

# 高乌甲素对 $\alpha$ -淀粉酶及其光谱性质的影响

周向军<sup>1</sup>, 高义霞<sup>1</sup>, 郑晓惠<sup>1</sup>, 张 继<sup>1,2\*</sup>

(1. 天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001;

2. 西北师范大学生命科学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**目的 研究高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制及其光谱变化。方法 运用可见及紫外光谱对高乌甲素与  $\alpha$ -淀粉酶相互作用的光谱进行探讨。结果 结果表明当高乌甲素在 0~0.5 mmol/L 范围内其对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用逐渐增加, 0.5 mmol/L 时达到饱和, 相对酶活力为 43%。高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶属于可逆非竞争性抑制, 抑制常数  $K_i = 9.86 \times 10^{-2}$  mol/L。紫外光谱表明  $\alpha$ -淀粉酶与高乌甲素作用后吸收峰发生蓝移, 说明其相互作用改变  $\alpha$ -淀粉酶的空间构象。结论 该结果为进一步研究  $\alpha$ -淀粉酶与小分子化合物相互作用提供依据。

**关键词:** 高乌甲素;  $\alpha$ -淀粉酶; 抑制; 光谱

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2013.03.015

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2013)03-0550-02

## Effects of lappacnitine on $\alpha$ -amylase and its spectral properties

ZHOU Xiang-jun<sup>1</sup>, GAO Yi-xia<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>1</sup>, ZHANG Ji<sup>1,2\*</sup>

(1. College of life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui Gansu 741001, China; 2. Department of life Science, Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract: Objective** The effects of lappacnitine on  $\alpha$ -mylase and its spectral properties were explored. **Methods** UV-VIS spectra were used to explore the effects of lappacnitine and  $\alpha$ -amylase. **Results** The results show that inhibition effect reaches equilibrium when lappacnitine is about 0.5 mmol/L and the relative activity is around 45%. Lappacnitine can lead to reversible noncompetitive inhibition and  $K_i = 9.86 \times 10^{-2}$  mol/L. UV spectra show that lappacnitine induces a blue shift of  $\alpha$ -amylase wavelength. **Conclusion** These results provide evidence for further study on interaction between  $\alpha$ -amylase and small molecular compounds.

**Key words:** lappacnitine;  $\alpha$ -amylase; Inhibition; Spectra

高乌甲素(lappacnitine), 又称巴拉乌头碱, 为毛茛科(Ranunculaceae) 乌头属(*Aconitum*) 多年生草本植物高乌头(*Aconitum sinomontanum* Nakai) 根中提取的生物碱。高乌甲素的单体成分之一氢溴酸高乌甲素(lappacnitine hydrobromide) 是一种良好的非麻醉性镇痛药, 具有明显的镇痛、消炎、消肿作用及无成瘾性和不良反应少等特点<sup>[1-3]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase) 也称  $\alpha$ -1,4-D-葡聚糖水解酶, 催化 3 个或 3 个以上含  $\alpha$ -1,4 糖苷键的 D-葡萄糖多聚物的水解<sup>[4]</sup>。高乌甲素作为一种药物, 进入体内后不可避免地与  $\alpha$ -淀粉酶相接触<sup>[5,6]</sup>, 势必会影响到  $\alpha$ -淀粉酶的活性, 因此高乌甲素有可能成为一种新型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂。本试验主要探讨高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制及其紫外光谱变化, 旨在为进一步研发高乌甲素作为  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂提供理论资料。

### 1 材料与仪器

高乌甲素、麦芽糖等均为国产分析纯。 $\alpha$ -淀粉酶为 sigma 产品。

3,5-二硝基水杨酸(DNS)<sup>[7]</sup>: 甲液: 溶解 6.9g 结晶酚于 15.2 ml 10% NaOH 中, 并稀释至 69 ml, 在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸氢钠。乙液: 称取 255 g 酒石酸钠, 加到 300 ml 10% NaOH

中, 再加入 880 ml 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。将甲液与乙液相混合即得黄色试剂, 贮于棕色试剂瓶中。在室温下, 放置 7~10 d 以后使用。

722 型分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津); 电子天平(德国梅特勒-托利多); PHS-3D 精密 pH 计(上海雷磁)。

### 2 方法

2.1 酶活性测定 按 WANG 方法<sup>[8]</sup> 稍作修改。1% 淀粉、pH6.9 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液均在 25℃ 预热 10 min。依次加入 1% 淀粉 1 ml、淀粉酶液及高乌甲素, 用磷酸缓冲液补充至 2 ml, 25℃ 准确保温 3 min, 分别加入 2 ml DNS, 摇匀, 置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却, 定容至 25 ml。520 nm 测定光吸收值, 以光吸收值表示酶活力。空白管以 1 ml 磷酸缓冲液代替酶液。

2.2 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶活力的影响测定 以高乌甲素浓度为横坐标, 相对剩余酶活力为纵坐标, 探讨高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的影响<sup>[9]</sup>。

2.3 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶抑制效应测定 固定底物浓度, 改变加入  $\alpha$ -淀粉酶的酶量, 测定不同高乌甲素浓度下  $\alpha$ -淀粉酶活力随底物浓度变化情况, 以淀粉酶量为横坐标, 酶活力为纵坐标, 判断抑制效应<sup>[10]</sup>。

2.4 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型及抑制常数测定 固定酶量, 改变底物浓度, 测定不同高乌甲素浓度下酶活力随底物浓度变化规律<sup>[10]</sup>。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图判别抑制类型、求得抑制常数  $K_i$ 。

2.5 高乌甲素与  $\alpha$ -淀粉酶相互作用的紫外光谱  $\alpha$ -淀粉酶与不同浓度高乌甲素保温 10 min, 在 270~300 nm 范围内进行紫外扫描<sup>[11]</sup>。

收稿日期: 2012-07-01; 修订日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(No. 50773064);

天水师范学院重点学科支持项目(No. ZD08037)

作者简介: 周向军(1980-), 男(汉族), 甘肃镇原人, 现为天水师范学院研究生, 讲师, 硕士学位, 主要从事天然产物研究与开发工作。

\* 通讯作者简介: 张 继(1963-), 女(汉族), 甘肃兰州人, 现任西北师范大学研究员, 博士学位, 主要从事植物化学研究工作。

### 3 结果

#### 3.1 高乌甲素对 $\alpha$ -淀粉酶活力的影响 见图 1。

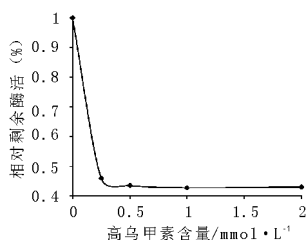


图 1 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶活力的影响

由图 1 可知, 当高乌甲素在 0~0.5 mmol/L 范围内时, 随浓度增加其对  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用增强; 随后继续增加高乌甲素浓度, 其对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用几乎保持不变, 达到饱和, 相对剩余活力保持在 43% 左右。

#### 3.2 高乌甲素对 $\alpha$ -淀粉酶抑制效应测定 见图 2。

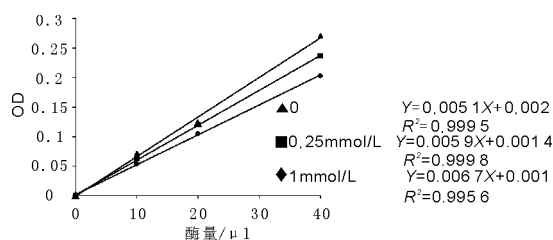


图 2 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶抑制效应

由图 2 可知, 淀粉酶活力对其体积作图得到一系列通过原点的直线, 随着高乌甲素浓度不断增加, 曲线斜率开始降低, 酶活力被抑制作用不断加强, 符合可逆抑制作用的特点<sup>[12]</sup>, 因此高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶属于可逆抑制作用。

#### 3.3 高乌甲素对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型及抑制常数测定 见图 3。

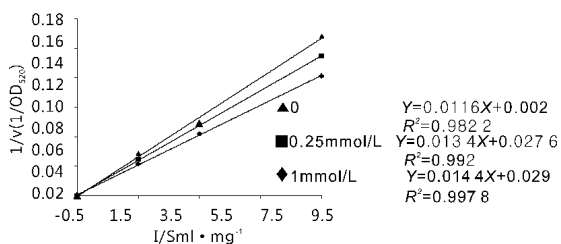


图 3 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用

由图 3 可知, 高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用得到一组交于横轴的直线, 测得的数据表明高乌甲素几乎不改变  $K_m$ , 只改变  $V_{max}$ , 且随其浓度增加而减小, 见表 1。其抑制机理符合非竞争性抑制。求得抑制常数  $K_i = 9.86 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。

表 1 不同浓度高乌甲素作用的  $K_m$  及  $V_{max}$

浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_m$	$V_{max}$
0	0.446	38.46
5	0.485	36.23
20	0.496	34.48

#### 3.4 高乌甲素与 $\alpha$ -淀粉酶相互作用的紫外光谱 高乌甲素在 245 nm 附近有特征吸收, 与资料报道的 252 nm 有所不同<sup>[13]</sup>, $\alpha$ -淀粉酶在 280 nm 附近有最大外吸收峰, 这主要是由于 Trp 和

Tyr 光吸收以及与酶构象和螺旋有关的相互作用<sup>[14, 15]</sup>。由图 4 可知, 当高乌甲素浓度不断增大时, 紫外吸收逐渐增强且发生蓝移, 这表明高乌甲素与  $\alpha$ -淀粉酶相互发生作用, 改变了酶分子中 Trp 和 Tyr 所处空间结构的微环境, 从而引起  $\alpha$ -淀粉酶最大吸收波长和强度的改变。当继续增大高乌甲素浓度时, 吸收峰值增幅逐渐变小, 这表明高乌甲素与  $\alpha$ -淀粉酶的相互作用接近饱和, 空间结构不再发生明显变化。

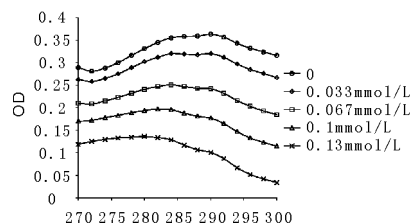


图 4 高乌甲素处理后  $\alpha$ -淀粉酶紫外吸收光谱

### 4 讨论与结论

当高乌甲素浓度在 0~0.5 mmol/L 范围内, 其对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用持续增强, 随后达到饱和,  $\alpha$ -淀粉酶相对剩余活力维持在 43% 左右。高乌甲素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型为可逆非竞争性抑制作用,  $K_i = 9.86 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。高乌甲素既可以与游离的酶结合, 也可以与 ES 复合物结合, 但并非结合在酶活性中心的底物结合位点, 而是活性中心附近的某些区域, 因此虽然不影响酶和底物的亲和力, 但引起了酶构象的改变, 因而导致酶活性中心催化作用降低。紫外光谱表明高乌甲素可使  $\alpha$ -淀粉酶吸收峰发生蓝移, 表明其相互作用引起了  $\alpha$ -淀粉酶构象变化。

#### 参考文献:

- [1] 李 军, 徐本明, 郎跃武, 等. HPLC 法测定注射用氢溴酸高乌甲素的含量及其他生物碱[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1497.
- [2] 黄 涛, 朱雪瑜, 张铁军. 高乌总碱缓释片处方优化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 5.
- [3] 孟永刚, 倪京满, 许有瑞. 氢溴酸高乌甲素聚氰基丙烯酸酯纳米囊的制备工艺研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(7): 557.
- [4] 师江波, 边六交, 董发昕. 荧光相图法研究猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶在脲和盐酸胍溶液中的去折叠过程[J]. 分析化学, 2006, 35(5): 707.
- [5] 谢 光, 刘芯韵, 郑 芸, 等. 茶碱与胃蛋白酶相互作用的光谱性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(18): 558.
- [6] 雷 芳, 喻 东, 胡 源, 等. 葛根素对胃蛋白酶部分性质的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 704.
- [7] 安建平, 王廷璞. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2005: 187.
- [8] 王 琳, 周铁杨, 唐 兴, 等. 野生苋属植物籽实中新型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的分离纯化及其性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 2004, 20(4): 434.
- [9] 陈 巧, 洪燕飞, 廖金花, 等. 杂色碱碱性磷酸酶在 DMSO 溶液中的活力与构象变化的研究[J]. 厦门大学学报, 2005, 44(6): 836.
- [10] 刘 伟, 肖 婷, 杜 磊, 等. 牛耳枫提取物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3720.
- [11] 梁娟然, 戴菲辉, 苏思莹, 等. 纤维素酶在二甲基亚砜微扰条件下的动力学行为和光谱学变化[J]. 生物加工过程, 2011, 9(2): 29.
- [12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 369.
- [13] 陈如进, 杨 岗, 丁苒芳, 等. 紫外分光光度法测定高乌甲素贴片含量[J]. 中草药, 1992, 23(4): 187.
- [14] 刘 雯, 裘晓丹, 雷 芳, 等. 茶碱对胰  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型及光谱性质[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(20): 298.
- [15] Roberfroid M, Roberfroid MB, Delzenne N M, et al. Dietary fructans[J]. Annu Rev Nutr, 1998, 18: 117.