

〔联邦德国〕

波林格生化试剂公司编

胡学智 陆敬懿 张惠荪 译

酶法食品分析

上海科学技术文献出版社

酶 法 食 品 分 析

[联邦德国]波林格生化试剂公司编

胡学智 陆敬懿 张惠荪 译

上海科学技术文献出版社

110725

责任编辑 叶德仁
封面设计 何永平

酶法食品分析

酶法食品分析

[联邦德国]波林格生化试剂公司编
胡学智 陆敬懿 张惠荪 译

*

上海科学技术文献出版社出版
(上海市武康路2号)

新华书店上海发行所发行
宜兴南漕印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 9.75 字数 234,000

1935年2月第1版 1935年2月第1次印刷

印数: 1—6,100

书号: 15192·340 定价: 1.50元

《科技新书目》85-236

T520

3

科学技术文献出版社

译 者 的 话

酶是生物催化剂,它具有高效和专一的催化特性,而且是在温和的条件下进行。因此,酶十分适合作为分析试剂,而且已广泛用于临床诊断,生化、环卫和食品等方面的分析。用酶作为分析试剂有许多优点:

1. 可从复杂的组分中检测某一成分而不受或少受其它共存成分之干扰;
2. 试料配制简便,分析操作微量化,从而可节约费用;
3. 可简化操作,测定快速精确,灵敏度高,如将酶固定化后还可以进行自动分析。

本书译自 Boehringer Mannheim 公司编的“酶法食品分析”,书中详细介绍了用酶法分析食品中所含的有机酸、醇类、酯类、糖类和淀粉等物质的实际操作。为了帮助读者了解本书的测定方法,我们还摘译了该公司海曼·马田海梅尔博士著的“酶法分析原理”的有关部分,并入本书的原理部分中。本书共分三部分,第一部分为原理,介绍酶分析法的原理和应用;第二部分是介绍应用组合试剂测定食品中所含有关物质的方法;第三部分是介绍用单一试剂分析食品中所含有关物质的方法。这些方法大多数是巧妙地将反应同脱氢酶偶联,或通过辅酶 I 或辅酶 II 的氧化还原反应,或通过色素的氧化还原反应,根据其在紫外或可见光区吸光率的增减而测定出被检物的浓度。

书中介绍的组合试剂中,所用试剂系现成商品,其组成成分缺乏详细说明,使用这些方法时仍需做一些试验,但这一切并不

影响本书的参考价值。

本书第一部分由胡学智译,第二部分由陆敬懿译,第三部分一至九测定法由胡学智译、十至三十一测定法由张惠荪译,全书由胡学智审校。由于译者水平所限,不足之处尚祈读者批评指正。

译 者 一九八四年一月

目 录

I. 原理	(1)
一、酶法分析的原理	(1)
二、应用说明	(22)
II. 应用组合试剂的分析	(26)
一、醋酸的测定(紫外光法)	(26)
二、L-抗坏血酸的测定(比色法)	(32)
三、胆甾醇的测定(比色法)	(40)
四、柠檬酸的测定(紫外光法)	(48)
五、乙醇的测定(紫外光法)	(52)
六、D-葡萄糖酸及 D-葡萄糖- δ -内酯的测定(紫外光法)	(58)
七、葡萄糖和果糖的测定(紫外光法)(附甘露糖的测定)	(63)
八、L-谷氨酸的测定(比色法)	(70)
九、甘油的测定(紫外光法)	(77)
十、D-异柠檬酸的测定(紫外光法)	(81)
十一、L-乳酸的测定(紫外光法)(附 D-乳酸的测定)	(85)
十二、乳糖和半乳糖的测定(紫外光法)	(91)
十三、苹果酸的测定(紫外光法)	(97)
十四、棉子糖的测定(紫外光法)	(101)
十五、淀粉的测定(紫外光法)	(105)

十六、蔗糖和葡萄糖的测定(紫外光法)	(109)
十七、卵磷脂的测定(紫外光法)	(116)
十八、乙醛的测定(紫外光法)	(123)
十九、尿素和氨的测定(紫外光法)	(127)
III. 应用单一试剂的测定	(133)
一、乙醛的测定(紫外光法)	(133)
二、醋酸的测定(紫外光法)	(137)
三、L-抗坏血酸的测定(比色法)	(143)
四、L-天冬氨酸, L-天冬酰胺的测定(紫外光法) ...	(150)
五、胆甾醇的测定(比色法)	(154)
六、柠檬酸的测定(紫外光法)	(160)
七、肌酸和肌酸酐的测定(紫外光法)	(165)
八、乙醇的测定(紫外光法)	(170)
九、蚁酸的测定(紫外光法)	(176)
十、葡萄糖和果糖的测定(紫外光法)	(189)
十一、D-葡萄糖酸和 D-葡萄糖- δ -内酯的测定 (紫外 光法)	(186)
十二、L-谷氨酸的测定(紫外光法)	(191)
十三、丙三醇(甘油)的测定(紫外光法)	(198)
十四、5'-鸟苷酸(鸟苷-5'-一磷酸)的测定(紫外光法)	(203)
十五、D-异柠檬酸的测定(紫外光法)	(208)
十六、L-乳酸、D-乳酸的测定(紫外光法)	(213)
十七、乳糖和半乳糖的测定(紫外光法)	(219)
十八、卵磷脂的测定(紫外光法)	(225)
十九、L-苹果酸的测定(紫外光法)	(232)
二十、麦芽糖和葡萄糖的测定(紫外光法)	(236)

二十一、焦磷酸和磷酸的测定(比色法)	(241)
二十二、丙酮酸的测定(紫外光法)	(247)
二十三、棉子糖的测定(紫外光法)	(251)
二十四、D-山梨糖醇的测定(紫外光法)	(255)
二十五、D-山梨糖醇的测定(紫外光测定、己糖激酶 法)	(259)
二十六、D-山梨糖醇和木糖醇的测定(比色法)	(266)
二十七、淀粉的测定(紫外光法)	(273)
二十八、琥珀酸的测定(紫外光法)	(279)
二十九、蔗糖和葡萄糖的测定(紫外光法)	(284)
三十、甘油三酯的测定(紫外光法)	(292)
三十一、尿素和氨的测定(紫外光法)	(299)

I. 原理

一、酶法分析的原理

Hermann Mattenheime

酶的定义和性质

酶是具有专一性催化功能的蛋白质, 酶作为催化剂, 具有以下性质:

1. 高效, 少量存在即显效果。

2. 反应中不变化。

3. 即使其存在量较底物少, 并不影响可逆反应的平衡, 但却增加达到平衡的反应速度。

酶具有蛋白质的一切性质。一个特别重要的属性是酶蛋白的结构很不稳定, 结构上的改变或变性都会引起酶活性的损失。已知影响酶稳定性的因素是温度、氢离子浓度 (pH) 和盐浓度。蛋白质是一种多价电解质, 并含有可电离的基团, 其电离状态取决于 pH, 并对酶的活性有影响。

作为电解质, 蛋白质可在电场中迁移, 带正电荷的分子移向阴极, 而带负电荷的分子则移向阳极。净电荷愈大, 分子的移动速度愈快。因此用电泳法可将具有不同净电荷的几种蛋白质分开, 此法已用于同功酶之分离。

酶作为一种试剂

现在有相当大量的结晶或相当高度纯化的酶，已有商品供应，并已成为一种不可缺少的试剂，这些酶在偶联酶试验中用作辅助酶和指示剂酶，以及在代谢物定量的测定中作为专一性的指示剂。

包括各种酶在内的组合试剂，是用于酶活性的测定和代谢物测定。

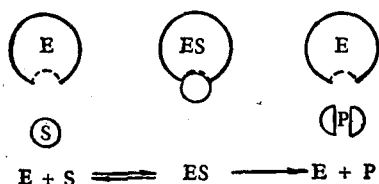
酶法测定的原则

1) 酶活性：酶活性是在正确规定和严格控制条件下，以测定单位时间内转化的底物量来确定的。底物的浓度必须过量，以确保在反应时间内所消耗的底物只是一小部份。

2) 代谢物浓度：当测定某一代谢物(或食物组成份)浓度时所用的酶必须是结晶状或高度纯化的，所选择的反应条件必须保证反应能够完成，即待测物(底物)能够完全转化。

酶-底物复合物

很久以前人们已经公认，在酶促反应中，酶同底物在形成一种复合物后才能进行反应。其机制如图1所示，图中E是



酶, S 为底物, ES 为酶同底物之复合物, P 是酶反应的产物。底物是通过酶分子中的所谓酶的“活性中心”的某些基团而同酶连结一起的。

酶反应的全部反应速度是由二个因素,即 a) 酶同底物结合所需的时间; b) 酶生成产物所需的时间所决定的。不难看出,底物浓度愈高,酶同底物形成复合物的时间愈短。关于这一点以后将会详细讨论。

图1 酶-底物复合物的形成

酶活性的单位

过去,对各种酶任意设下了各种各样的表示酶活性的单位,往往一种酶或相同的酶,有着几种不同的单位,以致几乎无从对酶的活性进行比较。[1961年国际生化联合会酶学委员会建议,对各种酶都采用一种标准的单位(国际单位)来表示。其定义如下:

一单位(U)酶是指在规定条件下,每分钟内催化1毫克分子底物发生转化所需的酶量。所谓规定的条件是指反应时的温度、pH、缓冲液系统、底物浓度与辅酶。在1961年委员会报告中所建议采用的温度是 25°C ,但1964年第二次报告中改为 30°C ,这种改动是考虑到热带地区无法用自来水进行冷却,难将温度控制在 25°C 的缘故。可惜提出这种改动时,标准单位,其中也包括使用 25°C 的建议,早已为许多科学家所接受。不管这个意见是否需要继续加以讨论,但测定酶活性的温度是要遵守执行的。

在临床化学上,所用的体液,主要是指血清,血浆,有关酶的强度是用单位/升或毫单位/毫升表示。

光学测定

光学测定是Otto Warburg在1936年所引进的,其基础是还原型NADH与NADPH在338.5与340.5 nm间有一个最大吸收峰,其氧化型NAD或NADP则在300与400 nm之间无光吸收。在任何脱氢酶反应中,无论是NAD或NADP的还原,还是NADH或NADPH的氧化,都可以通过读取在340 nm或其附近的光吸收的增减而测定之。

图2表示NADH和NAD的吸收光谱。在这曲线中,NAD与NADH溶液之浓度为 $c=0.05$ 毫克分子/升。在340 nm和光程 $d=1.0$ 厘米时,NADH溶液的吸光率 $A=0.315$ 。浓度既

知, 便可由 Lambert-Beer 定律计算出 NADH 的克分子吸光系数(ϵ)。

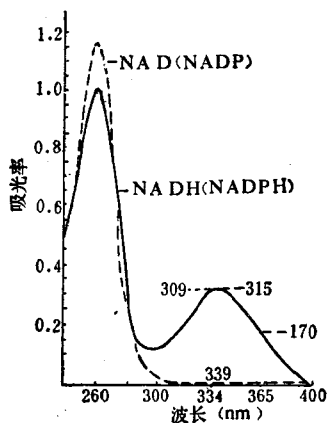


图2 NAD(NADP) 的吸收光谱
 $c=0.05$ 毫克分子/(25°C, 0.1 克分子/升三乙醇胺盐酸盐缓冲液 pH 7.6)

$$A = \epsilon \times c \times d \text{ 或 } \epsilon = \frac{A}{c \times d}$$

$$d = 1.0 \text{ cm} = \frac{A}{\epsilon \times c}$$

$$\epsilon_{340} = \frac{0.315}{0.05}$$

$$= 6.31 \text{ 升} \cdot \text{毫克分子}^{-1} \cdot \text{厘米}^{-1}$$

$$\epsilon_{365} = \frac{0.170}{0.05}$$

$$= 3.4 \text{ 升} \cdot \text{毫克分子}^{-1} \cdot \text{厘米}^{-1}$$

$$\epsilon_{334} = \frac{0.309}{0.05} = 6.181 \text{ 升} \cdot \text{毫克分子}^{-1} \cdot \text{厘米}^{-1}$$

设若 ϵ 已知, 则从吸光率便可计算出浓度 c 。当 $d=1.0$ 时

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

在 340 nm: $c = \frac{0.315}{6.3} = 0.05 \text{ 毫克分子/升}$

365 nm: $c = \frac{0.170}{3.4} = 0.05 \text{ 毫克分子/升}$

334 nm: $c = \frac{0.309}{6.18} = 0.05 \text{ 毫克分子/升}$

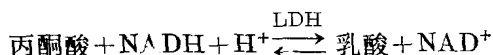
还可以进一步通过测定吸光率之改变 (ΔA) 算出反应中 NADH 的氧化量或 NAP 的还原量:

$$\Delta A_{340} = 1.000 \triangleq 0.159 \text{ 毫克分子/升}$$

$$4A_{365} = 1.000 \pm 0.294 \text{ 毫克分子/升}$$

$$4A_{334} = 1.000 \pm 0.162 \text{ 毫克分子/升}$$

乳酸脱氢酶(LDH)催化下述可逆反应:



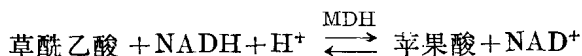
它的活性可通过将酶液与丙酮酸和 NADH 在 pH 7.5 中一起保温, 或将酶液与乳酸及 NAD 一起在 pH 8.9 中保温而测定。吸光率在前一例子中的降低率, 和在后一例子中的增加率都可作为活性的参数。

通过将反应同脱氢酶系统偶联, 也可以利用光学法来测定与 NAD 无关的酶反应。

以测定 GOT 活性为例加以说明:



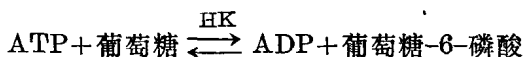
为了要用光学法测定活性, 乃向反应物加入 NADH 与过量的 MDH, 进行反应:



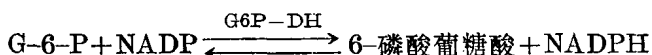
每转化一克分子草酰乙酸成为苹果酸, 就有一克分子 NAD 生成, 因而吸光率的减少就成为一个 GOT 酶活性的参数。MDH 的作用可看作为是一种指示剂反应。在其他例子中, 偶联到一个指示剂反应上, 需要外加一个辅助的酶反应步骤。例如在 CK(肌激酶)的测定中, CK 催化将肌酸磷酸盐的一个磷酸基团转到 ADP 的可逆反应:



在上述的系统中, 所生成的 ATP, 在己糖激酶 (HK) 辅助反应中, 用以使葡萄糖磷酸化。



于是葡萄糖-6-磷酸在有 NADP 存在下, 就成为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6P-DH) 所催化的指示剂反应中的底物。



因此在 OK 作用下, 通过 HK (辅助酶) 和 G6P-DH (指示剂酶) 的作用, 每转化 1 克分子的磷酸盐到 ADP 时, 就有 1 克分子的 NADPH 生成。

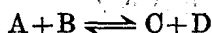
辅助酶类和指示剂酶必须过量添加, 以避免成为整个反应中的限制因素。

用酶法定量测定代谢物

用酶来测定代谢物, 其优点在于它的专一性; 而用化学法测定代谢物时, 由于具有类似结构的物质也可发生反应, 故往往使结果偏离。一个广泛用于测定血清中的丙酮酸方法是基于与 2, 4-二硝基苯肼形成腙, 但是其他生理性或病理性存在于血清中的酮酸, 例如 α -氧代酮戊二酸、乙酰醋酸、氧代乳酸也会发生反应, 而使丙酮酸的外观浓度偏高。

借乳酸脱氢酶的反应可精确地测出丙酮酸的含量。在详细讨论之前, 让我们先对一般概念依次作一叙述。

每一种化学反应达到它平衡时, 在反应



中双箭头表示进行反应的二个方向, 即向前或向后。如果反应是由一个 A 与 B 的混合物开始的, 开始时 C 与 D 的生成速

度很快, 但当 C 与 D 的生成是愈来愈多时, 逆反应将会加强而向前反应减弱一直达到平衡为止, 此时向前反应与逆向反应的速度相等。平衡点可以偏在任何一边, 根据反应类型之不同, 可以是几乎完全偏于右边也可以是完全偏于左边, 也可以居中。

有些化学反应进行得很快, 但另外有一些反应则如不加催化剂就进行得极慢。酶是生物催化剂, 能促进达到平衡的速度。在一定范围内酶量并不影响平衡值, 但酶浓度如果太低时, 将延长达到平衡所需的时间。

一个反应的平衡可用质量作用定律公式来表示, 即反应速度是正比于反应物浓度的乘积

$$V_{\rightarrow} = k_1[A] \times [B]$$

和

$$V_{\leftarrow} = k_2[C] \times [D]$$

此处 k_1 与 k_2 是一常数, 而 $V_{\rightarrow}$ 与 $V_{\leftarrow}$ 分别表示是向前($\rightarrow$)或逆向($\leftarrow$)的反应速度, 在平衡时 $V_{\rightarrow} = V_{\leftarrow}$

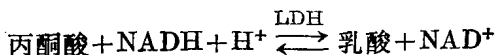
或

$$k_1[A][B] = k_2[C][D]$$

$$\text{上式可改写为 } \frac{k_2}{k_1} = K = \frac{[A] \times [B]}{[C] \times [D]}$$

上式中 K 是反应的平衡常数, 表示在平衡时反应物的浓度之比。

现用 LDH 测定丙酮酸为例加以说明:



在丙酮酸定量地转变为乳酸的反应条件下, 试用平衡式来进行计算。平衡常数 K' 取决于 pH 和温度, 是在 pH 7、25°C 中测定所得到的。

$$K'_{\text{pH}=7} = \frac{[\text{丙酮酸}] \times [\text{NADH}]}{[\text{乳酸}] \times [\text{NAD}]} = 2.3 \times 10^{-5}$$

换句话说，在分子表示的乘积 $[\text{乳酸}] \times [\text{NAD}]$ 比分子所表示的乘积 $[\text{丙酮酸}] \times [\text{NADH}]$ 大 100,000 倍以上时就可达到平衡。

让我们再来计算下式的商值：
$$\frac{[\text{丙酮酸}] \times [\text{NADH}]}{[\text{乳酸}] \times [\text{NAD}]}$$

设若样品(血液)中丙酮酸是在 $\text{pH}=7$, 25°C 用标准方法测定的,若此商值大于 K' ,则说明方法适用,如果小于 K' ,则必须修正。

在血液中丙酮酸的正常值大约是 5×10^{-5} 克分子/升。在血液脱蛋白后,取出一小部分不含蛋白质的上清液,放入比色杯,与缓冲液、 NADH 、 LDH 相混合后丙酮酸浓度为 2×10^{-5} 克分子/升。同样乳酸的浓度约为 1×10^{-3} 克分子/升,在试验混合物中的终浓度为 4×10^{-4} 克分子/升。

如果有 99% 的丙酮酸被还原成乳酸,即丙酮酸的浓度由 2×10^{-5} 降到 0.02×10^{-5} ,或者减少 1.98×10^{-5} 克分子/升,则

* 正确地讲 K' 应当叫“表观”平衡常数,它不同于热力学的和不依赖于 pH 的平衡常数 K 。

对 LDH 反应来说, $K = \frac{[\text{丙酮酸}] \times [\text{NADH}] \times [\text{H}^+]}{[\text{乳酸}] \times [\text{NAD}]} = 2.3 \times 10^{-2}$ 克分子/升。要得出某一 pH 时的 pH 依赖常数 K' ,应以某一氢离子浓度除 K ,

$$\text{在 } \text{pH}7: [\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ 克分子/升; } K_{\text{pH}=7.0} = \frac{2.3 \times 10^{-2}}{10^{-7}} = 2.3 \times 10^{-5}$$

$$\text{pH}8: [\text{H}^+] = 10^{-8} \text{ 克分子/升; } K_{\text{pH}=8.0} = \frac{2.3 \times 10^{-2}}{10^{-8}} = 2.3 \times 10^{-4}$$

$$\text{pH}9: [\text{H}^+] = 10^{-9} \text{ 克分子/升; } K_{\text{pH}=9.0} = \frac{2.3 \times 10^{-2}}{10^{-9}} = 2.3 \times 10^{-3}$$

如此类推。

因酶法测定代谢物是在缓冲液中进行的,其氢离子浓度实际上是保持恒定的,表观平衡常数足以表示反应特性。

此反应已可满足要求。

试验开始的浓度如下:

$$\text{丙酮酸} = 2 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{NADH} = 10 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{乳酸} = 40 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{NAD} = 0$$

每还原 1 克分子丙酮酸, 就有一克分子 NADH 被氧化, 并生成乳酸和 NAD 各 1 克分子。当 99% 或 1.98×10^{-5} 克分子/升的丙酮酸被还原后, 所得到的是:

$$\text{丙酮酸} = 2 \times 10^{-5} - 1.98 \times 10^{-5} = 0.02 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{NADH} = 10 \times 10^{-5} - 1.98 \times 10^{-5} = 8.02 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{乳酸} = 40 \times 10^{-5} + 1.98 \times 10^{-5} = 41.98 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

$$\text{NAD} = 0 + 1.98 \times 10^{-5} = 1.98 \times 10^{-5} \text{ 克分子/升}$$

将上述数值代入以下方程式:

$$\frac{[\text{丙酮酸}][\text{NADH}]}{[\text{乳酸}][\text{NAD}]} = \frac{0.02 \times 10^{-5} \times 8.02 \times 10^{-5}}{41.98 \times 10^{-5} \times 1.98 \times 10^{-5}} \\ = 1.92 \times 10^{-3}$$

所得到的商仍大于 $K' = 2.3 \times 10^{-5}$, 故反应几乎可进行到丙酮酸 100% 被还原。

LDH 反应也可以用于乳酸的测定, 但必须将丙酮酸从反应系中移去, 以便使乳酸能定量地氧化。反应是在 pH 9 中进行的, 其 $K' = 2.3 \times 10^{-3}$, 在平衡时, 分母的乘积仍比分子的乘积大 1000 倍以上。借添加胍使之同丙酮酸形成一可溶性的络合物, 于是丙酮酸就可从反应中除去, 而使乳酸的氧化得以进行完全。其他能够用酶法方便地、专一性地测定的代谢物有 ATP, ADP, AMP, 氨, 乙醇, 葡萄糖, α -酮戊二酸, 尿素, 与脲酸等。

计算代谢物的浓度可用前述公式: