

三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 果实乙醇提取物 对酪氨酸酶体外活性的影响

彭涤非¹, 钟彩虹^{1,2}, 周海燕³, 曾斌¹, 王中炎¹

(1. 湖南省园艺研究所, 长沙 410125; 2. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074;

3. 湖南农业大学生化与发酵工程实验室, 长沙 410128)

摘要: 以人工栽培条件下三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 果实为试材, 用 80% 乙醇分别提取果皮、果肉、种子中的有效成分, 经离心过滤后, 于旋转蒸发仪上减压蒸馏浓缩, 再经真空干燥处理得到三叶木通乙醇提取物。以 L-DOPA 为底物, 熊果苷作阳性对照, 分析测定了该提取物对酪氨酸酶活性的抑制百分率。结果表明: 不同部位的三叶木通果实乙醇提取物对酪氨酸酶活性均有一定的抑制作用, 其中果肉对酪氨酸酶活性的抑制作用最佳, 中等浓度的果肉乙醇提取物 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制率相当。

关键词: 三叶木通; 酪氨酸酶; 美容

中图分类号: Q949.746.6; Q946

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2008)02-0183-03

The Inhibitory Effects *in vitro* of Ethanol Extracts from the Fruit of *Akebia trifoliata* on the Tyrosinase Activity

PENG Di-Fei¹, ZHONG Cai-Hong^{1,2}, ZHOU Hai-Yan³, ZEN Bin¹, WANG Zhong-Yan¹

(1. Hunan Horticultural Research Institute, Changsha 410125, China; 2. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 3. Biochemistry and Fermenting Engineering Laboratory, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Fruits of cultivated *Akebia trifoliata* were used as experimental materials and the active components were extracted with 80% ethanol from pericarp, flesh and seeds respectively. The ethanol extracts were obtained by centrifuging and filtering, distilling and concentrating on revolving evaporation apparatus at reduced pressure, and then vacuum drying. The inhibitory activities of these extracts on tyrosinase were examined with L-DOPA as substrate and arbutin as positive control. The results showed that the extracts from different parts of akebia fruit all had obvious inhibitory activity on tyrosinase, the strongest effects occurred with flesh extract. Flesh extract at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had similar level of effects to arbutin at 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration.

Key words: *Akebia trifoliata*; Tyrosinase; Whitening

酪氨酸酶是黑色素生物合成途径中的主要限速酶, 其活性与某些色素障碍性皮肤病及面部黄褐斑的产生有关, 酪氨酸酶活性增高会产生黄褐斑等色素沉着性疾病^[1]。目前的皮肤美白剂就是通过抑制酪氨酸酶活性或者阻断酪氨酸生成黑色素的氧化途径, 从而减少黑色素的生成达到美白皮肤的效果。它不仅要求美白效果好, 而且要求安全无毒副作用, 一般源自天然植物提取物, 如原花色素、熊果苷、曲酸及其衍生物、维生素 C 及其衍生物, 以及中草药提取物如甘草黄酮等^[2]。研究天然植物源酪氨酸酶抑制剂, 对于色素型皮肤病的治疗, 增白美容化妆品的研发及野生植物的综合利用有重要意义。

三叶木通 [*Akebia trifoliata* (Thunb) Koidz] 是木通科木通属的一种野生果树, 其植株为缠绕木质藤本, 在我国南部、长江流域和西北地区均有分布。其果实浓甜, 果肉白色晶莹, 风味独特, 具有保健作用。其种子、茎、叶、根亦可入药, 在公元 8 世纪左右陈士良所著的《食性本草》中就有记载, 民间多用其治疗小便赤涩、妇女经闭、乳汁不通等疾病^[3]。木通属植物化学成分的研究报道多集中在三萜及其皂苷类化合物, 药理活性多集中在其利尿、抗肿瘤、抗菌和毒性研究方面^[3-5], 尚未见三叶木通果实美白祛斑功能的研究报道。由于三叶木通果实具有良好的食用品质和丰富的营养, 近年来, 国内相关单位正

收稿日期: 2007-08-14, 修回日期: 2007-11-13。

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (05JJ30030); 湖南省农业科学院重点学科建设项目资助。

作者简介: 彭涤非 (1966 -), 男, 汉族, 湖南宁乡人, 硕士, 副研究员, 主要从事果树生理生态和新水果研究。

在对三叶木通进行系统的驯化利用研究,以期开发成新型水果^[6]。研究中,我们意外发现,食用其果实 3 年后,面部皮肤明显变白,其果实具有明显的祛斑作用,但还缺乏科学论证,本研究以人工栽培条件下三叶木通果实为试材,较系统地研究了其对酪氨酸酶活性的抑制作用,以期为其美白、祛斑功效及开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料采自湖南省园艺研究所木通试验园,为人工驯化第三代三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 优株所结果实。

试剂:L-DOPA、蘑菇酪氨酸酶为 Sigma 公司产品。磷酸二氢钾、磷酸氢二钠为市售分析纯。

仪器:UV1600 紫外可见分光光度计,北京瑞丽分析仪器公司生产。

1.2 方法

1.2.1 提取物的制备

(1) 果皮提取物:三叶木通果实称重后,分离果皮,称其重量并切碎,匀浆,加入 80% 的乙醇浸泡两次,每次浸泡过夜,用纱布粗滤,然后在 4℃、3000 r/min 的条件下离心 10 min,取上清液。合并提取液,备用。

(2) 果肉提取物:将果实剥去种子,果肉称重后匀浆,加入 80% 的乙醇浸泡两次,每次浸泡过夜,用纱布粗滤,然后在 4℃、3000 r/min 的条件下离心 10 min,取上清液。合并提取液,备用。

(3) 种子提取物:种子吹干,粉碎,加入 80% 的乙醇浸泡两次,每次浸泡过夜,用纱布粗滤,然后在 4℃、3000 r/min 的条件下离心 10 min,取上清液。合并提取液,备用。

取上述(1)、(2)、(3) 3 种提取液,分别在旋转蒸发仪上减压蒸馏(30~50℃)至稠膏状,真空干燥处理(60~70℃),得到的产物置于冰箱冷藏。

1.2.2 酪氨酸酶活性抑制率的测定

主要参考文献[7,8]的方法并略作修改:分别取果皮、果肉和种子的提取物样品各 5、2、0.5 mg 加入 0.067 mol/L, pH 6.8 的磷酸盐缓冲液溶解,定容至 10 mL,在 25℃ 下温育 10 min。取不同浓度的样品溶液 0.5 mL,然后加入 135 U/mL 的蘑菇酪氨酸酶 0.5 mL 和 0.03% L-DOPA 溶液 0.5 mL,25℃ 下温育 5 min,立即在 475 nm 处测吸光值。熊果苷作阳性对照,浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L。

酪氨酸酶活性抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率} = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \times 100\%。$$

式中,A 为未加提取物但加酪氨酸酶时的吸光值,B 为未加提取物且未加酪氨酸酶的吸光值,C 为加提取物并加酪氨酸酶的吸光值,D 为加提取物而未加酪氨酸酶的吸光值。

2 结果与分析

2.1 活性成分提取率

用上述方法提取三叶木通果实不同部位的活性成分,其提取率以果肉为最高,达到 30.7%,其次为果皮 5.2%,种子最低 3.0% (见表 1)。

表 1 样品活性成分提取率
Table 1 The crude extracting rates of active components from *Akebia trifoliata* fruit

样品部位 Sample source	样品重量 (g) Sample weight	提取物重量 (g) Weight of extracts	提取率 (%) Extracting rate	平均提取率 (%) Average extracting rate
果皮 Pericarp	20.00	1.08	5.40	5.20
	36.00	1.90	5.30	
	25.00	1.23	4.92	
果肉 Flesh	14.00	4.58	32.70	30.70
	19.50	5.66	29.00	
	15.70	4.79	30.50	
种子 Seed	35.00	1.12	3.20	3.00
	39.40	1.18	3.00	
	29.00	0.81	2.80	

2.2 对酪氨酸酶活性的抑制作用

三叶木通果实不同部位的乙醇提取物对酪氨酸酶活性均有一定的抑制作用(见表 2),其中尤以果肉对酪氨酸酶活性有极佳的抑制效果,200 μg/mL 的果肉提取物对酪氨酸酶活性的抑制率达 54.60%,500 μg/mL 的果肉提取物的抑制效果达 77.64%。

熊果苷(对苯二酚葡萄糖苷),是一种从砂梨 [*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai]、虎耳草 (*Saxifraga stolonifera* Curt.) 等植物中提取的化学成分,它在不影响细胞增殖的情况下可以有效减少黑色素的形成,是一种被认为副作用很低的美白祛斑剂,有 21 世纪最佳美白剂之称,本研究中用作阳性对照。在本实验条件下,不同浓度熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制率分别是 0.1 mmol/L 为 21.4%,0.5 mmol/L 为 49.57%,1.0 mmol/L (270 μg/mL) 为 59.70%,5.0 mmol/L 为 89.5%。

三叶木通果实对酪氨酸酶活性的抑制率与熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制率虽然没有绝对意义上的

表 2 三叶木通提取物对酪氨酸酶活性的抑制率
Table 2 The inhibitory activity of extracts from *Akebia trifoliata* fruit on tyrosinase

提取部位 Type of extracts	提取物浓度 (μg/mL) Concentrations of extracts	吸光值 Absorbance				抑制率 (%) Inhibitory rate
		A	B	C	D	
果皮 Pericarp	50	0.8974	0.0003	0.8063	0.0007	10.20
	200	0.9007	0.0004	0.7956	0.0010	11.74
	500	0.8952	0.0003	0.7023	0.0012	21.66
果肉 Flesh	50	0.8930	0.0005	0.6710	0.0009	24.92
	200	0.8964	0.0003	0.4080	0.0011	54.60
	500	0.8980	0.0004	0.2020	0.0013	77.64
种子 Seed	50	0.8988	0.0005	0.7295	0.0004	18.84
	200	0.8897	0.0002	0.6150	0.0007	30.94
	500	0.8958	0.0006	0.5710	0.0008	36.30

注: A、B、C、D 分别代表不同反应混合液在 475 nm 处的吸光值。其中, A 为未加提取物但加酪氨酸酶时的吸光值; B 为未加提取物且未加酪氨酸酶的吸光值; C 为加提取物并加酪氨酸酶的吸光值; D 为加提取物而未加酪氨酸酶的吸光值。

表 3 熊果苷和三叶木通果肉提取物对酪氨酸酶活性的抑制率比较
Table 3 The comparison of inhibitory rates on tyrosinase activity between arbutin and the extract from flesh of *Akebia trifoliata*

熊果苷的抑制率 Inhibitory rate of arbutin (x_1)	木通果肉提取物的抑制率 Inhibitory rate of flesh extract (x_2)	$x_1 - \bar{x}_1$	$x_2 - \bar{x}_2$	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$	$(x_2 - \bar{x}_2)^2$
21.40	24.92	-33.64	-27.47	1131.65	754.60
49.57	54.60	-5.47	2.21	29.29	857.90
59.70	77.64	4.66	25.25	21.72	471.76
89.50		34.46		1187.49	
$\sum x_1 = 220.17$	$\sum x_2 = 157.16$			$\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 = 2370.15$	$\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2 = 2084.26$
$\bar{x}_1 = 55.04$	$\bar{x}_2 = 52.39$				

可比性,但从上述结果仍可大致推断,三叶木通果肉对酪氨酸酶的抑制效果与熊果苷相当:以中等浓度(200 μg/mL)为例,三叶木通果肉提取物的抑制率为 54.60%,而 1.0 mmol/L (270 μg/mL)熊果苷的抑制率为 59.70%。

根据成组数据(两样本容量不等)的 t 检验,计算两样本的均数差异标准差:

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]} = 22.79,$$
$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}} = 0.12$$

自由度 $df = n_1 + n_2 - 2 = 4 + 3 - 2 = 5$,查 t 表, $t_{0.05} = 2.57$,现 $t = 0.12$ 远小于 $t_{0.05} = 2.57$,说明三叶木通果肉提取物对酪氨酸酶活性的抑制率与熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制率无显著差异,进一步验证了上述结果(见表 3)。

3 结论

无论从活性成分提取率还是抑制效果来看,三叶木通果实中抑制酪氨酸酶的活性成分都主要存在

于果肉当中,而果肉正是三叶木通作为新水果开发的可食部分,三叶木通具有开发出美白保健产品的潜力,可望开发成一种新型美容水果。

三叶木通果实对皮肤黑素细胞增殖的抑制效果及活性成分的鉴定尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 邹先伟,蒋志胜.植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展[J].中草药,2004,35(6):702-705.

[2] 王白强,曾晓军.酪氨酸酶活性的抑制研究及皮肤美白化妆品的研制[J].福建轻纺,2002(7):1-6.

[3] 高黎明,何仰清,魏小梅,闫海燕.木通属植物化学成分及药理活性研究进展[J].西北师范大学学报(自然科学版),2004,40(1):108-114.

[4] 高慧敏,王智民.木通属药用植物研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(1):10-14.

[5] 梁永红.三叶木通资源和质量分析研究[D].北京:北京中医药大学,2006.5.

[6] Wang Z Y, Zhong C H, Bu F W, Peng D F, Peng J C, Yuan F R. *Akebia*— a valuable wild fruit under domestication[J]. *Agricultural Science and Technology*, 2005, 6 (2): 12-17.

[7] 任冰如,吴菊兰,汪洪江,梁呈元,李维林,张涵庆.测定 24 种植物的提取物对酪氨酸酶活性的影响[J].中国美容医学,2004,13(3):287-289.

[8] Lee K T, Kim B J, Kim J H, Heo M Y, Kim H P. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation[J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 1997, 19(6):291-298.