

## 酶解法测定乳糖和半乳糖含量

### 一、应用范围

本方法可适合于各种乳和乳制品。

### 二、原理

在除去干扰成份(脂肪和蛋白质)的水相浸提液中,游离半乳糖在半乳糖脱氢酶的催化下由辅酶 I (NAD) 氧化成半乳糖酸。在这个反应中 NAD 还原成 NADH。用 340nm 光谱测量透光率,从而确定 NADH 的含量。NADH 与半乳糖的量相等。

在既含有半乳糖又含有乳糖的样品中加入  $\beta$ -半乳糖氧化酶可使乳糖分解成葡萄糖和半乳糖。形成的半乳糖如同天然游离半乳糖用 NAD 进行转换。

两次测量的透光率之差与乳糖含量成正比。

### 三、药品

1. 亚铁氰化钾溶液: 将 15g  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  用蒸馏水溶解至 100ml。

2. 硫酸锌溶液: 30g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  用蒸馏水溶解至 100ml。

3. 硫酸, 2mol/L。

4. 氢氧化钠溶液, 0.25mol/L。

5. 缓冲溶液 (注意, 在使用前将缓冲溶液加热至 20~22°C。)

(1) 柠檬酸盐缓冲液, pH6.6: 2.8g 柠檬酸钠 ( $C_6H_5NaO_7 \cdot 2H_2O$ ), 625mg 硫酸镁 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 和 42mg 柠檬酸 ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 溶解于 40ml 蒸馏水中。用几滴硫酸或氢氧化钠溶液调整 pH 值。加蒸馏水至 50ml。在 4°C 时此溶液可保存 3 个月。

(2) 磷酸盐缓冲溶液, pH8.6: 8.3g 焦磷酸

钾 ( $K_4P_2O_7$ ) 溶解于 40ml 蒸馏水中, 用硫酸调整 pH 值。加蒸馏水至 50ml。在 4°C 条件下此溶液可保存 2 个月。

6. NAD 溶液: 35mg 辅酶 I (NAO) 溶解于 7ml 柠檬酸盐缓冲液中。在 4°C 条件下此溶液可保存 3 周。

7.  $\beta$ -半乳糖氧化酶悬浮液: 5mg/ml 酶悬浮液溶解于含 2.2 克分子硫酸铵的溶液中。30U/mg。

8.  $\beta$ -半乳糖脱氢酶悬浮液: 5mg/ml 酶悬浮液溶解于含 2.2 克分子硫酸铵的溶液中。5U/mg。

### 四、仪器和辅助材料

1. 分析天平, 分度值为 0.1mg。

2. 酶解分析法吸移管, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1 ml, 1.92ml 和 2ml。

3. 容量瓶, 100ml。

4. 折叠滤纸, 150mm $\phi$ , 中等过滤速度。

5. 分光光度计, 适合于 340nm 波长的测定。或汞灯滤光光度计, 适合于 334nm 或 365nm 波长的测定。

6. 比色皿, 光径为 10mm。

7. 搅拌棍, 用于搅拌比色皿内的溶液。

8. 三角烧瓶, 100ml。

6. 漏斗。

### 五、操作

1. 取样的多少应使样品中乳糖量不超过 0.1g。测定乳、乳清和融化干酪调制制品时, 称取样品约 10g 装入 100ml 的容量瓶中, 然后用 50ml 蒸馏水混合。如样品为固体或粥糊状, 可先在研钵中用水搅合, 然后再转入到容量瓶内, 同样使加入的水约为 50ml。

2. 分别加入 1ml 亚铁氰化钾溶液和 1ml 硫酸锌溶液, 每次加入后都需用力震动。用氢氧化钠溶液中和(用试纸作指示)。加水至刻度。混匀后经滤纸过滤。透明滤液供酶解测试用。

3. 酶解法测定。空白试验、半乳糖测定和乳糖测定同时进行。按下列步骤将下列溶液加入到比色皿中:

	空白 试验	半乳糖 样 品	乳糖 样 品
NAD溶液(ml)	0.20	0.20	0.20
$\beta$ -半乳糖氧化酶悬浮液(ml)	0.02	—	0.02
滤液(ml)	—	0.10	0.10

混合后静置 15 分钟, 然后加入:

磷酸盐缓冲溶液(ml)	1.00	1.00	1.00
水(ml)	2.00	1.92	1.90

混合后静置 2 分钟, 测定各比色皿溶液的透光率( $E_{1B}$ ,  $E_{1G}$ ,  $E_{1L}$ ), 然后加入:

$\beta$ -半乳糖脱氢酶悬浮液(ml)	0.02	0.02	0.02
------------------------	------	------	------

重新混合。反应停止以后(约 15 分钟)测定透光率( $E_{2B}$ ,  $E_{2G}$ ,  $E_{2L}$ )。如果反应在 15 分钟后还没有达到静止状态, 则需每隔 2 分钟再进行透光率的测定, 直到透光率恒定递升为止。用坐标与曲线可以表示测定结果与时间之间的关系。曲线中直线部位的延长线与反应起始点(加入酶的时刻)的交点则为正确的透光率(图 1)。

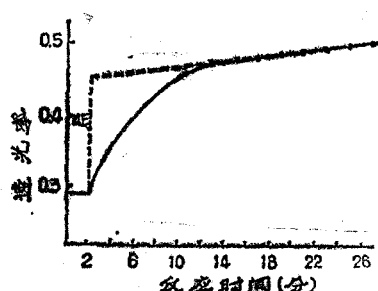


图1 反应时间与透光率的关系

## 六、计算

1. 溶液中半乳糖和乳糖含量的计算。首先由测定结果计算出下列各差值:

$$\text{半乳糖值}, \Delta E_G = (E_{2G} - E_{1G}) - (E_{2B} - E_{1B})$$

$$\text{乳糖值} \Delta E_L = (E_{2L} - E_{1L}) - (E_{2B} - E_{1L}) - \Delta E_G$$

使用下面的通式计算溶液的浓度  $C(g/100ml)$

$$C = \frac{V \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

式中  $V$ ——测试液体积(比色皿内所有溶液的总液体积)(ml)

$MG$ ——用于测定所取样品的克分子量(半乳糖: 180.16, 乳糖: 342.30, 乳糖一分子水合物: 360.31)

$v$ ——所取样品(滤液)的体积(ml)

$d$ ——比色皿光径(cm)

$\epsilon$ ——透光率系数( $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

NAD在 340nm 时,  $\epsilon = 6.3$

在 365nm 时,  $\epsilon = 3.4$

在 334nm 时,  $\epsilon = 6.18$

计算半乳糖时用  $\Delta E_G$ 、计算乳糖时用  $\Delta E_L$  代替公式中的  $\Delta E$ 。

2. 样品内乳糖和半乳糖含量的计算。上一步计算出来的结果只表明 100ml 样品溶液中所含半乳糖或乳糖的克数。它还需按照下面的公式换算成样品内半乳糖或乳糖的含量:

$$W_L = \frac{C \cdot 100}{E}$$

式中  $W_L$ ——样品中半乳糖或乳糖的含量(%)

$E$ ——样品重(g)

$C$ ——样品溶液浓度

在记载测定结果时应注明, 此结果是指乳糖还是乳糖一分子水合物。

3. 正确性的检查。用标准溶液(1 升中含 1 g 乳糖一分子水合物)检验测定结果的正确性是为了确保实验的准确性。取标准溶液 0.1ml 直接进行酶解法测试。测试结果与理论值之间的偏差不得超过 1%。

## 七、重复性

乳糖: 0.1% 半乳糖: 0.05%

## 八、注解

1. 对那些除含有乳糖外还存在来自于添加剂的还原糖的乳制品应用酶解法测定半乳糖或乳糖的含量尤其重要, 比如用于测定融化干酪调制品的测定。

2. 如果样品内半乳糖或乳糖含量很低, 可

以将滤液的用量增加到 1 ml, 同时减少水的用量。

3. 出现差错的主要原因: 吸量不精确 (尤其是在使用活塞吸管时); 比色皿不合适; 比色皿内药品混合不均匀; 酶活性太低 (制剂太旧)。

袁斌译 张学舜 胡蓉校

# 火焰原子吸收光谱法测定乳粉中的锌与铁

黑龙江大学化学系 曾纪铭 魏 薇

通常乳粉中锌与铁的含量较低, 为了增加儿童对锌与铁的摄入量, 目前市售的母乳化乳粉和婴儿乳粉中多加有这两种元素, 测定乳粉中锌的标准方法<sup>[1]</sup>是采用酸消化或高温灰化样品, 用双硫脲分光光度法测定, 该方法十分繁琐费时。近来也有采用干灰化——火焰原子吸收法测定乳粉中锌的报导<sup>[2,3]</sup>, Mingorance<sup>[4]</sup>以石墨炉原子吸收光谱测定了牛奶中的 Cu、Fe、Mn 等元素; Engeni<sup>[5]</sup>采用一种较复杂的预处理操作以火焰原子吸收法测定了乳粉中的铁。尹仲潮<sup>[6]</sup>使用乳化剂 OP 的水溶液将乳粉分散成均匀稳定的乳浊液, 直接喷雾于空气——乙炔火焰中以测定钙, 但该方法需要用氘灯校正背景并使用标准加入法。

我们经过仔细选择, 采用司班 80 与吐温 60 为复合乳化剂。该乳化剂对乳粉的乳化效果好, 乳化液长期稳定, 乳粉中共存的其他离子对测定没有干扰。在我们的实验条件下, 背景吸收很低, 工作曲线与标准加入曲线平行, 乳化液可直接喷入空气——乙炔火焰中以工作曲线法进行测定。本法简单快速, 测定灵敏度锌为  $0.012\mu\text{g}/\text{ml}$   $0.0044\text{A}$ , 铁为  $0.066\mu\text{g}/\text{ml}$   $0.0044\text{A}$ , 比乳粉水溶液的灵敏度提高约 30—40%。检测限 ( $2\sigma$ ) 锌为  $0.0031\mu\text{g}/\text{ml}$ , 铁为  $0.013\mu\text{g}/\text{ml}$ 。回收率在 96—100% 之间, 相对标准偏差 ( $n=10$ ) 在 6% 以内。本法测定结果与干灰化原子吸收光谱法及双硫脲分光光度

法基本一致。

## 实验部分

### 仪器与试剂

AA-670 型原子吸收分光光度计 (日本岛津公司产)

锌、铁空心阴极灯 (日本滨松光电子公司)  
司班 80, 10% 二甲苯溶液  
吐温 60, 10% 水溶液。

### 结果与讨论

#### 1 乳化剂的选择

由于乳粉中含有大量的脂肪、蛋白质及其他有机物, 要使乳粉在水中能均匀地分散, 应加入既亲水又亲油的复合乳化剂来进行乳化, 为了提高乳化液的稳定性及其灵敏度, 还应认真地选择适当的复合乳化剂及其配比。

我们对亲油的司班系列 (3 种) 及亲水的吐温系列 (4 种) 经反复试验, 结果发现: 当 50ml 被测液中, 含有司班 80 与吐温 60 各 1 ml 即其配比为 1:1 时, 比混合乳化液灵敏度最高, 比乳粉水溶液的灵敏度约高 30—40%, 使在乳粉中含量较低的锌与铁可用火焰法直接测定, 并且此乳法液十分稳定, 至少可以稳定两周以上, 使用时只要充分摇匀即可。

#### 2 仪器工作条件的选择

测定锌与铁时, 对影响测定灵敏度的诸因素如灯电流、狭缝宽度、火焰高度及乙炔与空