

· 中药工业 ·

白芷 白术 白附子提取物对酪氨酸酶抑制作用的比较[△]

陈革豫¹, 朱周静¹, 田航周¹, 刘思雨¹, 康翰林¹, 王琪玉¹, 王征^{2*}

1. 陕西国际商贸学院/陕西省中药绿色制造技术协同创新中心, 陕西 咸阳 712046;
2. 陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

[摘要] **目的:** 对白芷、白术、白附子水提物和醇提物对酪氨酸酶的抑制作用进行比较。**方法:** 应用酪氨酸酶活性抑制实验, 通过测定加入中药提取物前后对生成多巴醌的影响来评估中药提取物对酪氨酸酶的抑制作用, 从而对中药提取物的美白活性进行比较和评估。**结果:** 以此方法比较了白芷、白术、白附子3种中药水提液和醇提液对酪氨酸酶的抑制作用。其中, 白芷提取物对酪氨酸酶的抑制作用比白术和白附子强, 白芷醇提液对酪氨酸酶的抑制率达30.77%, 白芷水提液对酪氨酸酶的抑制率达20.40%, 白术醇提液对酪氨酸酶的抑制率达14.71%, 白术水提液对酪氨酸酶的抑制率达8.69%; 白附子醇提液对酪氨酸酶的抑制率达8.36%, 白附子水提液对酪氨酸酶的抑制率达3.34%。**结论:** 为进一步揭示中药提取物美白活性成分的物质基础提供了参考。

[关键词] 白芷; 白术; 白附子; 美白; 酪氨酸酶

[中图分类号] R282.71; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-2068-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191128001

Comparative Study on the Inhibitory Effect of Angelicae Dahuricae Radix, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and Typhonii Rhizoma Extract on Tyrosinase

CHEN Ge-yu¹, ZHU Zhou-jing¹, TIAN Hang-zhou¹, LIU Si-yu¹, KANG Han-lin¹,
WANG Qi-yu¹, WANG Zheng^{2*}

1. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce/Shaanxi Collaborative Innovation Center for Green Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine, Xiayang 712046, China;
2. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Xiayang 712083, China

[Abstract] **Objective:** To compare the inhibition of tyrosinase by water extract and alcohol extract of Angelicae Dahuricae Radix, Atractylodes Macrocephalae Rhizoma and Typhonii Rhizoma. **Methods:** Their human skin whitening activity was assessed by tyrosinase inhibition test. The inhibitory effect of Chinese medicine extract on the production of dopoquinone was evaluated by measuring the effect of dopoquinone before and after adding Chinese medicine extract. **Results:** This method was used to compare the inhibitory effects of three Chinese medicine water extracts and alcohol extracts on tyrosinase. Among them, the inhibitory effect of Angelicae Dahuricae Radix extract on tyrosinase was higher than that of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and Typhonii Rhizoma. The inhibitory rate of alcohol extract of Angelicae Dahuricae Radix on tyrosinase was 30.77% and the inhibitory rate of water extract of Angelicae Dahuricae Radix on tyrosinase was 20.40%. The inhibition rate of alcohol extract of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on tyrosinase was 14.71% and the inhibition rate of water extract of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on tyrosinase was 8.69%. The inhibition rate of alcohol extract of Typhonii Rhizoma on tyrosinase was 8.36% and the inhibition rate of water extract of Typhonii Rhizoma on tyrosinase was

[△] **[基金项目]** 陕西省教育厅科研计划项目(19JK0097); 陕西国际商贸学院校级项目(SMXY201911); 陕西省大学生创新创业项目(S201913123026); 陕西高校青年科技创新团队项目(陕教〔2019〕90号)

* **[通信作者]** 王征, 副教授, 研究方向: 中药活性物质基础的发现与活性评价; Tel: (029)38182201, E-mail: wazh0405@126.com

3.34%。 **Conclusion:** The study provides a reference for revealing the material basis of whitening active ingredients of traditional Chinese medicine extracts.

[**Keywords**] Angelicae Dahuricae Radix; Atractylodes Macrocephalae Rhizoma; Typhonii Rhizoma; whitening; tyrosinase

“美容美白”是每个时代亘古不变的话题，尤其在当下，寻找中药美白活性成分，开发毒副作用较小且美白功效明确的美白产品逐渐成为中药美白的研究热点^[1-7]。于静等^[1]经翻阅古籍并查阅了104部中医中药著作，共查出用于美白的外用古方119个，白芷是历代医家喜用的美白中药之一，但这些美容方剂的现代应用颇少，究其原因，主要是其美白机制尚不清楚，具体的美白活性成分尚不明确，另外，这些美白中药中部分毒性成分的存在阻碍了其在化妆品中的应用^[8]。酪氨酸酶是黑色素生成的关键酶，近年来，对于酪氨酸酶抑制剂的研究也较为多见^[2,4]，其对延缓褐变和抑制黑色素形成具有重大意义^[9-10]。基于此，本研究选取了白芷、白术、白附子3种出现频次较高的中药，比较了其酪氨酸酶的抑制作用，试图追踪中药美白活性成分，以揭示中药美白的作用机制以及物质基础。

1 方法原理

在一定条件下，L-多巴能在酪氨酸酶的作用下生成多巴醌，该物质在475 nm处有最大吸收峰，而底物L-多巴和酪氨酸酶吸收较小。若将中药提取物加入其中，如果中药提取物能够抑制酪氨酸酶的活性，势必会影响多巴醌的生成。测定加入中药提取物前后多巴醌的生成情况，就可以判定中药提取物对酪氨酸酶的抑制作用强弱。多巴醌生成减少越多，说明中药提取物对酪氨酸酶的抑制作用越强，这样可以比较中药提取物对酪氨酸酶的抑制作用。对酪氨酸酶抑制作用强的中药就可能作为美白的关键中药。以此为指引进一步分析就可以追踪到中药美白的活性成分。

2 材料

2.1 仪器

UV-2600型紫外-可见分光光度计[龙尼柯(上海)仪器有限公司]; GT10-1型高速台式离心机、DT5-2型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

2.2 试药

L-多巴(上海源叶生物科技有限公司, 纯度: 99%); 磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司); 磷酸氢二钠(天津市河东区红岩试剂厂); 所用试剂均为分析纯; 水为二次蒸馏水。

药材购买于北京同仁堂西安西大街分店, 经陕西国际商贸学院医药学院雷国莲教授鉴定均为正品药材(符合《中华人民共和国药典》2015年版规定)。白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 产地四川; 白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 产地浙江; 白附子 *Typhonium giganteum* Engl. 产地河南。所有药材先用蒸馏水洗去尘土, 80 °C烘干6 h备用。

3 方法与结果

3.1 中药提取物的制备

各中药提取物中浸出物含量应符合《中华人民共和国药典》2015年版中的相关规定。

3.1.1 中药水提液的制备 准确称取各中药10.00 g, 加水150 mL, 浸泡30 min, 大火煎煮至沸, 改用文火微沸30 min, 用4层纱布滤过, 得滤液。滤渣再加水100 mL, 煎煮2次, 每次20 min, 合并3次滤液。浓缩至约50 mL, 静置, 次日8000 r·min⁻¹高速离心(离心半径为10 cm)30 min, 取上清液定容于50 mL的量瓶中, 制成相当于生药0.2 g·mL⁻¹的溶液待用, 用时稀释10倍, 相当于生药0.02 g·mL⁻¹。

3.1.2 中药醇提液的制备 准确称取各中药10.00 g, 加入适量70%的乙醇, 50 °C超声1 h, 趁热滤过, 取滤液, 倒入量筒中, 量取体积, 加入3倍量的无水乙醇, 沉淀24 h。然后将提取物放入离心机4500 r·min⁻¹(离心半径为16 cm)离心30 min, 取上清液, 放入旋转蒸发仪中, 50 °C蒸至无醇味, 定容至50 mL量瓶中, 制成相当于生药0.2 g·mL⁻¹的溶液待用, 用时稀释10倍, 相当于生药0.02 g·mL⁻¹。

3.2 L-多巴的制备

精密称取L-多巴0.148 g, 加入pH 6.8的磷酸盐缓冲液(PBS)定容至100 mL, 备用。分别取上述配制好的L-多巴1、2、3、4、5、6 mL定容至10 mL

量瓶中, 备用。

3.3 酪氨酸酶的制备

参照文献 [3] 方法, 进行酪氨酸酶的制备。新鲜土豆去皮, 洗净, 切块, 称取土豆 10 g, 待用。研钵洗净, 取 pH 6.8 的 PBS 10 mL, 全部放入冰箱中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 30 min, 取出, 将冷冻好的土豆和冷冻过的 PBS 放在一起, 捣碎, 于离心机中 $4500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径为 16 cm) 离心 10 min, 取上清液, 定容至 100 mL 量瓶中, 即得酪氨酸酶溶液, 现配现用。

3.4 吸收波长的考察

精密量取 pH 6.8 的 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 1 mL、酪氨酸酶溶液 1 mL 于试管中, 常温反应 40 min, 得反应液, 对该反应液、*L*-多巴及酪氨酸酶溶液这 3 种溶液进行全波长扫描, 测定吸光度(A)。结果见图 1。在本实验条件下, *L*-多巴和酪氨酸酶反应后在 475 nm 处有最大吸收峰, 而此时 *L*-多巴和酪氨酸酶本身的吸收均较小, 故选择 475 nm 为检测波长。

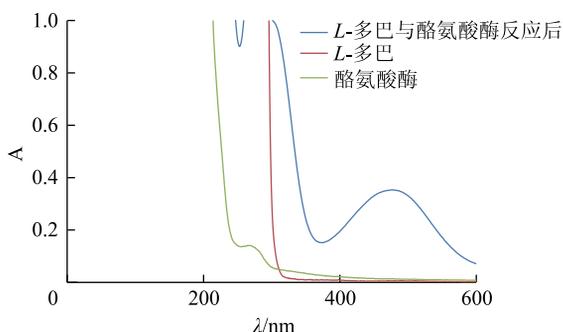


图1 *L*-多巴、酪氨酸酶反应前后的紫外吸收光谱

3.5 反应时间的考察

精密量取 pH 6.8 的 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 1 mL、酪氨酸酶溶液 1 mL 于试管中, 考察反应不同时间(10、20、30、40、50、60 min), 反应物在 475 nm 处的 A, 结果见图 2。表明当反应时间为 40 min 时, A 最大, 故选择常温反应 40 min。

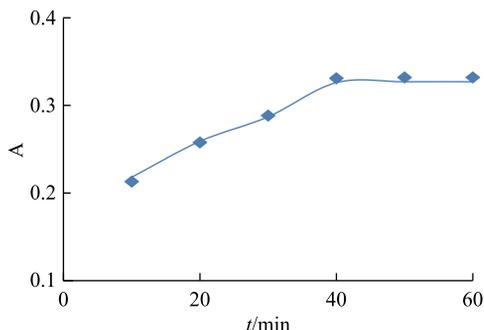


图2 酪氨酸酶催化氧化 *L*-多巴反应时间的考察

3.6 精密度试验

精密吸取 pH 6.8 的 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 1 mL、酪氨酸酶溶液 1 mL 于试管中, 按照实验方法进行测定, 分别测量 6 次, 记录 A, 其 RSD 为 0.42%, 表明该方法的精密度良好。

3.7 重复性试验

精密吸取 6 份同质量浓度的白芷水提液 1 mL, 按 3.4 项下的方法操作, 分别记录其 3、4 组的 A, 其 RSD 分别为 0.68%、1.53%, 表明该方法重复性良好。

3.8 线性关系的考察

精密吸取 pH 6.8 的 PBS 缓冲液 1 mL, 不同浓度的 *L*-多巴溶液 1 mL、纯化水 1 mL、酪氨酸酶溶液 1 mL 于试管中, 用紫外分光光度法在 475 nm 下测定 A, 以 *L*-多巴溶液的浓度为横坐标 X, A 为纵坐标 Y 绘制标准曲线。在试验条件下, *L*-多巴溶液浓度为 $0.75\sim 4.51\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时符合比尔定律, 线性回归方程为 $Y=0.1179X+0.271$, $r=0.9993$ 。

3.9 白芷、白术、白附子 3 种中药提取物对酪氨酸酶抑制作用的比较

如表 1 所示, 精密量取 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 1 mL、酪氨酸酶 1 mL 于试管中, 常温下反应 40 min, 于 475 nm 处测吸收值, 记为 A_1 。 A_1 值即为在本实验方法下加入中药提取液之前 *L*-多巴在酪氨酸酶的作用下反应后所得产物的吸收值。精密量取 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 2 mL 于试管中, 常温下反应 40 min, 于 475 nm 处测吸收值, 记为 A_2 。 A_2 值即为在本实验方法下 *L*-多巴和酪氨酸酶反应前可能产生的吸收值。精密量取 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、中药提取液 1 mL、酪氨酸酶 1 mL 于试管中, 常温下反应 40 min, 于 475 nm 处测吸收值, 记为 A_3 。 A_3 值即为在本实验方法下加入中药提取液之后 *L*-多巴在酪氨酸酶的作用下反应后所得产物的吸收值。精密量取 PBS 1 mL、*L*-多巴 1 mL、纯化水 1 mL、中药提取液 1 mL 于试管中, 常温下反应 40 min, 于 475 nm 处测吸收值, 记为 A_4 。 A_4 值即为在本实验方法下加入中药提取液之后但未加酪氨酸酶时可能产生的吸收值。按公式(1)计算中药提取液对酪氨酸酶的抑制率(IR)。

$$\text{IR} = \left[(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) \right] / (A_1 - A_2) \times 100\% \quad (1)$$

表1 酪氨酸酶活性抑制实验反应体系

组别	mL				
	PBS	L-多巴	纯化水	提取液	酪氨酸酶溶液
1	1	1	1	0	1
2	1	1	2	0	0
3	1	1	0	1	1
4	1	1	1	1	0

3.9.1 白芷、白术、白附子水提液对酪氨酸酶抑制作用的比较 按表1方法进行实验,分别对未加入中药提取液及加入白芷、白术、白附子水提液后酪氨酸酶催化L-多巴的反应产物进行全波长扫描,结果见图3。结果表明,加入白芷、白术和白附子水提液后在475 nm处的A均有所降低,其中白芷水提液加入后降低最多。

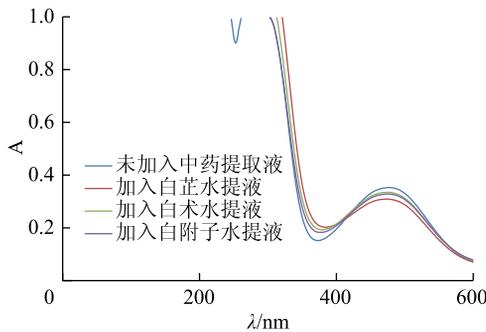


图3 加入中药水提液前后的紫外吸收光谱

3.9.2 白芷、白术、白附子醇提液对酪氨酸酶抑制作用的比较 按表1方法进行实验,分别对未加入中药提取液及加入白芷、白术、白附子醇提液后酪氨酸酶催化L-多巴的反应产物进行全波长扫描,结

果见图4。结果表明,加入白芷、白术和白附子醇提液后在475 nm处的A均有所降低,其中白芷醇提液加入后降低最多。

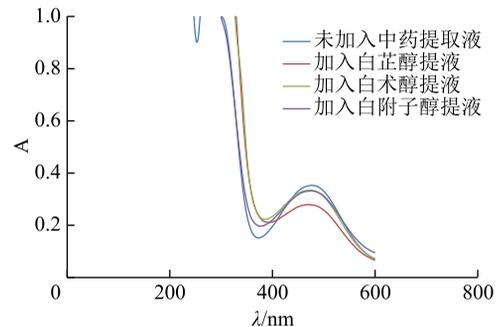


图4 加入中药醇提液前后的紫外吸收光谱

3.9.3 白芷、白术、白附子各水提液和醇提液对酪氨酸酶抑制作用的比较 按表1方法分别测定了加入白芷、白术、白附子水提液和白芷、白术、白附子醇提液前后酪氨酸酶催化L-多巴的反应产物在475 nm处的A,结果见表2。

4 讨论与展望

本研究就历代医家喜用的美白中药白芷、白术、白附子在同一实验方法下测定了其各自水提液和醇提液对酪氨酸酶的抑制作用,结果表明,白芷对酪氨酸酶的抑制作用的确是这三者中最高的。该研究方法简单易行,可以对比多种中药提取物对酪氨酸酶的抑制作用,从而筛选出可能具有美白作用的中药,进一步分离可以追踪到活性较好、安全性较高的天然美白活性成分,为中药美容美白的研究提供了参考。

表2 各中药提取液对酪氨酸酶的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=5$)

样品	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	IR/%
白芷水提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.308 8 ± 0.000 4	0.031 6 ± 0.000 5	20.40
白芷醇提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.279 1 ± 0.000 9	0.038 1 ± 0.000 2	30.77
白术水提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.335 2 ± 0.000 4	0.017 3 ± 0.000 2	8.69
白术醇提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.334 3 ± 0.000 2	0.037 3 ± 0.000 2	14.71
白附子水提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.339 1 ± 0.000 3	0.002 5 ± 0.000 3	3.34
白附子醇提液	0.353 8 ± 0.000 4	0.005 6 ± 0.000 2	0.332 6 ± 0.000 4	0.013 5 ± 0.000 3	8.36

参考文献

[1] 于静,朱艳华. 中药白芷在古方中美白作用的应用概述[J]. 黑龙江医药,2014,27(1):156-158.
 [2] 胡泳华,贾玉龙,陈清西. 酪氨酸酶抑制剂的应用研究进

展[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2016,55(5):760-768.
 [3] 陈颖,孙建菊. 白芷与薏苡仁美白面膜制备[J]. 商洛学院学报,2017,31(6):64-68.

(下转第2079页)

药量和粒径结果的二项式拟合结果均具有显著性差异,经优化后得到基质的最佳配比;预测模型和验证实验的结果基本一致,保证了该制备工艺稳定可行,沙棘籽油微乳的含量测定方法线性、稳定性和加样回收率结果的RSD均小于3%,表明此方法稳定性良好,可用于维生素E的含量测定。综上,本研究制备得沙棘籽油微乳工艺过程较为简单、稳定可靠,能够改善沙棘籽油溶解度较低的问题,增加其生物利用度,具有较高的临床应用价值,为沙棘的综合开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 刘鑫,朱丹,牛广财,等.超声波-微波协同萃取沙棘籽油工艺优化[J].包装工程,2019,40(5):34-44.
- [2] 朱彦蓉,陈洁,刘建明,等.沙棘籽油提取工艺的优化及体外抗氧化试验[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(14):8-10.
- [3] 魏文慧,于长青,张晓雪,等.超临界萃取沙棘籽油及脂肪酸组成研究[J].现代食品,2019(8):160-165.
- [4] 彭琪,黄瑞娟,李燕峰,等.气相色谱质谱法测定沙棘籽油中的塑化剂DBP含量[J].中国检验检疫,2018,26(5):9-11,39.
- [5] 郑满荣,吕晓玲,王建新,等.3种沙棘油的主要成分及抗氧化能力比较[J].食品研究与开发,2018,39(8):24-29.
- [6] 李晓红,黄瑜,于佳丽.亚临界法萃取沙棘籽油的工艺研究[J].山东工业技术,2017(19):283.
- [7] 李蔚,王春洪.自微乳及其在中药制剂中的应用[J].中国药业,2012,21(6):94-96.
- [8] 龙凯花,王春柳,李晔,等.Box-Behnken响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺[J].中国药房,2018,29(24):3372-3375.
- [9] 魏红,魏昱,袁超,等.微乳技术在中药领域中的应用[J].中国中药杂志,2008,33(19):2287-2290.
- [10] 吴顺芹,李三鸣,赵国斌.微乳及其在药剂学中的应用[J].沈阳药科大学学报,2003,20(5):381-385.
- [11] 孟少华,宫照斌,顾文清,等.水代法提取沙棘籽油的工艺研究[J].食品科技,2013,38(2):163-166.
- [12] 刘怀永.沙棘籽油软胶囊功效成分分析及增强免疫功能研究[D].福州:福建医科大学,2014.
- [13] 崔亚娟,徐响,高彦祥.高效液相色谱法检测沙棘籽油中VE含量[J].食品科技,2007(7):208-212.
- [14] 刘伟,张莹莹,周文杰,等.复方彻清膏微乳的制备及稳定性研究[J].中草药,2018,49(14):3252-3260.
- [15] 孙林芳,郑广娟,冯兵,等.白术挥发油微乳的制备[J].中成药,2015,37(4):889-895.
- [16] 李华妮,郑连营,葛文静,等.正交试验、响应面法优化加味三根汤的提取工艺比较[J].中国现代中药,2019,21(8):1089-1093.
- [17] 魏秀芳.黄芩苷眼用微乳制剂的制备及其性质评价[D].广州:广州中医药大学,2016.
- [18] 仲粒,李小芳,廖艳梅,等.甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价[J].中草药,2019,50(13):3044-3051.
- [4] 何徽,王建芬,杜玉菲,等.基于酪氨酸酶抑制活性的八白散组方研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):1009-1011.
- [5] 陶丽莉,刘洋,吴金昊,等.化妆品美白功效评价方法研究进展[J].日用化学工业,2015,38(3):15-21.
- [6] 官兴丽,罗理勇,曾亮.天然产物的美白作用及其机理研究进展[J].食品工业科技,2011,32(5):432-435,439.
- [7] 童仁东.新八白散的研究开发[D].昆明:云南中医药大学,2017.
- [8] 谢惠英,陈保华,张金涛.几种植物提取物在化妆品中的应用现状[J].香料香精化妆品,2012,38(3):50-53.
- [9] 马姣.酪氨酸酶抑制剂的筛选及其作用机理的研究[D].郑州:郑州大学,2018.
- [10] 延永,张亦琳,李玉萌,等.白芷与茯苓美白保湿面膜的制备及性能研究[J].香料香精化妆品,2019,45(1):65-68.

(收稿日期:2019-09-16 编辑:王笑辉)

(上接第2071页)

(收稿日期:2019-11-28 编辑:王笑辉)