DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.02.012

洋甘菊抑制酪氨酸酶活性成分研究

王国林[1]， 达热卓玛[1]， 徐德平*[1]
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：研究了罗马洋甘菊乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶活性的影响并对有效成分进行分离纯化。实验中以L-酪氨酸为底物，空白对照，采用比色法测定了罗马洋甘菊乙醇提取物不同乙醇浓度的洗脱物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用。结果表明：MCI30%（体积分数）乙醇浓度洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制率最灵敏。该部分洗脱物经MCI、ODS-A柱分离，得到了3个单体化合物：山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-O-(6"-3-羟基-3-甲基-戊二酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷。

关键词：罗马洋甘菊；酪氨酸酶；分离；结构鉴定
中图分类号：O 656.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)02—0191—04

Inhibition of Tyrosinase by *Anthemis nobile* L. Extract

WANG Guolin[1]， *DARE Zhuoma*[1]， *XU Deping*[*1]
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate whether the extract with ethanol from *Anthemis nobilis* L. could be ascribed to the inhibition of tyrosinase and know about the active ingredients, the experiment was conducted. The inhibition rates of different concentration of ethanol elution on mushroom tyrosinase were tested by the colorimetric method using L-tyrosine as substrate. It finds out that the 30% volume concentration of ethanol elution content is the most sensitive part on tyrosinase activity inhibition. The further result shows that the active part include kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-(6"-O-methyl)-β-D-glucopyranoside.

Keywords: *Anthemis nobilis* L., tyrosinase, purification, structural elucidation

罗马洋甘菊(*Anthemis nobilis* L.)，菊科黄春菊属一年生或多年生草本植物，广布于南欧和西欧，目前在我国新疆也有种植。罗马洋甘菊(以下简称洋甘菊)有极强的香味，在医药、香料和化妆品的生产中有广泛的应用。洋甘菊水提物在降低STZ糖尿病大鼠的血糖含量中有显著效果[1]，洋甘菊精油能减缓经期综合症[2]，帮助肝脏再生和解痉等。另外，洋甘菊精油还可以作为香薰按摩和护发产品中的成分[3-4]。在化妆品中添加洋甘菊可以使皮肤更加舒缓和柔滑[5-6]，但对其在美白方面的研究还未见报道。

收稿日期：2015-09-13
基金项目：中央高校基本科研业务费专项(JUSRP21127)。
* **通信作者**：徐德平(1965—)，男，安徽宣城人，副教授，工学博士，硕士研究生导师，主要从事天然产物化学研究。E-mail:xdp1219@sina.com
引用本文：王国林，达热卓玛，徐德平. 洋甘菊抑制酪氨酸酶活性成分研究[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(2)：191-194.

为此,本文对洋甘菊提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用进行了研究,旨在明确洋甘菊乙醇提取物中的起美白作用的物质,为洋甘菊在美白方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗马洋甘菊,购于新疆伊犁;L-酪氨酸(生化级),国药集团化学试剂有限公司产品;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠皆为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品;酪氨酸酶(生化级),上海宝曼生物科技有限公司产品。MCI CHP20P(75~150 μm)柱填料,Mitsubishi Kasei Co. 产品;ODS 柱填料,Nacalai Tosoh Inc 产品。

1.2 仪器与设备

RAT-100 型萃取罐,无锡申科仪器有限公司产品;R-1002 型旋转仪,上海申顺生物科技有限公司产品;ZF-90 型暗箱式紫外透射仪,上海顾村电光仪器厂制造;WFJ 2000 型可见分光光度计,优尼柯(上海)仪器有限公司产品;核磁共振仪 Avance 500 MHz,Bruer 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 洋甘菊醇提物的制备 洋甘菊经水蒸汽蒸馏法去除挥发性成分后得到的残渣,按料液质量比1:5 加入体积分数 95%的乙醇,于 50 ℃条件下搅拌提取 3 h,过滤取上清液,如此重复 2 次。将 3 次所得上清液减压浓缩去乙醇后即得洋甘菊醇提物浓缩液,-20 ℃保存备用。

1.3.2 洋甘菊醇提物的粗分离 将 2.1 所得洋甘菊提取物解冻后,用去离子水作适当稀释,过虑后将滤液上 MCI 柱(5 cm×100 cm),依次用去离子水和不同体积分数乙醇以 15 mL/min 流速进行梯度洗脱。TCL 检测,茴香醛-硫酸显色,将洗脱液分成 A(水洗脱)、B(15%洗脱)、C(30%洗脱)、D(70%洗脱)4 个部分所得洗脱物分别为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ。分别减压浓缩并真空干燥后,于-20 ℃保存备用。

1.3.3 洋甘菊醇提物对酪氨酸酶抑制作用的研究

1)试剂的配制

①缓冲溶液(PBS)的配制 准确称取Na_2HPO_4 3.55 g,$NaH_2PO_4·2H_2O$ 3.9 g,分别用去离子水溶解后混合,定容至 1 000 mL,调 pH 至 6.8,配成 25 mmol/L 的缓冲溶液,置于 4 ℃冰箱中待用。

②1 mmol/L 酪氨酸溶液的配制 准确称取 L-酪氨酸 181 mg,加入数滴 0.1 mol/L 盐酸溶解后,加约 95 mL 磷酸缓冲溶液,调节其 pH 至 6.8,然后定容至 100 mL。置于 4 ℃冰箱中待用。

③酪氨酸酶溶液的配制 将酪氨酸酶用已配好的磷酸缓冲液溶解分装于 PE 管,置于-20 ℃冰箱中保存。

④样品的配制 准确称取 120 mg 1.3.1 所得样品和 1.3.2 所得的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4 个样品,2.1 所得样品用含体积分数 10% DMSO、pH 为 6.8 的 PBS 溶解,2.2 所得 4 个样品用 PBS 溶解,均配制成 8 mg/mL 的溶液备用。

2)洋甘菊乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的测定 酪氨酸酶抑制率的测定参考任红荣[7]的方法并稍加改动。按表 1 准确吸取 T_1、T_2、C_1、C_2 4 组反应液,在 37 ℃的水浴中恒温 20 min 后,各加入 240 μL 酪氨酸酶溶液,充分混匀,反应 30 min 后,迅速冷却以减慢反应,然后移入比色皿中,于 475 nm 处测吸光度 A_{T_1}、A_{T_2}、A_{C_1}、A_{C_2},按公式 1 求抑制率。

$$抑制率=1-[(A_{T_1}-A_{C_1})/(A_{T_2}-A_{C_2})]\times 100\% \quad (1)$$

式中,A_{T_1}为样品和酪氨酸酶在有底物存在时的吸光值;A_{C_1}为样品和酪氨酸酶在无底物存在时的吸光值;A_{T_2}为未添加样品时,酪氨酸酶在有底物存在时的吸光值;A_{C_2}为未添加样品和底物时,酪氨酸酶溶液的吸光值。

表 1 反应液组成与体积

Table 1 Composition and volume of the reaction solution

	T_1	C_1	T_2	C_2
样品/mL	1	1	0	0
底物/mL	1	0	1	0
酪氨酸酶液/μL	240	240	240	240
PBS(pH 6.8)/mL	1.76	2.76	2.76	3.76
合计/mL	4	4	4	4

3)不同体积分数乙醇洗脱物对酪氨酸酶抑制率的测定 根据 1.3.3 中 2)的方法,在反应体系中分别加不同质量浓度的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4 个样品,测定各部分对酪氨酸酶的抑制率。

1.3.4 洋甘菊醇提物 MCI 30%(体积分数)乙醇洗脱物的分离纯化 将 30%(体积分数)乙醇洗脱物用适量的去离子水溶解后,过 MCI 柱(5 cm×100 cm),用 30%(体积分数)的乙醇洗脱,将洗脱液分成 A、B、C 3 个部分。分别将各部分依次过MCI(3 cm×100 cm)

柱和 ODS-A 柱(3 cm×100 cm),经TCL 鉴定纯度,共得 3 个纯化合物 1、2、3。

2 结果与分析

2.1 洋甘菊乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的测定

对洋甘菊体积分数 95%乙醇提物对酪氨酸酶活性的抑制率如图 1。

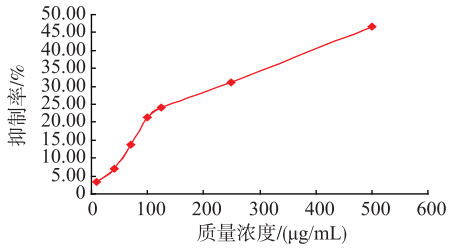


图 1 乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的抑制

Fig. 1 Inhibition of tyrosinase by crude ethanol extract

从图可知,洋甘菊体积分数 95%乙醇提物对酪氨酸酶的活性有抑制作用,并且在提取物质量浓度小于 200 μg/mL 时,抑制率随着质量浓度的增加而增加较快;当提取物质量浓度大于 200 μg/mL 时,抑制率随着质量浓度的增加而较慢。

2.2 不同体积分数乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制作用

对洋甘菊醇提物经 MCI 柱后不同体积分数乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制率如表 2 所示。

由表 2 的实验结果可知,在不同体积分数乙醇洗脱中,30%(体积分数) 乙醇浓度洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制率最灵敏,并且随着样品质量浓度的增加,抑制率趋于平衡。而水洗物和体积分数 70%乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制率都较低。因此,本文针对洋甘菊乙醇粗提物的 30%(体积分数)乙醇洗脱物部位进行进一步的分离纯化研究。

表 2 不同体积分数乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制作用

Table 2 Inhibition of tyrosinase activity by different ethanol concentration elution

样品质量浓度/(μg/mL)	抑制率			
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅴ
10	10.89%	8.24%	26.63%	4.89%
40	12.59%	12.99%	51.87%	5.70%
70	23.80%	27.10%	64.17%	20.94%
100	28.63%	30.39%	65.78%	23.87%
125	39.16%	45.83%	65.78%	44.03%
250	46.04%	57.26%	72.46%	53.34%
500	54.23%	60.02%	75.02%	58.18%

2.3 30%体积分数乙醇洗脱物的分离

对 30%体积分数乙醇洗脱物经反复上 MCI 柱和 ODS-A 柱后,TCL 检测,茴香醛-硫酸显色,得到 3 个单体化合物。

2.4 活性物质的确定

以二甲亚砜为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,将上述 3 个化合物经氢谱和碳谱等光谱数据分析,确定其结构。

1)化合物 1,淡黄色粉状物,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,可溶于水。

由化合物 1 的 ^{1}H-NMR 谱图可知,δ 8.06 处有 2 个质子信号,J=8.9 Hz,δ 6.88 有 2 个质子信号,J=8.9 Hz,说明该化合物中含有 1 个对位取代苯环,这 4 个氢均为苯环上的氢。δ 6.44(1H,d,J=2.0),δ 6.21(1H,d,J=2.0)为苯环上的间位质子信号,是连有羟基的碳邻位碳上的氢。δ 5.46 处的质子信号为糖的端基质子,J=7.1,可知该糖为 β 构型。δ 3.33~δ 4.95 处的质子信号为糖上的其他氢。化合物 1 的 ^{13}C-NMR 数据如表 3 所示,经与文献[9]相比较,可判断该化合物为山奈酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷。其结

表 3 化合物 1、2、3 的 ^{13}C-NMR 数据

Table 3 Signals of carbon in the ^{13}C-NMR 0f 1,2 and 3

碳位	δ/ppm			碳位	δ/ppm		
	1	2	3		1	2	3
C-2	156.9	156.9	157.0	C-3′	116.0	145.9	116.1
C-3	128.6	128.4	128.6	C-4′	161.1	150.3	161.2
C-4	181.9	181.8	182.0	C-5′	116.0	116.0	116.1
C-5	162.9	162.9	162.7	C-1″′	105.3	105.3	105.5
C-6	99.9	99.9	99.6	C-2″	73.1	73.1	73.0
C-7	164.3	164.5	164.4	C-3″	76.4	76.4	76.14
C-8	94.8	94.7	94.7	C-4″	69.6	69.6	69.8
C-9	161.6	161.1	161.4	C-5″	77.2	77.2	74.0
C-10	103.0	103.0	103.1	C-6″	60.6	60.6	
C-1′	120.8	121.1	121.0	OMe	—	56.0	63.3
C-2′	128.6	128.6	128.6	OEth	—	—	27.5

构见图 2 左上。

2)化合物 2,淡黄色粉状物,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,可溶于水。

从化合物 2 的 ^{1}H-NMR 谱可见,δ 6.20,δ 6.40 (1H,d,J=2.0)处各有 1 个质子,为苯环上的间位氢。δ 6.86,δ 7.57,δ 7.59 处各有 1 个质子信号,从偶合常来看是同一个苯环的 3 个氢。δ 5.47(H,d,J=7.0 Hz) 处为葡萄糖端基质子信号,δ 3.45~δ 3.59 为糖上的其他质子信号。化合物 2 的 ^{13}C-NMR 数据表如表 3 所示,化合物 2 中有 21 个碳,其中 6 个碳为糖中的碳,一个为甲氧基。将其余 15 个碳的碳信号与文献[10]参比,可知化合物 2 为应为异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷。其结构见图 2 右上。

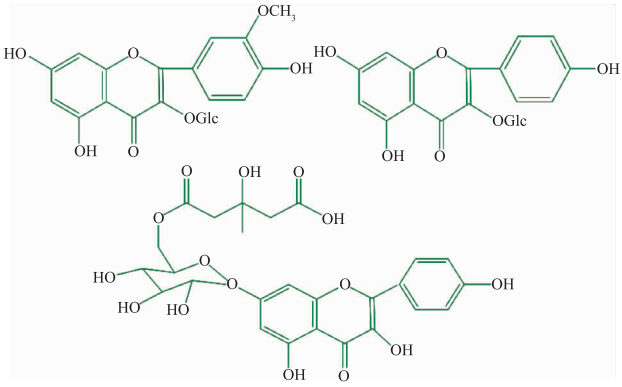


图 2　化合物 1、2、3 的结构

Fig. 2　Structure of the compounds 1–3

3)化合物 3,淡黄色粉状物,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,可溶于水。从 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 谱中可见,化合物 3 与化合物 1 的母环结构一样,2、但不同之处为化合物 3 糖 C6 位连有一个 3-羟基-3-甲基-戊二酰基团。黄酮上连有 3-羟基-3-甲基-戊二酰基团可能是乙酰辅酶 A 或 L-亮氨酸在洋甘菊代谢合成异戊烯二磷酸过程中的中间产物。GABRIELA M.等人[10]在 1996 年就从洋甘菊水提物中分离并解出该化合物。该化合物在洋甘菊中含量较少。其结构见图 2 下。

3 结　语

研究发现,洋甘菊体积分数 95%乙醇提取物对酪氨酸酶的活性有抑制作用,并且经 MCI 柱后 30%(体积分数)乙醇洗脱物对酪氨酸酶的抑制最灵敏。从 30%(体积分数) 乙醇洗脱物中分离得到 3 个化合物, 经 NMR 鉴定为山奈酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山奈酚-3-O-(6"-3-羟基-3-甲基-戊二酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷,都是黄酮类化合物。由此可以推测对酪氨酸酶的活性有抑制作用的成分应是黄酮类,这与文献[11]中报道甘草中胱甘草腚(黄酮类物质)对酪氨酸酶有强抑制作用的报道相类似。因此,本研究确定了洋甘菊美白作用的物质基础,为洋甘菊美白护肤品的开发提供理论依据。

参考文献:

[1] EDDOUKS M. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of Chamaemelum nobile in normal and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2005, 67: 189-195.

[2] OWLIAP, RASOOLI I, SADEFI H. Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L. research[J]. **Journal of Biological Sciences**, 2007, 2(2): 155-160.

[3] ANDERSON C, LIS-BALCHIN M, et al. Evaluation of massage with essential oils on childhood atopic eczema[J]. **Phytother Res**, 2000, 14: 452-456.

[4] WILKINSON S, ALDRIDGE J. An evaluation of aromatherapy massage in palliative care[J]. **Palliat Med**, 1999, 13: 409-417.

[5] SCALA G. Acute, short-lasting rhinitis due to chamomile-scented toilet paper in patients allergic to *Compositae*[J]. **Int Arch Allergy Immunol**, 2006, 139: 330-333.

[6] THORNFELDT C. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future[J]. **Dermatol Surg**, 2005, 7: 873-880.

[7] REN Hongrong, ZHANG Weiming, SHAN Chengying, et al. Study on inhibition of ethanol extract from nymphaea hybrid on the activity of tyrosinase[J]. **Detergent & Cosmetics**, 2009, 32(12): 19-21.(in Chinese)

[8] 孙文基. 天然药物成分 NMR 谱模拟特征及实例[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2009: 78.

[9] 惠永正. 中药天然产物大全[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2011: 2906.

[10] LUO Congyan, MU Chunhai, WANG Yuanji, et al. The isolation of glabridin and inhibitory effect on activity of tyrosinase[J]. **Journal of Shihezi University (Natural Science)**, 2010, 48(4): 479-481.(in Chinese)