

· 工艺与制剂 ·

艾纳香不同部位提取物的抗氧化活性 及其对酪氨酸酶的抑制作用

庞玉新^{1,2*}, 袁蕾^{1,2}, 王中洋^{1,2,3}, 胡璇^{1,2}, 孙懂华^{1,2,3}, 杨全³

(1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 农业部华南作物基因资源
与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737;

2. 海南省艾纳香工程技术研究中心, 海南 儋州 571737; 3. 广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 考察艾纳香不同部位提取物的抗氧化活性及其对酪氨酸酶的抑制作用, 筛选具有抗氧化活性及美白作用的有效部位。方法: 采用水, 50% 乙醇及 95% 乙醇 3 种不同极性溶剂分别回流提取艾纳香的功能叶、嫩叶、嫩茎; 运用 DPPH, ABTS, FRAP 法及酪氨酸酶抑制活性试验分别比较各部分提取物的相关活性。结果: 艾纳香功能叶、嫩叶、嫩茎的 95% 乙醇提取物 DPPH 自由基清除率大于其他溶剂提取物, 依次为 95.38%, 91.32%, 92.49%; ABTS, FRAP 法及酪氨酸酶抑制试验结果显示艾纳香功能叶和嫩叶的 50% 乙醇和 95% 乙醇提取物均具有较好的活性, 当各提取物质量浓度为 1 500 mg·L⁻¹ 时, 艾纳香功能叶的水, 50% 乙醇和 95% 乙醇提取物对 ABTS 自由基的清除率分别为 26.54%, 82.48%, 67.46%, 嫩叶的 3 种提取物分别为 34.15%, 95.39%, 59.59%, 嫩茎的 3 种提取物分别为 52.05%, 39.35%, 38.77%。功能叶的水, 50% 乙醇及 95% 乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制率分别为 24.24%, 32.79%, 37.97%; 嫩叶不同提取物的抑制率分别为 27.12%, 36.53%, 34.19%, 嫩茎的则依次为 31.36%, 26.22%, 24.00%。结论: 艾纳香提取物具有较好的抗氧化活性和酪氨酸酶抑制作用, 其中功能叶和嫩叶为其主要活性部位。

[关键词] 艾纳香; 抗氧化活性; DPPH 自由基; ABTS 自由基; 铁还原能力; 酪氨酸酶抑制作用

[中图分类号] R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0004-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180004

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1441.001.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:41

Antioxidant Activities and Anti-tyrosinase of Extracts from Different Parts of *Blumea balsamifera*

PANG Yu-xin^{1,2*}, YUAN Lei^{1,2}, WANG Zhong-yang^{1,2,3}, HU Xuan^{1,2}, SUN Dong-hua^{1,2,3}, YANG Quan³

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou 571737, China;

2. Hainan Provincial Engineering Research Center for *Blumea balsamifera*, Danzhou 571737, China;

3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate anti-tyrosinase and *in vitro* antioxidant activities of crude extracts from different parts of *Blumea balsamifera*, in order to screen active ingredients with whitening and antioxidant effects. **Method:** Functional leaves, tender leaves and immature stems of *B. balsamifera* were refluxed by aqueous, 50% ethanol and 95% ethanol, respectively. Then crude extracts were measured tyrosinase inhibitory by enzymology method, and antioxidant activities were detected by DPPH, ABTS and FRAP methods. **Result:**

[收稿日期] 20140413(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374065/81303171); 国家农业部引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目(2013S3)

[通讯作者] * 庞玉新, 博士, 副研究员, 从事药用植物学、南药质量标准 and 南药资源开发与利用研究, Tel: 0898-23300268, E-mail: blumeachina@126.com

DPPH free radical scavenging rate of 95% ethanol extract from functional leaves, tender leaves, immature stems of *B. balsamifera* was higher than other extracts, which was 95.38%, 91.32% and 92.49%, respectively. FRAP, ABTS and anti-tyrosinase experiment's result showed that 50% ethanol and 95% ethanol extracts from functional leaves and immature stems possessed good activity. When concentration of each extracts were 1 500 mg·L⁻¹, scavenging rates of aqueous, 50% ethanol and 95% ethanol extracts of functional leaves for ABTS radical were 26.54%, 82.48% and 67.46%, data of these three extracts of tender leaves were 34.15%, 95.39% and 59.59%, while these data of immature stems were 52.05%, 39.35% and 38.77%, respectively. Inhibition rates of aqueous, 50% ethanol and 95% ethanol extracts of functional leaves on tyrosinase were 24.24%, 32.79%, 37.97%; these data of tender leaves were 27.12%, 36.53% and 34.19%, while immature stems' were 31.36%, 26.22% and 24.00%, respectively. **Conclusion:** Crude extracts from different parts of *B. balsamifera* have good antioxidant activities and inhibitory effect on tyrosinase, functional leaves and tender leaves are main active parts.

[**Key words**] *Blumea balsamifera*; antioxidant activities; DPPH radical; ABTS radical; iron reduction ability; inhibitory effect on tyrosinase

艾纳香又名大风艾、大风叶、娜龙(黎药名)等,主产于海南、贵州、台湾等地^[1],具有温中活血、调经、祛风湿之功效,用于治疗肿胀、筋骨疼痛、跌打刀伤和高血压等,并且对产后浮肿、阴疮等证亦有较好的疗效^[2]。艾纳香中单体化合物已被证明具有良好的抗氧化、酪氨酸酶抑制活性^[3,4],但有关其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性有效部位的研究报道相对较少。

艾纳香为我国重要的民族药之一,在黎、苗、壮等民族均有悠久的用药历史,尤其是在治疗皮肤烧烫伤、晒后修复以及透皮促渗作用等方面功效显著^[5]。随着人们生活水平的提高,皮肤的保养问题越来越被关注,如抗衰老、美白、晒后修复等。氧化是肌肤衰老的最大威胁;酪氨酸酶是黑色素形成的关键酶,过多存在体内导致肌肤色素沉着的,也是产生各种色斑的原因之一。由于化学合成的抗氧化、美白产品会对人体有一定副作用,因此,以植物提取物作为功效原料是今后化妆品行业发展的必然趋势。

近年从植物中分离具有抗氧化活性的酪氨酸酶抑制剂引起了国内外学者的普遍关注^[6-7],故本实验选择艾纳香为研究对象,利用95%乙醇、50%乙醇和水共3种不同极性溶剂提取艾纳香功能叶、嫩叶、嫩茎3个不同组织部位,运用DPPH, ABTS和FRAP法^[8]评价不同提取物的抗氧化活性及其对酪氨酸酶的抑制作用,为该药材活性部位筛选及护肤品开发提供参考。

1 材料

Multiskan[®] Go型全波长酶标仪(赛默飞世尔

科技)。艾纳香药材采自农业部儋州热带药用植物种质资源圃,经中国热带农业科学院庞玉新副研究员鉴定为菊科艾纳香属植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的全草,标本存放于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所标本馆;二甲基亚砜(DMSO,广州化学试剂厂),酪氨酸酶(美国Worthington公司),酪氨酸、熊果苷(纯度均>99%,上海宝曼生物科技有限公司),维生素C(Vitamin C, VC, 纯度>99%,北京索莱宝科技有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,美国Sigma公司),ABTS和FRAP试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 艾纳香不同部位提取物的制备 称取自然晾干的艾纳香功能叶、嫩叶和嫩茎各10g,粉碎,过20~30目筛,分别加20倍量水回流提取2次,提取时间依次为3,2h,合并2次提取液,减压浓缩,干燥至恒重,得不同部位的水提取物,计算得率分别为24.28%, 23.16%, 24.72%。同法制备艾纳香功能叶、嫩叶、嫩茎的50%乙醇提取物和95%乙醇提取物,得率分别为29.90%, 26.71%, 22.80%; 26.72%, 23.82%, 17.98%。

2.2 艾纳香不同部位抗氧化活性评价

2.2.1 DPPH法^[9] 以VC为阳性对照。提取物加无水乙醇配成31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00, 1 000.00 mg·L⁻¹的供试品溶液。阳性参照物配制方法与供试品溶液配制方法一致。DPPH配制成 1.5×10^{-4} mol·L⁻¹的溶液。将供试品溶液和DPPH溶液各100 μL共置于96孔板中,设置3个平

行样品组,对照组加入无水乙醇和 DPPH 溶液各 100 μL ,空白组分别加入供试品溶液和无水乙醇 100 μL 。点样完毕后,室温放置 30 min,在 517 nm 处测定吸光度(A),重复测定 3 次,取平均值,计算清除率和 IC_{50} 。

$$\text{清除率} = [1 - (A_s - A_b) / A_c] \times 100\%$$

式中 A_c 为对照溶液吸光度, A_s 为供试品溶液吸光度, A_b 为空白溶液吸光度。艾纳香不同部位的水,50%乙醇和 95%乙醇提取物清除 DPPH 自由基的线性关系见图 1。结果显示艾纳香功能叶、嫩叶、嫩茎不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除能力随提取物质量浓度的增加而增强;提取物质量浓度为 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,功能叶和嫩叶不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除能力的强弱顺序为 95%乙醇提取物 > 50%乙醇提取物 > 水提取物,而嫩茎不同溶剂提取物的排序为 95%乙醇提取物 > 水提取物 > 50%乙醇提取物。表明艾纳香 3 个部位 95%乙醇提取物的清除率均大于其他溶剂提取物,接近同等质量浓度阳性参照物 VC 的效果(96.34%)。艾纳香各部位的不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除率均呈正量效关系,且以 95%乙醇为提取溶剂时达最好效果。当提取物质量浓度到达 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,清除率曲线变化缓慢,说明此浓度下提取物对自由基的清除能力接近饱和,继续增加质量浓度清除率趋于平衡。艾纳香乙醇溶液提取物的 IC_{50} 均比水提取物小(表 1),提示清除自由基的活性物质主要存在于乙醇提取物中。

表 1 艾纳香各部位不同提取物的抗氧化活性

提取部位	提取溶剂	DPPH 法	ABTS 法	FRAP 法
		IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	FeSO_4 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
功能叶	水	192.11	15 612.42	214.03
	50%乙醇	38.23	423.67	885.61
	95%乙醇	44.78	875.04	1 030.37
嫩叶	水	226.12	4 562.21	225.17
	50%乙醇	35.73	118.03	847.65
	95%乙醇	12.01	1 096.43	446.90
嫩茎	水	207.89	1 490.32	548.84
	50%乙醇	13.23	4 601.27	157.27
	95%乙醇	15.34	4 262.89	184.15
阳性参照物	-	2.30(VC)	-	-

2.2.2 ABTS 法^[10] 将提取物加无水乙醇配成 62.50, 125.00, 250.00, 500.00, 1 000.00, 1 500.00

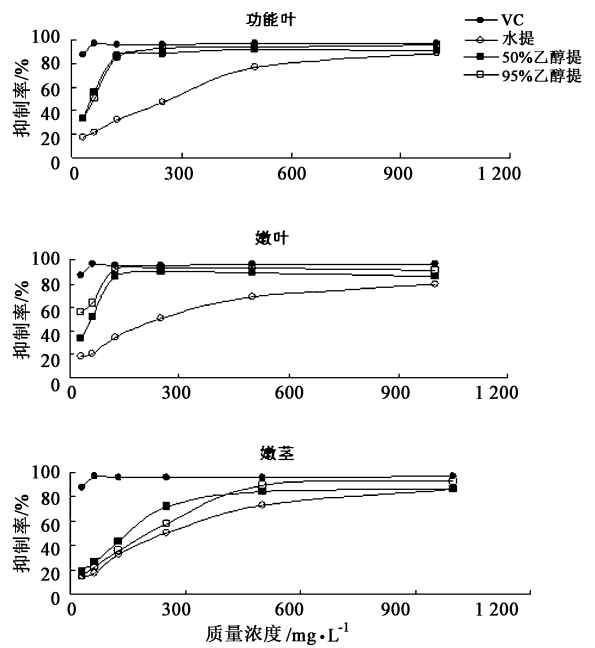


图 1 艾纳香不同部位提取物对 DPPH 自由基的清除率

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液,其他溶液均为试剂盒提供。样品组于 96 孔板中加入过氧化物酶工作液 20 μL 与供试品溶液 10 μL 混匀,加入 ABTS 工作液 170 μL ,设置 3 个平行样品组,对照组加入无水乙醇 10 μL 代替供试品溶液,空白组加入供试品溶液 10 μL 和不含过氧化氢溶液的 ABTS 工作液 170 μL (过氧化氢溶液部分用检测缓冲液补充)。点样完毕后,室温放置 6 min,于 734 nm 处测定 A,重复 3 次,取平均值,计算抑制率和 IC_{50} ,见表 2。结果表明艾纳香各部位的不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除率均呈正量效关系,当提取物质量浓度达 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,清除率曲线变化缓慢,说明此浓度下提取物对自由基的清除能力接近饱和,继续增加浓度清除率趋于平衡。结合表 1 中各提取物的 IC_{50} ,确定艾纳香功能叶和嫩叶不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除能力强弱顺序为 50%乙醇提取物 > 95%乙醇提取物 > 水提取物,而嫩茎中水提取物清除能力最强,50%乙醇提取物和 95%乙醇提取物的清除能力接近。

2.2.3 FRAP 法^[11] 准确称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80 mg,加水定容至 1 mL,得 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,将其稀释至 0.15, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50, 1.80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,供试品溶液的配制方法同 2.2.2 项,其他溶液均为试剂盒提供。样品组将 FRAP 工作液 180 μL 和供试品溶液 5 μL 共置于 96 孔板的微孔板中,设置 3 个平行样品组,对照组为工作液 180 μL

表 2 艾纳香各部位提取物对 ABTS 自由基的清除率

部位	提取溶剂	质量浓度 /mg·L ⁻¹	清除率 /%	部位	提取溶剂	质量浓度 /mg·L ⁻¹	清除率 /%	部位	提取溶剂	质量浓度 /mg·L ⁻¹	清除率 /%
功能叶	水	62.50	9.41	嫩叶	水	62.50	11.29	嫩茎	水	62.50	7.03
		125.00	8.34			125.00	16.97			125.00	11.29
		250.00	11.18			250.00	19.31			250.00	16.87
		500.00	15.15			500.00	30.91			500.00	25.45
		1 000.00	25.26			1 000.00	31.79			1 000.00	43.48
		1 500.00	26.54			1 500.00	34.15			1 500.00	52.05
50%乙醇		62.50	10.44	50%乙醇		62.50	26.67	50%乙醇		62.50	8.02
		125.00	33.73			125.00	51.68			125.00	8.91
		250.00	30.34			250.00	53.58			250.00	8.45
		500.00	65.03			500.00	95.29			500.00	19.19
		1 000.00	79.55			1 000.00	96.54			1 000.00	33.00
		1 500.00	82.48			1 500.00	95.39			1 500.00	39.35
95%乙醇		62.50	10.03	95%乙醇		62.50	6.77	95%乙醇		62.50	8.62
		125.00	18.55			125.00	9.69			125.00	8.03
		250.00	20.13			250.00	15.82			250.00	9.23
		500.00	31.55			500.00	29.04			500.00	26.83
		1 000.00	53.18			1 000.00	50.85			1 000.00	30.77
		1 500.00	67.46			1 500.00	59.59			1 500.00	38.77

和无水乙醇 5 μL,空白组为不含检测缓冲液的 FRAP 工作液[体积不足部分使用 2,4,6-三吡啶基-S-三嗪(TPTZ)溶液稀释液补足]180 μL 和供试品溶液 5 μL。点样完毕后,于 37 ℃ 孵育 5 min,在 593 nm 处测定 A,重复测量 3 次,取平均值。以 FeSO₄ 为标准物质,质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.2935C - 0.0251 (R^2 = 0.9948)$,样品的总抗氧化能力由相同吸光值对应的 FeSO₄ 摩尔浓度来表示。当提取物质量浓度 1 500 mg·L⁻¹ 时,对应的 FeSO₄ 摩尔浓度见表 1,说明功能叶中各提取物的还原能力顺利为 95% 乙醇提取物 > 50% 乙醇提取物 > 水提物,嫩叶中则为 50% 乙醇提取物 > 95% 乙醇提取物 > 水提物,而嫩茎中水提物最强,50% 乙醇提取物和 95% 乙醇提取物还原能力接近。

2.3 不同部位提取物对酪氨酸酶抑制活性^[11] 选择熊果苷为阳性参照物。将提取物配成 1 000.00 mg·L⁻¹ 的供试品溶液(含 50% DMSO)。将酪氨酸酶 25 KU 溶于 0.05 mol·L⁻¹ 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(PBS)中,定容至 100 mL,得 250 U·mL⁻¹ 的酪氨酸酶溶液。准确称取适量酪氨酸,溶于 0.05 mol·L⁻¹ PBS

中,配成 100.00 mg·L⁻¹ 的酪氨酸溶液。按表 3 进行点样,每个反应孔中反应物总体积 200 μL。点样完毕后,于 37 ℃ 孵育 30 min,在 475 nm 处测定 A (n=3),按抑制率 = $[(A_1 - A_2)/(A_3 - A_4)] \times 100\%$ 计算,A₁,A₂,A₃,A₄ 分别表示有底物但无测试物、既无底物也无测试物、有底物和测试物、有测试物但无底物时的吸光度。考察艾纳香各部位不同溶剂提取物及熊果苷质量浓度均为 1 000 mg·L⁻¹ 时对酪氨酸酶的抑制效果,见表 4,结果熊果苷的抑制率 80.82%,功能叶的水、50% 乙醇及 95% 乙醇提取物的抑制率分别为 24.24%,32.79%,37.97%,嫩叶不同提取物的抑制率分别为 27.12%,36.53%,34.19%,嫩茎的则依次为 31.36%,26.22%,24.00%。

表 3 酪氨酸酶抑制实验待测液及组成

测量 指标	反应物体积				总体积
	提取物溶液	PBS	酪氨酸溶液	酪氨酸酶溶液	
A ₁	-	120	40	40	200
A ₂	-	160	40	-	200
A ₃	40	80	40	40	200
A ₄	40	120	40	-	200

3 讨论

天然抗氧化成分极性各异,采取单一极性的溶剂进行提取,对提取物的抗氧化活性评价不够全面,根据“相似相容”原理,本文采用水、50%乙醇、95%乙醇3种不同极性系统对艾纳香不同部位进行提取,通过DPPH, ABTS, FRAP法对提取物进行总体抗氧化评价。结果发现艾纳香不同部位提取物对DPPH自由基均具有良好的清除作用,其中95%乙醇提取物效果最为显著;ABTS和FRAP法的试验结果显示艾纳香功能叶和嫩叶中50%乙醇提取物和95%乙醇提取物的抗氧化能力均大于水提取物,嫩茎部分水提物的活性均大于乙醇提取物;提示艾纳香提取物具有较好的抗氧化活性,对脂溶性、水脂溶性自由基均具有清除作用,其中对脂溶性自由基的效果尤为显著。

艾纳香不同部位提物对酪氨酸酶均有一定的抑制作用,其中艾纳香功能叶、嫩叶的50%乙醇和95%乙醇的提取物对酪氨酸酶的抑制作用均大于水提取物,而嫩茎部分水提物的抑制效果均大于2种乙醇提取物,提示艾纳香中可能存在黄酮类以外的有效物质。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志. 第75卷[M]. 北京:科学出版社,1988:19.
[2] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:223.
[3] Saewan N, Koysoomboon S, Chantrapromma K, et al. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC[J]. J Med Plants Res, 2011, 5(6):1018.
[4] Fazilatun N, Normisah M, Zhari I, et al. Superoxide

radical scavenging properties of extracts and flavonoids isolated from the leaves of *Blumea balsamifera* [J]. Pharm Biol, 2005, 43(1):15.
[5] 周辉, 邹纯礼. 中药湿敷、苗药艾纳香油外擦治疗婴幼儿湿疹35例的疗效观察[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(2):1.
[6] 张涛, 朴艳, 赵萍, 等. 长白山区常见药用植物中常规成分的检测及其活性扫描[J]. 延边大学学报:自然科学版, 2011, 37(2):165.
[7] Peter C W, Aisling M, Lisa R, et al. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods [J]. Food Res Int, 2011, 44(1):217.
[8] 张伟, 李昌勤, 刘瑜新, 等. 酸模叶蓼抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):228.
[9] Lou H Q, Hu Y, Zhang L Y, et al. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values [J]. LWT-Food Sci Technol, 2012, 47(1):19.
[10] Müller L, Fröhlich K, Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay [J]. Food Chem, 2011, 129(1):139.
[11] 陈良华, 刘轩, 明艳林, 等. 叶下珠提取物对酪氨酸酶的抑制和抗氧化作用[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2012, 51(3):410.

[责任编辑 刘德文]

欢迎投稿

欢迎订阅