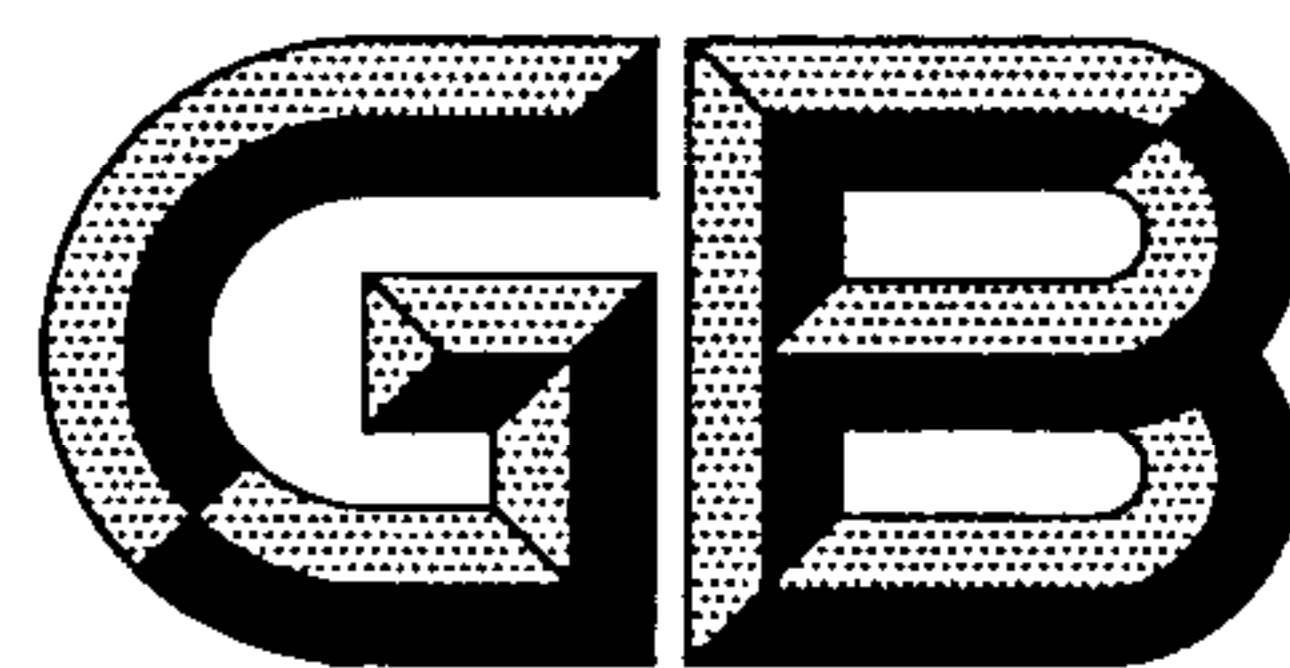




中华人民共和国国家标准

GB/T 21870—2008/ISO 12243:2003

天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定 改进 Lowry 法

Medical gloves made from natural rubber latex—
Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method

(ISO 12243:2003, IDT)

2008-05-14 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准等同采用 ISO 12243:2003《天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定 改进 Lowry 法》(英文版)。

本标准等同翻译 ISO 12243:2003。

为便于使用,本标准做了下列编辑性修改:

- a) “本国际标准”一词改为“本标准”;
- b) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”。

附录 A、附录 B 为规范性附录,附录 C、附录 D 为资料性附录。

本标准由中国石油和化学工业协会提出。

本标准由全国橡胶与橡胶制品标准化技术委员会胶乳制品分技术委员会(SAC/TC 35/SC 4)归口。

本标准主要起草单位:江阴嘉乐威胶乳制品有限公司、湛江出入境检验检疫局、湛江嘉力手套制品有限公司、江阴出入境检验检疫局、北京市医疗器械检验所、中橡集团株洲橡胶塑料工业研究设计院。

本标准主要起草人:徐永平、云俊、周松茂、高乃东、岳卫华、康敏静、郭平、李枚辉。

本标准为首次发布。

ISO 前言

国际标准化组织(ISO)是各国国家标准团体(ISO 成员团体)的世界性联合机构。制定国际标准的工作通常由 ISO 技术委员会进行,凡对已建立了技术委员会项目感兴趣的成员团体均有权参加该委员会,与 ISO 有联系的政府或非政府的国际组织也可参加此项工作。在电工技术标准化的所有工作中,ISO 与国际电工委员会(IEC)紧密合作。本国际标准是根据 ISO/IEC 导则第 2 部分起草的。

技术委员会的主要任务是制定国际标准。技术委员会采纳的国际标准草案应下发到各成员团体投票,作为国际标准发布时,要求至少有 75% 的成员团体投赞成票。

应对本文件中的某些部分是专利权主题的可能性引起注意,ISO 没有识别任何或所有专利权的责任。

国际标准 ISO 12243 由橡胶与橡胶制品技术委员会橡胶工业用原材料(包括胶乳)分技术委员会(ISO/TC 45/SC 3)制定。

天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定

改进 Lowry 法

警告——本标准使用者应熟悉一般实验室操作。本标准不涉及任何安全性问题,即使是与它有关的也不例外,使用者应建立相应的安全与健康规范,并使之符合国家的规定。

1 范围

本标准规定了天然胶乳医用手套水抽提蛋白质含量的测定,也适用于其他天然胶乳制品中水抽提蛋白质含量的测定,但抽提过程和次数没有得到证实,会随试验样品类型不同而变化。附录 C 介绍了医用手套中几种特种蛋白质的其他测定方法,但不具有通用性。

本标准仅涉及分析方法,与取样无关,也不涉及测定结果的安全性或标志要求。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 7543—2006 一次性使用灭菌橡胶外科手套 (ISO 10282:2002, IDT)

GB 10213—2006 一次性使用医用橡胶检查手套 (ISO 11193-1:2002, IDT)

3 原理

用缓冲溶液抽提水溶性蛋白质,然后通过沉淀、浓缩,将其从有可能干扰测定的其他水溶性物质中分离出来(见附录 A 和附录 D);再溶解沉淀的蛋白质,以标准蛋白质做参照,用改进 Lowry 方法进行比色,定量测定蛋白质含量(该方法的概述见参考文献[1])。

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

4.1

浓缩因子 F concentration factor

沉淀蛋白质所用抽提液体积与再溶解蛋白质沉淀所用氢氧化钠溶液的体积比。

注:用 4 mL 蛋白质抽提液进行沉淀,然后用 0.8 mL 氢氧化钠溶液再溶解沉淀,则浓缩因子 F 为: $4/0.8=5$ 。

4.2

蛋白质 protein

存在于天然胶乳制品中并可用水进行抽提的蛋白质与蛋白质类似物质(如多肽)。

4.3

改进 Lowry 方法 modified Lowry method

原 Lowry 分析方法的改进,通过对蛋白质进行沉淀和分离,减少了其他可抽提物在测定中可能产生的干扰。

5 设备

除另有说明外,所有的实验室用器皿(如烧瓶、试管等)均为聚丙烯或聚乙烯制造。

注:聚丙烯或聚乙烯器皿比玻璃器皿对蛋白质的吸附量小,蛋白质吸附量的测定方法见附录 B。

5.1 无蛋白质手套

由合成胶乳或塑料制造、无粉且不含其他可转移到试样或抽提液中的物质的手套。

5.2 离心机

性能至少达到 $60\,000\text{ m/s}^2$ ($6\,000\text{ g}$)。

注：当离心时间延长时，温度可能会上升，最好用冷冻离心机。

5.3 离心管

容量为 200 mL、50 mL、10 mL、2 mL、1.5 mL 蛋白质吸附量少的聚丙烯或聚乙烯（如果适用）离心管。

5.4 锥形瓶

容量为 250 mL。

5.5 微量移液器。

5.6 试管振动器

振动频率为 3 Hz~6 Hz。

5.7 漩涡混合器或超声波仪。

5.8 一次性使用滤膜

蛋白质吸附量少且孔径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 或更小的滤膜。

5.9 夹持器

在抽提过程中用来夹持手套并保持不漏水的设备，夹持器可为一对与泡沫橡胶连接的能用螺钉拧在一起的铝条，或者为血液透析用 170 mm 长的塑料夹具。

5.10 分光光度设备

5.10.1 分光光度计

带有一次性使用的聚苯乙烯透明比色皿（可用石英材质但要求十分干净）。

5.10.2 酶标仪

96 孔容量为 0.25 mL~0.5 mL 的聚苯乙烯平底酶标仪。

注：最好使用容量 0.5 mL 的孔板，也可用较小容量的孔板，但会降低分析灵敏度。

5.11 天平

精确到 0.000 1 g。

6 试剂

试验过程中，使用试剂均为分析纯和蒸馏水或去离子水。

6.1 染色剂：溴苯酚蓝（钠盐），将 0.1 g 溴苯酚蓝溶于 1 L 水中，有效期为 4 周。

6.2 抽提液：在整个抽提过程中 pH 值能保持在 7.4 ± 0.4 范围内的一种缓冲溶液。

注 1：适用的缓冲溶液包括 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液（PBS）和 0.1 mol/L 的 *N*-(羟甲基)-甲基-2-氨基乙磺酸钠缓冲溶液（TES）。磷酸盐缓冲溶液的制备是根据产品说明将磷酸盐溶解于蒸馏水中，如果缓冲溶液的 pH 值达不到 7.4 ± 0.4 ，有必要使用浓度高一点的磷酸盐溶液。TES 缓冲溶液的制备是将 24 g TES 溶于 500 mL 的水中，然后用水稀释至 1 L。

注 2：PBS 和 TES 容易从市场获得。

6.3 改进的 Lowry 蛋白质分析试剂

6.3.1 试剂 A：碱性柠檬酸铜溶液，将 10 份试剂 C 和 0.2 份试剂 D 混匀，在检验的当天配制。

也可使用碱性酒石酸铜，同样应在检验的当天配制。成套试剂中则会含有可能影响检测的未加说明的保护剂。

6.3.2 试剂 B：用 28 mL 水加入 72 mL 2 mol/L 的福林试剂后得到的稀溶液。

注：2 mol/L 的福林试剂可从市场上购买，例如：可从美国西格玛化学公司（Box 14508, St Louis, MO 63178）获得（目录号 F 9252），有些工业用高浓度的福林试剂可能达不到 2 mol/L。

6.3.3 试剂 C: 6 g 碳酸钠溶解在 100 mL 水中的溶液。

6.3.4 试剂 D: 1.5 g 硫酸铜和 3 g 柠檬酸钠溶解在 100 mL 水中的溶液。

6.3.5 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 0.2 \text{ mol/L}$ 。

6.3.6 脱氧胆酸钠溶液(DOC): 用水溶解 0.15 g 脱氧胆酸钠稀释至 100 mL 后的溶液。冷藏贮存, 有效期为 4 周。

6.3.7 三氯乙酸(TCA)溶液: 用水溶解 72 g 三氯乙酸稀释至 100 mL 并混合均匀的溶液。冷藏贮存, 可稳定贮存较长时间。

6.3.8 磷钨酸(PTA)溶液: 用水溶解 72 g 磷钨酸至 100 mL 后的溶液。混合均匀, 贮存在冷藏室中, 有效期为 4 周。为了方便, 可将 TCA 和 PTA 溶液按 7.4.2 步骤同时等体积比进行预混合, 这种混合溶液缺少贮存期数据, 只能在检验的当天混合。

6.4 卵清蛋白贮备液: 卵清蛋白是用硫酸铵分馏并在 $\text{pH}=4.5$ 时重复结晶所得。例如: 可从美国西格玛化学公司 (Box 14508, St Louis, MO 63178) 获得 (目录号 A 5503)。

将 100 mg 卵清蛋白溶解于 100 mL 的抽提液(6.2)中制备成浓度为 1 mg/mL 的贮备液, 将溶液用 $0.45 \mu\text{m}$ (或更小的孔径) 低蛋白质吸附量的滤膜 (5.8) 过滤, 用紫外分光光度计, 以光程为 1 cm 的比色皿在 280 nm 波长处测定蛋白质的吸光度, 以抽提液 (见 6.2) 作为空白样, 然后将吸光度除以 $0.64^{1)}$ 得到卵清蛋白贮备液的精确浓度。在不高于 7°C 条件下, 溶液可稳定贮存 48 h, 或在 -10°C 条件下可冷冻贮存 2 个月; 融化时要求加热到 45°C 并保温 15 min。

注: 冷藏时间为累计时间。为避免反复冷冻和融化, 建议将蛋白质贮备液分几份贮存, 每份足够制备一条校准曲线, 或在验证试验步骤中足够使用 (见附录 A)。

7 抽提步骤

7.1 原理

试验步骤包括整只手套的抽提、抽提液的提纯和浓缩。使用按同样方法浓缩的蛋白贮备液 (见 6.4 和 7.3) 的稀释液绘制标准曲线, 对照标准曲线, 测定抽提液中的蛋白质浓度。分析人员的操作技能必须按附录 A 进行证实。

在给定批中抽取 3 只或 3 双手套按 3 份进行平行测定, 每份抽提液独立进行提纯、浓缩及最后的测定。

7.2 抽提

7.2.1 概述

在 $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ 条件下, 将手套表面完全展开在抽提液中抽提 $(120 \pm 5) \text{ min}$ 。可以按“剪碎手套”和“手套套手套”两种抽提方法进行抽提。在检测报告中须注明所用的抽提方法, 同类样品均应用同一方法进行抽提。抽提时应进行 3 个平行试验, 对每份抽提液应单独进行测定。

抽提过程中穿戴无蛋白质手套 (见 5.1) 来处理试验手套样品。

注: 抽样和手套的左右之分不在本标准范围之内。

7.2.2 方法 A——剪碎手套抽提方法

7.2.2.1 称量手套质量(m)至少精确到 0.001 g。

7.2.2.2 沿边缘将手套剪切, 为了便于抽提, 允许将手套剪成更小的片 (须注意 7.2.2.3)。

7.2.2.3 如果结果以手套每单位面积微克数来表示 (如: $\mu\text{g}/\text{dm}^2$) 时, 手套表面积按以下步骤测量: 在手套背面剪取 $0.5 \text{ dm} \times 0.5 \text{ dm}$ 的正方形小片, 准确测量尺寸, 计算其面积 A_1 。称量正方形小片的质量 (m_p) 精确到 0.001 g。测试样品手套两面的总面积 A 由下式计算: $A = 2A_1 \times m/m_p$ 。

1) 卵清蛋白的消光系数精确值是经过证实了的。

7.2.2.4 将手套碎片放入一个合适的锥形瓶(见 5.4)中。

7.2.2.5 准确加入适量体积为 V 的抽提液(见 6.2),每克手套抽提液的用量在 10 mL~15 mL 之间,使之能完全浸泡手套碎片。

7.2.2.6 在 $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ 条件下,将手套样品抽提 $(120 \pm 5)\text{min}$ 。开始时搅动试片 15 s,然后不超过 30 min 搅动一次,最好连续缓慢搅动。

7.2.2.7 将抽提液移入离心管中,在不低于 $20\,000\text{ m/s}^2$ ($2\,000\text{ g}$)的条件下离心 15 min,将固体物离心分离。分离出的抽提液最好立即试验,但也可以在不高于 7°C 条件下贮存 48 h,或者在低于 -10°C 条件下冷冻贮存 15 d。

7.2.3 方法 B——手套套手套抽提方法

7.2.3.1 取两只手套并准确称量每只手套的质量(m_1 和 m_2),至少精确到 0.001 g,在每只手套从中指顶端沿袖口边方向 20 cm 处作个标记,取一只手套并将其插入另一只手套里面使它们贴合在一起(为了方便可使用一根杆将大拇指套插入另一个手套的大拇指套里面,其他指套也可用类似方法;然而,这个步骤并不是关键,只要能使两只手套的展开尽可能简化)。使用同一规格另外两双手套重复上述操作。

7.2.3.2 往里层手套中加入足量的染色剂(6.1)充满每个手指为止,在里层手套与外层手套之间加入 25 mL 的抽提液(6.2),轻缓赶走抽提液里面的气泡,并在 20 cm 标记处用夹持器(5.9)封住手套。

7.2.3.3 将手套固定在一个振荡器上,在 $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ 条件下振动 $(120 \pm 5)\text{min}$,如外面手套的表面出现小液滴,表明外层手套有孔洞,应丢弃该样品并取另一双手套重新抽提。

7.2.3.4 抽提结束后,移走夹持器并小心地将手套分开,注意不能让里层手套中的染色剂污染抽提液。

7.2.3.5 将外层手套中的抽提液移入离心管(5.3)中,如抽提液被染成蓝色,说明里面手套有针孔或交叉污染。在这种情况下,倒掉溶液用另一双手套重新抽提。将抽提液在不低于 $20\,000\text{ m/s}^2$ ($2\,000\text{ g}$)的条件下离心 15 min,抽提液可在不高于 7°C 条件下贮存,并在 48 h 内进行测定;也可以在一 10°C 或以下冷冻贮存 15 d。

7.2.3.6 在 20 cm 处剪掉两个手套袖口边,吸掉袖口边多余的液体并室温干燥,测量袖口边质量(m_c)至少精确到 0.001 g。由下式计算手套被抽提部分的平均质量(m_s):

$$m_s = (m_1 + m_2 - m_c)/2$$

式中:

m_1 和 m_2 ——手套初始质量;

m_c ——未被抽提的两只手套袖口边总质量。

7.3 蛋白质标准溶液的制备

蛋白质标准溶液的制备是用抽提液(6.2)将蛋白质贮备液(6.4)稀释,制备下列蛋白质标准溶液: $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$,同时用抽提液(6.2)作空白。溶液可稳定冷藏 2 d(见注)。

注:将适当浓度的溶液进行双倍逐级稀释可得到更低浓度的溶液,这些标准溶液应有较宽的浓度范围,具体浓度值可通过已知浓度的贮备液(见 6.4)得到。这些溶液还要求符合附录 A 中的验证步骤。

7.4 蛋白质的沉淀与浓缩

7.4.1 总则

在 $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ 条件下逐一进行测试。

7.4.2 分别准确移取 4 mL 抽提液(6.2)(作为一个空白样)、蛋白质标准溶液(见 7.3)和 3 个手套抽提液置于 10 mL 的离心管(5.3)中,各加入 0.4 mL 的 DOC(6.3.6),混匀并静置 10 min,然后各加入 0.4 mL 的 TCA(6.3.7)并混匀,再各加入 0.4 mL 的 PTA(6.3.8),混匀并再静置 30 min(见注)。

注:溶液量须满足比色分析的需要,如使用酶标仪测定,则可以适当地减少用量。如样本量大,则特别注意清楚标识每个离心管。

7.4.3 将离心管在不低于 $60\,000\text{ m/s}^2$ ($6\,000\text{ g}$) 的条件下离心 30 min, 确保蛋白质充分沉淀, 如有必要可延长离心时间。倾去上层清液, 将每个离心管倒置在滤纸上, 让水流干。在每个离心管中各加入 0.8 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液(6.3.5) (包括空白样), 用来再溶解蛋白质沉淀, 必要时使用漩涡混合器或超声波仪(5.7), 使蛋白质沉淀溶解完全。

确保蛋白质完全再溶解至澄清溶液, 假如还有蛋白质沉淀, 可继续加入定量的不超过 3.2 mL 的 NaOH 溶液 (即总量为 4.0 mL), 在每一个溶液中加入 NaOH 溶液的量应相同。加入推荐量 0.8 mL 的 NaOH 溶液时, 浓缩因子 F 为 5, 如果每个样加入 NaOH 溶液的量不相同, 那么 F 也不相同:

$$F = \frac{\text{沉淀前抽提液体积}}{\text{溶解蛋白质所用 NaOH 溶液体积}}$$

溶解后的蛋白质溶液最好是当天测定, 如测定不能立即进行, 则溶液可在不超过 7°C 的条件下贮存且不超过 24 h。如果加入 4.0 mL 的 NaOH 溶液后沉淀还没完全溶解时, 可在 $60\,000\text{ m/s}^2$ ($6\,000\text{ g}$) 的条件下离心 15 min 直至出现澄清蛋白质溶液为止。

7.5 比色检验

7.5.1 按使用说明打开分光光度计并调零。

7.5.2 分别在 0.8 mL 再溶解蛋白质溶液及空白样(7.4.2)中加入 0.3 mL 的试剂 A(6.3.1)并混匀; 加入 0.1 mL 的试剂 B(6.3.2), 混匀, 在测定吸光度前至少静置 15 min 但不得超过 1 h。

注: 只需 0.8 mL 再溶解蛋白质溶液用于显色反应, 不考虑再溶解蛋白质溶液的总体积。

如因某些干扰物质的存在导致静置过程中产生沉淀, 则应在比色检验前离心至澄清溶液。

7.5.3 分光光度计测定

加入试剂 B 后 1 h 内, 移取 7.5.2 准备好的溶液到比色皿中, 在 750 nm 波长处(最好)或在规定波长 600 nm~750 nm 范围内对照空白样测定其吸光度。为统一结果, 时间范围、仪器和选择波长必须保持一致, 测定蛋白质含量时单位为 $\mu\text{g/g}$ (见 8.3)。

7.5.4 酶标仪测定

加入试剂 B 后 1 h 内, 移取 0.49 mL 7.5.2 制备的溶液到平底酶标板中(见 5.10.2), 在规定波长 600 nm~750 nm 范围内对照空白样测定其吸光度, 测定蛋白质含量时单位为 $\mu\text{g/g}$ (见 8.3)。

8 结果计算

8.1 校准曲线

以蛋白质校准溶液(见 7.3)的浓度对应经过沉淀和再溶解(见 7.5.3 或 7.5.4)后吸光度绘制一条校准曲线。

注: 在浓缩过程中会损耗一些蛋白质。本方法假设在浓缩过程中试样与标准溶液的蛋白质损耗率是一致。

8.2 浓度计算

3 个抽提样中的每个样品浓度 c 值根据其吸光度直接在校准曲线上读取, 单位为 $\mu\text{g/mL}$, 结果取中值。

注: 在校准曲线不是线性的情况下, 其值可通过多项式回归法来计算, 采用商用计算机软件描绘曲线并计算未知浓度更实用些。

8.3 可抽提蛋白质含量的计算

8.3.1 方法 A——剪切手套抽提方法

用下式计算可抽提蛋白质的含量 E , 单位为 $\mu\text{g/g}$ 。

$$E = \frac{5Vc}{Fm}$$

式中:

V ——抽提液体积,单位为毫升(mL);

c ——再溶解蛋白质溶液中蛋白质的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

F ——浓缩因子;

m ——整只被抽提手套的质量,单位为克(g)。

注:除非使用 NaOH 溶液的量不是所推荐的量(见 7.4.3),否则式中 $5/F$ 为 1。

每只手套中可抽提蛋白质的量可用下式计算,单位为 μg 。

$$\text{每只手套中可抽提蛋白质的量} = E \times m$$

8.3.2 方法 B——手套套手套抽提方法

用下式计算每克手套中可抽提蛋白质的含量 E ,单位为 $\mu\text{g/g}$ 。

$$E = \frac{5 Vc}{F m_s}$$

式中:

V ——抽提液体积,单位为毫升(mL);

c ——再溶解蛋白质溶液中蛋白质浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

F ——浓缩因子;

m_s ——被抽提手套样品质量(见 7.2.3.6),单位为克(g)。

注:除非使用 NaOH 溶液的量不是所推荐的量(见 7.4.3),否则式中 $5/F$ 为 1。

每只手套中可抽提蛋白质含量可用下式计算,单位为 μg 。

$$\text{每只手套中可抽提蛋白质的量} = E \times m$$

式中:

m ——整个手套的质量 $[=(m_1 + m_2)/2]$,单位为克(g);

m_1 和 m_2 ——一双手套相应的初始质量。

8.3.3 单位表面积质量换算

当结果需要用表面积来表示,例如: $\mu\text{g/单位面积}$ 。可用下式进行换算,单位为 $\mu\text{g/dm}^2$:

$$\text{可抽提蛋白质的含量}(\mu\text{g/dm}^2) = \frac{5 Vc}{FA}$$

式中:

A ——被抽提手套总表面积(见 7.2.2.3),单位为平方分米(dm^2)。

9 精密度

9.1 背景

2002 年按 ISO 9272 (当时在制定中)中所描述的精密度测定程序和指南进行了一次实验室间比对试验(ITP)来评估本方法的精密度。其他细节和术语可以查阅当时的 ISO/TR 9272。

剪切手套和手套套手套两种抽提方法均通过以下试验进行了评估。为提高测量水平,采用 4 种原材料在 7 个实验室进行 ITP 试验,评估了 1 型精密度。每两组平行试验中,每组做 3 个重复试验取平均值作为试验结果,精密度是依据测试结果来给定的,即:两组试验结果中某组的平均值。

除有本精密度评估结果确实适用于产品或原材料测试的文件规定外,ITP 试验的精密度结果不应作为任何原材料或产品接收或拒绝检验的依据。

9.2 精密度结果

4 个样本的 2 个抽提过程的每一个精密度结果见表 1。这些结果是依据 ISO 9272 中的离群校正和离散删除方法来获得的。下面列举了精密度结果用法的概述, r 和 R 为绝对精密度, (r) 和 (R) 为相对精密度,见下面的附加说明。

表 1 精密度数据

剪切手套抽提方法(方法 A)								
原材料	平均值/(μg/g)	实验室内			实验室间			实验室数量
		s_r	r	(r)	s_R	R	(R)	
1	14.3	3.48	9.7	68.3	7.57	21.2	148.5	5
2	68.3	6.46	18.1	26.5	12.6	35.2	51.5	5
3	162.2	6.79	19.0	11.7	25.1	70.3	43.3	5
4	200.6	13.6	39.7	18.9	28.2	78.9	39.3	5
手套套手套抽提方法(方法 B)								
原材料	平均值/(μg/g)	实验室内			实验室间			实验室数量
		s_r	r	(r)	s_R	R	(R)	
1	13.8	1.66	4.64	33.6	4.70	13.2	95.2	6
2	53.1	4.97	13.93	26.3	16.3	45.6	86.0	6
3	140.0	5.25	14.70	10.5	21.7	60.9	43.5	6
4	164.2	11.21	31.40	19.1	32.6	91.4	55.6	6
注： s_r——实验室内标准偏倚(以测量单位计)； r——重复性，即：实验室内精密度(以测量单位计)； (r)——重复率(对平均值的百分比)； s_R——实验室间标准偏倚(各实验室间的差异，以测量单位计)； R——再现性，即：实验室间精密度(以测量单位计)； (R)——再现率(对平均值的百分比)； 实验室的数量是去除离散数据的实验室后的数量。								

重复性和再现性表述如下。

重复性：每一种测试方法的重复性或实验室内精密度根据表 1 中的值已经建立，每一种测试水平(原材料)的重复性或实验室内精密度值也列于表中。两个独立试验结果平均值的差(正确运用本标准获得的值)如大于表中对应的 r 和(r)值， r 用测量单位计，(r)用百分数计，则应认为结果不可靠，即：由不同样本数所致；建议进行相应的分析。

再现性：每一种测试方法的再现性或实验室间精密度根据表 1 中的值已经建立，每一种测试水平(原材料)的再现性或实验室间精密度值也列于表中。不同实验室间的两个独立试验结果平均值的差(以本标准的专用方法获得)如大于表中对应的 R 和(R)值， R 用测量单位计，(R)用百分数计，则应认为结果不可靠，即：由不同样本数所致；建议进行相应的分析。

9.3 附加说明

对剪切手套抽提方法而言，分析表明有两个实验室有明显的离群性，虽然根据 ISO 9272 步骤进行离群校正，但重复性和再现性仍相当差，表 1 中剪切手套抽提方法的结果是删除了两个离群实验室后的数据，也就是 5 个参与实验室的数据。就手套套手套抽提方法而言，同样也有一个实验室数据离群，得到的精密度差。表 1 中手套套手套抽提方法的结果是去除一个离群实验室的数据，也就是 6 个参与实验室的数据。

9.4 偏倚

偏倚是指测试结果的平均值与待测物的基准值或真实值之差，由于这些方法不存在基准值，因此，偏倚是不能估算的。

10 试验报告

试验报告至少包含下列内容：

- a) 采用的标准；
- b) 充分区分测试样品的详细信息；
- c) 试验结果和试验日期；
- d) 所用标准蛋白质的来源和类别；
- e) 所用缓冲溶液的种类；
- f) 抽提方法(方法 A 或方法 B)；
- g) 如不是手套制造商的实验室,则注明实验室名称和地址；
- h) 注明测定中观察到的任何异常现象。

附录 A

(规范性附录)

验证

A.1 概述

在手套生产中往天然胶乳中加入的表面活性剂、促进剂和抗氧剂等化合物,在测试过程中会对比色检验产生干扰,有些可能会减弱显色,而另一些可能会增强显色。

沉淀和再溶解浓缩蛋白质的过程,目的是去除干扰以提纯蛋白质。在这个过程中损耗一定数量蛋白质是不可避免的;为满足检验目的,假定标准溶液的蛋白质损耗率与样品抽提液中的蛋白质损耗率相同。

为了保证操作过程中蛋白质损耗最小,要求按以下步骤通过在沉淀与再溶解蛋白质标准溶液过程中,对实际回收量进行测试,验证初次实验室和(或)新实验员的技术能力。

A.2 原理

通过对蛋白质标准溶液一式两份浓缩,每份溶液分两份进行比色测试,以此来评价操作者工作的一致程度。

A.3 步骤

A.3.1 未沉淀蛋白质标准溶液的制备

用 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液(6.3.5)将卵清蛋白贮备液(6.4)稀释制备成 80 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白质标准溶液。

A.3.2 沉淀用蛋白质标准溶液的制备

同样地用抽提液(6.2)将卵清蛋白贮备液(6.4)稀释,制备成下列浓度的蛋白质标准溶液:40 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

A.3.3 蛋白质沉淀与浓缩

平行样按 7.4 步骤,将稀释后蛋白质标准溶液(A.3.2)沉淀处理,然后用 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液(6.3.5)再溶解蛋白质沉淀,使每份溶液的浓缩因子 F 都为 5。

A.3.4 比色检验与测定

按 7.5 步骤,测定非沉淀蛋白质系列溶液的平行样(A.3.1)和沉淀再溶解后的蛋白质系列溶液(A.3.3)的平行样。

A.3.5 计算

以未沉淀蛋白质标准溶液的平均吸光度相对应的浓度(见 A.3.1)绘制一条校准曲线,利用校准曲线测定沉淀浓缩后蛋白质溶液的浓度(见 A.3.3),浓度 c 取 4 个测试值的平均值(每份标准蛋白质溶液分两份沉淀,比色检测前又分两份,共 4 个检测值)。

A.3.6 回收百分率

回收百分率是蛋白质标准溶液(见 A.3.2)沉淀前的浓度 c/F ,对应其起始浓度所得到的百分数。

例如:起始浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白质溶液,经沉淀与再溶解至 5 倍浓度($F=5$)后,浓度 c 为 200 $\mu\text{g/mL}$,那么 $c/F=40$ $\mu\text{g/mL}$ 并不等于 50 $\mu\text{g/mL}$,这反映了在过程中有损耗。用真实值的百分数即 $(40/50) \times 100 = 80\%$ 来表示,得出回收百分率。

A.3.7 要求

浓度低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时其回收百分率应不低于 80%。如果达不到要求需重新试验,试验过程中应特别注意操作技能。在测试手套样品前应验证操作员的操作技能。

附录 B
(规范性附录)

聚丙烯和聚乙烯管对蛋白质的吸附量

B.1 概述

由于聚丙烯和聚乙烯管对蛋白质吸附量小,所以在整个过程中使用聚丙烯和聚乙烯管,本方法适用于实际吸附量的检测。试验应在一天内完成。

B.2 步骤

B.2.1 用抽提液(6.2)稀释卵清蛋白贮备溶液(6.4),制备 50 mL 浓度为 $10\ \mu\text{g/mL}$ 的参比溶液。

B.2.2 分别移取 10 mL B.2.1 制备的卵清蛋白溶液至两个聚丙烯或聚乙烯管(5.3)中,用振动器(5.6)振动,确保整个试管表面被溶液湿润。30 min 后,将溶液转移至另两个管中并振动,重复此步骤直至每组的 10 mL 溶液分别将 5 个管全部浸润,保存剩下的试验溶液。

B.2.3 按 7.5 中给定的方法 3 次测试 B.2.1 制备的参比溶液和 B.2.2 制备的两个试验溶液的蛋白质浓度,每份溶液分 3 个平行样。

B.3 计算

用下式计算每个管吸附卵清蛋白的平均质量,单位为 mg。

$$\begin{aligned}\text{每个管吸附卵清蛋白的平均质量} &= \frac{10 \times (R - T)}{5} \\ &= 2 \times (R - T)\end{aligned}$$

式中:

R ——参比溶液中卵清蛋白含量的 3 次检测结果的平均值;

T ——浸润试管后剩余测试溶液中卵清蛋白含量的平均值(即 6 个值的平均值)。

B.4 要求

测得卵清蛋白的吸附量应低于 $10\ \mu\text{g/管}$,如超过此值,则试管不适用于测试。

附 录 C
(资料性附录)
可选用的分析方法

C.1 概述

使用改进 Lowry 方法测定水抽提蛋白质存在自身的难度,此论断得到了认可。表面活性物质和某些促进剂可能对测试有干扰,导致结果假性偏高或偏低。为减少这种干扰,本标准中规定了关于抽提蛋白质的沉淀和再溶解的详细方法,尽管结果不能完全满意,特别是对于某些促进剂^[4]更是如此。虽然技术验证这个分析过程有利于弥补这个问题,但在蛋白质沉淀和回收过程中可能还是有潜在损耗。用背景扣除法可降低干扰(见附录 D)。

还有其他分离或测定蛋白质的方法,当对本标准测得的数据有疑问时,这些方法可用于复核。下面简单描述的两种方法,虽然目前还存在一些缺陷,但将来可能会成为很好的分析方法。

C.2 酶联免疫吸附分析法 ELISA(enzyme-linked immuno-sorbent assay)

本方法是依据蛋白质与蛋白质抗体发生过敏反应来测试的。这种方法存在的问题是用时较长且过于专业化。做这个测试最理想的方式是某一特定分子量范围内的蛋白质与单一抗体(如多肽)发生反应。然而,尽管导致过敏反应的几种蛋白质能够从天然浓缩胶乳中分离出来,但并不是所有易过敏者对同种类蛋白质发生过敏反应,也就是说,有些人过敏反应可能较轻微,但有些人则可能较严重。

用相反的方法,即:使用取自混合血清的非均质抗体混合物进行测试,结果也不令人满意。原因是不同分子量的蛋白质间的比率不是恒定的,这个比率可能随着抽提情况不同而变化,也可随着橡胶树品系的不同而不同。这意味着需要结合不同的抗体与不同的抗体和不同分子量的蛋白质之间的反应结果而定。

C.3 高效液相色谱法 HPLC(high-performance liquid chromatography)

本方法是通过凝胶分离蛋白质或者通过蛋白质水解后测定氨基酸来完成,这两种方式速度缓慢且费用昂贵。这种方法可以把与各种分子量范围的蛋白质在一起的所有干扰物彼此分离出来,然而,有必要识别出每种被分离的蛋白质分子量范围,以便将各正确组份集中。如果采用水解蛋白质来检测其氨基酸方法,则分不出检测到的氨基酸由哪种蛋白质所产生的。

附 录 D
(资料性附录)
背景扣除法

D.1 概述

这是一种可以对手套抽提液中存在的干扰予以较好校正的方法。本试验依据 Lowry 等^[5]人最初观察,蛋白质和福林试剂的显色反应主要因为有铜的存在;而干扰物与福林试剂并不是因为铜才呈显色反应。本方法也可参照用于测定手套中干扰物质的含量。

D.2 原理

将从手套中抽提出来再溶解沉淀的蛋白质分成平行两份,一份按 7.5 用于比色检验,另一份在显色反应时,试剂 D(6.3.4)中不加硫酸铜,所得吸光度称为“背景”,然后在前一份含铜组分的最终测试结果中减去“背景”。

D.3 试剂

D.3.1 试剂 DA:碱性柠檬酸钠,当天制备,用 10 份试剂 C 与 0.2 份试剂 DD 混合。

D.3.2 试剂 B:见 6.3.2。

D.3.3 试剂 C:见 6.3.3。

D.3.4 试剂 DD:将 3 g 柠檬酸钠溶解在 100 mL 水中的溶液。

D.4 步骤

D.4.1 按本方法与 7.5 所述的测试方法进行平行试验。再溶解蛋白质溶液的用量应足够用于 4 个测量样(两组平行样)。根据仪器情况,可能有必要增加蛋白质抽提液的量,随着沉淀量的加大,再溶解蛋白质沉淀时 NaOH 溶液也要作相应的调整。

D.4.2 按 7.5 中的方法同时用 7.3 中制备的蛋白质标准溶液进行此步骤。

D.4.3 接着用试剂 DA(D.3.1)代替试剂 A(6.3.1),按 7.5 的步骤测量背景值。1 h 内在 600 nm~750 nm 范围内同一波长测量吸光度,结果取每组平行样的平均值。

D.5 结果表示

D.5.1 校准曲线

以 7.3 中制备的蛋白质标准溶液浓度对应它们已扣除背景的吸光度绘制校准曲线。

D.5.2 计算

用含有铜的试剂时测得的抽提蛋白质溶液的吸光度减去背景值,直接在标准曲线上读取浓度,单位为 $\mu\text{g/mL}$ 。用不含有铜的试剂(D.3.4)测得的蛋白质抽提液的吸光度(即背景)对应于标准曲线,读取浓度,可能获得一个等同于蛋白质的干扰物含量。

参 考 文 献

- [1] MARKELL. 生物化学. 1978, 87: 206.
 - [2] ISO 9272 《橡胶与橡胶制品试验方法标准精密度的确定》.
 - [3] ISO/TR 9272:1986 《橡胶与橡胶制品测试方法标准精密度的确定》.
 - [4] CHEN, S. F, et al, J. Allergy Clin. Immunol, 100(3), pp713-4(1997).
 - [5] Lowry et al, J. Biol. Chem, 1951, 199: 265.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定
改进 Lowry 法

GB/T 21870—2008/ISO 12243:2003

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字

2008年8月第一版 2008年8月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-32469

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21870—2008