

团 体 标 准

T/CHC XXX—2025

白芸豆提取物中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性的测定 分光光度法

Determination of  $\alpha$ -amylase inhibitory activity in white kidney bean extract by spectrophotometric method

(征求意见稿)

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

中国保健协会 发布



# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 试剂和材料 .....	1
5.1 试剂 .....	1
5.2 试剂配制 .....	1
6 仪器设备 .....	2
7 分析步骤 .....	2
7.1 麦芽糖标准曲线的制作 .....	2
7.2 样品的处理 .....	2
7.3 反应体系 .....	3
7.4 $\alpha$ -AI 抑制活力的测定和计算 .....	3
8 精密度 .....	4
参考文献 .....	5

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由云南天保桦生物资源开发有限公司提出。

本文件由中国保健协会归口。

本文件起草单位：XXXXXX。

本文件主要起草人：

# 白芸豆提取物中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性的测定 分光光度法

## 1 范围

本文件规定了分光光度法的原理、试剂和材料、仪器、分析步骤、精密度的要求。  
本文件适用于白芸豆提取物中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性测定。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**白芸豆提取物 white kidney bean extract**

以白芸豆种子为原料制得的，含有 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性的天然提取物。

### 3.2

**$\alpha$ -淀粉酶抑制剂  $\alpha$ -amylase inhibitor**

一类具有抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性的天然生物活性物质。

以下简称“ $\alpha$ -AI”。

## 4 原理

白芸豆提取物中含有 $\alpha$ -AI，其可抑制 $\alpha$ -淀粉酶对淀粉的水解，进而抑制麦芽糖的生成，通过反应体系中麦芽糖的生成量可计算出白芸豆提取物对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制活力。麦芽糖的生成量越低则代表白芸豆提取物中 $\alpha$ -AI的活力越高。

## 5 试剂和材料

### 5.1 试剂

5.1.1 十二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

5.1.2 氯化钠( $\text{NaCl}$ )

5.1.3 可溶性淀粉

5.1.4 猪胰 $\alpha$ -淀粉酶(10080-25G)

5.1.5 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )

5.1.6 3,5-二硝基水杨酸(98%)

5.1.7 四水酒石酸钾钠

5.1.8 苯酚

5.1.9 亚硫酸钠(98%)

5.1.10 麦芽糖(97%)

5.1.11 柠檬酸

5.1.12 除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

### 5.2 试剂配制

5.2.1 2 mg/mL 麦芽糖标准溶液

称取0.200 g麦芽糖（干基计算）置于烧杯中，加适量水溶解后，倒入100 mL容量瓶中，然后用水分3次反复润洗烧杯，将润洗水倒入容量瓶，用水定容至 100 mL。

### 5.2.2 PBS 缓冲液

称取45.23 g 十二水磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）置于烧杯中，加350 mL水搅拌至完全溶解。称取8.07 g柠檬酸置于烧杯中，加约100 mL水搅拌至完全溶解。将柠檬酸溶液缓慢加入十二水磷酸氢二钠溶液中，至pH=6.0后定容至1000 mL。

### 5.2.3 0.1mol/L 盐酸溶液

量取8.6 mL浓盐酸，加水定容至1000 mL。

### 5.2.4 2 mg/mL 可溶性淀粉溶液

称取1.00 g可溶性淀粉于烧杯中，加入约200 mL水，搅拌分散后于电炉上加热至完全透明（沸腾后保持20~30 s），冷却后用水定容至500 mL，现配现用。

### 5.2.5 DNS 试剂

DNS试剂按以下步骤进行配置：

- 2 mol/L NaOH 溶液：称取 21.0g NaOH，用水溶解于 262 mL 水中。
- 称取 6.3 g DNS，缓慢加入到 45℃水浴中保温的 2 mol/L 262 mL NaOH 溶液中。
- 将 185.0 g 四水酒石酸钾钠溶解于 500 mL 水中后与 b) 中所得溶液混合，一起于水浴锅中搅拌至 DNS 溶解。
- 称取 5.0 g 苯酚和 5.0 g 无水亚硫酸钠溶解于 c) 中所得溶液。
- 冷却后用水定容至 1000 mL，放于棕色瓶中一周后使用。

## 6 仪器设备

- 分光光度计。
- 分析天平：感量 0.1 mg。
- pH 计：测量精度±0.01。
- 恒温水浴锅：控温范围 0 ℃~100 ℃，控温精度±0.5 ℃。
- 涡旋混合器。
- 磁力搅拌器。
- 计时器：秒表或电子计时器，分度值 1 s。
- 带盖离心管：总容量不小于 15 mL。
- 普通玻璃试管：用于制作标准曲线及显色反应。
- 移液器：配备 10 μL~1000 μL 及 1 mL~5 mL 量程的移液器，并配有相应吸头。
- 容量瓶：50 mL、100 mL、500 mL、1000 mL 等。
- 烧杯、量筒等一般实验室器具。

## 7 分析步骤

### 7.1 麦芽糖标准曲线的制作

取8只试管编号，分别加入麦芽糖标准溶液（浓度为2.00 mg/mL）0、1、2、3、4、5、6、7 mL，用水将各试管中液体体积补足至7 mL。向各试管中加入2.5 mL PBS缓冲液和5 mL 盐酸溶液（0.1 mol/L），混匀（如表1）后各取 1mL溶液，向各试管中加入1 mL DNS，沸水浴中水浴10 min，立即置于冰水浴中冷却，向各试管中加入 5 mL纯水，振荡混匀后，于540 nm 波长下测定吸光度值。以0号管作空白（不含麦芽糖管），以麦芽糖含量为横坐标(x)，吸光度值(y)为纵坐标，绘制标准曲线。

### 7.2 样品的处理

#### 7.2.1 试样溶液的制备

称取约0.30 g白芸豆提取物(可适当调整配置浓度,将 $\alpha$ -AI抑制率控制在30%~60%范围)置于250mL烧杯中,加水至100mL,磁力搅拌使其完全分散,取混合液作为供试品溶液。

### 7.2.2 $\alpha$ -淀粉酶溶液的制备

称取一定量的猪胰 $\alpha$ -淀粉酶(0.02±0.01g),用水定容至100 mL,摇匀后放置约30min。取上清液作为酶标准液(用于作为酶对照和样品结合溶液),现配现用。

注:可根据酶液活力进行浓度调整,将酶对照管(A3)体系中的淀粉水解约60%~85%。

### 7.2.3 试样溶液与 $\alpha$ -淀粉酶溶液的制备

准确吸取上述8.2.1中试样溶液和8.2.2中 $\alpha$ -淀粉酶溶液各5mL置于15 mL带盖离心管中,混合均匀,使溶液体系均匀(用于抑制管A4使用)。同时,吸取10 mL $\alpha$ -淀粉酶溶液于另一只试管中(用于酶对照管A3使用),将上述试管置于37°C水浴中预热8 min,临用前精密控制时间加入。

注:加入前不能剧烈摇晃溶液,避免淀粉酶与提取物结合物分离。

## 7.3 反应体系

按下表依次吸取各溶液加入各试管中(加入水、PBS、淀粉溶液后,放入37°C水浴预热8min,将体系溶液温度提升至酶解适宜温度),再按照表3中酶对照管(A3)和抑制管(A4)要求加入相应的酶溶液和结合液,将各样品管于37°C水浴中准确反应5min(秒表计时,建议每个处理间隔20s,便于操作),待酶解时间达到5min时,立即加入5mL 0.1mol/L稀盐酸终止反应。摇匀后用于 $\alpha$ -AI活力的测定。

表1  $\alpha$ -AI 活性测定反应体系

项目	水(mL)	PBS(mL)	淀粉溶液(mL)	样品+酶液(mL)	酶液(mL)	样品(mL)
空白管(A1)	7	2.5	0	0	0	0
对照空白管(A2)	2	2.5	5	0	0	0
酶对照管(A3)	1	2.5	5	0	1	0
抑制管(A4)	0	2.5	5	2	0	0
抑制对照管(A5)	1	2.5	5	0	0	1

注:空白管A1:不添加任何样品;对照空白管(A2):测定 $\alpha$ -淀粉酶溶液的还原糖;抑制对照管(A5):不加 $\alpha$ -淀粉酶;酶对照管(A3):控制淀粉酶的配置浓度;抑制管(A4):控制试样溶液的配制浓度;抑制对照管(A5):测定白芸豆提取物中的还原糖/淀粉含量情况。

## 7.4 $\alpha$ -AI 抑制活力的测定和计算

### 7.4.1 测定

取8.3中溶液1mL,向各试管中加入1 mL DNS,沸水浴中水浴10 min,立即置于冰水浴中冷却,向各试管中加入5 mL纯水,振荡混匀后,于540 nm波长下测定吸光度值。

### 7.4.2 活性的定义及计算

1g白芸豆提取物,在37°C、pH6.0的反应条件下,1min内抑制 $\alpha$ -淀粉酶将淀粉链切断成1微摩尔( $\mu$ mol)麦芽糖的量,即为 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性,以U/g表示。按公式1或公式2计算。 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的活力应在80 U/g~120 U/g,若不在此范围需调整测试所用 $\alpha$ -淀粉酶浓度。

$$\theta_1 = \frac{(M_3 - M_4) - (M_5 - M_2)}{M \times T \times 342.3} \times F \times 10^6 \dots \dots \dots (1)$$

$$\theta_1 = \frac{(A_3 - A_4) - (A_5 - A_2)}{M \times B \times T \times 342.3} \times 100 \times 10^6 \dots \dots \dots (2)$$

式中:

- $\theta_1$  ——淀粉酶抑制剂活性(U/g);
- M ——白芸豆提取物的取样量(g);
- $M_2$  ——对照空白管的还原糖(g);
- $M_3$  ——酶对照试管的还原糖(g);

- M<sub>4</sub>——抑制管的还原糖（g）；
- M<sub>5</sub>——抑制对照管的还原糖（g）；
- B ——麦芽糖标准曲线回归方程中的斜率；
- A<sub>2</sub>——对照空白管的吸光度；
- A<sub>3</sub>——酶对照管的吸光度；
- A<sub>4</sub>——抑制管的吸光度；
- A<sub>5</sub>——抑制对照管的吸光度；
- T ——反应时间（5 min）；
- F ——样品的稀释倍数，100；
- 10<sup>6</sup>——克与微克的单位转化系数。

### 7.4.3 抑制率

按照DNS法中各处理得到的吸光值，按公式3或公式4计算样品的抑制率。样品的AR值应在20%~50%之间，否则需要调整粉末样品与PBS的比例。

$$AR = \left(1 - \frac{A_4 - A_5}{A_3 - A_2}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

$$AR = 100 - 100 \times (A_4 - A_5) / (A_3 - A_2) \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- AR——抑制率；
- A<sub>2</sub>——对照空白管的吸光度。
- A<sub>3</sub>——酶对照管的吸光度；
- A<sub>4</sub>——抑制管的吸光度；
- A<sub>5</sub>——抑制对照管的吸光度；

### 8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

## 参 考 文 献

- [1] 俞超华、曾傲琼白芸豆提取物中.  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性检测方法对比分析[A], 安徽农学通报 2024, 01: 88-94.
-