

## 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 350—2011

---

### 血清葡萄糖测定参考方法

Reference procedure of the measurement of glucose in serum

2011-09-30 发布

2012-04-01 实施

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和缩略语 .....	1
4 测定原理 .....	3
5 测定样品 .....	3
6 测定试剂 .....	3
6.1 警示与安全注意事项 .....	3
6.2 试剂原料 .....	3
6.3 试剂性能要求 .....	4
6.4 试剂制备 .....	4
6.5 标准液的制备 .....	6
7 测定条件 .....	7
7.1 仪器 .....	7
7.2 最终反应混合液的浓度 .....	10
7.3 血清葡萄糖测定条件 .....	10
7.4 校准的扩展不确定度 .....	11
8 测定 .....	11
8.1 无蛋白滤液的制备 .....	11
8.2 试剂准备 .....	11
8.3 标准曲线制作 .....	11
8.4 测定方法 .....	12
8.5 测定范围 .....	12
8.6 误差的来源 .....	12
8.7 测定样品要求 .....	13
9 结果计算 .....	13
9.1 标准曲线的制作 .....	13
9.2 样品测定结果的计算 .....	13
9.3 单位换算 .....	13
附录 A (规范性附录) ATP 原液浓度测定 .....	14
附录 B (规范性附录) $\beta$ -NAD <sup>+</sup> 原液浓度测定 .....	16
附录 C (规范性附录) 己糖激酶原液催化活性测定 .....	18
附录 D (规范性附录) 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定 .....	21

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准制定修改采用由国际检验医学溯源联合委员会(JCTLM)批准的《CDC 人血清葡萄糖己糖激酶参考方法(分光光度法)》，并参考 ISO 15193:2009《体外诊断器具 生物源样品中量的测定 参考测定程序的表述》适当增加内容。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 为规范性附录。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准起草单位:北京航天总医院。

本标准主要起草人:陈宝荣、邵燕、陈琦、孙慧颖、杨振华。

# 血清葡萄糖测定参考方法

## 1 范围

本标准规定了在临床医学应用中,测定血清葡萄糖浓度的参考方法。

本标准主要适用于参考实验室,作为血清葡萄糖测定的溯源,也可作为与血清葡萄糖检验有关的仪器和试剂生产企业的溯源,可供有关认可单位及质量管理部门应用。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

ISO 15193:2009 体外诊断器具 生物源样本中量的测定 参考测定程序的表述

## 3 术语和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**原始样本 primary sample**

最初从一个系统中取出的一个或几个部分的集合物,旨在提供该系统的信息或作为对该系统做出决定的基础。

注:在某些情况下,所提供的信息可以适用于一个较大的系统或一组系统,此时取样系统是这些系统的组成部分。

#### 3.1.2

**实验室样本 laboratory sample**

准备送到实验室或实验室接收的用于测定的原始样本或原始样本的分样本。

#### 3.1.3

**分析样本 analytical sample**

自实验室样本制备的、可从中取出分析部分的样本。

注:在取出分析部分之前,分析样本可经过各种处理。

#### 3.1.4

**分析部分 analytical portion**

从分析样本中取出的用于实际测定和观察的物质部分。

注:如果不需预处理,分析部分直接从原始样本或实验室样本中取出。某些情况下,需将分析部分溶解成分析溶液再上机测定。

#### 3.1.5

**分析溶液 analytical solution**

将分析部分溶解在气体、液体或固体中而制备的溶液,溶解过程中可以有反应发生或无反应发生。

3.1.6

**(某一物质系统的)基质 matrix(of a material system)**

一个物质系统中除被分析物之外的所有成分。

3.1.7

**参考方法 reference measurement procedure**

是在校准或表征标准物质时为提高测定结果所采用的测定方法,它适用于评定由同类量的其他测定方法获得的被测量值的测定正确度。

3.1.8

**测定系统的灵敏度 sensitivity of a measuring system**

简称:灵敏度 sensitivity

测定系统的示值变化除以相应的被测定值变化所得的商。

注1:测定系统的灵敏度可能与被测定的量值有关。

注2:所考虑的被测定值的变化必须大于测定系统的分辨力。

3.1.9

**分析特异性 analytical specificity**

测定方法只测定可测定的量的能力。

3.1.10

**分析干扰 analytical interference**

由一个影响量引起的系统测定误差,该影响量自身在测定系统中不产生信号,但它会引起示值的增高或降低。

3.1.11

**影响量 influence quantity**

被测定以外的可影响测定结果的量。

3.1.12

**被测量 measurand**

拟测定的量。

注1:对被测定的说明要求了解量的种类,以及含有该量的现象、物体或物质状态的描述,包括有关成分及所涉及的化学实体。

注2:在VIM第二版和IEC 60050-300:2001中,被测定定义为受到测定的量。

注3:测定包括测定系统和实施测定的条件,它可能会改变研究中的现象、物体或物质,使被测定的量可能不同于定义的被测定。在这种情况下,适当的修正是必要的。

3.1.13

**检出限 detection limit, limit of detection**

由给定测定方法获得的测得值,其声称的物质成分不存在的误判概率为 $\beta$ ,声称物质成分存在的误判概率为 $\alpha$ 。

注1:国际理论和应用化学联合会(IUPAC)推荐 $\alpha$ 和 $\beta$ 的默认值为0.05。

注2:有时使用缩写词LOD。

注3:不要用术语“灵敏度”表示“检出限”。

3.1.14

**校准品 calibrator**

用于校准的测定标准。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

NAD:氧化型 β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-nicotinamide-adenine-dinucleotide,oxidize form)

HK:己糖激酶(hexokinase)

ATP:还原型 β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-nicotinamide-adenine-dinucleotide,reduced form)

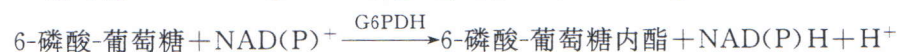
G6PDH:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase)

IFCC:国际临床化学与检验医学联合会(international federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

SOP:标准操作方法(standard operation procedure)

#### 4 测定原理

在己糖激酶催化下,葡萄糖和 ATP 发生磷酸化反应,生成葡萄糖-6-磷酸与 ADP。葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化下脱氢,生成 6-磷酸葡萄糖酸,同时使 NAD(P)还原成 NAD(P)H。反应式如下:



在 NAD(P)转化成 NAD(P)H 的同时,伴有 340 nm 处摩尔消光系数的上升,摩尔消光系数变化与葡萄糖含量成正比,通过检测 339 nm 处摩尔消光系数即可测定血清中葡萄糖含量。

#### 5 测定样品

标准物质、校准品、质控品、血清。

#### 6 测定试剂

##### 6.1 警示与安全注意事项

6.1.1 氢氧化钡:高毒类物质,吸入及接触可引起中毒,表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻、脉缓、进行性肌麻痹、心律紊乱、血钾明显降低等。接触高温本品溶液可造成皮肤灼伤同时吸收中毒。称量及配制试剂时应进行有效防护,带防护眼镜、橡胶手套,穿隔离服。

6.1.2 硫酸锌:对眼睛有中度刺激性,对皮肤无刺激性,误服可引起急性胃肠炎,严重可引起休克至死亡,称量及配制试剂时应进行有效防护,带防护眼镜、橡胶手套,穿隔离服。

6.1.3 乙酸镁:吸入、摄入或经皮肤吸收后对身体有害。对眼睛、皮肤和黏膜有刺激作用。吸入可致咳嗽、咯痰。误服可引起胃痛、呕吐、呼吸困难、紫绀、肾脏受累等,称量及配制试剂时应进行有效防护,带防护眼镜、橡胶手套,穿隔离服。

6.1.4 安息香酸:对皮肤有轻度刺激性,蒸汽对呼吸道、眼和皮肤产生刺激,但一般情况下接触无明显危害性,称量及配制试剂时应进行有效防护,带橡胶手套。

##### 6.2 试剂原料

本方法使用下列试剂。

6.2.1 3,3-双(4-羟基苯基)-1(3H)-异苯并呋喃酮(酚酞,  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ),相对分子质量=318.33。

6.2.2 硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),相对分子质量=287.56。

6.2.3 氢氧化钡[ $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ],相对分子质量=315.46。

6.2.4 安息香酸( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ ),相对分子质量=122.12。

- 6.2.5 2-氨基-2-羟基-1,3-丙二醇(Tris-HCl)( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$ ), 相对分子质量=157.60。
- 6.2.6 三羟甲基氨基甲烷(Tris-Base)[ $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ], 相对分子质量=121.14。
- 6.2.7 醋酸镁[ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ], 相对分子质量=214.45。
- 6.2.8 牛血清白蛋白, 五级, 相对分子质量=68 000。
- 6.2.9 5'三磷酸腺嘌呤(ATP)[ $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ], 相对分子质量=551.14。
- 6.2.10 氧化型β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\beta\text{-NAD}^+$ )( $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$ ), 相对分子质量=663.43。
- 6.2.11 己糖激酶(hexokinase, HK), 来源于酵母, 要求高纯度。
- 6.2.12 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH), 应来源于肠膜明串珠菌, 可以悬浮于硫酸铵溶液或为冻干粉, 要求高纯度。

### 6.3 试剂性能要求

- 6.3.1 宜使用最高纯度的试剂。
- 6.3.2  $\beta\text{-NAD}^+$ :  $\beta\text{-NAD}^+$  原液浓度应  $>0.005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 若  $<0.005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 则该来源的  $\beta\text{-NAD}^+$  不能用于测定血清葡萄糖。
- 6.3.3 ATP: ATP 原液浓度应  $>0.005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 若  $<0.005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 则该来源的 ATP 不能用于测定血清葡萄糖。
- 6.3.4 250 mL 己糖激酶原液酶总活性至少为 1 250 U。
- 6.3.5 250 mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液总活性至少为 1 250 U。

### 6.4 试剂制备

#### 6.4.1 称量量的计算

配制试剂的试剂原料的纯度应为 100%, 如果试剂原料含量小于 100% [例如,  $y(\%)$ ], 按公式(1)计算实际含量:

$$w_{\text{实际}} = \frac{w_{\text{理论}}}{y} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$w_{\text{实际}}$  —— 实际称量;

$w_{\text{理论}}$  —— 理论称量;

$y$  —— 试剂原料纯度, %。

注: 每次称量过程中的扩展不确定度( $k=2$ )(包括物质纯度的不确定度)应  $\leq 1.5\%$ , 称量时显示的值与靶值的差异不应超过 0.5%。

#### 6.4.2 试剂制备用水

##### 6.4.2.1 纯水

宜使用高纯度的水(导电性  $< 2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pH6~7, 硅酸盐  $< 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )制备试剂。

##### 6.4.2.2 无 CO<sub>2</sub> 水

试剂水在敞口的容器中煮沸 15 min, 密闭冷却至使用前。

#### 6.4.3 血清葡萄糖试剂

##### 6.4.3.1 0.5% 酚酞指示剂

准确称取 0.125 g 酚酞, 放入烧杯内, 用 20 mL 95% 乙醇溶解后转移至 25 mL 容量瓶内, 用 95% 乙

醇补足至刻度线。密闭玻璃瓶 2℃~8℃ 保存。稳定 1 个月。

#### 6.4.3.2 22 g·L<sup>-1</sup> 的 ZnSO<sub>4</sub> 溶液

准确称取 22 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 放入烧杯内, 用 800 mL 热的无 CO<sub>2</sub> 水(水温大于 50℃) 溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶内, 用无 CO<sub>2</sub> 水补足至刻度线。密闭玻璃瓶室温保存。稳定 1 个月。

#### 6.4.3.3 饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液

准确称取 80 g Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, 放入烧杯内, 用 800 mL 热的无 CO<sub>2</sub> 水(水温大于 50℃) 溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶内, 用无 CO<sub>2</sub> 水补足至刻度线。需至少 24 h 后使用。采用带有碱石灰帽的玻璃瓶密闭室温保存, 碱石灰帽中的碱石灰每两天更换 1 次。稳定 1 个月。

#### 6.4.3.4 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液

6.4.3.4.1 用无 CO<sub>2</sub> 水稀释 245 mL 饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液→1 000 mL。密闭玻璃瓶室温保存, 稳定 1 d。

6.4.3.4.2 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液的检查方法:

- 用中和滴定法检查该溶液的浓度;
- 在清洁干燥的烧杯中准确加入 10 mL 的 ZnSO<sub>4</sub> 溶液;
- 在烧杯中加入 2 滴 0.5% 的酚酞溶液作为指示剂;
- 准确吸取 10 mL 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液进行滴定, 至淡粉色为终点;
- 结果判断: 如果消耗 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液在 10 mL±0.1 mL 范围内, 说明配制的溶液符合要求; 如果消耗 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液 >10.1 mL 或 <9.9 mL, 说明 0.11 mol·L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液浓度过高或过低, 应按式(2)计算补偿量:

$$c_{\text{稀释}} = \frac{c_{\text{ZnSO}_4} \times V_{\text{ZnSO}_4}}{V_{\text{Ba(OH)}_2}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$c_{\text{ZnSO}_4}$  —— ZnSO<sub>4</sub> 溶液浓度, 单位为摩尔每升(mol·L<sup>-1</sup>);

$V_{\text{ZnSO}_4}$  —— ZnSO<sub>4</sub> 溶液体积, 单位为毫升(mL);

$V_{\text{Ba(OH)}_2}$  —— Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液体积, 单位为毫升(mL)。

#### 6.4.4 1 g·L<sup>-1</sup> 安息香酸稀释液

准确称取 2.0 g 安息香酸, 放入烧杯内, 用 1 800 mL 热的试剂水溶解后转移至 2 000 mL 容量瓶内, 用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶室温保存。稳定 3 个月。

#### 6.4.5 1.5% Tris-HCl 原液

准确称取 31.52 g Tris-HCl, 放入烧杯内, 用 1 800 mL 试剂水溶解后转移至 2 000 mL 容量瓶内, 用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃ 保存。稳定 2 周。

#### 6.4.6 1.2% Tris-Base 原液

准确称取 6.06 g Tris-Base, 放入烧杯内, 用 400 mL 试剂水溶解后转移至 500 mL 容量瓶内, 用试剂水补足至刻度线。密闭试剂瓶 2℃~8℃ 保存。稳定 2 周。

#### 6.4.7 pH7.5 的 Tris-Mg 缓冲液

移取 800 mL Tris-HCl 原液和 200 mL Tris-Base 原液至烧杯内充分混匀。准确称量 1.1 g 醋酸镁



溶解于混合好的 Tris 溶液中,在 25 ℃测定混合液 pH 值。

配酶试剂时要新鲜配制,贮存前用 0.45 μm 滤菌膜过滤溶液,贮存在无菌带螺旋帽的硼硅酸盐玻璃瓶中,贮存于 2 ℃~8 ℃冰箱。稳定 2 周。

#### 6.4.8 0.2% Tris-白蛋白原液

准确称取 0.5 g 牛血清白蛋白,放入烧杯内,用 200 mL Tris-Mg 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-Mg 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.9 ATP 原液

准确称取 0.826 8 g ATP 二钠盐,放入烧杯内,用 200 mL Tris-Mg 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-Mg 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.10 β-NAD<sup>+</sup> 原液

准确称取 0.995 2 g β-NAD<sup>+</sup>,放入烧杯内,用 200 mL Tris-Mg 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-Mg 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.11 己糖激酶原液

采 25 ℃称量法依据己糖激酶测定的含量获得总活性为 1 250 U 己糖激酶,放入烧杯内,用 200 mL Tris-Mg 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-Mg 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.12 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液

采用 25 ℃称量法依据 6-磷酸葡萄糖脱氢酶测定的含量获得总活性为 1 250 U 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,放入烧杯内,用 200 mL Tris-Mg 缓冲液溶解后转移至 250 mL 容量瓶内,用 Tris-Mg 缓冲液补足至刻度线。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.13 酶试剂

试剂验证合格后,用 Tris-Mg 缓冲液稀释 200 mL ATP 原液、200 mL β-NAD<sup>+</sup> 原液、总活性 800 U 的己糖激酶原液和总活性 800 U 的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液→1 000 mL,轻轻颠倒混匀,不要用力振荡。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 2 周。

#### 6.4.14 60%葡萄糖液

用 1 g/L 安息香酸稀释 60 mL 葡萄糖原液→100 mL。密闭试剂瓶 2 ℃~8 ℃保存。稳定 1 周。

### 6.5 标准液的制备

#### 6.5.1 葡萄糖标准原液(10 g·L<sup>-1</sup>)的配制

准确称取 5.000 g SRM 917b,放入清洁干燥经过灭菌处理的烧杯内,加入 300 mL 安息香酸稀释液进行溶解,溶解后倒入 500 mL A 级容量瓶中,用安息香酸稀释液多次冲洗烧杯,将烧杯内的葡萄糖溶液全部转移至容量瓶,加安息香酸溶液至 500 mL 标记线下 1 cm 处,密闭,把容量瓶放 20 ℃±1 ℃水槽中,水浸至瓶颈处,平衡溶液 30 min。用安息香酸稀释液补足,密闭颠倒混匀至少 10 次,每一次颠倒、旋转倒置容量瓶 10 s。配制完成后进行分装,每 125 mL 一份,放入带有螺旋盖的硼硅酸盐的瓶中,密闭并标记,注明日期,保存在 4 ℃或-20 ℃。如无污染,标准原液可以长期稳定。建议每 6 个月重新

配制。

在一个新批号标准物质使用前,应使用新标准原液配制 1 个系列新工作标准液,与旧的系列工作标准液在同一批测试,每一浓度测定双份,比较它们的变异。

注 1: SRM 917b 的称量误差应控制在  $\pm 0.002$  g 以内。分装后的每一瓶标准原液只能用于制备 1 套系列标准液。

注 2: 葡萄糖标准原液(10 g/L)的配制也可采用其他国际或国家标准物质。

## 6.5.2 工作标准液的配制

将葡萄糖标准原液和安息香酸稀释液在  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  的水浴箱中平衡 30 min,按表 1 配制工作标准液。

表 1 工作标准液配制方法

原液 mL	用安息香酸稀释液 稀释的最终体积 mL	最终葡萄糖浓度	
		$\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
0	100	0	0
5.00	100	50	2.78
10.00	100	100	5.55
20.00	100	200	11.10
30.00	100	300	16.65
40.00	100	400	22.20

配制好的工作标准液应贮存于聚乙烯螺旋帽瓶中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  稳定期不超过 1 个月。

注: 工作标准液贮存瓶必须清洁干燥且经过无菌化处理。

## 7 测定条件

### 7.1 仪器

#### 7.1.1 紫外可见分光光度计

##### 7.1.1.1 环境条件

温度:  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 湿度:  $45\% \sim 85\%$ , 避光, 不能直接放在风口, 防震, 外围禁放热源, 放置场所周围不能有大容量变压器等强磁场, 周围环境宜清洁无尘, 电压稳定, 避免共用电源设备的频繁开关。应有接地线, 接地电阻  $> 100\ \Omega$ , 仪器两侧各应有大于 20 cm 空间。

##### 7.1.1.2 数据测定范围

ABS:  $-3.000 \sim 3.000$  或  $0.0\%T \sim 200.0\%T$ 。

##### 7.1.1.3 测定模式

ABS; %T; Conc。

##### 7.1.1.4 技术指标

应符合下列要求:

- 波长:190 nm ~1 100 nm;
- 波长准确度:±0.2 nm;
- 波长重现性:±0.1 nm;
- 摩尔消光系数准确性:±(0.002~0.004);
- 摩尔消光系数重现性:±(0.001~0.002);
- 噪声:≤0.000 2 Abs;
- 基线稳定性:≤0.000 3 Abs/h;
- 基线平稳度:±0.001 A;
- 光谱带宽:≤1.5 nm;
- 光学精度:±0.005 A;
- 杂散光:≤0.05% T。

#### 7.1.1.5 校准情况

每年至少进行一次校准;大型实验前应进行校准。

#### 7.1.2 点式温度计

##### 7.1.3 环境条件

温度 0 °C ~100 °C,湿度 <90%。

##### 7.1.3.1 数据测定范围

0 °C ~100 °C。

##### 7.1.3.2 测定模式

°C。

##### 7.1.3.3 技术指标

应符合下列要求:

- 分辨率:0.001 °C;
- 准确度:±0.01 °C;
- 重复性:±0.005 °C;
- 解析度:±0.000 1 °C。

##### 7.1.3.4 校准情况

每年至少进行一次校准;大型实验前应进行校准。

#### 7.1.4 pH 计

##### 7.1.4.1 环境条件

温度 5 °C ~45 °C,湿度 5%~85%。

##### 7.1.4.2 基本性能特征

应符合下列要求:

- pH 范围:—1.000~14.000;

- pH 分辨率:0.002/0.01;
- 准确度:±0.002;
- 斜率:80%~120%;
- 温度范围:-5℃~105℃;
- 温度分辨率:±0.3℃。

#### 7.1.4.3 校准情况

##### 7.1.4.3.1 pH 标准缓冲液的选择与使用

应符合下列要求:

- 应使用至少两种标准缓冲液进行校准,标准缓冲液应包含 pH6~8 的范围,即应包含需调整的测定试剂的 pH 值;
- pH 标准缓冲液的不确定度应 $\leq$ 0.01 pH;
- 所用标准缓冲液应能溯源至国际或国家参考物质。

##### 7.1.4.3.2 pH 计校准

按标准物质证书制备 pH 标准缓冲液:将 pH 标准溶液温度调整至 25℃,按 pH 计使用说明书进行校准。

#### 7.1.5 电子分析天平

##### 7.1.5.1 环境条件

温度 5℃~35℃,湿度 45%~85%。

##### 7.1.5.2 技术指标

应符合下列要求:

- 准确度级别:特种准确度级;
- 最大允许误差:±0.000 5 g。

##### 7.1.5.3 校准情况

每年进行一次校准;必要时可增加校准。

#### 7.1.6 电子天平

##### 7.1.6.1 环境条件

温度 5℃~35℃,湿度 45%~85%。

##### 7.1.6.2 技术指标

应符合下列要求:

- 准确度级别:高准确度级;
- 最大允许误差:±0.05 g。

##### 7.1.6.3 校准情况

每年至少进行一次校准;大型实验前应进行校准。

### 7.1.7 加样器

#### 7.1.7.1 技术指标

应符合下列要求：

- 容量允许误差:JJG 646—2006 计量性能标准；
- 测定重复性:JJG 646—2006 计量性能标准。

#### 7.1.7.2 校准情况

每三个月进行一次校准；实验前应进行校准。

### 7.1.8 容量瓶

#### 7.1.8.1 技术指标

应符合下列要求：

- 材质、外观、结构、密合性:JJG 196—2006 通用技术标准；
- 容量允许误差:JJG 196—2006 计量性能标准。

#### 7.1.8.2 校准情况

实验前进行校准。

### 7.2 最终反应混合液的浓度

见表 2。

表 2 血清葡萄糖最终完全反应混合液的浓度

参 数	指 标
醋酸镁[Tris-Mg]	4.17 mmol · L <sup>-1</sup>
pH(25 °C)	7.5 ± 0.05 <sup>a</sup>
ATP	1 mmol · L <sup>-1</sup>
NAD	1 mmol · L <sup>-1</sup>
己糖激酶(25 °C)	667 U · L <sup>-1</sup> (11 μkat · L <sup>-1</sup> )
6-磷酸葡萄糖脱氢酶(25 °C)	667 U · L <sup>-1</sup> (11 μkat · L <sup>-1</sup> )
醋酸镁[Tris-Mg]	4.17 mmol · L <sup>-1</sup>
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

### 7.3 血清葡萄糖测定条件

见表 3。

表 3 血清葡萄糖测定条件

参 数	指 标
温度	25.0 °C ± 1 °C <sup>a</sup>
波长	339 nm ± 1 nm <sup>a</sup>
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm <sup>a</sup>
孵育时间	10 min
测定时间	孵育后 30 min 内
<sup>a</sup> 扩展不确定度( $k=2$ )。	

#### 7.4 校准的扩展不确定度

如果校准的扩展不确定度等于或小于原参考测定程序中规定的该参数允许范围,且校准的不确定度范围重叠于规定的允许区间,则温度、pH、光径和波长的参数遵从规定允许范围。

## 8 测定

### 8.1 无蛋白滤液的制备

按表 4 所列顺序和量,将试剂和工作标准液/样品加入离心管中。

表 4 无蛋白滤液的制备步骤

Ba(OH) <sub>2</sub> (0.11 mol · L <sup>-1</sup> )	5.0 mL
工作标准液/样品	0.5 mL
充分混匀 5 s~10 s,立即加入 ZnSO <sub>4</sub>	
ZnSO <sub>4</sub>	5.0 mL
剧烈振荡 10 s,充分混匀,立即按 1 000 × g · min <sup>-1</sup> 离心 10 min,离心后上清液即为无蛋白滤液。	

### 8.2 试剂准备

测定前,将足量的酶试剂和样本(无蛋白滤液)在 25 °C 下平衡 20 min。其余酶试剂溶液应贮存于 2 °C~8 °C。

### 8.3 标准曲线制作

#### 8.3.1 工作标准液滤液摩尔消光系数的测定

按表 5 所列顺序和量,将工作标准液无蛋白滤液和试剂进行混合孵育后加入比色杯。

表 5 工作标准液摩尔消光系数测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
酶试剂	2.5 mL	0
工作标准液无蛋白滤液	0.5 mL	0
试剂水	0	3.0 mL

轻轻颠倒混匀, 孵育 10 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀, 将各管液体依次倒入比色杯内, 在 30 min 内测定摩尔消光系数。

### 8.3.2 制备标准曲线

工作标准液的摩尔消光系数值按最小二乘法计算, 制作标准曲线。比较每个浓度标准的实际测定浓度与它的理论浓度差值, 按下列标准进行判断:

- 工作标准液浓度在 0 mg/dL ~ 200 mg/dL 范围: 则 | 实际测定浓度 - 理论浓度 | 应  $\leq 2.0$  mg/dL;
  - 工作标准液浓度  $> 200$  mg/dL 时: 则 | 实际测定浓度 - 理论浓度 |  $\leq 2.5$  mg/dL;
  - 要求 12 个标准的测定结果最多有 2 个不在允许范围内。
- 如果超出以上要求, 则标准曲线无效, 需重新制备。

### 8.4 测定方法

按表 6 所列顺序和量, 将试剂和样品进行混合孵育后加入比色杯。

表 6 血清葡萄糖测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
酶试剂	2.5 mL	0
样本无蛋白滤液	0.5 mL	0
试剂水	0	3.0 mL

轻轻颠倒混匀, 孵育 10 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀, 将各管液体依次倒入比色杯内, 在 30 min 内测定摩尔消光系数。

注: 应使用符合测定性能的分光光度计和高准确度容量设备, 分光光度测定的不确定度和样品体积的不确定度宜用已知标准不确定度的测定程序确定; 分光光度测定的摩尔消光系数扩展不确定度 ( $k=2$ ) 不应超过 1%; 样品体积部分的扩展不确定 ( $k=2$ ) 应该  $\leq 1\%$ 。

### 8.5 测定范围

血清葡萄糖测定参考方法的线性为  $0 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1} \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  (考虑浓度  $> 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  无临床实际意义, 不进行浓度  $> 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  的样品线性分析)。

### 8.6 误差的来源

- 8.6.1 组织细胞和微生物会引起糖酵解, 干扰血清葡萄糖的测定。
- 8.6.2 高浓度专用抗凝剂氟化钠会干扰血清葡萄糖的测定。
- 8.6.3 红细胞内释放出的有机酸磷脂和一些酶可干扰血清葡萄糖的测定。

## 8.7 测定样品要求

8.7.1 校准品、质控品、标准物质应严格按照运输条件和贮存条件运输和保存。

8.7.2 静脉采血应空腹 10 h ~ 14 h, 采血 3 mL, 室温 2 h 内离心分离血清, 离心速度  $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心时间 10 min。

## 9 结果计算

### 9.1 标准曲线的制作

用最小二乘法获得标准曲线斜率  $b$  和截距  $a$ , 每个单独的摩尔消光系数作为非独立变异因素给出, 浓度作为独立因素使用, 12 个摩尔消光系数值和 12 个浓度用于 6 组数据分析。

设定“倍增系数( $F$ )”= $1/b$ ; “校正因数( $C$ )”= $a/b$ 。

12 个标准液的每一个实际测定浓度按公式(3)计算:

$$c_{\text{标准液}} = A_{\text{标准液}} \times F - C \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$c_{\text{标准液}}$  —— 标准液实际测定浓度, 单位为毫克每分升( $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ );

$A_{\text{标准液}}$  —— 标准液摩尔消光系数值;

$F$  —— 倍增系数, 等于  $1/b$ ;

$C$  —— 校正因数, 等于  $a/b$ 。

### 9.2 样品测定结果的计算

标准曲线符合通过标准后, 按公式(4)计算样品浓度:

$$c_{\text{样品}} = A_{\text{样品}} \times F - C \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

$c_{\text{样品}}$  —— 样品浓度, 单位为毫克每分升( $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ );

$A_{\text{样品}}$  —— 样品摩尔消光系数值;

$F$  —— 倍增系数, 等于  $1/b$ ;

$C$  —— 校正因数, 等于  $a/b$ 。

### 9.3 单位换算

以  $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  单位表示的血清葡萄糖浓度可通过乘以系数( $f=0.056$ )转化成  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



附 录 A  
(规范性附录)  
ATP 原液浓度测定

## A.1 测定试剂

## A.1.1 试剂准备

Tris-Mg 缓冲液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、己糖激酶原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中 20 min, 使试剂达到预定温度。

## A.1.2 试剂制备

## A.1.2.1 ATP 实验试剂

等量混合 Tris-Mg 缓冲液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、己糖激酶原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液, 混合后的量应满足最初和重复三次分析的量。使用前新鲜配制。

## A.1.2.2 ATP 稀释液

移取 5 mL ATP 原液至 100 mL 容量瓶内, 用 Tris-Mg 缓冲液稀释, 补足至刻度线。2 °C ~ 8 °C 稳定性 1 d。

## A.2 测定条件

## A.2.1 最终反应混合液的浓度

见表 A.1。

表 A.1 ATP 原液浓度验证最终反应混合液的浓度

参 数	指 标
醋酸镁 [Tris-Mg]	0.83 mmol · L <sup>-1</sup>
pH(25 °C)	7.5 ± 0.05 <sup>a</sup>
NAD	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
己糖激酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 μkat · L <sup>-1</sup> )
6-磷酸葡萄糖脱氢酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 μkat · L <sup>-1</sup> )
葡萄糖	6.67 mmol · L <sup>-1</sup>
样品与反应混合物体积比	0.167 (1 : 6)
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

## A.2.2 ATP 原液浓度测定条件

见表 A.2。

表 A.2 ATP 原液浓度测定条件

参 数	指 标
温度	25.0 °C ± 0.2 °C <sup>a</sup>
参数	指示
波长	339 nm ± 1 nm <sup>a</sup>
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm <sup>a</sup>
孵育时间	10 min
测定时间	孵育后马上测定
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

## A.3 测定

## A.3.1 试剂准备

将 ATP 实验试剂、5 mL ATP 稀释液和含有 5 mL Tris-Mg 缓冲液的密闭的试管放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中大约 10 min, 使液体达到预定温度。

## A.3.2 测定方法

按表 A.3 的顺序和量, 将试剂和样品进行混合孵育后加入比色杯。

表 A.3 ATP 原液浓度测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
ATP 实验试剂	5.0 mL	5.0 mL
ATP 稀释液	1.0 mL	0
Tris-Mg 缓冲液	0	1.0 mL
轻轻颠倒混匀, 孵育 10 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀, 将各管液体依次倒入比色杯内, 立即测定摩尔消光系数。		

## A.4 结果计算

按公式(A.1)计算 ATP 原液的浓度:

$$c = [A_{\text{test}}(10 \text{ min}) / (E \times b)] \times (V_r / V_s) \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- $c$  —— 浓度, 单位为毫摩尔每毫升( $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ );
- $A_{\text{test}}(10 \text{ min})$  —— 10 min 的摩尔消光系数;
- $E$  —— 摩尔消光系数(对于本试验: 值是  $6.53 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );
- $b$  —— 光径, 单位为厘米(cm);
- $V_r$  —— 总反应体积, 单位为毫升(mL), 本例为 6 mL;
- $V_s$  —— 在总反应体积中  $\text{NAD}^+$  原液体积, 单位为毫升(mL), 本例为 0.05 mL。

**附录 B**  
(规范性附录)  
 **$\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液浓度测定**

**B.1 测定试剂****B.1.1 试剂准备**

Tris-Mg 缓冲液、ATP 原液、己糖激酶原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中 20 min, 使试剂达到预定温度。

**B.1.2 试剂制备****B.1.2.1  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 实验试剂**

等量混合 Tris-Mg 缓冲液、ATP 原液、己糖激酶原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液, 混合后的量应满足最初和重复三次分析的量。使用前新鲜配制。

**B.1.2.2  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 稀释液**

移取 5 mL  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液至 100 mL 容量瓶内, 用 Tris-Mg 缓冲液稀释, 补足至刻度线。2 °C ~ 8 °C 稳定性 1 d。

**B.2 测定条件****B.2.1 最终反应混合液的浓度**

见表 B.1。

**表 B.1  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液浓度验证最终反应混合液的浓度**

参 数	指 标
醋酸镁[Tris-Mg]	0.83 mmol · L <sup>-1</sup>
pH(25 °C)	7.5 ± 0.05 <sup>a</sup>
ATP	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
己糖激酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 μkat · L <sup>-1</sup> )
6-磷酸葡萄糖脱氢酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 μkat · L <sup>-1</sup> )
葡萄糖	6.67 mmol · L <sup>-1</sup>
样品与反应混合物体积比	0.167 (1 : 6)
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

**B.2.2  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液浓度测定条件**

见表 B.2。

表 B.2  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液浓度测定条件

参 数	指 标
温度	25.0 °C ± 0.2 °C <sup>a</sup>
波长	339 nm ± 1 nm <sup>a</sup>
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm <sup>a</sup>
孵育时间	10 min
测定时间	孵育后马上测定
<sup>a</sup> 扩展不确定度( $k=2$ )。	

### B.3 测定

#### B.3.1 试剂准备

将  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 实验试剂、5 mL  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 稀释液和含有 5 mL Tris-Mg 缓冲液的密闭的试管放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中大约 10 min, 使液体达到预定温度。

#### B.3.2 测定方法

按表 B.3 的顺序和量, 将试剂和样品进行混合孵育后加入比色杯。

表 B.3  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液浓度测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
$\beta$ -NAD <sup>+</sup> 实验试剂	5.0 mL	5.0 mL
$\beta$ -NAD <sup>+</sup> 稀释液	1.0 mL	0
Tris-Mg 缓冲液	0	1.0 mL
轻轻颠倒混匀, 孵育 10 min。孵育结束后轻轻颠倒混匀, 将各管液体依次倒入比色杯内, 立即测定摩尔消光系数。		

### B.4 结果计算

按公式(B.1)计算 NAD<sup>+</sup> 原液的浓度:

$$c = [A_{\text{test}}(10 \text{ min}) / (E \times b)] \times (V_r / V_s) \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

- $c$  —— 浓度, 单位为毫摩尔每毫升 ( $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ );
- $A_{\text{test}}(10 \text{ min})$  —— 10 min 的摩尔消光系数;
- $E$  —— 摩尔消光系数(对于本试验: 值是  $6.53 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );
- $b$  —— 光径, 单位为厘米 (cm);
- $V_r$  —— 总反应体积, 单位为毫升 (mL), 本例为 6 mL;
- $V_s$  —— 在总反应体积中 NAD<sup>+</sup> 原液体积, 单位为毫升 (mL) 本例为 0.05 mL。

## 附 录 C

(规范性附录)

## 己糖激酶原液催化活性测定

## C.1 测定试剂

## C.1.1 试剂准备

Tris-白蛋白、ATP 原液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液放在 25 °C  $\pm$  0.2 °C 的水浴箱中 20 min, 使试剂达到预定温度。

## C.1.2 试剂制备

## C.1.2.1 己糖激酶实验试剂

等量混合 Tris-白蛋白、ATP 原液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液、葡萄糖液, 混合后的量应满足最初和重复三次分析的量。使用前新鲜配制。

## C.1.2.2 己糖激酶稀释液

移取 1 mL 己糖激酶原液至 100 mL 容量瓶内, 用 Tris-白蛋白稀释, 补足至刻度线。2 °C ~ 8 °C 稳定性 1 d。

## C.2 测定条件

## C.2.1 最终反应混合液的浓度

见表 C.1。

表 C.1 己糖激酶原液催化活性测定最终反应混合液的浓度

参 数	指 标
白蛋白[Tris-白蛋白]	0.001 mmol · L <sup>-1</sup>
pH(25 °C)	7.5 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
ATP	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
NAD	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
6-磷酸葡萄糖脱氢酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 $\mu$ kat · L <sup>-1</sup> )
葡萄糖	6.67 mmol · L <sup>-1</sup>
样品与反应混合物体积比	0.167 (1 : 6)
<sup>a</sup> 扩展不确定度( $k=2$ )。	

C.2.2 己糖激酶原液浓度测定条件

见表 C.2。

表 C.2 己糖激酶原液催化活性测定条件

参 数	指 标
温度	25.0 °C ± 0.2 °C <sup>a</sup>
波长	339 nm ± 1 nm <sup>a</sup>
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm <sup>a</sup>
孵育时间	10 min
测定时间	孵育后连续测定 5 min
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

C.3 测定

C.3.1 试剂准备

将己糖激酶实验试剂、5 mL 己糖激酶稀释液和含有 5 mL Tris-白蛋白的密闭的试管放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中大约 10 min,使液体达到预定温度。

C.3.2 测定方法

按表 C.3 的顺序和量,将试剂和样品加入比色杯。

表 C.3 己糖激酶原液催化活性测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
己糖激酶实验试剂	5.0 mL	5.0 mL
己糖激酶稀释液	1.0 mL	0
Tris-白蛋白	0	1.0 mL
轻轻颠倒混匀,倒入比色杯内,立即连续测定 5 min 摩尔消光系数。		

C.4 结果计算

按公式(C.1)计算 25 °C HK 原液的浓度:

$$\text{HK 原液活性量(U/L)} = [(dA/dt) / (E \times b)] \times (V_r / V_s) \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

dA —— 摩尔消光系数变化值(本次分析用 3min 和 2min 读数的变化);

dt —— 测定时间变化,单位为分(min);

E —— 摩尔消光系数(本次分析条件下,值为  $6.53 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );

b —— 光径,单位为厘米(cm);

$V_r$  ——总反应体积,单位为毫升(mL),(上面给出的程序,体积为 6 mL:5 mL HK 试验试剂+1 mL 稀释 HK);

$V_s$  ——总反应量中的酶原液量,单位为毫升(mL)[上面给出的程序:1 mL 被稀释 HK 加到反应混合液中(包含 0.01mL 酶原液),因此  $V_s$  是 0.01 mL。]。

注:在 5 min 内任意 1 min 的摩尔消光系数分析偏差变化应 $<0.005 \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}$ ,若摩尔消光系数变化 $>0.005 \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}$ ,应考虑分析偏差以外的原因。

#### C.4.1 己糖激酶原液活性测定示例

示例:如己糖激酶厂家提供的活性浓度为  $1\,395 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按 C.3 测定方法进行测定,3 min 时摩尔消光系数是 0.203,2 min 时摩尔消光系数是 0.166,计算 HK 原液活性量。

$$\begin{aligned} \text{HK 稀释液活性} &= \{A_{\text{rest}}(3\text{min}) - A_{\text{rest}}(2\text{min})\} \times (0.963 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}) \times (1/V_s) \\ &= (0.203 - 0.166) \cdot \text{min}^{-1} \times 0.963 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \times 1/0.01 \\ &= 3.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{在 } 25 \text{ }^\circ\text{C}) \end{aligned}$$

$$\text{HK 原液活性} = 3.56 \times 250 = 890.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$$

该己糖激酶纯度为  $890 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,与厂家提供的活性浓度不符,配制时应按照实测活性配制。

## 附录 D

(规范性附录)

## 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定

## D.1 测定试剂

## D.1.1 试剂准备

Tris-白蛋白、ATP 原液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、己糖激酶原液、葡萄糖液放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中 20 min, 使试剂达到预定温度。

## D.1.2 试剂制备

## D.1.2.1 6-磷酸葡萄糖脱氢酶实验试剂

等量混合 Tris-白蛋白、ATP 原液、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 原液、己糖激酶原液、葡萄糖液, 混合后的量应满足最初和重复三次分析的量。使用前新鲜配制。

## D.1.2.2 6-磷酸葡萄糖脱氢酶稀释液

移取 1 mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液至 100 mL 容量瓶内, 用 Tris-白蛋白稀释, 补足至刻度线。2 °C ~ 8 °C 稳定性 1 d。

## D.2 测定条件

## D.2.1 最终反应混合液的浓度

见表 D.1。

表 D.1 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定最终反应混合液的浓度

参 数	指 标
白蛋白[Tris-白蛋白]	0.001 mmol · L <sup>-1</sup>
pH(25 °C)	7.5 ± 0.05 <sup>a</sup>
ATP	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
NAD	0.2 mmol · L <sup>-1</sup>
己糖激酶(25 °C)	133 U · L <sup>-1</sup> (13 μkat · L <sup>-1</sup> )
葡萄糖	6.67 mmol · L <sup>-1</sup>
样品与反应混合物体积比	0.167 (1 : 6)
<sup>a</sup> 扩展不确定度 ( $k=2$ )。	

## D.2.2 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定条件

见表 D.2。



表 D.2 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定条件

参 数	指 标
温度	25.0 °C ± 0.2 °C <sup>a</sup>
波长	339 nm ± 1 nm <sup>a</sup>
带宽	≤ 2 nm
光径	10.00 mm ± 0.01 mm <sup>a</sup>
孵育时间	10 min
测定时间	孵育后连续测定 5 min
<sup>a</sup> 扩展不确定度(k=2)。	

## D.3 测定

## D.3.1 试剂准备

将 6-磷酸葡萄糖脱氢酶实验试剂、5 mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶稀释液和含有 5 mL Tris-白蛋白的密闭的试管放在 25 °C ± 0.2 °C 的水浴箱中大约 10 min,使液体达到预定温度。

## D.3.2 测定方法

按表 D.3 的顺序和量,将试剂和样品加入比色杯。

表 D.3 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液催化活性测定步骤

试剂/样品	反应管	空白管
6-磷酸葡萄糖脱氢酶实验试剂	5.0 mL	5.0 mL
6-磷酸葡萄糖脱氢酶稀释液	1.0 mL	0
Tris-白蛋白	0	1.0 mL
轻轻颠倒混匀,倒入比色杯内,立即连续测定 5 min 摩尔消光系数。		

## D.4 结果计算

按公式(D.1)计算 25 °C G6PDH 原液的浓度:

$$G6PDH \text{ 原液活性量}(U/L) = [(dA/dt) / (E \times b)] \times (V_r / V_s) \quad \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

dA —— 摩尔消光系数变化值(本次分析用 3 min 和 2 min 读数的变化);

dt —— 测定时间变化,单位为分(min);

E —— 摩尔消光系数(本次分析条件下,值为  $6.53 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );

b —— 光径,单位为厘米(cm);

$V_r$  —— 总反应体积,单位为毫升(mL)(上面给出的程序,体积为 6 mL:5 mL HK 试验试剂 + 1 mL 稀释 HK);

$V_s$  —— 总反应量中的酶原液量,单位为毫升(mL)[上面给出的程序:1 mL 被稀释 HK 加到反应

混合液中(包含 0.01 mL 酶原液),因此  $V_s$  是 0.01 mL。]

注:在 5 min 内任意 1 min 的摩尔消光系数分析偏差变化应  $<0.005 \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}$ ,若摩尔消光系数变化  $>0.005 \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}$ ,应考虑分析偏差以外的原因。

#### D.4.1 6-磷酸葡萄糖脱氢酶原液活性测定示例

示例:如 6-磷酸葡萄糖脱氢酶厂家提供的活性浓度为  $1395 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按 D.3 测定方法进行测定,3 min 时摩尔消光系数是 0.203,2 min 时摩尔消光系数是 0.166,计算 G6PDH 原液活性量。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH 稀释液活性} &= \{A_{\text{test}}(3 \text{ min}) - A_{\text{test}}(2 \text{ min})\} \times (0.963 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}) \times (1/V_s) \\ &= (0.203 - 0.166) \cdot \text{min}^{-1} \times 0.963 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \times 1/0.01 \\ &= 3.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{在 } 25 \text{ }^\circ\text{C}) \end{aligned}$$

$$\text{G6PDH 原液活性} = 3.56 \times 250 = 890.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$$

该 6-磷酸葡萄糖脱氢酶纯度为  $890 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,与厂家提供的活性浓度不符,配制时应按照实测活性配制。