

无患子总皂苷体外抑制酪氨酸酶活性的研究

陈雷,赵春琳,周生学* (吉林农业科技学院中药学院,吉林吉林 130011)

摘要 [目的]研究无患子总皂苷体外对酪氨酸酶的抑制率。[方法]超声波提取法,溶剂用水、30%乙醇和60%乙醇对无患子总皂苷提取,用大孔树脂(D101)富集水、30%乙醇和70%乙醇部分,紫外分光光度计法,测量酪氨酸酶抑制率。[结果]超声波提取得率中,水提得率(18.56%)最高,60%乙醇提取得率为14.46%,而30%乙醇提取得率为17.85%,接近水提取得率;大孔树脂富集后70%乙醇洗脱部分抑制率高于30%乙醇部分和水部分;与熊果酸比较,70%乙醇洗脱部分、30%乙醇洗脱部分和总皂苷对酪氨酸酶均具有明显的抑制作用。[结论]无患子总皂苷及30%乙醇和70%乙醇大孔树脂洗脱部位对酪氨酸酶抑制率较高,可以作为优良的美白护肤品天然添加剂,应用于生产中。

关键词 无患子;总皂苷;酪氨酸酶;体外;抑制率

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)21-056-03

Research on the Inhibition of Tyrosinase Activity *in vitro* by Total Saponins from *Sapindus*
CHEN Lei, ZHAO Chun-lin, ZHOU Sheng-xue* (College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agriculture Science And Technology College, Jilin, Jilin 132101)
Abstract [Objective] The research aimed to study the inhibition rate of tyrosinase *in vitro* by total saponins from *Sapindus*. [Method] Total saponins were extracted from *Sapindus* by Ultrasonic with water, 30% ethanol and 60% ethanol. Each part of the water, 30% ethanol and 70% ethanol was collected through macroporous resin (D101) column. Tyrosinase inhibition rate was measured by ultraviolet spectrophotometer. [Result] Total saponins extract yield (18.56%) by water was higher than 60% ethanol (14.46%) and 30% ethanol (17.85%), and 30% ethanol content close to water extraction yield. The tyrosinase inhibitory activity with 70% ethanol eluent was higher than 30% ethanol eluent by different parts of Macroporous resin elution of *Sapindus*. Compared with ursolic acid, 70% ethanol eluent, 30% ethanol eluent and total saponins were significantly tyrosinase inhibited. [Conclusion] The inhibition rate of total saponins of *Sapindus* and 30% ethanol and 70% ethanol of macroporous resin elution fractions on tyrosinase were higher, which can be used as an excellent natural skin care products whitening additive, used in production.
Key words *Sapindus*; Total saponins; Tyrosinase; Vitro; Inhibition rate

无患子(*Sapindus mukurossi* Gaertn.)本草纲目中称为木患子,我国产于长江流域以南。无患子具有很强药用价值,其果皮、种子、种仁、根、皮、叶均可以用作医药原材料^[1],现代药理学研究证明无患子还具有抗菌作用、抗肿瘤、降压和心脏保护作用、保肝作用、免疫调节、抗病毒、镇痛等多种药理作用^[2]。无患子总皂苷洗涤液对于汞、锰、镉、铅等重金属的洗涤效果明显^[3]。无患子总皂苷还是很好的农药乳化剂,对蜗牛、苍蝇、蚊子、棉蚜虫、红蜘蛛等均有较好的杀灭效果^[4]。无患子果皮皂苷含量丰富,含量约为5.33%^[5],主要为三萜皂苷类、倍半萜糖苷类,具有较强的表面活性作用^[6-7]。明代李时珍在本草纲目中记载:无患子洗头去风明目,洗面增白祛斑。笔者在此主要研究无患子抑制酪氨酸酶^[8-9]的作用,筛选美白护肤化妆品天然添加剂。

1 材料与方法

1.1 试验仪器 JYT-2型药物天平(上海医用激光仪器厂);AL-204型电子天平(梅特勒-托利多(上海)有限公司);WMZK-72型指针式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);DHG-9035A型电热鼓风干燥箱(上海源长实验仪器设备有限公司);SY-360型超声提取器(上海宁商超生仪器有限公司);紫外可见分光光度计UV-1700PharmaSpec(北京普析通仪器有限公司)。

1.2 试验材料 无患子果皮(2012年9月购于海宁市盐官

苗木合作社,产于浙江);D101型大孔树脂(天津农药厂);L-酪氨酸(日本味之素公司);酪氨酸酶(25 000单位/mg, sigma公司);DOPA(购自 sigma公司,用PBS缓冲液配制成所需浓度单位);磷酸缓冲盐(北京化工有限公司);95%乙醇。

1.3 试验方法

1.3.1 无患子总皂苷的提取。用药物天平称取约为10 g的干燥无患子果皮3份,提取以料液比1:5分别加入蒸馏水、30%乙醇、60%乙醇各50 ml,提取温度为35℃,超声功率为360 W,超声提取时间为30 min/次^[10-13],共3次,合并各组份提取物,烘干称重。

1.3.2 无患子总皂苷大孔树脂吸附富集^[14-15]。

1.3.2.1 大孔树脂预处理。取D101树脂用95%乙醇浸泡24 h,湿法装柱,用95%乙醇洗至流出液加5倍量无白色浑浊为止。用纯水洗至中性,备用。

1.3.2.2 大孔树脂吸附富集。合并无患子总皂苷粗提物,将其按5 g/份取3份,分别放入标号为A、B、C的50 ml烧杯中。加10倍量的水溶解,静置沉淀后过滤,定容至50 ml容量瓶中。准确量取已经预处理的湿树脂200 ml 3份,湿法上3个大孔树脂柱(标号A、B、C),分别上样5 g提取物,依次以蒸馏水、30%乙醇、70%乙醇各3倍体积量依次洗脱。收集A、B、C 3个大孔树脂柱的水、30%乙醇和70%乙醇各个的洗脱部位置于电热鼓风干燥箱中40℃烘干,记录数据,计算平均值得率,合并备用。

1.3.3 酪氨酸酶活性抑制率试验。酪氨酸酶抑制率按文献^[16-17]方法,于475 nm处测吸光度,得出抑制率作比较。按表1准确吸取A、B、C、D 4组反应液,每组设平行3组试

基金项目 吉林农业科技学院大学生科技创新科研项目(2014052)。
作者简介 陈雷(1989-),男,吉林松原人,本科生,专业:中药资源与开发。*通讯作者,讲师,硕士,从事中药新药开发研究。
收稿日期 2015-05-26

管,25 ℃温育 5 min 立即转移比色皿中于 475 nm 吸光值。B 组空白组,记录 A、C、D 吸光度值。依据公式计算酪氨酸酶的抑制百分率,即酪氨酸酶的抑制百分率 = $\frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100\%$ 。

表 1 反应液组成与体积 ml				
反应液	0.03% 左旋多巴	0.05% 酪氨酸酶	200 U/ml 酪氨酸酶	磷酸 缓冲液
A	0.5	0	0.5	1.5
B	0.5	0	0	2.0
C	0.5	0.5	0.5	1.0
D	0.5	0.5	0	1.5

2 结果与分析

2.1 无患子总皂苷提取 从表 2 可以看出,在超声波提取无患子总皂苷提取液过程中,水提得率最高(18.56%),60%乙醇得率最低(14.46%),而 30%乙醇提取含量接近水提取得率,为 17.85%;色泽上,60%乙醇提取物色泽较深,为棕色,30%乙醇提取物颜色为黄色,而水提取物颜色最浅,为浅黄色。

表 2 无患子总皂苷得率				
无患子/g	试剂	产品颜色	粗提物/g	得率/%
20	H ₂ O	浅黄色	3.712	18.56
20	30%乙醇	黄色	3.569	17.85
20	60%乙醇	棕色	2.892	14.46

2.2 无患子提取物大孔树脂不同洗脱部位得率 对于大孔树脂富集情况(表 3)来看,水洗脱部分占总提取物 28.47%,其中主要部分为水溶性物质,不是主要皂苷类成分,30%乙醇提取部分含有约 19.84%,属于含糖量大的皂苷类物质,而 70%乙醇洗脱部分得率为 34.00%,为主要三萜皂苷类,根据文献报道^[14],该部分为主要皂苷类活性成分。

表 3 不同浓度乙醇洗脱试验数据			
洗脱溶媒	上样量/g	固形物/g	得率/%
H ₂ O	5	1.423 3	28.47
30%乙醇	5	0.992 2	19.84
70%乙醇	5	1.700 1	34.00

2.3 无患子皂苷酪氨酸酶活性抑制结果 通过测试各个不同洗脱部位所配置浓度(0.2、0.5、1.0 mg/ml)供试品溶液吸光度值,然后计算其各组分对酪氨酸酶抑制率。从图 1 可以看出,无患子提取物对酪氨酸酶有很强的抑制作用,其中总提取物、30%乙醇和 70%乙醇洗脱组分在 1.0 mg/ml 浓度上抑制率很强,与熊果酸抑制率相似,而大孔树脂水洗脱组分抑制率较低。不同浓度提取物对酪氨酸酶抑制作用显著不同,在 0.2~1.0 mg/ml 范围内随提取物浓度增加抑制率升高,提取物对酪氨酸酶活性抑制效率最高的质量浓度为 1.0 mg/ml。70%乙醇大孔树脂洗脱组分抑制率高于 30%乙醇组分,表明该部分为主要酪氨酸酶抑制成分,水洗部分抑制

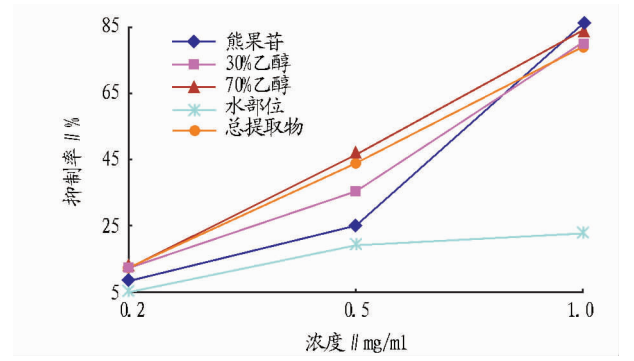


图 1 不同浓度的不同洗脱部位无患子皂苷的酪氨酸酶抑制率,该部分成分抑制酪氨酸酶活性不强。

3 讨论

通过对水和不同浓度乙醇溶液提取比较,水提得率较高,60%乙醇含量较少,主要原因是无患子果皮中含有较多糖类物质,随着乙醇浓度提高,糖类物质浸出较少,反而以沉淀形式析出。在试验过程中可观察到醇的浓度越高,无患子粗提物的色泽更深,可能皂苷含量更多,或在提取中有部分色素易溶于有机溶剂的缘故。而在后续步骤采取洗脱后的无患子总皂苷进行抑制酪氨酸酶活性试验,超声提取法由于提取温度低、提取时间短,更有利于保留无患子皂苷的生理活性。

在皮肤黑色素生成系列反应中,酪氨酸酶在生物体内具有重要的生理功能,它与人体由于色素沉积而引起的雀斑、褐斑等有关。在酪氨酸酶的作用下,酪氨酸生成还原型多巴,进而氧化成醌式结构,经过系列代谢反应,多巴醌形成多巴色素和 5,6-二羟基吲哚,然后转化为黑色素^[16-17]。因此,抑制酪氨酸酶活性可以起到阻断人体皮肤黑色素形成机制,进而起到皮肤美白的效果。

无患子在民间常用于美白祛斑药物,在抑制酪氨酸-多巴试验中,无患子水提取物经过大孔树脂吸附处理,得到 30%乙醇和 70%乙醇组分其抑制酪氨酸酶较强,分别为 82.29% 和 84.21%,同时总提取物抑制率也较高(80.23%),以上 3 种组分具有较强的抑制效果,均与熊果酸抑制率接近,且成分的稳定性好,可以用于美白护肤产品天然提取物添加剂,其主要原因可能是无患子中含有三萜皂苷类、倍半萜糖苷类,对酪氨酸酶有较强的抑制作用,同时也表明该成分是无患子主要成分^[14]。无患子作为天然产物,符合当前人们消费理念,欧洲现在开发许多植物提取物作为化妆品添加成分,受到消费者的大力追捧,无患子也将成为不久的将来化妆品中最具有潜力的美白护肤添加剂。

参考文献

[1] 钱志潮. 多用途生态树种——无患子[J]. 浙江林业,2004(7):16.
[2] 郭英,谢建平,柳爱华,等. 无患子药理作用概述[J]. 中国病原微生物杂志,2011,6(11):873-874.
[3] 杨玉英,甘荔,耿文奎,等. 无患子去皮肤金属沾染洗涤剂毒性研究[J]. 广西医学,1988,10(6):339-342.
[4] 周露,谢文申,罗雁捷. 川滇无患子提取物用于农药的生物活性研究[J]. 植物保护,2010(5):162-164.
[5] 杨志斌,杨柳,李晖. 无患子有效化学成分的分析研究[J]. 湖北林业科技,2010(5):32-34,68.

- [6] 李锐,周燕,杨永成,等. 无患子皂苷成分的串联质谱分析[J]. 高等学校化学学报,2006,27(1):52-54.
- [7] 解辉. 无患子总皂苷分离纯化的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2007.
- [8] 陈清西,宋康康. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 厦门大学学报,2006,36(5):731-737.
- [9] 张建友,方艳燕,吴晓琴,等. 天然活性美白化妆品研究现状及发展前景[J]. 精细化工,2008,25(1):72-76.
- [10] 魏凤玉,余锦城,解辉. 天然无患子皂苷的提取分离[J]. 安徽化工,2007,33(3):15-16.
- [11] 饶厚曾,郭隆华. 无患子皂苷提取工艺的研究[J]. 江西科学,2002,20(1):55-58.
- [12] 杨安平,蔡小连. 无患子总皂苷提取工艺的正交设计优选试验[J]. 中

医药导报,2012,18(6):74-75.

- [13] 赵丹青,苏肇秦,张卫明,等. 超声辅助低水比提取无患子皂素工艺过程研究[J]. 中国野生植物资源,2012,31(4):18-22.
- [14] 傅雷,雷鹏,韩玉梅,等. 大孔吸附树脂法制备无患子皂苷及其抑菌菌活性表征[J]. 中药材,2010,33(2):267-272.
- [15] 南艳平,唐青涛,赵宏伟,等. 均匀设计法优化大孔树脂纯化无患子皂苷的工艺[J]. 中国医药工业杂志,2012,42(11):811-814.
- [16] 龚盛昭,杨卓如,程江. 香草醛对酪氨酸酶活性的抑制[J]. 华南理工大学学报,2006,34(5):53-56.
- [17] 努尔买买提·艾买提,哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医异常粘液质成熟剂体外对蘑菇酪氨酸酶活性的作用[J]. 中药药理与临床,2006,22(3):147-149.

(上接第 55 页)

床底部需增加酿热物用以提高温度。一般苗床宽 1.7 m,长度根据需要而定,东西走向。酿热物配制方法:将作物秸秆铡碎,以 1:3 比例掺进新鲜的牛、马等粪尿中。苗床底部铺上 1 层碎草,再铺上酿热物,厚度 30 cm 左右,然后盖上 1 层营养土,最后覆膜以增温发酵。

2.1.2 排种。覆膜发酵 1 周后进行排种。排种前用 50% 甲基托布津 500 倍液或 25% 多菌灵 1 000 倍液浸泡种薯 10 min 以杀灭种薯携带的病菌。排种时,种薯头部向上,斜排成 45°,大小薯块分开排种,以前薯压住后薯 1/3 为宜,做到上齐下不齐,薯块行距 5 cm,再用肥沃细土盖住薯块,浇足水,盖上塑膜。

2.1.3 苗床管理。出苗前保温催芽,夜间或阴雨天需盖上草帘用以保温,使苗床温度能达到 25~30℃。20 d 后开始出苗,出苗后重点进行控温、保湿。温度过高可适当放风,床土发干时需喷水保湿。温度掌握的原则是:高温催芽,平稳长苗,降温炼苗,先催后炼,催炼结合,达到育成壮苗的目的。

2.2 扦插栽培 当苗高达到 25 cm 时可考虑剪苗移栽,栽前 1 周需充分通风炼苗。每次采苗后结合浇水追施 1 次有机肥水,或者浇施 25 g/m² 尿素肥料。分为叶菜专用型栽培和薯菜兼用型栽培 2 种方式。

2.2.1 叶菜专用型栽培。菜地周围设置缓冲地带,防止周边打药对蔬菜造成二次污染。当气温稳定在 15℃以上时,可作为露地栽插的安全日期,江苏淮北地区在 5 月上旬即可栽插,保护地栽培情况下可提前栽插。用作苗圃的土壤需肥沃,一般施用优质农家肥 45 000 kg/hm²,同时施入富含钾肥的多元复合肥 375 kg/hm²,深翻土壤,耙细整平,整成宽 2 m 的畦面;然后开沟栽插或穴栽,株行距为 15 cm×30 cm,密度约为 22.5 万株/hm²。薯苗短于 20 cm 时采用直插方法埋入 2~3 节,薯苗长于 25 cm 时采取斜插入土 3~4 节。天气干旱时采用埋叶法栽插能减少叶面蒸发,起到抗旱保苗效果,具体方法是:扦插后浇足水,第 2 天早上再培土。露出顶端 3 张叶片,其余叶片均埋入土中,待活棵后再稍稍剥去一些土。

2.2.2 薯菜兼用型栽培。采用高垄单行栽培,垄宽 80 cm,垄高 25 cm,株距 25~30 cm,密度 45 000 株/hm²,人工单株栽

插。为了防止地下害虫危害薯块,可在浇团棵水时兑上少许辛硫磷乳油。为了预防杂草生长,移栽前铺上黑色塑料地膜遮光,同时可起到增温保湿的作用。为保持市场供应的连续性,可采取分期分批栽插,夏季可栽至 6 月底。至秋末还可收获数量可观的薯块。在茎叶盛长期可分期分批采摘幼嫩茎叶,扎成小把,低温储运,不可堆闷;也可进行深加工,及时烘焙研末,做成饮品或食品添加材料。每次采摘完后,适量浇些硫酸钾型复合肥水。

2.3 冬季温室叶菜专用栽培技术 冬季室内可用薯块直接生产薯菜。为了提高温度,除了在苗床下放置酿热物以外,还可以用火炕或电热丝加热苗床,同时在苗床上再加上塑膜用以多层保温。当苗高长至 20 cm 以上时,基部留下 2 个腋芽,以利再生生长,将薯苗上部像割韭菜那样割下,扎成小捆运往市场销售。需要注意的是,储运过程与夏季恰恰相反,因冬季气温低,需要保温,以防冻坏,影响品质。采用此法不但产量高,而且采收间隔期也短,生长周期长。利用温室栽培可实现产品的周年供应。

3 种薯的收藏

甘薯块根是无性器官,在适宜的温度条件下可持续膨大,无明显的成熟标准和收获期。当甘薯茎叶长时间处于 10℃或短时间低于 6℃即受冷枯死,块根在地温低于 9℃以下时间稍长即受冷害。需在地温降至 12℃以前(即枯霜前)收获完毕。另外需要注意的是,留种的薯块适当摘取茎叶无妨,但不可过分采摘,以免影响薯块的正常发育。大田收获后的薯块进行再次选拔,选择的薯块需大小均匀,剔除病、伤、虫、冻薯块,并根据来年的用种量预留出 20% 左右的损耗。不管采用何种方法保存种薯,其贮藏的适宜温度应控制在 11~14℃,最适温度为 12.5℃。相对湿度保持在 85%~90% 为宜。做好定期检查。

参考文献

- [1] 路瑶,周振林,柳毅,等. 叶用甘薯新品种引种栽培试验初报[J]. 湖南农业科学,2013(15):169-172.
- [2] 李水凤,陈琦,茅国夫,等. 菜用甘薯新品种引进及性状比较试验[J]. 中国种业,2013(1):55-56.
- [3] 吴东根. 叶用甘薯栽培技术[J]. 中国蔬菜,2007(4):44-45.
- [4] 石黒浩二. サツマイモの葉にはルテインが豊富に含まれる[J]. 農業および園芸,2006,81(3):345-349.