

计算结果保留三位有效数字。

8.2.2 固体样品

试样中肝素酶活力按式（3）计算：

$$X_2 = \frac{(V_3+V_4) \times k}{\varepsilon \times V_4} \times \frac{V_0}{m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_2 ——酶活力，单位为酶活力单位每克（IU/g）；

V_3 ——反应底物溶液体积，单位为微升（μL）；

V_4 ——待测液体积，单位为微升（μL）；

k ——每分钟吸光度变化（ΔA/min）；

ε ——232 nm下4,5-不饱和糖醛酸的摩尔消光系数，3.8 $mM^{-1}cm^{-1}$；

V_0 ——待测液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样品质量，单位为克（g）。

计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。