



中华人民共和国国家标准

GB/T 23527.2—××××

代替 GB/T 23535—2009

酶制剂质量要求 第2部分：脂肪酶制剂

Quality requirements for enzyme preparations—Part 2: Lipase preparations

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

本文件是 GB/T 23527《酶制剂质量要求》的第 2 部分。GB/T 23527 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：蛋白酶制剂；
- 第 2 部分：脂肪酶制剂；
- 第 3 部分：淀粉酶制剂；
- 第 4 部分：固定化葡萄糖异构酶制剂。

本文件代替 GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》，与 GB/T 23535—2009 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了术语“脂肪酶制剂”的定义(见 3.2)，更改了“脂肪酶活力”的定义(见 3.3,2009 年版的 3.2)；
- b) 更改了“产品分类”的内容(见第 4 章,2009 年版的第 4 章)；
- c) 更改了理化要求中的“酶活力”要求(见表 2,2009 年版的表 1)，增加了理化要求“细度”指标(见表 2)；删除了“卫生要求”(见 2009 年版的 5.3)；
- d) 更改了酶活力与和干燥失重的试验方法(见 6.3、6.4,2009 年版的 6.2、6.3)，增加了细度的试验方法(见 6.5)；
- e) 更改了出厂检验、型式检验及判定规则的内容(见 7.3~7.5,2009 年版的 7.3、7.4)；
- f) 更改了标志、包装、运输和贮存的内容(见第 8 章,2009 年版的第 8 章)；
- g) 删除了“保质期”(见 2009 年版的第 9 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64)提出并归口。

本文件起草单位：青岛蔚蓝生物集团有限公司、山东隆科特酶制剂有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、诺维信(中国)投资有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、中国生物发酵产业协会、英联酶制剂贸易(上海)有限公司、天野酶制剂(江苏)有限公司上海分公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、广州焙乐道食品有限公司、湖南鸿鹰生物科技有限公司、帝斯曼(中国)有限公司北京分公司、白银赛诺生物科技有限公司、安琪酶制剂(宜昌)有限公司、浙江华康药业股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、南宁庞博生物工程有限公司、山东省药学院、北京工商大学、郑州香雪儿食品有限公司、中山洪力健康食品产业研究院有限公司、中山市南方新元食品生物工程有限公司、中国海洋大学、福建师范大学、华南理工大学。

本文件主要起草人：陈楠楠、邵静、郭庆文、张峻炎、徐丽、王晋、裴静、王友谊、沈涛、高铁成、黄石桥、杜建华、俞峰、平磊、徐菁菁、黄志明、刘汉灵、刘飞、王彦波、李培育、胡志高、刘高峰、黄建忠、王永华、徐晓东、张杰、孟浩、王金凤、周樱、王洁、袁琳、李康乐、童远洋、易鸣、李晓毅、刘校函、邓娟娟、胡昌辉、王校冬、张秀华、曾冀、徐胜华、郑萍、田天娥。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2009 年首次发布为 GB/T 23535—2009；
- 本次为第一次修订。

引 言

随着酶制剂工业的迅速发展,酶制剂种类向多元化发展,产品质量得到提升,产品品种得以丰富,行业技术有了长足的进步与发展。制定 GB/T 23527《酶制剂质量要求》,是对酶制剂的产品质量和检测方法的规范化和标准化,是规范酶制剂及相关产品行业秩序、促进产业发展的基础性工作。

GB/T 23527《酶制剂质量要求》拟由四个部分构成:

- 第 1 部分:蛋白酶制剂。目的在于提升蛋白酶制剂行业的产品质量。
- 第 2 部分:脂肪酶制剂。目的在于提升脂肪酶制剂行业的产品质量。
- 第 3 部分:淀粉酶制剂。目的在于提升淀粉酶制剂行业的产品质量。
- 第 4 部分:固定化葡萄糖异构酶制剂。目的在于提升固定化葡萄糖异构酶制剂行业的产品质量。

随着脂肪酶制剂行业产品创新发展,根据行业调研和产品征集,结合国内外检测方法的进展,以及产业发展需要,在本次修订中,修订完善了 GB/T 23535—2009 版酶活力测定方法和测定条件。

酶制剂质量要求 第2部分:脂肪酶制剂

1 范围

本文件给出了脂肪酶制剂的产品分类,规定了技术要求、检验规则、标志、包装、运输和贮存,并描述了相应的试验方法。

本文件适用于微生物发酵生产的脂肪酶制剂产品的生产、检验和销售。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB/T 191 包装储运图示标志
- GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
- GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
- GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- QB/T 1803—2023 工业酶制剂通用试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脂肪酶 lipase

能水解甘油三酯(含天然油脂)或脂肪酸酯产生单或双甘油酯或甘油和游离脂肪酸,在特定条件下也能催化酯合成和酯交换反应的酶。

3.2

脂肪酶制剂 lipase preparations

以脂肪酶为主要催化活性组分,通过制剂等工艺制得的产品。

注:制剂工艺中能加入有助于产品贮存、稳定和使用的辅料。

3.3

脂肪酶活力 lipase activity

脂肪酶制剂的酶活力 activity of lipase preparations

1 g 固体脂肪酶制剂(或 1 mL 液体脂肪酶制剂)含有的酶活力单位。

注 1:以 U/g(或 U/mL)表示。

注 2:在一定温度和 pH 条件下,脂肪酶每分钟水解底物产生 1 μmol 的可滴定的脂肪酸,即为脂肪酶 1 个酶活力单位(以 U 表示)。也能根据所采用的酶活力测定方法,另行约定相应的酶活力单位。

4 产品分类

4.1 按产品的应用领域

食品工业用和其他工业用脂肪酶制剂。

4.2 按产品的形态

固体剂型(含粉末剂型、颗粒剂型和固定化剂型)和液体剂型脂肪酶制剂。

5 要求

5.1 感官要求

应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	固体剂型	液体剂型
状态	粉末或颗粒,无结块、无潮解现象	液体,允许有少量凝聚物
色泽	白色至黄褐色,色泽均一	浅黄色至棕褐色,色泽均一
气味	无异味,有本品特有的发酵气味	

5.2 理化要求

应符合表 2 的规定。

表 2 理化要求

项目	固体剂型	液体剂型
酶活力 ^a /(U/g 或 U/mL)	符合声称	
干燥失重 ^b /%	≤ 8.0	—
细度(通过网孔尺寸 0.40 mm 的试验筛) ^c /%	≥ 90	—
^a 可按供需双方合同规定的酶活力规格执行,提供相应的测定方法条件。 ^b 不适用于固定化剂型产品。 ^c 不适用于颗粒产品。		

6 试验方法

6.1 一般要求

本文件所用试剂和水,在未注明其他要求时,均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的三级水。试验中所用标准滴定溶液、制剂及制品,在没有注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

6.2 感官要求

取适量样品,置于清洁、干燥的白瓷盘中,在自然光线下,观察其色泽和状态,并嗅其气味。

6.3 酶活力

根据底物适应性,测定水解橄榄油底物的酶活力时,按附录 A 进行检测;测定水解三丁酸甘油酯底物的酶活力时,可参考附录 B。也可根据实际需求采用其他方法进行检测。

6.4 干燥失重

按 QB/T 1803—2023 中干燥失重的试验方法执行。

6.5 细度

按 QB/T 1803—2023 中细(粒)度的试验方法执行,标准试验筛为网孔尺寸 0.40 mm 的试验金属丝编织网筛。

注:SSW 0.40/0.250 mm,相当于 39 目。

7 检验规则

7.1 批次

同原料、同配方、同工艺、同生产线连续生产的,同规格的产品为一批。

7.2 抽样

抽样的样本量可按表 3 执行,或由生产企业和(或)相关方确定。批取样量应不小于 300 g(或 300 mL),不足者按照比例适当加取。混合均匀后检验。

表 3 抽样的样本量

批量范围/最小外包装单位	抽样的样本量/最小外包装单位	每个样本抽取单位包装数
≤50	2	1
51~500(含)	3	1
>500	4	1

注:批量范围是指批中所包含的最小外包装单位数量。抽样的样本量是指抽取样本的最小外包装单位数量。

7.3 出厂检验

7.3.1 产品出厂前,应由生产厂的质检部门负责按本文件规定逐批进行检验。检验符合本文件后方可出厂。

7.3.2 检验项目如下:

- 固体剂型:感官要求、酶活力、干燥失重、细度;
- 液体剂型:感官要求、酶活力。

7.4 型式检验

检验项目为本文件中全部要求项目。一般情况下,同一类产品的型式检验每年至少进行一次,有下

列情况之一,也应进行型式检验:

- a) 原辅材料有较大变化时;
- b) 更改关键工艺或设备时;
- c) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月后,重新恢复生产时;
- d) 出厂检验与上次型式检验结果有较大差异时;
- e) 国家监督机构按有关规定需要抽检时。

7.5 判定规则

7.5.1 抽取样品经检验,所检项目全部符合要求,判该批产品符合本文件。

7.5.2 检验结果如有两项以上指标不符合要求,判定该批产品不符合本文件。如有 1 项~2 项不符合要求,应重新自同批产品中抽取样本量的 2 倍进行复检,以复检结果为准。若仍有 1 项不符合要求,判定该批产品不符合本文件。

7.5.3 当供需双方对检验结果有异议时,可由双方协商解决,或委托有关单位进行仲裁检验,以仲裁检验结果为准。

8 标志、包装、运输和贮存

8.1 标志

8.1.1 销售包装使用标签时,应标注产品类型和酶活力。

8.1.2 包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的要求。

8.2 包装

包装容器应整洁、无破损。

8.3 运输

运输工具应清洁卫生。不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混装、混运,避免受潮、受压、暴晒。装卸时,应轻拿轻放,不应直接钩扎包装。

8.4 贮存

应贮存在通风、干燥、清洁的环境中,不应日晒雨淋,远离火种。不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混存。

附录 A

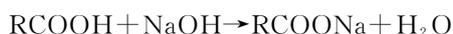
(规范性)

脂肪酶制剂活力的测定 滴定法

A.1 原理

脂肪酶在一定条件下,能使甘油三酯水解成脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯和甘油,所释放的脂肪酸可用标准碱溶液进行中和滴定,用 pH 计指示反应终点,根据消耗的碱量,计算其酶活力。

反应式为:



A.2 试剂和材料

A.2.1 聚乙烯醇:聚合度 1 750±50。

A.2.2 橄榄油:试验试剂。

A.2.3 无水乙醇。

A.2.4 磷酸二氢钾。

A.2.5 十二水磷酸氢二钠。

A.2.6 氢氧化钠。

A.3 溶液配制

A.3.1 聚乙烯醇溶液(4%):称取聚乙烯醇(A.2.1)40 g(精确至 0.1g),加水 800 mL,在沸水浴中加热,搅拌,直至全部溶解,冷却定容至 1 000 mL。

注:根据乳化效果和溶解情况,也能选择使用 2%的聚乙烯醇溶液。

A.3.2 底物溶液:称量聚乙烯醇溶液(A.3.1)150 g,加橄榄油(A.2.2)50 g,用高速匀浆机 10 000 r/min 处理 6 min(分 2 次处理,间隔 5 min,每次处理 3 min),水浴控制温度,处理过程中温度维持在 60 °C,处理结束后常温下磁力搅拌 20 min。底物溶液显微镜观察应有 80%以上的液滴直径小于或等于 3 μm。该溶液现配现用。

注:也能选其他转速,并根据乳化效果延长或缩短均质时间。

A.3.3 磷酸缓冲溶液(pH=7.5):分别称取磷酸二氢钾(A.2.4)1.96 g 和十二水磷酸氢二钠(A.2.5)39.62 g,用水溶解并定容至 500 mL。如需要,调节溶液的 pH 至 7.5±0.05。

A.3.4 氢氧化钠标准溶液[$c(\text{NaOH})=0.05 \text{ mol/L}$]:按 GB/T 601 的规定配制与标定 0.5 mol/L 氢氧化钠标准滴定溶液。使用时,准确稀释 10 倍。

注:也能采用商品化的氢氧化钠标准溶液。

A.3.5 乙醇溶液(95%,体积分数)。

A.3.6 酚酞指示液(10 g/L):按 GB/T 603 的规定配制。

A.4 仪器和设备

A.4.1 磁力搅拌水浴锅:±0.2 °C。

A.4.2 电子天平:感量 0.1 mg。

A.4.3 移液器。

A.4.4 酸度计:精度±0.01。

A.4.5 秒表。

A.4.6 高速匀浆机。

A.4.7 电位滴定仪。

A.4.8 光学显微镜。

A.4.9 微量滴定管:10 mL,分刻度≤0.05 mL。

A.5 分析步骤

A.5.1 样品前处理

称取酶样品 1.00 g(精确至 0.1 mg)或 1.0 mL,加入适量磷酸缓冲溶液(A.3.3)磁力搅拌溶解 15 min 并稀释,稀释酶液采用玻璃器皿,测定时控制酶液浓度,样品与对照消耗碱量之差控制在 1.0 mL~2.0 mL 范围内,吸取样品时,应将酶液摇匀后再取。

注:酶会附着在塑料上,因此用玻璃器皿溶解稀释和滴定。使用塑料枪头短时间转移的情况除外。

A.5.2 测定

A.5.2.1 电位滴定法(仲裁法)

按电位滴定仪使用说明书对仪器进行校正(若使用酸度计进行试验,则按照酸度计说明书对酸度计进行校正)。

取 4 个 100 mL 烧杯,于空白杯(A)和样品杯(B1、B2、B3)中各加入 4.0 mL 底物溶液(A.3.2),5.0 mL 磷酸缓冲溶液(A.3.3),再于 A 杯中加入 15.00 mL 95%乙醇溶液(A.3.5)。40℃±0.2℃水浴中磁力搅拌预热 5 min,然后于空白杯(A)和样品杯(B1、B2、B3)中各加 1.00 mL 待测酶液,准确反应 15 min 后,于样品杯(B1、B2、B3)中立即补加 15.00 mL 95%乙醇溶液(A.3.5)终止反应。

在每个烧杯中加 25 mL 蒸馏水,置于电位滴定仪上(若使用酸度计,则将酸度计电极放入烧杯中),边搅拌,边用氢氧化钠标准溶液(A.3.4)滴定,直至 pH 10.3 为滴定终点,记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。

注:对于某些脂肪酶样品加入 25 mL 蒸馏水影响酶活检测结果,此类样品在终止反应后直接进行氢氧化钠标准溶液滴定。

A.5.2.2 指示剂滴定法

取 2 个 100 mL 锥形瓶,分别于空白瓶(A)和样品瓶(B)中各加入底物溶液(A.3.2)4.00 mL 和磷酸缓冲液(A.3.3)5.00 mL,再于 A 瓶中加入 95%乙醇溶液(A.3.5)15.00 mL,于 40℃±0.2℃水浴中预热 5 min,然后于空白瓶(A)、样品瓶(B)中各加待测酶液 1.00 mL,立即混匀计时,准确反应 15 min 后,于样品瓶(B)中立即补加 95%乙醇溶液(A.3.5)15.0 mL 终止反应,取出。

于空白和样品溶液中各加酚酞指示液(A.3.6)两滴,用氢氧化钠标准溶液(A.3.4)滴定,直至微红色并保持 30 s 不褪色为滴定终点,记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。

A.6 计算

脂肪酶制剂的酶活力按公式(A.1)计算:

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 50 \times n_1}{0.05 \times 15} \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

X_1 ——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克或酶活力单位每毫升(U/g 或 U/mL);

V_1 ——滴定样品溶液时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——滴定空白溶液时消耗氢氧化钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

- c —— 氢氧化钠标准溶液浓度,单位为摩尔每升(mol/L);
50 —— 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 1.00 mL 相当于脂肪酸 50 μmol ;
 n_1 —— 样品的稀释倍数;
0.05 —— 氢氧化钠标准溶液浓度换算系数;
15 —— 反应时间 15 min。

A.7 结果表示

所得结果表示至整数。

A.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值应不超过算术平均值的 10%。

附录 B

(资料性)

脂肪酶制剂活力的测定 动态滴定法

B.1 方法信息

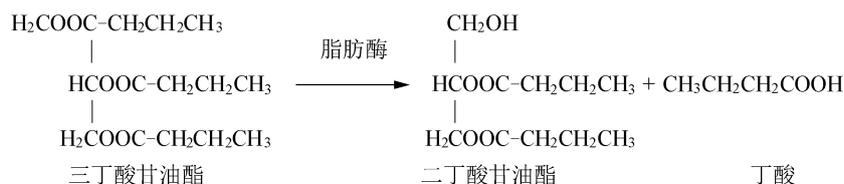
B.1.1 原理

脂肪酶水解甘油三酯生成脂肪酸,使反应体系的 pH 下降。通过连续加入碱的方法保持反应体系的 pH 恒定。碱滴定的速率与酶活力成比例。酯酶的存在会使检测的脂肪酶的活力增加。蛋白酶的存在降解脂肪酶,从而使检测到的脂肪酶的活力减小。

注:洗涤剂的存在会严重影响本方法。依不同洗涤剂的类型和浓度不同,这种影响表现为从完全抑制到激活。酶会附着在塑料上,因此用玻璃器皿溶解稀释和滴定,使用塑料枪头短时间转移的情况除外。

B.1.2 反应式

反应式为:



B.1.3 反应条件

反应条件如下:

- 温度:30 °C ± 1 °C;
- pH:7.00;
- 底物浓度:0.16 mol/L 的三丁酸甘油酯;
- 反应时间:至少 1.5 min(只有线性反应区用于计算斜率)。

B.1.4 分析范围

样品的分析范围为 0.2 U/mL~4.0 U/mL。如果可能,所有样品在 1.5 U/mL~4.0 U/mL 的范围内被分析。

B.1.5 检测限

对于液体样品,检测限为 20 U/g,相当于 2.5 g 样品溶解在 10 mL 溶液中,然后再稀释 25 倍。对于固体样品,检测限为 50 U/g,相当于 1.0 g 样品溶解在 10 mL 溶液中,然后再稀释 25 倍。

B.2 仪器和设备

B.2.1 动态滴定(pH-stat)功能的滴定仪。

B.2.2 乳化器。

B.2.3 恒温水浴;精度±0.2 °C。

B.2.4 温度计;精度±0.2 °C。

B.2.5 自动移液器。

B.3 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

B.3.1 三丁酸甘油酯($C_{15}H_{26}O_6$)。

B.3.2 氯化钠(NaCl)。

B.3.3 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

B.3.4 阿拉伯胶。

B.3.5 甘氨酸(H_2NCH_2COOH)。

B.3.6 甘油 [$HOCH_2CH(OH)CH_2OH$]。

B.3.7 氢氧化钠片剂(NaOH)。

B.3.8 电极校正液(pH 7.0)。

B.3.9 电极校正液(pH 4.01)。

B.3.10 乙醇溶液(96%,体积分数)。

B.3.11 氮气(N_2)。

B.3.12 氢氧化钠溶液 [$c(NaOH) = 1 \text{ mol/L}$]:按照 GB/T 601 的规定配制。

B.3.13 氢氧化钠滴定液 [$c(NaOH) = 0.025 \text{ mol/L}$]:取氢氧化钠溶液(B.3.12)25 mL,用水稀释并定容至 1 000 mL。配好后需用适宜的设备脱气。

B.3.14 氢氧化钠滴定液 [$c(NaOH) = 0.005 \text{ mol/L}$]:取氢氧化钠滴定液(B.3.13)25 mL,用水稀释并定容至 5 000 mL。

B.3.15 乳化剂:移取约 180 mL 去离子水于 500 mL 烧杯中,加入搅拌子高速搅拌,再缓慢加入 30.0 g 阿拉伯胶,继续搅拌至全部溶解。另取 500 mL 烧杯,加入 53.7 g 氯化钠和 1.20 g 磷酸二氢钾,再加入 350 mL 水充分溶解。将 1 620 mL 甘油置于 3 L 容量瓶中,再依次加入上述氯化钠—磷酸二氢钾溶液和阿拉伯胶溶液,最后以水定容并混匀。

B.3.16 底物乳剂:称取三丁酸甘油酯 62.5 g,分别量取乳化剂(B.3.15)200 mL 和水 940 mL,混合。将混合液用匀浆器处理 3 min(7 000 r/min)。匀浆后的溶液先用普通的磁力搅拌器搅拌至少 20 min,然后调节 pH 至 4.75 ± 0.05 。

注:不同来源和批号的三丁酸甘油酯和阿拉伯胶对试验结果有影响,在更换产品或批号前需进行有效性确认。

B.3.17 甘氨酸缓冲液 1(7.51 g/L):称取甘氨酸 37.54 g 和氢氧化钠片剂 18.5 g,用水溶解并定容至 5 L。如需要,调节溶液的 pH 至 10.8 ± 0.05 。

B.3.18 甘氨酸缓冲液 2(0.75 g/L):取 100 mL 甘氨酸缓冲液 1(B.3.17),用水定容至 1 000 mL。如需要,调节溶液的 pH 至 10.8 ± 0.05 。

B.4 标准曲线和样品处理

B.4.1 标准曲线

称取一定量的已知活力酶标准品,精确至 0.000 1 g,用甘氨酸缓冲液 2(B.3.18)溶解并稀释,制成标准储备液。标准储备液的浓度为 20 U/mL。然后按照表 B.1 配制溶液,并绘制标准曲线。

表 B.1 标准曲线

标准点	脂肪酶活力 U/mL	标准储备液所用体积 mL	用水定容至 mL
1	0.200	1.00	100
2	0.500	2.50	100
3	1.000	5.00	100
4	2.000	10.0	100
5	3.000	15.0	100
6	4.000	20.0	100

B.4.2 标准对照

可使用已知活力的样品作为标准对照。标准对照的处理同样品。

B.4.3 样品处理

不同的样品需做不同的预处理,以激活或保护在样品基质中的脂肪酶。

可考虑采用甘氨酸缓冲液 1(B.3.17)和水来分别溶解和稀释样品的方法,或采用甘氨酸缓冲液 2 来溶解和稀释样品的方法,或直接用水溶解和稀释样品的方法,以求得到最好的效果。样品的溶解液和稀释液需搅拌均匀。样品最终稀释到酶活力在 1.5 U/mL~4.0 U/mL 范围内。如可能,样品稀释完立即测定。

B.5 分析步骤

B.5.1 系统准备

B.5.1.1 按照无水乙醇、适当的肥皂水、热水、去离子水、底物的顺序清洗滴定容器和管路。保证水浴的温度在 $30.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

B.5.1.2 校正 pH 电极:使用前需校正 pH 电极的灵敏度在 95%~102%;pH7.00 在 6.985~6.989 之间;pH4.01 在 4.009~4.012 之间。如果达不到此标准,按照 pH 电极使用说明进行冲洗并再次校正。

B.5.2 分析

B.5.2.1 pH 电极用后浸泡在饱和的氯化钾(KCl)溶液中,使用前冲洗。在反应溶液表面用氮气吹充,以防止空气中二氧化碳的干扰。分析前一定要保证底物的温度为 $30.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在分析每个样品前要用 0.005 mol/L 的氢氧化钠滴定液(B.3.14)冲洗滴定皿和管路。

B.5.2.2 试验步骤如下。

- 将 15 mL 的底物加入滴定皿中。滴定前 pH 电极的读数应小于 7.0。
- 加 1 mL 样品稀释液加入滴定皿中。反应体系的 pH 在滴定过程中保持在 7.0。记录为保持恒定 pH 而加入的滴定液的数量。
- 滴定结束后滴定仪打印出滴定曲线线性范围的平均斜率(如果使用不同的设备,数据可能以其他形式输出)。滴定曲线需有一段持续 1.5 min 的线性输出。
- 先分析标准曲线(每个标准点分析一次),再分析一个标准对照,最后分析样品(每个样品分析一次)。需注意,一天内非一次运行的样品不能使用相同的标准曲线。如果样品在当天晚些时

候分析,标准溶液要重新分析。

——每个样品分析前和最后一个样品完成分析后,系统将进行冲洗。排空底物容器和管路,并用乙醇冲洗。如果系统将在一周以上时间不再使用,则需用去离子水进行冲洗并用氢氧化钠滴定液(B.3.14)或相同浓度的盐酸溶液充满敏感部件,避免出现盐类结晶。

B.6 计算

B.6.1 结果计算

利用标准点的测定值作标准曲线,其中 X 轴为标准品酶活力,Y 轴为相应的滴定反应的平均斜率(mL/min)。标准曲线为一条直线。样品稀释液的活力从标准曲线中读出,然后按公式(B.1)计算:

$$X_2 = \frac{A \times V_3 \times n_2}{m_3} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

X_2 ——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL);

A ——稀释样品在标准曲线上读出的酶活力,单位为酶活力单位每毫升(U/mL);

V_3 ——样品溶解用的容量瓶体积,单位为毫升(mL);

n_2 ——第二次稀释的倍数;

m_3 ——样品的质量或体积,单位为克(g)或毫升(mL)。

B.6.2 结果的确认

当满足以下条件时可以确认本次分析有效。

- a) 标准对照的检测值在本方法所规定的可接受偏差范围内。
- b) 标准曲线的斜率满足:
 - 1) 标准点 1 小于 0.02 mL/min;
 - 2) 标准点 6 在 0.14 mL/min~0.18 mL/min 之间。
- c) 标准曲线的相关系数(r^2)大于或等于 0.995。
- d) 标准点 3~点 6 相关系数(r^2)大于 0.999 5。标准点 1~点 2 的 r^2 大于 0.995 是可接受的。如果达不到此条件,检查分析系统。

B.6.3 结果的表示

结果给出 3 位有效数字。如果结果低于检测限,则表示为小于 20 U/g(液体)或小于 50 U/g(固体)。

B.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 5%。