



中华人民共和国国家标准

GB/T 21498—2008/ISO 14902:2001

大豆制品中胰蛋白酶抑制剂 活性的测定

Determination of trypsin inhibitor activity of soya products

(ISO 14902:2001, IDT)



2008-03-06 发布

2008-08-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
大豆制品中胰蛋白酶抑制剂
活性的测定

GB/T 21498—2008/ISO 14902:2001

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 17 千字

2008年5月第一版 2008年5月第一次印刷

*

书号: 155066·1-31357 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21498-2008

前 言

本标准等同采用 ISO 14902:2001《动物饲料 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》(英文版)。为了便于使用,本标准对 ISO 14902:2001 进行了下列编辑性修改:

- 将“本国际标准”改为“本标准”;
- 用小数点“.”代替原文中小数点“,”;
- 删去原标准名称中“动物饲料”一词,直接采用“大豆制品”;
- 将规范性引用文件中的“ISO 3696:1987 分析实验室用水 规格和试验方法”修改为“GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法”;
- 对有关表格增加了表头;
- 对有关公式进行了编号。

本标准的附录 A 是规范性附录,附录 B 是资料性附录。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:南京财经大学。

本标准主要起草人:鞠兴荣、袁建、汪海峰、杨晓蓉。

大豆制品中胰蛋白酶抑制剂 活性的测定

1 范围

本标准规定了大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定方法。胰蛋白酶抑制剂活性可以用来表示大豆制品的烘烤程度。

本标准适用于大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定。

本方法的检出限为 0.5 mg/g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

胰蛋白酶抑制剂活性 **trypsin inhibitor activity, TIA**

按照本标准所规定的程序测出的胰蛋白酶抑制剂质量除以试样质量所得的值。

注:胰蛋白酶抑制剂活性以 mg/g 表示。

4 原理

在 pH9.5 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)测量残余的胰蛋白酶活性。用分光光度法测定释放的对硝基苯胺的量。

5 试剂和材料

仅使用分析纯试剂。

5.1 水:最低 3 级,符合 GB/T 6682 要求。

5.2 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})=0.01 \text{ mol/L}$ 。

5.3 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$ 。

5.4 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=1 \text{ mol/L}$ 。

5.5 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

5.6 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.001 \text{ mol/L}$ 。

5.7 乙酸溶液: $c(\text{CH}_3\text{COOH})=5.3 \text{ mol/L}$ 。

5.8 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.9 氯化钙盐酸溶液:称取 0.735 g 氯化钙(5.8)溶解于 1 L 0.001 mol/L 盐酸溶液(5.6)中,调节 pH 至 3.0 ± 0.1 。

5.10 牛胰蛋白酶:Merck No 24579 或等效物¹⁾。

按 9.4 测定活性。储藏于冰箱(6.3)中。

5.11 胰蛋白酶储备液:将胰蛋白酶(5.10)放置至室温,称取胰蛋白酶 27.0 mg 置于 100 mL 容量瓶(6.1)中,以氯化钙盐酸溶液(5.9)溶解,并定容至刻度。该溶液保存于冰箱中最多可使用 5 d。

5.12 胰蛋白酶使用液:吸取胰蛋白酶储备液(5.11)5 mL 加入 100 mL 容量瓶(6.1)中,用氯化钙盐酸溶液(5.9)稀释至刻度。

5.13 苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺(L-BAPA)。

5.14 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。

5.15 二甲亚砜(DMSO)。

5.16 Tris-氯化钙缓冲溶液:称取 6.05 g Tris(5.14)和 0.735 g 氯化钙(5.8)溶于预先加入 900 mL 水的 1 000 mL 刻度量筒中,用 6 mol/L 盐酸溶液(5.3)调节 pH 值至 8.2 ± 0.1 ,加水稀释至 1 000 mL。

5.17 L-BAPAS 试剂:于使用当日制备。称取 60 mg L-BAPA(5.13)置于 100 mL 容量瓶中,用 1 mL DMSO(5.15)溶解,以 Tris-氯化钙缓冲溶液(5.16)稀释至刻度。

6 仪器

实验室常规仪器,特别是下列仪器设备:

6.1 容量瓶:100 mL。

6.2 比色皿:光程 10 mm。

6.3 冰箱:控制温度于 $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。

6.4 pH 计:分度值 0.05。

6.5 涡旋混合器。

6.6 分光光度计:适于在 410 nm 波长下进行测量。

6.7 秒表。

6.8 水浴:具循环泵,可保持温度于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ 。

6.9 粉碎设备:具 0.5 mm 筛网。

6.10 离心机:径向加速度约为 $1\,500g_n$ (g_n 为标准自由落体加速度, $g_n = 9.806\,65\text{ m/s}^2$)。

6.11 离心管。

7 采样

实验室接收的样品应具有真实的代表性,且在运输和储藏过程中未损坏或变质。

采样不是本标准所规定的方法中的内容,推荐采用 ISO 6497 规定的取样方法。

8 试样制备

用粉碎机粉碎部分代表性的样品,避免样品受热。充分混匀粉碎样品。

9 分析步骤

9.1 测定次数

如果需要检查重复性是否合适(11.2),按照 9.2 和 9.5 重复性条件进行两份单试样的测定。

9.2 样品提取

称取 $1\text{ g} \pm 0.001\text{ g}$ 制备的试样(第 8 章)加入 100 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 0.01 mol/L 氢氧化钠

1) Merck No24579 牛胰蛋白酶是一种合适的商业产品,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,但不表示对该产品的指定认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

溶液(5.2),将试样充分悬浮。用 1 mol/L 盐酸溶液(5.4)和 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)调节 pH 至 9.5 ± 0.1 。用尽量少的水冲洗电极。将锥形瓶密封后置于冰箱(6.3)中过夜(15 h~24 h)。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(6.1)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,样品提取液可保存 1 d。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。

9.3 样品提取液的稀释

估计样品的 TIA 值,参照表 A.1 稀释方案将样品提取液稀释三个不同稀释度,以便在三个抑制百分率中至少有一个 TIA 值的测定结果在 40%~60%之间。

如果三个测定结果中没有一个落在此范围内,则需要改变估计值并重新测定。

9.4 胰蛋白酶使用液活性的测定

检查每一批胰蛋白酶(5.10)的活性。使用液的吸光度和空白液的吸光度之间的差异($A_r - A_{br}$)应为 0.380 ± 0.050 ,否则,需要检查胰蛋白酶的质量。必要时,取用一瓶新鲜的胰蛋白酶。

依据表 1 吸取一定的溶液加入至离心试管中。

表 1 胰蛋白酶使用液活性测定时各溶液加入量表

单位为毫升

加入物	空白标准	标准
L-BAPA 溶液(5.17)	5	5
水(5.1)	3	3
乙酸(5.7)	1	0

用涡旋混合器(6.5)混匀离心试管中的溶液,并置于水浴(6.8)中保温 10 min。

在空白管和标准管中各加入 1 mL 胰蛋白酶使用液(5.12),用涡旋混合器(6.5)将管内溶液混匀。将离心管放回到水浴中。在保温 $10 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$ 后。在标准管中加入 1 mL 乙酸溶液,用涡旋混合器(6.5)混匀。

将离心管置于离心机(6.10)中,以径向加速度约为 $1\,500 g_n$ 离心 10 min。

用分光光度计(6.6),于 410 nm,用 10 mm 比色皿(6.2),以水调零,测定上清液的吸光度。

该溶液可保持稳定至少 2 h。

9.5 胰蛋白酶抑制剂活性的测定

按表 2 吸取一定的溶液加入至各离心管中。

每一样品提取液(9.3)的稀释液均需准备相应的空白溶液。样品提取液和相应的空白溶液在测定过程中应同时进行操作(包括离心)。

表 2 胰蛋白酶抑制剂活性测定时各溶液加入量表

单位为毫升

加入物	空白标准	标准	空白样品	样品
L-BAPA 溶液(5.17)	5	5	5	5
试样稀释液	0	0	1	1
水(5.1)	3	3	2	2
乙酸溶液(5.7)	1	0	1	0

用涡旋混合器(6.5)混匀离心试管中溶液,并置于水浴(6.8)中保温 10 min。在上述试管中各加入 1 mL 胰蛋白酶使用液(5.12)。用涡旋混合器将管内溶液混匀后,将试管放回到水浴(6.8)中。保温 $10 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$ 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(6.10)中,以径向加速度约为 $1\,500 g_n$ 离心 10 min。

用分光光度计(6.6),于 410 nm,用 10 mm 比色皿(6.2),以水调零,测定上清液的吸光度。

该溶液可保持稳定至少 2 h。

10 结果计算

10.1 样品提取液的抑制百分率按式(1)计算。

$$i = \frac{(A_r - A_{br}) - (A_s - A_{bs})}{(A_r - A_{br})} \times 100\% \quad \text{.....(1)}$$

式中:

i ——抑制百分率;

A_r ——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。

10.2 胰蛋白抑制剂活性

按式(2)计算胰蛋白酶抑制剂的活性(TIA),以每克样品抑制胰蛋白酶毫克数(mg/g)表示。

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

式中:

TIA——胰蛋白酶抑制剂活性,单位为毫克每克(mg/g);

i ——抑制百分率;

m_0 ——试样的质量,单位为克(g);

m_1 ——胰蛋白酶的质量,单位为毫克(mg);

f_1 ——样品提取液的稀释度(100 mL×100 mL/ F ,其中 F 为表 A.1 所示理论稀释度, mL/100 g);

f_2 ——根据胰蛋白酶的纯度(56%,见参考文献[1]、[2])和按 5.11 和 5.12 稀释时的换算系数,
 2.8×10^{-4} 。

计算结果精确至 0.1 mg/g。

11 精密度

11.1 实验室间比对试验

附录 B 总结了本方法精密度的实验室间测试情况。从这些测试中得到的数值可能并不适用于其他的浓度范围和样本。

11.2 重复性

在同一实验室中,由同一操作人员,使用同一设备,在较短的时间间隔内,用同样的方法对同一实验材料所做的两份独立单实验所得测试结果之间的绝对差值,超过表 3 所示重复性极限值的概率应小于 5%。

表 3 重复性(r)极限值和再现性(R)极限值

样品	胰蛋白酶抑制剂活性	r	R
大豆 1	1.53	0.18	1.11
大豆 2	1.30	0.09	2.11
烘烤过的大豆	2.08	1.03	1.88

11.3 再现性

在不同的实验室中,由不同的操作人员,使用不同的设备,用同样的方法对同一实验材料所做的两份单实验,所得测试结果之间的绝对差值,超过表 3 所示再现性极限值的概率应小于 5%。

12 检验报告

检验报告应详细说明：

- 应包括鉴定样品所必需的全部信息；
- 采样方法(如已知)；
- 本标准所涉及的测定方法；
- 还应说明本标准中没有具体说明的、或者被认为是可选性的，以及所有可能影响了测试结果的操作细节；
- 测定结果。如果进行了重复性试验，应说明两次测定的结果和平均结果。



附 录 A
(规范性附录)
样品提取液稀释方案

表 A.1 给出了样品提取液的稀释方案。图 A.1 和图 A.2 显示了样品稀释方案的图解实例。

表 A.1 样品提取液的稀释表

预计的 TIA/ (mg/g)	不同抑制百分率的理论稀释度(F)/ (mL/100g)		
	40%	50%	60%
0.5	61	76	91
1.0	30	38	45
1.5	20	25	30
2.0	15	19	23
2.5	12	15	18
3.0	10	13	15
3.5	8.6	11	13
4.0	7.6	9.5	11
4.5	6.7	8.4	10
5.0	6.0	7.6	9.1
6	5.0	6.3	7.6
7	4.3	5.4	6.5
8	3.8	4.7	5.7
9	3.4	4.2	5.0
10	3.0	3.8	4.5
11	2.7	3.4	4.1
12	2.5	3.2	3.8
13	2.3	2.9	3.5
14	2.2	2.7	3.2
15	2.0	2.5	3.0
16	1.9	2.4	2.8
17	1.8	2.2	2.7
18	1.7	2.1	2.5
19	1.6	2.0	2.4
20	1.5	1.9	2.3
25	1.2	1.5	1.8

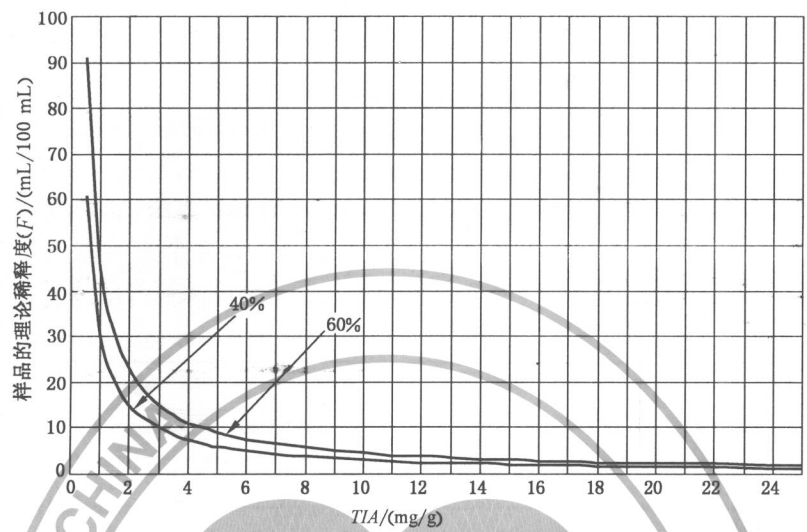


图 A.1 胰蛋白酶抑制剂活性与样品理论稀释度(F)的关系

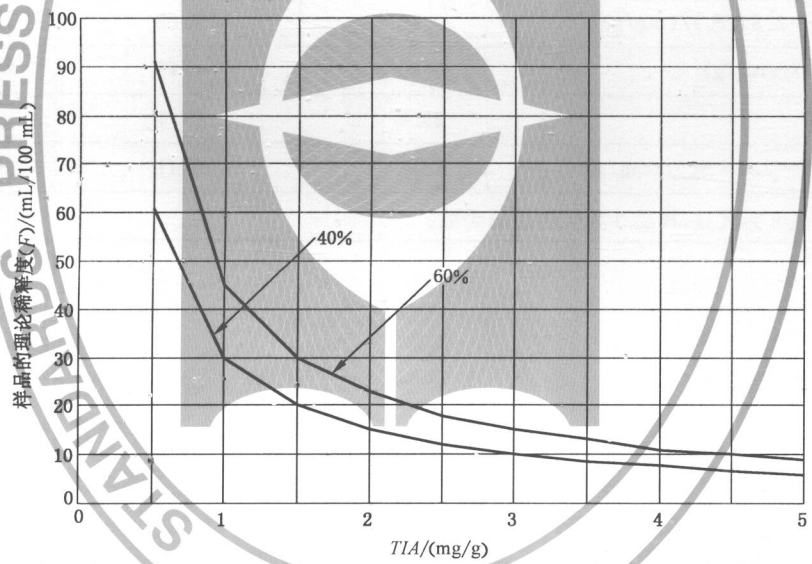


图 A.2 胰蛋白酶抑制剂活性与样品理论稀释度(F)的关系
(图 A.1 中部分的放大)

附 录 B
(资料性附录)

实验室间比对试验结果

根据 ISO 5725-1^[3] 和 ISO 5725-2^[4] 关于重复性和再现性的测定方法,1998 年进行的实验室间比对实验确定了本方法的精密度。为了测定本方法的重复性极限值,由 7 个实验室进行了大豆样品的双试验分析,为了测定本方法的再现性极限值,由 7 个实验室进行了两份大豆样品及一份烘烤大豆样品的单试验分析。

参 数	样 品 ^a		
	1	2	3
实验室数目	7	7	7
排除异常值后的实验室数目	7	7	7
胰蛋白酶抑制剂活性平均值/(mg/g)	1.53	1.30	2.08
重复性标准偏差(S_r)/(mg/g)	0.06	0.03	0.37
重复性变异系数/%	4.18	2.31	1.03
重复性极限值(r)($r=2.8 \times S_r$)/(mg/g)	0.18	0.09	1.03
再现性标准偏差(S_R)/(mg/g)	0.40	0.75	0.67
再现性变异系数/%	25.9	57.7	35.7
再现性极限值(R)($R=2.8 \times S_R$)/(mg/g)	1.11	2.11	1.88
^a 样品 1 和样品 2 为大豆,样品 3 为烘烤过的大豆。			

参 考 文 献

- [1] KAKADE M L, SIMONS N, LIENER I E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.* ,46,1969,518-526.
 - [2] SMITH C, VAN MEGEN W, TWAALFHOVEN L, HITCHCOCK C. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* ,1980,31:341-350.
 - [3] ISO 5725-1: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions.
 - [4] ISO 5725-2: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
 - [5] ISO 6497, Animal feeding stuffs—Sampling.
 - [6] ISO 6498:1983, Animal feeding stuffs—Preparation of test sample.
-