

基于过氧化氢-碘化钾体系的紫外-可见吸收光谱法间接测定食品添加剂葡萄糖氧化酶的活性

姚彦红, 陈嘉琦, 白 莹, 张爱菊*, 董 娜, 张小林*

(甘肃医学院, 平凉 744000)

中图分类号: O657.32

文献标志码: B

文章编号: 1001-4020(2025)05-0613-04

葡萄糖氧化酶(GOD)可催化葡萄糖与氧气反应生成过氧化氢^[1], 临幊上可作为诊断酶用来制备尿糖和血糖试纸, 制药工业中可用作维生素C及B₁₂制剂的稳定剂, 食品行业中可作为溴酸钾的替代品广泛用于面粉加工^[2]。GOD活性体现着酶催化反应速率, 常用酶活量U($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, 每分钟从葡萄糖溶液体系中释放出过氧化氢的微摩尔数)表示, 已报道的测定方法有电化学法^[3]、测压法^[4]和滴定法^[5]。电化学法和测压法对仪器要求较高, 随着检测手段的发展已经少有人使用; 滴定法具有简便易行、测试成本较低的优势, 但其测量精度有限, 不便于标准化开发。分光光度法的报道最多, 包括连续光度法^[6-7]、褪色光度法^[8], 其中以4-氨基安替比林作供体的连续光度法(双酶法)应用最为广泛, 但这种方法对显色反应速率要求比较高, 测定过程中不得不使用价格更昂贵的辣根过氧化物酶作显色反应的催化剂, 而辣根过氧化物酶不稳定, 测量不确定性增加。褪色光度法以传统染料靛蓝胭脂红作氢供体, 测定过程中不需使用催化剂, 方法简单, 试验成本较低, 但是体系反应温度为100℃, 靛蓝胭脂红褪色程度、体系稳定性、过氧化氢反应完全程度很难保障, 不适合分析低活性酶。

文献[9]依托碘-淀粉显色反应完成GOD活性测定, 有效测定范围为0.1~0.5 U \cdot mL⁻¹, 相对标准偏差(RSD)小于5.0%, 具有较好的实用性。本研究团队发现, 过氧化氢-碘化钾显色体系具有更好的检测性能: 反应产物碘在紫外波长288 nm处有强吸

收稿日期: 2023-10-01

基金项目: 2024年高校教师创新基金(2024A-215); 甘肃医学院(系)主任负责制资助项目(GY-2023FZZ06)

作者简介: 姚彦红, 讲师, 硕士, 研究方向主要为微生物学及其检测

*通信作者: 张爱菊, 副教授, 硕士, 研究方向主要为药物分析, zhangaiju@gsmc.edu.cn; 张小林, 教授, 研究方向主要为光分析检测, zxlpkyz2005@126.com

收; 该体系表观摩尔吸光系数是碘-淀粉显色体系的1.58倍, 达到 $3.57\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。基于此, 本工作建立了一种测定GOD活性的简易方法, 该方法具有以下优点: 有效吸光度上限可扩展到1.5附近; 光稳定性良好; 测定过程更为简单; 方法灵敏度更高。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

UH5300型紫外-可见分光光度计。

GOD工作液: 5 mg \cdot L⁻¹, 称取GOD标准品(10 000 U \cdot g⁻¹)0.5 mg, 用100 mL磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解并稀释而成。

葡萄糖-磷酸盐缓冲液: 称取一水合葡萄糖1.9800 g, 用100 mL磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解并稀释, 配制成葡萄糖的浓度为0.1 mol \cdot L⁻¹的葡萄糖-磷酸盐缓冲液, 于-4℃冷藏保存, 保存期限2 d。

过氧化氢标准溶液(1.0 mmol \cdot L⁻¹)、碘化钾溶液(0.05 mol \cdot L⁻¹)、硫酸溶液(3.0 mol \cdot L⁻¹)和磷酸盐缓冲液(0.05 mol \cdot L⁻¹, pH 7.0)均由相关试剂用水溶解并稀释而成。

除特别说明外, 试验所用试剂均为分析纯; 试验用水为蒸馏水。试验样品为3种固体酶粉(食品添加剂), 酶活力标示值为2 000 U \cdot g⁻¹。

1.2 试验方法

准确称取固体酶粉0.20~0.25 g(精确至0.0001 g), 加入100 mL磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 磁力搅拌30 min。以转速500 r \cdot min⁻¹离心10 min, 吸取0.50 mL上清液, 用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释100倍, 得到样品溶液。

取葡萄糖-磷酸盐缓冲液1.00 mL, 于37℃预热5 min, 与同步预热过的0.50 mL样品溶液或0.50 mL GOD工作液混合, 于37℃振荡反应10 min, 加入硫酸溶液0.50 mL终止酶反应。再加

入碘化钾溶液 1.00 mL, 于 40 ℃ 反应 15 min, 用水定容至 10 mL。以水作参比, 1 cm 石英比色皿作吸收池, 在 288 nm 波长处测量体系的吸光度 A(扣除了酶空白的吸光度), 采用公式(1)计算 GOD 活性(酶活性用 X 表示, 单位 $U \cdot mL^{-1}$)。

$$X = \frac{A}{k} \times 10 / (t \times V) \quad (1)$$

式中: k 为标准曲线的斜率; t 为酶催化反应时间, 10 min; V 为 GOD 工作液 / 样品溶液体积, 0.50 mL; 10 为定容体积, mL。

2 结果与讨论

2.1 可行性分析

分别对含有葡萄糖、碘化钾、 $0.01 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 过氧化氢、 $0.01 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 过氧化氢 + 碘化钾和 $0.05 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 过氧化氢 + 碘化钾的 5 种磷酸盐缓冲液进行紫外-可见光扫描, 各体系的紫外-可见吸收光谱见图 1, 分别对应曲线 a~e。

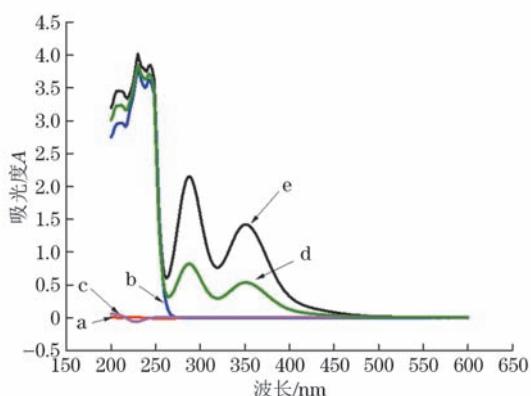


图 1 不同体系的紫外-可见吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet-visible absorption spectra of different systems

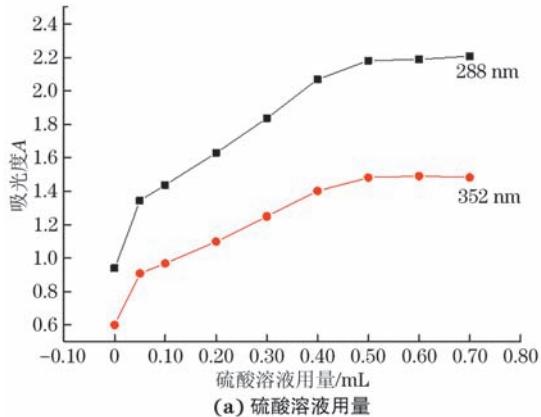


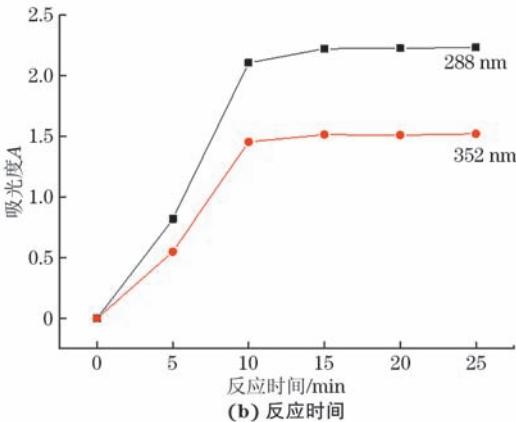
图 2 体系吸光度随硫酸溶液用量和反应时间变化的曲线

Fig. 2 Curves of system absorbance changing with the amount of sulfuric acid solution and reaction time

结果显示: 葡萄糖、碘化钾和过氧化氢在 200~600 nm 内无特征吸收峰(曲线 a~c); 加入过氧化氢和碘化钾后, 体系在紫外光区(200~400 nm) 出现了碘的特有吸收峰(曲线 d~e), 吸收峰分别位于 288, 352 nm 处, 峰距为 64 nm, 且吸光度随过氧化氢浓度的增大而升高。以上结果表明, 基于过氧化氢-碘化钾体系的紫外-可见吸收光谱法可用于 GOD 含量的间接测定。

2.2 过氧化氢-碘化钾体系反应条件的优化

直接取 $1.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 过氧化氢标准溶液 0.50 mL 代替酶反应液, 后续步骤同 1.2 节, 采用单因素法考察了硫酸溶液用量、碘化钾溶液浓度、反应温度、反应时间对体系吸光度的影响。过氧化氢与碘化钾的反应需在酸性条件下进行, 而磷酸盐缓冲液呈中性。为调节体系酸度, 试验选用硫酸溶液进行酸化, 结果显示, 随着硫酸溶液用量的增加, 体系吸光度呈现上升趋势, 当硫酸溶液用量不小于 0.50 mL 时, 吸光度趋于稳定, 因此试验选择的硫酸溶液用量为 0.50 mL, 详见图 2(a)。碘化钾溶液既是还原剂, 又是助溶剂, 氧化产物碘会和 I^- 结合形成可溶性碘(I_3^-), 从而提高体系的稳定性, 当碘化钾溶液的浓度不小于 $0.05 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时, 吸光度较大且保持不变, 因此试验选择将碘化钾溶液的浓度设定为 $0.05 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 。常温下过氧化氢和碘化钾的反应较为缓慢, 而温度过高会导致部分碘挥发, 适宜反应温度为 30~40 ℃, 因此试验选择将反应温度控制为 40 ℃。体系吸光度随反应时间变化的曲线见图 2(b), 结果显示, 当反应时间不小于 10 min 时体系吸光度趋于稳定, 为保证反应完全, 试验选择的反应时间为 15 min。



2.3 酶催化反应条件的优化

2.3.1 底物溶液用量

在葡萄糖-磷酸盐缓冲液(底物溶液)中加入GOD工作液0.50 mL, 考察了底物溶液用量对体系吸光度的影响。结果显示, 体系吸光度随底物溶液用量的增加而显著升高, 当底物溶液用量不小于0.40 mL时, 吸光度较高并趋于稳定。鉴于GOD催化反应为准一级反应, 其反应速率与底物溶液浓度无关; 为保证酶催化反应正常进行, 体系中葡萄糖浓度需保持绝对过量, 因此试验选择的底物溶液用量为1.00 mL。

2.3.2 酶催化反应时间

取GOD工作液0.50 mL, 按照试验方法测量了不同酶催化反应时间下的吸光度A。结果显示: 酶催化反应时间为0时, 吸光度为0.17, 说明碘化钾已被部分氧化; 酶催化反应时间继续延长, 吸光度快速增大, 25 min内随酶催化反应时间t(min)的延长呈线性升高, 线性回归方程为 $A=0.0725t+0.1725$, 相关系数为0.9977。为缩短测定时间, 试验选择的酶催化反应时间为10 min。

2.3.3 酶催化反应终止剂

试验比较了3种常用终止剂硫酸溶液、盐酸溶液和氢氧化钠溶液对酶催化反应的终止效果。结果显示, 3种终止剂均可瞬间终止酶催化反应, 但碱性介质不利于后续氧化产物碘的稳定存在, 盐酸溶液受热易挥发, 因此试验选择硫酸溶液作终止剂, 并考察了其用量(0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80, 1.00 mL)对体系吸光度的影响, 结果见图3。

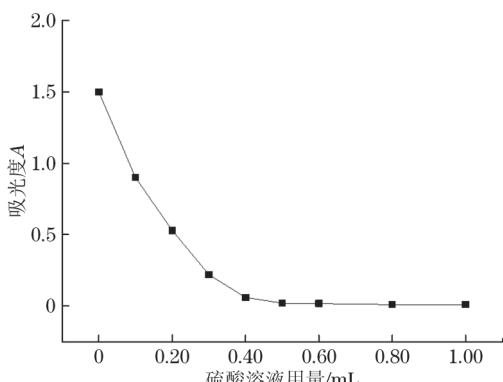


图3 不同用量硫酸溶液灭活时体系的吸光度

Fig. 3 Absorbance of the system during inactivation with different amounts of sulfuric acid solution

结果显示, 当硫酸溶液用量为0.40 mL时, 吸光度趋于0, 酶活性完全消失。结合2.2节中过氧化氢与碘化钾反应对酸度的要求, 试验选择的硫酸溶液

用量为0.50 mL。

2.4 标准曲线和检出限

在磷酸盐缓冲液1.00 mL中各加入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢标准溶液0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 mL, 按照试验方法测定, 考察了体系中过氧化氢浓度分别为0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光度的变化, 结果见图4。

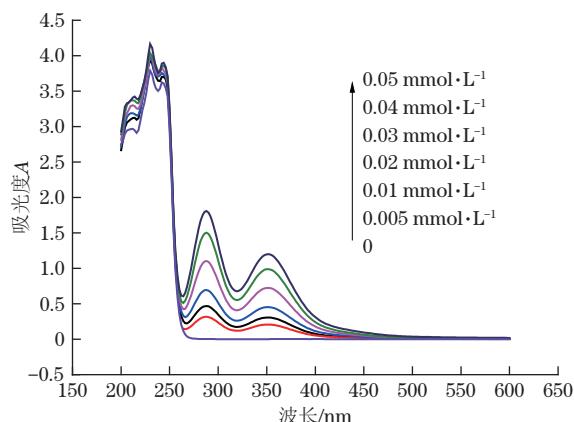


图4 含不同浓度过氧化氢体系的紫外-可见吸收光谱图

Fig. 4 Ultraviolet-visible absorption spectra of systems containing different concentrations of hydrogen peroxide

结果显示, 随着过氧化氢浓度的增加, 288, 352 nm处的吸光度均随之增加, 且吸收峰位置未发生改变。以过氧化氢的浓度($c, \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标, 对应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。结果显示, 288, 352 nm处的线性回归方程分别为 $A=35.69c+0.04714$ 和 $A=23.63c+0.02805$, 线性范围均为 $0.005 \sim 0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相关系数分别为0.9955和0.9960, 表观摩尔吸光系数分别为 $3.57 \times 10^4, 2.36 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。考虑到288 nm处标准曲线的斜率和表观摩尔吸光系数更大, 因此试验选择的测定波长为288 nm。

按照试验方法对不含葡萄糖的体系连续测定10次, 计算288 nm处体系吸光度的标准偏差s, 以 $3s$ 和288 nm处标准曲线斜率k的比值计算检出限($3s/k$), 结果为 $8.4 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

酶活性体现的是过氧化氢的生成速率, 而不是生成量, 当酶催化反应时间为10 min, GOD工作液用量为0.50 mL时, GOD活性测定范围为 $0.01 \sim 0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $1.68 \times 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 共存物质干扰试验

当GOD工作液用量为0.50 mL时, 按照试验方法考察了 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 常见共存物质 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、果糖、蔗糖、维生素C、麦芽糖



对GOD活性测定的干扰情况。结果显示:加入 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Fe}^{3+}$ 后,测定值相对误差的绝对值大于5.0%,实际测试时需要排除其干扰;加入其余共存物质后,测定值相对误差的绝对值均小于5.0%,不影响GOD活性测定。

2.6 精密度和准确度试验

取GOD工作液0.50 mL,按照试验方法平行测

定6次,计算测定值的RSD。结果显示,GOD酶活性测定值为 $0.0412\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD为0.85%,表明本方法具有较好的精密度。根据稀释倍数计算得GOD活力为 $8240\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,与认定值 $10000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 基本一致。

按照试验方法和文献[5]中双酶法分析3种固体酶粉样品(编号分别为S₁~S₃),结果见表1。

表1 方法比对结果($n=6$)

Tab. 1 Results of method comparison ($n=6$)

样品编号	称样量 m/g	酶活性理论值/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	酶活性测定值/($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)		RSD/%	
			本方法	双酶法	本方法	双酶法
S ₁	0.2088	0.0418	0.0375	0.0359	1.8	3.1
S ₂	0.2364	0.0472	0.0425	0.0420	2.3	2.8
S ₃	0.2468	0.0493	0.0395	0.0379	1.2	3.5

结果显示:两种方法酶活性测定值远小于理论值,可能原因为GOD酶活性在运输、保存过程中下降;本方法所得的测定值较双酶法的偏高,说明酶催化反应更加完全;相较双酶法,本方法所得测定值的RSD更低,说明本方法具有较高的精密度。

本工作以葡萄糖为底物,利用GOD催化生成中间产物过氧化氢,过氧化氢和碘化钾反应生成显色产物碘,利用紫外-可见吸收光谱法测定,进而计算GOD活性。本方法操作简便,检出限满足食品添加剂GOD活性分析要求,有望为GOD试剂盒开发以及行业标准制定提供技术参考。

参考文献:

- [1] 田益玲,贾英民,安铁军.葡萄糖氧化酶对玉米粉品质的影响[J].中国粮油学报,2006,21(5): 51-53.
TIAN Y L, JIA Y M, AN T J. Effect of glucose oxidase on cornmeal character[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(5): 51-53.
- [2] STEFFOLANI M E, RIBOTTA P D, PÉREZ G T, et al. Combinations of glucose oxidase, α -amylase and xylanase affect dough properties and bread quality[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(3): 525-534.
- [3] 任婷月,周万里,张利群,等.一种检测葡萄糖氧化酶活力的新方法[J].食品与发酵工业,2015,41(1): 212-215.
REN T Y, ZHOU W L, ZHANG L Q, et al. The new technology for detecting glucose oxidase activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(1): 212-215.
- [4] 肖志明,樊霞,马东霞.葡萄糖氧化酶的应用和检测方

- 法研究进展[J].中国畜牧杂志,2014,50(18): 76-81.
XIAO Z M, FAN X, MA D X. Research progress of usage and analysis method for glucose oxidase[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2014, 50(18): 76-81.
- [5] 李丕武,刘瑜,李瑞瑞,等.两种葡萄糖氧化酶活力测定方法的比较[J].食品工业科技,2013,34(12): 71-75.
LI P W, LIU Y, LI R R, et al. Comparison of two kinds of glucose oxidase activity determination methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(12): 71-75.
- [6] 王镜岩,朱圣庚,徐长法,等.生物化学(上)[M].3版.北京:高等教育出版社,2002: 351-367.
WANG J Y, ZHU S G, XU C F, et al. Biochemistry (Volume 1)[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 351-367.
- [7] H·比斯瓦根.酶学实验手册[M].刘晓晴,译.北京:化学工业出版社,2009.
BISSWANGER H. Practical enzymology[M]. LIU X Q, trans. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [8] 周建芹,陈韶华,王剑文.测定葡萄糖氧化酶活力的一种简便方法[J].实验技术与管理,2008,25(12): 58-60.
ZHOU J Q, CHEN S H, WANG J W. A simple and convenient method to determine the activity of glucose oxidase[J]. Experimental Technology and Management, 2008, 25(12): 58-60.
- [9] 惠瑶瑶,郑斐,王倩楠,等.一种检测葡萄糖氧化酶活力的新方法[J].食品与发酵工业,2020,46(9): 255-259.
HUI Y Y, ZHENG F, WANG Q N, et al. An innovative iodine-starch spectrophotometry method for quantitative detection of glucose oxidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 255-259.