

不同产地、不同年限人参中淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶的活力比较

邢楠楠¹, 赵雨^{1*}, 刘宏¹, 张惠¹, 李红艳² (1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 辽宁中医药大学大连校区, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 对不同产地、不同生长年限人参进行淀粉酶(AMY)、酯酶(Est)和酸性磷酸酯酶(ACP)活力比较。方法 用中性缓冲溶液提取总蛋白, 应用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定 AMY 活力; 乙酸- α -萘酯比色法测定 Est 活力; 对硝基酚比色法测定 ACP 活力。结果 不同产地人参 AMY、Est、ACP 活力均存在很大差异。取不同产地、相同生长年限酶活力平均值进行不同年限的酶活力比较, 可知 4 年与 5 年生人参 3 种水解酶活力均无明显差异。结论 AMY、Est、ACP 活力可以作为评价人参质量的内在指标之一。

关键词: 人参; 淀粉酶; 酯酶; 酸性磷酸酯酶

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)01-0044-04

Comparison of Activities of Amylase, Esterase, Acid Phosphatase in Ginseng Radix et Rhizoma from Different Origins and Different Growth Periods

XING Nannan¹, ZHAO Yu^{1*}, LIU Hong¹, ZHANG Hui¹, LI Hongyan² (1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Campus, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare activities of Ginseng Radix et Rhizoma amylase(AMY), esterase (Est) and acid phosphatase (ACP) from different origins and different growth periods. **METHODS** Total protein was extracted using a neutral buffer solution. Determination of AMY activity applied 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry. Determination of Est activity was using acetic acid- α -naphthyl ester colorimetry. Determination of ACP activity was using *p*-nitrophenol colorimetry. **RESULTS** There was a significant difference in activities of AMY, Est and ACP in Ginseng Radix et Rhizoma from different origins. Take the average value for enzyme activity in Ginseng Radix et Rhizoma of different origin and the same growth period, purpose was to compare the enzyme activity at different ages. We can know that activities of three kinds of enzyme hydrolysis were not significantly different in Ginseng Radix et Rhizoma from 4 years old and 5 years old. **CONCLUSION** Activities of AMY, Est, ACP can be used as one of the intrinsic indicators to assess the quality of Ginseng Radix et Rhizoma.

KEY WORDS: Ginseng Radix et Rhizoma; amylase; esterase; acid phosphatase

人参为五加科植物人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.)的根, 主产于我国东北, 是中国传统珍贵中药材, 具有大补元气、强心固脱、安神生津的功效。酶类作为功能基因表达的产物, 既是生理指标, 又是可靠的遗传标志^[1]。通常将植物体中的酶分为 6 大类, 即氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、异构酶类以及合成酶类。其中水解酶存在于植物各组织中, 与植物生长及干物质积累密切相关。淀粉酶是淀粉被分解的起始酶。淀粉是植物细胞代谢所需糖类营养物质的主要来源之一。淀粉酶对其水解能力可直接影响

到植物生长发育的进程。酯酶、酸性磷酸酯酶是植物脂类代谢相关酶, 在脂类消化吸收过程中起重要作用。本研究通过对淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶 3 种水解酶进行活力测定。为鉴定不同产地人参质量提供技术支持, 并通过对吉林省 8 个不同产地、不同年限共 16 批人参中该 3 种水解酶的活性比较, 为确定以酶活力作为中药材规范化种植、品质评价以及种质资源优选的指标提供理论依据。

1 实验材料

1.1 材料

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873371); 国家科技支撑计划资助项目(2007BAI38B02)

作者简介: 邢楠楠, 女, 硕士生 Tel: (0431) 86172331 E-mail: nanxing1984@yahoo.com.cn

*通信作者: 赵雨, 男, 博士, 教授,

硕导 Tel: (0431) 86172300 E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

4年、5年生人参购于吉林省抚松县等8个地区,共16批样品;经长春中医药大学研发中心姜大成教授鉴定,均为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey.的干燥根和根茎,符合中国药典2010年版一部的规定。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);CP225D 型电子天平(十万分之一,北京赛多利斯仪器系统有限公司);LL3000 型冷冻干燥机(德国 Heto 公司);DS21 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂);Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo 公司)。

1.2.2 试剂 3,5-二硝基水杨酸(DNS,化学纯,批号:F20081018)、乙酸- α -萘酯(化学纯,批号:T20080112)、 α -萘酚(分析纯,批号:20080925)均购于国药集团化学试剂有限公司;酒石酸钾钠(天津市光复科技发展有限公司);固蓝 B 盐(长春鼎国生物有限公司);对硝基苯磷酸二钠(上海晶纯试剂有限公司)。所用试剂均为分析纯。Bradford 蛋白质定量试剂盒购自于天根生化科技(北京)有限公司。

2 方法

2.1 供试样品的制备

取鲜参主根洗净,称重后匀浆,加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl 缓冲液(含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.4) 100 mL,置 4°C 下浸提 24 h, $4\,600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,吸取上清液 1 mL, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清液 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜滤过,冻干即得测定用样品^[2]。

2.2 蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法,应用 Bradford 蛋白质定量试剂盒,以牛血清白蛋白绘制标准曲线。操作方法参照 Bradford 蛋白质定量试剂盒说明书。

2.3 淀粉酶活力测定^[3]

2.3.1 麦芽糖标准曲线的绘制 取 7 支干净的具塞刻度试管,编号,分别取麦芽糖标准溶液($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mL 依次加入到试管中,用蒸馏水补足至 2 mL,向各试管中加入 2 mL DNS,摇匀,置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却,加蒸馏水定容至 20 mL。以 1 号管作为空白调零点,在 540 nm 波长下测定吸光度。以麦芽糖含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制

标准曲线。

2.3.2 酶活力测定 取冻干品用蒸馏水配制成浓度为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶液,取 1 mL 酶液,置于 40°C 恒温水浴中保温 10 min,加入 1 mL 1%淀粉溶液,在 40°C 恒温水浴中准确保温 5 min,加入 2 mL DNS,在沸水浴中加热 5 min,迅速冷却,加蒸馏水定容至 20 mL,以第一次保温前加入 DNS 试剂作为对照,540 nm 处测吸光度。

根据吸光度在麦芽糖标准曲线上查出相应的麦芽糖含量,淀粉酶活力以单位时间内(1 min)每毫升酶液催化反应所得 1 mg 麦芽糖为一个酶活力单位。比活力为每毫克蛋白所含的酶活力单位数。

2.4 酯酶活力测定^[4]

2.4.1 α -萘酚标准曲线的绘制 用无水乙醇将 α -萘酚配制成浓度为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。分别取标准溶液 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 用 pH 6.5 磷酸缓冲溶液将其定容为 5.0 mL,混匀;然后从中取出 3.1 mL 混合液,在 40°C 恒温水浴下保温 10 min,即刻加入 0.9 mL $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的固蓝 B 盐溶液,在 524 nm 处测定其吸光度。以 α -萘酚含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4.2 酶活力测定 将冻干品用蒸馏水配制成浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶液。然后分别取 1 mL pH 7.8 磷酸缓冲溶液、1 mL 酶液、1 mL 二次蒸馏水混合,0.1 mL 乙酸- α -萘酯溶液(将 5 mg 乙酸- α -萘酯溶于 4 mL 无水乙醇中)和 0.9 mL 固蓝 B 盐溶液(将 4 mg 固蓝 B 盐溶于 20 mL 二次蒸馏水中)混合,分别放在两个试管里,在 40°C 恒温水浴下保温 10 min,拿出两管后即刻混匀,在 524 nm 处测定其在 30, 60, 90, 120 s 的吸光度。

根据吸光度在 α -萘酚标准曲线上查出相应的 α -萘酚含量。一个酶活力单位定义为:单位时间(1 min)内每毫升酶液与底物反应所得 1 ng 的 α -萘酚为 1 个酶活力单位。比活力为每毫克蛋白所含的酶活力单位数。

2.5 酸性磷酸酯酶活力测定^[5]

2.5.1 对硝基酚标准曲线的绘制 取 6 支干净的具塞刻度试管,编号,分别取对硝基酚标准溶液($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mL 依次加入到试管中,用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 补至 6 mL,混匀,显色后即可比色。以 1 号管作为空白调零点,在 405 nm 波长下测定各管吸光度。以对硝基酚含

量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.5.2 酶活力测定 将冻干品用蒸馏水配制成浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的酶液,取 0.5 mL $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对硝基苯磷酸二钠, 1.5 mL pH 4.6 乙酸缓冲液,于试管中混合后,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min ,加入 0.5 mL 酶液,立即混匀并记时, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 准确保温 20 min ,加入 1 mL $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 终止酶反应,以先加入 NaOH 后再加酶液作为空白,然后于 405 nm 处测吸光度。

根据吸光度在对硝基酚标准曲线上查出相应的对硝基酚含量。一个酶活力单位定义为:单位时间内(1 min)每毫升酶液反应产生 1 nmol 对硝基

酚为 1 个酶活力单位。比活力为每毫克蛋白所含的酶活力单位数。

3 结果与分析

3.1 结果

不同产地、不同年限人参淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力测定结果见表 1。由表可见,不同产地人参中该 3 种水解酶活力均有差异,淀粉酶活力以临江市 4 年生人参活力最高,长白县 5 年生人参活力最低;酯酶活力以长白县 5 年生人参活力最高,安图县 4 年生人参活力最低;酸性磷酸酯酶以抚松县 4 年生人参活力最高,靖宇县 4 年生人参活力最低。

表 1 不同产地、不同年限人参中淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶比活力值($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Specific activity of amylase, esterase, acid phosphatase in Ginseng Radix et Rhizoma from different origins and different growth periods($n=3, \bar{x} \pm s$)

样品编号	产 地	生长年限/年	淀粉酶/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	酯酶/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	酸性磷酸酯酶/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
1	安图县	4	94.7 ± 0.5	637.5 ± 67.0	$2\ 374 \pm 18$
2	安图县	5	88.4 ± 6.7	724.6 ± 0.0	$2\ 965 \pm 0.0$
3	长白县	4	104.1 ± 2.0	$1\ 018.4 \pm 5.3$	$2\ 895 \pm 239$
4	长白县	5	53.1 ± 0.8	$1\ 174.8 \pm 0.0$	$3\ 759 \pm 580$
5	抚松县	4	77.3 ± 11.3	743.8 ± 59.1	$4\ 127 \pm 641$
6	抚松县	5	114.6 ± 8.3	$1\ 125.9 \pm 11.7$	$3\ 284 \pm 27$
7	敦化市	4	113.3 ± 10.8	776.4 ± 3.8	$3\ 204 \pm 153$
8	敦化市	5	97.2 ± 6.0	934.9 ± 1.7	$4\ 043 \pm 118$
9	临江市	4	166.7 ± 8.7	$1\ 208.4 \pm 30.9$	$3\ 028 \pm 194$
10	临江市	5	150.0 ± 4.8	856.2 ± 42.6	$2\ 599 \pm 409$
11	黄泥镇	4	149.0 ± 2.4	961.4 ± 37.8	$3\ 134 \pm 128$
12	黄泥镇	5	158.4 ± 7.1	839.9 ± 14.6	$3\ 996 \pm 419$
13	通化县	4	89.1 ± 5.4	$1\ 054.3 \pm 33.7$	$2\ 221 \pm 265$
14	通化县	5	97.6 ± 0.0	$1\ 033.9 \pm 39.3$	$2\ 685 \pm 24$
15	靖宇县	4	79.3 ± 0.6	944.9 ± 17.8	$1\ 975 \pm 40$
16	靖宇县	5	85.9 ± 2.6	991.5 ± 29.2	$2\ 688 \pm 487$

3.2 分析

3.2.1 不同产地人参淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力比较 取 4 年、5 年生人参淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力平均值作比较。不同产地淀粉

酶活力大小依次为:临江市>黄泥镇>敦化市>抚松县>通化县>安图县>靖宇县>长白县。不同产地酯酶活力大小依次为:长白县>通化市>临江市>靖宇县>抚松县>黄泥镇>敦化市>安

图县。不同产地酸性磷酸酯酶活力大小依次为：抚松县>敦化市>黄泥镇>长白县>临江市>安图县>通化县>靖宇县。

3.2.2 不同年限人参淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力比较 取不同产地、相同生长年限的人参中淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力平均值做比较。4年生淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力分别为 109.2, 918.1, 2 870 U·mg⁻¹；5年生人参淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力分别为 105.6, 960.1, 3 252 U·mg⁻¹。从以上数据可以看出，4年与5年生人参的淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力均无明显差异。

3.2.3 聚类分析 对 8 个产地样品进行分析。取相同产地、不同年限淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶活力平均值作为变量，运用 SPSS 13.0 软件对其进行系统聚类。先对数据集进行标准化，然后采用离差平方和法(Ward's Method)，利用欧氏距离(Euclidean)作为样品的测量度。

8 个样品大致可以分为 4 类，见图 1。样品 2、3、4 即长白县、抚松县、敦化市人参聚为 I 类，主要是这些样品中 3 种酶的活力均接近，其中酸性磷酸酯酶活力均较高，为 4 类中该酶活力最高的一类。样品 5、6 即临江市、黄泥镇人参聚为 II 类，主要是这两个产地人参中淀粉酶活力较高，为 4 类中该酶活力最高的一类。样品 7、8 即通化县、靖宇县人参聚为 III 类，主要是这些样品中 3 种酶的活力均接近，活力中等。1 号样品即安图县人参单独聚为 IV 类，与其他 3 类距离最远，其特点为 3 种酶活力均较低，其中酯酶活力明显低于其他 3 类。以上结果可以作为人参来源鉴定的依据之一。

4 讨论

目前，对于不同产地人参的差异性研究报道较少。章观德等^[6]曾对我国几个地区的生晒参皂苷含量进行过初步分析。姜先刚等^[7]针对 10 个产地、4 年或 5 年生人参共 20 批样品建立了人参药材水提取物的高效凝胶过滤色谱指纹图谱。但至今还未见关于不同产地人参酶活力比较研究方面的报道。本研究选取吉林省 8 个主要人参产地的 4 年和 5 年生人参作为供试样品，对其淀粉酶、酯酶、

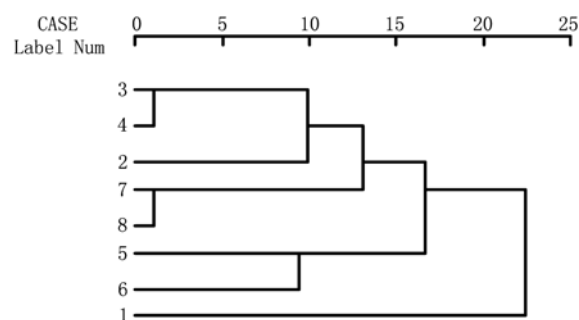


图 1 8 批人参样品聚类图

Fig 1 Cluster diagram of 8 batches of Ginseng Radix et Rhizoma

酸性磷酸酯酶活力进行体外测活，通过以上结果及分析可知，不同产地人参中该 3 种酶的活力均存在差异。这种差异可能是因为不同地区的温度、光照、湿度等环境生长因素不同造成的。确切原因有待进一步研究。

各产地 4 年与 5 年生人参的淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶无明显差异，说明人参生长到 4 年时已进入稳定缓慢的生长期，同时说明现在市场上以 4 年或 5 年采收人参为主是比较合理的。

REFERENCES

- [1] SUN H Y, WANG L S. Peroxidase isozyme analysis of the eight kinds of Chinese cabbage [J]. Mod Agric Sci Technol (现代农业科技), 2009, (5): 8-9.
- [2] ZHANG W, JIANG X G, MA J, et al. Study on the thermal stability of Ginseng protein by SDS-PAGE and gel filtration chromatography [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2007, 9(2): 7-10.
- [3] HAO J J, KANG Z L, YU Y. Lab Technology of Plant Physiology (植物生理学实验技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 104-106.
- [4] HOU M D. Determination of plant esterase of organophosphorus pesticide residues [J]. Food Sci (食品科学), 2002, 23(7): 111-115.
- [5] WANG D. Experiment Course In Biochemistry And Clinical Biochemistry Test(生物化学和临床生物化学检验) [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2005: 151-153.
- [6] ZHANG G D, ZHOU Z H, WANG M Z, et al. Analysis of Ginseng [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1980, 15(3): 175-180.
- [7] JIANG X G, ZHAO Y, TANG E N, et al. Study on HPGFC fingerprint chromatogram of fresh Ginseng aqueous extract [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(8): 1222-1225.

收稿日期：2010-04-26