

技术与方法

抗坏血酸氧化酶活性的脉冲极谱法测定*

汪乃兴 张晓岚

(复旦大学化学系, 上海 200433)

提 要

用微分脉冲极谱法测定了各种植物样品中抗坏血酸氧化酶的活性, 并研究了其影响因素。与传统的滴定法相比, 结果完全一致。其方法简便快速, 重现性好。

关键词 抗坏血酸氧化酶, 活力测定, 微分脉冲极谱法

抗坏血酸氧化酶普遍存在于植物中。植物体内的抗坏血酸, 在抗坏血酸氧化酶的作用下, 能被空气中的氧氧化为脱氢抗坏血酸。抗坏血酸氧化酶活力的测定, 通常有氧化还原滴定法^[1]。但手续不太简便, 且终点显示用指示剂, 主观误差较大, 脉冲极谱法是电化学分析法中新发展的方法, 具有灵敏度高, 干扰少等特点, 该法用于酶活性的测定, 迄今未见报道。我们用微分脉冲极谱法测定了抗坏血酸氧化酶的活性, 并研究了底物浓度、pH 值、温度等影响因素。抗坏血酸为不饱和的羟基内酯衍生物, 其分子结构中的烯醇基可以在电极上氧化, 产生阳极氧化峰。而抗坏血酸的氧化产物(脱氢抗坏血酸), 在一定的实验条件下为非电活性, 因此可以用极谱法来测定酶的活性。由于工作电极使用滴汞电极, 故峰电流有良好的重现性。抗坏血酸的氧化峰电位在零伏附近, 空白影响小, 有很好的选择性。本方法灵敏度高, 手续简便, 应用于马铃薯、香菜、辣椒、胡萝卜、卷心菜和菠菜等 10 余种植物样品中抗坏血酸氧化酶活性的测定, 结果良好。本方法还与滴定法^[1]相比, 两者结果相符, 表明方法可靠, 宜于推广使用。

1 材料和方法

1.1 仪器

F-78 型脉冲极谱仪(复旦大学电子仪器厂); 501 型超级恒温器(上海实验仪器总厂)。

工作电极为滴汞电极, 对极为 Pt 片电极, 参比电极为 Ag-AgCl 电极。

1.2 试剂

1.2.1 抗坏血酸标准溶液: 称取抗坏血酸分析纯 1.7613g, 用少量水溶解后, 定容于 100 ml, 得 0.1mol/L 抗坏血酸标准溶液。避光保存在冰箱里。用前随时将此标准溶液稀释到所需要的浓度。

1.2.2 0.1 mol/L KH_2PO_4 -0.1 mol/L K_2HPO_4 (pH6.0) 缓冲液。

1.2.3 碘酸钾溶液: 称取 0.2168g KIO_3 (分析纯), 定容于 100ml, 得到浓度为 $1.013 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 的溶液。取出 1ml, 再稀释定容于 100ml, 得到浓度为 $1.013 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 的溶液。

* 本文系国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-02-04

修回日期: 1991-04-13

1.2.4 1% 淀粉溶液: 0.5g 可溶性淀粉, 加入 50ml 煮沸的去离子水, 使淀粉溶解。

其他试剂均为分析纯, 水为去离子水。

1.3 粗酶匀浆液的提取

取植物样品(如马铃薯块茎 10g), 加入少量的 pH6.0 的 0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液, 在研钵中研碎。将悬浮液转移至 50ml 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 仔细混匀。测定时取出匀浆的上清液。上述手续在室温低于 5℃ 下进行。

1.4 操作步骤

在 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 恒温条件下, 取 14ml pH6.0 的磷酸缓冲液于 25ml 清洁干燥的烧杯中, 加入 6ml 上述粗酶匀浆清液(反应体积也可相应减少), 通入 N_2 搅拌 4min 后, 加入 25 μl 0.1 mol/L 的抗坏血酸, 再通 N_2 40s, 使混合均匀。用脉冲极谱法测定在起始 ($t = 0$) 和各不同反应时间 (t) 下的极谱峰电流高度的变化 (Δh)。电压扫描范围自 -0.150V 至 $+0.150\text{V}$, 扫描速度 2mV/s。其他实验条件为灵敏度 $2 \times 10^{-3} \text{ A/mV}$, 衰减 1.0, 脉冲振幅 50mV, 记录仪 X 100mV, Y10mV。

2 结果与讨论

2.1 底物(抗坏血酸)的脉冲极谱法测定条件试验

2.1.1 测定底液 pH 的影响

实验表明, pH 值对抗坏血酸的峰高无明显影响, 但 pH 值过低 ($\text{pH} < 4$), 则峰电流与汞的氧化峰相近, 发生干扰。pH 值过高 ($\text{pH} > 9$), 则抗坏血酸易被氧化分解。考虑到以后酶活性测定的最佳 pH 为 6, 故实验选定极谱测定的介质为 pH6.0 的磷酸缓冲液。

2.1.2 标准曲线、检测限和重现性

电解池中加入 pH6.0 的磷酸缓冲液, 温度为 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 。加入不同浓度的抗坏血酸标准液, 同上操作步骤, 进行微分脉冲极谱法测定。结果表明抗坏血酸浓度在 4×10^{-6} — $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 间与峰电流呈线性关系。同上条件, 检测限为 $1.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。当抗坏血酸的浓度

为 $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时, 在上述底液中, 重复实验 7 次, 得到的峰高变异系数为 2.9%, 重现性良好。

2.2 酶活力测定的条件试验

2.2.1 酶反应过程时间的影响

按上述操作步骤, 试验了产物生成和时间的关系。实验结果如图 1 所示。纵坐标为产物生成后的极谱峰电流变化 (Δh), 横坐标为时间。结果表明, 时间在 1—25min 内, 均呈直线关系。30min 后反应速度逐渐降低。

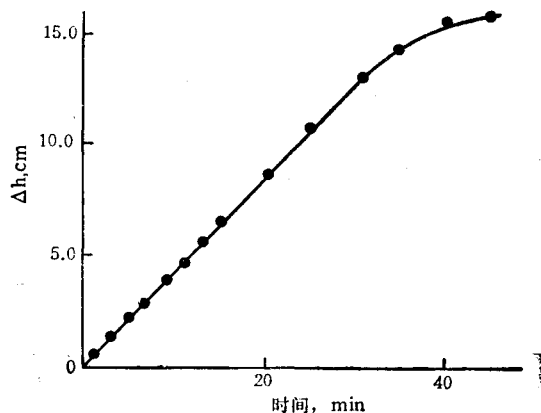


图 1 酶反应过程

2.2.2 底物浓度的选择

在一定量的酶液 (6ml) 存在下, 加入 14ml pH6.0 的磷酸缓冲液, 温度 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 试验了不同底物浓度 (5×10^{-3} — $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$),

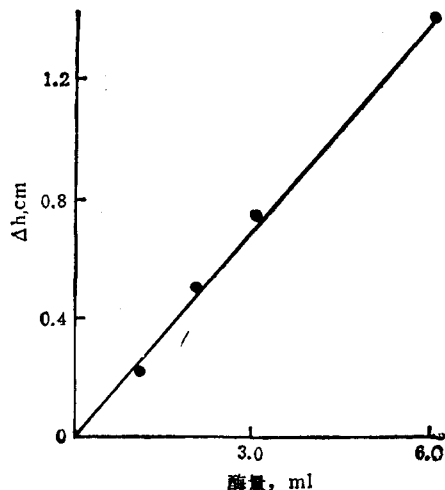


图 2 酶量的影响

即抗坏血酸浓度影响,反应时间为 3min。结果表明底物浓度为 $1.25 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 时,浓度已足够过量,可把酶完全饱和。同上条件,试验了不同酶量的影响,结果如图 2 所示,表明上述底物浓度的选择是合适的。

2.2.3 pH 值对酶活力的影响

取 6ml 酶液,分别加入 pH 为 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 的磷酸缓冲溶液 14ml, 在 25℃ 下保温 30min。加入抗坏血酸,得浓度为 $1.25 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, 反应时间 10min, 同上步骤进行极谱测定。结果表明,酶反应速率在 pH6.0 时达最大值。

2.2.4 酶的热稳定性

6ml 酶液,在 pH6.0 的磷酸缓冲液中,先在下列各温度: 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 35℃, 50℃ 和 70℃, 保温 30min。然后在 25℃ 下进行测量。加入底物(抗坏血酸)后,反应时间 3min, 同前操作步骤,进行极谱测定。结果表明温度有较大的影响,酶活力在本实验条件下,随着温度升高,而逐渐下降。参照一些氧化酶活力的测定^[2],反应温度取 25℃。

2.2.5 与滴定法比较

按文献[1]方法,25℃ 下取 6ml 粗酶,加入 14ml pH6.0 磷酸缓冲液和 25 μl 0.1mol/L 的抗坏血酸,反应 3min 后,加入 1ml 10% H_3PO_4 ,

终止反应。再加入 1ml 1% 淀粉, 1ml 0.05mol/L KI, 未反应的抗坏血酸残余部分用 $1.013 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ KIO_3 滴定至蓝色不消失为止。另一方面,作平行对照滴定。25℃ 条件下,取 6ml 粗酶,加入 14ml pH6.0 的磷酸缓冲液,加入 1ml 10% H_3PO_4 终止反应,加入 1ml 1% 淀粉和 1ml 0.05mol/L KI, 用 KIO_3 标准液滴定至蓝色不消失为止。

两种方法的测定结果如下:极谱法为 7.1 酶活力单位;滴定法为 6.9 酶活力单位。(酶活力单位定义为 25℃ 下 1g 被分析物质,每分钟能氧化的抗坏血酸微摩尔数)。表明结果相符,方法可靠。

2.2.6 样品测定

取 5g 新鲜材料,加 pH6.0 的磷酸缓冲液少许,在研钵中研碎,转移至 25ml 容量瓶中,稀释至 25ml,混匀,取 5ml 进行测定。加入 15ml pH6.0 的缓冲液,通入 N_2 4min 后,加入 4.0 μl 0.1mol/L 抗坏血酸,通入 N_2 40s 后进行极谱测定;待反应 3min 后,再记录极谱峰电流。各样品测得的结果列于表 1。结果表明抗坏血酸氧化酶的活性与抗坏血酸的含量^[3]无相关性,但同一植物样品、不同取样部位,其酶活性可有较大的差异。如辣椒梗茎的酶活性高于辣椒籽和辣椒肉;而冬笋,则笋肉高于笋壳。

表 1 各种植物样品中酶活力的测定结果

样品	香菜	青菜	萝卜	胡萝卜	黄瓜	菠菜	卷心菜	辣椒			冬笋		洋葱	
								梗	肉	籽	壳	肉	芽	肉
酶活性 (酶活力单位)	0.23	0.060	无活性	0.060	0.68	0.033	0.067	2.0	0.040	1.7	0.070	0.15	0.020	无活性

参 考 文 献

1 应振士,李曙轩. 园艺学报, 1990; 17(1): 51

2 蒋传葵等编著. 工具酶的活力测定. 上海: 科学技术出版社, 1982: 2—8

3 黄伟坤等编. 食品化学分析. 上海: 科学技术出版社, 1979: 352—353.