

## 高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响

张伟, 尹震花, 彭涛, 康文艺\*  
(黄河科技学院, 郑州 450063)

**[摘要]** 目的:研究高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响。方法:采用体外酪氨酸酶多巴速率氧化微量法,测定高温处理补骨脂后对酪氨酸酶活性的影响。结果:除低浓度和 30 min 中浓度外,同一浓度和高温处理时间下,随着温度的升高,对酪氨酸酶的激活率逐渐增大;同一浓度和温度下,随着高温处理时间的增大,对酪氨酸酶的激活率未呈现规律性的增强或减弱的趋势,其中,在  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 40 min 和 20 min 对酪氨酸酶的激活率最高,分别为  $135.45\% \pm 4.29\%$  和  $106.97\% \pm 3.21\%$ 。结论:控制合适的高温处理时间和温度可以增强补骨脂浸膏对酪氨酸酶的激活活性。

**[关键词]** 补骨脂; 高温处理; 酪氨酸酶;

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0071-03

**[doi]** 10.11653/syfyj2014030071

## Effect of High-temperature Heat Treatment of *Psoralea corylifolia* on the Activity of Tyrosinase

ZHANG Wei, YIN Zhen-hua, PENG Tao, KANG Wen-yi\*  
(Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of high-temperature heat treatment of *Psoralea corylifolia* on the activity of tyrosinase. **Method:** The activity of tyrosinase was detected by measuring the oxidation rate of *L*-DOPA *in vitro*. **Result:** In addition to the low concentration and median concentration in the 30 min, in the same concentration and high-temperature heat time, the higher the temperature was more, the stronger the activation rate on tyrosinase would be. In the same concentration and temperature, the activation rate was not regularly increased or decreased with the increase of heating time. When the mass concentration was  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and heated treatment 40 min and 20 min at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , the activation rate on tyrosinase was the highest,  $135.45\% \pm 4.29\%$  and  $106.97\% \pm 3.21\%$  respectively. **Conclusion:** By controlling appropriate temperature and time, *P. corylifolia* could enhance the activation of tyrosinase activity.

**[Key words]** *Psoralea corylifolia* Linn.; high-temperature heat treatment; tyrosinase

补骨脂为豆科植物补骨脂的果实,味辛、苦、性温,归肾、脾经;具有补肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明,补骨脂含有抑制  $\alpha$ -葡

萄糖苷酶、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、治疗白癜风、保肝等作用<sup>[2-5]</sup>,含有黄酮类、香豆素类、脂肪酸类和单萜酚类等多种化学成分<sup>[6]</sup>。

氨酸酶(Tyrosinase, TYR)是一种含铜的氧化还原酶,广泛存在于生物体中。TYR 是皮肤黑素生物合成的主要限速酶,其活性与黑素合成量呈正相关,调节 TYR 的活力即可控制黑素生成量。TYR 活性过低致使色素减少,会导致色素脱失性疾病的发生如白癜风、白发病,激活酪氨酸酶和加速黑色素生成的药物可以提高这些疾病的治疗效果。传统医学用含呋喃香豆素类药物治疗白癜风的历史悠久,长期的临床实践证明含呋喃香豆素类药物对白癜风的

**[收稿日期]** 20130627(004)

**[基金项目]** 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13B360981);河南省科技厅重点攻关项目(132102310261)

**[第一作者]** 张伟,硕士,副教授,从事中药活性成分研究, Tel: 0371-66607902, E-mail: zzzwwwqq@126.com

**[通讯作者]** \*康文艺,博士,教授,从事中药活性成分及新药研究, Tel: 0378-3880680, E-mail: kangweny@hotmail.com

治疗效果明显<sup>[7]</sup>,而且补骨脂呋喃香豆素类成分补骨脂素和异补骨脂素具有光敏性作用,这是补骨脂用于治疗白癜风的主要依据<sup>[8]</sup>。目前关于补骨脂对酪氨酸酶的影响已有报道,如熊丽丹和李利<sup>[9]</sup>研究发现补骨脂在低浓度对酪氨酸酶具激活作用,在高浓度对酪氨酸酶具抑制作用。随浓度的增加,对酪氨酸酶激活作用逐渐降低,当浓度达4 g·L<sup>-1</sup>时表现出抑制作用。未见其高温处理对酪氨酸酶影响的报道。

目前补骨脂注射液光化学疗法已成为治疗白癜风最有效的疗法。其机制有可能是补骨脂中的有效成分通过提高酪氨酸酶的活性,促进皮损处的黑色素细胞形成。依据补骨脂注射液的生产工艺,作者针对 100 ℃ 或 121 ℃ 处理不同时间对补骨脂的影响,从药材入手,了解高温处理下药材中成分前后变化对酪氨酸酶的影响,考察高温处理中的物质基础变化,为补骨脂注射液的再评价提供理论基础。

### 1 材料

LRH-150 型生化培养箱(上海一恒科技有限公司),MultiskanMK3 型酶标仪(美国 Thermo Electron 公司),DELTA 320 型 pH 计(美国 Mettler-Toledo 公司),AL104 型电子天平(美国 Mettler-Toledo 公司),旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

左旋多巴 [L-3-(3,4-Dihydroxyphenyl) alanine, Alfa Aesar, 10102261], 酪氨酸酶 (Tyrosinase, Worthingto Biochemical Corporation, 32M13706); 8-甲氧基补骨脂素(成都瑞芬思生物科技有限公司, H-035-130627), 二甲基亚砜 (DMSO, 天津市富宇精细化工有限公司), 双蒸水。

补骨脂药材购于开封乐仁堂总店,经河南大学药学院李昌勤副教授(河南大学药学院生药教研室)鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实。

### 2 方法

**2.1 补骨脂浸膏的提取及高温处理** 补骨脂,粉碎,用 95% 乙醇渗漉 24 h,渗漉液浓缩,得补骨脂 95% 乙醇浸膏。称取一定量的浸膏,分别于 100, 121 ℃ 高温处理 10, 20, 30, 40 min,每份样品 3 个平行。

### 2.2 酪氨酸酶激活活性筛选

**2.2.1 酪氨酸酶活力的测定** 参考文献[10],并略作调整,45 μL 磷酸缓冲液 (pH 6.8), 5 μL DMSO, 25 μL 0.2 U·mL<sup>-1</sup> 的酪氨酸酶水溶液,

30 ℃ 温育 10 min 后加入 0.5 g·L<sup>-1</sup> 左旋多巴溶液 25 μL,振荡均匀,30 ℃ 反应 5 min,用酶标仪在 492 nm 下测吸光度。

**2.2.2 检测方法** 样品用 DMSO 配成质量浓度为 40 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,震荡超声至溶解或分散均匀,储存于 4 ℃ 冰箱中备用。用时用 DMSO 稀释成相应的浓度,用于酶活性的测定。

根据采用的反应体系,45 μL 磷酸缓冲液 (pH 6.8), 5 μL 样品, 25 μL 0.2 U·mL<sup>-1</sup> 的酪氨酸酶水溶液, 30 ℃ 温育 10 min 后加入 0.5 g·L<sup>-1</sup> 左旋多巴溶液 25 μL,振荡均匀,30 ℃ 反应 5 min,用酶标仪在 492 nm 下测吸光度。同时做相同体系下不加酶的样品空白组、不加样品的空白对照组以及 8-甲氧基补骨脂素为激活剂的阳性对照组。

$$\text{酪氨酸酶激活率} = \frac{A_{\text{样品+底物+酶}} - A_{\text{样品+底物}} / A_{\text{DMSO+底物+酶}} - A_{\text{DMSO+底物}}}{-1} \times 100\%$$

### 3 结果

采用体外酪氨酸酶多巴速率氧化微量法测定补骨脂高温处理后对酪氨酸酶的影响,结果见表 1。表 1 显示,补骨脂高温处理后,随着浓度的增大,对酪氨酸酶的激活率逐渐增大。与阳性对照 8-甲氧基补骨脂素相比,补骨脂浸膏高中浓度对酪氨酸酶的激活率均低于阳性对照;100 ℃ 时,高中浓度对酪氨酸酶的激活率均低于阳性对照,低浓度高于阳性对照,同一浓度下,高温处理 20 min 对酪氨酸酶的激活率均低于 10, 20, 40 min; 121 ℃ 时,中浓度对酪氨酸酶的激活率均低于阳性对照,在高浓度时,40, 20 min 对酪氨酸酶的激活率均高于阳性对照,10, 30 min 低于阳性对照;补骨脂高温处理 40 min,高中低浓度下,对酪氨酸酶的激活率均强于补骨脂浸膏。

表 1 补骨脂高温处理对体外酪氨酸酶活性的激活率(̄x ± s) %

温度 /℃	t /min	终浓度/g·L <sup>-1</sup>		
		2	1	0.25
100	10	48.14 ± 1.86	47.09 ± 0.22	19.21 ± 6.47
	20	37.33 ± 8.04	32.49 ± 0.32	12.46 ± 0.22
	30	81.56 ± 5.01	75.67 ± 2.80	19.10 ± 8.41
	40	85.55 ± 9.45	43.40 ± 2.65	14.53 ± 0.45
121	10	62.17 ± 14.93	47.09 ± 2.04	6.81 ± 1.41
	20	106.97 ± 3.21	35.72 ± 11.94	-14.70 ± 4.50
	30	78.71 ± 7.61	16.06 ± 2.36	-15.58 ± 2.96
	40	135.45 ± 4.29	64.85 ± 3.64	4.85 ± 0.64
补骨脂浸膏		85.39 ± 0.18	50.00 ± 0.27	-4.83 ± 0.36
8-甲氧基补骨脂素		92.68 ± 0.78	84.55 ± 0.62	-6.37 ± 0.70

注:8-甲氧基补骨脂素为阳性对照。

### 4 讨论

目前关于补骨脂对酪氨酸酶的激活作用已有报

道,除丁翔云采用酶标仪在 492 nm 测定酪氨酸酶与左旋多巴作用后生成多巴红的吸光度,结果显示,补骨脂乙醇提取物在质量浓度为 100,50,10 g·L<sup>-1</sup> 下对酪氨酸酶的激活率分别为 65.5% ± 20.2%, 76.4% ± 25.2%, 171.5% ± 18.2%, 随着浓度的增加,激活率不断降低<sup>[10]</sup>,大部分采用紫外分光光度仪在 475 nm 测定生成多巴红的吸光度,如雷铁池等<sup>[11]</sup>研究表明,补骨脂乙醇提取物在生药终浓度为 100,50,10 g·L<sup>-1</sup> 下对酪氨酸酶的激活率分别为 42.2% ± 23.4%, 63.4% ± 30.7%, 157.1% ± 20.8%。而本研究的结果表明,补骨脂浸膏在终浓度为 2,1,0.25 g·L<sup>-1</sup> 下对酪氨酸酶的激活率分别为 85.39% ± 0.18%, 50.00% ± 0.27%, -4.83% ± 0.36%, 这可能与补骨脂药材提取的方法、测定的实验方法不同有关。

补骨脂中具有多种成分,但其主要成分为香豆素类,具有水蒸汽蒸馏和易氧化的性质。呋喃香豆素类有高温升华的性质,并且香豆素类主要存在果皮最外层,因此补骨脂经高温处理后,成分会发生质和量的变化<sup>[12]</sup>。郭晏华等<sup>[13]</sup>报道雷公法炮制使补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素含量增加;艳夕等<sup>[14]</sup>采用 HPLC 测定了补骨脂不同炮制品中补骨脂素和异补骨脂素的含量,加热或加辅料炮制后的补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素 2 种成分的含量均比生品高;而且补骨脂用乙醇提取,可以提高香豆素类化合物的溶出度。本文选用 95% 乙醇渗漉提取,有利于有效成分的溶出,进行高温处理有利于香豆素类成分含量的增加。高温处理可能会增大补骨脂对酪氨酸酶的激活率。实验结果表明,除低浓度和 30 min 中浓度外,同一浓度和高温处理时间下,随着温度的升高,对酪氨酸酶的激活率逐渐增大,这可能是高温处理过程使化学成分发生了变化。但是,同一温度下,随着高温处理时间的增大,同一浓度下对酪氨酸酶的激活率未呈现规律性的增强或减弱的趋势,这可能与不同高温处理时间补骨脂中化学成分种类不同有关,因此,有待通过高效液相研究补骨脂在高温处理后化学成分的种类和含量变化。

考查文献报道,一些中药进行过活性成分分析,除了补骨脂和独活中含有补骨脂素外,其他并未含有补骨脂素化合物。因此,在对酪氨酸酶有激活作用的中药提取物中一定含有除补骨脂素以外的其他有激活作用的成分,如咖啡酸和阿魏酸对酪氨酸酶

具有上调激活作用<sup>[15]</sup>。为了进一步研究补骨脂高温处理后对酪氨酸酶的活性变化,有待研究补骨脂在高温处理前后化学成分的变化。

## [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 11 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999:3348.
- [2] 郭秀芝, 刘卫萍, 杨杰. 补骨脂的药理活性及其开发利用[J]. 中医药学报, 2005, 33(5):52.
- [3] Kamboj J, Sharma S, Kumar S. *In vivo* anti-diabetic and anti-oxidant potential of *Psoralea corylifolia* seeds in streptozotocin induced Type-2 diabetic rats[J]. J Health Sci, 2011, 57(3):225.
- [4] 张伟, 尹震花, 彭涛, 等. 补骨脂生品及炮制品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):24.
- [5] 李昌勤, 赵琳, 康文艺. 补骨脂生品及炮制品体外抑菌活性研究[J]. 中成药, 2012, 34(1):109.
- [6] 吉力, 徐植灵. 补骨脂化学成分的综述[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(2):120.
- [7] 熊友健, 杨玉明, 姜松, 等. 呋喃香豆素类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2010, 32(10):1764.
- [8] 罗艺晨, 刘娟, 朱兆荣. 中药补骨脂的研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2007(5):49.
- [9] 熊丽丹, 李利. 地瓜藤提取物对酪氨酸酶的激活作用[J]. 中国现代中药, 2012, 14(3):25.
- [10] 丁翔云. 对酪氨酸酶活性有激活作用的中药的筛选 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [11] 雷铁池, 朱文元, 夏明玉, 等. 89 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性的上调作用[J]. 临床皮肤科杂志, 1999, 28(3):147.
- [12] 姚三桃, 杨滨. 中药补骨脂炮制沿革的研究[J]. 基层中药杂志, 1996, 10(1):17.
- [13] 郭晏华, 罗志冬, 贾天柱. 补骨脂炮制前后化学成分的变化[J]. 中药材, 2006, 29(11):1142.
- [14] 艳夕, 谭志静, 俞浩, 等. 不同炮制方法对补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素含量的影响[J]. 中药材, 2010, 33(7):1062.
- [15] 闫军, 李昌生, 陈声利, 等. 咖啡酸、阿魏酸和香草酸对酪氨酸酶活性的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(3):337.

[责任编辑 顾雪竹]