**使用分光光度计测定蔗糖含量**

酶是非常有用的助手，凭借其极高的专一性和重现性能够检测到所需的分子。正是因为有此特性，他们可制作成检测试剂盒，用来检测果汁、红酒、啤酒、鸡蛋和肉类等各类食品的各种底物如糖和其它碳水化合物、酸和醇等。酶试剂盒受欢迎还因为它有如下优点：首先，和其它测试方法比起来它的样品制备快速且简单。其次，每次测试的成本非常低。最后，测试不需要任何危险试剂。酶试剂盒的原理是基于辅酶系统烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸（NAD/NADH）的颜色变化进行检测 – 还原态(NADH)在340nm有光谱吸收。

我们通过检测软饮料中的蔗糖含量来举例说明。第一步，蔗糖被酶分解成葡萄糖和果糖。然后通过己糖激酶将葡萄糖和果糖磷酸化成葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸。另外一种酶将葡萄糖-6-磷酸转化成6-磷酸葡萄糖。在后一个反应中，辅酶NAD被还原成NADH。NADH的生成可以通过测量340nm的吸收峰检测到，它直接与样品中的蔗糖含量成比例。然而，由于大部分样品不仅含有蔗糖，也含有葡萄糖，而且葡萄糖也会代谢产生NADH，因此在计算中必须减去葡萄糖的量。

**实验过程**

进行测试时，作为对照品的蔗糖标准品和相应的空白必须根据试剂盒制造商的要求在标准1cm石英比色皿中制备，如下表所示。在本例中我们采用的是Sigma-Aldrich公司的蔗糖试剂盒[1]。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 比色皿 | 蔗糖分析试剂[mL] | 样品量[mL] | 水[mL] |
| 蔗糖分析试剂空白 | 0.1 | - | 0.1 |
| 葡萄糖分析试剂空白 | - | - | 0.2 |
| 对照品空白 | - | 0.1 | 0.1 |
| 对照品测试 | 0.1 | 0.1 | - |
| 样品空白 | - | 0.1 | 0.1 |
| 样品测试 | 0.1 | 0.1 | - |

将每个比色皿中物质混合均匀并在室温静置10分钟。然后将2.0 mL葡萄糖分析试剂加入到每个比色皿中，混合均匀并在室温再静置15分钟。最后在梅特勒-托利多的UV5Bio上测量340nm的吸光度。如果连接了LabX软件，仪器可以在一个方法中定义所有计算，这样就可以自动获得最终结果，无需复杂的人工计算。如果仪器配备了CuvetteChanger自动多联池，可以一次加载所有的空白、对照品和样品，使得测量流程变得更便利。

通过下面公式计算得到蔗糖浓度。首先计算总空白，它包括了样品和试剂的吸光度：

A(总空白)=A(样品/对照品空白)+A(蔗糖分析试剂空白)-A(葡萄糖分析试剂空白)

对于样品和对照品，因生成NADH产生的吸光度差值可如下计算：

ΔA=A样品/对照品测试-A总空白

现在就可以计算得到蔗糖浓度了：

$$C\left(\frac{mg}{mL}\right)=\frac{(∆A ∙(总体积)∙(摩尔重量蔗糖)∙(稀释因子)}{ε∙d∙(样品体积)∙(转换因子ug到mg)}$$

（ε：蔗糖的吸光系数，d：光程）

**总结**

蔗糖含量可以很容易的使用酶试剂盒和紫外可见分光光度计进行测量。酶分析强大之处在于高专一性和灵敏性，可以分辨蔗糖和其它糖分子如葡萄糖和果糖。酶分析可以广泛用于饮料和其它食品。

使用配置了自动多联池和LabX软件的UV5Bio超越系列分光光度计，可以大大加快测量流程。此外，复杂的计算过程可以在测量结束后即刻自动完成并安全的保存在LabX数据库中，日后可用于梅特勒-托利多其它分析仪器测量的进一步计算。

**参考资料**

[1] Sigma-Aldrich: 蔗糖试剂盒（货号SCA20）