植物学通报 2001，18（4）：505～508
Chinese Bulletin of Botany

研究简报

用 Warburg 法测定蜂花粉中过氧化氢酶活性

[1]潘建国 [1]王开发 [2]郑尧隆 [2]刘远红

[1]（同济大学花粉应用研究中心 上海 200092）
[2]（广州市蜂产品研究所 广州 510403）

摘要 在国内首次利用经典的、国际上通用的仪器——Warburg 呼吸计测定蜂花粉中过氧化氢酶活性。该方法具有较好的精确度、重现性，变异系数小，建议可作为花粉中过氧化氢酶活性测定的法定方法。

关键词 蜂花粉，过氧化氢酶，活性，Warburg 呼吸计

Measurement of Catalase Activity in Bee Pollen by Warburg's Method

[1]PAN Jian-Guo [1]WANG Kai-Fa [2]ZHENG Yao-Long [2]LIU Yuan-Hong

[1]（*Pollen Research Center*, *Tongji University*, Shanghai 200092）
[2]（*Guangzhou Bee Products Institute*, Guangzhou 510403）

Abstract Warburg's method for measuring the catalase activity of bee pollen proved to bh much better than the old method, with improved accuracy, repeatability and reduced coefficient of variation.

Key words Bee pollen, Catalase activity, Warburg respirometer

花粉是有花植物的繁殖细胞，国际上被誉为完全营养食品（perfect food）。花粉除了含有糖、蛋白质、氨基酸、维生素等营养素外，还含有多种生物活性酶。据不完全统计，花粉含有 90 余种生物酶。这些具有生物活性的酶类，在抗衰防老和恢复青春的活力方面有重要意义。

蜂花粉在收集、干燥、储存和加工过程中，如处理不当，其所含的酶类及其它成分可被破坏，营养价值将大大下降，因此，评定花粉的质量，酶活性是一个重要的指标。因而，探索一种较精确、简便的测定过氧化氢酶活性的方法显得非常必要。以前的测定方法，如任玉翠（1980）的测定方法重复性差，而 GB/T11758-89 中过氧化氢酶的测定方法所用的仪器没有通过国家计量认证，且又难以购买，实际上此标准颁布多年几乎没有什么单位用此方法进行测定。为此，我们利用经典的仪器——Warburg 呼吸计进行探讨。该方法设备要求较合适、操作容易，重现性和变异系数均令人满意。

1 仪器和试剂

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-087

1.1 仪器 Warburg 呼吸计，柱上每小格为 1 mm 微量呼吸检压仪 SKW-3 由上海科技大

① 收稿日期：2000-06-20 接受日期：2000-11-05 责任编辑：姜联合

学研制;电子天平。

1.2 试剂 5%的过氧化氢;pH 6.9 的磷酸盐缓冲液:1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 55.4 mL 和 1/15 mol/L 磷酸二氢钾 44.6 mL 混合,摇匀;Brodie 溶液的配置:取 23 g NaCl,牛胆酸钠(Sodium Taurocholxate)5 g 溶于 500 ml 水中,另加伊文思蓝(Evans blue)少许使溶液着色。该溶液比重为 1.033,柱高 10 000 时的压力等于 1 个大气压。

2 材料与方法

2.1 材料

“宝生园”牌蜂花粉,广州市宝生园蜂产品厂出品。

2.2 方法

2.2.1 原理 在固定体积并保持一定温度的密闭系统中,过氧化氢酶在特定反应条件 pH 6.9、温度 37 ℃及底物浓度下反应,根据 Boyle 定理和 Henry 定理,可以从此系统中气体压力上的变化测定并计算出系统内氧气体积的变化,从而计算出蜂花粉中过氧化氢酶的活力。

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} 2H_2O + O_2\uparrow$$

2.2.2 操作步骤

2.2.2.1 在电子天平上称取“宝生园”牌蜂花粉 1.5 g,加入一定量的 pH 6.9 的 1/15 mol/L磷酸盐缓冲液,搅拌均匀,定容为 100 mL。

2.2.2.2 启动微量呼吸检压仪,调节水温 37 ℃,并进行恒温设定。

2.2.2.3 取两个反应瓶,一个用移液管吸取 2 mL 的花粉悬浮液注入到反应瓶内(注意:不要注到中央小井中),再用 1 mL 的移液管吸取 1 mL 的 5%的过氧化氢溶液注入反应侧管内;另一个反应瓶内注入 3 mL 的磷酸盐缓冲液,用之来当空白对照。

2.2.2.4 连接好压力计和反应瓶,将上述 2 支 Warburg 呼吸计放到恒温水浴支架上,使反应瓶浸入水中,启动振荡开关,保持 15 min,使反应瓶内的气体和溶液与水浴温度平衡达到 37 ℃。

2.2.2.5 停止振荡,将压力计右边的 brodie 液面调节至零点(150 mm 处),并记录左边 brodie 液面高度。

2.2.2.6 立即将反应瓶侧管内的 5%的过氧化氢液倒入反应瓶内,关闭三通活塞,开始计时,反应 3 min 后,停止振荡,将右边的 brodie 液调至零点,记录左边的 brodie 液面高度。

2.2.2.7 重新按上述方法测定 2 次,记录反应液面高度。

2.2.2.8 测定完毕,打开三通活塞,关闭微量呼吸检压仪的电源开关,将压力计移至压力计支架上,取下反应瓶,清洗干净。

2.2.3 计算公式

a. $$V = \frac{V_1 \times 273/T - V_2}{P_0} \times \frac{T}{273} \times H = K \times H$$

https://www.scienceone.com/doi/10.3724/CBB-t20-087

式中:

V　为实验中所变化的气体在温度 T 反应条件下的体积，以微升（μL）表示

V_1　为反应瓶中气体体积（包括压力计的连接侧管至 150 mm 处）

V_2　为反应瓶中的液体体积（包括花粉悬浮液和过氧化氢液）

H　为压力计读数，以 mm 表示之

P_0　为标准压力，即 760 mm 水银柱（如以 Brodie 溶液表示，则 P = 10000 mm）

K　为反应系数。即上述公式中除 H 外的其它值之间的比值（因为每支 Warburg 呼吸计都有独自配套，因此各支 Warburg 呼吸计的反应系数不一定相同，如果实验中反应瓶的 V_1、V_2、T 保持不变时 K 为一常数。K 值测定方法见（植物生理学实验手册第 17 章，1985）

273　为标况下的温度，以绝对温度表示

T　为水槽的温度，以绝对温度表示

b.
$$n = \frac{V \times 1268}{W \times 3 \times 1000}$$

式中：

n：酶活性单位，以 μg O_2/g.min.分表示。

V：为 a 式中反应后系统中所产生的氧气的气体体积，以 μL 表示。

W：参与反应的蜂花粉的重量，以 g 来表示。

3：为反应时间 3 min。

1268：为 37 ℃下 1 mL 氧气的重量（μg）。

3　结果与讨论

3.1　结果

用 Warburg 方法测定花粉过氧化氢酶活性（两个重复）结果如表 1

表 1　花粉中过氧化氢酶的活性
Table 1　The activity of catalase in pollen

样品号	反应系数 K	压力计压力差（mm）			酶活力（ug O_2/g·min）		
		1	2	3	1	2	3
1	1.3260	103	97	103	1924	1812	1924
2	1.2701	107	110	107	1915	1968	1915
3	1.2524	106	105	107	1870	1853	1888

将上述的测定数据进行变异系数的计算得：

$X_{均} = 1897$，S = 46.26，C.V = 2.4%

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-087

为了与传统方法（任玉翠，1989）进行比较，用同一花粉进行了测定，结果如表 2。

表 2 用气量法(任玉翠,1989)测定同一花粉实验结果
Table 2 The experiment result of measuring the same pollen by Warburg's method

项目 \ 测定次数	1	2	3	4	5
酶活性, $\mu g\ O_2/g \cdot min$	1024	904	1786	895	1679
平均值 X			1258		
方差 S			195.9		
变异系数 C.V			15.57		

3.2 讨论

本方法因为过氧化氢酶具有极强的特异性——它仅能作用于过氧化氢,在适宜的 pH6.8 ~ 7.0 条件下,根据在单位时间内释放的氧气量就能够判断酶的活性,用该方法测定的重现很好。

由于过氧化氢酶对温度比较敏感,用 Warburg 呼吸计测定酶活性时,温度采用接触恒温温度计进行控温,从而使得温差波动范围为 ± 0.1 ℃,所以该测定系统的恒温控制非常合理。这是以往的方法所没有的。另外,此方法还具有微量和进行多组测定的特点。

采用本方法测定蜂花粉中过氧化氢酶的活性,变异系数为 2.4%,比按任玉翠等采用的气量法测定的变异系数 15.57% 要小得多,因此该方法具有较好的精密度。本方法测定的数据的重现性效果较好,而用气量法测定的数据的重现性效果差。本方法的灵敏度较高,只要压力计上有 1 mm 的 Brodie 水柱变化就可以进行测定,所以必须要求样品的称量以及量取都要求必须十分精确。

由于该反应过程必须不停的摇动,摇得快慢对放出的氧气的影响较大,本方法在反应过程中采用了微量活性检压仪的振荡功能,用机械地有规律的振荡克服了任玉翠等以前检测花粉中过氧化氢酶活性的方法中手动摇动等缺点,进而使反应的变异系数得以降低,使该方法的精密度得以提高。由于无法买到 GB/T11758-89 标准规定的仪器,因此本试验结果与标准中的 XU-HU 型气量法花粉活性检测仪所据仪器测定原理与任玉翠等一致,因此可以认为再无比较的价值。

由此可以初步认为,此方法具备了作为花粉中过氧化氢酶活性测定的法定方法的可能性。并为在其它食品中检测此酶提供了一种新的思路。

参 考 文 献

任玉翠,1989. 蜂花粉中过氧化氢酶活性的测定方法. 食品科技, 5:53 ~ 54
植物生理学实验手册第 17 章, 1985. 微量定积检压技术. 上海:上海科技出版社,PP526 ~ 536

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-087