

## 气相色谱法测定脂肪酶的活力

李谭瑶, 邓克国, 陈波\*, 姚守拙

(湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

**摘要:** 本文发展了一种以气相色谱检测脂肪酶活力的方法。以三丁酸甘油酯为底物, 通过气相色谱对产物正丁酸进行定性定量分析。正丁酸在  $0.11 \sim 11.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内线性关系良好, 回归方程为:  $y = 45\,464x - 3\,115.2$ ,  $r = 0.996\,8$ 。反应时间仅需 5 min, 最适 pH 值和温度分别为 7.5 和 32 °C。低、中、高 3 个浓度正丁酸的回收率分别为 90.3%, 104.6% 和 89.4%; RSD 分别为 3.01%, 4.50% 和 6.64%。通过实验测定出  $K_m = 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 奥利司他的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.048\,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本方法具有反应体积小、操作简单、快速、灵敏等特点。

**关键词:** 脂肪酶; 三丁酸甘油酯; 正丁酸; 气相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0628-04

## Determination of lipase activity by gas chromatography

LI Tan-yao, DENG Ke-guo, CHEN Bo\*, YAO Shou-zhuo

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** A rapid gas chromatography method was developed for determination of lipase activity using tributyrin as substrate. The standard curves of butyric acid hydrolyzed from tributyrin were linear in the range of  $0.11 \sim 11.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The recoveries of low, moderate and high concentrations of tributyrin were 90.3%, 104.6%, 89.4% with RSD of 3.01%, 4.50%, 6.64%, respectively. The incubation time was only 5 minutes which was less than with the half time of the conventional titrimetry and spectrophotometry. The optimum pH value was 7.5 and the optimum temperature was 32 °C. Based on the Lineweaver-Burk plots, the Michaelis-Menten constant was  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The effect of orlistat on the enzyme inhibiting activity was studied to prove the accuracy of this method. It was found that the half-inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) of orlistat was  $0.048\,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The small total reaction volume, the simple treating procedures, the high accuracy and precision present the advantages of the new method.

**Key words:** lipase; tributyrin; butyric acid; gas chromatography

脂肪酶(三酰基甘油酯水解酶E.C.3.1.1.3)是一类特殊的酯键水解酶,广泛存在于动物和微生物体内。食物中的脂肪被肠道中的脂肪酶水解成单酰甘油和游离脂肪酸后,被人体吸收并重新合成脂肪,过量时可造成脂肪堆积,最终导致肥胖<sup>[1]</sup>。脂肪酶抑制剂,如奥利司他(orlistat)等能直接作用于脂肪酶,抑

制人体对脂肪的吸收,从而达到减肥的目的。脂肪酶作为减肥药物的作用靶点,已经成为近年来研究的热点。目前,对脂肪酶活力的检测方法有很多种,国内常用的有酸碱滴定法<sup>[2]</sup>和比色法<sup>[3,4]</sup>。滴定法中使用的白色底物乳化液及缓冲体系中存在的缓冲液会干扰滴定终点的判别,影响滴定结果的准确性和稳定性<sup>[5]</sup>;比色法中由于合成的底物 *p*-NPP (对硝基苯酚酯类)较昂贵<sup>[6]</sup>或使用了有毒溶剂——苯作为提取溶剂,从而限制了其发展<sup>[7]</sup>。因此,有必要开发一种准确性高、经济、环保的方法来测定脂肪酶活力。用气

收稿日期: 2008-11-24.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2006CB504701); 国家自然科学基金资助项目 (20875028).

\*通讯作者 Tel: 86-731-8865515, E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com

相色谱法测定脂肪酶活力在国内鲜有报道。本文在酸碱滴定法的基础上,发展了一种以三丁酸甘油酯为底物,通过气相色谱来检测产物——正丁酸的量,来评价脂肪酶活力的方法。

## 材料与方法

**实验试剂与仪器** 黑曲霉属脂肪酶 (S-7449 from *Aspergillus niger*, 深圳绿微康公司); 三丁酸甘油酯 (Alfa Aesar 公司); 考马斯亮蓝 G-250 (Amresco 公司); 奥利司他 (大邦生物制药公司); 聚乙烯醇 (简称 PVA, 聚合度 1750; 上海山浦化工有限公司); 其他试剂为国产分析纯; 实验用水为双蒸水。

银河 501 型超级恒温水浴锅 (重庆仪表电机厂); 凯达 TG16G 高速离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司); 雷磁 PHS-3C 精密 PH 计 (上海精密科学仪器有限公司); 舒美 KQ3200 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); HP5890 气相色谱仪带 FID 检测 (美国安捷伦公司)。

**色谱条件** Supecl-NUKOL™ FFAP 毛细管柱 (固定相为对苯二甲酸改性的聚乙二醇; 30 m × 0.53 mm × 0.5 μm), 柱温 100 °C, 保持 5 min, 以 20 °C·min<sup>-1</sup> 的速率升温至 180 °C 后, 保持 6 min。分流。进样口温度 250 °C, 检测器温度 250 °C, 载气 (氮气) 流速 10 mL·min<sup>-1</sup>, 氢气流速 30 mL·min<sup>-1</sup>, 空气流速 300 mL·min<sup>-1</sup>, 尾吹 30 mL·min<sup>-1</sup>。进样量 1 μL。

### 溶液的配制

正丁酸标准溶液: 精密称取正丁酸适量, 用乙腈稀释, 配制成 8 个不同浓度的正丁酸标准溶液。

脂肪酶溶液: 精密称取适量酶粉, 溶于 pH 7.5 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 10 mL 中, 超声 20 min, 离心 10 min (3 500 r·min<sup>-1</sup>)。取上清液作为酶反应液。脂肪酶蛋白浓度以考马斯亮蓝法<sup>[8]</sup>测定。

三丁酸甘油酯乳化液: 精密量取三丁酸甘油酯 1 mL, 以 2%PVA 溶液定容至 10 mL, 超声 20 min。

### 脂肪酶活力的检测

测定原理: 三丁酸甘油酯在脂肪酶的作用下水解成甘油和正丁酸。产物正丁酸可以通过气相色谱进行定量分析。由此, 可以计算出脂肪酶的活力单位。

脂肪酶活性测定: 反应总体积为 500 μL。空白组组成为: 底物乳化液 100 μL, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液 400 μL。实验组组成为: 底物乳化液 100 μL, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液 200 μL, 酶液 200 μL。在 32 °C 水浴反应 5 min 后, 加入乙腈 800 μL 终止反应, 振荡 10 s, 离心 10 min (10 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液

进样分析。

脂肪酶活力单位定义: 在 pH 为 7.5, 温度为 32 °C 条件下, 每分钟催化三丁酸甘油酯水解生成 1 μmol 正丁酸的量, 定义为一个酶活力单位。

计算公式为:

$$X = \frac{B - A}{C \times t}$$

$X$  为脂肪酶活力 (U·mg<sup>-1</sup>);  $B$  为实验组产生的正丁酸的量 (μmol);  $A$  为空白组产生的正丁酸的量 (μmol);  $C$  为体系中所含酶量 (mg);  $t$  为反应时间 (min)。

### 脂肪酶抑制活性的检测

原理: 脂肪酶抑制剂 (奥利司他) 能抑制脂肪酶活性, 通过比较有无抑制剂加入情况下生成的正丁酸量的差异, 来评价脂肪酶抑制剂对脂肪酶活性的抑制程度。

测定方法: 按上述方法, 在反应液中加入奥利司他甲醇溶液 100 μL 后, 测定生成的正丁酸的量。按参考文献<sup>[9]</sup>计算抑制率及 IC<sub>50</sub> 值。

## 结果与讨论

### 1 正丁酸标准曲线

正丁酸在 0.11~11.35 mmol·L<sup>-1</sup> 内, 峰面积 ( $y$ ) 与浓度 ( $x$ ) 的回归方程为:  $y = 45\,464x - 3\,115.2$ ,  $r = 0.996\,8$ 。结果表明正丁酸的浓度与峰面积线性关系良好, 因此可用气相色谱外标法对正丁酸进行定量检测。

### 2 最适 pH 值和反应温度的选择

酶催化作用受测定环境的影响, 因此测定酶活力要在最适条件下进行<sup>[10]</sup>。通过改变 pH 值和反应温度, 考察了两者对酶活力的影响。结果见图 1 和图 2。

由图 1 可知, 脂肪酶在碱性条件下具有较高的活力, 最佳 pH 值为 7.48。由于在碱性缓冲体系中脂肪

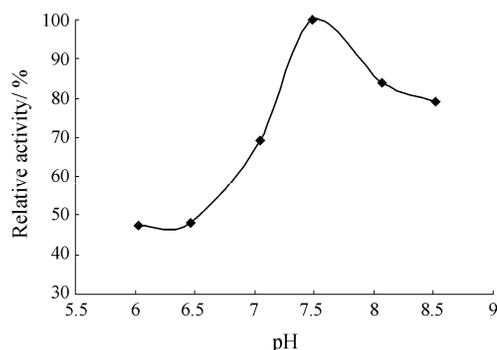


Figure 1 Effect of pH on lipase activity

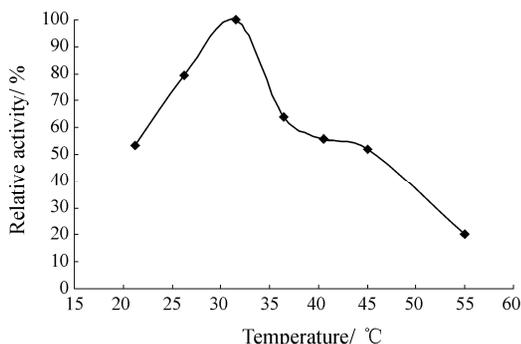


Figure 2 Effect of temperature on lipase activity

酶带负电荷，与 PVA 带负电的亲水端相斥，而使酶分子容易与有机相的底物接触，从而发挥出较大的活性<sup>[9]</sup>。因此，反应体系中选择 pH = 7.5 ± 0.1 的 Tris-HCl 作为缓冲溶液。

不同来源的脂肪酶具有不同的最适反应温度。通常，猪胰脂肪酶的最适反应温度为 37 °C 左右<sup>[11]</sup>；黑曲霉属脂肪酶在 25~35 °C 具有较高的酶活，本文所测最适反应温度为(31.6 ± 0.5) °C，与文献<sup>[12]</sup>相符。

3 反应时间和方法专属性

由于在气相色谱法中，正丁酸的灵敏度比酸碱滴定要高很多，所以用气相色谱法测定脂肪酶活力可以缩短反应时间。通常，滴定法和分光光度法所需反应时间为 10~30 min<sup>[5, 7, 11]</sup>，而本方法仅需 5 min。较短的反应时间不仅有利于准确的计算反应初速度和米氏常数<sup>[10]</sup>，而且有利于进行在线分析。

正丁酸在 5 min 左右就能被检测到，且峰形良好，如图 3 所示。脂肪酶水解样品中，正丁酸与其他杂质能达到很好的分离效果。

实验发现，在空白样品（不加酶）中，也能检测到少量的正丁酸，可能是由于少量三丁酸甘油酯能自发水解。为了排除其干扰，计算酶活力时应扣除空白

样品中正丁酸的浓度。

4 终止剂的选择

脂肪酶反应的终止剂一般为乙醇，高浓度的磷酸盐或磷酸。分别用乙醇，乙腈和 1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸来终止反应，于 0 °C 下保存 4 h 后，测定正丁酸前后的变化量，来评价其终止效果。结果如表 1 所示。每种终止剂平行测定 3 次，表中所列差值范围为平行样的标准偏差范围。

Table 1 The effect of different terminators

Terminator	Difference from the initial value of butyric acid/%
Orthophosphoric acid (1 mol·L <sup>-1</sup> )	2.56-5.71
Ethanol	-7.27-11.04
Acetonitrile	1.98-6.35

用乙醇终止反应的样品稳定性较差。可能是由于乙醇不能完全终止反应，未反应完的底物继续水解生成了正丁酸。用乙腈和 1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸终止反应的样品都有较好的稳定性，标准偏差小于 6.35%。但考虑到乙腈能更好的沉淀蛋白，防止样品中的酶蛋白对气相色谱柱的污染，本文选用乙腈作为反应终止剂。

5 方法的准确度和精密度

在未经反应的实验组溶液中分别加入浓度为 0.22, 1.14 和 5.68 mmol·L<sup>-1</sup> 的正丁酸标准溶液，通过检测并计算正丁酸的平均回收率来考察本方法的准确性和精密性。平均回收率分别为 90.3%, 104.6%和 89.4%; RSD 值分别为 3.01%, 4.50%和 6.64% (n = 3)。

6 脂肪酶米氏常数的测定

配制 0.026, 0.033, 0.066 和 0.132 mmol·L<sup>-1</sup> 的底物乳化液，分别测定酶活力，按 Lineweaver-Burk 法做双倒数图。结果如图 4 所示，直线在横轴上截距为 -1/K<sub>m</sub>，纵轴截距为 1/V<sub>m</sub>。求算出该实验方法下米氏常数 K<sub>m</sub> 值为 0.25 mmol·mL<sup>-1</sup>。

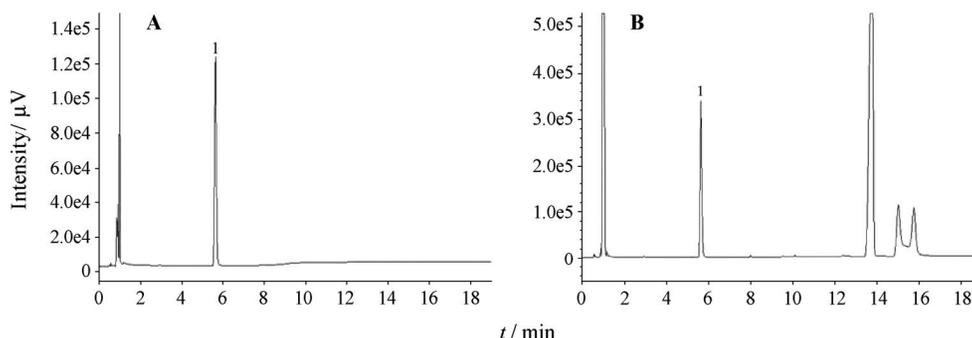


Figure 3 Chromatograms of lipase activity determined by GC-FID. A: Butyric acid standard solution; B: Experiment sample solution. 1: Butyric acid

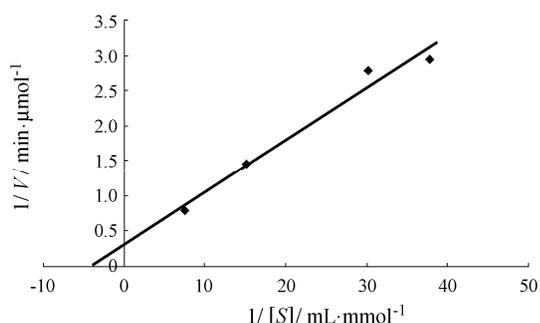


Figure 4 Lineweaver-Burk plots of the lipase activity

## 7 奥利司他溶剂的选择及其 $IC_{50}$ 值的测定

为了进一步验证方法的可靠性,在反应体系中加入奥利司他溶液,测定其对脂肪酶的抑制作用。奥利司他极性很小,通常只溶于氯仿、甲醇、二甲亚砜(DMSO)和四氢呋喃(THF)等有机溶剂。由于氯仿与缓冲溶液不互溶,DMSO对正丁酸峰产生干扰,本文仅考察了甲醇和THF对酶的抑制情况。体系中16.7%(加入量100  $\mu$ L)的甲醇或THF对酶的抑制率分别为47.9%和89.4%。所以本文选择抑制活性较小的甲醇作为奥利司他的溶剂。以甲醇空白液为对照(抑制率为0),计算出 $IC_{50}$ 值为 $0.0485 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,与文献<sup>[9]</sup>比较接近,因此本方法具有较高的可靠性。

## 结论

本文以三丁酸甘油酯为底物,发展了一种以气相色谱检测脂肪酶活力的方法。该方法克服了滴定法重现性差和准确性低的缺点,具有反应体积小,反应时间短,检测速度快等优点,适合于脂肪酶活力的测定及其抑制剂的筛选。

## References

[1] Chiesi M, Huppertz C, Hofbauer KG. Pharmacotherapy of

obesity: targets and perspectives [J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22: 247–254.

[2] Brockman HL. Triglyceride lipase from porcine pancreas [J]. Methods Enzymol, 1981, 71: 619–627.

[3] Zeng SH, Yang JK, Xu L, et al. Lipase immobilization and its stability analysis [J]. Biotechnology (生物技术), 2006, 16: 54–57.

[4] Zhang HY, Ding Y, Ying RQ, et al. The newest study on the lipase activity [J]. Bull Biol (生物学通报), 2007, 42: 16–17.

[5] Gao G, Han SP, Wang Z, et al. Comparative studies on the assay methods of lipase activity [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2002, 9: 281–284.

[6] Zheng Y, Ye HM, Zhou X, et al. Progress of lipase activity determination [J]. Ind Microbiol (工业微生物), 2005, 35: 36–40.

[7] Jiang HF, Wang YQ, Liu CG. Comparison and improvement of three determination methods for lipase activity [J]. Chem Bioeng (化学与生物工程), 2007, 24: 72–75.

[8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.

[9] Huo SX, Zhou TY, Si XJ, et al. Inhibitory effect on pancreatic lipase of flavonoids derived from Lotus leaf [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2008, 20: 328–331.

[10] Shen T, Wang JY. Biological Chemistry (生物化学) [M]. Beijing: High Education Press, 2002.

[11] Yong XB, Yan FL, Yong Y, et al. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale  $\text{SiO}_2$  spheres [J]. Process Biochem, 2006, 41: 770–777.

[12] Heerden EV, Litthauer D, Verger R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films [J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 30: 902–909.