

香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制作用研究

董柳青¹, 周琛媛¹, 芦芳², 吴晓琴¹, 沈建福^{1*}¹浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; ²浙江芸麒龙祥生物技术有限公司, 杭州 311121

摘要:以香水莲花为原料经超声提取、分级萃取得到香水莲花提取物及其分级相(石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相),在最佳反应条件下研究香水莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶活性的抑制作用,并探究其对胰脂肪酶的抑制类型。结果表明:在反应时间为 10 min、pH 为 7.5、温度为 37 °C 的条件下,香水莲花提取物能最大程度地抑制胰脂肪酶的活性,其中乙酸乙酯相抑制作用最强,其半抑制浓度(IC₅₀)为 2.09 mg/mL。根据酶动力学研究,香水莲花乙酸乙酯相相对胰脂肪酶的抑制类型为可逆混合型抑制,抑制常数 K_i 为 0.95 mg/mL, K_i' 为 8.79 mg/mL。此外,香水莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶的抑制作用与总酚含量具有极强的相关性,相关系数达到 0.885。因此,香水莲花乙酸乙酯相可通过抑制胰脂肪酶活性发挥减肥因子作用,而其中的有效成分可能为酚类物质。

关键词:香水莲花;胰脂肪酶;乙酸乙酯相;半抑制浓度;抑制类型;抑制常数

中图分类号: Q55; O69

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.028

Inhibitory Effect of *Nymphaea hybrid* Extract on Pancreatic Lipase

DONG Liu-qing¹, ZHOU Chen-yuan¹, LU Fang², WU Xiao-qin¹, SHEN Jian-fu^{1*}¹College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;²Zhejiang Yunqilongxiang Biotechnology Company Limited, Hangzhou 311121, China

Abstract: In the study, *Nymphaea hybrid* extract and its fractional phases (petroleum ether phase, ethyl acetate phase, n-butyl alcohol phase and water phase) were obtained through ultrasonic extraction and fractional extraction. The inhibitory effects of *Nymphaea hybrid* extract and its fractional phases on pancreatic lipase were analyzed under the optimum reactive conditions and the inhibitory type was determined by using enzyme kinetic analysis. The results showed that the optimal inhibitory effect was reached when the response time was 10 min, the pH was 7.5 and the temperature was 37 °C, and under this reaction condition the ethyl acetate phase of *Nymphaea hybrid* could effectively inhibit the ability of pancreatic lipase and its half-inhibitory concentration (IC₅₀) on pancreatic lipase was 2.09 mg/mL. According to the research of enzyme kinetic analysis, the inhibitory type of ethyl acetate phase was reversible mixed inhibition, and the inhibitory constants (K_i and K_i') were 0.95 mg/mL and 8.79 mg/mL. What's more, the correlation between content of total polyphenols and inhibition rate of pancreatic lipase was strong ($R^2 = 0.885$). Therefore, the ethyl acetate phase of *Nymphaea hybrid* can play the role of weight reducing factor by inhibiting the activity of pancreatic lipase, and the key compounds may be phenolics.

Key words: *Nymphaea hybrid*; pancreatic lipase; ethyl acetate phase; half-inhibitory concentration; inhibitory type; inhibitory constant

胰脂肪酶(Pancreatic lipase, EC 3.1.1.3)是一种由胰腺分泌,负责水解 50% ~ 70% 膳食脂肪的关键生物酶,它能催化甘油三酯分解生成链脂肪酸、甘油、单酯和二酯^[1]。抑制其活性可有效地控制膳食脂肪在人体消化道中的分解与吸收,从而达到预

防肥胖的作用。奥利司他是美国 FDA 批准的减肥药,其作用机理就是抑制胰脂肪酶活性,阻断 30% 膳食甘油三酯水解,因此具有较好的减肥作用,然而它存在多种胃肠道副作用,包括油便、胃肠道胀气、粪便失禁等^[2]。因此,天然胰脂肪酶抑制剂的开发和应用日益成为健康产业关注的热点。已有的研究表明,植物来源的天然产物能有效抑制胰脂肪酶的活性,如多酚类化合物、黄酮类化合物、皂苷类化合物、萜类化合物、生物碱类化合物等^[3]。Wu 等^[4]发

收稿日期: 2016-10-14 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(30872056)

* 通信作者 E-mail: shenjfl07@zju.edu.cn

现荔枝花提取物在体外能有效抑制胰脂肪酶活性,并对高脂膳食诱导的肥胖具有预防作用。刘天因等^[5]报道茯砖茶多酚类物质对胰脂肪酶活性起到非竞争抑制作用。Cai 等^[6]则从燕麦中提取了多酚类物质,它对胰脂肪酶的抑制率可以高达 80%。

香水莲花 (*Nymphaea hybrid*) 是睡莲科睡莲属热带大型睡莲,其颜色艳丽、香气扑鼻,具备观赏、美容、餐饮等多种功能^[7,8],深受广大女士喜爱。近年来,香水莲花的生物学功效逐渐被人们所发现,如抗氧化^[9]、抑制络氨酸酶活性^[10]、抑制前列腺增生^[11]、降血脂^[12]等,然而其在预防肥胖领域却少有涉及。本文研究香水莲花提取物对胰脂肪酶抑制作用,以期香水莲花减肥产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器

RE-5210 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;FD-1-50 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;KQ-300DE 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;H1850R 离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;HZ-8812S-B 水浴恒温振荡器,太仓市华利达实验设备有限公司;EON 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;EL20 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.1.2 材料与试剂

香水莲花 (*Nymphaea hybrid*) 由杭州芸径农业发展有限公司提供。

猪胰脂肪酶 (TypeII), 购于美国 Sigma-Aldrich 公司;无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸氢钠、乙酸铜、盐酸、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(均为分析纯),胆汁盐、福林酚试剂(均为生化试剂),购于国药集团化学试剂有限公司;苯(分析纯)、橄榄油(化学纯)、没食子酸(纯度 99%),购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 香水莲花提取物及其分级相的制备

将香水莲花干花粉碎,过 50 目筛,按照 1:10 料液比,60% 乙醇溶液(v/v)50 °C 超声浸提 30 min 后过滤,滤液减压浓缩除去乙醇,真空冷冻干燥后得到香水莲花提取物。将上述香水莲花提取物用水配制成悬浮液,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取三次,合并萃取液后减压浓缩、真空冷冻干

燥至干粉,得到四个香水莲花分级相,分别是石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相。

1.2.2 总酚含量的测定

总酚含量的测定参考福林酚法^[13],反应后的溶液置于 760 nm 波长处测定吸光度,得到没食子酸标准曲线 $y = 0.014x + 0.055$ ($R^2 = 0.999$;式中 x 为没食子酸含量, μg ; y 为吸光度)。

1.2.3 胰脂肪酶活性的测定

胰脂肪酶活性的测定参考纪建业^[14]的方法,并稍作修改。配制浓度为 1、2、3、4、5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的油酸/苯溶液,分别取 4 mL 于锥形瓶中,加 1 mL 5% 醋酸铜溶液(用吡啶调节至 $\text{pH} = 6.1$),磁力搅拌 3 min 后,离心取上层有机相在 710 nm 下测定吸光度,得脂肪酸吸光度工作曲线 $y = 0.142x + 0.022$ ($R^2 = 0.999$;式中 x 为油酸浓度, $\mu\text{mol}/\text{mL}$; y 为吸光值)。

取 3 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 按需配置)和 1 mL 橄榄油于 25 mL 锥形瓶中,预热 5 min。然后向锥形瓶中加入 0.1 mL 一定浓度的胰脂肪酶溶液与 0.5 mL 一定浓度的香水莲花提取物,一定温度下水浴震荡一段时间,立即加 8 mL 苯,继续震荡 2 min,终止反应。将溶液转移至离心试管中,在 4000 rpm 下离心 10 min,取上层有机相 4 mL 于锥形瓶中,之后重复上述方法测定有机相在 710 nm 波长下的吸光度。

胰脂肪酶的活性以反应液每分钟每毫升体积释放的油酸分子数(μmol)来表达。

香水莲花提取物对胰脂肪酶活性的抑制率按照以下公式进行计算

$$\text{抑制率}/\% = (U_1 - U_2)/U_1 \times 100$$

式中 U_1 、 U_2 分别代表在不添加香水莲花提取物与添加香水莲花提取物情况下胰脂肪酶的活性。

1.2.4 最佳抑制条件的确定

根据 1.2.2 的方法,测定 3 mg/mL 香水莲花提取物在不同反应时间(4、6、8、10、12、14 min)、不同体系 pH (6、6.5、7、7.5、8、8.5、9.0)、不同体系温度(31、34、37、40、43 °C)下对胰脂肪酶的抑制率。

1.2.5 香水莲花提取物对胰脂肪酶抑制类型的确定

根据 1.2.3 的方法,在反应体系含有不同量胰脂肪酶的条件下,测定有无添加抑制剂情况下酶促反应速率。以胰脂肪酶浓度为横坐标,以反应速率($1/v$)为纵坐标,做图可判断抑制作用为可逆或不

可逆。

根据 1.2.3 的方法,在反应体系含有不同量底物的条件下,测定有无抑制剂情况下酶促反应速率。以反应底物质量浓度的倒数为横坐标 ($1/[S]$),以反应速率的倒数为纵坐标 ($1/v$),作 Lin-

eweaver-Burk 图,得可逆性抑制类型。

2 结果与讨论

2.1 不同反应条件对抑制胰脂肪酶活性的影响

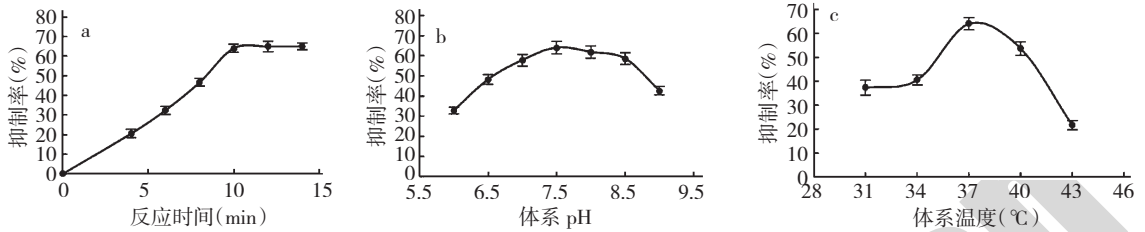


图 1 不同反应条件下香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制率

Fig. 1 The inhibition rate of *Nymphaea hybrid* extract on pancreatic lipase activity under different reaction conditions

胰脂肪酶作为一种生物催化剂,对反应条件(如反应时间、温度、pH)极其敏感^[15,16],反应时间、温度、pH 对香水莲花提取物抑制胰脂肪酶的影响见图 1。在图 1(a)中,香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制率随反应时间的增加而提高,10 min 后,抑制率达到最高,随后抑制率趋于平稳。这说明 0~10 min 内,香水莲花提取物逐渐与胰脂肪酶发生作用,抑制了胰脂肪酶的活力,而在 10 min 后香水莲花提取物与胰脂肪酶发生的作用达到了平衡。由图 1(b)可知,香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制率随 pH 的增大呈先上升后下降的趋势。当 pH 为 7.5 时,其抑制率达到最大值,而此 pH 与人体小肠 pH 相符合(pH 为 4.8~8.2)。图 1(c)则表明了香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制率在 31 °C~37 °C 范围内呈上升趋势,在 37 °C 时达到最高值,在 37 °C~41 °C 呈下降趋势。由此确定胰脂肪酶抑制实验反应体系

中最适反应时间为 10 min, pH 为 7.5, 温度为 37 °C。

2.2 香水莲花提取物对胰脂肪酶活性的抑制作用

香水莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶的半抑制浓度(IC_{50})见表 1,半抑制浓度(IC_{50})数值越小,则表明该抑制剂对胰脂肪酶的抑制作用越强。在本实验中,香水莲花提取物、乙酸乙酯相以及正丁醇相均能较好地抑制胰脂肪酶活性,其中香水莲花乙酸乙酯相抑制作用最强,其 IC_{50} 为 2.09 mg/mL。多处研究也表明植物乙酸乙酯相能有效抑制胰脂肪酶活性,其中杨龙佳^[17]发现贵州红茶乙酸乙酯相对胰脂肪酶活性的抑制率最高,任秀娟等^[18]也报道了葡萄籽提取物的四个分级相中乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制效果最佳。虽然与奥利司他相比,香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制作用略弱,但这与活性成分的纯度相关。

表 1 香水莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶的半抑制浓度 (IC_{50})

Table 1 Half-inhibitory concentration (IC_{50}) of *Nymphaea hybrid* extract and its fractional phases on pancreatic lipase activity

抑制剂 Sample	提取物 Extract	石油醚相 Petroleum ether	乙酸乙酯相 Ethyl acetate	正丁醇相 n-Butanol	水相 Water	奥利司他 Orlistat
IC_{50} (mg/mL)	4.02 ± 0.36 ^a	10.98 ± 0.52 ^c	2.09 ± 0.34 ^b	5.15 ± 0.59 ^c	9.14 ± 0.59 ^d	0.44 ± 0.18 ^a

注:结果表示为平均值 ± 标准差 (Mean ± SD); 两两之间若字母完全不同,则两者之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制类型

酶的抑制类型根据底物(S)、酶(E)、抑制剂(I)三者之间的作用方式不用,可以分为可逆性抑制与不可逆性抑制,可逆性抑制又可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制、混合型抑制^[19]。从图 2 可知,当反应体系中添加抑制剂(浓度为 2 mg/mL 的乙酸乙酯相)后,其速率直线通过原点,则

香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制类型为可逆性抑制。从图 3 (Lineweaver-Burk 图)看出两条双倒数曲线相交于第二象限,判断香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制方式属于可逆性抑制中的混合型抑制,即乙酸乙酯相可以通过与酶直接结合来降低酶的活性,也可以通过与酶-底物复合物结合来降低酶的活性。推测原因可能是香水莲花乙酸乙酯是多

种酚类物质的混合物,不同酚类物质对胰脂肪酶活性的抑制类型不同。根据 Lineweaver-Burk 图,计算可得香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的混合型抑制常数 K_i 为 0.95 mg/mL, K_i' 为 8.79 mg/mL ($K_i < K_i'$),这说明香水莲花乙酸乙酯相直接对胰脂肪酶的抑制作用大于对酶-底物复合物的抑制作用。

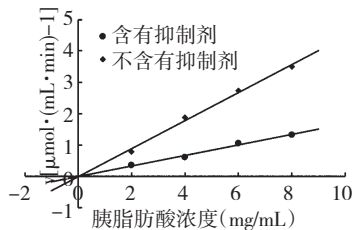


图2 香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制类型

Fig. 2 The inhibitory type of ethyl acetate phase from *Nymphaea hybrid* on pancreatic lipase

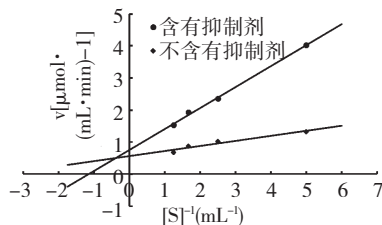


图3 香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的可逆性抑制双倒数图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of ethyl acetate phase from *Nymphaea hybrid* on pancreatic lipase

2.4 香水莲花提取物及其分级相总酚含量与酶活的相关性分析

香水莲花提取物及各分级相中总酚含量见图4,其中乙酸乙酯相的总酚含量最高,为60.43%。图5则分析了香水莲花提取物及其分级相总酚含量与胰脂肪酶的抑制率的相关性。由图中可知,香水

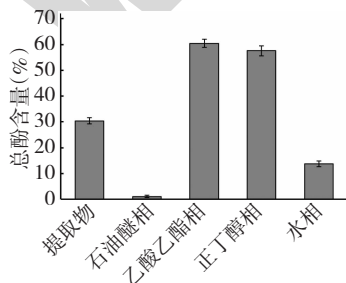


图4 香水莲花提取物及其分级相总酚含量

Fig. 4 The total phenolic content of *Nymphaea hybrid* extract and its fractional phases

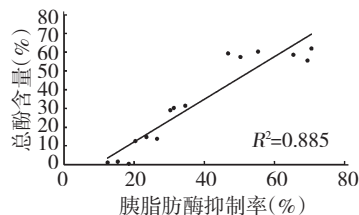


图5 总酚含量与胰脂肪酶抑制率的相关性分析

Fig. 5 The correlation between content of total polyphenols and inhibition rate of pancreatic lipase

莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶的抑制率与其总酚含量之间具有较强的相关性,其相关系数可以达到0.885。因此,可推断香水莲花提取物及其分级相对胰脂肪酶起抑制作用的物质可能为酚类物质。

3 结论

本研究制备了香水莲花提取物及其分级相(石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相)并探索了这些提取物对胰脂肪酶的抑制作用。实验结果表明,当体系反应时间为10 min, pH为7.5,温度为37℃时,香水莲花提取物对胰脂肪酶的抑制效果最佳。在该条件下,相比于其他几种提取物,香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶的抑制作用最强,其半抑制浓度(IC_{50})为2.09 mg/mL,抑制类型为可逆性抑制中的混合型抑制,抑制常数 K_i 为0.95 mg/mL, K_i' 为8.79 mg/mL。分析香水莲花提取物及其分级相总酚含量与酶活的相关性,发现两者之间具有极强的相关性,相关指数可达到0.885。因此,香水莲花乙酸乙酯相对胰脂肪酶有较强的抑制作用,推测其中对胰脂肪酶起抑制作用的物质可能是酚类物质。本研究为香水莲花减肥降脂产品的开发利用提供了一定的科学实验依据,分离鉴定抑制胰脂肪酶关键化合物成为下一阶段的研究重点。

参考文献

- 1 Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 879-889.
- 2 Ballinger A, Peikin SR. Orlistat; its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol*, 2002, 440: 109-117.
- 3 Jiang YY (姜运耀), Lv GY (吕国英), Li YF (李燕飞), et al. Advances in the study of pancreatic lipase inhibitors derived from plants. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2012, 33: 199-202.