

# 紫外分光光度法测定大豆中胰蛋白酶抑制剂活性

UV-047

**摘要：**本文参考 GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》国家标准，采用紫外分光光度法测定了大豆中胰蛋白酶抑制剂活性，实验结果表明，该方法简单，可以快速实现大豆中胰蛋白酶抑制剂活性的测定。

**关键词：**粮食 大豆 胰蛋白酶抑制剂 活性 紫外分光光度法

胰蛋白酶抑制剂 ( trypsin inhibitor ) 是大豆以及其他一些植物性饲料中存在的重要的抗营养因子。它可防止大豆籽粒自身发生分解代谢，调节大豆蛋白质的合成与分解，并具有抗虫作用，因而是大豆必需成分。胰蛋白酶抑制剂能抑制胰蛋白酶及糜蛋白酶，阻止胰脏中其他活性蛋白酶原的激活及胰蛋白酶原的自身激活。临床

用于预防和治疗急性胰腺炎、纤维蛋白溶解引起的出血及弥漫性血管内凝血。胰蛋白酶抑制剂活性用来表示大豆制品的烘烤程度。

本文参考 GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》国家标准，对大豆粉胰蛋白酶抑制剂活性进行了测定。

## 实验部分

### 1.1 实验原理

在 pH=9.5 条件下，从样品中提取胰蛋白酶抑制剂。通过加入底物苯甲酰 -L- 精氨酸 - 对硝基苯胺 ( L-BAPA ) 测定残余的胰蛋白酶活性。

### 1.2 仪器配置及测定条件

UV-2700 ( 岛津 )

10 mm 石英比色皿

测定波长：410 nm

### 1.3 试剂

1.3.1 氢氧化钠溶液，0.01 mol/L

1.3.2 盐酸溶液，6 mol/L

1.3.3 盐酸溶液，1 mol/L

1.3.4 盐酸溶液，0.1 mol/L

1.3.5 盐酸溶液，0.001 mol/L

1.3.6 乙酸溶液，5.3 mol/L

1.3.7 氯化钙盐酸溶液：称取 0.735 g 氯化钙溶于 1 L 0.001 mol/L 盐酸溶液，调节 pH 值至  $3.0 \pm 0.1$ 。

1.3.8 牛胰蛋白酶

1.3.9 胰蛋白酶储备液：将牛胰蛋白酶放置至室温，称取胰蛋白酶 27.0 mg 置于 100 mL 容量瓶中，以氯化钙盐酸溶液溶解，并定容至刻度。

1.3.10 胰蛋白酶使用液：吸取胰蛋白酶储备液 5 mL 加入 100 mL 容量瓶中，用氯化钙盐酸溶液稀释至刻度。

1.3.11 苯甲酰 -L- 精氨酸 - 对硝基苯胺 ( L-BAPA )

1.3.12 三羟甲基氨基甲烷 ( Tris )

1.3.13 二甲亚砜 ( DMSO )

1.3.14 Tris- 氯化钙缓冲溶液：称取 6.05 g Tris 和 0.735 g 氯化钙溶于预先加入 900 mL 水的 1000 mL 刻度量筒中，用 6 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至  $8.2 \pm 0.1$ ，加水稀释至 1000 mL。

1.3.15 L-BAPAS 试剂：称取 60 mg L-BAPA 置于 100 mL 容量瓶中，用 1 mL DMSO 溶解，以 Tris- 氯化钙缓冲溶液稀释至刻度。

## 测定步骤

### 2.1 样品提取

称取  $1 \pm 0.001$  g 制备的试样加入 100 mL 锥形瓶中，加入 50 mL 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液，将试样充分悬浮。用 1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至  $9.5 \pm 0.1$ 。将锥形瓶密封后置于冰箱中过夜。同时在冰箱中放入适量的水以供制备样品提取液用。

将样品提取液转移至 100 mL 容量瓶中，用在冰箱中冷却过的水稀释至刻度，混匀。经过 15 min 的沉淀，可进一步处理样品提取液，并根据需要稀释。

### 2.2 胰蛋白酶抑制剂活性测定

表1 胰蛋白酶抑制剂活性测定溶液配比

加入物	空白标准	标准	空白样品	样品
L-BAPA	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
试样稀释液	0	0	1 mL	1 mL
水	3 mL	3 mL	2 mL	2 mL
乙酸	1 mL	0	1 mL	0

涡旋混合器混匀离心试管中溶液，并置于水浴中保温 10 min。在上述试管中再加入 1 mL 胰蛋白酶使用液。涡旋混合器将管内溶液混匀，将试管放回到水浴中。保温 10 min ± 5 s 后，在标准管和样品管中加入 1 mL 乙酸溶液混匀。

将离心管置于离心机中离心 10 min。以对应空白测定标准及样品溶液。

## 实验结果

表2 样品提取液抑制百分率测定结果

项目	结果
标准溶液 $A_r$	0.2592
样品溶液 $A_s$	0.1065
抑制百分率 $i$	58.9%

注：计算公式  $i = \frac{A_r - A_s}{A_r} \times 100\%$

表3 胰蛋白酶抑制剂活性测定结果

项目	结果
抑制百分率 $i$	58.9%
试样质量 $m_0, g$	1.016
试样质量 $m_1, mg$	27.0
试样提取液稀释度 $f_1$	333
换算系数 $f_2$	$2.8 \times 10^{-4}$
胰蛋白酶抑制剂活性 TIA, mg/g	1.26

注：计算公式  $TIA = \frac{i}{100\%} \times \frac{m_1 f_1 f_2}{m_0}$

## 结论

本文参考 GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》国家标准，对大豆粉胰蛋白酶抑制剂活性进行了测定。该方法简单，可以实现快速测定大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性。