

红花中酪氨酸酶抑制成分的快速筛选和分析

李红艳¹, 刘艳杰², 王 倩³, 邹敏杰¹, 姜 民^{4*}, 白 钢⁴

1. 天津嘉氏堂科技有限公司, 天津 300457

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 河南广播电视大学, 河南 郑州 450008

4. 南开大学 药学院, 天津 300071

摘要: **目的** 通过红花中酪氨酸酶抑制剂的筛选, 明确红花中酪氨酸酶抑制剂成分, 为美白祛斑剂的研发提供实验依据。**方法** 采用索氏提取法依次提取红花石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇和水 5 种提取物, 分别检测其对酪氨酸酶的抑制作用; 针对活性组分通过 UPLC-Q/TOF 鉴定活性成分, 并结合分子对接和酶学检测验证药效成分。**结果** 初步筛选结果显示红花水层提取物具有较强的抑制作用, 并进一步通过液相色谱分离, 质谱检测, 以及分子对接预测技术, 推测其中 9 种成分可能具有酪氨酸酶抑制作用, 选取代表性单体羟基红花黄色素 A 进行验证, 确认其具有较强的抑制作用。**结论** 谱效结合构效的筛选模式为天然产物中美白祛斑成分的筛选提供了便捷方法; 红花中羟基红花黄色素 A 对酪氨酸酶具有明显的抑制作用。**关键词:** 红花; 酪氨酸酶抑制剂; 谱效关系; UPLC-Q/TOF

中图分类号: R285.5; R286 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0170-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.016

Quick screening and analysis on components from *Carthami Flos* with tyrosinase inhibitory activity

LI Hong-Yan¹, LIU Yan-jie², WANG Qian³, ZOU Min-jie¹, JIANG Min⁴, BAI Gang⁴

1. Tianjin JiaShiTang Technology Co., Ltd, Tianjin 300457, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. HeNan Radio & Television University, Zhengzhou 450008, China

4. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To confirm the effective inhibitory components through screening the tyrosinase inhibitor from *Carthami Flos*, and to provide a basis for the development of whitening agent. **Methods** Soxhlet extraction system was used by petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water solvent in proper sequence to extract the effective fraction of *Carthami Flos* and to detect the inhibition of tyrosinase activity. UPLC-Q/TOF was used to analyze and identify the active ingredients, and the molecular docking and enzymological method were used to validate their efficacy composition. **Results** The water layer showed a strong inhibition on the activity of tyrosinase. Through UPLC-Q/TOF system and molecular docking prediction technology, nine kinds of compounds were confirmed. Hydroxyl safflower yellow pigment A was validated to have an observable inhibition on tyrosinase activity by comparison with the standard product. **Conclusion** The high throughput screening system established for the white spot component screening provides a convenient method in the natural product. Especially the hydroxyl safflower yellow pigment A extracted from *Carthami Flos* has a significant tyrosinase inhibitory effect.

Key words: *Carthami Flos*; tyrosinase inhibitor; spectrum-activity relationship; UPLC-Q/TOF

拥有白皙亮丽的皮肤, 是现今社会大多数人对美的追求。人们希望通过物理或化学方法达到美白的效果, 但随着美白化妆品中曲酸的泛滥使用出现的一系列问题, 美白产品的安全性引起了广大研究

收稿日期: 2012-12-29

作者简介: 李红艳 (1977—), 女, 高级工程师, 研究方向为植物药在化妆品及健康食品领域的应用。E-mail: lihongyan07@126.com

*通信作者 姜 民 Tel: (022) 23506930 E-mail: minjiang@nankai.edu.cn

者的重视。同时人们也更希望通过天然保护剂的使用使自己拥有白皙的肌肤^[1-4]。因此各国研究者正致力于研发各种新型的、毒副作用少的美白制剂，而从天然植物中提取美白剂成为寻求新型美白剂的重要方向之一。

酪氨酸酶是生物体内参与黑色素合成的关键酶，又称多酚氧化酶、酚氧化酶、儿茶酚氧化酶，是广泛存在于自然界中的含铜多亚基氧化还原酶。在黑色素形成中，酪氨酸作为原料，而酪氨酸酶则是酪氨酸转化为黑色素的主要限速酶。红花作为常用药物在临床上应用极其广泛。包括对心脏系统、血液系统、神经系统等的作用^[5-6]。中药对酪氨酸酶的抑制作用已有报道^[7]，但红花活性成分众多，其调节酪氨酸酶活性成分至今报道尚少。徐鹏等^[8]对 27 味中药的酪氨酸酶抑制作用的筛选中，显示红花具有显著的抑制作用。因此寻找红花中具有抑制酪氨酸酶的活性成分具有重要意义。本实验以红花为研究对象，采用索氏提取法，按溶剂极性大小对红花活性成分进行分段提取，分别检测了各部位的酪氨酸酶抑制率。进而引入谱效关系，通过酶催化底物反应的测定方法结合分离鉴定具有抑制酪氨酸酶的活性成分，并通过计算机辅助药物筛选模型进行验证，以期在获得活性成分的同时建立一种高通量的酪氨酸酶抑制剂筛选及鉴定体系。

1 材料

红花购自天津中医药大学第一附属医院，经南开大学药学院谢春峰博士鉴定为菊科红花属红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花；曲酸（美国 aladdin 公司）；酪氨酸酶（美国 Sigma 公司）；L-多巴（上海斯高勒生物技术有限公司）；二甲基亚砜、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯（天津大学科威有限公司）；甲醇（色谱纯，美国 Tedia）；超纯水由瑞士 Millipore Milli-Q 超纯水系统制备。

酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；日本岛津 20A 高效液相色谱仪；UPLC-Q/TOF 串联质谱仪、Masslynx 工作站（美国 Waters 公司）；JFSD100 粉碎机（上海嘉定粮油仪器有限公司）；R201D II 旋转蒸发器（上海申顺生物科技有限公司）；Mettler Toled 1/10 万电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

2 方法与结果

2.1 红花提取物的制备

取红花 30 g，经粉碎机粉碎，采用索氏提取法，依次以 300 mL 石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇

和水回流提取 3 h，收集提取液，旋蒸浓缩后真空干燥，分别得各提取物 2.0、0.8、1.9、6.1、1.7 g。将各提取物分别溶解于 5% DMSO 助溶于 PBS 缓冲液（pH 6.8）中，配制成 10 μg/mL 的溶液，备用。

2.2 酪氨酸酶抑制活性的测定

准确配制未加中药的加酶混合液（100 μL PBS + 1 500 U/mL 酪氨酸酶溶液 50 μL）、未加中药和酶的混合液（150 μL PBS）、加中药和酶的混合液（100 μL 样品溶液 + 1 500 U/mL 酪氨酸酶溶液 50 μL）以及加中药而未加酶的混合液（50 μL PBS + 100 μL 样品溶液）。分别加入 96 孔板中，25 ℃ 静置 10 min 后，加入 800 μg/mL L-多巴 50 μL，继续静置 1 h 后，于 490 nm 波长处分别测定吸光度值，计算对酪氨酸酶的抑制率。以酪氨酸酶的抑制率表示对酪氨酸酶的抑制作用^[9-10]。

$$\text{抑制率} = [1 - A_1 - A_2] / (A_3 - A_4) \times 100\%$$

A_1 为加中药和酶的混合液； A_2 为加中药而未加酶的混合液； A_3 为未加中药的加酶混合液； A_4 为未加中药和酶的混合液

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计。组间比较采用单因素方差分析 One-way ANOVA。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.4 红花提取物对酪氨酸酶抑制作用的初筛

以曲酸作为阳性对照，未加中药和酶的混合液作为空白对照，测定吸光度值，计算抑制率。红花各提取物对酪氨酸酶的抑制作用见表 1。结果显示，水提取物具有显著的酪氨酸酶抑制作用，而其他各提取物的抑制作用不显著。

表 1 红花提取物对酪氨酸酶的抑制作用的初筛结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Comparison of tyrosinase inhibitory rate of different extract fractions from *Carthami Flos* ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

样 品	抑制率 /%
空白	0.030 ± 1.470
曲酸	68.515 ± 0.980***
石油醚	-11.986 ± 1.080
氯仿	-7.484 ± 0.940
醋酸乙酯	-7.841 ± 1.220
正丁醇	-6.202 ± 1.040
水	21.586 ± 1.720*

与空白组比较：* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs blank group

2.5 红花水提取物的 HPLC 分离

HPLC 色谱条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相水 (A) - 甲醇 (B), 二元梯度洗脱: 0~15 min 5%~50% B, 15~25 min 50%~75% B, 25~35 min 75%~100% B, 35~48 min 保持 100% B, 48~50 min 100%~5% B; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量 50 μL。

取红花水提取物溶于甲醇, 配制成 3 mg/mL 待测溶液, 采用 HPLC 法分离活性成分, 见图 1。

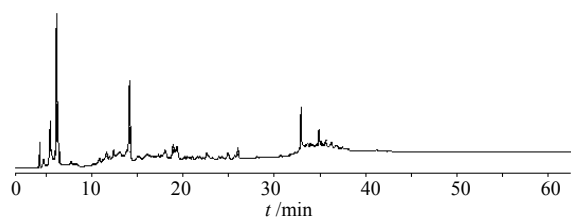


图 1 红花水提取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of water extract from *Carthami Flos*

分别按时间收集分离样品, 减压真空干燥后, 检测其对酪氨酸酶的抑制活性, 结果见表 2。10~30 min 收集的样品对酪氨酸酶具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。

表 2 红花水提取物不同分离时间段样品对酪氨酸酶活性的抑制 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Tyrosinase inhibition activity of samples with different separation periods from *Carthami Flos* water extract ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间/min	抑制率/%
0~5	12.346±0.920
5~10	8.235±0.470
10~15	30.968±1.060***
15~20	27.012±1.900***
20~25	25.105±1.700***
25~30	23.045±0.180***
30~35	5.096±0.740
35~40	6.912±0.640
45~50	11.675±0.990
50~55	3.646±1.530
空白	0.013±0.030

与空白组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.01$ vs blank group

2.6 红花 HPLC 收集部位的 UPLC-Q/TOF 鉴定

UPLC 色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈

色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.2% 醋酸水 (B); 梯度条件: 0~7 min A 相从 2% 线性梯度上升到 30%, 7~10 min A 相线性梯度上升到 75%, 10~13 min A 相线性梯度上升到 100%, 13~18 min 维持 A 相 100%, 18~19 min A 相线性梯度下降到 2%, 19~20 min A 相维持 2%; 进样量 6 μL; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 °C; DAD 扫描波长范围 190~400 nm; 分析时间 20 min。

质谱条件: ESI 源, 负离子检测模式。扫描范围: m/z 50~2 000, 毛细管电压为 3 kV (负模式)。锥孔电压 30 V, 脱溶剂气为氮气, 350 °C, 600 L/h, 源温 100 °C。二级质谱能量 30 V。

数据采集工作站为 MassLynx 4.0。

收集合并高活性组分进一步进行 UPLC-Q/TOF 鉴定, 色谱图见图 2。

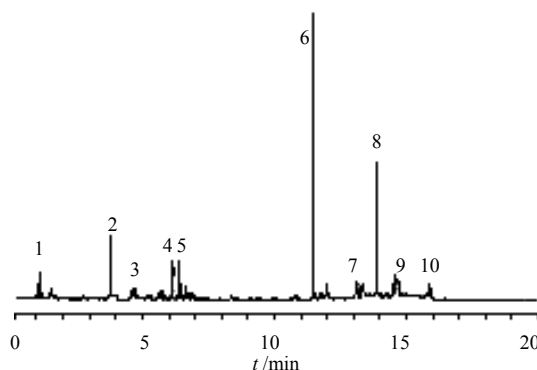


图 2 红花水提取物的负离子模式离子流图

Fig.2 Total negative ion chromatogram of water extract from *Carthami Flos*

2.7 计算机辅助药物分子模拟对红花 HPLC 收集部位的筛选

采用了分子对接软件 Autodock 4.2 对鉴定的化合物分别与酪氨酸酶进行分子对接, 以评估其结合能力。分子对接所使用的蛋白晶体结构为双孢菇酪氨酸酶 2y9x (Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase 的晶体结构)。格点计算参数: grid center=-9.96、-28.676、-43.432, grid spacing=0.375, npts=50、50、50。对接参数: ga_run=200, qstep=30, dstep=30。

依据文献报道、精确相对分子质量以及离子碎片信息^[11], 共计确定了 10 个主要成分。采用计算机辅助药物分子评价, 分析预测各成分与酪氨酸酶的结合能力。结果见表 3。除硬脂酸外, 其他 9 种成分均可能具有一定的抑制作用。

表 3 红花水提取物中成分的鉴定数据和活性预测

Table 3 Identification data and activity predictions of components in water extract from *Carthami Flos*

峰号	<i>t</i> /min	相对分子质量	质 谱 <i>m/z</i>	化合物	活性预测
1	1.26	788	787[M-H] ⁻ 、624[M-H-C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁻	杨梅树皮素-3- <i>O</i> - α -L-(2- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖基)吡喃鼠李糖苷	强结合力
2	3.91	612	611[M-H] ⁻ 、419[M-H-BA] ⁻ 、473[M-H-BA-H ₂ O] ⁻	羟基红花黄色素 A	强结合力
3	4.71	788	787[M-H] ⁻ 、625[M-H-Glu] ⁻ 、463[M-H-2Glu] ⁻	6-羟基山柰酚-3,6,7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	强结合力
4	6.13	1 044	1 043[M-H] ⁻ 、1 025[M-H-H ₂ O] ⁻ 、1 007[M-H-2H ₂ O] ⁻ 、923[M-H-BA] ⁻ 、863[M-H-Glu] ⁻	脱水红花黄色素 B	强结合力
5	6.51	594	593[M-H] ⁻ 、285[M-H-Glc-C ₉ H ₇ O ₂] ⁻	红花黄色素 A	强结合力
6	11.59	340	339[M-H] ⁻ 、311[M-H-CO] ⁻	2',4'-二羟基-7-甲氧基-8-异戊烯基黄烷	强结合力
7	13.23	444	443[M-H] ⁻ 、282[M-H-C ₇ H ₁₃ O ₄] ⁻	山柰酚 7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	强结合力
8	14.21	640	639[M-H] ⁻ 、476[M-H-C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁻	异鼠李素-3,4'-二葡萄糖苷	强结合力
9	14.85	284	283[M-H] ⁻ 、237[M-H-COOH] ⁻	硬脂酸	弱结合力
10	15.94	612	611[M-H] ⁻ 、449[M-H-Glc] ⁻ 、286[M-H-2Glu] ⁻	4,5-二羟基黄铜-6,7-二氧吡喃葡萄糖苷	强结合力

2.8 对酪氨酸酶抑制作用的方法确证

选取红花中具有典型性的成分羟基红花黄色素 A 以及阳性药物曲酸分子，分别检测其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见图 3。

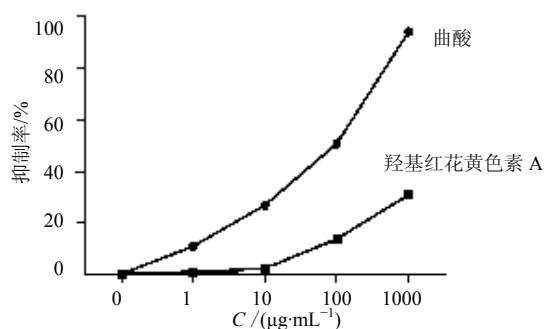


图 3 酪氨酸酶抑制率曲线

Fig. 3 Inhibitory curves of tyrosinase

结果显示羟基红花黄色素 A 具有一定的抑制效果。其中羟基红花黄色素 A 质量浓度在 1 g/mL 时的抑制率可以达到 30.8%。酪氨酸酶抑制活性的分析结果与药物分子对接预测结果一致，提示该方法有较好的可信性。

3 讨论

中药中有效成分的筛选一直是先导化合物的主要来源之一^[12]。中药谱效关系研究常用于中药活性成分靶向性筛选^[13]。明确中药中起作用的成分已成为中药现代化发展的关键因素，这也是中药走进国际市场的重要条件。在对天然植物美白祛斑的筛选中，本实验采用高效液相色谱对有效部位进行分段，通过液质联用技术对活性成分进行鉴定，结合分子对接评价技术进行预测，并进一步通过单体验证以确定具有美白祛斑效果的有效成分。本实验采用的研究方法不仅可以避免研究过程中需要样品量大、分离鉴定时间长的问题，而且通过构效关系还可以更有目的筛选到天然植物中具有活性的有效成分，为筛选安全性高、毒副作用少的天然植物来源美白祛斑剂提供了方法参考。

参考文献

- [1] Gupta A K, Gover M D, Nouri K, *et al.* The treatment of melasma: a review of clinical trials [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 55(6): 1048-1065.
- [2] Giroir L E, Huff W E, Kubena L E, *et al.* Toxic effects of kojic acid in the diet of male broilers [J]. *Poult Sci*, 1991,

- 70(3): 499-503.
- [3] 陈永红, 邹志飞, 王 岚, 等. 曲酸对动物的毒性研究及安全性评价 [J]. 食品科学, 2007, 28(9): 536-540.
- [4] 陈永红, 黄夏宁, 邹志飞, 等. 曲酸遗传毒性的研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(3): 228-232.
- [5] 朴永哲, 金 鸣, 藏宝霞, 等. 红花黄色素改善大鼠缺氧心肌能量代谢的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 436-439.
- [6] 刘 发, 魏 苑, 杨新中, 等. 红花黄素对高血压大鼠的降压作用及对肾素-血管紧张素的影响 [J]. 药学学报, 1992, 27(10): 785-787.
- [7] 刘艳杰, 王 倩, 姜 民, 等. 基于谱效-构效关系筛选大黄中酪氨酸酶活性抑制成分的方法研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2120-2126.
- [8] 徐 鹏, 钱 竹, 章克昌, 等. 27 味中药醇提物对酪氨酸酶体外活性的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 986-988.
- [9] Huang X H, Chen Q X, Wang Q, *et al.* Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids [J]. *Food Chem*, 2006, 94(1): 1-6.
- [10] Han P, Chen C Q, Zhang C L, *et al.* Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities [J]. *Food Chem*, 2008, 107(2): 797-803.
- [11] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分集 [M]. 第 3 卷. 北京: 科学出版社, 2009: 346.
- [12] 杜冠华, 刘艾林, 张 莉, 等. 天然产物中先导化合物的快速发现技术 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 328-331.
- [13] Hou Y, Cao X, Dong L, *et al.* Bioactivity-based liquid chromatography-coupled electrospray ionization tandem ion trap/time of flight mass spectrometry for β_2 AR agonist identification in alkaloidal extract of *Alstonia scholaris* [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1227: 203-209.