

磁珠固定化酶和 LC-MS/MS 筛选鉴定虎杖中的胰脂肪酶抑制剂

陈廷贵*, 魏煜如, 张立伟

化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西大学分子科学研究所, 太原 030006

摘要:肥胖严重危害着人类的健康,各种减肥药物和替代疗法正在不断研发之中。本文首先结合单因素实验,利用响应面分析法,优化了羧基磁珠固定化胰脂肪酶合成条件,对其结构、稳定性、专一性及重复性进行了验证,然后通过该固定化酶筛选出了天然植物虎杖中的胰脂肪酶抑制剂,最后通过分子模拟对不同抑制类型抑制剂结合位置进行了预测。结果表明:缓冲液 pH 值 7.48、PL 浓度 20.32 mg/mL、温度 35.40 °C 为最佳合成条件,胰脂肪酶成功固定于羧基磁珠之上,且储存 2 周后酶活仍保持 80% 以上,可特异性筛选出阳性抑制剂,重复利用五次后酶活仍保持 50% 以上。从虎杖醇提水沉物中共筛选出 6 个胰脂肪酶抑制剂,经 LC-MS/MS 鉴定和混合标准品确认,共鉴定出 4 个胰脂肪酶抑制剂,其 IC_{50} 值和抑制类型分别为大黄素 ($72.3 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$, 非竞争性抑制)、白藜芦醇 ($195.5 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$, 混合型抑制)、大黄素甲醚 ($168.8 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$, 反竞争性抑制) 和大黄素-8- O - β -D-葡萄糖 ($234.3 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$, 非竞争性抑制),其中白藜芦醇、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖是新发现的胰脂肪酶抑制剂。分子模拟预测出不同抑制类型抑制剂分别结合于胰脂肪酶的两个位置。

关键词:虎杖;肥胖;胰脂肪酶抑制剂;磁珠固定化酶

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.2.003

Screening and Identification of Pancreatic Lipase Inhibitors in *Polygonum cuspidatum* with Enzyme-Immobilized Magnetic Nanoparticles and LC-MS/MS

CHEN Ting-gui*, WEI Yu-ru, ZHANG Li-wei

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Obesity is seriously harmful to human health, therefore, a variety of anti-obesity drugs and alternative therapies are in constant development. In this study, pancreatic lipase immobilized on carboxylic acid-terminated magnetic nanoparticles synthesis conditions were optimized by response surface analysis firstly. Next, pancreatic lipase inhibitors were screened and identified from *Polygonum cuspidatum*. At last, binding locations of different type inhibitors and complex of pancreatic lipase and colipase were predicted. The results showed that the optimal synthetic conditions were pH 7.48, PL 20.32 mg/mL and 35.40 °C, pancreatic lipase had been successfully immobilized on magnetic nanoparticles. And after 2 weeks, the enzyme activity still remained over 80%, which can specifically screen out positive inhibitors. In addition, the enzyme activity kept over 50% after it had been reused for five times. Altogether 6 inhibitors on pancreatic lipase had been screened out from *P. cuspidatum*, and 4 inhibitors were identified by LC-MS/MS and mixed standard sample. The IC_{50} and inhibition types were respectively emodin ($72.3 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$, non-competitive inhibition), resveratrol ($195.5 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$, mixed inhibition), physcion ($168.8 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$, anti-competitive inhibition) and emodin-8- O - β -D-glucose ($234.3 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$, non-competitive inhibition). In 4 inhibitors, resveratrol and emodin-8- O - β -D-glucose inhibitors were firstly discovered. Two binding location of different type inhibitors on pancreatic lipase and colipase complex were predicted.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; obesity; pancreatic lipase inhibitor; enzyme-immobilized magnetic nanoparticles

肥胖已成为全球性流行病,可引起冠心病、II 型

糖尿病、癌症、呼吸系统疾病与骨关节炎等^[1]。在与肥胖斗争中,因胰脂肪酶(Pancreatic lipase, PL)可水解 50% ~ 70% 的膳食脂肪,其抑制剂的筛选成为减肥药物研究主要方向之一^[2,3]。然而,奥利司他作为 PL 抑制剂的突出代表,仍有一些副作用^[4-6],

收稿日期:2016-09-22

接受日期:2016-11-14

基金项目:山西省中药现代化关键技术研究振东专项(2014ZD0304)

* 通讯作者 Tel:86-015536955921; E-mail:chentg@sxu.edu.cn

因此,理想的天然 PL 抑制剂仍在探索之中^[7-10]。

传统方法上,从天然产物中筛选 PL 抑制剂是一项费时和费力的工作,往往涉及到重复的生物活性导向分离和鉴定^[11-13]。近年来,固定化酶技术已成为从中草药中筛选有效成分的新方法^[14-16],而磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNPS)因其表面结构多样性、酶负载能力大、重用性好、易分离等特点,正成为优良的固定化酶载体^[17-19]。

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.),属于蓼科植物,是一种传统中草药,广泛分布于中国、韩国和日本等国家,用于治疗炎症、便秘、感染、黄疸、胆结石、皮肤灼伤和高脂血症等疾病^[20-22]。另外,虎杖粗提物对 PL 有较强的抑制作用,但其有效成分还不清楚^[23]。

本文首先通过优化条件合成羧基磁珠固定化 PL(pancreatic lipase immobilized on magnetic nanoparticles, PLIMNs),然后就其结构、稳定性、专一性和重复性进行研究,接着通过合成的固定化酶和 LC-MS/MS 对虎杖中的 PL 抑制剂进行筛选和鉴定,最后对不同抑制类型抑制剂结合于 PL 和辅脂酶复合体上的位置进行预测。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

羧基磁珠(10 mg/mL, 1 μm)购买于上海奥润微纳新材料科技有限公司;虎杖购买于振东制药;PL、N-(3-dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide HCl (EDC)、N-hydroxysuccinimide (NHS)、2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)、Tween 20、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和甘氨酸(Gly)均购于 Solarbio 科技有限公司;对硝基苯基丁酸酯(p-Nitrophenyl butyrate, pNPB)购于 Sigma 公司;白藜芦醇(批号:R02J6S1)、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖(批号:Z25A7B13739)购于上海源叶生物科技有限公司;大黄素(批号: MUST-14110704)、大黄素甲醚(批号: MUST-14072413)购于成都曼思特生物科技有限公司;色谱纯乙腈、96 孔微量滴定板购于 NEST Biotech Co. Ltd。其它试剂均为分析纯,所有溶液均用超纯水配制。

JSM-700F 扫描电镜(日本电子公司),Spectra Max 190 酶标仪(美国 molecular devices 公司),Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Thermo Scientific Q Exactive 高分辨液质联用

仪。

1.2 固定化酶结构表征

羧基磁珠(CATMNs)、固定化 PL(PLICATMNs)及甘氨酸封闭后的固定化 PL(PLICATMSGs)通过 JSM-700F 扫描电镜进行表征。

采用 KBr 压片法,分别取少量空白磁珠、PL、磁珠固定化 PL,与 KBr(质量比约为 1:100)压片,测其红外吸收光谱图。

1.3 固定化酶合成条件优化

1.3.1 酶活力与酶固载量的测定

1.3.1.1 酶活力测定方法

在 1.5 mL 离心管中加入 100 μL 固定化酶溶液,再加入 800 μL Tris-HCl 缓冲液,100 μL pNPB 溶液,37 °C 精确水浴 10 min,以空白磁珠溶液作为空白对照组。然后磁分离,取上清液,测其 400 nm 处的吸光度值。根据标准曲线,计算 pNP 浓度。按以下公式计算酶活力。

$$X = \frac{C_{pNP} \times V_{总}}{C_{PL} \times V_{PL} \times t}$$

公式中,X 为 PL 活力,U/mg;C_{pNP}为反应体系中 pNP 浓度;V_总为反应体系的总体积;C_{PL}为酶液中的蛋白含量;V_{PL}为加入酶液的体积;t 为反应时间。

按上述方法测定溶液 PL 活力,以不加酶液作为空白对照。而后用下列公式计算固定化酶的相对活力:

$$R(\%) = \frac{X_{固}}{X_{溶}} \times 100\%$$

公式中,R 为固定化酶相对活力,X_固为固定化酶活力,X_溶为溶液酶活力。

1.3.1.2 酶固载量测定方法

分别测定酶固定前 PL 溶液、固定后上清液蛋白浓度,按以下公式计算酶固载量。

$$M = \frac{C_{前} \times V_{溶液} - C_{后} \times V_{溶液}}{C_{磁} \times V_{磁}}$$

公式中,C_前:固定前溶液蛋白含量,μg/mL;V_{溶液}:加入的 PL 溶液的体积;C_后:固定后上清液蛋白含量,μg/mL;C_磁:磁珠浓度,mg/mL;V_磁:加入磁珠的体积。

1.3.2 单因素实验

合成条件包括 PL 浓度、缓冲溶液 pH 值、合成时间及合成温度。

PL 浓度考察:磁珠浓度一定(2 mg/mL),考察 PL 浓度(5、10、15、20、25 mg/mL)。缓冲溶液 pH 考

察:其它条件一定,考察缓冲溶液 pH(5.6、6.2、6.8、7.4、8.0)。反应时间考察:PL 浓度 20 mg/mL,缓冲溶液 pH 为 7.4 条件下,反应时间(60、120、180、240、300 min)。合成温度考察:其他条件一定,温度(25、31、37、43 °C)。这四个因素对酶活力及酶固载量的影响。

1.3.3 响应面法优化

在单因素实验结果的基础上,采用 BBD 法进行实验设计,选取缓冲液 pH 值、PL 浓度和温度这 3 个对固定化酶合成起主要影响的 3 个因素为考察变量,以酶活力和酶固载量为衡量指标。

1.4 自由酶和固定化酶的稳定性、固定化酶特异性以及重复利用实验

优化条件下合成固定化酶,比较 4 °C 储存的固定化酶与游离酶二者两周内酶活力变化。

称取阳性 PL 抑制剂橙皮苷(IC₅₀为 53.51 μg/mL)^[24]与阴性 PL 抑制剂五味子醇甲^[14]各 5 mg,溶于 1 mL DMSO 溶液中,取其 20 μL 加入到 300 μL 固定化酶(2 mg/mL)中,然后用 PBS 缓冲液定容至 1 mL。37 °C 孵育 120 min,孵育结束后,去上清,用 1 mL PBS 缓冲液冲洗固定化酶 3 次以去除非特异性吸附,分别收集洗脱液,第 4 次用 1 mL 10% 乙腈变性溶液将特异性吸附化合物洗脱下来。4 次洗脱液分别进行 HPLC 检测。

利用 PL 阳性抑制剂橙皮苷和阴性抑制剂五味子醇甲混合物进行固定化酶的重复利用实验,进行 5 次。方法同特异性筛选试验。

1.5 样品制备和抑制剂筛选

准确称取虎杖 300 g,加入 3 L 70% 乙醇,回流提取 1.5 h,抽滤得滤液,重复提取一次,合并滤液,浓缩至 300 mL。其中,1/4 浓缩液进行干燥,剩下的 3/4 加入 4 倍蒸馏水,震荡,静止 1 h,进行离心,得到醇提水沉物与醇提水溶物,分别对其进行浓缩干燥。

测定虎杖醇提物(AE)、醇提水沉物(AEWPf)和醇提水溶物(AEWSF)三者的抑酶活性。取 100 μL PL 溶液(0.5 mg/mL, Tris-HCl 溶解)置于 1.5 mL 离心管中,再加入 20 μL 浓度为 0.5 mg/mL 的待测样品溶液,用 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液定容至 900 μL,充分振荡后迅速将溶液转移到 96 孔酶标板(每个浓度设 4 个复孔)37 °C 下孵育 15 min。然后每个孔加入 20 μL pNPB 溶液(10 mmol/L, 乙腈溶解),最后用酶标仪测定该溶液 400 nm 处的吸光度

值在 15 min 内随时间的变化率 K。根据如下公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (K_{\text{正常组}} - K_{\text{实验组}}) / K_{\text{正常组}} \times 100\%$$

反应体系中以不加酶作为空白对照,不加抑制剂作为正常组,以奥利司他作为阳性对照,每个实验重复 3 次。

选取最高抑酶活性组分,进行 PL 抑制剂固定化酶筛选,方法与“1.4”相同。用 HPLC 检测是否已筛选出抑制剂,条件为:Thermo Scientific Hypersil Gold C₁₈柱进行分离,检测波长 254 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL/min,流动相为乙腈(A)和 0.5% 醋酸水溶液(B),梯度洗脱设置:0~8 min,13%~23% A;8~14 min,23% A;14~34 min,23%~50% A;34~46 min,50%~80% A;46~51 min,80%~13% A;51~56 min,13% A。

1.6 抑制剂鉴定

通过 LC-MS/MS 及混合标准品比对进行抑制剂的鉴定,其中 LC 条件同上。混合标准品配制过程:取适量白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷标准品,用 10% 乙腈水溶液溶解,按“1.5”色谱条件进行检测。所得 HPLC 图谱与该混合标品 HPLC 图谱进行比较,鉴定其化合物。

1.7 抑制剂抑酶活性及抑制类型测定

抑酶活性检测:方法同“1.5”。抑制类型测定:分别配制 0.5 mg/mL PL 溶液和浓度接近 IC₅₀ 值的抑制剂溶液,以不加抑制剂作为对照组,加抑制剂作为实验组,测定底物浓度分别为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mmol/L 时的酶反应速率,然后按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图,最后,根据对照组和实验组两直线交点的位置判断抑制类型。

1.8 抑制剂与 PL 和辅脂酶复合体结合位置预测

从 RCSB PDB 数据库下载 1LPA 晶体结构,除配体加氢加电荷。不同抑制剂进行结构优化。竞争性抑制剂采用 Ligand mode 进行预测,其它抑制类型抑制剂采用 Automatic mode 进行预测,其它参数采用默认参数。

2 实验结果

2.1 固定化酶结构表征

扫描电镜表征如图 1 中 A、B、C 所示。结果表明,PL 成功固定于羧基磁珠表面。A 图:CATMNs, B 图:PLICATMs, 短箭头所指突起部分为固定上的 PL, C 图:PLICATMSGs, 短箭头所指突起部分为固定

上的 PL,长箭头所指为封闭的甘氨酸。

磁珠固定化 PL 的傅里叶红外光谱表征结果见图 2。由图看出空白磁珠在 1647 cm^{-1} 处出现羧基的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰,而磁珠固定化酶则只在

1632 cm^{-1} 处出现酰胺键的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰,说明磁珠上的羧基与 PL 上的氨基反应形成了酰胺键,证明 PL 成功地通过共价键键合在羧基磁珠上。

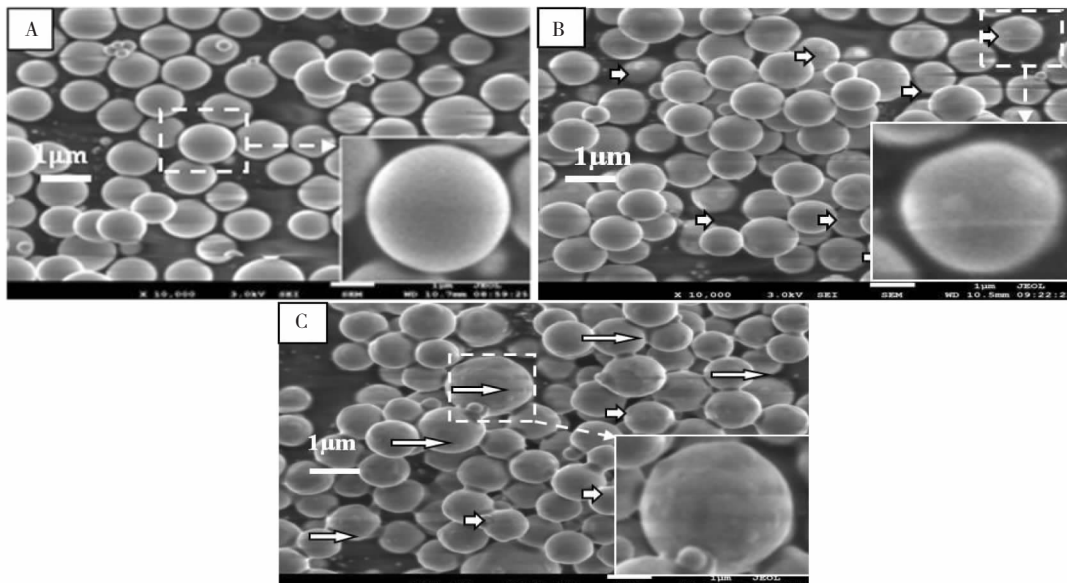


图 1 羧基磁珠(A)、羧基磁珠固定化 PL(B)和甘氨酸封闭的羧基磁珠固定化 PL(C)扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electron microscope of CATMNs (A), PLICATMs (B) and PLICATMSGs (C)

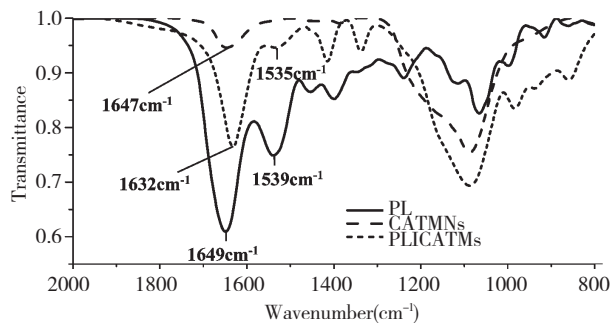


图 2 PL、磁珠、磁珠固定化酶的红外吸收光谱

Fig. 2 Infrared absorption spectrum of PL, CATMNs and PLICATMs

2.2 固定化酶合成条件优化

2.2.1 单因素实验结果

酶浓度、缓冲溶液 pH 值、合成时间和合成温度对固定化酶酶活力和酶固载量的影响结果如图 3,由此可知初步的最佳反应条件:PL 浓度 20 mg/mL 、pH 7.4、时间 180 min、温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 响应面优化结果

本研究采用三因素三水平 BBD 设计优化缓冲液 pH 值、PL 浓度和反应温度,实验结果列于表 1

中。方差分析表明,两个响应值模型均有较高显著性($P < 0.001$), R^2 均大于 0.95,实验数据与模型预测值相吻合。两者的失拟值均不显著,意味着模型对于预测反应精确性很高。酶活变异系数(C. V. %) 小于 4.64%,酶固载量变异系数小于 5.74% 表示该模型具有很好的重复性。通过响应面图可直观反映各个因素的交互作用对两个响应值得影响如图 4,最佳合成条件:缓冲液 pH 值 7.48、PL 浓度 20.32 mg/mL 、温度 $35.40\text{ }^{\circ}\text{C}$,此条件下酶活力为 89.74%、酶固载量为 $84.54\text{ }\mu\text{g/mg}$,按最优条件进行验证,测得酶活力为 89.02%、酶固载量为 $83.18\text{ }\mu\text{g/mg}$,与预测值基本吻合,偏差较小,说明此模型预测可靠。

2.3 固定化酶稳定性、特异性和重复性实验

稳定性实验结果表明,固定化 PL 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存 2 周后酶活力仍可维持最初活性 80% 以上,而游离酶酶活降到 20% 左右。固定化酶能够将混合物中的阳性抑制剂成功筛选出来,具有特异性。重复筛选 5 次后,固定化酶酶活依然保持 50% 以上,证明该固定化酶重复性较好。

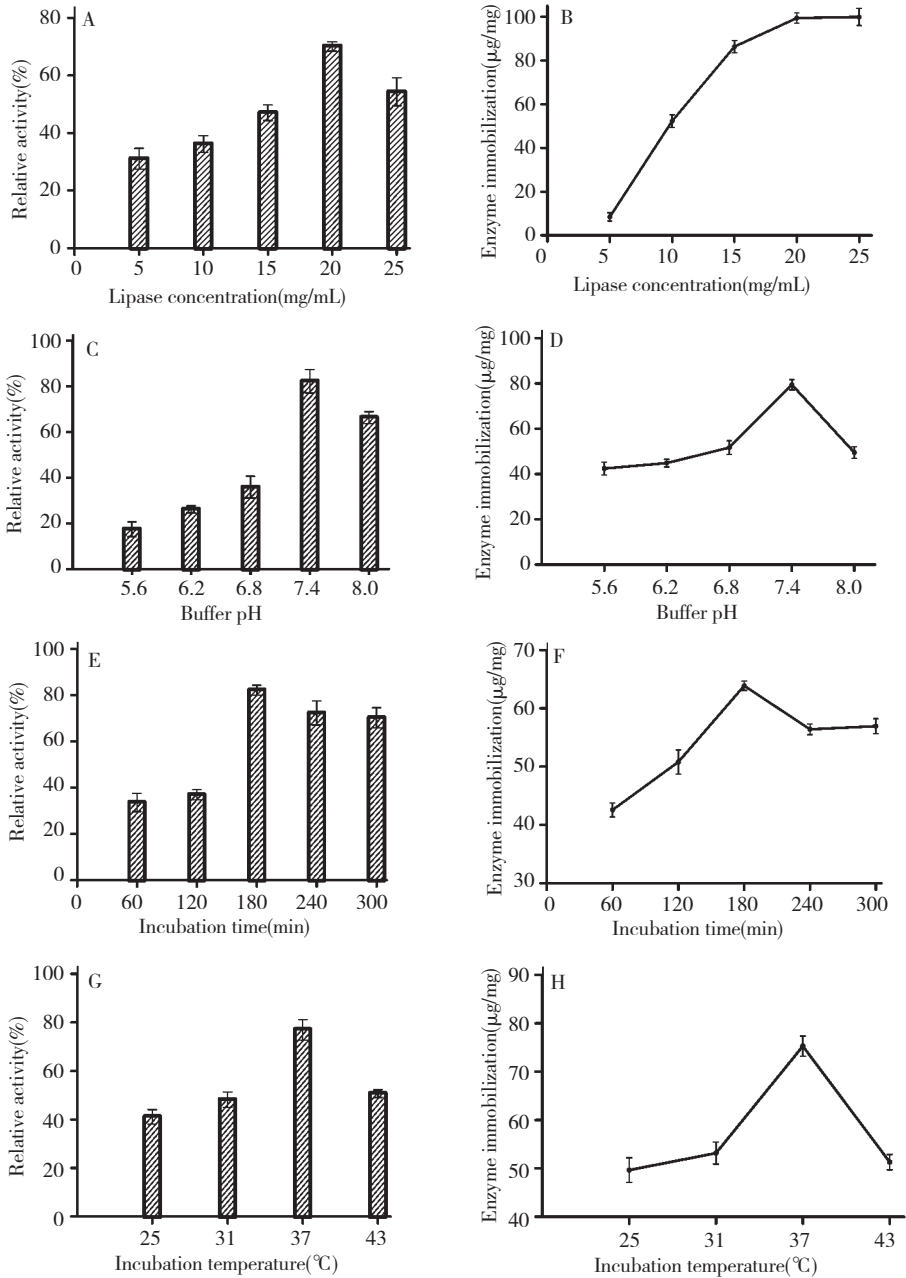


图3 PL浓度、缓冲液pH、孵育时间和孵育温度对固定化酶活性和酶固载量的影响

Fig. 3 Effects of enzyme concentration, buffer solution pH, incubation time and temperature on immobilized enzyme activity and enzyme immobilizing capacity

表1 响应面实验设计结果

Table 1 Design and results of response surface analysis

序号 No.	缓冲液 pH Buffer pH	PL 浓度 PL Concentration	温度 Temp	R ₁	R ₂
1	6.80	20.00	43.00	57.3767	44.2061
2	7.40	25.00	43.00	77.4118	67.0878
3	6.80	20.00	31.00	76.5064	66.5908
4	7.40	20.00	37.00	85.0792	80.0535

序号 No.	缓冲液 pH Buffer pH	PL 浓度 PL Concentration	温度 Temp	R ₁	R ₂
5	6.80	25.00	37.00	57.0981	43.5981
6	8.00	25.00	37.00	70.7753	63.1051
7	8.00	20.00	31.00	77.8545	67.9083
8	7.40	20.00	37.00	87.1005	85.3563
9	7.40	20.00	37.00	86.1069	81.1035
10	7.40	20.00	37.00	85.7633	84.9514
11	8.00	15.00	37.00	67.1833	50.7935
12	7.40	15.00	31.00	72.5412	65.4115
13	7.40	25.00	31.00	73.8165	65.9882
14	7.40	15.00	43.00	69.1442	62.1883
15	7.40	20.00	37.00	87.2197	86.1223
16	6.80	15.00	37.00	57.6787	44.0112
17	8.00	20.00	43.00	73.3363	65.5983

注: R₁: 固定化酶活性; R₂: 酶固载量。

Note: R₁: immobilized enzyme activity; R₂: enzyme immobilizing capacity.

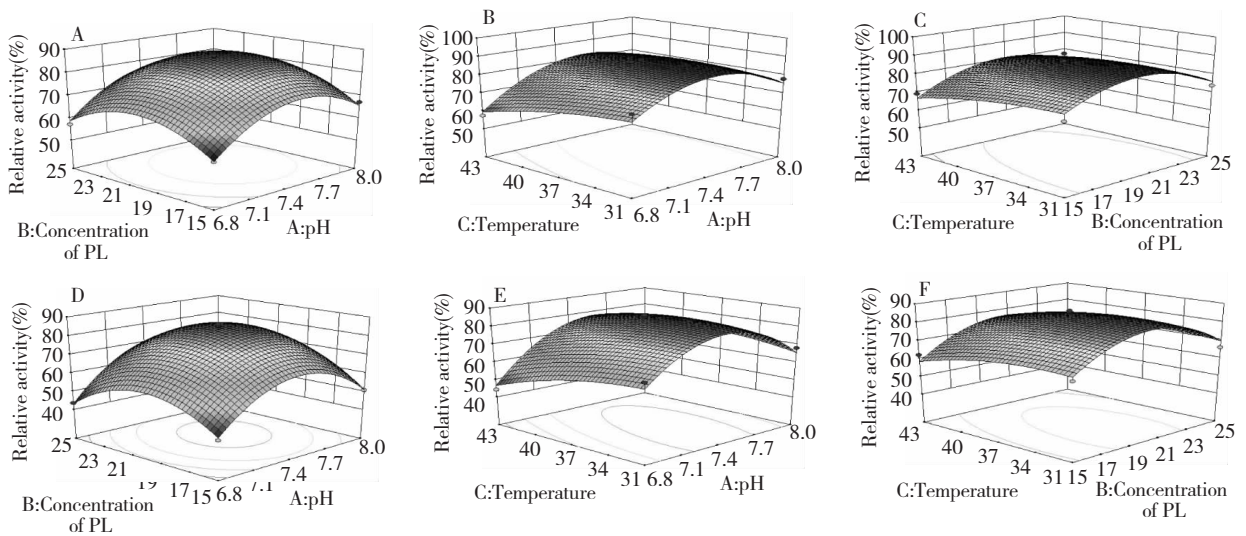


图4 各因素交互作用对固定化酶活性及酶固载量影响的响应面图

Fig. 4 Response surface plots showing mutual effects of reaction conditions on immobilized enzyme activity and enzyme immobilizing capacity

2.4 虎杖中 PL 抑制剂的筛选与鉴定

虎杖醇提物、醇提水沉物和醇提水溶物在 500 μg/mL 时对 PL 的抑制作用分别为 66.82%、72.24%、60.25%，因此选择醇提水沉物作为固定化酶筛选对象。

固定化酶筛选该组分的变性洗脱液 HPLC 图谱见图 5A，可筛选出 6 个化合物。通过 LC-MS/MS 鉴定，A、B、D、F 四个化合物分别为白藜芦醇、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素(鉴定结果见附录)。混合标准品 HPLC 图谱图 5B 进一步确认了

该 4 个化合物。

2.5 各抑制剂抑酶活性与抑制类型检测

经检测，大黄素、白藜芦醇、大黄素甲醚和大黄素-8-O-β-D-葡萄糖四个 PL 抑制剂 IC₅₀ 值分别为 72.3 ± 2.4、195.5 ± 3.6、168.8 ± 3.4、234.3 ± 5.2 μg/mL。四个抑制剂抑制类型检测结果见图 6 所示，从图中可看出白藜芦醇为混合型抑制，大黄素甲醚表现为反竞争性抑制，大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷和大黄素均表现为非竞争性抑制。

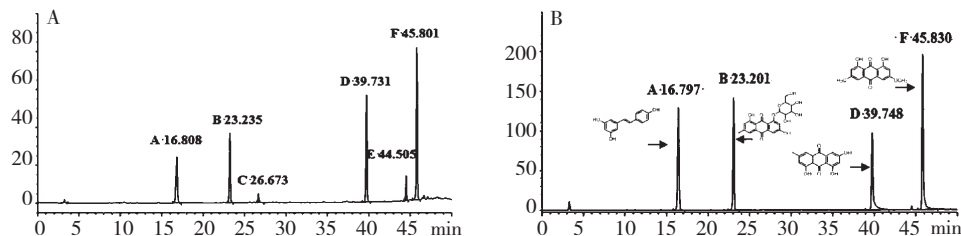


图5 固定化 PL 洗脱液 (A) 及混合标准品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of compounds screened out by PLICATMs from acetonitrile denatured solution (A) and mixed standard samples (B)

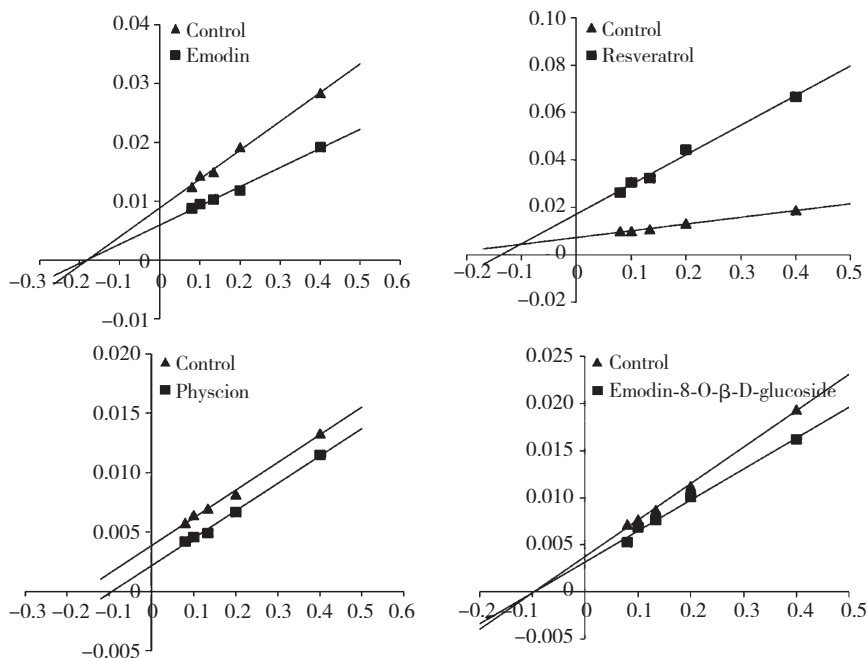


图6 大黄素、白藜芦醇、大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷对 PL 的抑制类型

Fig. 6 Inhibition types of emodin, resveratrol, physcion and emodin-8-*O*- β -D-glucoside on PL

2.6 抑制剂与 PL 和辅脂酶复合体结合位置

结合位置预测结果如图 7 所示。其中二级结构上部分为 PL, 下部分为辅脂酶, A 部分为竞争性抑

制剂结合位置, B 部分为非竞争性、反竞争性 and 混合性抑制剂结合位置。本文首次对除竞争性抑制类型外其它抑制类型抑制剂结合于 PL 和辅脂酶复合体

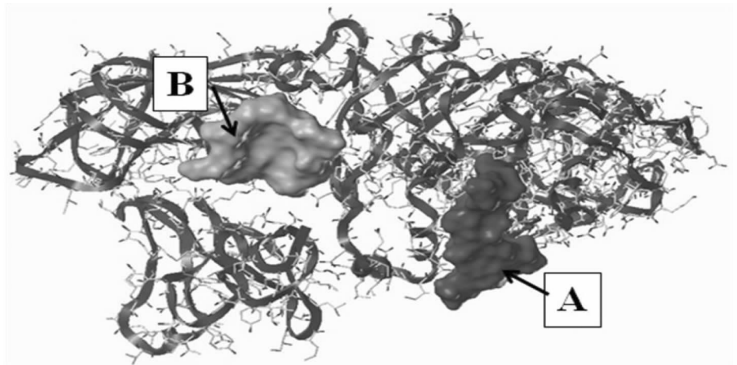


图7 不同抑制类型抑制剂与 PL 和辅脂酶复合体结合位置预测

Fig. 7 Binding location prediction of different type inhibitors and complex of pancreatic lipase and colipase

上的位置进行了预测。

3 结论与讨论

本文通过固定化 PL 筛选模型一次性从虎杖中筛选出 4 个 PL 抑制剂,它们分属于不同化合物种类和不同抑制类型,其中有 1 个多酚类(白藜芦醇,混合性抑制),3 个蒽醌类(大黄素,非竞争性抑制;大黄素甲醚,反竞争性抑制;大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖,非竞争性抑制),其中,首次发现了白藜芦醇($195.5 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖($234.3 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$)具有抑制 PL 活性。

本文首次预测了不同抑制类型抑制剂在 PL 和辅脂酶复合体上的结合位置。除竞争性抑制剂结合于 PL 活性中心(A 位置)外,其它抑制类型都结合于 B 位置。在 B 位置,抑制剂是通过结合于 PL 上,可能使 PL 空间结构发生改变,从而使 PL 催化水解底物受到一定抑制,也可能是通过结合于 PL 和辅脂酶之间,从而影响了辅脂酶启动 PL 盖(lid)的幅度,从而使 PL 催化水解底物受到一定抑制还不清楚,有待后续进一步研究。

总的来说,虎杖中包含有 PL 抑制剂,充分说明了虎杖组分抑制 PL 原因^[23],同时,从虎杖醇提物、醇提水沉物和醇提水溶物抑酶活性看出,各组分对 PL 都具有较高的抑酶活性,表明这些组分都可作为肥胖替代疗法的原料之一。

感谢:感谢厦门大学药学院韩大雄教授分子模拟帮助。

参考文献

- 1 Risstad H, Sovik TT, Hewitt S, *et al.* Changes in health-related quality of life after gastric bypass in patients with and without obesity-related disease. *Obes surg*, 2015, 25: 2408-2416.
- 2 Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 879-889.
- 3 Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet*, 2005, 366: 1197-1209.
- 4 Cooke D, Bloom S. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature Rev: Drug Discov*, 2006, 5: 919-931.
- 5 Melnikova I, Wages D. Anti-obesity therapies. *Nature Rev: Drug Discov*, 2006, 5: 369-370.
- 6 Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orl-

- 7 istat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*, 2007, 369: 71-77.
- 7 Huo SX(霍世欣), Zhou TY(周陶忆), Si XJ(司晓晶), *et al.* Inhibitory effect on pancreatic lipase of flavonoids derived from lotus leaf. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 328-331.
- 8 Mohamed GA, Ibrahim SRM, Elkhayat ES El Dine, *et al.* Natural anti-obesity agents. *Bull Facul Pharm, Cairo Univ*, 2014, 52: 269-284.
- 9 Roh C, Jung U. Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *Int J M Sci*, 2012, 13: 1710-1719.
- 10 Banskota AH, Steevensz AJ, Stefanova R, *et al.* Pancreatic lipase inhibitory activity of monogalactosyldiacylglycerols isolated from the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phyco*, 2015, 28: 169-175.
- 11 Zhang Y, Xiao S, Sun L, *et al.* Rapid screening of bioactive compounds from natural products by integrating 5-channel parallel chromatography coupled with on-line mass spectrometry and microplate based assays. *Anal Chim Acta*, 2013, 777: 49-56.
- 12 Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, *et al.* Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 4604-4609.
- 13 Nakai M, Fukui Y, Asami S, *et al.* Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 4593-4598.
- 14 Wang H, Zhao X, Wang S, *et al.* Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. *J Chromatogr A*, 2015, 1392: 20-27.
- 15 Tao Y, Zhang Y, Cheng Y, *et al.* Rapid screening and identification of alpha-glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27: 148-155.
- 16 Tao Y, Zhang Y, Wang Y, *et al.* Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography-mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf. *Anal Chim Acta*, 2013, 785: 75-81.
- 17 Tang ZM, Kang JW. Enzyme inhibitor screening by capillary electrophoresis with an on-column immobilized enzyme microreactor created by an ionic binding technique. *Anal Chem*, 2006, 78: 2514-2520.
- 18 Jonker N, Kretschmer A, Kool J, *et al.* Online magnetic bead dynamic protein-affinity selection coupled to LC-MS for the screening of pharmacologically active compounds. *Anal Chem*, 2009, 81: 4263-4270.