



太湖蓝藻水华胰蛋白酶抑制剂的含量测定

汤晓智, 敖宗华, 孙志浩, 熊筱晶, 陶文沂

(无锡轻工大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用紫外分光光度法对太湖蓝藻提取液中的胰蛋白酶抑制剂进行了含量测定, 测定的线性范围在 4~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 此法简单方便, 精密度和回收率均较理想.

关键词: 蓝藻, 胰蛋白酶抑制剂, 紫外分光光度计

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

Determination of Content of Trypsin Inhibitors in Waterbloom of the Cyanobacterium from Taihu Lake

TANG Xiao-zhi, AO Zong-hua, SUN Zhi-hao, XIONG Xiao-jing, TAO Wen-yi

(School of biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: Content of trypsin inhibitors in extracts of cyanobacterium from Taihu lake was determined by UV spectrophotometry in this paper. The linear range of determination method is 4~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This method was simple and convenient with satisfactory precision and recovery.

Key words: cyanobacterium; trypsin inhibitors; UV spectrophotometry

20 世纪 90 年代, 太湖流域水质严重富营养化, 导致每年夏季蓝藻水华爆发, 蓝藻水华的迅速爆发和死亡进而导致太湖水质更加恶化, 影响了居民的生活健康. 因此, 迅速去除蓝藻水华以防止其在沿岸的聚集和腐败是改善水质的主要方法. 日本已成功地将特制的捕捞船通过捞取去除水华^[1], 如能利用蓝藻开发新药, 提高其水华经济价值, 将会极大地推动收集的力度.

产生太湖蓝藻水华的藻类是铜锈微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*). 作者通过近 3 年的研究, 发现太湖蓝藻水华中含有大量的胰蛋白酶抑制剂. 胰蛋白酶抑制剂在临床上有着重要的应用价值, 可用于治疗急性胰腺炎等胰腺或胰周感染性疾病^[2], 还可用于肺气肿、脑水肿及脑缺血等疾病的治疗^[3]. 太

湖蓝藻中提取得到的胰蛋白酶抑制剂由于其活性高、相对分子质量小因而有可能成为开发此类新药的首选^[4]. 目前, 蓝藻中胰蛋白酶抑制剂提取过程的定量方法国内外尚未有报道, 作者采用紫外分光光度法测定提取液中胰蛋白酶抑制剂的含量, 结果令人满意.

1 材料与方

1.1 仪器

UV7500 紫外-可见分光光度计

1.2 试剂及材料

胰蛋白酶(1:250) 华美生物工程公司提供;
TAME(对苯甲磺酰-L-精氨酸甲酯酸盐) 上海丽

珠东风生物技术有限公司提供;胰蛋白酶抑制剂 aeruginosin98-A 纯品(经核磁谱、质谱等鉴定)^[4];蓝藻干粉 作者于1999年9月采集,喷雾干燥后在低温干燥状态下保存。

1.3 方法

1.3.1 胰蛋白酶活性的测定 参照文献[5]进行。

1.3.2 胰蛋白酶抑制剂样品活性的测定

抑制剂样品活性是指抑制剂样品对胰蛋白酶活性的抑制能力。作者在每批样品活性测定的同时,测定一空白对照,即不加样品的酶活性。胰蛋白酶的抑制率可用下式表示: $\eta = 1 - U_i / U_0$

式中: η (%)为胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶的抑制率, U_i 为加酶抑制剂后的酶活, U_0 为不加抑制剂的酶活。

抑制剂活性单位定义为:同样条件下,降低一个酶活性单位所需的抑制剂量。

1.3.3 胰蛋白酶抑制剂 标准样品溶液和待测样品的配制取 aeruginosin98-A 标准样品 1.000 mg,甲醇溶解后定容于 10 mL 容量瓶中,得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准样品液,再分别稀释至 4、10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待测定;取蓝藻干粉 5 g,室温下,用 90% 乙醇按质量体积比 1:10 浸提 24 h,抽滤,取清液待测。

1.3.4 实验条件的选择

1) 线性关系 在 1cm 的比色皿中加入 0.3 mL TAME 底物溶液,精密吸取标准样品溶液(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.005 mL,再用 Tris-HCl 缓冲液补充至 2.9 mL,摇匀,调温至 25 $^{\circ}\text{C}$,迅速加入 0.1 mL 酶液,在 247 nm 处测定。以未加样品的胰酶活性为空白对照,计算出胰酶相对剩余酶活及抑制率。用同样的方法测定 10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准样品溶液,以抑制率为纵坐标,酶抑制剂浓度为横坐标,作曲线,结果见图 1。

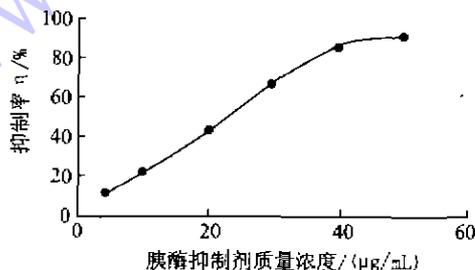


图 1 胰酶抑制剂质量浓度-抑制率图

Fig.1 The relationship between trypsin inhibitor concentration and inhibitory ratio

由上图取线性范围内数据作标准曲线,其回归方程为 $y = 2.1017x + 1.3427$, $r = 0.9996$ 。

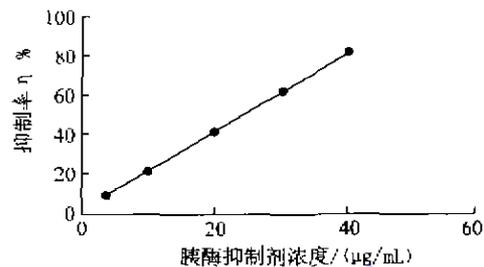


图 2 标准曲线

Fig.2 Standard curve

2) 样品的测定 将待测样品按以上测定方法测定,得到胰酶抑制剂抑制率,在标准曲线上查得相应胰蛋白酶抑制剂的质量浓度,从而推算提取得率。

3) 精密度测定 取同一批蓝藻干粉,称取 6 份,每份 5 g.在室温下用 90% 的乙醇按质量体积比 1:10 浸提,测定推得样品中胰酶抑制剂质量浓度,进一步算出平均提取得率为 0.0298%,RSD 为 1.6% ($n = 6$) 见表 1。

表 1 样品液精密度实验结果

Tab. 1 The results of the precision tests

编号	提取得率 / %	平均提取得率 / %	RSD / %
1	0.0290	0.0298	1.6
2	0.0296		
3	0.0293		
4	0.0302		
5	0.0300		
6	0.0306		

4) 稳定性实验 取待测样品在室温放置 24 h 内多次测定,结果较稳定,RSD=1.7%。见表 2。

表 2 样品液稳定性实验结果

Tab.2 The results of stability tests

时间 / h	抑制剂质量浓度 / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0.0290
4	0.0296
8	0.0302
12	0.0289
16	0.0290
24	0.0292

5) 加样回收率实验 取待测样品液进行加样回收率实验。取 5 mL 样品液加入 1 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液,稀释至 10 mL 进行测定,计算得平均回收率为 103.4%,RSD 为 1.9% ($n = 6$),结果见表 3

表3 样品加样回收率实验结果
Tab.3 The results of recovery tests

测定 样品 件号	实际 加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/%
1	189.74	100	295.46	102.0	
2	189.74	100	305.70	105.5	
3	189.74	100	290.35	100.2	103.4
4	189.74	100	305.70	105.5	
5	189.74	100	300.58	103.7	
6	189.74	100	300.58	103.7	

2 讨论

2.1 定量测定方法建立的依据

关于胰蛋白酶抑制剂的定量测定方法, 尚未见

报道, 虽可以用高压液相色谱法进行测定, 但操作复杂, 设备投资大. 出于经济实用的角度考虑, 选择紫外分光光度计测定抑制酶的活性作为其定量测定方法, 简单方便, 实验结果令人满意. 由于杂质不会引起吸光度的连续性改变, 从而克服了紫外法受杂质影响大的缺点, 使化合物的定量分析结果较为准确.

2.2 定量测定方法应注意的问题

由于本定量方法是建立在胰蛋白酶活性测定方法的基础之上的, 因此应注意测定过程中的温度和 pH 值的控制. 胰蛋白酶酶反应的最适温度为 25℃ 左右, 最适 pH 值为 7~9^[5], 因此测定温度应尽量保持在 25℃ 左右, pH 值主要取决于 Tris 缓冲液的确配制.

参考文献:

- [1] 张晓江. 日本霞浦湖微囊藻的处理与资源化[J]. 环境导报, 1996, (2): 41~43.
- [2] 张泰昌. 蛋白分解酶抑制剂在急性胰腺炎治疗中的应用[J]. 国外医学·消化系统疾病分册, 1994, 14(1): 39~43.
- [3] 郭准莲, 董为伟. 胰蛋白酶抑制剂在脑水肿和脑缺血防治研究中的应用[J]. 国外医学·内科学分册, 1994, 24(7): 298~300.
- [4] 敖宗华. 太湖蓝藻水华胰蛋白酶抑制剂的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1999.
- [5] B. 施特尔马赫著. 酶的测定方法[M]. 北京: 轻工业出版社, 1992.

(责任编辑: 宋明)