

具有酪氨酸酶抑制活性的丹参有效成分筛选研究

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 筛选丹参中对酪氨酸酶活性具有抑制作用的有效成分。方法 基于受试物抑制酪氨酸酶催化底物 L-多巴的反应原理, 将丹参经 80%乙醇提取后依次经石油醚、氯仿、醋酸乙酯、饱和正丁醇和水 5 种不同极性溶剂萃取, 分别检测各提取部位对酪氨酸酶活性的抑制作用; 并通过 UPLC-MS/MS 技术鉴定活性最强提取部位化学成分, 结合分子对接技术预测各成分潜在活性, 并通过酶学检测验证。结果 丹参氯仿萃取层具有较强的酪氨酸酶抑制活性。其生物活性与丹参素、原儿茶醛等 6 种成分有关, 酶学检测验证结果与筛选结果一致。结论 丹参中丹参素和原儿茶醛等成分对酪氨酸酶活性具有显著的抑制作用。

关键词: 丹参; 酪氨酸酶; 美白祛斑; 活性成分筛选

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)02-0085-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.002

Screening of active components in *Salvia miltiorrhiza* with inhibition on tyrosinase

LI Hong-yan¹, LIU Yan-jie², WANG Qian¹, ZOU Min-jie³, 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 screen the active components in *Salvia miltiorrhiza* with the inhibitory activity against tyrosinase. **Methods** The method of L-Dopa oxidization reaction was employed to detect the tyrosinase activity. *S. miltiorrhiza* was first extracted by 80% ethanol and then extracted by PE, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O. The inhibition of the different fractions on tyrosinase was detected. UPLC-MS/MS was used to analyze and identify the active components in the fraction with the strongest inhibition. Molecular docking was used to predict the potential activity and enzymological method was used to validate their efficacy components. **Results** The chloroform fraction showed a strong inhibition on tyrosinase activity. The bioactivities had the relationship with six components, such as tanshinol and protocatechualdehyde, etc. Enzymological method showed the same results with the screening. **Conclusion** Tanshinol, protocatechualdehyde, and so on in *S. Miltiorrhiza* have the significant inhibition on tyrosinase.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; tyrosinase; whitening freckle; active components screening

随着社会的发展, 人们在对衣食住行有了更高追求的同时, 对个人的形象也有了更高的要求。雀斑、晒斑、黄褐斑、妊娠斑及老年斑等色素沉着是影响个人形象的主要问题之一。美白护肤品是减少各种色素沉着的主要手段, 已受到国内外众多化妆品公司的高度重视。当前, 美白祛斑化妆品主要通过以下几方面达到美白祛斑的效果: 在细胞内通过

抑制酪氨酸酶或黑色素生成的中间体来抑制黑色素的生成; 或通过刺激角质细胞使黑色素减少, 淡化黑色素; 在胞外通过抑制内皮素-1 和内皮素-2 减少黑色素生成^[1]; 又或者通过减少紫外线的照射来减少黑色素的生成^[2]。但在众多方法中对酪氨酸酶的抑制仍是美白化妆品研制的主要方向。

丹参为唇形科植物丹参的干燥根和根茎, 性味

收稿日期: 2013-01-05

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

苦,微寒,归心、肝经。具有活血祛瘀,通经止痛,清心除烦,凉血消痛的功效^[3]。丹参在临床上应用相当广泛,在扩张血管、保护心肌细胞、抗血栓形成、降血脂、改善微循环、保护肝细胞、抗氧化、抗肿瘤、抗菌消炎等方面都发挥着重要作用^[4-8]。也有研究报道,丹参提取物对酪氨酸酶活性具有一定的抑制作用^[9]。目前上市的绝大多数复方中药美白祛斑产品中都会加入一定剂量的丹参^[10-11]。但关于丹参中对酪氨酸酶活性具有抑制作用的成分报道尚少,寻找丹参中对酪氨酸酶具有抑制作用的有效成分可以为寻求安全性高、毒副作用小的天然植物美白剂提供实验依据。

1 实验材料和仪器

1.1 材料

丹参,购自天津中医药大学第一附属医院,经南开大学谢春峰老师鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎; L-多巴 (L-DOPA, 上海斯高勒生物技术有限公司); 酪氨酸酶 (Tyrosinase, 美国 Sigma 公司); 曲酸 (Kojic acid, 美国 Sigma)。

1.2 仪器

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

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

丹参样品粉碎后过 20 目筛,准确称取丹参粗粉 100 g,经 80%乙醇进行回流提取后依次经石油醚、氯仿、醋酸乙酯、饱和正丁醇和水 5 种溶剂萃取。收集各层萃取液,置旋转蒸发仪浓缩后真空干燥,得石油醚部位 3.15 g、氯仿部位 4.05 g、醋酸乙酯部位 3.95 g、正丁醇部位 3.20 g 以及水提取部位 20.10 g。将各部位提取物分别溶解于 5% DMSO 助溶的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.8) 中,配成 100 μg/mL 中药提取液,于 4 °C 冰箱中保存备用。

2.2 试剂配制

酪氨酸酶的配制:取 1 881 U/mg 的酪氨酸酶,以 PBS 配成 0.8 mg/mL 的溶液。L-多巴溶液的配制:以 PBS 配成 0.05% 的溶液,待用。

2.3 丹参提取物对酪氨酸酶抑制作用的测定方法

测定前,配制 C₁ 测试样:100 μL PBS 加入 50 μL 酪氨酸酶溶液; C₂ 测试样:150 μL PBS; T₁ 测试样:100 μL 样品溶液加入 50 μL 酪氨酸酶溶液; T₂ 测试样:50 μL PBS 加入 100 μL 样品溶液,各测试样分别加入 96 孔板中,25 °C 水浴恒温反应 10 min,加入 50 μL L-Dopa 溶液,继续 25 °C 水浴恒温反应 1 h,反应结束后立即于 490 nm 处分别测定 C₁、C₂、T₁、T₂ 的吸光度 A_{T1}、A_{T2}、A_{C1}、A_{C2},以酪氨酸酶的抑制率表示对酪氨酸酶的抑制作用^[12-13]。

$$\text{酪氨酸酶的抑制率} = 1 - (A_{T1} - A_{T2}) / (A_{C1} - A_{C2})$$

2.4 丹参氯仿部位谱效关系分析

取活性最强的丹参氯仿层萃取物溶于甲醇配成 3 mg/mL 待测溶液,采用 HPLC 分离活性成分。HPLC 条件:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A) - 甲醇 (B); 二元梯度洗脱:0~10 min 20%~50% B 相; 10~30 min, 50%~75% B 相; 30~40 min, 75%~100% B 相; 40~48 min, 100% B 相; 48~50 min, 100%~20% B 相。体积流量为 1 mL/min,检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量 100 μL。分别以每分钟为一个时间段收集分离样品,减压真空干燥后,将样品溶解于 1 mL PBS 中,按照“2.3”项下酪氨酸酶催化底物发生反应的测定方法检测 HPLC 分离的各时间段对酪氨酸酶的抑制活性。收集合并检测结果中高活性组分进行 UPLC-Q/TOF 成分鉴定。

UPLC 液相色谱条件:Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相乙腈, B 相 0.2% 乙酸水 (梯度洗脱程序: 0~2.5 min, 20%~27% A 相; 2.5~6 min, 27%~45% A 相; 6~20 min, 45%~100% A 相; 20~23 min, 100% A 相; 23~24 min, 100%~20% A 相; 24~25 min, 20% A 相。进样量 6 μL; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 °C; DAD 扫描波长 190~400 nm; 分析时间 25 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 35 V。数据采集工作站为 MassLynx 4.0。

2.5 计算机辅助药物分子模拟筛选

采用分子对接软件 Autodock 4.2 对上述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)。格点计算参数如下: grid center = -9.96, -28.676, -43.432; grid spacing = 0.375; npts = 50, 50, 50。对接参数如下: ga_run = 200; qstep = 30; dstep = 30。

2.6 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)。

3 结果

3.1 丹参各提取部位对酪氨酸酶抑制作用

不同极性溶剂丹参萃取物对酪氨酸酶抑制作用的结果显示, 丹参氯仿萃取物对酪氨酸酶具有显著抑制作用 (图 1)。

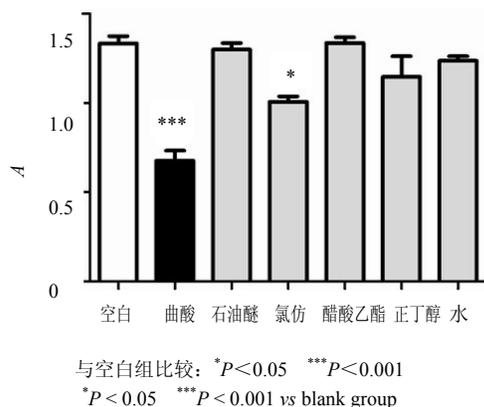


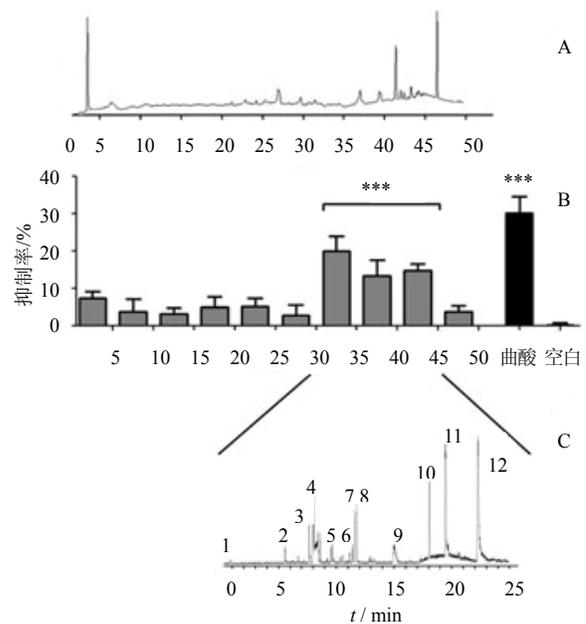
图 1 丹参各提取部位对酪氨酸酶抑制活性 ($n=6$)

Fig. 1 Inhibition of different fractions from *S. miltiorrhiza* on tyrosinase ($n=6$)

3.2 丹参酪氨酸酶抑制部位的谱效关系分析

取丹参氯仿部位萃取物经 HPLC 分离后进行谱效关系分析, 结果见图 2, 30~45 min 收集的样品对酪氨酸酶具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。收集具有活性部分的样品进行 UPLC-Q/TOF 鉴定, 依据文献报道、精确分子量以及离子碎片信息^[14], 共确定了 12 个主要成分 (表 1)。

采用计算机辅助药物分子评价, 分析预测上述丹参成分与酪氨酸酶的结合能力 (表 1)。分析结果显示原儿茶醛、丹参素、2, 4, 4'-三羟基查耳酮对酪氨酸酶具有明显的抑制作用, 其中原儿茶醛、丹参素含邻二苯酚结构, 与酪氨酸酶的活性中心铜离子产生络合反应, 且由于分子结构小, 易于进入酶反应腔与之发生反应, 因此具有明显的抑制作用; 2, 4, 4'-三羟基查耳酮的间苯二酚结构中 2 位羟基可以与 CuII 反应中心络合, 同时 4 位羟基与主链上的羰基形成氢键, 因此对酪氨酸酶可能具有更强抑制



与空白组比较: *** $P < 0.001$

A-丹参氯仿层液相展开图 B-酪氨酸酶活性抑制率结果 C-丹参具有酪氨酸酶抑制活性部位负离子模式离子流图

*** $P < 0.01$ vs blank group; A-Liquid chromatogram of chloroform fraction of *S. miltiorrhiza*; B-Inhibitory capability against tyrosinase activity; C-Total negative ion chromatogram of components with inhibitory activity against tyrosinase

图 2 丹参谱效关系分析图

Fig. 2 Spectrum-activity relationship analysis of *S. miltiorrhiza*

作用; 3-(4-羟基苯亚甲基)-5, 7-二羟基苯并二氢吡喃-4-酮含有间苯二酚结构, 同样可与酪氨酸酶发生络合反应并与主链上的羰基形成氢键; 毛刺锦鸡儿酚、加雷决明酚 E 由于其结构中都含有茛菪类结构中的间苯二酚结构, 因此能与酪氨酸酶发生反应, 但由于毛刺锦鸡儿酚、加雷决明酚 E 的空间构型对进入酶的空腔结构可能会产生空间位阻, 因此活性可能相对降低。丹参中潜在的酪氨酸酶抑制成分结构见图 3。

3.3 丹参中酪氨酸酶抑制剂的验证

根据筛选结果, 选取原儿茶醛、丹参素, 以曲酸为阳性药, 采用“2.3”项下方法分别检测其对酪氨酸酶的抑制作用。结果显示原儿茶醛与丹参素对酪氨酸酶均具有抑制作用, 且原儿茶醛的抑制作用明显高于丹参素。当单体质量浓度为 1 mg/mL 时, 原儿茶醛的抑制率达到 50.5%, 丹参素的抑制率为 21.8% (图 4)。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。

4 讨论

酪氨酸酶抑制剂通过抑制酪氨酸酶的活性或干扰黑色素生成的中间体两方面来防止黑色素的生成

表1 丹参氯仿层中主要成分的UPLC/MS/MS鉴定及活性预测

Table 1 UPLC/MS/MS identification and activity prediction of main components in chloroform fraction of *S. miltiorrhiza*

峰号	t/min	相对分子质量	质谱 (m/z)	化合物	活性预测
1	0.61	198	395 [2M-H] ⁻ , 197 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 135 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	丹参素	+
2	5.36	330	329 [M-H] ⁻ , 287 [M-H-CH ₂ CO] ⁻ , 245 [M-H-2CH ₂ CO] ⁻	条叶蒽素	-
3	7.48	138	137 [M-H] ⁻ , 109 [M-H-CO] ⁻	原儿茶醛	+
4	7.91	360	359 [M-H] ⁻ , 197 [C ₉ H ₁₀ O ₅ -H] ⁻ , 179 [M-C ₉ H ₈ O ₄] ⁻ , 161 [M-H-2C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁻ , [C ₉ H ₁₀ O ₅ -H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	迷迭香酸	-
5	9.51	486	485 [M-H] ⁻ , 241 [M-C ₁₄ H ₁₂ O ₄] ⁻ , 226 [M-C ₁₄ H ₁₂ O ₄ -H ₂ O] ⁻	毛刺锦鸡儿酚	+
6	10.44	572	571 [M-H] ⁻ , 528 [M-H-C ₃ H ₇] ⁻	弥罗松酚 (铁锈醇)	-
7	11.42	418	417 [M-H] ⁻ , 373 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 197 [C ₉ H ₁₀ O ₅ -H] ⁻ , 175 [M-H-CO ₂ -C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁻	丹参酚酸 D	-
8	11.64	494	493 [M-H] ⁻ , 295 [M-H-C ₉ H ₁₀ O ₅] ⁻	丹参酚酸 A	-
9	14.95	486	485 [M-H] ⁻ , 467 [M-H-H ₂ O] ⁻ ,	加雷决明酚 E	+
10	18.06	280	279 [M-H] ⁻ , 261 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 233 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻	去氢丹参新酮	-
11	19.45	256	255 [M-H] ⁻ , 161 [M-C ₆ H ₆ O] ⁻	2,4,4'-三羟基查耳酮	+
12	22.32	284	283 [M-H] ⁻ , 265 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 237 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻	3-(4-羟基苯亚甲基)-5,7-二羟基苯并二氢吡喃-4-酮	+

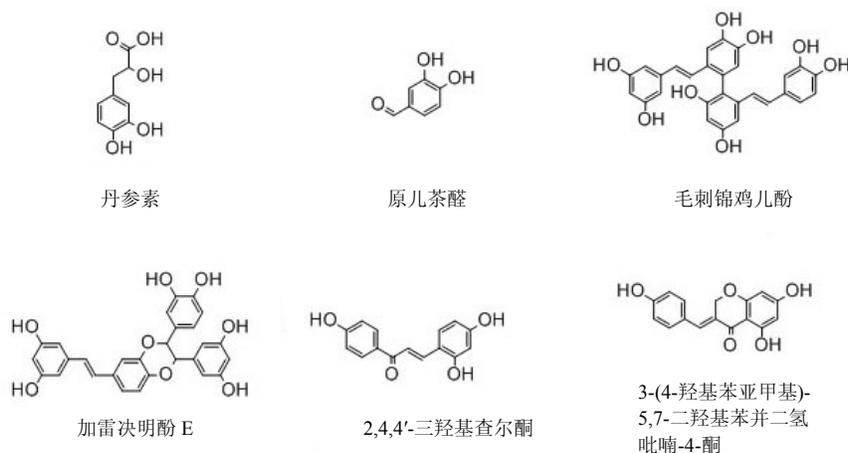


图3 丹参中潜在的酪氨酸酶抑制成分结构

Fig. 3 Structures of components with potential inhibition on tyrosinase

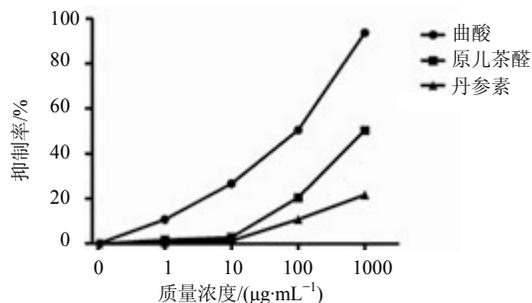


图4 酪氨酸酶抑制率曲线

Fig. 4 Inhibition curves on tyrosinase

以达到美白祛斑的效果^[15]。酪氨酸酶抑制剂的发现已有 50 余年, 曲酸由于作用的高效性引起众多学者的注意^[16-17]。然而, 近些年的医学实验研究表明, 曲酸在长时间使用后, 会对人的皮肤细胞、血液生化乃至内脏等产生严重的毒副作用^[18-20]。因此, 从传统中药中寻找安全有效的酪氨酸酶抑制剂已逐渐成为新的研究热点。

本实验的结果显示丹参的氯仿层抑制酪氨酸酶活性明显强于其他各层, 因此提示在进行源自中药的酪氨酸酶抑制剂筛选研究中除传统的醇水提取方

法外还可考虑其他提取方法,以避免漏筛及最大化中药利用度。同时对酪氨酸酶抑制作用的构效关系研究,可以为新型酪氨酸酶抑制剂的研发提供更有价值的理论依据。以往研究结果表明苯环上有单羟基取代的化合物对酪氨酸酶均表现为竞争性抑制类型,且邻位、间位和对位的取代化合物对酪氨酸酶均有不同程度的抑制作用^[21-22]。从植物中提取的具有芪类结构的化合物抑制作用为曲酸的32倍,表明芪类结构中的间苯二酚发挥着重要作用^[23-25]。这与本文的实验结果一致。本文的实验结果显示,具有邻二苯酚结构的原儿茶醛、丹参素同样表现出了明显的抑制作用,且当单体质量浓度为1 mg/mL时,原儿茶醛抑制率达到50.5%,丹参素抑制率为21.8%。

中药制剂因其成分复杂限制了其临床应用^[26],分离和筛选中药制剂中的生物活性成分,对阐明其药效物质基础和作用机制具有重要意义。而基于系统生物学的高通量筛选是一种快速的分析大量的潜在中药中有效成分的分析方法^[27-28]。本研究选用高效液相色谱与飞行质谱联用的分析方法,因其具有高准确性,高分辨率,高敏感性,以及具有精确分子量与结构信息相结合的优势而被广泛应用于中药化学成分分析^[29-30]。结合分子对接技术可以预测中药化学成分的潜在活性,为进一步研究指明方向。本研究结果显示,丹参酪氨酸酶抑制活性与丹参素和原儿茶醛等成分密切相关,为进一步开发高效安全的酪氨酸酶抑制剂提供了实验依据。

参考文献

[1] Prota G. Melanins and melanogenesis [M]. UK: Academic Press, 1992.

[2] 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): 73-75.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[4] Liu A H, Lin Y H, Yang M, et al. Development of the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSⁿ [J]. *J Chromatogr*, 2007, 846: 32-41.

[5] 宋延平, 孔令姍, 吴静, 等. 丹酚酸 A 与丹酚酸 B 改善大鼠心肌缺血作用比较 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(9): 36-37.

[6] 胡爱萍, 潘亚梁, 叶治国. 丹参对缺氧/复氧心肌的保护作用涉及百日咳毒素敏感的 G 蛋白 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21, (5): 358.

[7] 王健, 嵩阳, 柴艳峰, 等. 苦参素注射液联合复方丹参注射液治疗慢性乙型肝炎 38 例 [J]. 中国药业, 2006, 15(1): 70.

[8] 胡咏武, 王胜春, 李哲. 丹参酮 II A 对 LPS 等诱导的

肝细胞损伤及枯否细胞释放细胞因子的作用 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(12): 1482-1486.

[9] 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(6): 986-988.

[10] 王海平, 杜喜平. 中草药复方祛斑美白组合物及外用制剂 [P]. 中国专利: CN. 102028752 A, 2011-04-27.

[11] 马艳荣. 一种纯中药美白面膜 [P]. 中国专利: CN 102113980 A, 2011-07-06.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分集 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.

[15] 仲少敏, 赵俊郁, 朱学骏, 等. Tri-Luma, 曲酸和熊果苷对人体黑化模型的脱色效果分析 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2007, 21(6): 321-323.

[16] 刘玮, 张怀亮. 皮肤科学与化妆品功效评价 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 103-106.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] Cohen M H, Sandler L, Hrbek A, et al. Eisenberg DM Policies pertaining to complementary and alternative medical therapies in a random sample of 39 academic health centers [J]. *Altern Ther Health Med*, 2005, 11: 36-40.

[22] Halai R, Cooper M A. Using label-free screening technology to improve efficiency in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7: 123-131.

[23] Warzecha C C, Hovhannisyan R, Carstens R P. Dynamic fluorescent and luminescent reporters for cell-based splicing screens [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 867: 273-287.

[24] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 7109-7122.

[25] Zeng J, Zhang X, Guo Z, et al. Separation and identification of flavonoids from complex samples using off-line two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1220: 50-56.