



蓝莓果渣提取物对酪氨酸酶的抑制作用

郭翠玲, 张 影

(吉林农业科技学院 制药工程学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:为促进蓝莓资源的综合利用,以乙醇为溶剂,超声提取,并采用紫外分光光度计对醇提液中熊果苷含量进行了测定,同时以水杨酸为阳性对照,测定了蓝莓果渣醇提液对酪氨酸酶的抑制作用。结果表明:蓝莓果渣含熊果苷 0.18%,其提取液对酪氨酸酶有抑制作用,随含量增加抑制活性增加,且抑制作用与水杨酸低剂量组相当。

关键词:蓝莓果渣;熊果苷;酪氨酸酶;抑制作用

蓝莓属杜鹃花科,越橘属植物^[1]。起源于北美,多年生灌木。果实为浆果,呈蓝色,故称为蓝莓。其果实,可直接食用,也可加工成果汁饮料、果酒饮品等产品。我国野生蓝莓主要产在长白山、大兴安岭和小兴安岭林区。蓝莓中包含大量营养成分^[2],具体有糖、酸、维生素 A、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 C、熊果苷、蛋白质、SOD、脂肪、花青苷、叶黄素以及其它果实少有的铁、锌、锰等。研究表明,蓝莓具有防止脑神经老化,减少早发性老年痴呆的发病率;降低胆固醇,防止动脉粥样硬化,增强心脏功能,治疗心血管疾病;清除自由基、延缓衰老、增强人体机能,预防癌症;消除眼睛疲劳,保护视力的作用^[3]。因此,被联合国粮农

组织列为人类五大健康食品之一。近年来,蓝莓产品形式多种多样,其中果汁产品越来越多。而随着生产量的增大,每年都会产生大量的蓝莓果渣。由于这些果渣长期以来未得到有效利用,不仅对环境造成了污染,也造成了资源的巨大浪费。

研究表明,蓝莓果渣提取液中仍含有熊果苷。熊果苷具有天然美白活性,能有效深入皮肤,在不影响细胞增殖浓度的同时,有效抑制皮肤中酪氨酸酶活性,阻断黑色素的形成,加速黑色素的分解与排泄,从而减少皮肤色素沉积,能够有效祛除色斑和雀斑,是祛斑、美白护肤品的常用添加物^[4]。本试验以蓝莓果渣为原料,经乙醇超声提取,测定醇提物中熊果苷的含量,以水杨酸^[5]为阳性对照,对醇提物抑制酪氨酸酶的活性进行评价,为蓝莓资源的综合利用,以及开发具有美白、祛斑作用的植物源化妆品奠定前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试药品有:熊果苷标准品(大连美仑生物技

收稿日期:2018-08-15

基金项目:吉林省大学生科技创新资助项目(2017066)。

第一作者简介:郭翠玲(1995-),女,在读硕士,从事药理学研究。E-mail:365144737@qq.com。

通讯作者:张影(1974-),女,博士,副教授,从事药物资源研究。E-mail:jlzhangying@163.com。

Application of Landscape Painting and Landscape Rendering Under the Revelation of 'Business Location'

CHEN Yin-ning, LU Zhong-xuan, ZHANG Peng

(Guangdong Polytechnic College, Zhaoqing 526070, China)

Abstract: Landscape painting is an important branch of the ancient Chinese painting and painting department, its important landscape forms and humanistic feelings have influenced modern landscape design techniques. This paper extracts three expression methods of 'whole and partial', 'echo and coordination', 'virtual and reality and blank white' in landscape paintings, and studies the combination of famous landscape paintings and modern landscape renderings, and distinguishes between ancient and modern three kinds of expression methods. The exploration of 'location', in order to provide some reference for the expression method of landscape rendering in the contemporary landscape design industry.

Keywords: composition theory; Chinese landscape painting; business location; landscape renderings

术有限公司)、酪氨酸酶(Sigma 公司)、L-酪氨酸(Sigma 公司)、3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA)(Sigma 公司)、乙醇、二甲基亚砜、水杨酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠均为分析纯。

供试仪器有:5100 紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司),BT25S 电子天平(德国 Sartorius 公司),RE-3000B 旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司),KQ-700V 型超声波破碎仪(济宁天华超声电子仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓果渣有效成分的提取 将蓝莓清洗干净,用榨汁机榨汁后得到蓝莓果渣,将这些果渣进行干燥,粉碎,并用 40 目筛网过筛。称取蓝莓果渣粉 10 g,按 1:20($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的料液比加入 60% 乙醇 200 mL,用超声波破碎仪辅助提取^[1]。提取条件:频率 30 kHz,超声功率 400 W,提取 40 min,抽滤,滤液浓缩,浓缩温度不高于 50℃,将提取液用二甲基亚砜定容至 25 mL,作为蓝莓果渣醇提原液备用。分别量取蓝莓果渣醇提原液 8.0、4.0、2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中用二甲基亚砜定容,得到浓度为 3.2、1.6、0.8 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为高、中、低浓度待测液备用。

1.2.2 熊果苷标准曲线的绘制 取熊果苷标准品 20 mg,60% 的乙醇溶解并于 100 mL 容量瓶中定容,制得质量浓度为 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,分别精密移取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中定容,配制 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度的标准溶液,采用紫外分光光度计在 282 nm 波长下分别测定其吸光度 A,绘制标准曲线^[6]。

1.2.3 水杨酸溶液的配制 取水杨酸固体 25 mg,用二甲基亚砜溶解并于 25 mL 容量瓶中定容,制得质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,分别精密移取 2.0、4.0、6.0 mL 于 10 mL 容量瓶中定容,配制成 0.2、0.4、0.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度,即低、中、高浓度备用。

1.2.4 酪氨酸酶抑制作用测定 酪氨酸酶活力测定是基于 L-酪氨酸和 L-DOPA 的酶催化氧化产物——多巴色素(dopachrome)在 475 nm 波长处有最大吸收。酪氨酸酶反应活性(ACT)定义:以

每分钟多巴色素在 475 nm 波长的吸光度(OD_{475})增加 0.001 为一个酶活力单位,即 $1 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在此最大波长下可以得到多巴色素在不同的实验条件下的吸光度值 $A^{[7]}$ 。根据酶反应活性的定义,在一定的抑制剂浓度下,酶反应活性表示为 ACTi,在没有抑制剂存在时酶反应活性表示为 ACT0,计算乙醇提取液和水杨酸对酶的相对抑制率(I):

$$I(\%) = (1 - (\text{ACTi}/\text{ACT0})) \times 100 = (1 - (A1 - A3)/(A2 - A4)) \times 100$$

A1 是指含有底物、酪氨酸酶、乙醇提取液(水杨酸)的测活体系的吸光度值;

A2 是指含有底物、酪氨酸酶,但不含乙醇提取液(水杨酸)的测活体系的吸光度值;

A3 是指含底物、乙醇提取液(水杨酸),但不含酪氨酸酶的测活体系的吸光度值;

A4 是指含有底物,但不含酪氨酸酶、乙醇提取液(水杨酸)的测活体系的吸光度值;

单酚酶活力的测定:以 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-酪氨酸作为底物。先将 1.5 mL $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-酪氨酸(溶于磷酸盐缓冲溶液, $\text{pH}=6.8$)置于试管中,然后加入 3.1 mL 的磷酸盐缓冲溶液($\text{pH}=6.8$),在 30℃ 恒温水浴中恒温 10 min,再加入 0.2 mL 含不同浓度的乙醇提取液(水杨酸作为阳性对照,水杨酸溶于二甲基亚砜中)和 0.2 mL $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酪氨酸酶水溶液,测定 475 nm 波长的吸光度值。

二酚酶活力的测定:以 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-DOPA 作为底物。先将 1.0 mL $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-DOPA(溶于磷酸盐缓冲溶液, $\text{pH}=6.8$)置于试管中,然后加入 3.6 mL 的磷酸盐缓冲溶液($\text{pH}=6.8$),在 30℃ 恒温水浴中恒温 10 min,再加入 0.2 mL 含不同浓度的乙醇提取液(水杨酸作为阳性对照^[7],水杨酸溶于二甲基亚砜中)和 0.2 mL $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酪氨酸酶水溶液,测定 475 nm 波长的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

将熊果苷标准品的浓度(C)作为标准曲线的横坐标,吸光度(A)作为标准曲线的纵坐标绘制

熊果苷标准曲线如图 1。

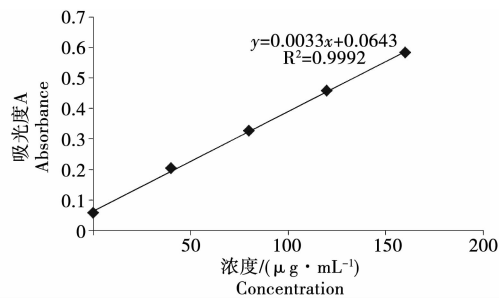


图 1 熊果苷标准曲线

Fig. 1 The standard curve of arbutin

根据熊果苷标准品得到标准曲线方程为 $y = 0.003\ 3x + 0.064\ 3$ ($R^2 = 0.999\ 2$),说明熊果苷在 $0 \sim 160\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时线性关系良好。

2.2 乙醇提取液中熊果苷的含量

取蓝莓果渣醇提原液 1 mL 稀释 10 倍,测定其吸光度值 A 为 0.299,代入标准曲线得到其浓度为 $71\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,从而计算出蓝莓果渣中含熊果苷 0.18%。

2.3 乙醇提取液对单酚酶的抑制作用

按 1.2.4 项下,对单酚酶抑制活性进行测定,结果见表 1。水杨酸的抑制机制为非竞争性类型,在此试验浓度范围内,随着水杨酸浓度的增大,对单酚酶的抑制作用也增强。水杨酸浓度为 $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用达到 32.3%,抑制强度是评价抑制剂的重要指标,常用半数抑制浓度(IC_{50})来表示,查阅文献得到,水杨酸的半数抑制率(IC_{50})为 $6.7\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [9]。在黑色素的合成过程中,有 3 种形式的酪氨酸酶参与催化反应,分别是氧化态(Eoxy)、还原态(Emet)和脱氧态(Edeoxy) [7]。在单酚酶循环中,单酚可与 Eoxy 反应,形成苯醌和 Edeoxy。最后 Edeoxy 与氧结合后又重新生成 Eoxy。对单酚酶的抑制,随着乙醇提取液浓度的增大,抑制作用也越强。乙醇提取液对单酚酶具有一定抑制作用,其抑制作用呈剂量依赖性关系,浓度增加,抑制率增加。当浓度为 $3.2\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用达到 9.1%,接近低浓度水杨酸抑制率。

2.4 乙醇提取液对二酚酶的抑制作用

按 1.2.4 项下,对二酚酶抑制活性进行测定,结果见表 2。由试验结果可知,随着水杨酸浓度

的增大,对二酚酶的抑制作用也增强。水杨酸浓度为 $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用达到 48.4%,查阅文献得到,水杨酸的半数抑制率(IC_{50})为 $4.8\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [8]。在双酚酶循环中,如果只有双酚存在,Eoxy 和 Emet 都会与其反应,生成苯醌。双酚与 Eoxy 结合生成苯醌和 Emet,后者会将另外一种双酚转化成苯醌,其自身会向含有二价铜离子活性中心的 Edeoxy 转化。大多数情形下,双酚是 Edeoxy 形成的必要因素,它是唯一能够与氧结合并且催化反应的分子 [4]。蓝莓果渣醇提取物对二酚酶的抑制作用强于对单酚酶的抑制作用,且呈剂量依赖性关系。当乙醇提取液浓度为 $3.2\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用达到 25.6%,高于低浓度水杨酸的抑制率,但仍低于中、高浓度水杨酸的抑制率。

表 1 乙醇提取液对单酚酶的抑制作用

Table 1 Inhibiting effect of ethanol extract to monophenoloxidase

浓度 Concentration	水杨酸抑制率/% Salicylic acid inhibition rate	提取液抑制率/% Extract inhibition rate
高浓度 High concentration	32.3	9.1
中浓度 Medium concentration	23.4	5.6
低浓度 Low concentration	11.6	3.2

表 2 乙醇提取液对二酚酶的抑制作用

Table 2 Inhibiting effect of ethanol extract to diphenoloxidase

浓度 Concentration	水杨酸抑制率/% Salicylic acid inhibition rate	提取液抑制率/% Extract inhibition rate
高浓度 High concentration	48.4	25.6
中浓度 Medium concentration	34.5	20.3
低浓度 Low concentration	16.8	11.7

3 结论

蓝莓果渣中含有熊果苷,用适宜的方法提取

后,得到其含量为 0.18%。蘑菇酪氨酸酶具有单酚羟化酶和二酚加氧酶活性,可以先羟化酪氨酸产生邻位二羟基苯丙氨酸(单酚酶活性),然后将其氧化成为相应的醌(二酚酶活性),进而生成一系列引起褐化的色素类物质^[9]。熊果苷对单酚酶和二酚酶都存在抑制作用,对单酚酶的抑制存在显著的迟滞时间^[4],这是酪氨酸的单酚酶的活性特点,熊果苷催化 L-DOPA 不存在迟滞过程。本试验从蓝莓果渣中提取含有熊果苷的提取物,并且对比了水杨酸对酪氨酸酶的抑制作用,高剂量的蓝莓果渣醇提物对酪氨酸酶的抑制作用与水杨酸低剂量组相当。有些酪氨酸酶抑制剂如曲酸和维生素 C 虽然对酪氨酸酶也有较强的抑制作用,但它们相对较不稳定,保质期比较短。熊果苷制剂作为化妆品的添加剂不仅对酪氨酸酶有较强的抑制作用,从化学结构看,它既是葡萄糖苷,又是天然产物,所以作用相对安全,几乎没有毒副作用,不留白斑,在一定浓度下还有抑菌作用。在 20 世纪 90 年代初,日本就率先将熊果苷应用于化妆品中作为美白添加剂。本试验对蓝莓果渣中

熊果苷含量的测定与抑酶活性评价,为蓝莓资源的综合利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王玉洁,陈敏,张扬,等. 蓝莓果渣中熊果苷提取工艺的研究[J]. 中国林副特产,2012(2): 23-25.
- [2] 王姗姗,孙爱东,李淑燕. 蓝莓的保健功能及其开发应用[J]. 中国食物与营养,2010(6): 17-20.
- [3] 李颖畅. 蓝莓花色苷提取纯化及生理功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学,2008.
- [4] 宋康康,邱凌,黄璜,等. 熊果苷作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2003(6): 791-794.
- [5] 张丽娟. 苯甲酸衍生物对酪氨酸酶的效应及其抑菌作用[D]. 厦门: 厦门大学,2006.
- [6] 付士慧,朱文学. 梨花熊果苷提取工艺及体外抗氧化性初步研究[J]. 河南科技大学学报(自然科学版),2017,38(5): 55-59.
- [7] 龚盛昭,杨卓如,程江. 肉桂酸抑制酪氨酸酶催化反应的动力学研究[J]. 高校化学工程学报,2007(2): 345-349.
- [8] 张春乐. 抑制剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制效应及抗菌活性[D]. 厦门: 厦门大学,2007.
- [9] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(14): 4108-4112.

Inhibiting Effect of Pomace Extract of *Vaccinium uliginosum* to Tyrosinase

GUO Cui-ling, ZHANG Ying

(College of Pharmaceutical Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: In order to promote the comprehensive utilization of *Vaccinium uliginosum* resources, ethanol was used as solvent for ultrasonic extraction, and the content of arbutin in ethanol extract was determined by ultraviolet spectrophotometer. At the same time, the inhibition of *Vaccinium uliginosum* pomace ethanol extract was determined by using salicylic acid as positive control. The results showed that the *Vaccinium uliginosum* pomace contained 0.18% arbutin, and the extract had inhibitory effect on tyrosinase. The inhibitory activity increased with the increase of the content, and the inhibitory effect was similar to that of salicylic acid low dose group.

Keywords: *Vaccinium uliginosum* pomace; arbutin; tyrosinase; inhibiting effect

欢迎关注本刊微信公众号

