



T/CAIA

中国分析测试协会标准

T/CAIA/SH019-2022/T/CSTM 01090-2022

乙酰胆碱酯酶 活性检测 分光光度法

Acetylcholinesterase-Determination of activity
-Spectrophotometric method

2022-10-00 发布

2022-12-01 实施

中国分析测试协会
中关村材料试验技术联盟

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本文件由中国分析测试协会标准化委员会（CAIA）和中国材料与试验团体标准委员会科学试验领域委员会（CSTM/FC98）提出。

本文件由中国分析测试协会标准化委员会（CAIA）和中国材料与试验团体标准委员会科学试验领域委员会科学试验创新方法技术委员会（CSTM/FC98/TC02）归口。

本文件起草单位：北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心），吉林大学，广东省科学院测试分析研究所，长春吉大·小天鹅仪器有限公司，盘锦检验检测中心，广州市食品检验所。

本文件主要起草人：杜美红，李静雯，高德江，张冠文，徐健峰，陈尔凝，李海霞，何丽媛，叶秋雄，赵春艳，洪甜，陈桂云，马品一，袁德崢。

乙酰胆碱酯酶 活性检测 分光光度法

1 范围

本文件规定了用分光光度法测定乙酰胆碱酯酶活性的方法。

本文件适用于有机磷与氨基甲酸酯类农药残留检测专用试剂中乙酰胆碱酯酶活性的测定，本方法定量限为 $0.01 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ ，测量范围为 $0.01 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min}) \sim 0.13 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精确度) 第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精确度) 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 26810 可见分光光度计

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

乙酰胆碱酯酶活性 acetylcholinesterase activity

在规定的反应条件下，乙酰胆碱酯酶具有催化分解碘化硫代乙酰胆碱的特性，用每毫升（或毫克）乙酰胆碱酯酶每分钟催化分解碘化硫代乙酰胆碱的微摩尔量表示。

4 原理

乙酰胆碱酯酶能水解碘化硫代乙酰胆碱生成硫代胆碱和乙酸。硫代胆碱与巯基显色剂 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应生成黄色化合物 5-巯基-2-硝基苯甲酸 (TNB)，TNB 在波长 412 nm 处有特征性光吸收，测定其吸光度值；根据还原型谷胱甘肽制备标准溶液与 DTNB 反应，所绘制谷胱甘肽的量与吸光度关系的标准曲线，计算出乙酰胆碱酯酶的酶活性值。

5 试剂

除非另有规定，本方法所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

5.1 pH8.0 磷酸缓冲液

称取33.92 g磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 和0.83 g磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 置于200 mL烧杯中, 用水溶解, 转移至1000 mL容量瓶中, 稀释至刻度后混匀, 即为pH8.0 0.1 mol/L磷酸缓冲液。

5.2 碘化硫代乙酰胆碱溶液

称取72 mg碘化硫代乙酰胆碱置于带盖离心管, 用10 mL磷酸缓冲液 (5.1) 溶解, 置4 °C冰箱中保存, 保存期不超过2天, 临用时用磷酸缓冲液稀释10倍。

5.3 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 溶液

称取19.8 mg DTNB置于烧杯中, 用磷酸缓冲液 (5.1) 溶解, 移入100 mL容量瓶中, 用磷酸缓冲液定容。应现用现配, 出现明显黄色即弃用。

5.4 抑制剂

吸取7 μL O,O-二甲基-O-(2,2-二氯乙烯基)磷酸酯 (敌敌畏) 纯品 (或有效含量为10 mg的溶液), 置于带盖离心管中, 立即加入10 mL丙酮溶剂, 混匀, 用封口膜密封保存。

5.5 谷胱甘肽标准溶液

称取30.7 mg还原型谷胱甘肽置于50 mL烧杯中, 用10 mL水溶解, 移入100 mL容量瓶中, 用水定容。此溶液1 mL相当于1 μmol 谷胱甘肽。因其易被氧化, 应现用现配, 水应先经煮沸去氧冷却后使用。

6 仪器设备

试验需要的仪器至少包括:

- a)秒表: 实际分度值不大于 0.15 s。
- b)分析天平: 感量为 0.1 mg。
- c)分光光度计: 达到 GB/T 26810 II 级要求。
- d)恒温水浴锅 (或空气恒温箱): 控温精度 $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 。
- e)移液器及吸头: 量程为 100 μL 和 1 mL, 精确至 0.001 mL。
- f)容量瓶: 容量为10 mL和100 mL。
- g)50 mL离心管和15 mm \times 150 mm试管若干。

7 样品

酶制剂样品 (酶粉和酶液) 按产品相关要求密封保存, 并远离农药等对酶活性有影响试剂, 在一周内进行检测。酶制剂样品经溶解或稀释后, 需立即进行酶活性检测。

8 试验步骤

8.1 样品制备

称取酶粉样品 10.0 mg 或吸取酶液样品 0.100 mL 置于烧杯中, 用 2 mL 磷酸缓冲液 (5.1) 溶解, 移入 10 mL 容量瓶, 用磷酸缓冲液定容, 制成样品原液。用移液器移取样品原液 1.0 mL, 加入盛有 9.0 mL 磷酸缓冲液的试管中, 振摇试管或反复吹打使其混合均匀, 制成 10 倍样品稀释液。按照上述操作程序, 可再制备 100 倍和 1000 倍样品稀释液。使样品稀释液 3 分钟催化分解碘化硫代乙酰胆碱的量在

0.03 μmol~0.40 μmol 范围内。选择 2 个~3 个浓度样品原液或样品稀释液进行酶活性的测定。

8.2 测定

取两支50 mL离心管，一支加入1.0 mL碘化硫代乙酰胆碱溶液（5.2），并加入9.0 mL磷酸缓冲液稀释；另一支加入20 mL DTNB（5.3），37 °C水浴锅中预热10 min。

取两支试管，一支加入1.0 mL待测样品液（8.1）作为样品管，另一支加入1.0 mL缓冲液（5.1）作为对照管，37 °C水浴锅中预热5 min。向样品管和对照管中分别依次加入预热后的DTNB（5.3）和碘化硫代乙酰胆碱稀释液各1.0 mL；加入碘化硫代乙酰胆碱稀释液时，立即计时并混匀。在37 °C下准确反应3 min后，立即向样品管和对照管中分别加入0.1 mL抑制剂（5.4）并混匀，以终止反应。每个样品应平行进行3组实验。

使用分光光度计在412 nm波长处，以对照管为参比，测试样品管吸光度。

注1：乙酰胆碱酯酶活性的检测易受环境干扰，常用农药等相关试剂的实验室宜在通风橱内进行该实验。

注2：在酶稀释后若溶液肉眼可见不澄清或者有颜色可将对照管变为酶稀释液，并将0.1 mL抑制剂提前加入管中。

8.3 校准曲线的绘制

取6支试管（记为0~5号管），按表1用移液器在每管依次加入谷胱甘肽标准溶液、磷酸缓冲液和DTNB溶液，混匀。

表1 每管配制成分表

名称	0	1	2	3	4	5
谷胱甘肽标准溶液（5.5）的体积，mL	0	0.030	0.100	0.200	0.300	0.400
磷酸缓冲液（5.1）的体积，mL	2.100	2.070	2.000	1.900	1.800	1.700
DTNB 溶液（5.3）的体积，mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
相当于分解碘化硫代乙酰胆碱的量，μmol	0	0.030	0.100	0.200	0.300	0.400

在412 nm波长处，以空白溶液（0号管）为参比，反应后每管的吸光度值为纵坐标，每管谷胱甘肽（相当于分解碘化硫代乙酰胆碱）的量为横坐标，绘制校准曲线。该校准曲线相关系数需不小于0.990。

按照此校准曲线，计算出酶稀释液催化分解碘化硫代乙酰胆碱的量。

9 结果计算

乙酰胆碱酯酶活性（A），按式（1）计算：

$$A = \frac{10 \times \bar{n} \times V_0 \times D}{m \times t} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A——乙酰胆碱酯酶的活性，单位为微摩尔每毫升（或每毫克）每分钟（μmol/(mL·min)或 μmol/(mg·min)）；

\bar{n} ——由校准曲线计算得到的酶稀释液催化分解碘化硫代乙酰胆碱量的平均值，单位为微摩尔（μmol）；

V_0 ——酶液或酶粉样品溶解后的体积，单位为毫升（mL）；

D——稀释倍数；

m ——吸取酶液的体积或称取酶粉的质量，单位为毫升（mL）或毫克（mg）；
 t ——反应时间，本方法为 3 分钟（min）；
 计算结果保留两位有效数字。

10 精密度

本文件的精密度试验由 7 个实验室对 4 个水平的乙酰胆碱酯酶活性进行测定。在 GB/T 6379.1 规定的重复性条件下，每个实验室对每个水平测定 6~7 次。

根据 GB/T 6379.2，对得到的结果进行统计分析，所得精密度见表 2。

表 2 精密度结果

乙酰胆碱酯酶活性 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$	重复性限 r	再现性限 R
0.01 ~ 0.13	$r=0.0815A-0.00025$	$R=0.0666A+0.00168$