

15 个不同产地人参中 4 种酶的活力比较

叶豆丹, 赵雨*, 王思明, 陈雨, 李晓华(长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

摘要: 目的 通过对 15 个不同产地的人参中 4 种酶活力进行测定, 为人参的鉴定和优选提供理论依据。方法 采用中性缓冲液提取粗酶液, 应用分光光度法对 15 个不同产地的人参中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD), 谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase, GPT), 葡萄糖磷酸异构酶(Glucose phosphate isomerase, GPI)和延胡索酸酶(Fumarase)4 种酶的活力进行比较。结果 15 批人参样品的 SOD 活力相差不大;GPT 活力以安图县万宝镇活力最高,是其他样品的 2~3 倍;通化市集安县、临江市东北岔子村等 10 批样品的 Fumarase 活力明显低于安图县万宝镇、抚松县北岗镇等 5 批样品。结论 SOD、GPT、GPI、Fumarase 的活力可以作为人参品种鉴定的评价指标。

关键词: 人参; 酶; 超氧化物歧化酶; 谷丙转氨酶; 葡萄糖磷酸异构酶; 延胡索酸酶

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)03-0264-04

Comparison of Four Enzymes Activities in Ginseng from 15 Different Origins

YE Doudan, ZHAO Yu*, WANG Siming, CHEN Yu, LI Xiaohua(*Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To measure the activities of four enzymes in Radix Ginseng from 15 different origins, in order to provide theoretical basis for the appraisal of ginseng. **METHODS** Neutral buffer solution was adopted to extract the enzyme solution of Radix Ginseng. Use spectrophotometry to test the activities of Superoxide dismutase (SOD), Glutamic-pyruvic transaminase (GPT), Glucose Phosphate Isomerase (GPI) and Fumarase. **RESULTS** There are little difference of the SOD activities from 15 batch of ginseng samples; the highest GPT activity of Ginseng sample which in Antu county Wanbao town is 2-3 times of other samples. Fumarase activity in Tonghua county Ji'an town, Linjiang city Dongbeichazi town and other 10 samples are significantly lower than the activities in Antu county WanBao town, Fuson county Beigang town and other 5 batch samples. **CONCLUSION** The activities of SOD, GPT, GPI and Fumarase can be used as the evaluating indicator of species identification of Radix Ginseng.

KEY WORDS: Radix Ginseng; enzyme; superoxide dismutase; glutamic-pyruvic transaminase; glucose phosphate isomerase; fumarase

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是五加科多年生草本植物人参的干燥根, 是我国传统名贵中草药, 作为一种具有极高药用价值和广泛药理作用的中草药在我国中医临床的应用中已有悠久的历史^[1]。人参中主要含有人参皂苷、蛋白质、挥发油、有机酸、多糖、氨基酸等有效成分^[2-3]。但目前对于人参的研究多是对皂苷、多糖等成分, 而针对人参中含有的蛋白质成分, 研究较少。

本实验研究的 4 种酶按照催化反应性质的不同分属于 6 大酶类中的 4 种, 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)属于氧化还原酶类, 谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase, GPT)属转移酶类, 葡萄糖磷酸异构酶(Glucose Phosphate Isomerase, GPI)属异构酶类, 延胡索酸酶(Fumarase)

属裂解酶类, 这几种酶在植物的生长发育过程中都具有一定的意义。本实验通过考察不同产地人参中 4 种酶的活力值, 为人参的质量评价奠定理论基础, 为人参的培育和优选提供科学依据。

1 材料与试剂

1.1 实验材料

实验所用 5 年生人参分别购自黑龙江、吉林两省的 15 个不同产地, 经长春中医药大学姜大成教授鉴定, 均为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)的根, 符合中国药典 2010 年版一部的规定, 见表 1。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 DT100 电子天平(常熟市双杰测试仪器有限公司); TA1203N 电子天平(上海精密科学仪器有限

作者简介: 叶豆丹, 女, 硕士, 副教授 Tel: (0431)86172300 E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

E-mail: hong70790@163.com *通信作者: 赵雨, 男, 博士, 教授 Tel:

公司); UV-2550 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司); 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); TDL-5 型台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); Mini 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); DS21 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂); LL3000 型冷冻干燥机(德国 Heto 公司)。

1.2.2 试剂 SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20100823); α -酮戊二酸(北京鼎国生物技术有限责任公司, 批号: 201007); L-丙氨酸(北京鼎国生物技术有限责任公司, 批号: 7AL10220); α -萘胺(天津市光复精细化工研究所, 批号: 20090527); 对氨基苯磺酸(天津市光复精细化工研究所, 批号: 20091112); 2,4-二硝基苯肼(天津市光复精细化工研究所, 批号: 20060329); DL-苹果酸[中国惠世生化试剂有限公司(上海), 批号: 090108]; 葡萄糖-6-磷酸(上海晶纯试剂有限公司, 批号: 20067); 其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 样品的制备

取不同产地人参各 3 根, 称重, 分别以 1:4 的料液比加入一定体积预冷的 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 匀浆, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸提 20 min, 过滤, 于 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液, 即得测定用粗酶液。

2.2 超氧化物歧化酶活力测定

依照 SOD 试剂盒方法测定样品中超氧化物歧化酶的活力。

2.3 谷丙转氨酶活力测定^[4-5]

取试管 4 支, 标号为标准管 M1、标准空白管 M2、测定管 N1、测定空白管 N2, M1 管中加入 $100 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙酮酸标准液 0.1 mL, M2 管中加入磷酸缓冲液 0.1 mL, N1、N2 中均加入样品液 0.1 mL, 后除 N2 管外其余 3 管中均加入 0.5 mL 底物液, 摇匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30 min。冷却后 4 个管中各加入 0.5 mL 2,4-二硝基苯肼溶液, 后向 N2 管中加入底物液 0.5 mL, 最后, 向各管中加入 $5.0 \text{ mL } 0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$, 显色 10 min 后, 在 520 nm 处测定吸光度值。(底物液: 称取 DL-丙氨酸 1.79 g, α -酮戊二酸 20.2 mg, 溶于 100 mL 磷酸缓冲液中)GPT 活力定义为: 1 g 鲜参于 pH 7.4, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 与底物作用 30 min, 产生 $2.5 \mu\text{g}$ 丙酮酸为 1 个 GPT 活性单位[单位: $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$]。

2.4 葡萄糖磷酸异构酶活力测定^[5]

本实验以 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-P}$ 为底物(0.4 mL), 加 pH 8.5、 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Tris}$ 缓冲液(pH 8.5)0.5 mL, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 与酶液 0.1 mL 反应 5 min, 以 $2 \text{ mL } 8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸终止反应, 加 0.1% 间苯二酚溶液 1.0 mL, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 冷却, 于 490 nm 处测光吸收值。对照首先将酶液以 $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸灭活, 然后再与底物溶液保温, 如前进行将测定管的吸光度值减去对照管的吸光度值后, 在 F-6-P 标准曲线上找到对应的 F-6-P 值。F-6-P 标准曲线的制作: 取浓度分别为 5, 10, 20, 30, 40, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ F-6-P}$ 溶液各 0.1 mL, 加水 0.4 mL。其余如酶反应系统(但无酶液及 G-6-P 溶液)进行反应, 以吸光度值对 F-6-P 浓度作标准曲线。酶的活力单位定义为: 1 g 鲜参与底物于 pH 8.5, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 产生 $1 \mu\text{mol}$ 的 F-6-P 为一个活力单位[单位: $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$]。

2.5 延胡索酸酶活力测定^[6]

取 2 只比色杯, 在 1 只比色杯中加入 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{PO}_4$ (pH 7.5)缓冲液 3 mL, 置于紫外分光光度计中, 在 250 nm 处将光吸收调节至零; 将反应液置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 保温 10 min, 向另一只比色杯中依次加入 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{PO}_4$ 缓冲液配制的 DL-苹果酸 2.0 mL, 酶液 1.0 mL, 立即计时, 加盖摇匀, 每隔 0.5 min 测 $A_{250\text{nm}}$, 连续测定 2 min。以 1 min 内 $A_{250\text{nm}}$ 上升 0.1 为一个酶活力单位[单位: $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$]。

3 结果与分析

3.1 超氧化物歧化酶活力测定

不同产地人参中超氧化物歧化酶活力顺序由高到低依次为: D1>C1>H>B1>A2>A1>E1>C2>D3>G>D2>E2>B2>F1>F1。在全部 15 批样品中, 黑龙江省穆岭市样品的超氧化物歧化酶活力最低, 只有其他样品活力的二分之一, 为 $1321.42 \pm 85.15 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$; 其余 14 批人参样品超氧化物歧化酶活力水平相近, 均在 $2\ 000\sim 3\ 500 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$ 的范围内。结果见表 1 和图 1。

3.2 谷丙转氨酶活力测定

不同产地人参中谷丙转氨酶活力顺序由高到低依次为: A1>C2>D3>H>E2>B1>D2>A2>C1>D1>C2>B2>E1>F1>F2。在全部 15 批样品中, 以安图县万宝镇样品的谷丙转氨酶活力最高, 为 $579.59 \pm 0.89 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$, 约是其他样品活力的 3 倍左右; 其次临江市-东北岔子的样品活力较高, 为 $349.38 \pm 1.53 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$, 是其他样品的 2 倍。

黑龙江省穆岭市样品活力最低, 为 $106.65 \pm 2.62 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$ 。结果见图 2 和表 1。

3.3 葡萄糖磷酸异构酶活力测定

不同产地人参中葡萄糖磷酸异构酶活力顺序由高到低依次为: $\text{H} > \text{G} > \text{D1} > \text{B2} > \text{F1} > \text{C1} > \text{B1} > \text{E1} > \text{D2} > \text{C2} > \text{E2} > \text{A1} > \text{F2} > \text{A2} > \text{D3}$ 。15 批样品中葡萄糖磷酸异构酶活力差距明显。结果见图 3 和表 1。

3.4 延胡索酸酶活力测定

15 批人参样品的延胡索酸酶活力顺序由高到低依次为: $\text{A1} > \text{D1} > \text{C1} > \text{D3} > \text{F2} > \text{B1} > \text{G} > \text{E2} > \text{D2} > \text{A2} > \text{H} > \text{E1} > \text{B2} > \text{C2} > \text{F1}$ 。在全部 15 批样品中, 按活力大小可分为两大类, 一类为活力较高的, 有 A1、C1、D1、D3、F2, 其中以安图县万宝镇的样品活力最高, 为 $31.22 \pm 0.73 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$; 另一类是活力偏低的一类, 共有 10 批样品, 平均活力为 $1.95 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$ 。结果见图 4 和表 1。

表 1 不同产地人参中 4 种酶活力值($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 The activity of four Enzymes in ginseng from different origins($n=3, \bar{x} \pm s$) [单位: $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$]

样品编号	产地	SOD	GPT	GPI	Fumarase
A1	安图县万宝镇	3 149.54±243.48	579.59±0.89	53.55±1.78	31.22±0.73
A2	安图县白河镇	3 321.24±112.90	203.88±45.17	38.71±4.70	2.15±0.31
B1	通化市集安县	3 322.97±297.62	215.77±35.50	75.20±8.36	2.38±0.30
B2	通化市通化县	2 320.84±272.05	136.64±19.86	90.52±6.54	1.67±0.18
C1	敦化市青沟子乡	3 435.49±84.16	170.35±25.33	85.09±2.14	23.14±1.96
C2	敦化市秋梨沟镇	3 123.22±124.85	150.01±11.01	64.01±3.85	1.64±0.78
D1	抚松县北岗镇	3 447.37±306.82	166.74±1.66	97.82±0.00	27.75±1.39
D2	抚松县板石河村	2 797.34±112.72	208.63±11.37	68.01±6.27	2.16±0.76
D3	抚松县黄泥镇	3 086.50±96.29	241.91±31.20	33.31±8.55	17.48±0.80
E1	长白县新房子镇	3 149.51±101.28	130.49±41.96	73.35±20.08	1.95±0.61
E2	长白县二道岗村	2 670.78±188.64	217.79±7.40	56.93±16.24	2.19±0.16
F1	黑龙江省牡丹江市	2 067.30±211.37	127.18±13.92	88.47±16.23	0.96±0.23
F2	黑龙江省穆岭市	1 321.42±85.15	106.65±2.62	52.13±15.85	8.76±0.73
G	临江市东北岔子村	3 030.14±167.52	349.38±1.53	112.05±22.34	2.30±0.23
H	珲春市	3 383.02±207.52	231.00±48.55	122.69±7.44	2.06±0.69

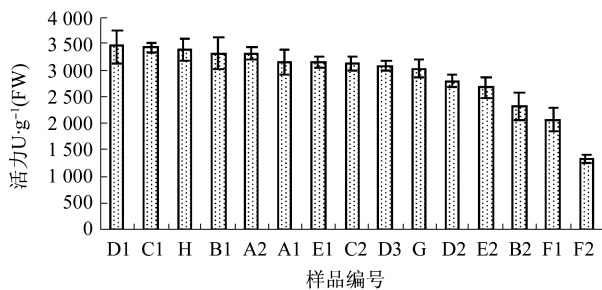


图 1 超氧化物歧化酶活力

Fig 1 The activity of Superoxide dismutase

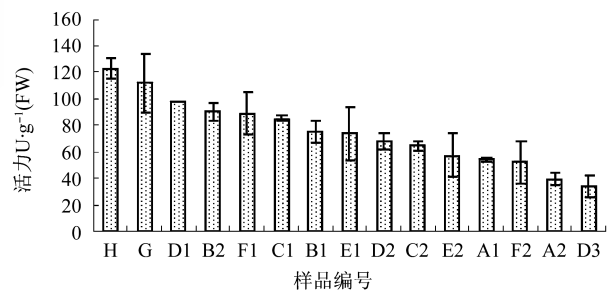


图 3 葡萄糖磷酸异构酶活力

Fig 3 The activity of Glucose Phosphate Isomerase

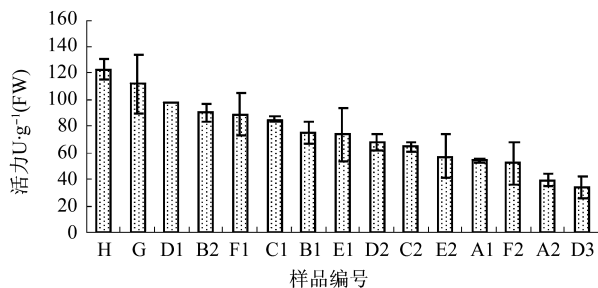


图 2 谷丙转氨酶活力

Fig 2 The activity of Glutamic-pyruvic transaminase

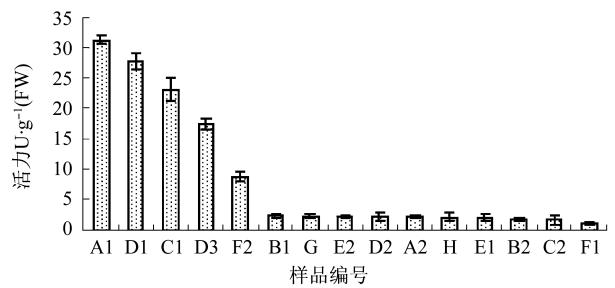


图 4 延胡索酸酶活力

Fig 4 The activity of Fumarase

3.5 聚类分析

以表 1 中 SOD、GPT、GPI、Fumarase 4 种酶的活力为变量, 运用 SPSS13.0 软件和采用欧式距离的统计方法对 15 批样品进行系统聚类分析。以距离小于 5 分类, 15 批样品为 5 类, 其中 A2、B1、C2、D2、D3、E1、E2 为第 I 类; B1、F1、F2 为第 II 类; C1、D1 为第 III 类; G、H 为第 IV 类, A1 为第 V 类。结果见图 5。

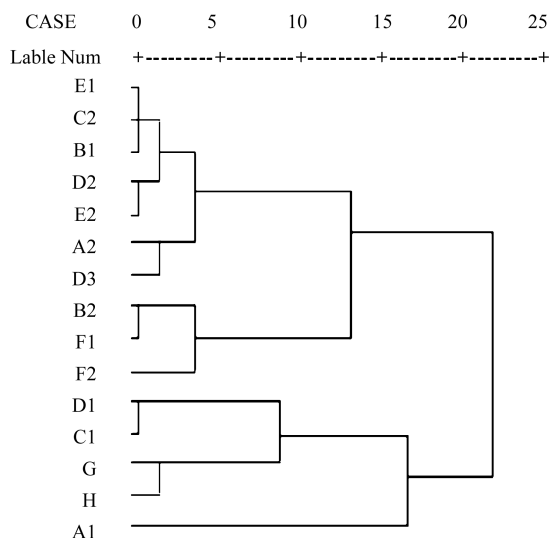


图 5 人参 15 批样品聚类分析树形图

Fig 5 Cluster analysis tree of 15 samples of ginseng

由结果可知, 第 I 类和第 IV 类的几个样品是 4 种酶活力值最平均的一组; 第 II 类是 SOD、GPT 活力最低组; 第 III 类是 SOD 活力最高组; 第 V 类的 H 样品是 GPT、Fumarase 活力最高, GPI 活力最低组。以上结果可以作为人参来源鉴定的依据。

4 讨论

目前对不同产地人参的样品研究有一些报道, 姜先刚等^[7]对不同产地、不同年限的 20 批人参样品建立了高效凝胶过滤色谱指纹图谱。苏建等^[8]对不同产地西洋参皂苷进行了 HPLC 分析。杜尔逊等^[9]对不同产地人参茎叶皂苷的含量进行了比较研究。但对于不同产地人参的酶活力的研究较少。

由实验结果可知, 同一种酶在不同产地人参中的酶活力有明显差别, 如谷丙转氨酶中安图县万宝镇人参中活力是其他产地的 2~3 倍; 而不同

产地人参的延胡索酸酶活力差别更大, A1 样品的活力约是其他产地的 10 倍之多。

对于同一地区的两批样品活力趋势基本相同, 如敦化市的两批样品, 青沟子乡的 4 种酶的活力均大于秋梨沟镇的, 同样其他同地区的样品也有相似的性质。

而相对于同一产地的人参样品, 不同酶的活力趋势基本相同, 如安图县万宝镇的 GPT、Fumarase 的酶的力均是 15 批样品中最高的。

不同产地人参中的相同酶有如此大的差别, 可能是由于人参的生长环境因素如土壤中的成分, 光照、温度、湿度等不同条件所引起的。本实验通过对 15 个不同产地人参中 SOD、GPT、GPI、Fumarase 酶活力测定的研究, 为人参的质量评价提供了更丰富的理论依据, 为人参的鉴别提供了参考。

REFERENCES

- [1] SUN P, MENG Q, XU J D. Domestic stems and leaves of American ginseng and ginseng saponin content [J] J Chin Med Pharmacol(中医学报), 1997, 35(6): 37-42.
- [2] ZENG S Y, ZHANG Y P, LU S R. Purification and properties of glucose-6-phosphate isomerase from animal muscles [J]. Acta Zoologica Sin(动物学报), 1994, 40(3): 287-295.
- [3] BAI X Y, ZHAO Y, LIU H L, et al. Content comparative study of total sugar, reducing sugar and soluble polysaccharide in ginseng from different regions [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(1): 39-42.
- [4] HAO J J, KANG Z L, YU Y. Plant physiology experiments(植物生理学实验技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 101-106.
- [5] WANG Y, QIAN S J. Biochemistry and clinical biochemistry test experiment tutorial(生物化学和临床生物化学检验实验教程) [M]. Beijing: Qinghua University Press, 2005: 167-170.
- [6] ZHENG T, SHI Q Q, WU S G. Purification and properties of fumarase from aspergillus wentii [J]. Microbiology(微生物学通报), 2002, 29(1): 30-34.
- [7] JIANG X G, ZHAO Y, TANG R N. Study on HPLC fingerprint chromatogram of fresh Ginseng aqueous extract [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(8): 1222-1225.
- [8] SU J, LI H Z, KONG L Y. HPLC analysis of saponins american ginseng produced in different areas [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16(6): 561-564.
- [9] DU E X, LIU Y Z. The origin of ginseng stems and leaves contain saponins [J]. J Chin Med Mater(中药材), 1981, 4(4): 23-24.

收稿日期: 2012-04-22