

马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶的提取及酶学性质的研究刘泽玉¹, 苏拓僮¹, 杨 明^{1*}, 邹文铨²

(1 成都中医药大学, 四川 成都 610000; 2 四川大学, 四川 成都 610000)

摘要:目的 建立 pNPG 法测定马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶的活性, 研究马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶的基本酶学性质, 为进一步阐明青黛炮制原理提供依据。方法 采用 pNPG 法考察马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶活性测定的最佳条件。结果 最适反应条件为总反应体积 1 mL, 反应时间 45 min, 底物 pNPG 体积 0.2 mL, 浓度 25 mmol/L, 缓冲液 pH 值 6, 反应温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下研究马蓝叶的粗酶液中 β -葡萄糖苷酶的基本酶学性质, 结果表明该酶在 30~60 $^{\circ}\text{C}$ 热稳定性较差。该酶在 pH 5.0~7.0 比较稳定, 而在酸性条件下酶活下降较快, 酶的 pH 值稳定性范围较窄。酶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下的保存稳定性较好。结论 确定了测定马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶活性的最佳条件, 探索了马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶的酶学性质, 该酶的热稳定性、pH 值稳定性和保存稳定性的研究为青黛炮制原理的研究奠定了理论依据。

关键词: 马蓝叶; pNPG 法; 最适反应条件; β -葡萄糖苷酶活性

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1461-04

Extraction and enzymatic properties of β -glucosidase in leaves of *Baphicacanthus cusia*LIU Ze-yu¹, SU Zhe-tong¹, YANG Ming¹, ZOU Wen-quan²

(1 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, China; 2 Sichuan University, Chengdu 610000, China)

Abstract: **Objective** To establish pNPG method for activity study of β -glucosidase in *Baphicacanthus cusia* and investigate the basic enzymatic properties, then provide accordance for further study on processing principle of *Indigo Naturalis*. **Methods** pNPG Method was adopted to investigate the optimum conditions for activity study of β -glucosidase. **Results** The optimum conditions were as following: the reaction volume was 1 mL, the reaction time was 45 min, the volume of substrate pNPG was 0.2 mL, the concentration was 25 mmol/L, the pH value of buffer solution was 6, and the reaction temperature was 55 $^{\circ}\text{C}$. Besides this, we investigated basic enzymatic properties of β -glucosidase in *B. cusia*. It indicated that β -glucosidase was unstable under 30–60 $^{\circ}\text{C}$, while it was stable under 4 $^{\circ}\text{C}$. It was stable under pH 5.0–7.0 and its activity decline rapidly acidic condition which manifested that the pH stability scope was narrow. **Conclusion** Through researching for optimum conditions of activity and enzymatic properties of β -glucosidase, we draw the conclusion of thermal stability, pH stability, and stability in storage. Then this lay the foundation of further study on processing principle of *Indigo Naturalis*.

Key words: the leaves of *Baphicacanthus cusia* Bremek.; pNPG method; optimum conditions of reaction; β -glucosidase activity

β -葡萄糖苷酶(EC3, 2, 1, 21)又称为 β -D-葡萄糖苷酶, 属于纤维素酶类, 存在于自然界许多植物体、酵母、曲霉菌、木霉菌属及细菌内^[1]。目前国内对植物来源的 β -葡萄糖苷酶的研究主要集中在茶叶、栀子花、茉莉花等方面, 主要研究其在植物醇系香气的形成中所起的重要作用^[2-5]。传统饮片青黛的炮制工艺中, 马蓝叶浸泡过程即吡啶苷在 β -葡萄糖苷酶的作用

下水解为吡啶酚的过程。本实验采用 pNPG 法对马蓝叶中细胞外酶 β -葡萄糖苷酶的提取和活性测定条件进行了探讨, 并且对 β -葡萄糖苷酶酶学特性进行了相关研究, 为阐明马蓝叶浸泡环节水解机制、工艺及青黛炮制原理研究提供了理论基础。

1 仪器与试剂

UV-1700 紫外可见分光光度计(日本岛津);

* 收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772784)

作者简介: 刘泽玉(1986—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新技术。

Tel: (028) 61800127 E-mail: 409192399@qq.com

* 通讯作者 杨 明 E-mail: yangming16@126.com

BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius, 0. 01 mg);SZ—93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);TGL—16G 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

马蓝叶由四川江油恒源药业提供, 经成都中医药大学药教研室郭晓恒博士鉴定。对硝基苯-β-D-葡萄糖苷(pNPG)、对硝基苯酚(≥98%), Sigma 公司产品;柠檬酸、磷酸二氢钠、碳酸钠、氢氧化钠均为 AR 级, 水为双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 对硝基苯酚标准曲线的绘制: 在一定条件下, β-葡萄糖苷酶能够水解对硝基苯-β-D-葡萄糖苷中的糖苷键, 生成对硝基苯酚, 在碱性条件下显黄色, 可以通过比色法测定该黄色物质, 进而计算出 β-葡萄糖苷酶的活力。以 1 mol/L 碳酸钠溶液作为溶剂, 配成 1. 73、3. 46、4. 33、5. 12、6. 93、10. 39 μg/mL 对硝基苯酚标准溶液。以 1 mol/L 碳酸钠溶液为空白, 在紫外可见区扫描其最大吸收峰, 以对硝基苯酚质量浓度为横坐标, 最大吸收峰处的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。可以得出回归方程为 $Y=0.1276X+0.0244$, $r^2\geq0.9995$ 。

2.2 β-葡萄糖苷酶粗酶提取液的制备^[6-7]: 将马蓝鲜叶剪碎, 称取 2. 5 g, 加入适量的预冷的 pH 6. 0 0. 2 mol/L 磷酸氢二钠 0. 1 mol/L 柠檬酸缓冲液, 冰浴上充分研磨成匀浆。将匀浆移入离心管中, 4 ℃, 15 000 r/min 离心 10 min。将上清液移入一量瓶中, 用缓冲液(pH 6. 0)定容至 25 mL, 得粗酶提取液, 4 ℃贮存备用。

2.3 β-葡萄糖苷酶粗酶活性测定: 在试管中加入 0. 6 mL pH 6. 0 的磷酸氢二钠柠檬酸缓冲液, 25. 0 mmol/L pNPG 0. 2 mL 和 0. 2 mL 粗酶提取液。将试管置于 55 ℃恒温水浴中反应 45 min。反应结束后, 向反应体系中加入 1 mol/L 碳酸钠溶液 2. 5 mL 终止反应^[8], 经适当稀释后在 402 nm 波长下比色。

酶活性= $(YV_2V_N)/(KV_1M_t)$
式中 Y 为酶促反应的吸光度; V 为酶液的提取体积; V_1 为反应体系中酶液体积; V_2 为总反应液体积; K 为对硝基苯酚标准曲线的斜率; M 为试样质量; t 为反应时间; N 为稀释倍数

β-葡萄糖苷酶活力国际单位定义为以 pNPG(对硝基苯-β-D-葡萄糖苷)为底物, 在一定的分析条件下, 每分钟释放出 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量。

2.4 影响 β-葡萄糖苷酶的提取与活力的因素考察

2.4.1 β-葡萄糖苷酶提取液的 pH 对酶活力的影响:

按照 2.2 项下方法, 其他条件不变, 不同的 pH 缓冲液(pH 值分别为 3. 5、4. 0、4. 5、5. 0、5. 5、6. 0、6. 5、7. 0、7. 5、8. 0)用于研磨、定容及稀释粗酶提取液, 以考察提取过程中 pH 值对酶活的影响。结果见表 1。可见在提取马蓝叶中 β-葡萄糖苷酶时, 提取粗酶液所加的缓冲液 pH 值会对酶活力产生较大影响。当提取液 pH 值为 6. 0 的 0. 2 mol/L 磷酸氢二钠 0. 1 mol/L 柠檬酸缓冲液时效果较好, 酶活力达到最大。

表 1 β-葡萄糖苷酶提取液 pH 对酶活力测定的影响

Table 1 Effects of pH value in extract solution of β-glucosidase on enzymatic activity

提取液 pH 值	酶活力/(U·g ⁻¹)	提取液 pH 值	酶活力/(U·g ⁻¹)
3. 5	17. 81	6. 0	29. 65
4. 0	25. 01	6. 5	28. 54
4. 5	26. 65	7. 0	28. 41
5. 0	27. 82	7. 5	27. 95
5. 5	28. 21	8. 0	26. 97

2.4.2 酶促反应环境 pH 值对酶活力的影响: 按照 2.3 项下方法, 其他条件不变, 仅改变反应体系 pH 值(3. 5、4. 0、4. 5、5. 0、5. 5、6. 0、6. 5、7. 0、7. 5、8. 0), 以测定反应体系 pH 值对酶活力的影响。结果见图 1。可见当反应体系 pH 值为 6 时, 测得的马蓝叶中的 β-葡萄糖苷酶活力最高, 故反应体系最适 pH 值为 6。

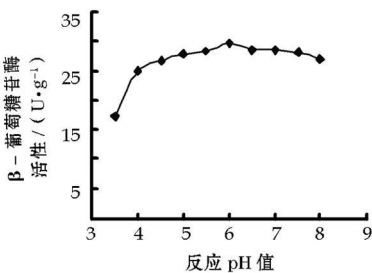


图 1 pH 值对酶活力测定的影响

Fig 1 Effect of pH value on enzymatic activity

2.4.3 底物浓度对酶促反应的影响: 按照 2.3 项下方法, 其他条件不变, 仅改变反应体系 pNPG 浓度(5. 0、8. 0、10. 0、12. 5、15. 0、20. 0、25. 0、30. 0 mmol/L), 以测定反应体系 pNPG 浓度对酶活力的影响。结果见图 2。可见底物浓度由 5 mmol/L 增加到 25 mmol/L 时酶活力逐渐增大, 当达到 30 mmol/L 时, 酶活力基本保持不变, 故测定马蓝叶中的 β-葡萄糖苷酶活力的最适底物浓度为 25 mmol/L。

2.4.4 反应温度对酶促反应的影响: 按照 2.3 项下方法, 其他条件不变, 仅改变反应体系的反应温度(35、40、45、50、55、60、70、80 ℃), 以测定反应体系的反应温度对酶活力的影响。结果见图 3。可见当

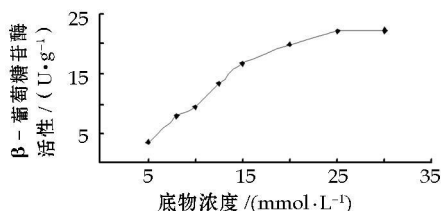


图 2 底物浓度对酶活力测定的影响

Fig 2 Effect of matrix concentrations on enzymatic activity

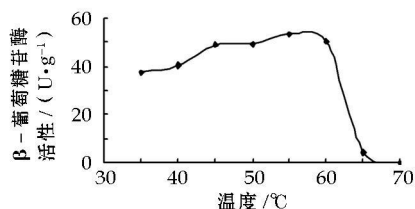


图 3 反应温度对酶活力测定的影响

Fig 3 Effect of reaction temperatures on enzymatic activity

温度由 35 °C 升高到 55 °C 时酶活力呈现逐渐增大的趋势, 当升至 65 °C 后酶活力急剧下降, 当达到 70 °C 时几乎测不出酶活, 可能已经失活, 故测定马蓝叶中的 β -葡萄糖苷酶活力的最适温度为 55 °C。

2.4.5 反应时间对酶促反应的影响: 按照 2.3 项下方法, 其他条件不变, 仅改变反应体系的反应时间 (15、30、45、60、75、90、105、120、135、150、180 min), 以测定反应体系的反应时间对酶活力的影响, 结果见图 4。可见初始随着反应时间的延长酶活力增大, 但当反应 45 min 后酶活力有逐步下降的趋势, 故测定马蓝叶中的 β -葡萄糖苷酶活力的最适反应时间为 45 min。

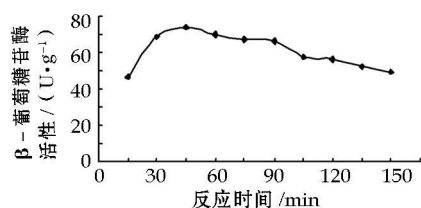


图 4 反应时间对酶活力测定的影响

Fig 4 Effect of reaction time on enzymatic activity

综上所述, 在 β -葡萄糖苷酶活性分析时, 最大吸收波长、反应时间、温度、pH 值和底物浓度都会对 β -葡萄糖苷酶的活性的测定产生一定的影响。单因素试验结果表明, 酶促反应的最适 pH 值为 6.0, 最适温度 55 °C, 底物浓度 25 mmol/L, 反应时间 45 min。

2.5 马蓝叶中 β -葡萄糖苷酶的基本酶学性质

2.5.1 酶的热稳定性研究: 将粗酶液在不同温度下保温一段时间后, 再测其酶活, 以判断其在不同温度

下的热稳定性, 以新制酶液酶活力为 100%, 绘制热稳定性曲线, 见图 5。可见酶在 30~60 °C 时, 随着温度的升高, 相对酶活有下降的趋势, 而且随着时间的延长下降的越多, 其热稳定性较差, 为青黛炮制过程中温度的控制提供了依据。

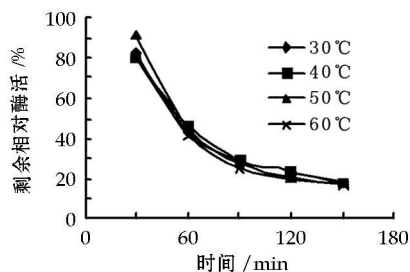


图 5 酶的热稳定性

Fig 5 Thermal stability of enzyme

2.5.2 酶的 pH 值稳定性的研究: 将粗酶液加入不同 pH 值缓冲液后, 在 4 °C 下静置 24 h, 测定酶活力。以酶液在相应 pH 值条件下 (未静置) 的酶活力为 100%, 绘制 pH 值稳定性曲线, 结果见图 6。 β -葡萄糖苷酶的稳定性范围较窄, 在 pH 5.0~7.0 比较稳定, 相对酶活性均在 90% 以上, 而 pH 值低于 4 时酶的稳定性较差, 尤其是在酸性条件下酶活下降较快。此研究为青黛炮制过程中浸泡液的 pH 值调控提供了一定的依据。

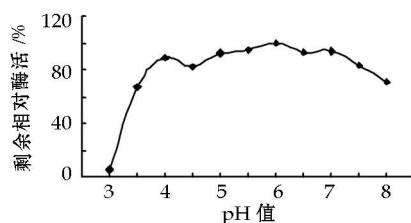


图 6 酶的 pH 稳定性

Fig 6 pH Value stability of enzyme

2.5.3 酶的保存稳定性研究: 将制好的粗酶液置于冰箱中于 4 °C 保存, 定时取样测定酶活力, 结果见图 7。酶的保存稳定性较好, 随着保存时间的延长, 酶活性下降幅度较小, 保存 10 d 尚剩余 80% 以上的酶活力, 由此可见, 此酶具有较好的耐储存性。

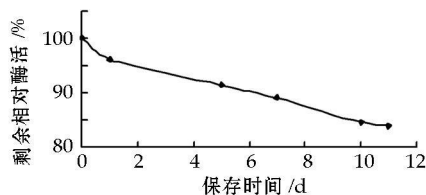


图 7 酶的保存稳定性

Fig 7 Storage stability of enzyme

3 讨论

热稳定性试验表明, 此酶在 30~ 60 ℃ 稳定性较差, 保温 150 min 酶活基本降至原来的 20%, 提示在炮制过程中温度的控制至关重要。pH 值稳定性试验表明, 在 pH 5.0~ 7.0 比较稳定, 而 pH 值低于 4 时酶的稳定性较差, 尤其是在酸性条件下酶活下降较快。保存稳定性试验表明, 在 4 ℃ 下保存 10 d 酶活性仍较高, 保存稳定性较好。基本的酶学性质为青黛炮制过程中浸泡环节温度和 pH 值的控制提供了依据, 对阐明炮制原理奠定了基础。

本研究试图证明马蓝叶细胞外存在 β -葡萄糖苷酶, 并研究它的最佳酶解条件, 以证明马蓝叶的浸泡过程是由 β -葡萄糖苷酶水解吲哚苷为吲哚酚的过程。并在此研究基础上, 确证了由马蓝叶中获取吲哚酚可以利用马蓝叶中的细胞外酶, 而不需要通过

发酵获取 β -葡萄糖苷酶, 这样不仅大大缩短了生产时间, 而且使生产环境和浸泡液的卫生条件得到了很大的改善, 还为马蓝叶的再利用拓宽了道路。

参考文献:

- [1] Woodward J, Wiseman A. Fungal and other β -glucosidase, their properties and applications [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 1982(4): 73-79
- [2] 董尚胜, 童启庆. 栀子花中糖苷酶的分离及其与醇系香气形成的关系[J]. 浙江大学学报, 2000, 26(1): 89-92
- [3] 董尚胜, 童启庆. 茉莉花中 β -D-葡萄糖苷酶活性差异[J]. 福建茶叶, 1998(4): 9-10
- [4] 赵 芹, 童启庆. 茶叶香气水解酶研究动态[J]. 福建茶叶, 1999(1): 5-7
- [5] 郭雯飞. 茶叶香气生成机理的研究[J]. 中国茶叶加工, 1996(4): 34-37
- [6] 江昌俊, 李叶云. 茶叶中 β -D-葡萄糖苷酶测定条件的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(2): 212-215
- [7] 骆耀平, 董尚胜, 童启庆, 等. 17 个茶树品种新梢生育过程中 β -葡萄糖苷酶的变化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(增刊): 104-107
- [8] 王华夫, 游小青. 茶叶中 β -葡萄糖苷酶活性测定[J]. 中国茶叶, 1996(3): 16-17

毛鸡骨草中异夏佛塔苷对照品的制备研究

宁丽娟^{1,2}, 叶志文³, 欧彪³, 汪豪^{1,2*}, 叶文才^{2,4}, 赵守训²

(1 中国药科大学 现代中药教育部重点实验室, 江苏 南京 210009; 2 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009; 3 广西玉林制药有限公司, 广西 玉林 537001; 4 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 目的 建立毛鸡骨草中异夏佛塔苷对照品的制备分离方法。方法 取毛鸡骨草药材醇提浸膏的正丁醇萃取部分用硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇(90:10~70:30)梯度洗脱, 收集异夏佛塔苷富集流份, 继续采用低压 C_{18} 柱色谱及制备 HPLC 进行分离纯化, 通过 NMR、MS 等波谱方法鉴定化合物结构, 经 TLC、HPLC-UV 及 MS 联用等技术进行质量分数检测。结果 从毛鸡骨草中制备分离的异夏佛塔苷对照品, 质量分数 > 99%。结论 本法得到的异夏佛塔苷对照品符合中药化学对照品的相关技术要求, 为药材毛鸡骨草和含毛鸡骨草的成方制剂的质量控制及药效物质基础研究提供化学对照品。

关键词: 毛鸡骨草; 异夏佛塔苷; 对照品; 制备高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1464-03

Preparation of isoschaftoside reference substance from *Abrus mollis*

NING Liruan^{1,2}, YE Zhiwen³, OU Biao³, WANG Hao^{1,2}, YE Wencai^{2,4}, ZHAO Shouxun²

(1 Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Ministry of Education, Nanjing 210009, China; 2 Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3 Guangxi Yulin Pharmaceutical Co., Ltd., Yulin 537001, China; 4 Institute of Traditional Chinese Medicine

and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To establish a preparative method for reference substance of isoschaftoside from *Abrus mollis*. **Methods** The *n*-butanol fraction from the ethanol extract of *A. mollis* was subject to column chromatography on silica gel eluted with a gradient of CHCl₃-MeOH (90:10 to 70:30). The collected fraction of isoschaftoside was successively purified by low-pressure ODS column and preparative HPLC. Its structure was identified by spectroscopic analysis and the purity was detected by TLC and HPLC-UV-MS. **Results** The TLC and HPLC analysis showed that the purity of the reference substance

* 收稿日期: 2010-03-23

基金项目: 科技部“十一五”重大新药创制项目(2009ZX09103-315); 广西科学研究与技术开发项目(桂科攻 0815005-1)

作者简介: 宁丽娟, 女, 硕士生。Tel: 15850686765 E-mail: lijuan_ning621@gmail.com

* 通讯作者 汪 豪 Tel: (025) 86185376 E-mail: btwanghao@yahoo.com.cn