

国家标准《肝素酶活力的测定分光光度法》  
(征求意见稿)

编制说明

《肝素酶活力的测定 分光光度法》标准起草组

2025 年 01 月

# 国家标准《肝素酶活力的测定 分光光度法》（征求意见稿）编制说明

## （一）工作简况

### 1、任务来源

本标准根据国标委公布的2023年国家标准计划项目，本项目计划编号为20231639-T-469，名称为《肝素酶活力的测定分光光度法》。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

### 2、目的和意义

肝素酶可以催化肝素或者硫酸乙酰肝素的裂解反应，分为肝素酶 I、II、III，其最重要的用途之一是酶解肝素制备低分子量肝素，而低分子量肝素是最重要的抗凝血药物之一。

肝素酶的酶活性是其质量的重要指标之一，鉴于目前我国并无统一的肝素酶活性测定的方法标准，产品的实际酶活性和包装标识的酶活性是否一致还缺乏相关的标准进行规范约束和验证，因此研制肝素酶活性的测定标准将为肝素酶的生产、流通及监管提供依据，促进我国肝素行业以及肝素酶相关医药行业的健康发展，具有非常重要的现实意义。

### 3、协作单位

本标准由清华大学主持，河北省食品检验研究院、中国测试技术研究院等单位联合起草。

### 4、标准编制过程和主要工作过程

（1）2022 年 05 月至 11 月，标准起草单位组织相关技术人员对《肝素酶活力的测定 分光光度法》标准项目进行了预研，起草组成员查阅资料，广泛收集国内外近百余篇标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

（2）2022 年 12 月，标准起草单位在收到全国生化检测标准化技术委员会项目征集通知后，提交了项目申报书以及国家标准草案工作组讨论稿。

(3) 2023 年 12 月，收到全国生化检测标准化技术委员会文件《关于下达 2023 年推荐性国家标准计划的通知》（生检标[2023] 41 号），《肝素酶活力的测定 分光光度法》标准项目立项，计划编号：20231639-T-469。

(4) 2024 年 1 月至 2024 年 12 月，进行标准的起草研制工作。完成了《肝素酶活力的测定 分光光度法》标准（征求意见稿）及其编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了标准（征求意见稿）的研制及修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了标准（征求意见稿）和编制说明。

## **5、国家标准主要修订人及其所做的工作**

本标准由清华大学主持，河北省食品检验研究院、中国测试技术研究院等单位联合起草。

### **（二）国家标准编制原则和确定国家标准主要内容**

#### **1、标准编制原则**

本标准的编制依据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》，并参照了GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分 总则与定义》、GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）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 35538-2017《工业酶制剂测定技术导则》。

#### **2、确定国家标准主要内容**

本标准描述了肝素酶活性的测定方法。

本标准适用于生化试剂肝素酶 I、II、III活性的测定。

### **（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果**

#### **1、原理**

肝素酶催化底物肝素或硫酸乙酰肝素裂解会生成4,5不饱和糖醛酸。4,5不饱和糖醛酸在232 nm波长下有特征吸收（图1），通过测定232 nm下的吸光度的变化，结合4,5不饱和糖醛酸的摩尔消光系数，计算酶活性。

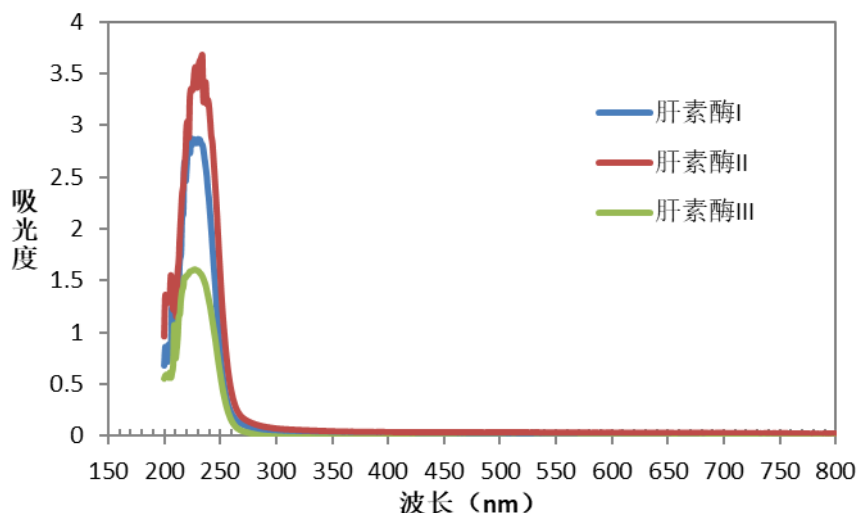


图 1 肝素酶催化生成的 4,5 不饱和糖醛酸的全波长扫描图

## 2、肝素酶酶活性测定方法的确立

由于酶的活性会受到温度、pH以及离子添加剂等多种参数的影响，因此选取不同温度、不同pH、不同CaCl<sub>2</sub>浓度条件对肝素酶I、II、III的活性进行测定，以确定酶的活性测定方法中的各项重要参数。此外，反应时间也会影响酶活性测定的结果，因此该参数也需在方法中确立。

### 2.1 反应温度的确定

肝素酶等酶的催化作用受温度的影响很大，一方面提高温度可以增加酶促反应的速度，另一方面酶的化学本质是蛋白质，温度过高可引起蛋白质变性，导致酶的失活。

不同温度对肝素酶 I、II、III活性的影响如图2所示。肝素酶 I 和肝素酶 II 的最适催化温度为30℃，而肝素酶III的活性在20℃-40℃的范围内随温度提高而缓慢提高，综合考虑三种肝素酶的热稳定性，选取30℃为肝素酶 I、II、III的活性测定温度。

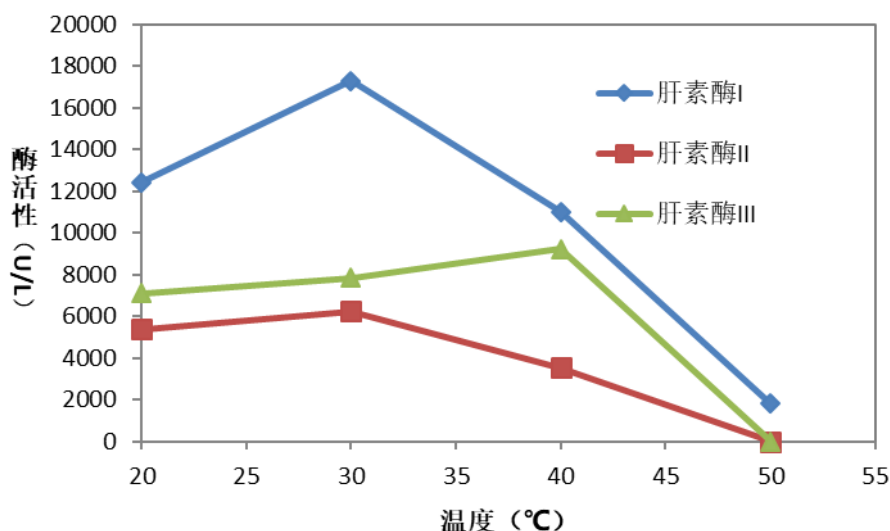


图2 肝素酶的酶活性随温度的变化

## 2.2 反应 pH 的确定

反应体系pH值对于肝素酶等酶的活性影响很大，pH的改变能影响酶活性中心上必须基团的解离程度，同时也能影响底物的解离程度，从而影响酶分子对底物分子的结合和催化。而当pH过小（过酸）或者过大（过碱）都有可能使蛋白变性而失活。

不同pH对肝素酶I、II、III活性的影响如图3所示。肝素酶I和III均能在pH6.0-7.0的范围内保持较高的活性，而肝素酶II的最适pH为7.0，三种肝素酶在pH为9.0的条件下迅速失活。对于三种肝素酶，选取pH7.0为活性测定的pH。

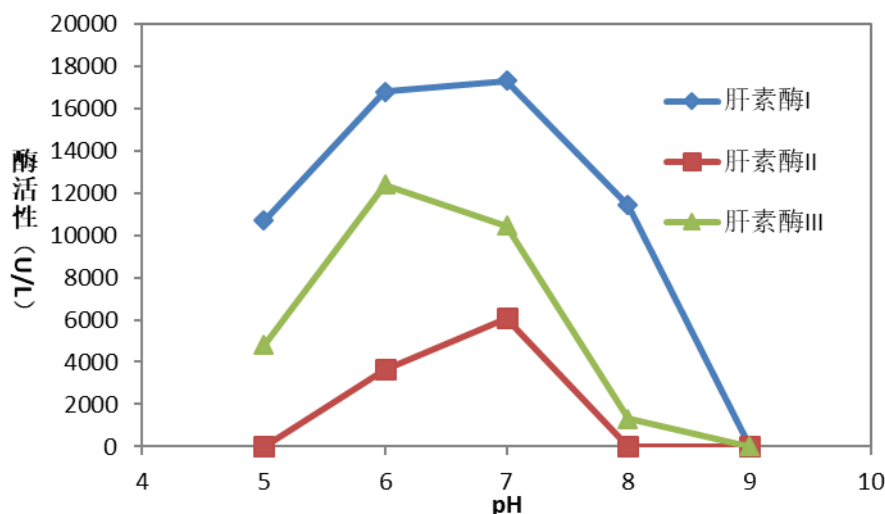


图3 肝素酶的酶活性随 pH 的变化

## 2.3 离子添加剂 $\text{CaCl}_2$ 浓度的确立

前期研究表明钙离子是肝素酶活性所必需的辅助因子。 $\text{CaCl}_2$ 浓度对三种肝素酶的活性影响如图4所示，其中三种肝素酶在 $\text{CaCl}_2$ 浓度为0时的活性分别设为100%。 $\text{CaCl}_2$ 的加入使得三种肝素酶的活性均有所提高，在 $\text{CaCl}_2$ 浓度为1.2-5.0 mM的范围内，钙离子的浓度对三种肝素酶的酶活性影响不大，因此选取1.2 mM为肝素酶 I、II、III活性测定时的 $\text{CaCl}_2$ 浓度。

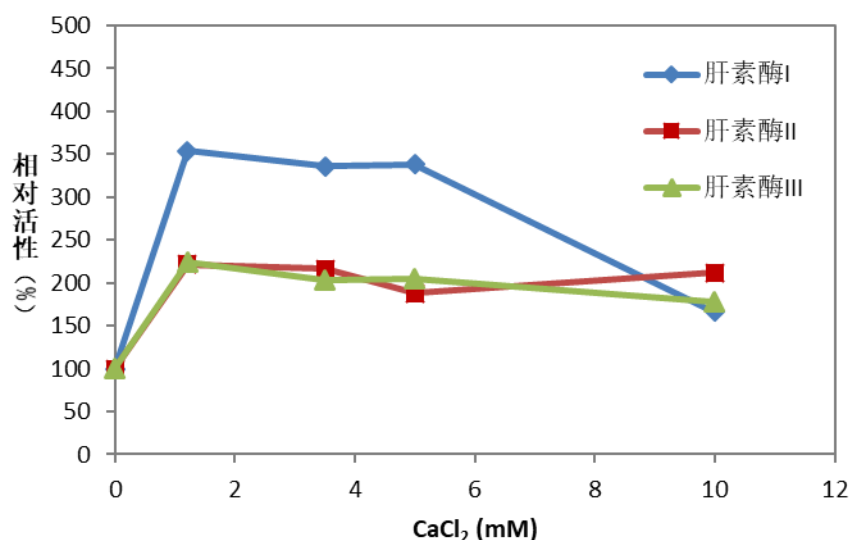


图4 肝素酶的酶活性随  $\text{CaCl}_2$  浓度的变化

## 2.4 离子添加剂 NaCl 浓度的确立

$\text{NaCl}$ 浓度对肝素酶活性的影响如图5所示。其中三种肝素酶在 $\text{NaCl}$ 浓度为0时的活性分别设为100%。肝素酶 I、II、III活性测定时的 $\text{NaCl}$ 浓度分别选取200 mM、100 mM以及50 mM。

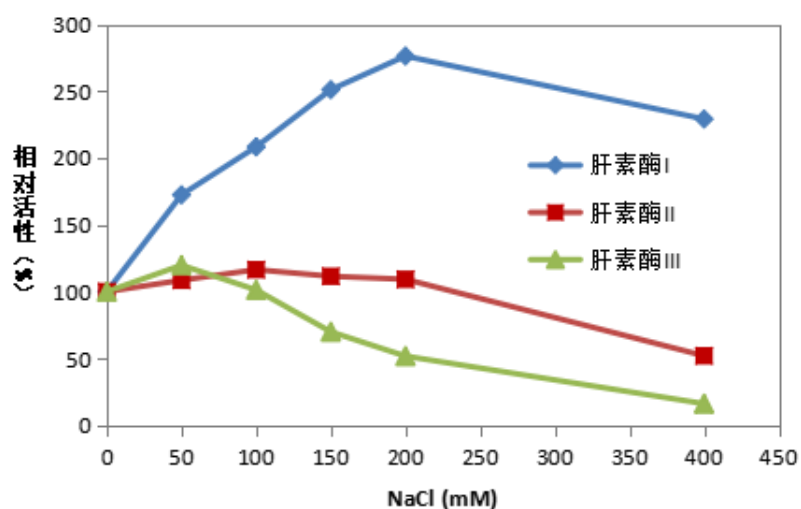


图5 肝素酶的酶活性随  $\text{NaCl}$  浓度的变化

## 2.5 反应时间的确立

肝素酶活性测定过程中吸光度随时间的变化曲线如图5所示。为保证酶活性测定的准确性,并且不遗漏活性测定过程中的重要数据,活性测定时间为20 min,在此时间范围内,三种肝素酶催化生成的底物吸光度呈线性增加的趋势。应选取曲线平滑且线性的60 s区段,通过线性回归方程计算斜率从而计算酶活性。

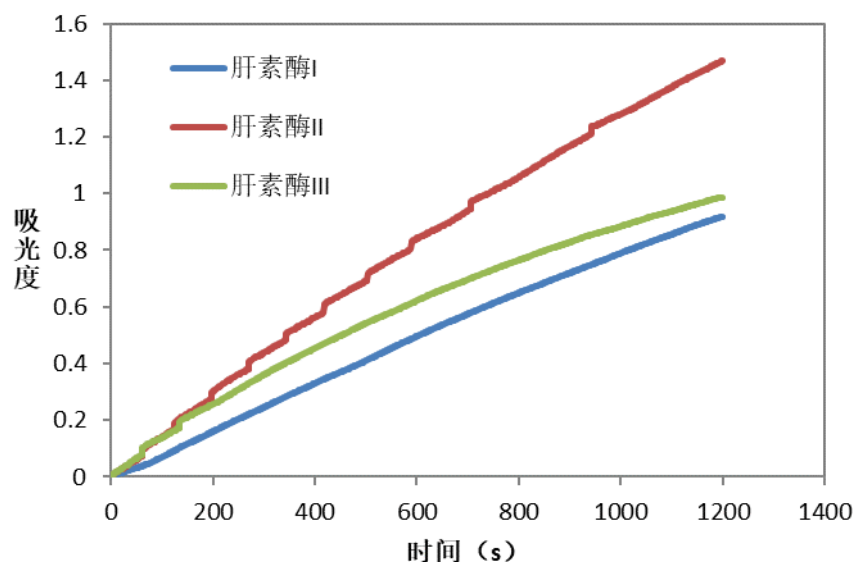


图6 肝素酶活性测定过程中的吸光度变化

## 2.6 摩尔消光系数的确定

收集到自1981年-2024年的4,5不饱和糖醛酸测定的相关文献37篇,其摩尔消光系数均设置为 $3.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,已成为行业内认可的标准数值。因此我们仍然选择了 $3.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

## 3、试剂和仪器设备

本标准给出了肝素酶活性的测定方法中所使用的试剂的清单,包括肝素钠、硫酸乙酰肝素、盐酸溶液、肝素酶 I 及肝素酶 II 的反应底物溶液以及肝素酶III的反应底物溶液。描述了试剂的主要特性,并给出了溶液的制备方法。

对于肝素酶 I 活性的测定,底物溶液含20 mmol/L三羟基甲基氨基甲烷(Tris)、1.2 mmol/L氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )、200 mmol/L氯化钠( $\text{NaCl}$ )及8.3 g/L肝素钠, pH 7.0;对于肝素酶 II 活性的测定,底物溶液含20 mmol/L三羟基甲基氨基甲烷(Tris)、1.2 mmol/L氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )、100 mmol/L氯化钠( $\text{NaCl}$ )及8.3 g/L肝素钠, pH 7.0;对于肝素酶III活性的测定,底物溶液含20 mmol/L Tris、1.2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、50 mmol/L  $\text{NaCl}$ 及16.7 g/L硫酸乙酰肝素, pH 7.0。

本标准给出了肝素酶活性的测定方法中所使用的仪器设备的清单,并描述了主要特性。仪器设备包括分析天平、pH计、紫外-可见分光光度计、磁力搅拌器、石英比色皿、容量瓶、烧杯、量筒以及移液器。

#### 4、试样制备和试验步骤

由于市售的肝素酶包含液体样品和固体样品两种形态,因此在试样酶液的制备中分为液体样品待测酶液制备和固体样品待测酶液制备两部分。

酶活性的测定步骤为:准确移取1000 μL反应底物溶液于石英比色皿中,置于分光光度计的温控比色皿槽内,待温度稳定于30℃后,迅速加入10 μL待测酶液,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。选取第一个曲线平滑且线性的60 s区段,计算斜率。

#### 5、试验数据处理

分为液体样品和固体样品两部分。

##### 5.1 液体样品

试样中肝素酶活性按式(1)计算:

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

式中:

X<sub>1</sub> ——肝素酶活性,单位为酶活性单位每毫升(U/mL)

V<sub>1</sub> ——反应底物溶液的体积,单位为微升(μL);

V<sub>2</sub> ——酶活性测定中加入酶液的体积,单位为微升(μL);

k ——酶活性测定中吸光度曲线斜率,单位为吸光度每分钟(Abs/min);

D ——稀释倍数;

ε ——吸光系数,单位为mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>(取值为3.8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)。

计算结果保留三位有效数字。

##### 5.2 固体样品

试样中肝素酶活性按式(2)计算:

$$X_2 = \frac{(V_1 + V_2) \times k}{\varepsilon \times V_2} \times \frac{V_0}{m} \quad (2)$$

式中:

X<sub>2</sub> ——肝素酶活性,单位为酶活性单位每克(U/g)



V1 ——反应底物溶液的体积，单位为微升（ $\mu\text{L}$ ）；

V2 ——酶活性测定中加入酶液的体积，单位为微升（ $\mu\text{L}$ ）；

k ——酶活性测定中吸光度曲线斜率，单位为吸光度每分钟（Abs/min）；

$\varepsilon$  ——吸光系数，单位为 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为 $3.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）；

V0 ——溶解酶粉的液体体积，单位为毫升（mL）；

m ——称取酶粉的质量，质量为克（g）。

计算结果保留三位有效数字。

## 6、精密度

取同一样品，相同条件下连续测定3次，结果如表1所示，重复性满足要求。

表1 重复性条件下的酶活性测定数据

| 酶       | 酶活性1<br>(U/mL) | 酶活性2<br>(U/mL) | 酶活性3<br>(U/mL) | 平均酶活性<br>(U/mL) | RSD<br>(%) |
|---------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| 肝素酶 I   | 3.13           | 3.21           | 3.05           | 3.13            | 2.56       |
| 肝素酶 II  | 9.27           | 9.31           | 8.95           | 9.18            | 2.15       |
| 肝素酶 III | 6.35           | 6.22           | 6.01           | 6.19            | 2.77       |

## 7、主要试验（验证）的分析

为了进一步完善和确定检验方法，标准起草工作组委托了五家单位对标准方法进行了实验室间验证。选用肝素酶 I 为验证样品，验证设置了3个浓度，分别为1.50、3.00和6.00 U/mL。结果详见验证结果报告单。

表2 不同实验室间盲样检测结果

| 序号 | 检测结果 (U/mL)、回收率 (%) |           |            |            |            | 平均值        | RSD (%) |
|----|---------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|---------|
|    | 机构A                 | 机构B       | 机构C        | 机构D        | 机构E        |            |         |
| A  | 1.58/105.3          | 1.49/99.3 | 1.54/102.7 | 1.53/102.0 | 1.51/100.7 | 1.53/102.0 | 2.22    |
| B  | 3.03/101.0          | 2.97/99.0 | 3.01/100.3 | 3.04/101.3 | 3.07/102.3 | 3.02/100.7 | 1.23    |
| C  | 5.87/97.8           | 5.84/97.3 | 5.88/98.0  | 6.11/101.8 | 6.08/101.3 | 5.96/99.3  | 2.15    |

起草组依据标准草案中拟定的肝素酶活性检测方法开展了验证实验。收集了市场上三个不同厂家的肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III，按照本标准的方法对其酶活性进行了测定，所得结果如表2所示。结果表明，所有的肝素酶均能测出活性，且测得酶活性与标称酶活性的比例均在60%以上，表明该方法具有较强的适用性。而由于不同厂家检测条件不同，各厂家生产的肝素酶的酶学特性存在差异，因此标识与本标准检测结果也会存在差异。这也进一步说明建立统一的肝素酶活性测定方法具有重要意义。

表3 不同厂家的三种肝素酶的活性测定

| 酶       | 厂家 | 标称酶活性(U/mL) | 测得酶活性(U/mL) | 测得酶活性/标称酶活性(%) |
|---------|----|-------------|-------------|----------------|
| 肝素酶 I   | a  | 10.0        | 11.7        | 117            |
| 肝素酶 I   | b  | 0.83        | 2.0         | 241            |
| 肝素酶 I   | c  | 10.0        | 7.5         | 75             |
| 肝素酶 II  | a  | 15.0        | 14.7        | 98             |
| 肝素酶 II  | b  | 0.167       | 0.11        | 66             |
| 肝素酶 II  | c  | 15.0        | 11.9        | 79             |
| 肝素酶 III | a  | 11.0        | 11.2        | 102            |
| 肝素酶 III | b  | 0.083       | 0.053       | 64             |
| 肝素酶 III | c  | 15.0        | 13.7        | 91             |

## 8、技术经济评估

本标准主要描述了肝素酶活性的测定方法，这将填补我国在肝素酶活性的测定方法标准的空白，为行业检测肝素酶活性提供一个切实可行的参考依据和评判标准。本标准的贯彻实施将规范行业的技术应用，提升产品质量管理水平，将产生良好的社会效益与经济效益。

（四）采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在制定过程中未采用国际标准或国外文件。

（五）与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准不得与现有法律、法规和强制性国家标准相抵触。

（六）重大分歧意见的处理经过和依据

无

（七）国家标准作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议

无

（八）贯彻国家标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

### 1、组织措施

在全国生化检测标准化技术委员会的组织协调下，以标准起草组成员为主，成立标准宣贯小组。

## 2、技术措施

组织撰写标准宣贯材料，组织标准宣贯培训，争取标准颁布实施后尽快推广。

### （九）废止现行有关标准的建议

无

### （十）其他应予说明的事项

无

《肝素酶活力的测定 分光光度法》标准起草组

2025 年 1 月