

中华人民共和国卫生行业标准

全血胆碱酯酶活性的分光光度测定方法 硫代乙酰胆碱-联硫代双硝基苯甲酸法

WS/T 67—1996

Blood—Determination of cholinesterase activity—
Spectrophotometric method—Acetylthiocholine and
dithio-bis-(nitrobenzoic acid) method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了血中胆碱酯酶活性的分光光度测定方法——硫代乙酰胆碱-联硫代双硝基苯甲酸法。本法最低检测浓度为2单位/1 mL血。

本标准适用于正常人和接触有机磷类及氨基甲酸酯类农药者血中胆碱酯酶活性的测定。

2 原理

胆碱酯酶水解硫代乙酰胆碱(ASCh, Acetylthiocholine)生成硫代胆碱和乙酸。硫代胆碱与巯基显色剂5,5'-联硫代-双-2-硝基苯甲酸(DTNB, Dithio-bis-nitrobenzoic acid)反应形成黄色化合物5-巯基-2-硝基苯甲酸(TNB)。在波长412 nm处比色定量。

3 仪器

- 3.1 分光光度计, 5 mm 比色杯。
- 3.2 恒温水浴。
- 3.3 离心机。
- 3.4 血红蛋白吸管, 20 μ L。
- 3.5 刻度吸管 0.5 mL, 2.0 mL。
- 3.6 试管 10 mL。
- 3.7 容量瓶 10 mL。
- 3.8 1/10 万天平。

4 试剂

本标准所用试剂除另有说明外, 均为分析纯试剂。

- 4.1 实验用水: 蒸馏水或具有同等纯度的去离子水。
- 4.2 磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L, pH 7.40): 称取 9.07 g 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 用水溶解并稀释至 1 000 mL(甲液); 称取 23.87 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 用水溶解并稀释至 1 000 mL(乙液)。取甲液 19.2 mL 与乙液 80.8 mL 混合即得。
- 4.3 生理盐水: 氯化钠 8.5 g/L。
- 4.4 硫代乙酰胆碱(ASCh): 称取 72.3 mg ASCh(生物试剂)溶于生理盐水中, 并稀释到 10 mL; 置冰箱中保存, 临用时以生理盐水稀释 10 倍。

4.5 5,5'-联硫代-双-2-硝基苯甲酸(DTNB)溶液:称取 19.8 mg DTNB,滴加磷酸盐缓冲液(4.2),搅拌,直至完全溶解,溶液透明(大约加 2 mL),再用生理盐水(4.3)稀释至 10 mL,置冰箱中保存,临用时以生理盐水稀释 10 倍。出现黄色即弃用。

4.6 抑制剂-毒扁豆碱:取 1 mg 左右柳酸毒扁豆碱,溶于 0.5 mL 生理盐水(4.3),临用时配制,严防污染其他试剂及器材。

4.7 1 mmol/L 谷胱甘肽标准溶液:精确称取 3.07 mg 还原型谷胱甘肽用水溶解,移入 10 mL 容量瓶中,稀释至刻度。此液 1 mL 相当于 1 μ mol 谷胱甘肽。因其易被氧化,应于用时配制,水必须先经煮沸去氧冷却后使用。

5 采样、运输和保存

取末梢血滴入置有肝素抗凝剂的小试管中混匀备用,或取 10 μ L 末梢血直接加到盛有 3 mL pH 7.40 的磷酸缓冲液(4.2)的小试管中,混匀,加塞,置冰瓶中运送,于 4℃ 冰箱内保存,尽快分析。

6 分析步骤

6.1 标准曲线的绘制:取 5 支试管按下表配制标准管。

标准管的配制

管 号	0	1	2	3	4
谷胱甘肽标准溶液(4.7),mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4
水,mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
缓冲液(4.2),mL	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
DTNB 溶液(4.5),mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
胆碱酯酶活性单位, μ mol/mL(37℃,6 min)	0	20	40	60	80

以水为参比,5 mm 厚比色杯在 412 nm 波长处读取吸光度,用各标准系列管的吸光度,分别减去零管吸光度之值,作为纵坐标,酶活性单位为横坐标,绘制标准曲线。

6.2 样品测定

取末梢血 10 μ L,放入盛有 3 mL 磷酸盐缓冲液(4.2)的小试管中,混匀后,取出 1.5 mL 置于另一小试管中,作测定管,原管作对照管。向对照管中加入一滴抑制剂液(4.6),混匀。将两管同置 37℃ 水浴中预温 5~10 min(视室温而定)。向两管中分别加入已在 37℃ 水浴保温的 DTNB 应用液(4.5)和 ASCh 应用液(4.4)各 0.5 mL。加入 ASCh 液时,立即计时并混匀。在 37℃ 水浴中准确反应 6 min 后,即向测定管中加入一小滴抑制剂液(4.6),混匀以终止反应。离心除去血细胞,取上清液,放入 5 mm 比色杯,于分光光度计上 412 nm 波长处,以水为参比,读取吸光度 A ;对照管的吸光度为 A' 。 A 减去 A' 得吸光度差 ΔA ,即为酶水解基质产生的硫代胆碱的显色深度,查标准曲线可得全血胆碱酯酶活性单位。

7 计算

测定人血样品时,以每毫升血样在 37℃ 温浴 6 min,水解 1 微克分子(μ mol)基质为 1 单位。

1 μ mol 谷胱甘肽能提供 1 μ mol 巯基,其显色效应相当于 1 μ mol 硫代胆碱,也相当于酶促使分解 1 μ mol 基质(乙酰硫代胆碱)的效应。现测定管取血量为 0.005 mL,温浴时间为 6 min。每 1 mL 巯基标准液含谷胱甘肽 1 μ mol,故显色效应相当于 0.1 mL 巯基标准液的酶活性单位为:

$$1 \mu\text{mol/mL} \times 0.1 \text{ mL} \times \frac{1}{0.005 \text{ mL}} = 20 \text{ 单位}$$

式中:0.1 mL——巯基标准应用液的用量,如果是 0.2 mL 巯基标准应用液就相当于 40 单位,余类推;
0.005 mL——血样量。

8 说明

8.1 本法的检测限为 2 单位,测定范围为 0~80 单位。精密度 CV:批内在 0.5%~2.4%之间;批间在 0.5%~3.9%之间。准确度:由于没有纯品胆碱酯酶,不能直接测定回收率。采取加入不同酶量,以实测酶量的百分数与理论酶量的百分数之比衡量准确度。本实验按加入 25%,50%和 75%的酶(血样量),其实测值相当于各该理论值的 94.6%,98.7%和 100.0%。

8.2 为测定乙酰胆碱用的血标本,无论是以全血或用 pH7.40 磷酸盐缓冲液稀释后的血样,于普通冰箱(0~4℃)保存 7 天,偏差<5%。

8.3 红细胞中的乙酰胆碱酯酶全部存在于细胞膜表面,因此,本测定方法不需将红细胞溶解。如有溶血,反而干扰本测定。

8.4 对照管的吸光度读数超过 0.07~0.08 时,即说明有明显溶血,或 DTNB 自然分解,会使测定结果偏低。

8.5 每个样品都需作自己的对照。

8.6 抑制剂及其溶液宜妥为处置,严格防止污染器材及其他试剂。实验完毕后,所有器材需经肥皂水洗刷,用重铬酸钾硫酸清洗液浸泡,清水洗净,蒸馏水淋洗 3 次。以除去残留的抑制剂。

8.7 血清、脑、肝、肠及其他组织的组织匀浆,均可参照本方法作胆碱酯酶活性测定。但是需要先求取最适样品量,以决定取材量和温浴时间。反应完毕后,使用蛋白质凝固剂(三氯乙酸或纯乙醇)离心沉淀去除组织材料再作比色。实验动物的血样也可参照本方法作测定,唯需根据其酶活性调整取血量及温浴时间。

附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由上海医科大学公共卫生学院负责起草。

本标准主要起草人薛寿征。

本标准由卫生部委托技术归口单位中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所负责解释。