

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

WS/T 66—1996

羟胺三氯化铁法

Blood—Determination of cholinesterase activity—Spectrophotometric
method—Hydroxylamine-ferric chloride 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——羟胺三氯化铁法。

本法最低检测浓度为 $2.4 \mu\text{mol/L}$ 。

本标准适用于正常人和接触有机磷农药人员血中胆碱酯酶活性的测定。

2 原理

血液胆碱酯酶使乙酰胆碱分解为胆碱和乙酸。未被胆碱酯酶水解而剩余的乙酰胆碱与碱性羟胺反应,生成乙酰羟胺,然后,与三氯化铁在酸性溶液中反应,形成红色羟肟酸铁络合物。颜色深度与剩余乙酰胆碱的量成正比。在波长 520 nm 比色定量,由水解的乙酰胆碱的量计算胆碱酯酶活性。

3 仪器

3.1 分光光度计, 10 mm 比色杯。

3.2 比色管, 10 mL 。

3.3 普通漏斗, 40 mm 。

3.4 恒温水浴箱,控温 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

3.5 采血针头。

3.6 血色素吸管,有 $20 \mu\text{L}$ 刻度。

4 试剂

本标准所用试剂均为分析纯试剂。

4.1 实验用水,蒸馏水或具同等纯度的去离子水。

4.2 盐酸, $\rho_{20} = 1.19 \text{ g/mL}$ 。

4.3 盐酸溶液(1+2)。

4.4 碱性羟胺溶液,临用前将 139 g/L 盐酸羟胺溶液和 140 g/L 氢氧化钠溶液等体积混合。

4.5 磷酸盐缓冲液($\text{pH} = 7.20$),准确称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 8.36 g 和磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.36 g ,用水溶解并稀释到 500 mL ,保存在冰箱内。

4.6 三氯化铁溶液,称取 10 g 三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),加 0.84 mL 盐酸(4.2),然后加水 100 mL 。贮存于棕色瓶中。

4.7 氯化乙酰胆碱标准液,精确称取乙酰胆碱 1.2716 g ,用磷酸盐缓冲液(4.5)溶解,并稀释到 100 mL ,此溶液 1 mL 相当于 $70 \mu\text{mol}$ 乙酰胆碱,为贮备液。临用前,取此溶液用磷酸盐缓冲液(4.5)稀

释 10 倍,此溶液 1 mL 相当于 7 μmol 乙酰胆碱,为应用液。

5 采样、运输和保存

5.1 用血色素吸管,取耳垂血 20 μL,注入比色管中(事先加入 0.98 mL 磷酸盐缓冲液),立即进行测定。

5.2 如不能立即测定,可静脉取血 0.5 mL,注入玻璃管中(含肝素或草酸钾抗凝剂),混匀。于保温瓶中加冰运送,置于 4℃ 冰箱中可保存一周。

6 分析步骤

样品测定按下表进行。

全血胆碱酯酶测定操作步骤

	样品管	对照管	标准管	空白管
磷酸盐缓冲液, mL	0.98	0.98	1.0	1.0
混匀全血(草酸钾抗凝), mL	0.02	0.02	—	—
置 37℃ 水浴中预热 5 min				
乙酰胆碱应用液(4.7), mL	1.0	—	1.0	—
水, mL	—	1.0	—	1.0

置 37℃ 水浴中反应 30 min,准时取出,各管加入 4.0 mL 碱性羟胺溶液(4.4),充分振摇 2 min,继续加入 2.0 mL 盐酸溶液(4.3),充分振摇 2 min,再加入 2.0 mL 三氯化铁溶液(4.4),充分振摇,用滤纸过滤后,以试剂空白为参比在波长 520 nm 处测吸光度。然后按 7.1 计算胆碱酯酶活性。如同时分析大批样品,可采用标准曲线法按 7.2 求出胆碱酯酶活性绝对值。

7 计算

7.1 公式计算法

7.1.1 按式(1)计算酶活性的绝对值。

$$X_s = \frac{C + B - A}{C} \times 7 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: X_s ——水解乙酰胆碱的浓度, μmol(0.02 mL · 37℃ · 30 min);
 A ——以试剂空白为参比的在波长 520 nm 处样品管的吸光度值;
 B ——以试剂空白为参比的在波长 520 nm 处对照管的吸光度值;
 C ——以试剂空白为参比的在波长 520 nm 处标准管的吸光度值。

7.1.2 按式(2)计算酶活性的相对值。

$$Y = \frac{X_s}{X_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中: Y ——酶活性的相对值, %;
 X_s ——被测血样中酶活性的绝对值, μmol(0.02 mL · 37℃ · 30 min);
 X_c ——正常人血中酶活性绝对值, μmol(0.02 mL · 37℃ · 30 min)。

7.2 标准曲线法

7.2.1 被水解乙酰胆碱的吸光度 = $C - (A - B)$ 。

7.2.2 被水解乙酰胆碱的吸光度查乙酰胆碱标准曲线,得相应的被水解乙酰胆碱(μmol)。此值是0.02 mL血液在37℃30 min反应条件下,胆碱酯酶的活性绝对值。

8 说明

8.1 本法检测限为2.4 $\mu\text{mol/L}$,线性范围为2.4~1 000.0 $\mu\text{mol/L}$ 。当乙酰胆碱的含量为1.4,4.2,7.0 μmol 时,其变异系数分别为:12.8%,9.0%,6.4%。

8.2 使用的玻璃器皿洗净后,在1+3硝酸中浸泡24 h,用水冲洗干净后,再用蒸馏水洗三次,干燥后备用。

8.3 取血时不应过度挤压耳垂,因为本法是同时测定血清假性胆碱酯酶和血球真性胆碱酯酶。选用的乙酰胆碱基质浓度对血球真性胆碱最适宜,此时测得的血液胆碱酯酶活性值,真性胆碱酯酶占85%。测定结果基本上只代表血球真性胆碱酯酶活性值。如果采血时过度挤压耳垂,采得的血液中血清和组织液所占比例过多,会使结果偏低。

8.4 加碱性羟胺和盐酸(1+2)时,必须严格掌握振摇时间,使其充分反应,否则会影响结果。

8.5 加三氯化铁显色后,棕红色铁络合物易褪色,必须控制在20 min内比色完毕。若大批样品分析时,可分批加入三氯化铁溶液,否则会有较大误差。

8.6 滤液一定要澄清,如果出现混浊,会使吸光度升高,而胆碱酯酶活性偏低。

8.7 氯化乙酰胆碱基质不太稳定,每次测定需做标准管。标准管读数在同一比色计上应保持恒定或仅有较小的变动。

8.8 计算胆碱酯酶活性百分数时,应以本地区正常人全血胆碱酯酶活性为基准。

附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由辽宁省劳动卫生研究所负责起草。

本标准主要起草人周健英、胡素清。

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。