

# 氧化石墨烯基质毛细管电色谱胰蛋白酶 微反应器的性能研究

刘佳, 董旭, 郭华, 王嫚, 申刚义\*

(中央民族大学药学院, 民族医药教育部重点实验室(中央民族大学), 北京 100081)

**摘要:** 基于石墨烯优良的物化性能, 利用层层组合法将氧化石墨烯修饰于石英毛细管内壁, 制备了氧化石墨烯基质的毛细管电色谱, 通过电渗流、拉曼光谱等对其进行表征。在此基础上, 基于离子键合法将胰蛋白酶固定于毛细管电色谱柱头, 制备胰蛋白酶微反应器。两者结合构成毛细管电色谱胰蛋白酶微反应器。实验结果显示, 氧化石墨烯作为基质既可提高样品的分离效率, 还能促进胰蛋白酶的催化性能。氧化石墨烯修饰的毛细管电色谱对 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)和 N-苯甲酰-L-精氨酸(BA)混合物的分离度从裸毛细管的 3.70 提升至 4.71, 而其固定化酶活性(米氏常数  $K_m = 1.10 \text{ mmol/L}$ , 最大反应速率  $V_{\max} = 0.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )也明显优于裸毛细管( $K_m = 109.77 \text{ mmol/L}$ ,  $V_{\max} = 0.00046 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )。利用所制备的微反应器从 10 种中药材中筛选胰蛋白酶抑制剂活性成分的药材, 结果发现三七和大黄中均存在胰蛋白酶抑制剂活性成分。

**关键词:** 酶微反应器; 氧化石墨烯; 毛细管电色谱; 胰蛋白酶; 抑制剂

中图分类号: O657.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)06-0734-05

## Study on Performance of a Capillary Electrochromatography Enzyme Immobilized Micro-reactor with Graphene Oxide as Carrier

LIU Jia, DONG Xu, GUO Hua, WANG Man, SHEN Gang-yi\*

(Key Laboratory of Ethnomedicine(Minzu University of China), Ministry of Education, School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A capillary electrochromatographic column with graphene oxide(GO) as carrier was fabricated by a layer-by-layer assembly immobilizing the GO nanosheets onto capillary wall. The characterization on the column was carried out by measuring the electro osmotic flow(EOF) and Raman spectrum, etc. Based on this, an about 1 cm length of capillary electrochromatography trypsin micro-reactor was prepared by immobilizing the trypsin on end of capillary column through ion bonding. The performance of this technique was investigated. Results showed that the introduction of GO to the capillary column not only improved its separation efficiency on sample, but also promoted its enzyme catalytic performance. The separation degree of the GO-coated capillary on a mixture of N-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride(BAEE) and N-benzoyl-L-arginine(BA) was increased from 3.70 to 4.71 compared with that of bare capillary. Meanwhile, the enzyme activity of immobilized enzyme with GO as carrier(Michaelis constant  $K_m = 1.10 \text{ mmol/L}$ , the maximum reaction rate  $V_{\max} = 0.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) was also enhanced significantly compared with that of the immobilized enzyme on unmodified capillary( $K_m = 109.77 \text{ mmol/L}$ ,  $V_{\max} = 0.00046 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). The prepared trypsin micro-reactor was finally employed as a model for the screening of enzyme inhibitors from ten kinds of herbs in the crude extracts. Results showed that the *Pseudo-ginseng* and the *Rheum officinale* both contained trypsin inhibitor activity, which indicated that the prepared enzyme immobilized micro-reactor is a potential tool for rapid inhibitor screening.

**Key words:** enzyme microreactor; graphene oxide; capillary electrochromatography; trypsin; inhibitor

收稿日期: 2018-10-29; 修回日期: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(81573834); 民族医药教育部重点实验室(中央民族大学)自主课题(KLEM-ZZ201808); 中央民族大学青年学术团队引领计划成果(2019QNYL26)资助

\* 通讯作者: 申刚义, 博士, 副研究员, 研究方向: 药物分析方法, E-mail: sgy@iccas.ac.cn

固定化酶微反应器作为一种微型生化反应工具, 具有样品用量少、催化效率高、可重复利用、易功能化组装等优势, 在蛋白质酶解、生物传感器、抑制剂筛选等领域得到了广泛研究和应用<sup>[1-3]</sup>。而将固定化酶微反应器和高效分离技术在线联用, 可实现酶解-分离-鉴定一体化平台操作, 显著提速研究周期。目前, 国内外众多学者对固定化酶微反应器在线高效分离技术进行了大量研究<sup>[4-7]</sup>。如 Zhang 等将胰蛋白酶微反应器与  $\mu$ PRLC-ESI-MS/MS 联用, 构建了一个集在线蛋白变性、还原、酶解、分离、检测于一体的蛋白质分析平台<sup>[4]</sup>。相对于其他分离技术, 以毛细管为反应及分离通道的毛细管电泳酶微反应器因制作简便、分离效率高、易于联用而优势明显。研究者将固定化酶微反应器与毛细管电泳在线耦合, 开展了从中药材中筛选酶抑制剂的研究<sup>[7-8]</sup>。本课题组也基于毛细管电泳酶微反应器, 测定了吉非替尼对人表皮生长因子受体的抑制率<sup>[8]</sup>。毛细管电泳酶微反应器主要由酶微反应器和毛细管分离通道两部分构成。不同的固酶基质对酶微反应器的性能有很大影响。而不同的毛细管电泳分离模式也直接影响后续样品的分离效率。因此开发新型固酶基质和电泳分离介质对于提高毛细管电泳酶微反应器性能至关重要。

近年来, 纳米材料作为固酶基质和分离介质逐渐受到研究者的青睐<sup>[9-10]</sup>, 其中石墨烯(Graphene)作为新型纳米材料<sup>[11-12]</sup>广受关注。石墨烯大的比表面积能增加固酶量, 而高电导率可促进酶的催化效率<sup>[13]</sup>。此外, 基于其良好的稳定性以及  $\pi-\pi$  共轭作用等独特物化性质, 石墨烯作为电色谱固相介质可显著提高分离效率。因此, 将石墨烯引入酶微反应器-毛细管电泳技术中, 制备石墨烯基质的固定化酶微反应器-毛细管电色谱, 既能简化制作方法, 还将提高该技术的整体性能。

虽然石墨烯作为毛细管的固酶基质已有研究<sup>[13-14]</sup>, 但将石墨烯优良的固酶性能和分离性能有机结合起来提高毛细管电泳酶微反应器技术整体性能鲜见报道。基于此, 本文以石墨烯衍生物氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)为基质, 以胰蛋白酶为模型蛋白, 通过层层组装法制备了毛细管电色谱胰蛋白酶微反应器, 对其性能进行了研究, 并将其应用于中药材中胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, TI)的快速筛选。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与样品

P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪(Beckman Coulter 公司), 配紫外检测器; 未涂层熔融石英毛细管(内径为 75  $\mu\text{m}$ , 总长为 40 cm, 有效长度 30 cm, 河北永年锐泽色谱器件有限公司); XP205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); pH 计(Sartorius PB-10); KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); NW10VF 超纯水系统(上海康雷分析仪器有限公司); RFS100/S 傅立叶拉曼光谱仪(Bruker 公司)。

GO(片径 50~200 nm, 南京先丰纳米材料科技有限公司); 牛胰蛋白酶(1:250, 4.0 U/mg, 美国 Amresco 公司); N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)、N-苯甲酰-L-精氨酸(BA)、聚乙烯亚胺(PEI, 50% 水溶液)、苜蓿盐盐酸盐(BH)均购于阿拉丁试剂上海公司; 10 种中药材(北京同仁堂中关村药店); 其他化学试剂(国药集团)除特殊说明外均为分析纯; 实验用水为超纯水; 所用溶液均经 0.22  $\mu\text{m}$  尼龙 66 膜过滤。

### 1.2 GO 毛细管电色谱的制备

裸毛细管内壁依次用 1 mol/L NaOH、超纯水、0.1 mol/L 的 HCl 各冲洗活化 20 min, 冲洗压力为 20 psi(1 psi =  $6.9 \times 10^3$  Pa)。活化后的毛细管用 5% (体积分数) PEI 冲洗 20 min 使内壁带正电荷, 用超纯水反向将未结合的 PEI 冲洗掉。通入 0.5 mg/mL 的 GO(使用前超声处理 0.5 h), 孵化 20 min, 重复上述步骤一次, 使毛细管内壁带上负电荷。用超纯水反向将未结合的 GO 冲洗掉。以上正向冲洗压力均为 5 psi, 反向冲洗压力均为 10 psi。

### 1.3 胰蛋白酶微反应器的制备

在 GO 毛细管电色谱进样端以 0.5 psi 的压力进样 10 s 注入一段约 1 cm 长的 5 mg/mL 的胰蛋白酶 Tris-HCl 溶液(50 mmol/L, pH 8.0)。孵化 40 min 后用 Tris-HCl 缓冲液反向冲洗 10 min, 冲洗压力为 10 psi。反应器制备完成后于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

## 1.4 药材提取液的制备

分别准确称量 5.0 g 各种中药材, 粉碎, 加入 100 mL 6 mmol/L NaOH 溶液, 超声 30 min。然后用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 8.0, 再超声 1.5 h, 倾入高速离心管中, 以 16 000 r/min 高速离心 10 min 使之分层, 弃去不溶物, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜, 滤液于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存待用, 临用时稀释至所需浓度。

## 1.5 仪器工作条件

电泳条件: 胰蛋白酶微反应器毛细管电色谱柱使用前经 Tris - HCl 缓冲液冲洗 10 min, 两次进样间运行缓冲液冲洗 5 min。样品进样量为 0.5  $\mu\text{s}$ , 分离电压 20 kV, 检测波长 254 nm, 实验温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 。系统控制与数据处理由 32Karat 软件完成。

酶性能测定条件: 不同浓度的 BAEE 按照上述进样量导入微反应器柱端, 25  $^{\circ}\text{C}$  下与固定化胰蛋白酶孵化 1 min 后分离检测, 其他条件同上。通过产物 BA 峰面积的变化来计算酶活。

抑制率测定条件: 10 mmol/L BAEE 和 5 mmol/L 抑制剂 BH(或 10 mg/mL 的中药材粗提物) 的混合液导入胰蛋白酶微反应器柱端, 于 25  $^{\circ}\text{C}$  下孵化 1 min 后分离检测, 其他条件同上。通过添加抑制剂前后产物 BA 峰面积的变化来计算抑制率:  $\text{Inhibition}(\%) = 100 - (100x/\text{blank})$ ; 式中,  $\text{Inhibition}(\%)$  为抑制率; blank 为加入抑制剂前产物 BA 的峰面积;  $x$  为加入抑制剂后 BA 的峰面积。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GO 电色谱表征

**2.1.1 电渗流** 选用二甲基亚砜(DMSO)作为电渗流(EOF)标记物, 以 pH 7.0~9.0 的 Tris - HCl 为运行缓冲液, 测定了 GO 毛细管电色谱的 EOF 值。结果如图 1 所示, 裸管的 EOF 随着 pH 值增大而增大; 当其表面修饰正电荷的 PEI 后, EOF 反转为负值; 而当进一步修饰 GO 后, 由于 GO 表面含有羧基负离子, 使得 EOF 回归正向。通过比较, 还可发现 GO 修饰的毛细管 EOF 稳定性在 pH 7.0~9.0 范围内有明显改善。

**2.1.2 拉曼光谱** 采用拉曼光谱对其结构进行表征。由图 2 可见, 毛细管修饰 GO 后显示出了两个特征峰 D 带(1 335  $\text{cm}^{-1}$ )和 G 带(1 610  $\text{cm}^{-1}$ ), 表明 GO 已成功修饰在毛细管内壁。

**2.1.3 稳定性** 分别考察了 GO 柱在同一天内多次测定( $n=5$ )、多天测定( $n=5$ )及不同批次 GO 柱( $n=3$ )电渗流的稳定性, 结果显示, 其相对标准偏差(RSD)均小于 5%, 表明所制备的毛细管电色谱具有良好的稳定性。

### 2.2 分离性能

以胰蛋白酶的底物 BAEE 和产物 BA 的混合物为分离对象, 考察 GO 毛细管电色谱的分离能力。结果发现, GO 毛细管电色谱分离度( $R$ )为 4.71( $n=3$ ), 而裸毛细管为 3.70( $n=3$ )。由此可见, GO 的引入可使分离效果明显提高, 有望进一步应用于复杂化合物的分离。

### 2.3 酶微反应器的性能

在 GO 毛细管电色谱的基础上制备了固定化胰蛋白酶微反应器, 并考察微反应器的性能。

**2.3.1 稳定性** 将 5 mmol/L BAEE 底物通入反应器, 孵化 1 min 后进行分离检测。以产物 BA 初始峰

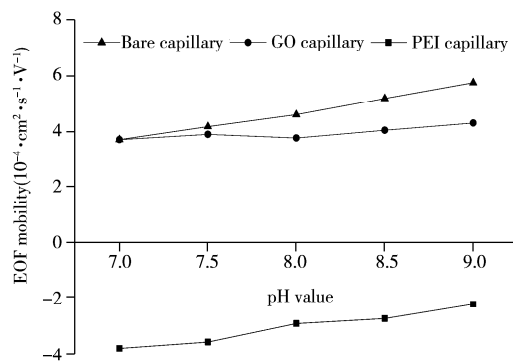


图 1 不同毛细管的 EOF 随 pH 值(7.0~9.0)的变化  
Fig. 1 The variation of EOF with pH range from 7.0 to 9.0 in different capillaries

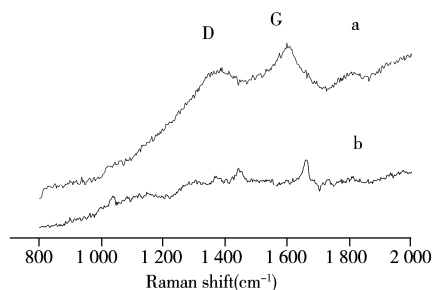


图 2 GO 修饰毛细管(a)和裸管(b)的拉曼光谱  
Fig. 2 Raman spectra of the GO-coated capillary(a) and bare capillary(b)

面积为定量指标, 考察微反应器的稳定性。结果显示, 新制备的微反应器前 8 次峰面积呈波动式下降, 这可能与未结合的酶流失有关。从第 9 次后趋于稳定, RSD 为 3.8% ( $n=10$ )。2 日内连续测定 20 次 RSD 为 1.8%。不同批次间 RSD 为 2.3% ( $n=3$ )。

**2.3.2 孵化时间** 考察了反应器不同孵化时间对酶活的影响(图 3)。结果显示, 随着孵化时间的延长, 产物 BA 量逐渐增加, 表明酶的水解活性提高。当孵化时间达到 8 min 后, BA 量最大且不再增加。由于孵化时间过长会造成样品区带的扩散, 不利于分离, 且分析时间也会延长, 综合考虑将孵化时间选为 1 min。

**2.3.3 酶活性能** 反应器的酶活性能主要通过米氏常数( $K_m$ )和最大反应速率( $V_{max}$ )进行评价。本研究计算得固定化胰蛋白酶微反应器的  $K_m =$

1.10 mmol/L,  $V_{max} = 0.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。同时, 利用静电作用在裸毛细管中固定胰蛋白酶, 在相同实验条件下, 固定化酶的  $K_m$  为 109.77 mmol/L,  $V_{max}$  为 0.00046 mmol  $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。对比可知, 采用 GO 作为固定酶基质的固定化酶的  $K_m$  远小于裸管,  $V_{max}$  远大于裸管。表明 GO 的引入显著提高了固定化酶的亲和力和对底物的催化活性。原因可能是 GO 具有独特的单原子厚度, 其二维的平面结构提供了极大的比表面积, 可以用来负载大量的各种分子, 将其作为固酶载体, 利于胰蛋白酶的固定。并且表面含有丰富的含氧基团, 有利于提高酶的固载量, 从而改善了酶微反应器的性能。

## 2.4 实际应用

胰蛋白酶抑制剂(TI)是对胰蛋白酶具有抑制作用的一类物质, 临床上广泛用于治疗胰腺炎、休克和脑外科、手术止血、肿瘤等。利用胰蛋白酶作为筛选 TI 的靶标, 从中药材提取物中筛选出活性药物具有非常重要的意义。本研究将所制备的酶微反应器用于实际药材中 TI 活性成分的筛选。图 4 为已知抑制剂 BH 和三七粗提液添加前后对胰蛋白酶抑制的电泳分离图。从图 4A 可知, 加入 BH 后产物 BA 峰面积与未加前相比明显降低, 而底物 BAEE 峰面积则相对增大。表明 BH 的加入有效抑制了胰蛋白酶对 BAEE 的水解。三七也有类似的结果(图 4B)。

表 2 列出了对市售 10 种中药材的筛选结果, 发现三七、大黄对胰蛋白酶有抑制作用, 其它中药材则无抑制, 与文献报道结果一致<sup>[15-16]</sup>, 表明该方法可以用于药材中酶抑制剂的快速筛选。抑制率计算结果与文献中存在差异主要是由于孵化温度的不同导致。

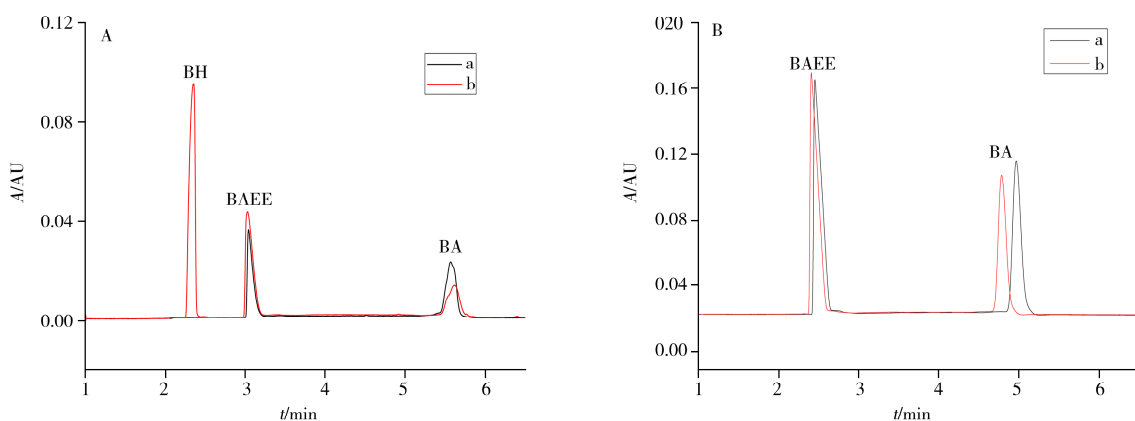


图 4 5 mmol/L BH(A) 和 50 mg/mL 三七粗提液(B)添加前(a)、后(b)底物 BAEE 和产物 BA 峰面积的变化

Fig. 4 Peak area change of BAEE and BA before(a) and after(b) adding 5 mmol/L BH(A) and 10 mmol/L *Pseudo-ginseng*(B)

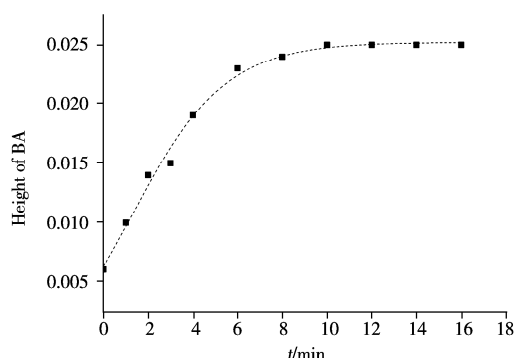


图 3 孵化时间对产物率的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on product BA

表 2 不同药材对胰蛋白酶的抑制率  
Table 2 Compound library for inhibitor screening

Sample	Inhibition (%)	Sample	Inhibition (%)
<i>Pseudo-ginseng</i> (三七)	26	<i>Phellodendron</i> (黄柏)	0
<i>Fresh Rehmanniae Radix</i> (鲜地黄)	0	<i>Rheum officinale</i> (大黄)	26.12
<i>Radix angelicae sinensis</i> (当归)	0	<i>Atractylodes macrocephala</i> (白术)	0
BH	53.5	<i>Codonopsis pilosula</i> (党参)	0
<i>Lonicera japonica</i> (金银花)	0	<i>Scropularia ningpoensis</i> (玄参)	0
<i>Dioscorea opposita</i> (山药)	0		

### 3 结 论

本文基于 GO 兼具良好的分离能力和固酶性能, 构筑了 GO 功能化的毛细管电色谱胰蛋白酶微反应器, 并利用该反应器从 10 种中药材中筛选出 2 种有胰蛋白酶抑制剂成分的中药材(三七和大黄)。该研究既为毛细管电泳酶微反应器的制备方法拓展了思路, 也为酶抑制剂筛选快速提供了一种简便的技术。

#### 参考文献:

- [1] Shen G Y, Yu W T, Liu M R, Cui X. *Prog. Chem.* (申刚义, 于婉婷, 刘美蓉, 崔勋. 化学进展), **2013**, 25(7): 1198–1207.
- [2] Yin J F, Xu T, Zhang N, Wang H L. *Anal. Chem.*, **2016**, 88: 7730–7737.
- [3] Zhang J Q, Zheng F, Qin W J, Qian X H. *Chin. J. Anal. Chem.* (张倩, 郑斐, 秦伟捷, 钱小红. 分析化学), **2016**, 44(11): 1692–1697.
- [4] Ma J F, Liu J X, Sun L L, Gao L, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2009**, 81: 6534–6540.
- [5] Yan X Y, Gilman S D. *Electrophoresis*, **2010**, 31: 346–354.
- [6] Tang Z, Kang J. *Anal. Chem.*, **2006**, 78: 2514–2520.
- [7] Zhao H, Chen Z. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1340: 139–145.
- [8] Shen G Y, Yu W T, Zhang A Q, Liu M R, Wang N. *Chin. J. Anal. Lab.* (申刚义, 于婉婷, 张爱芹, 刘美蓉, 王宁. 分析实验室), **2014**, 33(4): 392–394.
- [9] Deng H N, Yang X L, Tian M. *Chem. Ind. Eng. Prog.* (邓会宁, 杨秀丽, 田明. 化工进展), **2014**, 33(11): 3000–3006.
- [10] Cao S L, Xu P, Ma Y Z, Yao X X, Yao Y, Zong M H, Li X H, Lou W Y. *Chin. J. Cata.* (曹诗林, 徐培, 马永正, 姚潇晓, 姚远, 宗敏华, 李雪辉, 娄文勇. 催化学报), **2016**, 37: 1814–18237.
- [11] Liu J, Zhang L, Shen G Y. *Chem. Bull.* (刘佳, 张蕾, 申刚义. 化学通报), **2017**, 80(1): 41–46.
- [12] Ding H, Chen X X, Feng X, Wang S S, Jin J. *J. Instrum. Anal.* (丁浩, 陈小霞, 冯晓, 王珊珊, 金君. 分析测试学报), **2017**, 36(8): 969–974.
- [13] Yin Z, Zhao W, Tian M, Zhang Q, Guo L, Yang L. *Analyst*, **2014**, 139: 1973–1979.
- [14] Jiao J, Miao A, Zhang X, Cai Y, Lu Y, Zhang Y, Lu H. *Analyst*, **2013**, 138: 1645–1648.
- [15] Liu T X, Niu J Z, Du X D, Zhang Z S, Huang N T, Wu Y C, Wang J F. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (刘同祥, 牛建昭, 杜旭东, 张宗申, 黄能听, 吴跃传, 王继峰. 中国中药杂志), **2007**, 32: 643–646.
- [16] Lin H Y, Li T T, Yang L P, Fang Y L. *J. Fujian Norm. Univ. : Nat. Sci. Ed.* (林海英, 李田土, 杨良鹏, 方幼兰. 福建师大学报: 自然科学版), **1983**, 1: 83–86.

(责任编辑: 周启动)