

## 紫外和荧光光谱法研究油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的作用过程

张楠, 胡童霞, 朱鑫丽, 杨雪梅, 王磊, 吴帆, 李红亮

### Study on the Interaction Process between Rape Bee Pollen Polyphenols and Pancreatic Lipase by Ultraviolet and Fluorescence Spectroscopy

ZHANG Nan, HU Tongxia, ZHU Xinli, YANG Xuemei, WANG Lei, WU Fan, and LI Hongliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120185>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

对羟基肉桂酸乙酯对胰脂肪酶的抑制作用及机理

Inhibitory Effect and Mechanism of Ethyl *p*-hydroxycinnamate on Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2021, 42(9): 94-99 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060193>

黑木耳多糖对胰脂肪酶活性的抑制作用

Inhibitory effect of Auricularia auricula polysaccharides on pancreatic lipase activity

食品工业科技. 2017(22): 56-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.012>

水翁花蕾提取物DMC对胰脂肪酶的抑制作用研究

Inhibiting Effect of *Cleistocalyx operculatus* Buds' Extract (DMC) on Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2020, 41(15): 65-70 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.011>

地参结合酚提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用

Inhibitory Effects of Bound Phenolic Extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on  $\alpha$ -glucosidase and Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2018, 39(23): 111-116 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.020>

荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用

Study on the interaction between caffeic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy

食品工业科技. 2017(02): 152-155 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.020>

紫娟茶提取物对血管紧张素转换酶、 $\alpha$ -淀粉酶和胰脂肪酶的体外抑制作用

Inhibitory effects of Zijuan tea (*Camellia sinensis* var. *kitamura*) extracts on angiotensin converting enzyme,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase in vitro

食品工业科技. 2017(19): 11-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.003>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张楠, 胡童霞, 朱鑫丽, 等. 紫外和荧光光谱法研究油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的作用过程 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 36–42. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120185

ZHANG Nan, HU Tongxia, ZHU Xinli, et al. Study on the Interaction Process between Rape Bee Pollen Polyphenols and Pancreatic Lipase by Ultraviolet and Fluorescence Spectroscopy [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 36–42. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120185

· 研究与探讨 ·

# 紫外和荧光光谱法研究油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的作用过程

张楠<sup>1</sup>, 胡童霞<sup>1</sup>, 朱鑫丽<sup>1</sup>, 杨雪梅<sup>1</sup>, 王磊<sup>2</sup>, 吴帆<sup>1</sup>, 李红亮<sup>1,\*</sup>

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江杭州 310018;

2. 浙江分阳检测有限公司, 浙江杭州 311519)

**摘要:** 本文利用酶动力学方法测定了油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制作用, 并通过紫外光谱、荧光光谱和同步荧光光谱分析了油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶的相互作用过程。结果表明, 油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的活性具有一定的抑制作用, 其半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $1.670 \pm 0.045$  mg/mL, 抑制类型为可逆性抑制中的混合型抑制。荧光光谱分析显示, 随着油菜蜂花粉多酚浓度增加, 胰脂肪酶的最大荧光发射强度逐渐降低, 同时荧光最大发射波长从 341 nm 红移到 349 nm。同步荧光光谱表明, 多酚与胰脂肪酶结合时酶内部的疏水性降低, 肽链的伸展程度增加; 荧光猝灭机理结果显示, 猝灭常数随温度升高从 0.1000 减小到 0.0743, 其结合过程为静态猝灭, 且结合位点约为 1 个。综上, 油菜蜂花粉多酚通过改变胰脂肪酶构象来抑制胰脂肪酶的活性, 这为深入研究蜂花粉减脂机理提供了一定理论依据。

**关键词:** 油菜蜂花粉, 多酚, 胰脂肪酶, 荧光光谱, 抑制作用

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0036-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120185



本文网刊:

## Study on the Interaction Process between Rape Bee Pollen Polyphenols and Pancreatic Lipase by Ultraviolet and Fluorescence Spectroscopy

ZHANG Nan<sup>1</sup>, HU Tongxia<sup>1</sup>, ZHU Xinli<sup>1</sup>, YANG Xuemei<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, WU Fan<sup>1</sup>, LI Hongliang<sup>1,\*</sup>

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Sunshine Analysis and Testing Co., Ltd., Hangzhou 311519, China)

**Abstract:** In this study, the inhibitory effect of rape bee pollen polyphenols on pancreatic lipase was measured by enzyme kinetics method, and the interaction between pancreatic lipase and rape bee pollen polyphenol extracts was analyzed by the ultraviolet, fluorescence spectra and synchronous fluorescence spectra. The results showed that rape bee pollen polyphenols had a certain inhibitory effect on the activity of pancreatic lipase, and the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was  $1.670 \pm 0.045$  mg/mL. The inhibitory type was a mixed inhibition of reversible inhibition. Fluorescence spectra showed that the maximal fluorescence intensity of pancreatic lipase gradually decreased with the increasing of rape bee pollen polyphenols concentration, and the maximal fluorescence peak had a redshift from 341 nm to 349 nm. Synchronous fluorescence spectra showed that the hydrophobicity inside the enzyme decreased and the stretch of the peptide chain increased when polyphenols bind to pancreatic lipase. The fluorescence quenching mechanism showed that the quenching

收稿日期: 2022-12-21

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN22C170001); 国家自然科学基金 (32170531); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (2021R409049)。

作者简介: 张楠 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蜂产品功能成分利用, E-mail: nanmo\_77@163.com。

\* 通信作者: 李红亮 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蜂产品功能成分利用, E-mail: hlli@cjlu.edu.cn。

constant decreased from 0.1000 to 0.0743 with increasing temperature, and the binding process was static quenching with about one binding site. In conclusion, the rape bee pollen polyphenols could inhibit the pancreatic lipase activity by changing the enzyme conformation, which provided a certain theoretical basis for the mechanism of bee pollen lipid reduction.

**Key words:** rape bee pollen; polyphenols; pancreatic lipase; fluorescence spectrum; inhibitory effect

蜂花粉是蜜蜂采集显花植物花蕊内的花粉粒后混入自身腺体分泌物及花蜜的不规则扁球形团状物,再由蜜蜂的携粉足带回蜂巢,经脱粉器收集而来<sup>[1]</sup>。蜂花粉含有多种营养成分以及功能性物质,如蛋白质、多酚、脂肪、多糖及微量元素等<sup>[2]</sup>。作为传统的天然营养食品和理想的滋补品,蜂花粉具有一定的医疗和保健作用,如增强免疫力、抑制前列腺疾病、防癌作用和降脂减脂等功能<sup>[3-4]</sup>,其中多酚类化合物是蜂花粉重要的功能活性成分<sup>[5]</sup>。

多酚化合物是指分子结构中含有若干个酚羟基的植物源化合物,主要包括黄酮类、单宁类、酚酸类和花色苷类。酚类化合物具有降血脂、降血糖、清除自由基、抗动脉粥样硬化以及抗炎等功能,因而备受人们关注。杨佳林等<sup>[6]</sup>通过分离蜂花粉酸解液发现槲皮素和山奈酚为其主要抗氧化活性成分,另外研究表明山茶蜂花粉多酚对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症具有治疗作用<sup>[7]</sup>。近年来,已有一些与蜂花粉降脂相关的研究,Rzepecka-stojko 等<sup>[8]</sup>证明了富含多酚的蜂花粉乙醇提取物可以减少动脉粥样硬化小鼠模型 C57BL/6 因高脂饮食引起的肝脏脂肪变性和退行性变化的发生,同时在给予蜂花粉多酚能够有效降低引起高脂饮食小鼠动脉粥样硬化有关物质的形成。Li 等<sup>[9]</sup>利用玫瑰蜂花粉多糖对 HepG 2 细胞和高脂饮食诱导的肥胖小鼠作用,研究其对胰岛素功能和脂质代谢的影响,结果表明蜂花粉多糖通过 AMPK/mTOR 介导的信号通路促进自噬,从而减轻肝脏脂肪变性和胰岛素抵抗,提示其可能是一种新的治疗肥胖和糖尿病药物。

胰脂肪酶是体内参与脂代谢的关键酶<sup>[10]</sup>,它可以催化酯类生成脂肪酸和甘油,而胰脂肪酶抑制剂则通过抑制胰脂肪酶的活性来阻止脂肪的积累,从而达到减脂的功效<sup>[11]</sup>。因该类抑制剂具有不进入血液循环、不作用于神经系统、不抑制食欲等特点,备受人们的关注。来源于天然植物的胰脂肪酶抑制剂已经成为减肥保健产品的研究热点<sup>[12]</sup>,其具有较其它非天然来源(如有机合成和微生物来源)诸多优点如活性稳定、副作用小等<sup>[13]</sup>,愈来愈受到人们的重视。研究发现菠菜多酚水提取物对胰酶有较明显的抑制作用<sup>[14]</sup>,任秀娟<sup>[15]</sup>和田强<sup>[16]</sup>等研究发现葡萄籽提取物原花青素等多酚类物质对胰脂肪酶有明显的抑制作用,且该抑制作用多为非竞争性抑制。但对于蜂花粉多酚的降脂机制尚未见报道。

由于研究植物多酚类物质与酶、血清白蛋白等

蛋白质的相互作用能对于植物多酚物质的利用和人体吸收提供数据参考,因此本研究以油菜蜂花粉多酚为研究对象,首先利用超声波辅助乙醇提取法提取其中的多酚类物质,再分别利用酶动力学和荧光光谱技术探究其对胰脂肪酶的抑制作用过程。本实验结果为蜂花粉的降脂作用及进一步食品功能开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

干燥油菜蜂花粉 杭州天厨蜜源保健品有限公司提供,均于-20℃保存;脂肪酶 30000 U/g(来源于猪胰脏),北京百灵威科技有限公司;4-硝基苯基月桂酸酯(p-NPB) 上海阿拉丁试剂有限公司;福林酚试剂 生工生物公司(上海)股份有限公司;二甲亚砜、无水乙醇、Tris 缓冲溶液及其他试剂 均为国产分析纯。

RF-5301PC 型荧光分光光度计、UV-1800 型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;FlexA-200 型酶标仪 杭州奥盛仪器有限公司;Rotavapor R-210 型旋转蒸发仪 瑞士布奇公司;KQ-250DB 型数控超声提取仪 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 油菜蜂花粉多酚的提取和含量测定 油菜蜂花粉多酚的提取参照张燕新<sup>[17]</sup>的方法并稍有改进,取 100 g 油菜蜂花粉样品,研磨后过 60 目筛,按料液比 1:10 加入 75% 乙醇溶液在 50℃ 下进行超声(功率 200 W)提取 1 h,重复提取三次合并滤液。旋转蒸发仪减压浓缩后,稀释至合适浓度再进行乙酸乙酯萃取,利用旋转蒸发仪蒸发至干后冷冻干燥得油菜蜂花粉多酚提取物备用。

总多酚含量测定采用福林酚法<sup>[18]</sup>并稍作改动,配制质量浓度为 0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 mg/mL 的没食子酸标准品液,加入 0.5 mL 福林酚试剂与 10% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 1.5 mL,避光反应后利用紫外分光光度计测定 747 nm 波长处的吸光度。以没食子酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,测定三次取平均值进行计算。得到拟合方程为  $y=66.82x+0.4517$ ,其  $R^2=0.9987$ ,测得没食子酸计的油菜蜂花粉多酚含量为 71.2%。

1.2.2 蜂花粉多酚对胰脂肪酶活性的影响 胰脂肪酶活性测定及计算方法参考张静等<sup>[19]</sup>并稍作改动。将适量胰脂肪酶溶解于 0.25 μmol/L 的 Tris 缓冲溶液作为储备液,12000 r/min 离心 3 min 后取上清液

即为 5 mg/mL 的胰脂肪酶工作液,用二甲亚砜配制 10 mmol/L 的底物 p-NPB 溶液和不同质量浓度(0、0.142、0.356、0.570、0.712、1.068、1.424、2.136 mg/mL)的油菜蜂花粉多酚溶液。在酶标板中每孔加入 10  $\mu$ L 的蜂花粉多酚提取物、30  $\mu$ L 胰脂肪酶溶液、20  $\mu$ L Tris 缓冲液作为实验组,不加胰脂肪酶和多酚提取物为空白组,不加多酚提取物为实验对照组,不加胰脂肪酶为溶剂对照组。设置酶标仪孵育温度为 37  $^{\circ}$ C 并孵育 15 min 后,加入 40  $\mu$ L 的底物溶液,轻轻吹打混匀后继续孵育 15 min,并于 405 nm 处测定吸光度,通过公式(1)得到酶相对活性。以油菜蜂花粉多酚提取物的质量浓度为横坐标,纵坐标为酶相对活性,绘制曲线并进行多元线性拟合,再利用回归方程同时计算蜂花粉多酚的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>),所有组别平行测定三次。

$$\text{酶相对活性(\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中,  $A_1$  为实验组吸光度;  $A_2$  为空白组吸光度;  $A_3$  为实验对照组吸光度;  $A_4$  为溶剂对照组吸光度。

### 1.2.3 油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制类型判定

固定底物浓度为 10 mmol/L 不变,分别测定不同质量浓度的油菜蜂花粉多酚溶液(0、0.712、1.424 mg/mL)和不添加酶抑制剂时,不同酶浓度下的反应速率。以 1.2.2 中实验组体系进行反应,并以不加抑制剂为对照组。反应速率为反应后的体系吸光度与反应时间相除,以胰脂肪酶质量浓度为横坐标,反应速率为纵坐标绘制曲线,基于曲线斜率初步判断抑制类型<sup>[20]</sup>。

固定胰脂肪酶质量浓度为 5 mg/mL 和油菜蜂花粉多酚提取物浓度为 IC<sub>50</sub>,加入不同浓度的底物 p-NPB 溶液(0.5、1、2、3、4 mg/mL),以 1.2.2 中实验组体系进行反应。以底物浓度的倒数(1/[S])为横坐标,纵坐标为反应速率的倒数(1/v),绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线<sup>[21]</sup>。

### 1.2.4 油菜蜂花粉多酚作用于胰脂肪酶的紫外-可见吸收光谱分析测定

将胰脂肪酶工作液与不同质量浓度的油菜蜂花粉多酚溶液混匀,室温作用 5 min 后取适量反应液于石英比色皿,并在 250~400 nm 范围内进行紫外-可见吸收光谱扫描。

### 1.2.5 荧光发射光谱及同步荧光光谱分析测定

将不同浓度的油菜蜂花粉多酚提取物加入胰脂肪酶工作液中,调整油菜蜂花粉多酚提取物与胰脂肪酶的用量比。分别在不同温度(298 和 308 K)下振荡混匀并静置 5 min,设置仪器的激发波长为 280 nm,发射波长扫描范围 300~500 nm,狭缝宽为 5 nm 进行荧光发射光谱扫描。

改变荧光光谱仪的激发波长和发射波长之间的波长差( $\Delta\lambda$ )分别为 15 和 60 nm,进行同步荧光光谱扫描,其余测量条件和发射光谱实验条件一致<sup>[22]</sup>。

### 1.2.6 荧光猝灭机理和结合常数分析

根据荧光光谱峰值,结合式(2)进行荧光猝灭机理和结合常数的分析,以  $F_0/F$  为纵坐标,  $[Q]$  为横坐标绘制 Stern-Volmer 曲线,斜率即为猝灭常数( $K_{SV}$ )<sup>[23]</sup>,通过计算得到双分子碰撞猝灭常数( $K_q$ )。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{式(2)}$$

式中,  $F_0$  为不加样品时的荧光强度;  $F$  为加入样品后的荧光强度;  $\tau_0$  为生物分子的荧光寿命( $10^{-8}$ );  $[Q]$  为样品的质量浓度。

## 1.3 数据处理

使用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据处理,以及 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制作用

如图 1 所示,随着提取物的浓度增大,胰脂肪酶的活性也随之降低,呈现质量浓度依赖性,蜂花粉多酚引起胰脂肪酶的活性降低 50% 的质量浓度为  $1.670 \pm 0.045$  mg/mL。由此可见,油菜蜂花粉多酚提取物对胰脂肪酶的具有较好的抑制效果。张静等<sup>[19]</sup>发现黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶的半抑制质量浓度为  $2.84 \pm 0.45$  mg/mL,与本实验结果类似。

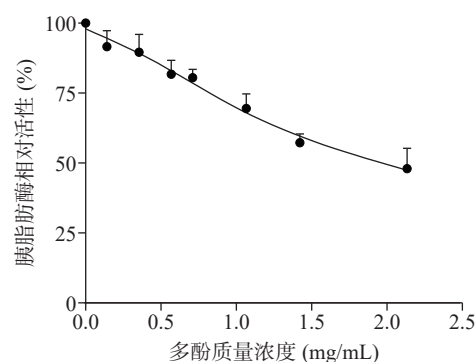


图 1 油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶活性的影响  
Fig.1 Effects of rape bee pollen polyphenols on pancreatic lipase activity

### 2.2 蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制类型

底物浓度为 10 mmol/L 不变,改变酶浓度,以反应速率对酶的质量浓度进行作图,得到经过原点的直线。由图 2A 可知,随着蜂花粉多酚浓度增加,直线斜率逐渐降低,且曲线均经过原点,说明油菜蜂花粉多酚通过降低酶活性使得反应速率减小,而不是通过降低酶量,说明此过程为可逆性抑制过程<sup>[24]</sup>。固定胰脂肪酶的质量浓度,改变底物的浓度, Lineweaver-Burk 双倒数曲线如图 2B,曲线均相交于第二象限,为非竞争性与竞争性混合的抑制类型<sup>[25]</sup>。黄桂丽等<sup>[26]</sup>证实枇杷花多酚对胰脂肪酶的抑制类型为可逆混合型抑制,半抑制质量浓度为  $66.1 \pm 6.36$   $\mu$ g/mL,与本研究的结果比较类似,表明植物提取多酚对于胰脂肪酶的抑制类型具有一定相似性。

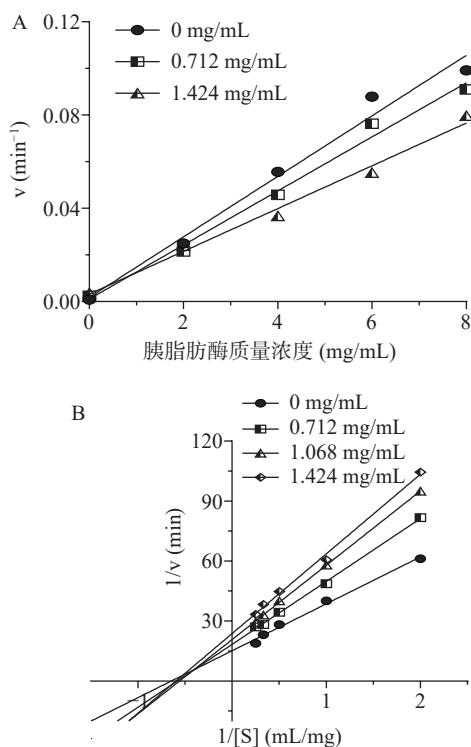


图2 油菜蜂花粉多酚对胰酶的抑制类型与 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.2 Inhibitory types and Lineweaver-Burk double reciprocal curve of rape bee pollen polyphenols on pancreatic lipase

注: A 为油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶抑制类型判断, B 为可逆性抑制的 Lineweaver-Burk 曲线。

混合型抑制是特异性抑制和酶催化作用同时存在的抑制类型,  $K_i$  表示抑制剂与酶的复合物(EI)的离解常数, 而  $K_{is}$  则表示抑制剂与酶-底物的复合物(EIS)分解出抑制剂(I)时的离解常数,  $K_i$  与  $K_{is}$  的大小均与抑制剂的抑制作用效果呈反比<sup>[27]</sup>。根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线计算在有无油菜蜂花粉多酚存在时斜率的比值( $1+[Q]/K_i$ )以及纵轴截距的比值( $1+[Q]/K_{is}$ )即可求得  $K_i$  及  $K_{is}$ , 计算结果见表 1。当油菜蜂花粉多酚质量浓度一定时,  $1/K_i > 1/K_{is}$ , 即多酚与胰脂肪酶的亲和力大于多酚与底物-酶复合物的亲和力<sup>[28]</sup>, 表明油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制现象是竞争性与非竞争性抑制两种混合的结果。王燕飞等<sup>[29]</sup>发现米胚芽中的胰脂肪酶抑制剂是通过间接改变底物乳化来阻碍底物与酶的结合, 不直接与酶作用。

表 1 Lineweaver-Burk 双倒数曲线参数

Table 1 Lineweaver-Burk double reciprocal curve parameters

| [Q]/(mg/mL) | 拟合方程               | $R^2$ | $K_i$ /(mg/mL) | $K_{is}$ /(mg/mL) |
|-------------|--------------------|-------|----------------|-------------------|
| 0           | $y=23.474x+15.126$ | 0.992 | /              | /                 |
| 0.712       | $y=31.485x+18.322$ | 0.997 | 2.086          | 3.370             |
| 1.068       | $y=37.179x+21.805$ | 0.998 | 1.829          | 2.419             |
| 1.424       | $y=39.859x+23.74$  | 0.996 | 2.040          | 2.510             |

### 2.3 油菜蜂花粉多酚作用于胰脂肪酶的紫外-可见吸收光谱分析

胰脂肪酶中含有芳香族氨基酸如酪氨酸、色氨

酸和苯丙氨酸, 这也决定了其在 260 nm 左右存在最大吸收波长。由图 3 可知, 胰脂肪酶除了在 260 nm 处有最大吸收峰外同时随着油菜蜂花粉多酚浓度的增加, 250~280 nm 处的吸收峰值增强并出现了红移现象, 这也说明了胰脂肪酶结构中的芳香族氨基酸微环境发生了改变, 因此导致酶构象的改变。

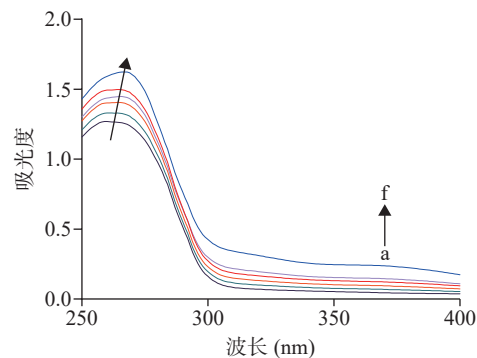


图3 不同浓度的油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的紫外-可见吸收光谱

Fig.3 UV absorption spectra of pancreatic lipase with different concentrations of rape bee pollen polyphenols

注: 曲线由 a~f 表示油菜蜂花粉多酚质量体积分数分别为 0、0.071、0.178、0.356、0.712、1.424 mg/mL。

### 2.4 油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的荧光光谱

通过荧光猝灭实验分析油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶之间的相互作用, 如图 4 所示, 随着油菜蜂花粉多酚质量浓度的升高, 胰脂肪酶的荧光强度呈现出递减的趋势, 同时荧光峰位从 341 nm 红移到 349 nm, 说明油菜蜂花粉多酚使胰脂肪酶的构象发生了改变, 即色氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸影响导致。

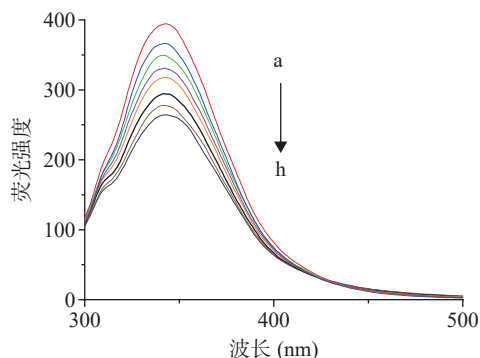


图4 油菜蜂花粉多酚与胰酶作用的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra of rape bee pollen polyphenols interacting with pancreatic lipase

注: 曲线由 a~h 表示油菜蜂花粉多酚质量体积分数分别为 0、0.712、1.424、2.492、3.916、5.696、7.832、10.324  $\mu\text{g/mL}$ 。

为进一步确定蜂花粉多酚对胰脂肪酶构象的影响, 利用同步荧光光谱来判断氨基酸残基构象及其所处环境的变化。如图 5A 和图 5B 分别是  $\Delta\lambda=15$  nm 和  $\Delta\lambda=60$  nm 时油菜蜂花粉多酚的加入对胰脂肪酶的影响。前者表示对胰脂肪酶中酪氨酸的光谱特性, 后者则为色氨酸<sup>[30]</sup>。由图 5 可知, 酪氨酸残基的最

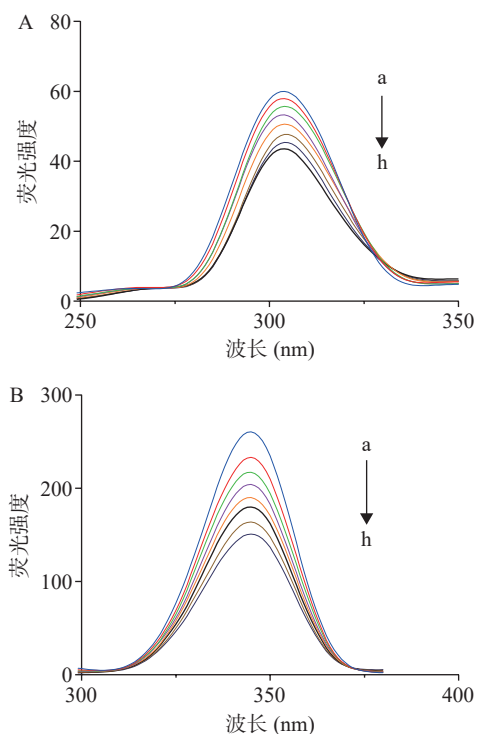


图5 油菜蜂花粉多酚对胰酶的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of rape bee pollen polyphenols on pancreatic lipase

注: 曲线由 a~h 表示油菜蜂花粉多酚质量体积分数分别为 0、0.712、1.424、2.492、3.916、5.696、7.832、10.324  $\mu\text{g/mL}$ 。

大发射波长基本保持不变, 而色氨酸残基的最大发射波长略有红移, 表明多酚的加入导致胰脂肪酶的构象发生变化, 从而降低了色氨酸残基所处环境的疏水性, 使得胰脂肪酶内部结构发生改变, 肽链的伸展程度随之增加<sup>[31]</sup>。范金波等<sup>[32-33]</sup>、张国文等<sup>[34]</sup>采用荧光光谱法分别研究了绿原酸、咖啡酸和白杨素与胰脂肪酶的相互作用。结果表明这三种多酚与胰脂肪酶的结合均通过改变酶的结构从而抑制胰脂肪酶活性, 同时金属离子在一定程度上抑制了这种结合。此外绿原酸、咖啡酸和白杨素均通过静态猝灭方式猝灭胰脂肪酶的内源性荧光。

## 2.5 荧光猝灭机理和结合常数分析

为探究胰脂肪酶和油菜蜂花粉多酚的互作模式, 实验比较了不同温度下 Stern-Volmer 方程的变化曲线。分别测定 298 K 和 308 K 时胰脂肪酶的荧光强度, 据公式(2)绘制  $F_0/F$  对  $[Q]$  的关系图见图 6A, 并将由 Stern-Volmer 曲线拟合得到的方程中各参数见表 2。在荧光分析中, 若已知猝灭为动态猝灭, 则随温度升高, 猝灭常数增大; 若为静态猝灭, 则

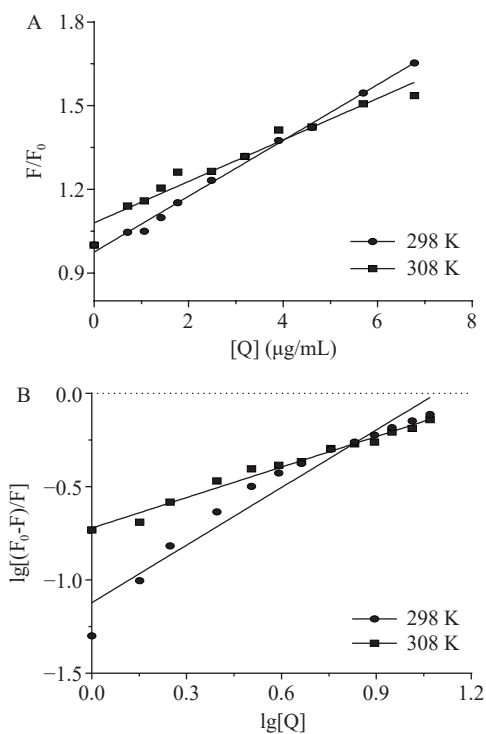


图6 油菜蜂花粉多酚对胰酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线和双对数曲线

Fig.6 Stern-Volmer curve and double logarithm curve of fluorescence quenching of pancreatic lipase by rape bee pollen polyphenols

注: A 和 B 分别为油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线和双对数曲线。

减小<sup>[35]</sup>。由图 6A 可知, 直线斜率随着温度升高而减小, 提示其结合过程为静态猝灭。另外在 298 K 时, 蜂花粉多酚对胰脂肪酶的  $K_{SV}$  为 0.1000  $\text{mg/mL}$ , 而在 308 K 时,  $K_{SV}$  则为 0.0743  $\text{mg/mL}$ 。当油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶的荧光猝灭主要为静态猝灭时, 其猝灭规律符合公式(3)。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad \text{式 (3)}$$

式中,  $F_0$  为未加入猝灭剂时的荧光强度;  $F$  为猝灭剂浓度等于  $[Q]$  时的荧光强度;  $K_A$  为表观结合常数;  $n$  为结合位点数。

以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg[Q]$  作图, 见图 6B 及表 2, 结合图表可求得 298 K 时的油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶的表观结合常数  $K_A$  的值为 0.0755  $\text{mg/mL}$  (298 K), 0.1718  $\text{mg/mL}$  (308 K), 结合位点常数  $n$  值为 1.0288 (298 K), 0.5993 (308 K), 说明油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶的结合位点在这两个温度下均仅有 1 个。

表2 不同温度下油菜蜂花粉多酚与胰脂肪酶相互作用的 Stern-Volmer 方程和双对数曲线方程参数

Table 2 Stern-Volmer equation and double logarithm curve equation parameters for the interaction between rape bee pollen polyphenols and pancreatic lipase at different temperatures

| 温度 (K) | Stern-Volmer 方程               | 双对数曲线方程                                     | $K_{SV}$ (mg/mL) | $K_q$ (mg/(mL·s))   | $K_A$ (mg/mL) | $n$    |
|--------|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------|---------------------|---------------|--------|
| 298    | $F_0/F = 0.1[Q] + 0.9751$     | $\lg[(F_0 - F)/F] = 1.0288 \lg[Q] - 1.1218$ | 0.1000           | $1.000 \times 10^7$ | 0.0755        | 1.0288 |
| 308    | $F_0/F = 0.0743 [Q] + 1.0796$ | $\lg[(F_0 - F)/F] = 0.5993 \lg[Q] - 0.7650$ | 0.0743           | $0.743 \times 10^7$ | 0.1718        | 0.5993 |

### 3 结论

本文通过紫外-可见分光光度法和荧光光谱法探究油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶的抑制活性和相互作用过程,发现油菜蜂花粉多酚能以静态猝灭方式与胰脂肪酶结合,而且能对胰脂肪酶的活性产生一定的抑制作用,引起酶活性降低 50% 时多酚的质量浓度为  $1.670 \pm 0.045$  mg/mL,抑制类型为可逆性混合型抑制。此外,根据同步荧光光谱结果显示,随着油菜蜂花粉多酚的加入,胰脂肪酶中酪氨酸残基的最大发射波长基本保持不变,而色氨酸残基的最大发射波长略有红移,由此可见多酚的加入导致胰脂肪酶的构象发生了变化。Stern-Volmer 猝灭常数  $K_{sv}$  随着温度升高而减小,表明结合过程为静态猝灭,且结合位点约为 1 个。综上所述,油菜蜂花粉多酚对胰脂肪酶存在明显抑制作用,多酚的存在可进一步阻碍膳食中脂肪的吸收,并使脂肪积累过程受到抑制。本实验也为蜂花粉多酚的降脂机制和进一步功能开发提供了理论依据,此外不同萃取方式得到的提取物及油菜蜂花粉多酚单体化合物对胰脂肪酶活性的抑制作用及二者的构效关系可作为后续研究的重点。

### 参考文献

- [1] THAKUR M, NANDA V. Composition and functionality of bee pollen: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 98: 82–106.
- [2] LI Q Q, WANG K, MARCUCCI M C, et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 472–484.
- [3] TUOHETI T, RASHEED H A, MENG L, et al. High hydrostatic pressure enhances the anti-prostate cancer activity of lotus bee pollen via increased metabolites[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 261: 113057.
- [4] 郑慧, 梁倩倩, 陈希平, 等. 蜂花粉保健功能及产品开发研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 230–236. [ZHENG H, LIANG Q Q, CHEN X P, et al. Research progress of bee pollen health care function and product development[J]. Food & Machinery, 2019, 35(4): 230–236.]
- [5] RZEPECKA-STOJKO A, STOJKO J, KUREK-GORECK A, et al. Polyphenols from bee pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity[J]. Molecules, 2016, 21(2): 21732–21749.
- [6] 杨佳林, 孙丽萍, 徐响, 等. 油菜蜂花粉黄酮醇的测定及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 79–82. [YANG J L, SUN L P, XU X, et al. Hydrolyzed rape bee pollen ethanol extract qualitative and quantitative analysis of flavonol and antioxidant activity evaluation[J]. Food Science, 2010, 31(3): 79–82.]
- [7] XU Y Y, CAO X R, ZHAO H A, et al. Impact of *Camellia japonica* bee pollen polyphenols on hyperuricemia and gut microbiota in potassium oxonate-induced mice[J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2665–2685.
- [8] RZEPECKA-STOJKO A, KABALA-DZIK A, KUBINA R, et al. Protective effect of polyphenol-rich extract from bee pollen in a high-fat diet[J]. Molecules, 2018, 23(4): 805–823.
- [9] LI X Z, GONG H Q, YANG S W, et al. Pectic bee pollen polysaccharide from *Rosa rugosa* alleviates diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via induction of ampk/mtor-mediated autophagy[J]. Molecules, 2017, 22(5): 699.
- [10] KLEIN S. Long-term pharmacotherapy for obesity[J]. Obesity Research, 2004, 12(12): 163–166.
- [11] BIRARI R B, BHUTANI K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(19-20): 879–889.
- [12] 姜运耀, 吕国英, 李燕飞, 等. 植物来源的胰脂肪酶抑制剂研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(2): 199–202. [JIANG Y Y, LÜ G Y, LI Y F, et al. Research advances in pancreatic lipase inhibitors from plants[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, 33(2): 199–202.]
- [13] SLANC P, DOLJAK B, KREFT S, et al. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition[J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(6): 874–877.
- [14] SUTANA R, ALASHI A M, ISLAM K, et al. Inhibitory activities of polyphenolic extracts of bangladeshi vegetables against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, pancreatic lipase, renin, and angiotensin-converting enzyme[J]. Foods, 2020, 9(7): 844–857.
- [15] 任秀娟, 马海乐. 葡萄籽提取物脂肪酶抑制活性筛选及抑制机理的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 181–186. [REN X J, MA H L. Study on inhibitory screening and mechanism of grape seed on pancreatic lipases[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(6): 181–186.]
- [16] 田强, 吴子健, 黄道荣, 等. 葡萄籽中胰脂肪酶抑制物提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 41–44. [TIAN Q, WU Z J, HUANG D R, et al. Optimizing conditions for the isolation of pancreatic lipase inhibitive substance from grape seeds[J]. Food Research and Development, 2010, 31(4): 41–44.]
- [17] 张燕新. 云南三种蜂花粉多酚的制备及抑制黑色素瘤 B16 细胞生物活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016. [ZHANG Y X. Preparation of three kinds of bee pollen polyphenols from Yunnan and their bioactivity against melanoma B16 cells[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology. 2016.]
- [18] 杨佳林. 油菜蜂花粉酚类化合物的分离及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010. [YANG J L. Purification of phenolic compounds in rape seed pollen (*Brassica campestris*) and its antioxidant activity[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.]
- [19] 张静, 米佳, 禄璐, 等. 黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 8–14. [ZHANG J, MI J, LU L, et al. Effect of anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* murr. fruit on pancreatic lipase activity[J]. Food Science, 2020, 41(5): 8–14.]
- [20] 张忠. 茶多酚对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 168–170. [ZHANG Z. The inhibition effect of tea polyphenol on pancreatic lipase[J]. The Food Industry, 2013, 34(8): 168–170.]
- [21] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(8): 72–75. [JIANG H F, WANG Y Q, LIU C G. Comparison and improvement of three determination methods for of lipase activity[J]. Chemistry & Bioengineering, 2007, 24(8): 72–75.]
- [22] 王燕, 吕达, 郭明, 等. 全氟辛酸与血清蛋白分子间作用的紫外-荧光光谱分析法建立及理论建模研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(2): 494–501. [WANG Y, LV D, GUO M, et al. Study on the intermolecular interaction between perfluorooctanoic acid and serum protein by UV-fluorescence spectrometry and the establishment of theoretical models[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(2): 494–501.]
- [23] LI X, CAI J J, YU J L, et al. Inhibition of *in vitro* enzymatic

- starch digestion by coffee extract[J]. Food Chemistry, 2021, 358(6): 129837–129843.
- [24] LIN M Z, CHAI W M, ZHENG Y L, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of rifampicin on  $\alpha$ -glucosidase: Insights from spectroscopic and molecular docking analyses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 122: 1244–1252.
- [25] ZHENG L, LEE J, YUE L M, et al. Inhibitory effect of pyrogallol on  $\alpha$ -glucosidase: Integrating docking simulations with inhibition kinetics[J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2018, 112: 686–693.
- [26] 黄桂丽, 王毓宁, 马佳佳, 等. 枇杷花多酚对脂肪酶的抑制作用[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 192–196. [HUANG G L, WANG Y N, MA J J, et al. Inhibitory effect of loqual flowers polyphenolics on lipase activity[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2021, 37(1): 192–196.]
- [27] HUANG Q, CHAI W M, MA Z Y, et al. Antityrosinase mechanism of ellagic acid *in vitro* and its effect on mouse melanoma cells[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(11): 12996–13005.
- [28] 陈宇霞, 张凯, 龚盛昭. 茯苓提取物对酪氨酸酶抑制动力学及刺激性研究[J]. 日用化学工业, 2017, 47(6): 317–321. [CHEN Y X, ZHANG K, GONG S Z. Tyrosinase activity inhibition kinetics and skin irritation of extracts of *Poria cocos* extract[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2017, 47(6): 317–321.]
- [29] 王燕飞, 郭贯新, 张晖. 米胚芽中脂肪酶抑制剂提取工艺及其性质的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(2): 85–87. [WANG Y F, GUO G X, ZHANG H. Inhibitory mechanism studies of pancreatic lipase inhibitor derived from rice germ[J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(2): 85–87.]
- [30] 李朕, 尚丽平, 邓琥, 等. 色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱特征参量提取[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1925–1928. [LI Z, SHANG L P, DENG H, et al. Extraction of characteristic parameters of three-dimensional fluorescence spectra of tyrosine and tryptophan[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(7): 1925–1928.]
- [31] 冯素玲, 袁道琴. 阿魏酸哌嗪与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 分析实验室, 2009, 28(7): 78–82. [FENG S L, YUAN D Q. Study on interaction between piperazine ferulate and bovine serum albumin[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(7): 78–82.]
- [32] 范金波, 李鑫芮, 葛春辉, 等. 荧光光谱法研究绿原酸与胰脂肪酶相互作用[J]. 食品与发酵科技, 2017, 53(6): 106–110. [FAN J B, LI X R, GE C H, et al. Study on the interaction between chlorogenic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectrometry[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2017, 53(6): 106–110.]
- [33] 范金波, 王晓露, 姜海静, 等. 荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 152–155. [FAN J B, WANG X L, JIANG H J, et al. Study on the interaction between caffeic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 152–155.]
- [34] 张国文, 黎沙, 朱苗. 白杨素对胰脂肪酶的抑制作用及机制[J]. 南昌大学学报(理科版), 2021, 45(6): 545–552. [ZHANG G W, LI S, ZHU M. Inhibitory interaction and mechanism of chrysin on pancreatic lipase[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2021, 45(6): 545–552.]
- [35] 周玉玳, 戴双雄, 佟斌, 等. 光谱学与分子对接结合解释生物大分子与配体间作用机制的研究进展[J]. 影像科学与光化学, 2021, 39(3): 337–347. [ZHOU Y D, DAI S X, TONG B, et al. Recent progress of the interaction mechanism between biomacromolecules with ligands based on combining spectroscopy analysis with molecular docking[J]. Imaging Science and Photochemistry, 2021, 39(3): 337–347.]