

荞麦蜂花粉抑制酪氨酸酶活性成分研究

王 晶, 徐德平*

江南大学食品学院, 无锡 214122

摘要: 本实验研究了荞麦蜂花粉乙醇提取物不同组分对蘑菇酪氨酸酶活性的影响, 并对其有效成分进行了分离及鉴定。结果表明: AB-8 大孔树脂 50% 乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制效果最明显, 该部分经 MCI、ODS 柱分离, 得到了三种鞣质类单体化合物: 1,2,3,4,6-五-O-没食子酰-D-葡萄糖(1)、1,2,3,4,6-五-O-没食子酰-2-O-间-双没食子酰-D-葡萄糖(2)、葡萄糖上连了 9 个没食子酰基团的物质(3)。这三个化合物是首次从荞麦蜂花粉中分离、鉴定的鞣质类物质, 在浓度为 1 mg/mL 时, 化合物 1、2、3 对酪氨酸酶的抑制率分别为: 60.77%、78.25%、53.64%。

关键词: 荞麦蜂花粉; 酪氨酸酶; 分离; 鉴定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.019

Tyrosinase-Inhibition Components from Buckwheat Bee Pollen Extract

WANG Jing, XU De-ping*

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: This study was aimed to investigate the effect of Buckwheat Bee Pollen ethanol extract on tyrosinase activity. The results showed that 50% ethanol extract was the most sensitive part for inhibiting tyrosinase activity. Then three pure tannin compounds were further separated from this part by MCI and ODS column: 1,2,3,4,6-five-O-galloyl-D-glucose (1), 1,2,3,4,6-five-O-galloyl-2-O-between-double galloyl -D-glucose (2) and glucose that connected nine galloyl (3). These three compounds were firstly isolated and identified from Buckwheat Bee Pollen. When the concentration of compound 1, 2 and 3 was 1 mg/mL, their inhibition rates on tyrosinase were: 60.77%, 78.25% and 53.64%, respectively.

Key words: Buckwheat Bee Pollen; tyrosinase; isolation; structural identification

荞麦 (*Fagopyrum esculentum* Moench.) 为蓼科荞麦属草本双子叶植物, 荞麦蜂花粉是蜜蜂从荞麦花中采集花粉后, 与自身腺体分泌的物质及唾液混合后, 形成的不规则扁圆形团状物, 富含人体所需的多种营养物质。林春榕等研究显示^[1]: 荞麦蜂花粉多糖能降低四氧嘧啶 (ALX) 性糖尿病大鼠高血糖、高血脂。周玲仙等研究证实^[2]: 荞麦蜂花粉具有和硫酸亚铁相似的抗缺铁性贫血作用。此外荞麦蜂花粉还具有消炎、抗氧化、治疗和预防前列腺疾病等功能^[3-5]。

酪氨酸酶, 又称多酚氧化酶, 它的活性与黑色素合成量相关, 控制其活力即可控制黑素生成量^[6,7]。酪氨酸酶抑制剂可以治疗目前常见的色素沉积导致的皮肤病, 如雀斑、黄褐斑、老年斑等^[8], 市场上流行的美白化妆品中, 增白剂多是酪氨酸酶抑制剂, 如

熊果苷、槲皮素及一些中药提取物等^[9,10]。

在荞麦蜂花粉产地, 大部分的荞麦蜂花粉销往美容院, 并流传着荞麦蜂花粉具有美白功效的说法, 用荞麦蜂花粉和蜂蜜做美白面膜的方法也很流行, 但目前国内外对荞麦蜂花粉的美白功能性研究较少。基于此, 本文研究了荞麦蜂花粉对酪氨酸酶活性的抑制作用, 旨在明确荞麦蜂花粉中的美白功效成分, 为其在美白方面的应用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

荞麦蜂花粉, 购于内蒙古库伦旗蜂场, 经江苏省植物所徐增莱鉴定为荞麦花粉; GF₂₅₄ 硅胶板 (山东烟台芝罘化工厂); AB-8 型大孔吸附树脂 (天津南开大学化学工厂产品); Octadecylsilyl (ODS) 填料 (Nacalai Tosoh Inc); Middle Chromatogram Isolated Gel (MCI GEL) 填料 (Mitsubishi Chemical Corpora-

收稿日期: 2016-06-29 接受日期: 2016-09-29

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP21127)

* 通讯作者 Tel: 86-018015355328; E-mail: xdp1219@sina.com

tion);L-酪氨酸(生化级,国药集团化学试剂有限公司);酪氨酸酶(生化级,上海宝曼生物科技有限公司);磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为去离子水。

1.2 实验仪器

CLF-205 型磨粉机(浙江省温州市创立药材器械厂);RAT-100 型萃取罐(无锡申科仪器有限公司);R-1002 型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器厂);SYB106-100 型恒流泵(天津市科器高新技术公司),ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂);WFJ 2000 型可见分光光度计(优尼柯上海仪器有限公司);核磁共振仪(Avance 500 MHz, Bruker 公司)。

2 实验方法

2.1 荞麦花粉醇提物的制备

荞麦花粉经粉碎后,按料液比 1:10(m/V)加入 80% 的乙醇,于 35 °C 条件下搅拌提取 3 h,过滤取上清液,如此重复 3 次。将 3 次所得上清液减压浓缩去乙醇后即得荞麦花粉醇提物,于-18 °C 保存备用。

2.2 酪氨酸酶抑制率的测定

2.2.1 溶液的配制

2.2.1.1 缓冲溶液(PBS)

准确称取 Na_2HPO_4 3.55 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.9 g,分别用去离子水溶解后混合,定容至 1000 mL,用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.8,配成 25 mmol/L 的缓冲溶液,置于 4 °C 冰箱中待用。

2.2.1.2 酪氨酸酶溶液

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,用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.8,然后定容至 100 mL,置于 4 °C 冰箱中待用。

2.2.1.3 酪氨酸酶溶液

将酪氨酸酶用已配好的磷酸缓冲液溶解分装于 PE(聚乙烯塑料)管,置于-18 °C 冰箱中保存。

2.2.1.4 阳性对照

洋甘菊提取物是目前常见进口美容护肤品中美白成分,并已有大量文献所道,同时我们对洋甘菊的抑制酪氨酸酶的作用有深入研究基础,其活性是确定的;而被人们誉为“美白黄金”光甘草脛很难得到且价格过高,熊果苷不溶于水,给实验带来误差。因此本实验选取洋甘菊提取物作阳性对照。

洋甘菊经水蒸汽蒸馏法去除挥发性成分后得到的残渣,按料液比 1:5(m/V)加 95% 的乙醇,于 50 °C 条件下搅拌提取 3 h,过滤取上清,如此重复 2 次。将 3 次所得上清减压浓缩去乙醇后即得洋甘菊醇提物,-20 °C 保存备用。

2.2.2 样品对酪氨酸酶抑制率的测定

酪氨酸酶抑制率的测定参考任红荣^[11]的方法并加以改动。按表 1 准确吸取 T_1 、 T_2 、 C_1 、 C_2 四组反应液,在 37 °C 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 I 求抑制率。

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

其中: 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。总反应体系为 5 mL,具体设计见表 1。

表 1 反应液组成与体积

Table 1 Composition and volume of the reaction solution

试剂 Reagent	体积 Volume			
	T_1	C_1	T_2	C_2
样品 Sample (mL)	1	1	0	0
底物 Substrate (mL)	1	0	1	0
酶液 Enzyme (μL)	240	240	240	240
PBS (pH 6.8) (mL)	1.76	2.76	2.76	3.76
合计 Total (mL)	4	4	4	4

2.3 荞麦花粉醇提物不同组分的制备及其对酪氨酸酶活性的影响

将荞麦花粉醇提物上 AB-8 型大孔树脂柱

(10 × 150 cm),依次用去离子水、浓度为 30%、50%、70%、95% 的乙醇进行梯度洗脱,薄层色谱法(TLC)跟踪检测洗脱液中的成分,并根据 TLC 检测

结果将具有相同成分的洗脱液合并,将洗脱液分成 A(水洗脱)、B(30%洗脱)、C(50%洗脱)、D(70%洗脱)、E(95%洗脱)五个部分。分别减压浓缩后,于-18℃保存备用。

分别准确称取 40 mg A、B、C、D、E 五个样品及洋甘菊醇提取物(阳性对照),用 PBS 溶解,均配制成 4 mg/mL 的溶液,再分别稀释为 1000,800,600,400,200 μg/mL 的溶液,根据 2.2 的方法测定各个样品不同浓度的溶液对酪氨酸酶的抑制率。

2.4 抑制酪氨酸酶活性部位的分离

将 2.3 中抑制率高的组分用适量的去离子水溶解后,上样到 ODS 柱(5 × 100 cm),依次用不同浓度的乙醇进行洗脱,TLC 法跟踪检测洗脱液中的成分,并根据 TLC 检测结果将具有相同成分的洗脱液合并,减压浓缩后再分别将各部分依次过 MCI(3 × 100

cm)柱和 ODS 柱(3 × 100 cm),TLC 法跟踪检测洗脱液成分,直至得到单体化合物。以二甲基亚砜- d_6 (DMSO- d_6)为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,将得到的化合物经质谱和碳谱等光谱数据分析,确定其结构。

根据 2.2 的方法,分别测定分离得到的单体化合物在 1000,800,600,400,200 μg/mL 浓度下对酪氨酸酶的抑制率。

3 结果与分析

3.1 荞麦花粉醇提取物不同组分对酪氨酸酶活性的抑制率

以洋甘菊醇提取物为阳性对照,荞麦花粉醇提取物过 AB-8 大孔树脂柱后得到的 A、B、C、D、E 五个组分对酪氨酸酶活性的抑制率如表 2 所示。

表 2 荞麦花粉醇提取物不同组分对酪氨酸酶活性的抑制作用

Table 2 Inhibition of tyrosinase activity by different concentrations of ethanol elution

浓度 Concentration (μg/mL)	抑制率 Inhibition of tyrosinase activity (%)					阳性对照 Positive control
	样品测定结果 Sample determination result					
	A	B	C	D	E	
200	12.87	18.12	25.93	3.87	3.32	21.38
400	14.63	22.91	51.78	5.69	4.17	48.25
600	21.07	37.28	54.13	21.34	16.54	50.13
800	27.83	40.39	63.89	22.67	19.27	58.61
1000	36.27	45.83	65.86	38.04	20.10	63.98

由表 2 的实验结果可知,在不同乙醇浓度洗脱物中,50%洗脱组分(C)对酪氨酸酶活性的抑制率最显著,并且随着样品浓度的增加,抑制率不断增加。而水洗物和其他乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制率相对较低。基于此,对荞麦花粉醇提取物 50%乙醇洗脱物部分进行进一步的分离。

表 3 化合物 1、2、3 不同浓度下对酪氨酸酶活性的抑制作用

Table 3 Inhibition of tyrosinase activity by compound 1, 2 and 3

浓度 Concentration (μg/mL)	抑制率 Inhibition rate (%)		
	1	2	3
200	15.09	49.07	16.3
400	18.91	50.94	20.48
600	27.29	55.86	22.13
800	36.91	59.72	37.9
1000	60.77	78.25	53.64

3.2 组分 C 的分离及对酪氨酸酶活性的抑制率

C 部分上 MCI 柱后分离得到三部分,分别将这三部分再反复上 ODS 柱后,TLC 跟踪检测,茴香醛-硫酸显色,分别得到三个单体化合物:化合物 1、2、3。

化合物 1、2、3 不同浓度下对酪氨酸酶活性的抑制率如表 3 所示。

由表3的实验结果可知,分离得到的**1**、**2**、**3**三个化合物中,化合物**2**对酪氨酸酶活性的抑制率最高。

3.3 化合物**1**、**2**、**3**的鉴定

化合物**1**:黄色无定形粉末,易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂,吸湿性强。

由化合物**1**的 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz)谱可知, δ 7.08、 δ 7.05、 δ 6.92、 δ 6.87、 δ 6.82(2H, s)处共有5组质子信号,每组含2个H,说明该化合物存在对称结构。 δ 6.39处有一个H, $J=8.0$,推测这个H为糖上的端基质子信号, δ 5.98~4.31处为糖上的其他质子信号。

从化合物**1**的 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 125 MHz)谱可知, δ 91.7、 δ 72.2、 δ 72.0、 δ 70.6、 δ 67.8、 δ 61.5处为吡喃葡萄糖基上的糖的6个碳信号。 δ 165.5~ δ 164.0、 δ 145.7~ δ 145.4、 δ 139.7~ δ 138.8、 δ 118.9~ δ 117.4、 δ 109.1~ δ 108.8处共有5组碳信号,每组含5个碳。从 ^{13}C DEPT谱中只见到 δ 109.1~ δ 108.8,为CH信号,其余为季碳。根据以上结果并参照相关文献^[12,13]可得该化合物含有5个没食子酰,综合分析得出该化合物为1,2,3,4,6-五-*O*-没食子酰-D-葡萄糖。

化合物**2**:黄色无定形粉末,易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂,吸湿性强。

化合物**2**的 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz)谱和 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 125MHz)谱与化合物**1**的类似。从化合物**2**的 ^1H NMR谱可见, δ 6.46处有一个H($J=8.0$),推测这个H为糖上的端基质子信号, δ 6.04~ δ 4.31处为糖上的其他质子信号。从化合物**2**的 ^{13}C NMR谱可见, δ 165.7~ δ 163.7、 δ 146.9~ δ 144.7、 δ 140.2~ δ 139.1、 δ 119.2~ δ 117.5、 δ 109.6~ δ 108.6处共有5组碳信号。另外, δ 164.9,150.8,146.9,140.2,126.8,109.1有1组碳信号,这组碳信号应为一个没食子酰基上再连一个没食子酰。根据以上结果推测,该化合物为1,2,3,4,6-五-*O*-没食子酰-2-*O*-间-双没食子酰-D-葡萄糖。

化合物**3**:黄色无定形粉末,易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂,吸湿性强。

从 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz)谱、 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 125 MHz)谱中可见,化合物**3**与化合物**1**、**2**的结构类似,不同之处在于 ^{13}C NMR中 δ 165.3~ δ 163.7处有9个羰基信号,结合化合物**1**、**2**的结构推测该化合物为葡萄糖上连了9个没食子酰基的物质,具体如何连接,还需要进一步研究。

表4 化合物**1**、**2**及**3**的 ^{13}C NMR数据
Table 4 ^{13}C NMR spectroscopic data of compound **1**, **2** and **3**

1		2		3							
position	δ_c	position	δ_c	position	δ_c	position	δ_c				
Glu	1	91.7	Glu	1	92.0	Glu	1	92.0	Gallic	1	118.2
Acid 6	2	70.6	2	70.9	2	70.9	2,6	108.7			
	3	72.2	3	72.3	3	73.0	3,5	145.4			
	4	67.8	4	67.9	4	67.9	4	138.9			
	5	72.0	5	72.0	5	72.3	C=O	164.4			
	6	61.5	6	61.4	6	62.0					
Gallic Acid 1	1	119.0	GallicAcid 1	1	119.0	Gallic Acid 1	1	118.7	Gallic Acid 7	1	118.0
	2,6	109.3	2,6	109.4	2,6	109.6	2,6	108.6			
	3,5	145.7	3,5	145.6	3,5	145.9	3,5	145.3			
	4	139.7	4	139.6	4	139.9	4	138.7			
	C=O	165.5	C=O	165.5	C=O	165.3	C=O	163.8			
Gallic Acid 2	1	118.2	GallicAcid 2	1	126.8	Gallic Acid 2	1	126.8	Gallic Acid 8	1	117.9
	2,6	109.1	2,6	109.1	2,6	109.2	2,6	108.5			
	3,5	145.6	3	150.8	3	150.8	3,5	145.1			
	4	139.2	4	140.2	4	140.7	4	138.5			
	C=O	164.9	5	146.9	5	146.6	C=O	163.7			

1			2			3		
			C = O	164.9		C = O	165.1	
Gallic Acid 3	1	118.1	GallicAcid 2'	1	118.1	GallicAcid 2'	1	118.1
	2,6	109.0		2,6	109.0		2,6	109.0
	3,5	145.5		3,5	145.5		3,5	145.5
	4	139.1		4	139.1		4	139.1
	C = O	164.6		C = O	164.6		C = O	164.6
Gallic Acid 4	1	118.0	GallicAcid 3	1	118.5	Gallic Acid 3	1	118.5
	2,6	108.9		2,6	108.9		2,6	109.2
	3,5	145.5		3,5	145.4		3,5	145.6
	4	139.0		4	139.1		4	139.6
	C = O	164.5		C = O	164.3		C = O	164.6
Gallic Acid 5	1	117.4	Gallic Acid 4	1	118.5	Gallic Acid 4	1	118.3
	2,6	108.8		2,6	108.7		2,6	109.0
	3,5	145.4		3,5	145.2		3,5	145.5
	4	138.8		4	139.0		4	139.3
	C = O	164.0		C = O	164.2		C = O	164.8
			Gallic Acid 5	1	118.1	Gallic Acid 5	1	118.2
				2,6	108.5		2,6	108.9
				3,5	145.1		3,5	145.4
				4	138.8		4	139.0
				C = O	164.1		C = O	164.4

4 结论

本实验结果表明,荞麦蜂花粉乙醇提取物大孔树脂 50% 乙醇洗脱物对酪氨酸酶活性的抑制作用显著,对 50% 乙醇洗脱物进行分离得到 **1**、**2**、**3** 三个化合物,经 NMR 鉴定,这三个化合物分别为:1,2,3,4,6-五-O-没食子酰-D-葡萄糖(**1**)、1,2,3,4,6-五-O-没食子酰-2-O-间-双没食子酰-D-葡萄糖(**2**)、葡萄糖上连了 9 个没食子酰基团的物质(**3**)。这三种化合物是首次从荞麦蜂花粉中分离、鉴定的鞣质类物质,且它们对酪氨酸酶的活性均有抑制作用,其中化合物 **2** 对酪氨酸酶活性的抑制率最显著。

参考文献

- Lin CR(林春榕),Zhang CX(张翠香),Zhuo SY(左绍远),et al. Effect of polysaccharide from buckwheat bee pollen on blood glucose and lipids in experimental diabetic rats. *Asia-Pacific Tradit Med*(亚太传统医药),2013,9(3):7-9.
- Zhou LX(周玲仙),Shao P(邵萍),Chen YH(陈彦红). Research on the role of orally-taking liquid of buckwheat pol-

len in Antianaemia. *Acade J Kunming Med Coll*(昆明医学院学报),1994,15(3):11-13.

- Wang KF(王开发). Discussion on the effect of Chinese common eight pollen. *J Bee*(蜜蜂杂志),2010,12:5-9.
- Dong J(董捷),Zhang H(张红),Li H(李慧). Capacity of eight kinds of bee pollen oxidation *in vitro* anti-alcohol extract. *Acta Nutr Sin*(营养学报),2010,32:309-311.
- Yang BC(杨必成),Yang YF(杨义芳). Advances in studies on material basis of pollen used for treatment of prostatic diseases. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药),2009,40:144-149.
- Sánchez-Ferrer A,Rodríguez-López JN,García-Cánovas F,et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *BBA-protein Mol Enzym*,1995,1247:1-11.
- Mitsuru I,Todd C,Shoko I,et al. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J Investiga Dermatol*,1990,95:9-15.
- Wang HQ(王寒清),Wang CT(王昌涛),Dong YM(董银卯). Function evaluation method of whitening cosmetics. *Deterg Cosmet*(日用化学品科学),2007,30(2):32-34.