

ICS 07.080

CCS A40

# T/CBPIA

中国生化制药工业协会团体标准

T/CBPIA 0003—2022

## 硫酸软骨素裂解酶活力的测定 分光光度法

Determination of the activity of chondroitinase — Spectrophotometric method

2022 - 11 - 03 发布

2022 - 11 - 03 实施

中国生化制药工业协会 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。

本文件由清华大学提出。

本文件由中国生化制药工业协会归口。

本文件起草单位：清华大学、中国标准化研究院、清华大学深圳国际研究生院、北京碧澄生物科技有限公司、深圳湾实验室、苏州大学。

本文件主要起草人：王怡、苏楠、吴希、邢新会、张翀、徐冰、云振宇、吴琦、赵琳、张真庆。

全国团体标准信息平台

# 硫酸软骨素裂解酶活力的测定 分光光度法

## 1 范围

本文件描述了测定硫酸软骨素裂解酶活力的分光光度法。

本文件适用于生化试剂、工业酶制剂中硫酸软骨素裂解酶AC和硫酸软骨素裂解酶B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  
中华人民共和国药典

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**硫酸软骨素裂解酶活力单位 chondroitinase activity unit**

在30℃、pH 7.5的条件下，每分钟酶解底物硫酸软骨素或硫酸皮肤素产生1 μmol 4,5-不饱和糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位，单位为U。

## 4 原理

硫酸软骨素与硫酸皮肤素分别为硫酸软骨素裂解酶AC与硫酸软骨素裂解酶B的特异性底物。硫酸软骨素裂解酶能催化底物裂解，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，通过测定232 nm下的吸光度的变化来计算4,5-不饱和糖醛酸的生成速率，计算酶活力。

## 5 试剂

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 硫酸软骨素钠：CAS号 9082-07-9，符合《中华人民共和国药典》规定的硫酸软骨素钠的要求。

5.2 硫酸皮肤素：CAS号 54328-33-5，纯度≥95%。

5.3 盐酸溶液：浓度为6 mol/L。

量取500 mL浓盐酸，缓慢注入400 mL的水中，混匀后定容至1 000 mL。

5.4 硫酸软骨素裂解酶AC的反应底物溶液：含50 mmol/L 三羟基甲基氨基甲烷（Tris）、20 mmol/L 氯化钙（CaCl<sub>2</sub>）、50 mmol/L 氯化钠（NaCl）及1 g/L 硫酸软骨素钠，pH 7.5。

使用分析天平准确称取3.03 g Tris、1.11 g CaCl<sub>2</sub>、1.46 g NaCl及0.5 g硫酸软骨素钠（5.1），溶解在400 mL的水中，使用盐酸溶液（5.3）在pH计上调节pH至7.5后，转移至500 mL容量瓶定容，充分混匀，现用现配。

5.5 硫酸软骨素裂解酶B的反应底物溶液：含50 mmol/L Tris、20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、50 mmol/L NaCl及1 g/L 硫酸皮肤素，pH 7.5。

使用分析天平准确称取3.03 g Tris、1.11 g CaCl<sub>2</sub>、1.46 g NaCl及0.5 g硫酸皮肤素（5.2），溶解在400 mL的水中，使用盐酸溶液（5.3）在pH计上调节pH至7.5后，转移至500 mL容量瓶定容，充分混匀，现用现配。

## 6 仪器设备

- 6.1 分析天平：感量为 0.1 mg。  
 6.2 pH 计：精度为 0.01。  
 6.3 紫外-可见分光光度计：带有温控比色皿槽，波长精度为 1 nm，吸光度值精度为 0.001。  
 6.4 石英比色皿：1 cm。  
 6.5 移液器：10 μL、100 μL、1 000 μL。

## 7 试样制备和试验步骤

### 7.1 试样酶液的制备

#### 7.1.1 液体样品待测酶液制备

使用移液器移取适量硫酸软骨素裂解酶液体样品溶于水中进行稀释，使待测酶液活力控制在 30 U/mL 以下。

#### 7.1.2 固体样品待测酶液制备

使用分析天平称取适量硫酸软骨素裂解酶固体样品（精确至 0.000 1 g）溶于水中，使待测酶液活力控制在 30 U/mL 以下。

### 7.2 测定

使用移液器准确移取 1 000 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 °C ± 1 °C 后，迅速用移液器加入 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。选取曲线中最早达到  $R^2 \geq 0.98$  的线性 60 s 区段，通过线性回归方程计算斜率。每个待测酶液平行测定三次。

## 8 试验数据处理

### 8.1 液体样品

试样中硫酸软骨素裂解酶活力按式（1）计算：

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

式中：

- $X_1$  ——硫酸软骨素裂解酶活力，单位为酶活力单位每毫升（U/mL）；  
 $V_1$  ——反应底物溶液的体积，单位为微升（μL）；  
 $V_2$  ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（μL）；  
 $k$  ——酶活力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；  
 $\varepsilon$  ——吸光系数，单位为  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为  $3.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，计算结果保留三位有效数字。

### 8.2 固体样品

试样中硫酸软骨素裂解酶活力按式（2）计算：

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

式中：

- $X_2$  ——硫酸软骨素裂解酶活力，单位为酶活力单位每克（U/g）；  
 $V_1$  ——反应底物溶液的体积，单位为微升（μL）；

$V_2$  ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（ $\mu\text{L}$ ）；

$k$  ——酶活力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 $3.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）；

$V_0$  ——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）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，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超过算数平均值的10%。

---