

侧柏叶不同提取部位抑制胰脂肪酶及抗氧化活性筛选

顾君, 孙怡*

(苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006)

[摘要] 目的:考察侧柏叶不同提取部位体外抑制胰脂肪酶活性和抗氧化活性。方法:对侧柏叶的醇提液、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位采用体外抑制胰脂肪酶活性研究,并通过其清除1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基和 Fe^{3+} 还原能力(FRAP)测定侧柏叶提取物的体外抗氧化作用。结果:侧柏叶提取物均有不同程度抑制胰脂肪酶活性,以乙酸乙酯部位效果最佳(IC_{50} 为 $26.09\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),其次正丁醇部位(IC_{50} 为 $39.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和醇提物(IC_{50} 为 $98.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),石油醚部位(IC_{50} 为 $188.27\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和水部位(IC_{50} 为 $325.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)最弱。抗氧化活性依次为醇提液(DPPH IC_{50} 为 $7.59\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $4.40\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > 乙酸乙酯部位(DPPH IC_{50} 为 $8.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $3.82\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > 正丁醇部位(DPPH IC_{50} 为 $24.21\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $1.77\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > 水部位(DPPH IC_{50} 为 $27.53\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $1.38\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > 石油醚部位。结论:初步确定侧柏叶抑制胰脂肪酶活性有效成分主要在乙酸乙酯与正丁醇部位,抗氧化及其相关成分主要在乙酸乙酯部位。

[关键词] 侧柏叶; 抑制胰脂肪酶活性; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0141-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140141

Study on Inhibition of Pancreatic Lipase and Antioxidation from *Platycladus orientalis* Leaves *in vitro*

GU Jun, SUN Yi* (Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibition of pancreatic lipase and antioxidation of different extracts from *Platycladus orientalis* leaves *in vitro*. **Method:** The inhibitory activities of pancreatic lipase of ethanol extract, petroleum aether extract, ethyl acetate extract, *n*-butyl alcohol extract and water extract were assayed *in vitro*. The antioxidant activities of these extracts were assessed by two complementary test systems, namely 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. **Result:** The ethyl acetate extract showed strong activity in the inhibitory activities of pancreatic lipase (IC_{50} $26.09\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The *n*-butanol extract (IC_{50} $39.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and ethanol extract (IC_{50} $98.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) displayed lower activity. Petroleum ether extract (IC_{50} $188.27\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and water fraction (IC_{50} $325.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) have a little activity. The antioxidant activities: ethanol extract (DPPH IC_{50} $7.59\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $4.40\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > ethyl acetate extract (DPPH IC_{50} $8.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $3.82\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > *n*-butanol extract (DPPH IC_{50} $24.21\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $1.77\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > water extract (DPPH IC_{50} $27.53\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FRAP $1.38\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) > petroleum ether extract. **Conclusion:** The ethyl acetate extract and *n*-butanol extract were the components of inhibition pancreatic lipase. The ethyl acetate extract was the antioxidative components.

[Key words] *Platycladus orientalis* leaves; inhibitory activities of pancreatic lipase; antioxidation

侧柏叶具有凉血止血、化痰止咳和生发乌发的功效,用于治疗血热妄行之咯血、衄血、吐血、尿血、崩漏等^[1-2]。据报道,侧柏叶的主要成分为挥发油,黄酮,

鞣质,无机元素等^[3]。目前关于侧柏叶的研究主要集中在其止血的有效成分与作用机制,而对侧柏叶其他功效的开发利用研究鲜见报道。

[收稿日期] 20140717(021)

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(Z201304)

[第一作者] 顾君,主管药师,从事医院药学研究, Tel:0512-67780474, E-mail: gujunsuzhou@163.com

[通讯作者] *孙怡,主管药师,从事医院药学研究, Tel:0512-67780474, E-mail: sunyisuzhou@163.com

随着生活水平的提高,肥胖和高脂血症已成为当今世界严重危害人们生命的杀手之一,有效的防治肥胖与降血脂是当今研究的热点。虽然西药效果明显,但往往会带来一系列较为严重的副作用,例如奥利司他(Orlistat)会导致人出现腹胀、腹泻、油性斑点、便秘、大便失禁,以及一些对肝脏的不利影响。天然化学成分或者有效部位具有高效、低毒、无副作用等优势,因此,在天然产物里寻找减肥治疗药物,是人们研究的一个方向。胰脂肪酶,由人类PNLIP基因编码,对甘油三酯的有效消化起到关键作用^[4]。它通过胰胆管系统分泌到十二指肠,负责占总量50%~70%的膳食脂肪水解^[5]。对于这种酶的抑制作用是发现和筛选天然抗肥胖药物体系中研究最为广泛的作用模式^[6]。文献研究表明多酚、黄酮类成分为抑制该酶的主要类别,然而侧柏中黄酮类成分含量较高,其中还富含有双黄酮类物质,为侧柏的进一步开发利用提供一个方向。

本研究通过对侧柏叶的不同提取部位进行体外抑制胰脂肪酶和抗氧化初步筛选,从减肥降脂的角度出发,初步筛选有效部位,从而为侧柏叶的进一步研究与开发奠定基础。

1 材料

1.1 药物及试剂 侧柏叶购自河南辉县,经苏州大学附属第一医院药学部周翔副主任中药师鉴定为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* 的干燥枝梢和叶。奥利司他(重庆华森制药有限公司,批号110102057),2,4,6-三吡啶基三嗪(上海阿拉丁有限公司,批号20100222),三氯化铁、硫酸亚铁(国药集团化学试剂有限公司),抗坏血酸(VC,中国医药集团上海化学试剂公司,批号20111016),1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH),胰脂肪酶,4-硝基苯棕榈酸酯(PNPP)均购自Sigma公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 KQ-500型超声波清洗器(江苏昆山公司),AY220型电子天平(日本岛津公司),中华PTHW型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司),ELISA酶标仪(美国Bio-Rad公司),PHSJ-3F型实验室雷磁酸度计(上海精密科学仪器有限公司),Spectrum 752型紫外-可见分光光度计(上海仪器有限公司)。

2 方法

2.1 提取部位的制备 侧柏叶枝叶分别用10倍90%乙醇,6倍50%醇各提取1次,合并药液将药液浓缩至无醇味后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取余下的水溶液为水部位,得到各个部位。

2.2 抑制胰脂肪酶活性成分的筛选

2.2.1 抑制胰脂肪酶活性测定 参考文献[5,7]反应体系,96微孔板上加Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)40 μL ,再加入1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰脂肪酶50,10 μL 样品溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温10 min后,加入2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPP 100 μL ,混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应10 min,利用酶标仪在405 nm波长下测吸光度A。以Orlistat为阳性对照,同时设定对照组(缓冲液+酶液+底物),空白组(缓冲液)。此次实验结果表明Orlistat的 IC_{50} 为33.791 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

$$\text{酶活性抑制率} = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

2.2.2 标准曲线的测定 用Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)配制1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对硝基苯酚,稀释成0,5,25,50,100,150,200,300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,以缓冲液为对照,利用酶标仪在405 nm下测定A,测3组取平均值。以A为纵坐标,对硝基苯酚浓度为横坐标,做出标准曲线 $Y = 7.342 X + 0.027, R^2 = 0.9997$ 。

2.2.3 胰脂肪酶活力的测定 根据反应体系96微孔板上加Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)40 μL ,再加入1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰脂肪酶50,10 μL DMSO,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温10 min后,加入2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPP 100 μL ,混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应10 min,利用酶标仪在405 nm波长下测A,通过测定PNP在405 nm处的吸收可测得脂肪酶的活力。

2.3 体外抗氧化活性测定

2.3.1 清除DPPH自由基活性试验^[8] 参考文献在96孔板中精密加入20 μL 样品溶液,再加入80 μL 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DPPH溶液,混匀,室温下反应30 min,在517 nm下测定A,每份样品平行测定3份,VC作为阳性对照(A_{VC}),以95%乙醇代替不同样品溶液作为空白对照(A_{K})。

$$\text{清除率} = [1 - (A - A_{\text{K}}) / A_{\text{VC}}] \times 100\%$$

2.3.2 还原 Fe^{3+} 能力测定^[8] 将25 mL 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲溶液(3.1 g醋酸钠和16 mL冰醋酸用蒸馏水配成1 L, pH 3.6),2.5 mL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPTZ溶液(0.04 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl溶解),2.5 mL 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 混合配制成FRAP试剂。在96孔板中分别加入10 μL 样品溶液和100 μL FRAP工作液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min,在593 nm下测定吸光度,每份样品重复3次。空白对照为95%乙醇代替样品溶液,VC为阳性对照。以 FeSO_4 标准溶液表示,样品总抗氧化能力表示为每克提取物干重中相当于 FeSO_4 的毫摩尔数($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)。

2.3.3 标准曲线 将 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液稀释成 $0.31, 0.62, 1.25, 2, 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 **2.3.2** 方法测定 A , 得到标准曲线 $Y = 0.489 1X + 0.358$, $R^2 = 0.999$ 。

3 结果

3.1 各提取部位抑制胰脂肪酶活性 侧柏叶不同部位对胰脂肪酶活性的抑制作用见表 1, 抑制胰脂肪酶 Orlistat > 乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 醇提液 > 石油醚部位 > 水部位。见表 1。

表 1 侧柏叶提取物对胰脂肪酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of *Platyclusus orientalis* leaf extract on activity of pancreatic lipase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
侧柏叶醇提液	22.58	10.68 ± 2.95	98.20
	45.17	24.12 ± 3.98	
	90.35	51.71 ± 1.65	
	180.70	75.27 ± 3.44	
	361.41	81.98 ± 1.60	
侧柏叶石油醚部位	22.62	0.00 ± 0.00	188.27
	45.24	19.18 ± 1.99	
	90.48	45.19 ± 2.98	
	180.97	70.71 ± 3.01	
	361.94	81.88 ± 3.19	
侧柏叶乙酸乙酯部位	3.74	9.11 ± 1.99	26.09
	7.49	14.19 ± 0.99	
	14.99	25.12 ± 3.11	
	29.99	54.87 ± 2.38	
	59.98	75.18 ± 3.10	
侧柏叶正丁醇部位	4.899	5.91 ± 2.15	39.02
	9.79	13.91 ± 2.00	
	19.59	33.19 ± 1.78	
	39.19	52.87 ± 2.09	
	78.38	75.19 ± 1.59	
侧柏叶水部位	50.05	10.19 ± 2.18	325.28
	100.09	20.41 ± 1.99	
	200.19	39.81 ± 2.46	
	400.39	53.19 ± 1.90	
	800.79	73.99 ± 2.03	

注: Orlistat 的 IC₅₀ 为 $33.791 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 各提取部位清除 DPPH 自由基能力 对侧柏叶不同部位药液按表 2 浓度设置, 测其清除率。其各部位清除 DPPH 自由基能力: 醇提液 > 乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 水部位 > 石油醚部位。见表 2。

表 2 侧柏叶提取物对 DPPH 自由基清除能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of *Platyclusus orientalis* leaf extract on antioxidant activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
侧柏叶醇提液	1.88	19.41 ± 0.41	7.59
	3.75	42.21 ± 0.27	
	7.51	55.38 ± 0.56	
	15.02	65.17 ± 0.62	
	30.03	70.11 ± 0.51	
侧柏叶石油醚部位	7.93	15.34 ± 0.23	109.99
	15.86	18.33 ± 0.14	
	31.72	40.10 ± 0.38	
	126.86	51.22 ± 0.46	
	253.72	61.35 ± 0.41	
侧柏叶乙酸乙酯部位	1.48	18.53 ± 0.21	8.28
	2.97	28.41 ± 0.14	
	5.94	49.32 ± 0.36	
	12.85	61.03 ± 0.13	
	23.79	66.58 ± 0.58	
侧柏叶正丁醇部位	3.03	12.67 ± 0.15	24.21
	6.06	23.33 ± 0.21	
	12.12	36.77 ± 0.58	
	24.25	50.34 ± 0.77	
	48.50	63.67 ± 0.63	
侧柏叶水部位	3.92	15.34 ± 0.23	27.53
	7.85	23.22 ± 0.39	
	15.69	41.83 ± 0.37	
	31.38	65.27 ± 0.42	
	62.77	71.11 ± 0.56	
VC	0.56	18.92 ± 0.25	1.43
	1.12	47.33 ± 0.34	
	2.24	70.23 ± 0.21	
	4.49	79.72 ± 0.54	
	8.98	89.44 ± 0.68	

3.3 各部位还原 Fe³⁺ 的能力 按照 **2.3.2** 方法测定各部位还原 Fe³⁺ 的能力, 测定结果见表 3。其结果与对 DPPH 自由基清除能力结果相一致。

表 3 侧柏叶提取物还原 Fe³⁺ 的能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of *platycladus orientalis* leaf extract on Fe³⁺ reduction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	A	FRAP /mmol·g ⁻¹
侧柏叶醇提液	57.122	0.38 ± 0.01	4.4097 ± 0.01
侧柏叶石油醚部位	99.182	0.29 ± 0.01	0.68 ± 0.01
侧柏叶乙酸乙酯部位	66.194	0.38 ± 0.00	3.83 ± 0.01
侧柏叶正丁醇部位	91.176	0.34 ± 0.01	1.78 ± 0.01
侧柏叶水部位	98.982	0.33 ± 0.01	1.39 ± 0.01
VC	41.192	0.41 ± 0.00	7.66 ± 0.01

4 讨论

肥胖可以引发身体各种各样的代谢异常,造成人体出现高血脂症、脂肪肝、心脑血管疾病、动脉粥样硬化、高血压、糖尿病,严重危及人类健康。研究表明胰脂肪酶,是一种水解膳食脂肪的非常重要的酶,50%~70%的食物脂肪可以被该酶水解。所以通过抑制胰脂肪酶活性来控制高脂饮食引起的肥胖是一种行而有效的减少肥胖现象。

目前研究表明,许多天然化学成分通过有效调节脂质代谢紊乱,提高机体的抗氧化能力来达到降脂减肥^[9]。本文正是从两个角度初步筛选侧柏降脂减肥功效上的活性部位,发现侧柏的乙酸乙酯部位以及正丁醇部位具有较为显著地效果。体外实验有很大的局限性,后续还需要进行动物实验再次筛选其有效部位,为活性成分筛选,有效部位的精制

奠定坚实的基础。

[参考文献]

- [1] 叶定江,原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:155-156.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:200-201.
- [3] 陈兴芬,单承莺,马世宏,等. 侧柏叶化学成分、生理活性及防脱发功能研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,29(3):1-5.
- [4] Low M E. The triglyceride lipases of the pancreas[J]. J Lipid Res, 2002, 43(2):2007-2016.
- [5] Birari R B, Bhutani K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential [J]. Drug Discovery Today,2007, 12(19/20):879-889.
- [6] 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]. Neth J Agr Sci Food Chem, 2007, 55(11):4604-4609.
- [7] 张丽娜. 水翁花对胰脂肪酶和α-淀粉酶抑制活性及作用机制初步探讨[D]. 上海:华东理工大学,2012:22.
- [8] 陈瀚,李进,李祥,等. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):184-186.
- [9] 张京芳,张强,陆刚,等. 香椿叶提取物对高血脂症小鼠脂质代谢的调节作用及抗氧化功能的影响[J]. 中国食品学报,2007,7(4):3-7.

[责任编辑 周冰冰]