

pH 滴定三丁酸甘油酯法测
定脂肪酶/酯酶的活性
KLU, KLU(T), LU-G, LU-
MM, LU-CA

(Determination of Lipase/esterase activity
KLU, KLU(T), LU-G, LU-MM, LU-CA, IDT)

前 言

- 本标准与 Novozymes A/S 标准方法：EB-SM-0095.02/01 Determination of Lipase/esterase activity KLU, KLU (T), LU-G, LU-MM, LU-CA (英文版) 的一致性程度为等同。
- 本标准代替 Q/12KF 3568.12-1997。
- 本标准与 Q/12KF 3568.12-1997 的不同之处在于：
 - 本标准按照 GB/T1.1-2000 的要求进行编排。
- 本标准由诺维信（中国）生物技术有限公司提出。
- 本标准由诺维信（中国）生物技术有限公司负责起草。
- 本标准主要起草人：蔺继尚、关越、翟文景。
- 本标准于 1997 年 10 月首次发布，2001 年 08 月第一次修订。
- 本标准所代替标准的历次版本发布情况为：
 - Q/12KF 3568.12-1997。

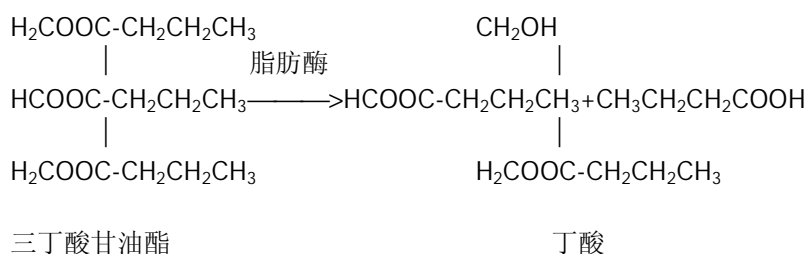
1. 范围

此法为分析开发样品，中间体样品和成品中的脂肪酶/酯酶活性的方法。脂肪酶与其它酶制剂的混合酶中的脂肪酶活力也可用此法分析。蛋白酶、脂肪酶混合酶制剂中的脂肪酶活力分析时需使用第三方标准。

特殊的脂肪酶或成品制剂在样品制备阶段需采用特殊的稳定或提取方法以保证活力的测得。这里不描述这些过程。

2. 原理

此法依据酶在恒定的 pH 下水解三丁酸甘油酯而产生丁酸。通过 pH 滴定，记录中和产生的酸所需的碱量与时间的关系。



反应条件:

温度: 30°C ± 1°C
 pH: 7.00
 底物浓度: 三丁酸甘油酯
 反应时间: 至少 2.0 min

3. 单位定义

1 LU (脂肪酶单位) 是在给定反应条件下每 min 释放 1 μmol 可滴定的三丁酸所需的酶量。

1 KLU = 1 000 LU。

1 LU-T (脂肪酶单位, 第三方标准) 是在给定反应条件下每 min 释放 1 μmol 可滴定的三丁酸所需的酶量。

1 KLU-T = 1000 LU-T。

LU-CA 是假丝酵母脂肪酶单位。

LU-MM 是白霉脂肪酶单位。

4. 专一性和灵敏度

酯酶的存在会使检测的脂肪酶的活力增加; 蛋白酶的存在会使检测的脂肪酶的活力减小 (10-20%), 因此混合酶制剂和 T 型颗粒产品需要用第三方标准进行分析。

标准曲线的最低定量限: 0.2 LU/mL (KLU, LU-CA, LU-MM, LU-G)

对单位 KLU 和 LU-G，液体产品的最低定量限为 0.020 KLU/g；固体产品为 0.055 KLU/g。

对于 1 mL 未稀释样品的分析检测限度为大约 0.05 LU/mL。

洗涤剂对此方法有很大的影响，从活化到完全抑制，根据洗涤剂的品种和它的浓度而定。

实验器皿必须为玻璃制品。

5. 仪器

pH 滴定系统（例如：Radiometer）包括：

- VIT 90 单元
- 滴定单元，ABU91/ABU93
- 耐热移动式搅拌器，TTA 80
- pH 计

匀浆器（如 Silverson）

恒温水浴（30°C）

自动方法使用的仪器有：

- Zymark robotic system
- 分配器（如 Hamilton Microlab M）

6. 试剂

6.1 试剂

NaOH, Titrisol

三丁酸甘油酯, Merck 1958

NaCl, Merck 6404

KH₂PO₄, Merck 4873

阿拉伯胶, Sigma G 9752

苯甲酸钠, Merck 100136

醋酸, Merck 4201

甘油, Merck 104091

电极校正液 pH 7.0, Radiometer 943-112

电极校正液 pH 4.01, Radiometer 943-111

乙醇 96% ,De Danske Spritfabrikker

氮气, AGA

6.2 溶液

6.2.1 1 M NaOH

举例：制备 1000 mL。

Titrisol（1 M NaOH）……………1 包装

去离子水……………加至 1000 mL

贮存期：建议室温 6 个月。

6.2.2 NaOH 0.025 M (滴定剂)

举例：制备 1000 mL:

Titrisol (1M NaOH)25 mL
去离子水.....加至 1000 mL

贮存期：室温下密闭、闭光 30 天。

6.2.3 乳化剂

举例：5000 mL 制备

NaCl89.5 g
KH₂PO₄.....2.05 g
甘油.....2700 mL
阿拉伯胶.....30 g
去离子水.....加至 5000 mL

大约 2000 mL 去离子水倒入 5000 mL 的烧杯中。称量 NaCl 和 KH₂PO₄ 并转入烧杯中。将甘油加入，溶液在充分搅拌下滴入阿拉伯胶。搅拌溶液至完全溶解定量转入 5000 mL 容量瓶中，充分搅拌下用去离子水定容。调节 pH 到 4.45±0.05。

贮存期：建议室温 1 个月。

6.2.4 底物乳剂

举例：1800 mL 制备

三丁酸甘油酯.....90 mL
乳化剂(试剂 6.2.3)..... 300 mL
去离子水1410 mL

使用前匀浆处理 3 min 并调节 pH 到 4.75±0.05。实验前搅拌 30 min。

贮存期：建议室温 24 hr。

6.2.5 甘氨酸缓冲剂 1M

举例：制备 10 L

甘氨酸.....750.7 g
氢氧化钠片.....约 38 g
去离子水.....加至 10 L

贮存期：建议室温 1 个月。

6.2.6 甘氨酸缓冲液 0.1 M

举例：制备 10 L

甘氨酸缓冲液（6.2.5）……………1000 mL

去离子水……………加至 10 L

调节 pH 到 10.8 ± 0.05 。

贮存期：建议室温 1 个月。

6.2.7 甘氨酸缓冲液 0.01 M

举例：制备 10 L

甘氨酸缓冲液（6.2.5）……………100 mL

去离子水……………加至 10 L

调节 pH 到 10.8 ± 0.05 。

贮存期：建议室温 1 个月。

7. 样品和标准**7.1 样品**

不同的样品需做不同的预处理。

KLU、KLU-T 和 LU-G 分析的样品的第一遍稀释用 0.1 M 甘氨酸缓冲液（6.1.1），第二遍用水稀释且最小的稀释比为 1:25。

LU-CA 的样品仅用水稀释。LU-MM 样品仅用 0.01M 甘氨酸缓冲液（6.1.1）稀释。且此两项分析的稀释样在实验前都需将 pH 调到 7。

包含蛋白酶的样品在稀释后仅可使用 1 hr。除此以外的稀释液均可使用 1 天。

KLU、LU-CA、LU-MM 和 LU-G 的样品按预期活性称重，使其最终稀释液的浓度约为 2.5 LU/mL；KLU-T 的样品按预期活性称重，使其最终稀释液的浓度约为 2.0 LU/mL。

7.2 KLU、KLU-T 和 LU 的样品分析次数

按文件 EB-SP-0598 执行。

7.3 标准**7.3.1 脂肪酶标准曲线的配制（KLU，LU-CA，LU-MM，LU-G）**

称取 0.5 g 的脂肪酶标准品 24-1199（标识活性 97.3 KLU/g），用 0.1M 甘氨酸缓冲液稀释溶解，在用去离子水 1: 50 做二遍稀释。次液为标准储备液。标准工作液

的配制见下表:

标准点.	LU/mL	mL of 二次稀释	水
1	0.2	1.0	定容至 100 mL
2	0.5	2.5	定容至 100 mL
3	1.0	5.0	定容至 100 mL
4	2.0	10	定容至 100 mL
5	3.0	15	定容至 100 mL
6	4.0	20	定容至 100 mL

贮存期: 室温 24 hr。

7.3.2 脂肪酶与蛋白酶混合标准品的配制

脂肪酶与蛋白酶的混合酶制剂的样品需采用第三方标准品。

第三方标准品的配制是选用脂肪酶的标准品与蛋白酶的水平控制品标准品混合而成。

称取 0.5 g 的脂肪酶标准品 24-1199 (标识活性 97.3 KLU/g); 称取 2.0 g 的蛋白酶水平控制品 PB82643/3 (标识活性 5.21KNPU (S) /g)。将所称取的酶用 60 mL 的 0.1 M 甘氨酸缓冲液稀释溶解, 在用去离子水 1:500 做二遍稀释。最终溶液的酶浓度为 2.0 LU/mL, 0.00035 KNPU (S) /mL。

上述混合标准品只能在稀释后 1 hr 内使用。

7.4 标准对照 (KLU, KLU-T, LU)

用已只活性的样品做标准对照品。

贮存期: 室温 24 hr。

8. 试验步骤

8.1 系统准备

校正电极, 使其灵敏度在 95%-102%之间。

利用水浴将系统温度维持在 30°C。

8.2 分析

反应体系用氮气包围以防止 CO₂ 的干扰。

加 15 mL 的底物到滴定杯中。加 1 mL 的样品稀释液到滴定杯中。按下开关, 仪器自动开始滴定, 滴定结束后仪器会自动计算结果。

9. 计算

9.1 KLU、LU-CA、LU-MM 和 LU-G 的结果

作标准曲线, X 轴为标准品酶活性, Y 轴为相应的滴定反应的

平均斜率。样品的酶活从标准曲线中读出，样品的活性计算如下：

$$\text{酶活 (KLU/g)} = \frac{C \cdot \text{flask} \cdot \text{dillution}}{\text{weight (g)} \cdot 1000}$$

其中：

C —— 稀释样品在标准曲线上读出的酶活（LU/mL）

flask —— 所用的容量瓶体积

dilution —— 第二次稀释的倍数（稀释系数）

weight —— 样品重量（g）

9.2 KLU-T 的结果

KLU-T 的结果计算如下：

$$\text{标准品的活性} = F_{st} = \frac{\text{总的稀释倍数} \cdot 0.025 \cdot 1000 \cdot M}{\text{称重}}$$

$$\text{试剂因子} = F = \frac{\text{标准品标识活性}}{F_{st}}$$

$$\text{样品的活性} = A = \frac{\text{总的稀释倍数} \cdot 0.025 \cdot 1000 \cdot M}{\text{称重}}$$

M = 滴定反应的平均斜率 mL/min

9.3 结果的确认条件

—— 水平控制品的偏差 < 5%。

—— KLU, LU-CA, LU-MM 和 LU-G 的实验：

标准点 1 < 0.02 mL/min ；

标准点 6 0.14-0.18 mL/min 。且曲线的 R2 ≥ 0.99。

KLU-T 的实验：

1.0 < F < 1.2 。

—— 对所有样品：

活性 > 10 KLU/g , CV% < 5% ；

活性 < 10 KLU/g , CV% < 10%。

9.4 结果的表示方法

KLU-T 和 LU: ≥ 10 KLU/g 三位有效数字；
< 10 KLU/g 两位有效数字。

10. 精确度和准确度

本实验的精确度在 92%-107% 之间。

标准曲线的重复性为 3.2%（KLU-T 为 2.6%）。

标准曲线的重现性为 3.9% (KLU-T 为 4.9%)。

11. 参考文献

- 1.Current version of EB-SP-0598: Sample types
- 2.Statistical Analysis of Intercalibration on Lipolase, Savinase, and Termamyl. By KIJO 19990603.
- 3.Afskaffelse af titrantcheck for enzym aktivitetets metoder med standardkurver, JSvK Luna No. 2000-01218-01 (in Danish)
- 4.Statistical Analysis of Data from N2-experiments,JFri, April 28 2000
- 5.Validation report

12. 存档

按本地 SOP 要求存档。

13. 意外情况

任何与本 SOP 不符的情况都应与负责该方法的化学工程师或 QA (GLP) 联系。。

Novozymes China Headquarters
14 Xinxi Lu,
Shangdi Zone,
Haidian Dist.,
Beijing
100085
P.R. China

诺维信中国总部
北京市海淀区上地信息路 14 号
邮编: 100085

Tel. +86 10 6298 7888
Fax +86 10 6298 1281
www.novozymes.com.cn

Novozymes A/S
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Tel. +45 8824 9999
Fax +45 8824 9998
info@novozymes.com
www.novozymes.com

有关法律、法规和第三方权利可能禁止客户以某种方式进口、加工、应用和/或转售某些产品。客户有责任在具体使用诺维信产品时，做到不违反相关的法律和法规，而且不侵犯专利权或其它第三方权利。
本文档内容如有更改，恕不另行通知。