

木蝴蝶提取物对酪氨酸酶的抑制及抗氧化作用

王锐*, 熊汝琴, 罗家刚, 祁岑

(昭通学院化学与生命科学学院, 云南 昭通 657000)

[摘要] 目的:研究木蝴蝶对酪氨酸酶的抑制及抗氧化作用。方法:以木蝴蝶醇提物的不同极性组分为研究对象,测定了木蝴蝶对酪氨酸酶的抑制作用,以及运用1,1-二苯-2-苦肟自由基(DPPH·)、羟基自由基(·OH)测定其抗氧化能力。结果:木蝴蝶醇提物的乙酸乙酯组分(EAO)、正丁醇组分(*n*-BO)、水提取组分(WO)对酪氨酸酶活性均有抑制作用,其半数抑制率(IC₅₀)分别为3.081 4, 8.525 3, 22.750 8 g·L⁻¹; DPPH·和·OH试验显示EAO, *n*-BO, WO具有较强的自由基清除作用,其清除自由基能力强弱次序均为EAO > *n*-BO > WO。结论:木蝴蝶具有良好的酪氨酸酶抑制活性及抗氧化作用,抑制酪氨酸酶活性的生成与其抗氧化能力具有正相关性;木蝴蝶醇提物的功能性成分主要分布在乙酸乙酯相中。

[关键词] 木蝴蝶; 酪氨酸酶; 抑制; 自由基; 清除; 抗氧化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0070-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180070

Effect on Anti-tyrosinase and Antioxidation Activities of Extract from *Oroxylum indicum*

WANG Rui*, XINOG Ru-qin, LUO Jia-gang, QI Cen

(College of Chemistry and Life Science, Zhaotong University, Zhaotong 657000, China)

[Abstract] **Objective:** To study anti-tyrosinase and antioxidation activities of extract from *Oroxylum indicum*. **Method:** This paper took different polar fractions of extract from the *O. indicum* ethanolic extract as research objects, measured its inhibition of tyrosinase and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH·) and the hydroxyl free radical (·OH) scavenging ability. **Result:** Its alcohol extract of ethyl acetate extract (EAO), *n*-butanol extract (*n*-BO) and water extract (WO) had inhibition to tyrosinase, the values of IC₅₀ reached 3.081 4, 8.525 3, 22.750 8 g·L⁻¹ respectively; EAO, *n*-BO, WO had stonger scavenging effect of DPPH· and ·OH, the order of scavenging ability was EAO > *n*-BO > WO. **Conclusion:** *O. indicum*. had better tyrosinase inhibitory and antioxidation, its antioxidation ability had positive correlation with its anti-tyrosinase. Its functional components were mainly distributed in the ethyl acetate phase.

[Key words] *Oroxylum indicum*; tyrosinase; inhibition; free radical; scavenging; antioxidant

木蝴蝶为紫葳科木蝴蝶属植物木蝴蝶的成熟种子,主产于广东、广西、四川、贵州、云南等省,具有清肺利咽、止咳、疏肝和胃以及生肌之功效^[1-2]。

木蝴蝶主要含有黄酮、对羟基苯乙醇、环己醇、紫檀碱及挥发油等多种化合物^[3],具有镇痛、抗炎、抗菌、抗氧化、抑制病毒及肿瘤生长等生物活性^[4]。酪氨酸酶是一种氧化还原酶类,其反应需要有氧自由基参加,清除氧自由基可以阻断酪氨酸酶的催化

反应,抑制黑色素的生成^[5]。通过对酪氨酸酶活性的抑制和自由基的清除,能减轻或祛除色素沉着现象,还可以起到抗衰老作用。本研究对木蝴蝶醇提物的不同极性组分同时进行酪氨酸酶活性抑制和1,1-二苯-2-苦肟自由基(DPPH·)、羟基自由基(·OH)清除试验,发现了木蝴蝶对酪氨酸酶的抑制作用和抗氧化功效,为木蝴蝶作为天然药物的进一步开发利用提供了科学依据。

[收稿日期] 20140102(004)

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金项目(08C0234)

[通讯作者] *王锐,硕士,副教授,从事天然产物化学研究, Tel:13887060020, E-mail:wangrui0020@aliyun.com

1 材料

1.1 仪器 AF1604 型电子天平(上海天平仪器厂),UV/VIS2802PCS 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂 木蝴蝶购于云南昭通中药房,1,1-二苯-2-苦肼自由基(DPPH·, Sigma 公司,批号 D9132)、酪氨酸酶(Sigma 公司,批号 93898)、熊果苷(上海晶纯试剂有限公司,批号 35648)、L-酪氨酸、维生素 C(VC)、硫酸亚铁、水杨酸、双氧水、乙酸乙酯、正丁醇、无水乙醇等试剂均为分析纯(南京化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 木蝴蝶不同极性组分的制备 木蝴蝶经干燥粉碎,过四号筛,80%乙醇作为溶剂,按料液比为 1:10,在 20 KHz,30 °C 条件下超声提取 1 h,过滤,滤渣同上重复提取 2 次,合并滤液,减压浓缩除去乙醇后得到浸膏。在浸膏中加入重蒸水,制成悬浮液。先用石油醚萃取除去脂溶性杂质,再依次用等体积的乙酸乙酯和正丁醇萃取,每个溶剂萃取 3 次,各萃取溶液和萃取剩余水相溶液经减压浓缩得稠浸膏,于 60 °C 烘干得到木蝴蝶的 3 个极性组分:乙酸乙酯组分(EAO)、正丁醇组分(*n*-BO)和剩余水相组分(WO)。各组分均用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成 20 g·L⁻¹ 的样品溶液,备用。

2.2 木蝴蝶不同极性组分对酪氨酸酶的抑制试验 参考文献[6-7]的方法,以 L-酪氨酸为底物,用 DMSO 溶剂稀释的不同质量浓度的木蝴蝶提取物作为效应物进行测定,总反应体系为 3 mL,反应液及其组成见表 1。其中 L-酪氨酸溶液为 2 mmol·L⁻¹ (0.067 mol·L⁻¹, pH 6.8 磷酸缓冲液溶解),酪氨酸酶液活力为 200 U(0.067 mol·L⁻¹, pH 6.8 磷酸缓冲液溶解),充分混匀后,在 37 °C 恒温条件下培育 30 min,于 475 nm 波长处测定吸光度。以熊果苷为阳性对照,每种样品重复测定 3 次。

样品对酪氨酸酶抑制率计算公式:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_c - A_d}{A_a - A_b}\right) \times 100\%$$

A_a 为空白对照溶液的吸光度, A_b 为空白对照溶液的本底吸光度, A_c 为加入效应物溶液后的吸光度, A_d 为效应物溶液的本底吸光度。

2.3 木蝴蝶不同极性组分对自由基的清除试验

2.3.1 DPPH·清除试验^[8-9] 用无水乙醇精确配制 1×10^{-4} mol·L⁻¹ 的 DPPH· 溶液,0 ~ 4 °C 避光保存,备用。分别取待测溶液与 DPPH· 溶液各 2 mL 均匀

表 1 反应液的组成

反应液成分/mL	A	B	C	D
0.067 mol·L ⁻¹ , pH 6.8	1.5	2	1.5	2
磷酸缓冲液				
L-酪氨酸	0.5	0.5	0.5	0.5
效应物	-	-	0.5	0.5
DMSO	0.5	0.5	-	-
酪氨酸酶	0.5	-	0.5	-
总体积	3	3	3	3

混合,在暗处放置 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度。以 DMSO 代替不同样品溶液为空白对照,VC 为阳性对照,每种样品重复测定 3 次。按下式计算其清除率^[10]:

$$\text{DPPH·清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100\%$$

A_c 为空白对照溶液的吸光度, A_i 为加入待测溶液后的吸光度, A_j 为待测溶液的本底吸光度。

2.3.2 ·OH 清除试验^[11-12] 依次在试管中加入待测溶液,9 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇,9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液,最后加入 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 各 2 mL,37 °C 反应 30 min,在 510 nm 波长处测定各待测液的吸光度。以 DMSO 代替不同样品溶液为空白对照,VC 为阳性对照,每种样品重复测定 3 次。依据下列公式计算清除率^[10]。

$$\cdot\text{OH 清除率} = \left(1 - \frac{A_x - A_{x_0}}{A_0}\right) \times 100\%$$

A_0 为空白对照溶液的吸光度, A_x 为加入待测溶液后的吸光度, A_{x_0} 为待测溶液的本底吸光度。

3 结果

3.1 木蝴蝶不同极性组分对酪氨酸酶的抑制作用

在以 L-酪氨酸为底物的测活体系中,加入不同质量浓度的效应物,试验其对酪氨酸酶的抑制作用,见图 1。随着效应物质量浓度的增大,熊果苷及木蝴蝶不同极性组分对酪氨酸酶的抑制率增强,且二者之间具有良好的线性关系。图 1 经计算机进行线性拟合

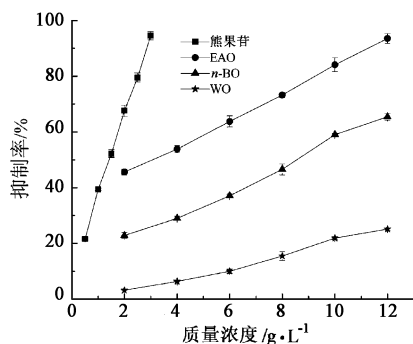


图 1 木蝴蝶不同极性组分及熊果苷对酪氨酸酶的抑制作用

计算出熊果苷、EAO、*n*-BO 和 WO 对酪氨酸酶半数抑制率(IC_{50})分别为 1.431 2, 3.081 4, 8.525 3, 22.750 8 $g \cdot L^{-1}$ 。 IC_{50} 越小, 其抑制酪氨酸酶的能力越强。由此可知, 在 2 ~ 12 $g \cdot L^{-1}$, 木蝴蝶不同极性组分对酪氨酸酶活性抑制能力的强弱关系表现为 $EAO > n-BO > WO$, EAO 对酪氨酸酶活性抑制能力最强, 约为熊果苷的 0.5 倍。由此说明, 木蝴蝶醇提物抑制酪氨酸酶的活性成分主要分布在乙酸乙酯相中。

3.2 对 DPPH· 的清除作用 在试验浓度范围内随着样品质量浓度的升高, VC 和各极性组分对 DPPH· 的清除率呈上升趋势, 均表现为剂量依赖性清除, 见图 2。说明 VC 和木蝴蝶醇提物的 3 种不同极性组分均对 DPPH· 具有一定程度的清除作用, 但它们的清除能力存在较大差异。由图 2 经计算机线性拟合得出 EAO, *n*-BO, WO 和 VC 清除 DPPH· 的 IC_{50} 分别为 18.478 6, 30.713 4, 82.584 6, 4.740 1 $mg \cdot L^{-1}$ 。表明, EAO 对 DPPH· 的清除能力明显强于 *n*-BO, WO 而弱于 VC。

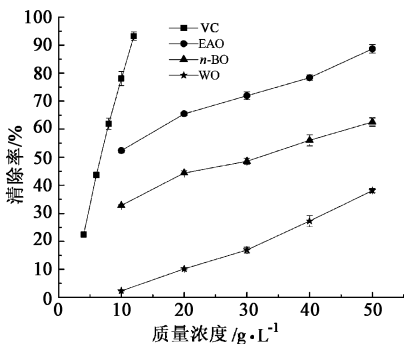


图 2 木蝴蝶不同极性组分及 VC 对 DPPH· 的清除作用

3.3 对·OH 的清除作用 在试验质量浓度范围内, 随着样品质量浓度的增高, 清除·OH 的能力增强, 说明样品与自由基清除能力存在良好的剂量关系, 见图 3, 计算机线性拟合得到 EAO, *n*-BO, WO 和 VC 清除·OH 的 IC_{50} 分别为 0.249 9, 1.579 1, 3.253 3, 0.172 0 $g \cdot L^{-1}$ 。说明, 木蝴蝶各极性组分中, EAO 对·OH 的清除效果强于 *n*-BO, WO, 而略弱于 VC。

由上述结果可以看出, EAO 对 DPPH· 和·OH 的清除能力均强于 *n*-BO, WO, 木蝴蝶抗氧化的活性成分主要集中在乙酸乙酯相中。

4 讨论

从木蝴蝶醇提物中不同极性组分对酪氨酸酶的抑制来看, 其能力强弱顺序和清除自由基的顺序相一致, 均依次为 $EAO > n-BO > WO$, 说明木蝴蝶对酪氨酸酶活性的抑制与其清除自由基的能力具有正相关性, 木蝴蝶可能通过清除自由基抑制酪氨酸酶的

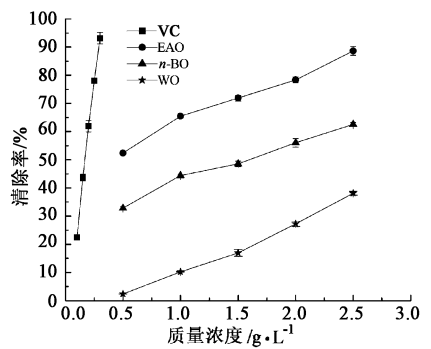


图 3 木蝴蝶不同极性组分及 VC 对·OH 的清除作用

催化活性。由此表明, 木蝴蝶抑制黑色素的生成与其抗氧化密切相关。

综合研究发现, 无论是对酪氨酸酶的抑制还是对自由基的清除, 木蝴蝶 EAO 能力最强。可进一步进行活性跟踪筛选和成分分离, 为木蝴蝶作为天然酪氨酸酶抑制剂和天然抗氧化剂的开发应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] 兰茂. 滇南本草[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1978: 24.
- [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: 60.
- [3] 张昌壮. 木蝴蝶化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [4] 王锐, 袁晓春, 何崑, 等. 木蝴蝶的化学成分和药理作用[J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 121.
- [5] Kubo I, Yokoawa Y, Kinoshita H. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5): 739.
- [6] 石嘉峰. 青梅花提取物的酪氨酸酶抑制作用及机理研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 205.
- [7] 郑成已, 郭云集, 梁戈, 等. 苯丙酸对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(1): 117.
- [8] Cotellen N, Bernier J L, Catteau J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20(1): 35.
- [9] SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 743.
- [10] 王锐, 何崑, 袁晓春, 等. 木蝴蝶总黄酮的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 115.
- [11] 唐鹏程, 焦士蓉, 唐远谋, 等. 石榴皮提取物体外抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1): 12.
- [12] 洪宗国, 易筠, 王东. 蕲艾总鞣酸对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 29(4): 50.

[责任编辑 顾雪竹]