

香水莲花花蕊醇提物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及其主要成分

张静¹, 侯北伟^{2,①}, 尹峥桢¹, 姜洪芳², 姚正颖², 孙力军², 张俊杰^{1,①}

(1. 江苏海洋大学食品科学与工程学院, 江苏 连云港 222005; 2. 南京野生植物综合利用研究所, 江苏 南京 211100)

摘要: 通过体外实验测定了香水莲花(*Nymphaea* sp.)花蕊醇提物对黄嘌呤氧化酶(XOD)的抑制率及其动力学常数(K_i),并采用液质联用法分析该醇提物的主要成分。结果表明:香水莲花花蕊醇提物对XOD具有抑制作用,且随醇提物质量浓度的升高抑制率增大,半数抑制浓度(IC_{50})为 $38.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;抑制反应类型为混合型抑制, K_i 值为 $0.95 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该醇提物的主要成分为没食子酸、鞣花酸和槲皮苷,其中鞣花酸对XOD有一定的抑制作用(IC_{50} 值为 $7.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),而没食子酸和槲皮苷对XOD无抑制作用。

关键词: 香水莲花; 黄嘌呤氧化酶; 酶动力学; 鞣花酸; 半数抑制浓度

中图分类号: Q946.8; S682.32 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)01-0092-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.01.13

Inhibitory effect of ethanol extract from stamen and pistil of *Nymphaea* sp. on xanthine oxidase and its main components ZHANG Jing¹, HOU Beiwei^{2,①}, YIN Zhengzhen¹, JIANG Hongfang², YAO Zhengying², SUN Lijun², ZHANG Junjie^{1,①} (1. School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 211100, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(1): 92-94

Abstract: The inhibitory rate of ethanol extract from stamen and pistil of *Nymphaea* sp. on xanthine oxidase (XOD) and its kinetic constant (K_i) were determined *in vitro*, and the main components of the ethanol extract were analyzed by using HPLC-MS method. The results show that the ethanol extract from stamen and pistil of *Nymphaea* sp. has inhibitory effect on XOD, the inhibition rate increases with the increase of ethanol extract mass concentration, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) is $38.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; the type of inhibition is mixed inhibition, and the K_i value is $0.95 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The main components of the ethanol extract are gallic acid, ellagic acid, and quercitrin, in which, ellagic acid has a certain inhibitory effect on XOD (IC_{50} value is $7.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), but gallic acid and quercetin have no inhibitory effect on XOD.

Key words: *Nymphaea* sp.; xanthine oxidase; enzyme kinetics; ellagic acid; half inhibitory concentration

痛风是一种由尿酸盐沉积引起的、与晶体相关的关节病。大量研究结果^[1-3]表明:药用植物的醇提物、水提物以及乙酸乙酯提取物等对黄嘌呤氧化酶(XOD)具有较高的抑制率,其中黄酮类、酚酸类和生物碱类等活性成分均对XOD有抑制作用,具有较强的降尿酸功能。

香水莲花(*Nymphaea* sp.)为水生宿根草本植物,具有降血脂、抗氧化和抗衰老等功能^[4-6]。香水莲花富含黄酮、多糖和多酚类等活性成分,其花蕊水提物对XOD有抑制作用^[7],但其醇提物对XOD的抑制作用尚不明确。为此,作者以香水莲花花蕊为研究材料,研究其醇提物对XOD的抑制作用,并采用液质联用法确定其醇提物的主要成分,为可调节尿酸水平的功能性食品开发提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

紫色香水莲花的干燥花朵于2019年购于安徽芜湖,由南京野生植物综合利用研究所张卫明研究员鉴定。取雄蕊和雌蕊,用粉碎机粉碎后过80目筛,密封保存、备用。

甲酸(色谱级)、甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级)、黄嘌呤(X7375-10G)和黄嘌呤氧化酶(X1875-5UN)购于美国Sigma公司;阳性对照品别嘌醇片购于合肥久联制药有限公司;没食子酸、鞣花酸和槲皮苷标准品(纯度 $\geq 98\%$)均购于瑞士Adamas公司;其他试剂均为分析纯,购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 南京市江宁区农业科技创新项目(2020-09KCJD)

作者简介: 张静(1996—),女,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事食品加工与安全方面的研究。

①通信作者 E-mail: hbwbaron@163.com; 631284077@qq.com

引用格式: 张静,侯北伟,尹峥桢,等. 香水莲花花蕊醇提物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及其主要成分[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(1): 92-94.

1.2 方法

1.2.1 醇提取物制备 称取 15 g 样品粉末,按料液比 1 : 10 ($m : V$)加入体积分数 70%的乙醇,浸提 24 h 后于 60 °C、40 kHz条件下超声提取 45 min,常温下 4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,滤渣重复提取 1 次;合并上清液,于 50 °C 旋转蒸发至膏状,冷冻干燥后研磨,备用。

1.2.2 XOD 抑制活性测定 XOD 抑制活性的测定参照文献 [7,8]的方法并加以改进。醇提取物、别嘌醇片和 3 个标准品(没食子酸、鞣花酸和鞣皮苷)均用二甲亚砜(DMSO)溶解,配制成不同质量浓度的样品,其中醇提取物的质量浓度分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25 和 2.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;别嘌醇质量浓度分别为 1.0、2.0 和 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;3 个标准品的质量浓度分别为 0.5、1.0 和 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,均设置 3 个平行组。酶促反应体系包括待测样品 200 μL (空白组为 DMSO 200 μL)、1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄嘌呤溶液 100 μL 、5 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ XOD 溶液 3 μL ,用磷酸盐缓冲液(pH 7.5)补充至 10 mL;混匀后在室温条件下于波长 295 nm 处测定吸光度,参照文献 [7]的方法计算不同质量浓度醇提取物以及阳性对照和标准品对 XOD 的抑制率;并以供试样品的质量浓度为自变量 x 、抑制率为因变量 y 拟合回归方程,根据回归方程计算供试样品的半数抑制浓度(IC_{50})。

在上述酶促反应体系中固定 XOD 浓度不变,分别加入 0.375、0.750、1.500 和 3.000 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄嘌呤溶液以及 0.00、1.75、2.00 和 2.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 醇提取物,按照上述方法测定吸光度,以反应时间为横坐标、吸光值为纵坐标作图,并根据直线斜率计算反应速率;采用双倒数作图法,以黄嘌呤溶液质量浓度的倒数为横坐标、反应速率的倒数为纵坐标作图,评价醇提取物对 XOD 的抑制作用类型,并据此计算抑制动力学常数(K_i)。

1.2.3 醇提取物主要成分分析 冷冻干燥后的醇提取物和标准品没食子酸、鞣花酸和鞣皮苷用乙腈溶解并配制成 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 待测样品,用 0.4 μm 有机系微孔滤膜过滤后备用。

采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)进行 HPLC 分析。色谱柱为 Eclipse XDB-C18 分离柱(4.6 $\text{mm} \times 250 \text{ mm}$,5 μm ,美国 Agilent 公司)。以体积分数 0.1%甲酸-水溶液(流动相 A)和乙腈(流动相 B)进行梯度洗脱,洗脱程序为:0~10 min,5%~13%B;10~15 min,13%~18%B;15~30 min,18%~23%B;30~40 min,23%~28%B;40~45 min,28%~33%B;45~50 min,33%~40%B;50~55 min,40%~100%B。流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35 °C;进样量 20 μL ;醇提取物检测波长为 260 和 360 nm,标准品检测波长为 360 nm。

采用 Agilent 1290 Infinity LC/6460 QQQ MS 液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司)进行质谱分析。质谱条件:ESI 离子源,喷雾电压 4 kV,雾化气体 N_2 ,雾化压力 344.75 kPa,雾化气流速 10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$;碰撞气体为 He,碰撞电压 250 V,干燥温度 350 °C;扫描方式为负离子,离子范围 m/z 100~2 000;采

用 Qualitative DA Software B.08.00 工作站对数据进行分析。

1.3 统计学分析

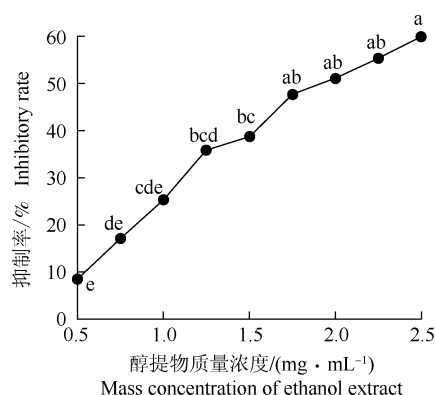
采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析,应用回归分析法计算 IC_{50} 及 K_i 值;采用 Origin 6.0 软件作图。

2 结果和分析

2.1 香水莲花花蕊醇提取物对 XOD 的抑制活性

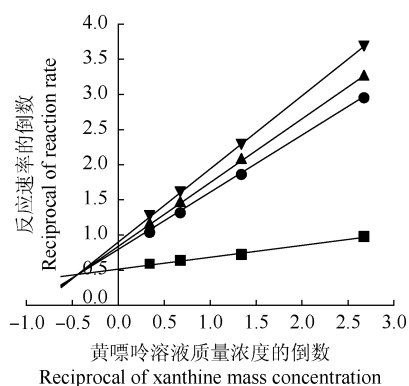
不同质量浓度香水莲花花蕊醇提取物对 XOD 的抑制率见图 1;对 XOD 的抑制动力学分析结果见图 2。

由图 1 可见:香水莲花花蕊醇提取物对 XOD 的抑制率随其质量浓度升高而增大,总体上差异显著($P < 0.05$)。质量浓度为



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

图 1 不同质量浓度香水莲花花蕊醇提取物对 XOD 抑制率的影响
Fig. 1 Effect of different mass concentrations of ethanol extract from stamen and pistil of *Nymphaea* sp. on inhibition rate of XOD



■: 0.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ●: 1.75 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ▲: 2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ▼: 2.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

图 2 不同质量浓度香水莲花花蕊醇提取物对 XOD 抑制反应的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 2 Lineweaver-Burk's double reciprocal figure of the XOD inhibition reaction of different mass concentrations of ethanol extract of stamen and pistil from *Nymphaea* sp.

0.50~1.25 mg·mL⁻¹时,抑制率随着质量浓度的升高快速增大;质量浓度为1.25~1.50 mg·mL⁻¹时,抑制率增幅减小;质量浓度为1.50~2.50 mg·mL⁻¹时,抑制率增幅再次增大。此外,香水莲花花蕊醇提取物对XOD抑制作用的半数抑制浓度(IC₅₀)为38.54 μg·mL⁻¹(拟合方程 $y=3.91x+1.11, r^2=0.994$),明显大于阳性对照别嘌醇片的IC₅₀值(0.015 μg·mL⁻¹)。

由图2可见:随香水莲花花蕊醇提取物质量浓度的提高,直线斜率和在纵轴上的截距均相应增加,且图中4条直线均相交于第2象限,说明香水莲花醇提取物对XOD抑制类型为混合型抑制,且该抑制反应的动力学常数(K_i)为0.95 mg·mL⁻¹。

2.2 香水莲花花蕊醇提取物的主要组成成分

液相色谱和质谱分析结果表明:香水莲花花蕊醇提取物的主要成分为没食子酸、鞣花酸和槲皮苷,且没食子酸的吸收峰为主要峰。对这3种化合物进行XOD抑制活性检测,结果显示:没食子酸和槲皮苷对XOD均无明显的抑制作用,而鞣花酸对XOD有较强的抑制作用,IC₅₀值为7.56 μg·mL⁻¹(拟合方程 $y=4.31x+6.81, r^2=0.987$)。

3 讨论和结论

前期研究表明:香水莲花花蕊水提取物对XOD有抑制作用,抑制类型为竞争性抑制,半数抑制浓度(IC₅₀)为145.80 μg·mL⁻¹[7]。本研究结果表明:香水莲花花蕊醇提取物对XOD也有抑制作用,但抑制类型为混合型抑制,IC₅₀值仅为38.54 μg·mL⁻¹,说明同种植物的不同溶剂提取物对XOD的抑制类型存在差异。

研究表明:香水莲花花蕊醇提取物的主要成分为没食子酸、鞣花酸和槲皮苷,其中鞣花酸对XOD的IC₅₀值为7.56 μg·mL⁻¹,没食子酸和槲皮苷对XOD无抑制作用。桉(*Eucalyptus robusta* Smith)叶提取物中鞣花酸对XOD的IC₅₀值为22.51 μg·mL⁻¹[9],与本研究结果存在差异,这可能与反应体系及仪器设备造成的客观误差有关,但2个研究均证实鞣花酸对XOD具有一定的抑制作用。没食子酸对XOD的抑制作用为特殊的混合型抑制,但抑制效果较弱,而V_c可协同提高没食子酸对XOD的抑制率[10];鞣花酸对XOD的抑制作用为竞争性抑制[9],而香水莲花花蕊醇提取物对XOD的抑制作用为混合型抑制,说明该醇提取物中除了鞣花酸,没食子酸及

其他成分也对XOD的抑制作用有协同影响。且在香水莲花花蕊醇提取物中,没食子酸的吸收峰为主要峰,因此,该醇提取物中没食子酸及其他成分对XOD的抑制作用有待进一步研究。

综上所述,香水莲花花蕊醇提取物对XOD具有一定的抑制作用,且抑制率随其质量浓度升高而增大,抑制作用类型为混合型抑制;该醇提取物中的主要成分为没食子酸、鞣花酸和槲皮苷,其中鞣花酸对XOD具有一定的抑制作用,但醇提取物中各成分之间的协同作用有待进一步研究。

参考文献:

- [1] KONG L D, CAI Y, HUANG W W, et al. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 73(1/2): 199-207.
- [2] EL-TANTAWY W H. Natural products for the management of hyperuricaemia and gout: a review [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2021, 127(1): 61-72.
- [3] 邹琳, 冯凤琴. 食品中降尿酸活性物质及其作用机理研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 352-357, 364.
- [4] 张卫明, 姜洪芳, 徐辉, 等. 香水莲花降血脂作用的实验研究 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(2): 111-112, 116.
- [5] 周琦, 曾莹, 祝遵凌. 响应面法优化香水莲花多酚的提取工艺及其抗氧化活性 [J]. *现代食品科技*, 2018, 34(11): 200-207, 7.
- [6] ZHUANG Z H, LV T, LI M, et al. The lifespan-extending effects of *Nymphaea hybrid* root extract in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2014, 69(4): 304-309.
- [7] 张静, 侯北伟, 姚正颖, 等. 香水莲花提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 [J]. *中国野生植物资源*, 2021, 40(8): 1-5.
- [8] 王亚楠, 张志军, 李会珍. 紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 [J]. *中成药*, 2020, 42(2): 462-465.
- [9] 刘又豪, 赵力超, 卢嘉欣, 等. 桉叶提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性成分的分离纯化及其动力学研究 [J]. *广东农业科学*, 2014, 41(14): 100-105.
- [10] 陈雨岑, 王莹莹, 杜若童, 等. 槲皮素、芦丁、没食子酸抑制黄嘌呤氧化酶的活性及动力学特性 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(12): 118-124.

(责任编辑: 吴蕊夷)