

豆浆中胰蛋白酶抑制剂活性测定方法的研究

殷帅^{1,2}, 姜成君¹, 田洪¹, 孟庆玉¹, 李健和^{3*}

(1. 中南大学药学院, 长沙 410013; 2. 湖南省食品药品检验研究院, 长沙 410001;
3. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011)

摘要: **目的** 在 GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》方法的基础上, 对影响豆浆中胰蛋白酶抑制剂活性测定的一些关键因素进行研究和改进。**方法** 豆浆样品加水提取并稀释至一定体积后, 加入 L-BAPA 试剂和胰蛋白酶使用液, (37±0.25) °C 水浴中保温 10 min±5 s 后, 加入乙酸溶液终止酶反应, 并采用分光光度计在 410 nm 波长下测定其吸光度值, 代入公式计算胰蛋白酶抑制剂的活性。**结果** 改进后的方法添加高、中、低 3 个浓度水平胰蛋白酶抑制剂的回收率分别为 113.1%、114.6%、134.9%, 平行测定的 RSD 分别为 1.4%、3.6%、7.2%, 方法的准确性和重复性能满足实验的需求。**结论** 改进后的方法快速简便, 节约了时间和实验成本, 方法的准确性和重复性能满足实验的需求。

关键词: 豆浆; 胰蛋白酶抑制剂活性; 测定方法

Determination of trypsin inhibitor activity of soybean milk

YIN Shuai^{1,2}, JIANG Cheng-Jun¹, TIAN Hong¹, MENG Qing-Yu¹, LI Jian-He^{3*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences of Central South University, Changsha 410013, China; 2. Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China; 3. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT: Objective To study and improve some key factors influencing determination of trypsin inhibitor activity of soybean milk, based on the method of GB/T 21498-2008 *Determination of trypsin inhibitor activity of soya products*. **Methods** Soybean milk samples were extracted by water and diluted to a certain volume, with adding L-BAPA reagent and trypsin using liquid, and (37±0.25) °C water bath insulation for 10 min±5 s, then the enzyme reaction was ceased by adding acetic acid. The absorbance value was determined at the wavelength of 410 nm by spectrophotometer and the trypsin inhibitor activity was calculated by substituting into the formula. **Results** The average recoveries of low, medium and high concentrations of standard samples were 113.1%, 114.6% and 134.9%, and the RSDs of parallel determination were 1.4%, 3.6% and 7.2%, respectively. The accuracy and reproducibility of the method has met the satisfaction of the experiment. **Conclusions** The improved method is time-saving and low-cost, and had high accuracy and precision, which also meets the requirements of the experiment.

KEY WORDS: soybean milk; trypsin inhibitor activity; determination method

*通讯作者: 李健和, 副主任药师, 主要研究方向为新药开发。E-mail: lijianhexy@126.com

*Corresponding author: LI Jian-He, Associate Chief Pharmacist, Xiangya School of Medicine, Central South University, No.139, People's Road, Changsha 410011, China. E-mail: lijianhexy@126.com

1 引言

胰蛋白酶抑制剂是豆类籽粒中存在的一种抗营养因子。Westfall 等^[1]研究发现, 它能抑制胰蛋白酶活性, 降低蛋白质的生物利用率。如果在生产加工和制作过程中处理不当, 抗营养因子没有彻底灭活, 人或动物食用后就可能引起消化不良、中毒、甚至死亡^[2]。Hackler 等^[3]研究认为, 豆制品中应有 90% 以上的胰蛋白酶抑制剂活性被失活后, 才可认为该豆制品是安全的。据报道^[4], 在 100 °C 下煮沸 30 min 以上, 胰蛋白酶抑制剂可减少 91.45%。因此, 豆浆需要充分煮沸才能保证食用安全。

胰蛋白酶抑制剂的测定方法主要有 2 种: 电泳法和酶测定法。前者在国内外常用于定性鉴定, 后者则用于定量测定^[5]。GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》^[6](以下简称国标方法)是由 ISO 14902:2001《动物饲料 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》^[7](英文版)翻译的中文译本, 是测定大豆制品中胰蛋白酶抑制剂的现行有效的国家标准。本研究因实验对象豆浆, 与动物饲料存在较大的基质差异, 对国标的前处理方法等进行了研究与改进, 以期为食品检验工作的顺利开展提供快速准确、简便易行的方法。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

大豆, 市售; 豆浆, 市售。

牛胰蛋白酶 T8003(1~10000 BAEE, Sigma 公司); 胰蛋白酶抑制剂(大豆, 抑制胰蛋白酶率 \geq 4000 U/mg, 国药集团上海试剂厂); 苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺(L-BAPA, Sigma 公司); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯(国药集团上海试剂厂)。溶液配制参见 GB/T 21498-2008。

2.2 仪器与设备

紫外分光光度计(UV 2550, 日本岛津公司); 多功能仪表(pH 计, Seven Excellence, 瑞士梅特勒-托利多公司), 分度值 0.001; 智能循环水浴锅(德国 LAODA 公司), 控温精度 \pm 0.1 °C; 涡旋混合器(IKA VIBRAX VXR, 德国 IKA 公司); 秒表(上海秒表厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品提取

原国标方法: 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 至 9.5 \pm 0.1。用尽量少的水冲洗电极。将锥形瓶密封后置于冰箱中过夜(15~24 h)。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, 将容量瓶保存于冰箱中。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。稀释度取决于预期的样品 TIA 值, 在室温下用水稀释。

新方法: 称取豆浆样品(3 \pm 0.01) g 加入 250 mL 锥形瓶中, 加入 97 mL 水, 振荡提取 30 min, 静置 15 min, 取上清液做进一步处理。若供试品溶液的抑制百分率 $i \geq 60\%$, 则将供试品溶液加水稀释至一定体积, 直至抑制百分率 i 在 40%~60% 之间。

2.3.2 样品中胰蛋白酶抑制剂活性(trypsin inhibitor activity, TIA)的测定

根据表 1 分别吸取一定的溶液加入至离心管中。

表 1 胰蛋白酶抑制剂活性测定时各溶液加入量表(mL)
Table 1 The amount of each solution during determination of trypsin inhibitor activity(mL)

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

混匀离心管中溶液, 并置于(37 \pm 0.25) °C 水浴中保温 10 min。在上述各管中分别加入 1 mL 胰蛋白酶使用液, 混匀, 在水浴中保温 10 min \pm 5 s 后, 在标准管和样品管中各加入 1 mL 乙酸溶液, 混匀。用分光光度计, 于 410 nm, 用 10 mm 比色皿, 以水调零, 测定上清液吸光度。

2.3.3 结果计算

抑制百分率 i 和胰蛋白酶抑制剂活性 TIA 分别根据公式(1)和公式(2)^[8]计算。

$$i = \frac{(A_T - A_{br}) - (A_S - A_{bs})}{(A_T - A_{br})} \times 100\% \quad (1)$$

式中: i —抑制百分率; A_T —标准溶液的吸光度; A_{br} —

标准空白溶液的吸光度; A_s —样品溶液的吸光度; A_{bs} —样品空白溶液的吸光度。

$$TIA = \frac{i}{100\%} \times \frac{m_1 f_1 f_2}{m_0} \quad (2)$$

式中: TIA—胰蛋白酶抑制剂活性, mg/g; i —抑制百分率; m_0 —试样的质量, g; m_1 —胰蛋白酶的质量, mg; f_1 —样品提取液的稀释度; f_2 —根据胰蛋白酶的纯度和稀释倍数确定的换算系数。

3 结果与分析

3.1 苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺(L-BAPA)用量的研究

L-BAPA 是酶解反应的底物, 理论上应过量以保证胰蛋白酶反应完全。其价格昂贵且用量大, 是影响实验成本的重要因素。NY/T 1103.2-2006《转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养因素第2部分: 胰蛋白酶抑制剂的测定》^[9]标准中配制 100 mL L-BAPA 溶液只需 40 mg L-BAPA, 远低于国标的 60 mg。按照 GB/T 21498-2008, 进行胰蛋白酶活性的测定时, 0.4 mg/mL 的 L-BAPA 溶液与胰蛋白酶反应, 其吸光度值在 0.38±0.05 范围内, 说明低浓度的 L-BAPA 溶液能与胰蛋白酶充分反应, 已经满足实验要求。减少 L-BAPA 的使用量将大大节约实验成本。

3.2 样品前处理方法的研究

3.2.1 样品取样量的研究

GB 2712-2014《食品安全国家标准豆制品》^[10]中并未对豆浆进行术语解释。本研究对象是指 2011 年中国豆制品专业委员会组织起草的行业标准中规定的豆浆^[11], 即大豆(不包括豆粕及粉)经脱皮或不脱皮, 经浸泡或不浸泡, 加水研磨、加热等使蛋白质等有效成分溶出, 除去豆渣后所得的总固形物含量在 6.0%以上的乳状液。不含调制豆浆和豆浆饮料。豆浆的市场渠道主要以农贸市场、早餐摊点、餐厅、卖场为主^[12]。因早餐摊点消费量较大, 所以实验对象以该渠道现磨豆浆或简易纸杯包装的豆浆产品为主。为满足实验要求, 采用生豆粉作为质控样。

豆浆在加工过程中, 通过采用高温加热钝化的方法, 使胰蛋白酶抑制剂失去活性, 且豆浆的主要成分是水, 其胰蛋白酶抑制剂的活性远远低于生豆粉。

随机选择 10 批次豆浆进行试验, 结果统计表明, 若按照国标方法取 1 g 样品操作, 则 60%样品的抑制百分率(i)高于 60%, 20%样品的抑制百分率(i)低于 40%得不到检测结果。当样品取样量为 3 g 时, 50%样品 i 值在 40%~60%范围内。继续加大取样量, 不仅样品溶液浑浊, 对测定带来干扰, 而且 i 值容易低于 40%, 需要再稀释进行二次实验, 加大了检验工作量, 增加了实验成本。所以, 确定豆浆样品最佳取样量为 3 g。

3.2.2 提取时间的研究

国标方法要求样品的提取须在冰箱(4 °C)中过夜(15~24 h), 实验时间过长, 不利于快速检测。根据相关文献^[13,14]报道, 将样品加水至 100 mL, 振荡提取 30 min, 静置取上清液进行下一步操作并测定 TIA 值。结果测得生豆粉(60 目)的 TIA 值约 21 mg/g, 与文献测得值^[14]近似, 说明此方法能将胰蛋白酶抑制剂提取完全。豆浆是由豆子粉碎并加水蒸煮而成的, 使用该方法提取比生豆粉更完全。实验证明, 提取 18 h 与提取 0.5 h, 样品的 TIA 值均在 0.073~0.080 范围内, 无显著性差异。所以, 确定样品最佳提取时间为 0.5 h。

3.2.3 提取溶剂的研究

国标方法使用 50 mL 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液分散样品, 再用盐酸溶液调节 pH 值至 9.5±0.1, 操作繁琐, 且容易造成样品损失。参考文献^[13,14]的方法, 本实验直接用超纯水提取并进行测定。实验证明, 两种方法测定的 TIA 值均在 0.073~0.080 范围内, 无显著性差异。

3.2.4 样品溶液过滤、离心对测定结果影响的研究

国标方法在样品中胰蛋白酶与底物反应完后, 以 1500 g 的离心力(约 5000 r/min)离心 10 min, 用来沉淀样品溶液中的漂浮物。实验证明, 1500 g 的离心力对于豆浆样品中的漂浮物不能起到很好的沉淀效果, 而且溶液的吸光度值会偏低, 随着离心力增加(10000 r/min), 溶液的吸光度值甚至会低于样品空白, 说明显色物也被离心沉淀了。史艳宇等^[13]采用滤纸过滤的方法去除样品中的漂浮物, 结果表明样品不进行过滤处理除了使样品溶液在测试过程中吸光度增加外, 并未影响最终测定结果。吕耀昌^[14]的研究结果表明滤纸会吸附显色物, 造成测定结果偏低。本方法对样品溶液是否过滤进行实验考察, 结果表明采用滤纸过滤的方法确实会导致测定结果偏低。结果见表 2。

表2 提取液过滤、离心对 TIA 值影响
Table 2 Effects of filtration and centrifugation of trypsin inhibitor solution on determination results of TIA

	处理步骤	样品溶液的吸光度	样品空白溶液的吸光度	抑制百分率(<i>i</i>)	TIA 值(mg/g)
加 BAPA 前	不过滤、不离心	0.5501	0.3660	49.03	0.141
	过滤	0.5256	0.3383	48.15	0.138
	10000 r/min 离心	0.1926	0.1915	99.70	/
加 BAPA 后	过滤	0.4476	0.2508	45.51	0.131
	5000 r/min 离心	0.3349	0.2068	64.53	/
	10000 r/min 离心	0.1738	0.1860	103.38	/

3.3 样品测定方法的研究

3.3.1 酶反应时间的研究

国标方法对酶反应时间要求很严格,为 10 min±5 s。为研究酶反应时间对溶液吸光度的影响,设定了酶反应时间 10 min±30 s、10 min±20 s、10 min±10 s、10 min±5 s 及 10 min,结果表明随着酶反应时间延长,溶液的吸光度不断升高,本实验需要严格控制酶反应时间(10 min±5 s)。

3.3.2 酶反应后溶液稳定性研究

国标方法中说明酶反应后的溶液,至少可以保持稳定 2 h,即 2 h 内溶液能保持稳定。考虑到部分样品的抑制率较高,需要稀释重测,可能会超出 2 h。本试验设定了更长的放置时间,研究酶反应后溶液的稳定性。结果表明,酶反应后的初始吸光度值为 0.4018,放置 3 h 后吸光度值仍只有 0.4079,与初始值差别不大。但溶液的吸光度值随着放置时间延长会不断增加,因此不宜放置过长的时间,酶反应后的溶液可以保持稳定 3 h。

3.4 方法学研究

3.4.1 回收率实验

豆浆中胰蛋白酶抑制剂的活性是由胰蛋白酶与底物反应生成的显色物间接测定的。国标方法中未提供回收率的参考值。本研究购买了商品型的大豆胰蛋白酶抑制剂(国药集团生产,抑制胰蛋白酶率≥4000 U/mg),测定了其 TIA 值,并将其定量加入到已知 TIA 值的豆浆样品中,通过计算回收样品的 TIA 值求得方法的回收率。因国标方法规定待测样品溶液的抑制百分率(*i*)须在 40%~60%范围内,添加的高浓度和中浓度回收样品需稀释不同的体积才能满足测定要求。经过实验,添加的高浓度样品回收率为 111.38%~

114.05%,中浓度样品回收率为 108.14%~118.13%,低浓度样品回收率为 127.34%~145.76%。国标方法中重复性(*r*)和再现性(*R*)的极差值都很大,高于测定值的 50%,因此测得的回收率偏高是可以接受的。

3.4.2 重复性实验

取 6 份中浓度回收样品测定,作为重复性实验研究。其平均回收率为 114.6%,RSD 为 3.6%。实验表明,方法的重复性良好。

3.4.3 检出限

因国标方法中规定待测样品溶液的抑制百分率(*i*)须在 40%~60%范围内,方法的检出限无法通过实验得出其真实值。设定当样品取样量为 3 g,按本方法测定 *i* 值为 40%,代入国标的公式计算,TIA 值为 0.1 mg/g,该值为方法的检出限,低于国标方法的检出限(0.5 mg/g)。

4 讨论

(1) GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》中 TIA 值的计算需折算牛胰蛋白酶的纯度,并在标准中给出了某批次牛胰蛋白酶的纯度值为 56%,但该批次的牛胰蛋白酶市场上已无法买到。购买的 Sigma 公司的牛胰蛋白酶 T8802(≥10000 BAEE)和 T8003(1~10000 BAEE)均只检测了蛋白质纯度(93%~100%),无法提供牛胰蛋白酶的纯度值。

按照国标方法进行酶使用液活性的测定,牛胰蛋白酶 T8802 的吸光度值大于 0.7,超出了活性范围(0.380±0.050),不宜用于实验;牛胰蛋白酶 T8003 的吸光度值为 0.3612,满足使用要求。用牛胰蛋白酶 T8003 对国药集团提供的胰蛋白酶抑制剂进行 TIA 值测定,若假设该酶的纯度为 100%,则胰蛋白酶抑制剂的 TIA 值约 1400 mg/g,现实中不成立。因此,当

使用的酶按照国标方法配制,其吸光度值满足活性测定的要求,则其纯度可按56%计。

(2) 有报道^[15]指出不饱和脂肪酸干扰TIA的测定,但吕耀昌、史艳宇等^[13,14]的研究结果均表明样品(豆粉)脱脂与不脱脂,测定结果无显著差别。因豆浆样品看不到明显的油脂层,且国标的处理方法也无脱脂的步骤,故未对脱脂进行研究。

(3) 有文献^[13]指出国标方法的TIA值计算公式存在较大缺陷,未直接给出胰蛋白酶活力测试由U/mg单位转化或推论到纯度单位的测定方法与计算公式,无法进行结果计算。本研究按照文献提供的计算公式对同一份样品进行计算,结果与按国标方法计算的有较大差异。因此本次试验仍采用国标方法的公式计算豆浆样品的TIA值。希望权威部门在现有国内外研究基础上,组织相关单位,对GB/T 21498-2008《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》进行系统研究,进一步完善该标准,为检验工作开展提供技术依据。

(4) 本方法对试剂、器具、人员操作等要求较高,较易产生结果偏差,需对实验进行质量控制。因豆浆不易保存,不适合作为质控样品,故选择生豆粉(60目)作为质控样品。平行测定22份,生豆粉的平均TIA值为20.83 mg/g,标准偏差SD为1.01 mg/g。

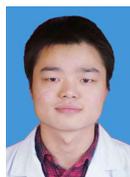
(5) 本研究针对现有实验方法对豆浆类样品处理存在的不足和缺陷进行了系统的改进和研究,在保证样品提取效果的前提下,确定了适合的取样量、提取时间和提取方法,大大减少了时间成本和实验成本,方法的重复性和精确度满足实验需求,改进后的方法使检验更快速、准确,满足实际检测工作需要。

参考文献

- [1] Westfall RJ, Hauge SM. The nutritive quality and trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures [J]. *J Nutr*, 1948, 35: 379-389.
- [2] 石慧, 张俊红. 大豆中抗营养因子的研究进展[J]. *孝感学院学报*, 2006, (5): 18-21.
Shi H, Zhang JH. Advances in soybean anti-nutritional factors [J]. *J Xiaogan Univ*, 2006, (5): 18-21.
- [3] Hackler LR. Effect of heat treatment on nutritive value of soymilk protein fed to weaning rats [J]. *Food Sci*, 1965, 30: 723.
- [4] 周红蕾, 李春玲, 王贵平, 等. 大豆中抗营养因子及其去除方法概述[J]. *饲料工业*, 2006, 27(3): 23-26.
- [5] Zhou HL, Li CL, Wang GP, *et al*. Brief introduction of soybean antinutritional factors and the way of getting rid of it [J]. *Feed Ind*, 2006, 27(3): 23-26.
- [5] 华蕾. 豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性测定方法的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
Hua L. Study on measurement method for trypsin inhibitor's activity of soya products [D]. Changchun: Jilin University, 2007.
- [6] GB/T 21498-2008 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定[S].
GB/T 21498-2008 Determination of trypsin inhibitor activity of soya products [S].
- [7] ISO 14902:2001 Animal feeding stuffs: Determination of trypsin inhibitor activity of soya products [S].
- [8] Wang HL, Swain EW, Wallen LL, *et al*. Free fatty acids as antitryptic factor in soybeans formulated by *Rhizopus oligosporus* [J]. *J Nutr*, 1975, 105: 1351-1355.
- [9] NY/T 1103.2-2006 转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素第2部分: 胰蛋白酶抑制剂的测定[S].
NY/T 1103.2-2006 Safety assessment of genetically modified plant and derived products Part 2: assay of anti-nutrients pancreatic trypsin inhibitor [S].
- [10] GB 2712-2014 食品安全国家标准 豆制品[S].
GB 2712-2014 National food safety standards of soy products [S].
- [11] SB/T 10633-2011 豆浆类[S].
SB/T 10633-2011 Soymilk [S].
- [12] 吴月芳. 我国豆浆行业的现状与展望[J]. *农产品加工·综合刊*, 2014, (3): 32-33.
Wu YF. Present situation and prospect of soybean milk industry in China [J]. *Farm Prod Proc*, 2014, (3): 32-33.
- [13] 史艳宇, 刘金华, 逢晓阳, 等. 豆制食品中胰蛋白酶抑制剂活性测定方法的改进[J]. *食品科学*, 2009, (30): 237-240.
Shi YY, Liu JH, Pang XY, *et al*. Improvement of the animal feeding stuffs-Determination of trypsin inhibitor activity of soybean products [J] *Food Sci*, 2009, (30): 237-240
- [14] 吕耀昌. 豆类胰蛋白酶抑制剂活度测定方法的研究[J]. *作物品种资源*, 1996, (1): 26-28.
Lv YC. Study on measurement method for trypsin inhibitor's activity of beans [J]. *Crop Var Res*, 1996, (1): 26-28
- [15] Wang HI, Swaln EW, Wallen LL, *et al*. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs [J]. *J Sci Food Agric*, 1980, 31: 341-350.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



殷 帅, 硕士研究生, 主管药师, 主要研究方向为食品、保健食品、化妆品的检验及质量控制。

E-mail: ys2275836@163.com



李健和, 副主任药师, 主要研究方向为新药开发。

E-mail: lijianhexy@126.com

“农药残留检测技术与风险评估”专题征稿函

农业产业化发展越来越依赖于现代农药的使用。农药使用为农产品生产、产量增长提供保障, 而不合理使用导致农产品中的农药残留超标, 影响消费者食用安全和污染环境。农药残留超标也影响农产品的贸易, 世界各国对各种农副产品中农药残留都做制定了越来越严格的限量标准。

鉴于此, 本刊特别策划了“农药残留检测技术与风险评估”专题, 由中国农业大学潘灿平教授担任专题主编。专题将围绕(1)食品中农药残留检测的前处理技术; (2)食品中农药残留快速检测方法、残留的分布规律与减低措施; (3)残留危害的风险评估、农药田间规范残留试验结果; (4)残留检测的规范化采样和检测不确定度研究; (5)农药残留环境和作物中的迁移、代谢和转化规律; (6)食品加工过程中农药残留的质与量的变化; (7)国际农药残留标准制定与限量标准的协调一致等多方面展开讨论, 计划在 2016 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 潘灿平教授和主编吴永宁研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2016 年 5 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部