

食品化學補充資料：第二章 水分

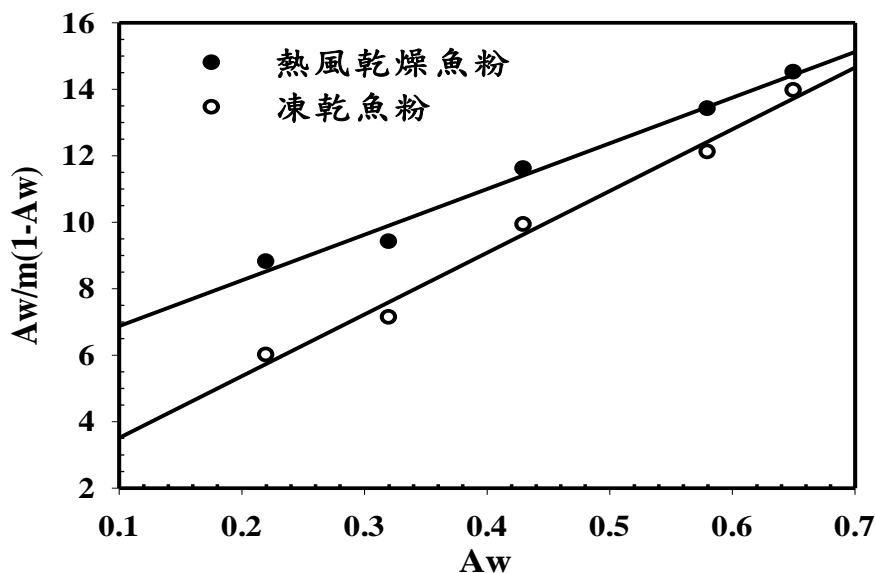
單層水測定實例

方法：1 克樣品以烘箱乾燥 8 小時→秤得乾重→置於固定相對溼度鹽類的密閉乾燥器皿中(康威氏皿)例如 $A_w=0.22、0.32、0.43、0.58、0.65$ →放置 25 天後取出秤重並計算單層水值

實驗結果

Aw	熱風乾燥魚粉		凍乾魚粉	
	m	Aw/m(1-Aw)	m	Aw/m(1-Aw)
0.22	0.032	8.81	0.047	6.00
0.32	0.050	9.41	0.066	7.13
0.43	0.065	11.61	0.076	9.93
0.58	0.103	13.41	0.114	12.11
0.65	0.128	14.51	0.133	13.96

m 為水分含量(g H₂O/g 固形物) 作圖如下：



比對 BET 方程式 $Aw/m(1-Aw)=(1/m1C)+ [(C-1)/m1C]Aw$

熱風乾燥魚粉一次迴歸方程式為 $Aw/m(1-Aw)=5.50+13.75Aw$

凍乾魚粉一次迴歸方程式為 $Aw/m(1-Aw)=1.65+18.58Aw$

熱風乾燥魚粉 $1/m1C=5.5$ 、 $(C-1)/m1C=13.75$ ， $C=3.5$ 單層水(m1)為 0.052 (g H₂O/g 固形物)

凍乾魚粉 $1/m1C=1.65$ 、 $(C-1)/m1C=18.58$ ， $C=12.26$ 單層水(m1)為 0.049 (g H₂O/g 固形物)

另法

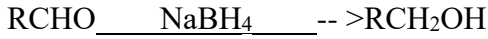
斜率= $(C-1)/m1C$ 截距= $1/m1C$ 斜率+截距= $1/m1$ 單層水 $m1=1/(斜率+截距)$

熱風乾燥魚粉單層水= $1/5.5+13.75=0.052$

凍乾魚粉單層水= $1/1.65+18.58=0.049$

第三章 碳水化合物反應

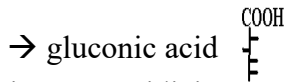
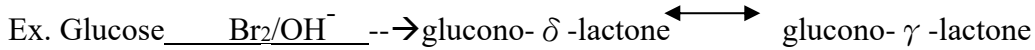
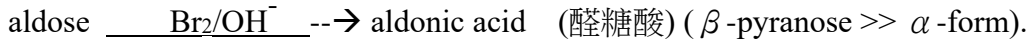
一、Reduction to sugar alcohol



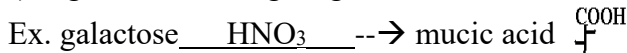
Glucose \rightarrow glucitol (sorbitol) Mannose \rightarrow Mannitol

二、Oxidation to aldonic, dicarboxylic and uronic acids

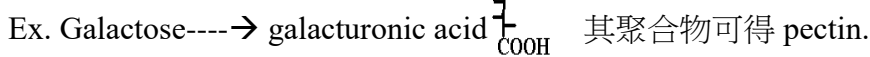
(一)mild condition Ex. With bromine water in buffered neutral or alkaline



(二) Vigorous oxidizing agent Ex. Nitric acid \rightarrow aldose $\xrightarrow{HNO_3}$ aldaric acid



(三) aldose \rightarrow uronic acid (糖醛酸)



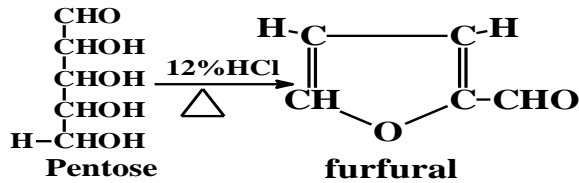
三、action of acids

(一) dilute mineral acids

aldohexose \rightarrow

5-hydroxymethyl furfural

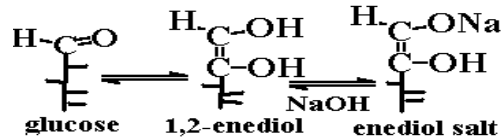
(二) strong acid \rightarrow sugar \rightarrow dehydrated



四、action of alkaline

products formed could include

1,2-enediol, 2,3- and 3,4-enediol.

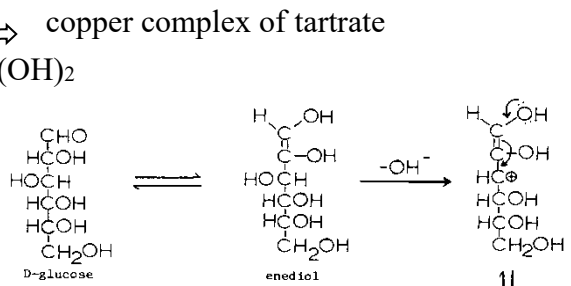
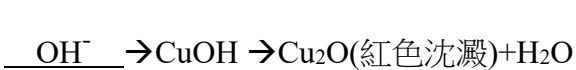


五、reducing agent in alkaline solution (Fehling's solution)

reducing sugar + alkali

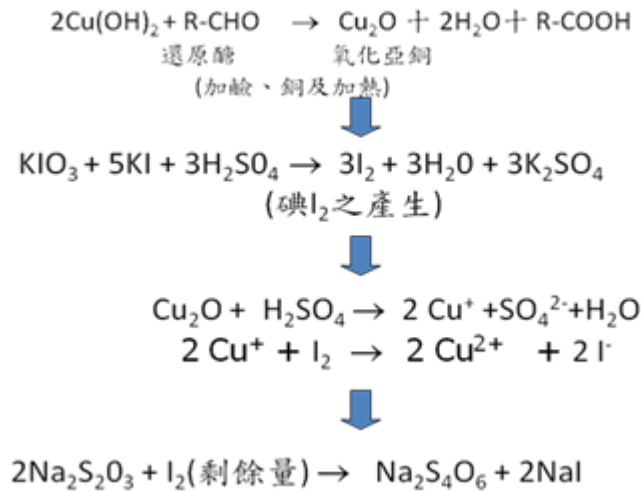
\rightarrow enediols and reducing sugar fragments + $Cu(OH)_2$

$\rightarrow Cu^+ +$ mixture of sugar acids



(一) Somogyi 法

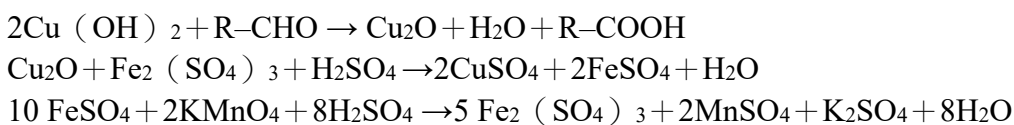
將一定量樣品溶液與過量的鹼性硫酸銅溶液共同加熱，樣品液中的還原糖定量地將 Cu^{2+} 還原為紅色的氧化亞銅(Cu_2O)沉澱，生成的氧化亞銅在酸性條件下溶解為 Cu^+ 離子。並能定量地還原由碘酸鉀和碘化鉀在酸性溶液中產生的一定量游離碘形成碘化物，而 Cu^+ 被氧化為 Cu^{2+} 。反應中剩餘的碘以標準硫代硫酸鈉溶液滴定，即可得知碘被消耗的量，再由各種還原糖的係數換算得到還原糖量。



本法為微量法，檢出量為 5mg~25mg，靈敏度高，再現性好，結果準確可靠。樣品用量少，可用於生物材料或經過層析處理後的微量樣品的測定。終點判斷容易，有色樣溶液不受限制

(二) Bertrand 法

還原糖(單糖)在硫酸銅的鹼性溶液中加熱，銅離子(Cu^{2+})會被還原成氧化亞銅 (Cu_2O) 而沉澱，此沉澱以酸性硫酸鐵處理時，氧化亞銅會被氧化成硫酸銅與硫酸亞鐵。此時三價的鐵(Fe^{3+})鹽與氧化亞銅量成比例地被還原為二價之鐵(Fe^{2+})鹽，低價之亞鐵鹽可利用高錳酸鉀 (KMnO_4) 標準溶液滴定之，從滴定值推算出被還原糖還原的銅量，再由銅量求出果之中的還原糖量。反應如下：

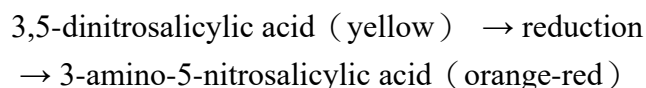


本法優點為適用於各類食品中還原糖的測定，有色樣品溶液也不受限制此方法的準確度，再現性優於其他的直接滴定法。缺點為操作複雜、費時計算測定結果時，需使用特製的高錳酸鉀法糖類檢索表。

(三) DNS 法

1. 原理

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法之原理係利用 DNS 具還原力的特性，只要碳水化合物具有游離的醛或酮基(亦即具有還原性)，即能在鹼性溶液下進行以下反應：



於其線性範圍內，顏色的深淺和還原糖含量成正比，故以葡萄糖製作檢量線來計算樣品中還原糖的含量。

2. 實驗方法

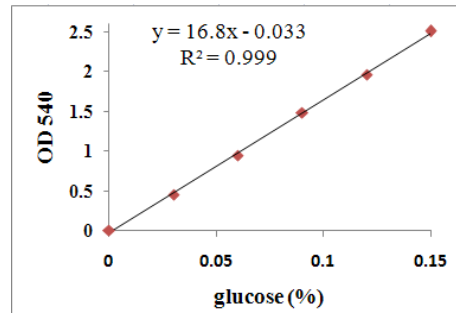
(1) 藥品配置

- A. 0.1 g 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)
- B. 3 g 酒石酸鉀鈉(Potassium sodium tartrate)
- C. 2 mL 之 2N NaOH

將上述藥品溶於 10 ml 蒸餾水中並加熱使其溶解，可得到 DNS 藥劑，最後保存於褐色瓶中。

(2) 實驗步驟

將樣品溶液經過適當稀釋後取 0.5 ml 加入 0.25 ml DNS 呈色劑，於 100°C 水浴加熱 10 min 後置於冷水浴冷卻，加入 0.75 ml 蒸餾水，於 540 nm 測定其吸光值，再將吸光值代入標準檢量線後，即可換算出還原糖含量。



標準曲線：葡萄糖

0、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15% (1.5 mg/mL)

六、總糖定量

(一) 酚-硫酸法(phenol-sulfuric acid method)

1. 原理

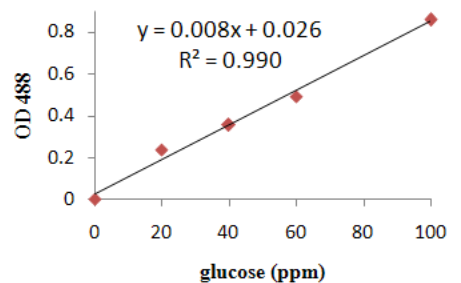
酚-硫酸法測定樣品之總糖(或多糖)含量是利用多糖在硫酸的作用下先水解成單糖，並迅速脫水生成糖醛衍生物，然後與酚生成橙黃色化合物，於 488 nm 處測定其吸光值。吸光值與糖的濃度成正比，因此可用於糖的定量分析。本法靈敏度高，可應用於靈芝多糖、香菇多糖、杏鮑菇多糖、人參多糖、海藻多糖、真菌多糖發酵液等之檢測。

2. 實驗步驟

樣品 0.2 毫升 + 5% phenol 0.2 mL + 濃硫酸 1 mL
→ 震盪混合 → 靜止 1 小時 → 測 488 nm

3. 標準曲線：葡萄糖

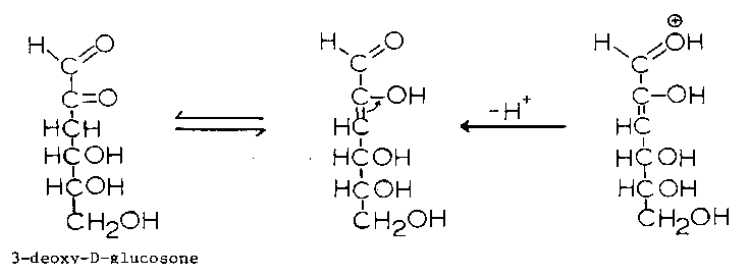
0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL
(0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm)



(二) 蒽酮-硫酸法(Anthrone -sulfuric acid method)

蒽酮-硫酸法(Anthrone -sulfuric acid method) 測定總糖(或多糖)含量原理係利用多糖在硫酸的作用下水解成單糖，並迅速脫水生成糖醛衍生物，再與蒽酮生成藍綠色化合物，於 620 nm 處測定其吸光值。吸光值與糖的濃度成正比，因此可用於糖的定量分析。本法靈敏度高，可應用於靈芝多糖、香菇多糖、杏鮑菇多糖、人參多糖、海藻多糖、真菌多糖發酵液等之檢測。本法囊括所有碳水化合物的測定，包括寡糖、多糖澱粉纖維素等均可用此法測定。硫酸蒽酮法吸光值較酚硫酸法高，線性範圍寬，可在強酸強鹼性條件測定。但蒽酮試劑穩定性差不易溶於水，需現用現配，且受蛋白質干擾。

七、.dehydration and thermal degradation of carbohydrate



八、Maillard reaction reducing sugar CHO, C=O group +amino group (NH₂)

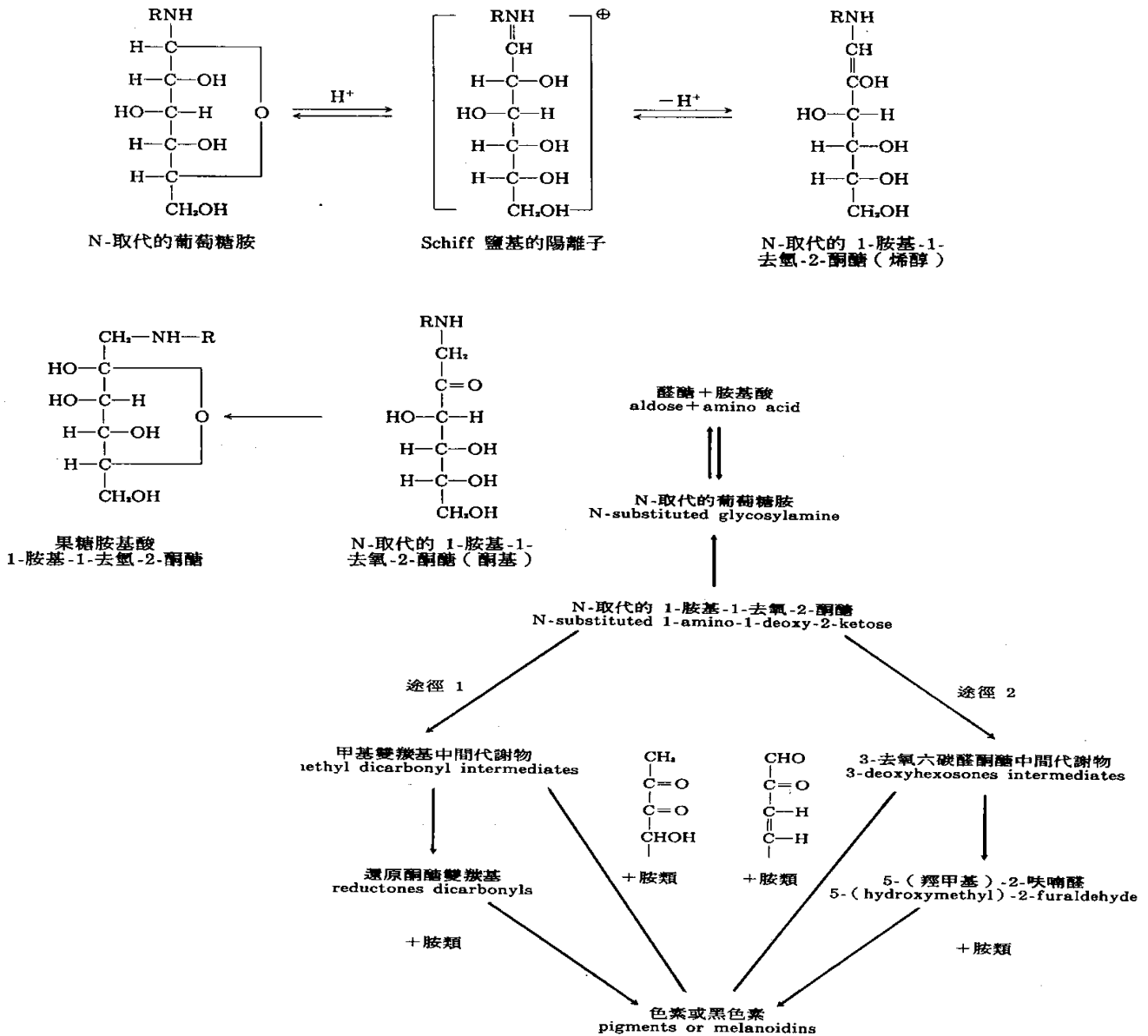


圖 10-4 導致形成色素的二個途徑

(一).Classification of Maillard reaction

A.Initial stage (colorless, no absorption near ultraviolet)

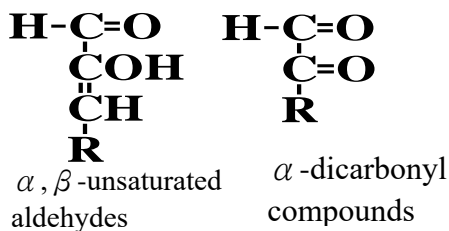
- a).sugar-amine condensation
- b).Amadori rearrangement

B.Intermediate stage (colorless or yellow, with strong absorption in near ultraviolet)

- c).sugar dehydration
- d).sugar fragmentation
- e).amino acid degradation

C.Final stage (highly colored)

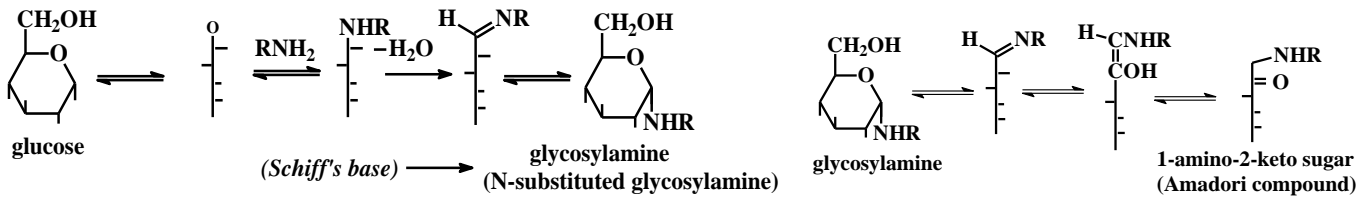
- f).alcohol condensation
- g).aldehyde-amine polymerization; formation of heterocyclic nitrogen compounds



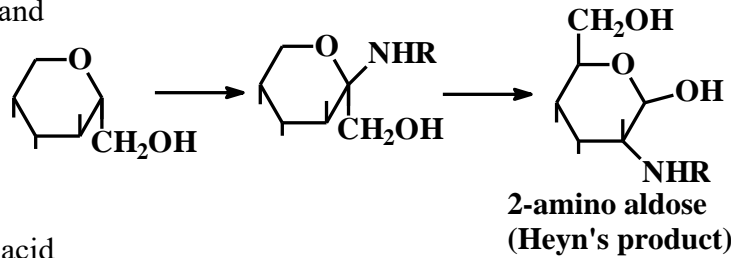
(二).Hodge (1953) called the Maillard reaction the carbonyl-amine reaction., because the compounds which react with the amines usually have a carbonyl or a potential carbonyl function.

Among the most reactive carbonyl compounds are α, β -unsaturated aldehydes (furaldehyde), and α -dicarbonyl compounds (diacetyl and pyruvaldehyde)

(三).

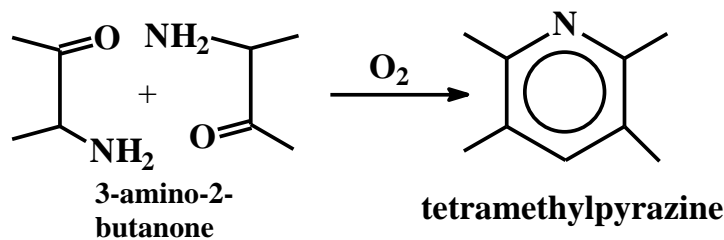
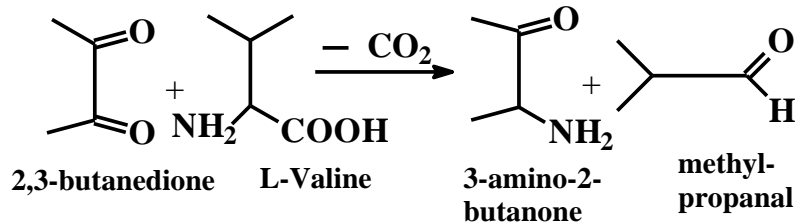
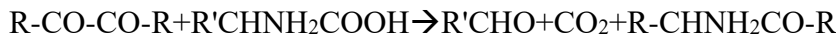


Glucosylamine formation with a ketose and Heyn's rearrangement



(四).Strecker degradation

α -dicarbonyl compounds + α -amino acid



(五).須控制 Maillard reaction

A. pH 7.8-9.2 Maillard reaction 嚴重 B. IMF, ERH 30%附近 Maillard reaction 嚴重

C. metal ion Cu^{2+} , Fe^{3+} (more effective than Fe^{2+})

D. Pentose reaction rate > hexose

D-xylose > L-arabinose > hexose > disaccharide; fructose less reactive than the aldose.

E. temperature 和 reaction rate 成正比

F. lysine 易參與反應, arginine, tryptophan, histidine 亦然。

(六)Inhibition of Maillard reaction

A. control the condition

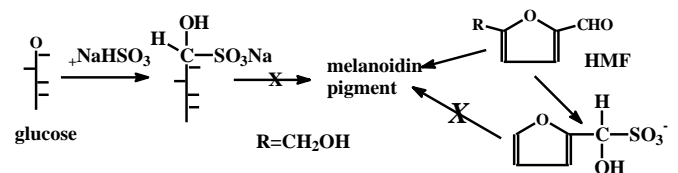
a). pH b). temperature c). Aw d). dilution e). inert gas

B. remove the substrate

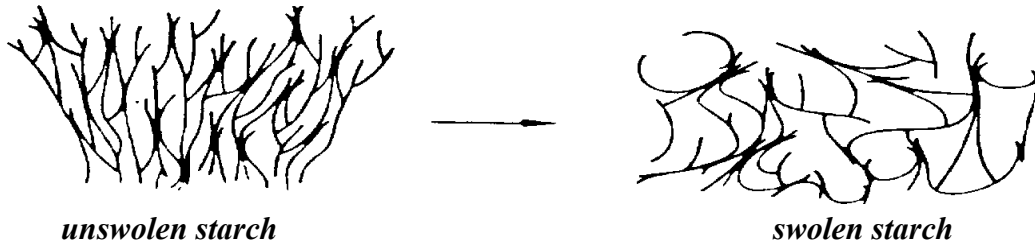
Dried eggs + D-glucose oxidase

Fish + *Lactobacillus pentoaceticum* (具 D-ribose oxidase activity 之細菌)

C. inhibitor: SO_2 , SO_3^{2-} , HSO_3^- , $CaCl_2$ (與 a.a 結合用於馬鈴薯)



九、Gelatinization



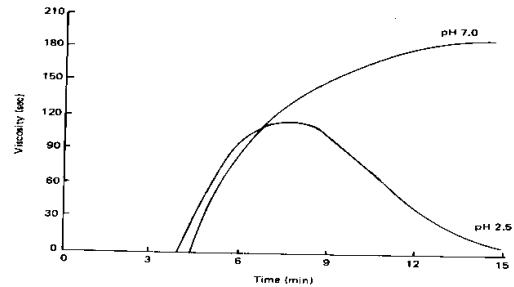
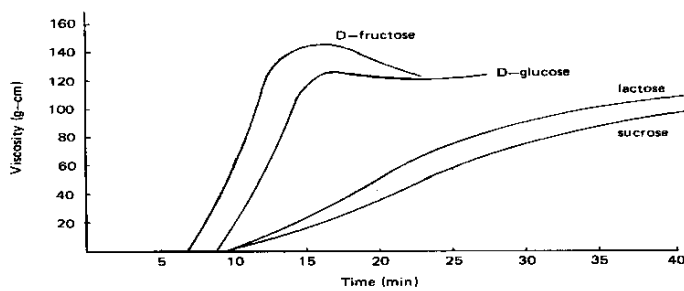
(一)糊化後複屈折性(birefringence)消失、黏度上升澄清度上升、對酵素敏感性上升。

(二)evaluation of gelatinization

- A.黏度法 B.測量複屈折性 C.測透光率 D.碘藍價法(amylose/iodine blue method)
- E.剛果紅法(congo red) F.酵素法-pullulanase
- G.示差熱分析儀 (DSC, differential scanning calorimetry)

(三)Factors which influence gelatinization

A. sugar-high conc. will inhibit gelatinization



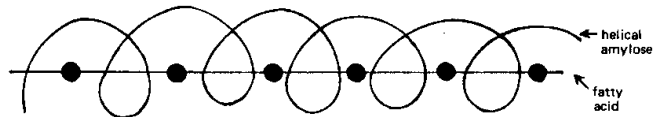
B. pH 4-7 no effect, pH 10 促進 gelatinization,

pH 2.5 破壞糊化。

C. fat- amylose-fat complex- gelatinization 下降

D. protein-unknown effect on gelatinization

E. salt-little effect.



第四章 油脂部分: 抗氧化活性檢測

一、氫過氧化物之測定(POV; Ferric thiocyanate 法)

(一)原理

抑制過氧化率之測定是採用硫氰酸鐵法(ferric thiocyanate method), 以評估抗氧化劑之抗氧化性, 其原理是利用脂質氧化初期生成高能的氫過氧化物, 將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} , Fe^{3+} 又會與 SCN^- 反應而生成紅色的硫氰酸鐵錯合物 $[Fe(SCN)_6]^{3-}$, 此錯合物於 500 nm 波長有最大吸收波峰。其反應如下:



當脂質氧化程度越高, 氫過氧化物亦生成越多, 呈色也跟著加深。因此, 藉由測量 500 nm 波長處的吸光值大小, 便可得知樣品的抗氧化性。

(二)試藥與儀器

儀器: 分光光度計、保溫箱

試藥: 0.02 M linoleic acid

30% ammonium thiocyanate

0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)

0.02 M iron(II) chloride tetrahydrate

75% ethanol

(三)樣品處理

樣品可以是純品、粗萃取物或乾燥粉末，要做此試驗前，需先使此樣品完全溶解於水、酒精、DMSO 或其他溶劑，若有不溶現象，需再經離心或過濾的處理，使樣品成均勻狀態的測液。

(四)實驗步驟

取 0.02 M 之 linoleic acid emulsion 2.5 ml，各加入不同濃度樣品及 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml。混勻後置於 37°C，每隔一段時間取出，依 ferric thiocyanate 方法測定其過氧化物。取上述之樣品混合液 0.1 ml，分別依序加入 75%之乙醇溶液 4.7 ml，30% ammonium thiocyanate 0.1 ml 及 0.02 M iron(II) chloride tetrahydrate 溶液 0.1 ml，振盪使其混合均勻。靜置 3 分鐘後，以分光光度計測其在 500 nm 波長下之吸光值。

* Linoleic acid emulsion (pH 7.0) 之配置：

50 ml 之 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 加入 0.2804 g 之 linoleic acid 及 0.2804 g 之 Tween 20，以均質機均質成乳化液即可。此乳化液愈新鮮配製愈佳。

(五)結果判定

由吸光值判定，吸光值愈低者，表示測試樣品之抗氧化能力愈強。或以抑制過氧化百分比表示，即抑制率愈高抗氧化效果愈佳。抑制過氧化率(Inhibition of peroxidation %, IP%) (抑制亞麻油酸過氧化物形成的能力) = $[1 - (\text{樣品於 } 500 \text{ nm 的吸光值}) / (\text{未添加樣品之控制組於 } 500 \text{ nm 的吸光值})] \times 100$ 。抑制脂質過氧化率(%)愈高表抗氧化性愈強。

二、共軛雙烯之測定(Conjugated diene 法)

(一)原理

不飽和脂肪酸氧化初期會因脫氫作用而形成自由基，此自由基再經分子內重排而產生共軛雙烯鍵，此共軛雙烯化合物可經由測 234 nm 之吸光值而得知其產生量。

(二)試藥與儀器

儀器：分光光度計、保溫箱

試藥：10 mM Linoleic acid 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.6) 80% Methanol

(三)樣品處理

樣品可以是純品、粗萃取物或乾燥粉末，要做此試驗前，需先使此樣品完全溶解於水或其他溶劑，若有不溶現象，需再經離心或過濾的處理，使樣品成均勻透明的測試液。

(四)實驗步驟

取 10 mM linoleic acid emulsion (pH 6.6) 2 ml，加入 0.1 ml 不同濃度樣品，不添加樣品之空白試驗亦同時進行。混勻後置於 37°C 暗室。於 0 及 15 小時，分別取出 0.2 ml，加入 80% 甲醇 7 ml，測 234 nm 之吸光值。

* Linoleic acid emulsion (pH 6.6) 之配置：

50 ml 之 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 加入 0.2804 g 之 linoleic acid 及 0.2804 g 之 Tween 20，以均質機均質成乳化液即可。此乳化液愈新鮮配置愈佳。

(五)結果判定

由吸光值判定，吸光值愈低者，表示測試樣品之抗氧化能力愈強。或以抑制過氧化百分比表示，即抑制率愈高抗氧化效果愈佳。共軛雙烯化合物產生之抑制率 = $[1 - (\text{樣品於 } 234 \text{ nm 的吸光值}) / (\text{未添加樣品之控制組於 } 234 \text{ nm 的吸光值})] \times 100$ 。

三、微脂粒 (liposome) 氧化作用之抑制(thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) 法)

(一)原理

利用 TBA (thiobarbituric acid) 之呈色法(測定 532 nm 之吸光值)來測定脂質過氧化之產物 (malondialdehyde, MDA)。

(二)試藥與儀器

儀器：分光光度計

試藥：微脂粒溶液(10 mg/ml)。 20mg/ml butylated hydroxytoluene (BHT)

2.8 % trichloacetic acid (TCA) 1.0% thiobarbituric acid (TBA)

(三)樣品處理

樣品可以是純品、粗萃取物或乾燥粉末，要做此試驗前，需先使此樣品完全溶解於水或其他溶劑，若有不溶現象，須再經離心或過濾的處理，使樣品成均勻透明的測試液。

(四)實驗步驟

取 300 mg 之卵磷脂，加入 30 ml 之 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 緩衝溶液(pH 7.4)，以超音波震盪成均質懸浮液，製備成微脂粒溶液(10 mg/ml)。反應液中含有微脂粒懸浮液(2 ml)、25 mM FeCl₃ (0.1 ml)、25 mM ascorbic acid (0.1 ml)、20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 緩衝溶液(pH 7.4, 1.2 ml)及加入 0.5 ml 不同濃度樣品，不添加樣品之空白試驗亦同時進行。將此反應液置於 37°C 2 小時，加入 20 mg/ml BHT 1 ml、1% TBA 2 ml 和 2.8% TCA 1 ml，於 100°C 水浴加熱 20 分鐘，冷卻後測 532 nm 吸光值。

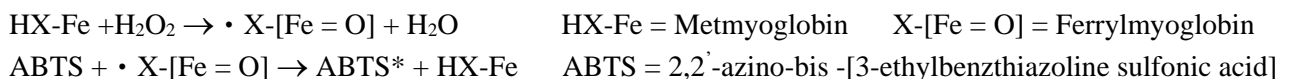
(五)結果判定

當 532 nm 之吸光值愈高即表示 MDA 產物愈多，因此若樣品可降低此系統之吸光值則表示其具有抗氧化效應。抑制率 (%)=[控制組的吸光值 - 受試組的吸光值 / 控制組的吸光值] 100 %。亦可以 1,1,3,3-tetramethoxypropane (為 MDA 的標準品)以 1 N H₂SO₄ 水解成之 MDA，再以同樣的檢測方法，測其吸光值，再製得標準曲線，由此標準曲線換算成 MDA 的產生量(M)，MDA 產生量愈高，其抗氧化效果愈差。

四、 Trolox 當量的抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

(一)原理

ABTS (2,2'-Azino-bis - [3-ethylbenthiiazoline sulfonic acid])與 peroxidase (metmyoglobin)及 H₂O₂ 反應，會產生 ABTS⁺。此為一相當穩定藍—綠色物質，於波長 734 nm 有吸收波峰。抗氧化劑的加入會抑制此顏色的產生，因此吸光值愈低，抗氧化效果愈佳。



(二)試藥與儀器

儀器：分光光度計

試藥：trolox 44 U/ml peroxidase 75 μ M H₂O₂

750 μ M 2,2'-azino-bis [3-ethylbenthiiazoline-6-sulfonic acid](ABTS)

(三)樣品處理

樣品可以是純品、粗萃取物或乾燥粉末，要做此試驗前，需先使此樣品完全溶解於水或其他溶劑，若有不溶現象，需再經離心或過濾的處理，使樣品呈澄清透明狀態的測試液。

(四)實驗步驟

取 0.5 ml peroxidase、0.5 ml ABTS 溶液以及 3.5 ml H₂O₂ 混合均勻，待產生安定藍綠色之 ABTS⁺ 陽離子自由基後(6 分鐘)，加入不同濃度的 trolox 樣品，以分光光度計測 734nm 之吸光值，做成 trolox 之檢量線，樣品的檢測同上，測得後再由 trolox 的檢量線，換算其相當的濃度(mM)。

(五)結果判定

一般以 TEAC 表示，常以 mM 為單位。若其化合物之 TEAC 為 2 mM，意味 1 mM 的化合物相當 2 mM 的 Trolox。TEAC 愈高，代表化合物的抗氧化性愈高。

五、除 α, α -diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定

(一)原理

油脂在自氧化的過程中會產生自由基而造成油脂酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫(hydrogen doner)來清除脂質過氧化物自由基(peroxyl radical)進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用 DPPH 來評估抗氧化的供氫能力。DPPH 之甲醇或乙醇溶液在 517 nm 下會有強吸光，但是被抗氧化劑(AH)還原時則吸光值降低，因此在 517 nm 的吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氫能力愈強。樣品若有顏色干擾情形，則可採用 HPLC 方法分析。

(二)試藥與儀器

儀器：分光光度計

試藥：10 mM DPPH

(三)樣品處理

先將樣品溶解於水或甲醇中，若有不溶現象需再經離心或過濾處理，使樣品呈澄清狀態的測試液。

(四)實驗步驟

取 4 ml 不同濃度的樣品，加入 1 ml 新鮮配製的 10 mM DPPH 甲醇或乙醇溶液，振盪混合均勻，於室溫下靜置 30 min 後，使用分光光度計檢測 517 nm 之吸光值。

(五)結果判定

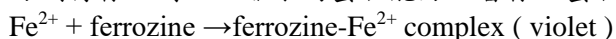
由吸光值判定，當 517 nm 吸光值愈低者，表示測試樣品之供氫能力愈強。或以清除百分比表示，即清除百分比愈高表示測試樣品之供氫能力愈佳。測試食品清除 DPPH 自由基能力，可同時與傳統抗氧化劑，如 BHA、Vit C 比較，以評估食品的抗氧化性。

清除率(scavenging effect %) = $[1 - (\text{樣品於 } 517 \text{ nm 的吸光值}) / (\text{未添加樣品之控制組於 } 517 \text{ nm 的吸光值})] \times 100$ 。

六、螯合鐵能力之測定

(一)原理

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由 redox cycle 反應，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中， Fe^{2+} 經常是最具影響力的助氧化劑，其會促進脂質氧化作用的進行。利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，可測得樣品對 Fe^{2+} 離子的螯合能力。當樣品螯合 Fe^{2+} 離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低。



(二)試藥與儀器

儀器：分光光度計

試藥：Methanol 2 mM 的 FeCl_2 5 mM 的 ferrozine

(三)樣品處理

樣品可以是純品、粗萃取物或乾燥粉末，要做此試驗前，需先使此樣品完全溶解於水或其他溶劑，若有不溶現象，須再經離心或過濾的處理，使樣品呈澄清透明狀態的測試液。

(四)實驗步驟

取 1 ml 不同濃度的樣品及控制組，加入 3.7 ml 的 methanol，先加入 2 mM 的 FeCl_2 0.1 ml，30 秒後再加入 5 mM 的 ferrozine 0.2 ml，反應 10 分鐘後，檢測 562 nm 的吸光值。吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子的能力越強。

(五)結果判定

由吸光值判定，吸光值愈低者，表示測試樣品之螯合鐵能力愈強。或以螯合鐵能力百分比表示，即螯合鐵能力愈高抗氧化效果愈佳。

螯合鐵能力百分比(Chelating effects %) = $[1 - (\text{樣品於 } 562 \text{ nm 的吸光值}) / (\text{未添加樣品之控制組於 } 562 \text{ nm 的吸光值})] \times 100$ 。

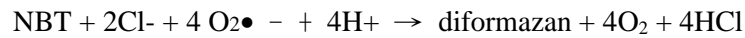
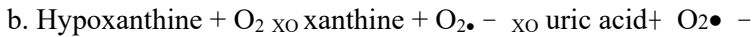
七、清除氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)能力之測定原理

電子順磁共振光譜(electron paramagnetic resonance; EPR)又可稱為電子自旋共振光譜(electron spin resonance; ESR)。電子順磁共振光譜檢測的原理是利用未成對的電子(奇數個電子)，在外加磁場中，經由吸收微波(microwave)輻射而改變電子自旋的狀態。所以 EPR 光譜可用來檢測自由基是否存在、測量自由基的濃度及證明自由基的結構。

八、清除超氧陰離子(SOD-like)能力之測定原理

本試驗是利用(A)非酵素及(B)酵素系統來產生超氧陰離子($\text{O}_2 \cdot^-$)，再以 nitro blue tetrazolium (NBT) 來檢測樣品清除 $\text{O}_2 \cdot^-$ 的能力。在(A)非酵素系統中 phenazine methosulphate (PMS)與 NADH 作用會產生超氧陰離子；在(B)酵素系統中 hypoxanthine 或 xanthine 與 xanthine oxidase 作用後會產

生超氧陰離子，其會進一步用 NBT 還原成 diformazan，此化合物在 560 nm 有最大吸收波峰，故可藉由測定 560 nm 處吸光值的變化，得知超氧陰離子的產生量。倘若所添加的樣品能使吸光值下降，則表示其具有清除超氧陰離子的能力。



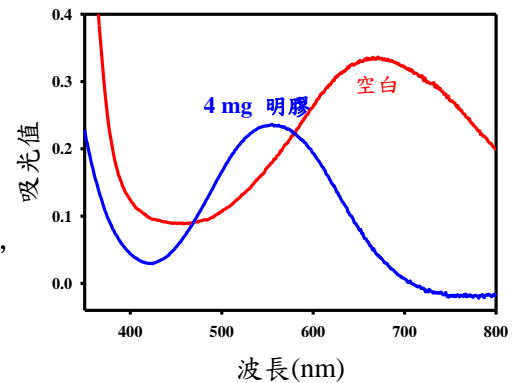
(Yellow) (Blue)

** PMS = phenazine methosulphate XO = Xanthine oxidase NBT = nitro blue tetrazolium

第五章蛋白質

一、Biuret 胜肽蛋白質測定

含有兩個以上胜肽鍵化合物與硫酸銅鹼性溶液會產生雙縮脲反應產生紅色物質於 540nm，因原藥劑藍色，故混合成紫色物質。



(一)Biuret試劑:

加入 3 g 硫酸銅copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

及 9 g 酒石酸鉀鈉 (sodium potassium tartarate) 於 500 mL 水中

+300mL 10% (w/v) NaOH+ 5 g 碘化鉀(potassium iodide)加水定容至1公升

備註

(1)使用碘化鉀目的為抑制銅離子還原

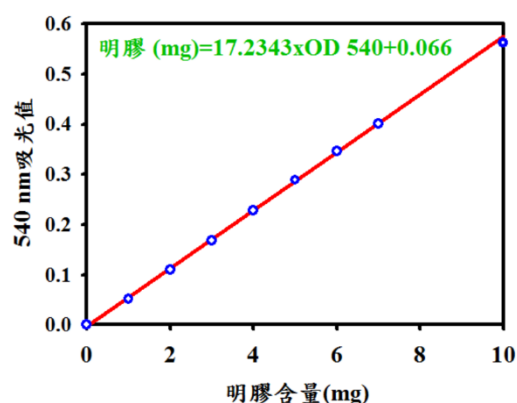
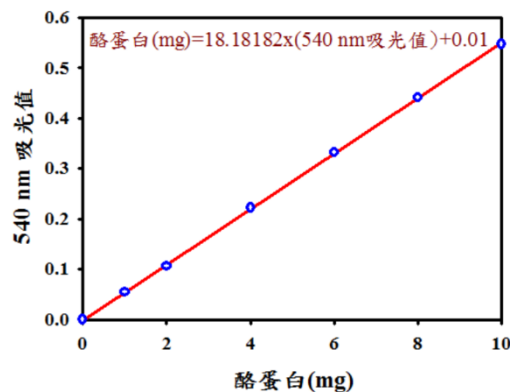
(2) Biuret試劑保存於褐色塑膠瓶暗處，可放幾個月，若有紅棕或黑色沉澱則藥品失效

(二)蛋白質標準品(牛血清白蛋白BSA或酪蛋白10 mg /mL)

秤取酪蛋白1克於80毫升RO水中，放入水浴中煮沸15分鐘，溶解后冷却，定容至100mL，保存於冰箱內，濃度為10 mg /mL。

(三)實驗方法

1. 標準蛋白(BSA或酪蛋白)或樣品溶液1毫升加Biuret試劑3毫升
2. 震盪混合後，室溫下靜止30分鐘後測定(或37°C 10分後測定)
3. 檢測540 nm吸光值
4. 帶入標準曲線換算蛋白質或胜肽含量



二、Lowry 法

(一)原理:

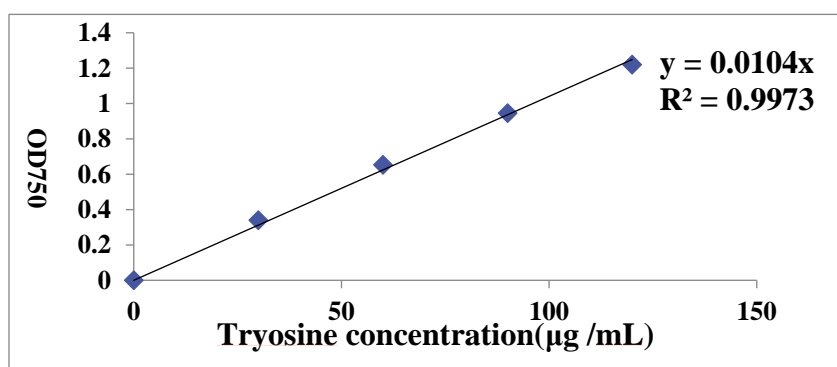
是上述 Biuret 法的延伸，當銅離子與胍鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質，更為靈敏(約 0.1 mg)，但較麻煩，也會受硫酸銨及硫醇化合物的干擾。步驟中各項試劑的混合，要特別注意均勻澈底，否則會有大誤差。蛋白質或胍肽在鹼性環境下，酒石酸鈉-銅鹽溶液會與胍肽鏈形成 Cu^{2+} 梔子紅色複合物，該複合物在鹼性條件下再與 Folin-phenol 試劑作用形成藍色複合物，複合物的顏色強度會與蛋白質中的芳香族官能基成正比，可在 750nm 下測得吸光值。將數值帶入已知標準曲線，可求得待測樣品之蛋白質或胍肽含量。

(二)實驗藥品

- 1.Reagent A: 2% Na_2CO_3 -0.1N NaOH
- 2.Reagent B: 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1%酒石酸鈉
- 3.Reagent C: A 50mL + B 1mL 混合
- 4.ReagentD: Folin-Ciocalteu reagent

(三)實驗方法

樣品溶液 0.5mL 加入
2.5mL Reagent C，混合後室溫
下靜置 10min，緊接著加入
0.25mL Reagent D，混合後靜
置 30min，在 750nm 下測得吸
光值，對照標準曲線以換算樣
品中酪胺酸含量並求得蛋白
質或胍肽含量。



以酪胺酸製得的標準曲線

三、UV 吸光法

胺基酸的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質胍鏈骨架上的基團在 210 nm 附近有吸光。由於各種蛋白質所含芳香族胺基酸組成不一，它們在 280 nm 的吸光能力亦不同，可以分子消光係數 (molar extinction coefficient) 來表示。一般以 $E(1\%, 280\text{ nm})$ 來表示，大部分蛋白質在 4~15 間(平均為 10)。若某蛋白質的 E 值為 10，其溶液在 280 nm 吸光值為 1，則此蛋白質溶液的濃度為 1 mg/mL。

可以下式計算：吸光值 = $E \times b \times c$

(c 為蛋白質 % 濃度，即每 100 mL 所含蛋白質的克數； b 為光徑 1 cm)

此法只有在蛋白質純度很高時，才能精確測定；但若將蛋白質的 E 值大概定為 10，則對粗抽取液的略估相當方便：在 280 nm 的吸光值為 1 時，濃度約為 1 mg/mL。