

## 连翘花中抑制酪氨酸酶活性成分研究

白美美<sup>1,2</sup>, 李丹凤<sup>1</sup>, 李石飞<sup>1\*</sup>, 张立伟<sup>1\*</sup><sup>1</sup>山西大学分子科学研究所化学生物学与分子工程教育部重点实验室; <sup>2</sup>山西大学化学化工学院, 太原 030006

**摘要:** 本文首次对连翘花抑制酪氨酸酶活性成分进行了研究。首先, 对连翘不同器官[叶、果实(青翘、老翘)、花]抑酶活性进行比较分析, 发现连翘花对酪氨酸酶的抑制表现出了浓度依赖性; 进而对连翘花不同溶剂提取物进行抑酶活性评价, 结果表明 95% 乙醇提取物抑酶活性最高。然后根据活性导向分离方法, 对连翘花 95% 乙醇提取物进行了化学成分分离, 从中分离得到 5 个化合物, 鉴定为: 连翘酯苷 A (1)、芦丁(2)、(+)-松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷(3)、(+)-甲基松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷(4)、连翘苷(5), 其中化合物 4 是首次从连翘花中分离得到。酪氨酸酶抑制活性测试表明化合物均显示出一定的抑酶活性, 同时各化合物之间表现出明显的协同作用, 这表明这些成分可能是连翘花美白作用的物质基础。

**关键词:** 连翘花; 提取和分离; 酪氨酸酶抑制; 化学物质; 协同作用

中图分类号: R914.4; 0629.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.10.010

## Activity-guided Isolation of Mushroom Tyrosinase Inhibitors from the Flower of *Forsythia suspensa*

BAI Mei-mei<sup>1,2</sup>, LI Dan-feng<sup>1</sup>, LI Shi-fei<sup>1\*</sup>, ZHANG Li-wei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Education Ministry, Institute of Molecular Science; <sup>2</sup>College of chemistry & Chemical engineering, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** This is the first time to investigate the chemical constituents of *Forsythia suspensa* flower for tyrosinase-inhibition activity. First, different organs (flower, leaf, green Forsythiae Fructus and ripe Forsythiae Fructus) of *F. suspensa* were tested for the tyrosinase-inhibition activity, and the *F. suspensa* flower showed concentration-dependent on the inhibition of tyrosinase activity. Second, different extracts of *F. suspensa* flower were also tested for the tyrosinase-inhibition activity, and the 95% ethanol extract displayed the best inhibition of tyrosinase activity. Then, five compounds were obtained from 95% ethanol extract by the activity-guided isolation method, and their structures were identified as forsythiaside A (1), rutin (2), (+)-pinoresinol- $\beta$ -D-glucoside (3), (+)-pinoresinol monomethyl ether  $\beta$ -D-glucoside (4) and (+)-phillyrin (5), while compound 4 was reported for the first time from *F. suspensa* flower. Four of them showed weak inhibition activity against tyrosinase but displayed obvious synergistic effect. The results implied that the 5 compounds were most likely to be the chemical substance foundation of the whitening effect of *F. suspensa* flower and its inhibitory effect was possibly produced by synergistic effect.

**Key words:** *Forsythia suspensa* flower; extraction and separation; tyrosinase inhibition; chemical substance; synergistic effect

黑色素合成是肤色形成的主要原因, 并且在阻止紫外线引起的皮肤损伤方面起到了关键作用。在皮肤表皮的最内层中高达 10% 的细胞产生黑色素<sup>[1]</sup>, 这一过程依赖于大量的酶反应和化学反应<sup>[2]</sup>。酪氨酸酶也称为多酚氧化酶(PPO), 是存在

于真菌和脊椎动物中的一种多功能含铜酶, 在酪氨酸形成黑色素的初始步骤中起到了催化作用<sup>[3]</sup>。因此, 酪氨酸酶抑制剂被认为是美白化妆品中的重要成分, 也被用来防止表皮层黑色素的过度生产<sup>[4]</sup>。从传统药用植物中寻找高效、安全、副作用小的酪氨酸酶抑制剂一直是美白功效物质的研究热点<sup>[5-7]</sup>。

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属植物, 其果实是一种传统中药, 有清热解毒

作用,被称为“疮家圣药”<sup>[8]</sup>。山西省是连翘的道地产区,资源量大,占全国资源量的50%以上<sup>[9]</sup>。每年4月连翘花盛开,漫山遍野的连翘花海不仅给山西旅游增添重要的景观,同时每年的落花也形成重要植物资源,按照连翘资源量计算,每年山西省连翘落花资源量有近200吨。HPLC分析表明连翘花和连翘果实具有类似的化合物,包含苯乙醇苷类,木脂素类,黄酮和三萜类等化学成分<sup>[10]</sup>。同时,研究表明连翘花提取物表现出抗氧化<sup>[11,12]</sup>,抗菌<sup>[13]</sup>,抗炎,抗肿瘤等多种药理活性。根据我们的调研发现,山西民间有采集连翘花,水煮后用此水洗脸的习俗,长期坚持使用,有益于消除面部的黄褐斑、蝴蝶斑等。然而,目前还未见有相关药效和物质基础报道。近年来,我们课题组重点研究连翘的化学成分,生物活性和资源的可持续利用<sup>[14-18]</sup>,为了充分利用连翘花资源和发现连翘花美白物质,本文采用酪氨酸酶抑制活性方法对连翘花进行活性导向分离,最终从连翘花95%乙醇提取物中分离得到5个化合物,鉴定为:连翘酯苷A(1)、芦丁(2)、(+)-松脂素-β-D-葡萄糖苷(3)、(+)-甲基松脂素-β-D-葡萄糖苷(4)、连翘苷(5),其中化合物4是首次从连翘花中分离得到。酪氨酸酶抑制活性测试表明化合物均显示出一定的抑酶活性,同时各化合物之间表现出明显的协同作用,这一结果表明这些成分可能是连翘花美白作用的物质基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

旋转蒸发器(瑞士BUCHI公司);SK2200HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型真空泵(巩义市予华仪器系统有限公司);BS/BT系列电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);ZF-1型紫外分析仪(其林贝尔仪器制造有限公司);JASCO DIP-370型数字式旋光仪(Tokyo Japan);DF-35型粉碎机(温岭市林大机械有限公司);Spextra Max 190酶标仪(美国Molecular Devices公司);40~70 μm Sephadex LH-20(美国GE Healthcare公司产品);Bruker AM-600核磁共振仪(Karlsruhe, Germany),TMS作为内标;Waters HPLC-ThermoFinnigan LCQ离子阱质谱仪(Milford, PA);Agilent 1200高效液相色谱仪,色谱柱为Zorbax SB-C<sub>18</sub>(i. d. 5 μm, 4.6 × 250 mm);CHEETAH™中压快速制备色谱(天津博纳艾杰尔科技有限公司);GF<sub>254</sub>

硅胶板(青岛海洋化工厂产品);200~300目MDS-5-3反向RP-18填料(北京麦迪生心技术开发中心产品);L-酪氨酸和蘑菇酪氨酸酶(25KU)购买自美国Sigma公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、二甲基亚砜为北京精求化工有限责任公司产品。石油醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、及甲醇等均为工业试剂,经重蒸后使用,其它所用试剂均为分析纯;液相用的色谱纯甲醇及乙腈为Merck公司生产,流动相用水为娃哈哈纯净水。

### 1.2 实验材料

实验所用的连翘花(4月)、叶(7月)、青翘(7月)和老翘(10月)均采自山西省安泽县,经山西大学张立伟教授鉴定,为木犀科连翘属连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl的各不同器官,样本编号分别为2015068,2015080,2015090和2015094,均存放于化学生物学与分子工程教育部重点实验室。各样品均自然阴干,然后粉碎成末,过筛,备用。

## 2 实验方法

### 2.1 酪氨酸酶抑制方法的构建

参考文献<sup>[19,20]</sup>中所用方法,在此基础上,稍作调整。本实验以L-酪氨酸为底物,蘑菇酪氨酸酶为催化剂,在pH为6.8的PBS缓冲液体系中进行反应。设置4组反应,反应温度为37℃,反应时间为40 min,记录40 min时A、B、C、D吸光度。供试品溶液对蘑菇酪氨酸酶的抑制率计算公式如下:

$$I(\%) = [1 - (C - D) / (A - B)] \times 100$$

酪氨酸酶体积,底物(L-酪氨酸)体积和反应时间通过单因素实验方法优化确定。熊果苷用作阳性对照,实验重复三次。

### 2.2 提取

连翘花、叶、果实(青翘、老翘)粉末约50 g,分别置于4个1000 mL圆底烧瓶中,加入料液比为(1:10)的纯净水,回流提取1 h,过滤,再加入料液比为(1:10)的纯净水,回流提取1 h,合并两次滤液,减压浓缩,冷冻干燥,得到连翘花提取物(LQH-W)、连翘叶提取物(LQY-W)、青翘提取物(QQ-W)以及老翘提取物(LQ-W)。

### 2.3 分离

各取连翘花粉末(100.0 g)于两个2 L圆底烧瓶,分别加入料液比为1:8的乙酸乙酯和95%乙醇回流提取三次,每次1 h,各自合并滤液,减压浓缩得到乙酸乙酯(a)和95%乙醇(b)提取物。在相同浓

度下,95%乙醇提取物(b)显示出最高的抑制酪氨酸酶活性。然后取95%乙醇提取物(b,9.0 g)经反相C-18硅胶(MDS)柱色谱分离(甲醇/水,5%~95%),得到6个组分bFr1~bFr6。组分4显示出最好的酪氨酸酶抑制活性,进一步经Sephadex LH-20柱色谱分离(氯仿/甲醇,50%),得2个亚组分(bFr4-1、bFr4-2)。其中bFr4-2经硅胶柱色谱分离(氯仿/甲醇,72%)得到化合物1(20.0 mg)和化合物2(15.0 mg),与标准品比对,确定化合物1和2分别为连翘酯苷A和芦丁。bFr4-1经Sephadex LH-20进一步纯化(氯仿/甲醇,50%),然后经半制备HPLC(甲醇/水,38%)得到化合物3(66.3 mg)、4(4.0 mg)和5(9.0 mg)。

## 2.4 活性测定和协同作用研究

准确称取各水提取物10 mg,以PBS(pH=6.8)为溶剂,分别配制浓度为5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625 mg/mL的供试品溶液。连翘花乙酸乙酯提取物(a)、95%乙醇提取物(b)、组分bFr1~bFr6,以15% DMSO(PBS)为溶剂,分别配制成浓度为1、1.25、2.5、5 mg/mL的供试品溶液。单体化

合物和阳性对照物(熊果苷)以15% DMSO(PBS)为溶剂,分别配制成终浓度为0.1562、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10 mg/mL的供试品溶液。参照2.1优化的方法,将50  $\mu$ L不同浓度的各样品溶液与80  $\mu$ L PBS溶液和50  $\mu$ L酪氨酸酶溶液(溶解于PBS溶液中,120 Units/mL)加入96孔板中,每个样品设置三个复孔,在37  $^{\circ}$ C下孵育10 min,最后向每个孔中加入20  $\mu$ L底物(0.45 mg/mL L-酪氨酸)触发反应。96孔板在37  $^{\circ}$ C下继续孵育30 min,然后用Spectramax 190酶标仪测定各孔在475 nm处的吸光度值,每组实验重复三次。此外,通过相同的方法测试了两种单体化合物对酪氨酸酶抑制的协同作用。

## 3 实验结果

### 3.1 酪氨酸酶活性实验体系确定

酪氨酸酶活性实验体系的设置如表1所示,同时采用单因素考察方法优化了酪氨酸酶的体积、底物(L-酪氨酸)的体积和反应时间。综上,酪氨酸酶活性实验体系最终确定如下(表2)。实验时,先加

表1 酶活反应体系  
Table 1 Enzyme reaction system

编号 Number	组别 Groups	反应体系 Reaction system	吸光度值 Absorbance value
1	空白对照组 Blank	PBS + 溶剂 + 酶 + 底物 PBS + Solvent + Enzyme + Substrate	A
2	背景组 Background	PBS + 溶剂 + 底物 PBS + Solvent + Substrate	B
3	实验组 Test sample	PBS + 酶 + 样品 + 底物 PBS + Enzyme + Sample + Substrate	C
4	背景组 Background	PBS + 样品 + 底物 PBS + Solvent + Sample + Substrate	D

表2 酪氨酸酶抑制活性实验反应体系  
Table 2 Reaction system of inhibitory effect on tyrosinase

组别 Groups	反应体系 Reaction system	吸光度值 Absorbance value
空白对照组 Blank	80 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L 溶剂 + 50 $\mu$ L 酶 (120 U/mL) 80 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L Solvent + 50 $\mu$ L TYR (120 U/mL)	A
背景组 Background	130 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L 溶剂 130 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L Solvent	B
实验组 Test sample	80 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L 酶 + 50 $\mu$ L 样品 80 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L TYR (120 U/mL) + 50 $\mu$ L Sample	C
背景组 Background	130 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L 样品 130 $\mu$ L PBS + 50 $\mu$ L Sample	D

注:此处的溶剂为PBS或15% DMSO(PBS)溶液。  
Note: Solvent was PBS or 15% DMSO (PBS).

蘑菇酪氨酸酶和供试品溶液,在 37 °C 预热 10 min,最后加入底物 L-酪氨酸 20  $\mu$ L,触发反应,设置检测波长为 475 nm,记录 30 min 时候的吸光度值。每组实验重复三次。

### 3.2 连翘不同部位酪氨酸酶抑制活性

对不同浓度的各提取物对酪氨酸酶活性的抑制率作图(图 1),发现各自均有不同的抑制规律。连翘花提取物对酪氨酸酶抑制活性与供试品浓度成正比,供试品浓度越小,抑制率就越低。老翘和青翘提取物均是在浓度为 0.3125 mg/mL 时,抑制率达到最高,随着抑制剂浓度越来越大,其抑制率却逐渐降低。对青翘和老翘而言,虽然两者对酪氨酸酶的抑制率随浓度的变化趋势一致,但青翘在各个浓度下表现出来的抑酶活性都强于老翘。连翘叶提取物则是在供试品高浓度的时候,对蘑菇酪氨酸酶表现出激活的作用,随着供试品浓度的减少,其抑制酶活反而越高,表现出了双重作用。连翘花对酪氨酸酶活性的抑制表现出了浓度依赖性,且在所设浓度范围内,果实(青翘和老翘)和连翘叶的最高抑制率均低于连翘花。

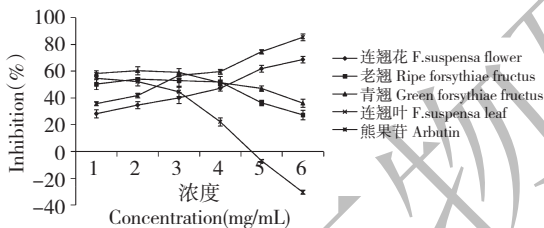


图 1 连翘不同部位水提取物对酪氨酸酶的抑制作用

Fig. 1 Tyrosinase inhibition rate by the water extracts of different organs of *F. suspensa* and arbutin at different concentrations

### 3.3 连翘花活性化合物的筛选

为了比较全面地研究连翘花中抑制酪氨酸酶的活性组分和活性成分,我们进一步用乙酸乙酯和 95% 乙醇作为溶剂提取连翘花,并对连翘花乙酸乙酯(a)、95% 乙醇(b)和水提取物(c)进行了抑酶活性比较。结果如图 2 所示,在同一浓度 95% 乙醇部分(b)显示出最高的抑酶活性(65.32%),而乙酸乙酯(a)和水提取物(c)部分对酪氨酸酶的抑制率分别为 47.08% 和 24.89%。因此,以酪氨酸酶抑制活性为向导,进一步对连翘花 95% 乙醇部分的化学成分进行分离,通过 MDS 反相 C-18 中压分离制备,得到 6 个组分,对 6 个组分进行抑酶活性测试,结果表明组分 bFr4 显示出最高活性(图 2)。然后进一步以

bFr4 为分离对象,通过 Sephadex LH-20 柱层析、硅胶柱层析和半制备 HPLC 技术从中分离得到 5 个化合物(活性导向分离图见图 3 所示)。

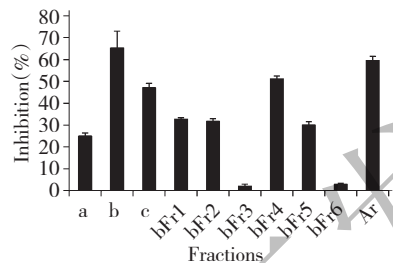


图 2 连翘花不同组分和熊果苷在同一浓度下对酪氨酸酶的抑制率

Fig. 2 Tyrosinase inhibition rate of the different fractions of *F. suspensa* flower and arbutin at the same concentration

### 3.4 化合物结构鉴定

将连翘花中分离的 5 个化合物的质谱、NMR 数据与文献对比,结果如下。其中化合物 1 和 2 通过与标准品比较(TLC、HPLC 和质谱分析)鉴定为连翘酯苷 A 和芦丁,化合物 3~5 被鉴定为:

**化合物 3** 白色粉末;分子量 520.5;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  6.88 (1H, brs, H-2), 6.71 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.75 (1H, brd,  $J = 8.0$  Hz, H-6), 4.60 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-7), 6.95 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-2'), 7.05 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.86 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-6'), 4.67 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-7'), 4.13 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.74 (2H, m, H-9b, 9'b), 4.87 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1''), 3.26 ~ 3.66 (6H, m, H-2'' ~ H-6''), 3.76 (3H, s, OMe), 3.75 (3H, s, OMe);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  137.5 (C-1), 111.1 (C-2), 150.9 (C-3), 117.9 (C-5), 119.9 (C-6), 87.1 (C-7), 55.6 (C-8), 72.8 (C-9, 9'), 133.9 (C-1'), 111.7 (C-2'), 149.2 (C-3'), 147.5 (C-4, 4'), 116.3 (C-5'), 120.2 (C-6'), 87.5 (C-7'), 55.4 (C-8'), 102.8 (C-1''), 75.0 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.6 (C-6''), 56.6 (OMe), 56.9 (OMe)。以上数据与文献<sup>[21,22]</sup>报道一致,因此确定化合物 3 鉴定为 (+)-松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷((+)-Pinoresinol- $\beta$ -D-glucoside)。

**化合物 4** 白色粉末;分子量 534.5;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  6.94 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-2), 6.77 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.80 (1H, dd,  $J$

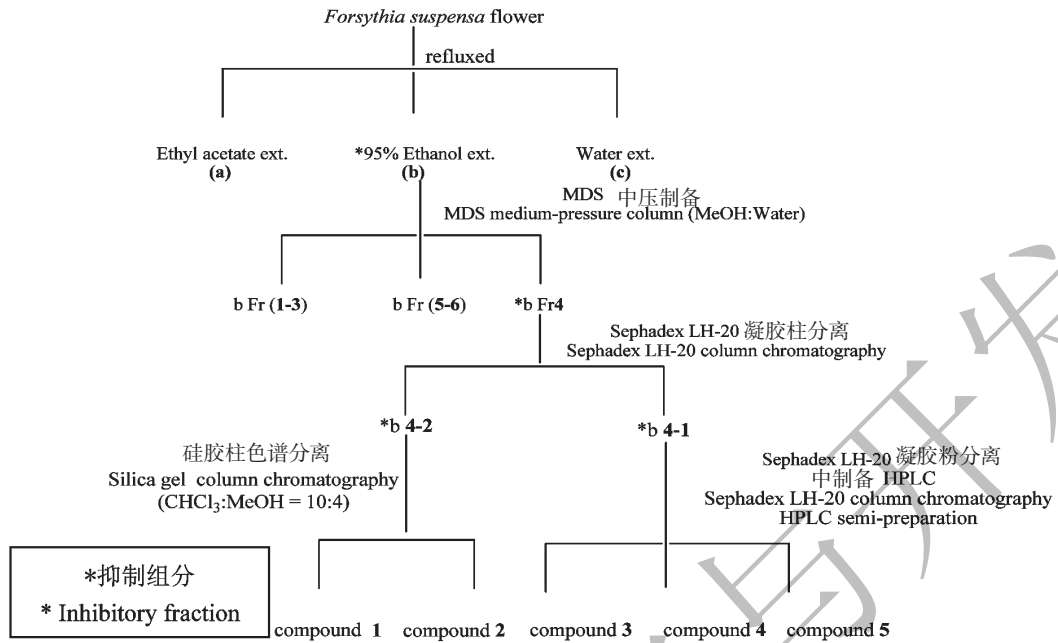


图3 连翘花抑制酪氨酸酶活性成分分离流程图

Fig. 3 Isolation scheme for the inhibitory compound from *F. suspensa* flower

= 8.0, 1.5 Hz, H-6), 4.70 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz, H-7), 7.02 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-2'), 7.14 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.91 (1H, dd,  $J = 1.5, 8.0$  Hz, H-6'), 4.75 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-7'), 3.12 ~ 3.15 (2H, m, H-8, 8'), 4.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1''), 3.23 ~ 3.64 (6H, m, H-2'' ~ H-6''), 3.85 ~ 3.86 (9H, s, 3 × OMe);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  136.6 (C-1), 110.1 (C-2), 150.1 (C-3), 149.3 (C-4), 117.6 (C-5), 119.2 (C-6, 6'), 86.3 (C-7), 54.7 (C-8, 8'), 72.1 (C-9, 9'), 134.1 (C-1'), 110.7 (C-2'), 149.7 (C-3'), 146.6 (C-4'), 120.0 (C-5'), 86.5 (C-7'), 102.3 (C-1''), 74.0 (C-2''), 78.2 (C-3''), 70.5 (C-4''), 78.6 (C-5''), 61.8 (C-6''), 56.1 (OMe × 2), 56.3 (OMe)。以上数据与文献<sup>[21,22]</sup>报道一致,因此确定化合物4鉴定为(+)-甲基松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷((+)-Pinoresinol monomethyl ether- $\beta$ -D-glucoside)。

**化合物5** 白色结晶粉末;分子量 534.5;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.12 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 7.24 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 7.01 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 4.56 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-7), 4.24 (1H, m, H-9a), 3.97 (1H, m, H-9b), 7.09 (1H, brs, H-2'), 7.02 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 7.02 (1H, overlapped, H-6'), 4.96 (1H, m,

H-7'), 3.35 (1H, m, H-9'a), 3.88 (1H, m, H-9'b), 4.98 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 3.48 ~ 3.78 (6H, m, H-2'' ~ H-6''), 3.96 (3H, s, OMe), 3.93 (3H, s, OMe), 3.92 (3H, s, OMe);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  136.7 (C-1), 110.7 (C-2), 150.2 (C-3), 146.8 (C-4), 117.5 (C-5), 119.5 (C-6), 88.3 (C-7), 55.1 (C-8), 71.5 (C-9), 131.6 (C-1'), 109.8 (C-2'), 149.4 (C-3'), 148.7 (C-4'), 111.9 (C-5'), 118.5 (C-6'), 82.7 (C-7'), 50.6 (C-8'), 102.4 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.9 (C-3''), 70.6 (C-4''), 62.0 (C-6''), 56.4 (OMe), 56.2 (OMe × 2)。以上数据与文献<sup>[21,22]</sup>报道一致,因此确定化合物5鉴定为连翘苷((+)-Phillyrin)。

### 3.5 化合物抑制酪氨酸酶活性及协同作用

由于化合物4得到的量过低,且市场上并无在售的标准品,因此,本实验以熊果苷为阳性对照,对连翘酯苷A(1)、芦丁(2)、(+)-松脂- $\beta$ -D-葡萄糖苷(3)和连翘苷(5)4个化合物进行了抑酶活性测试,结果见表3。由表可知,4个化合物的抑酶活性均较差( $\text{IC}_{50}$ 值 > 2.50 mg/mL),而其前体组分 bFr4 在浓度为 1.25 mg/mL 时的抑制率为 51.40%,这暗示着化合物之间存在协同作用。因此对4个化合物进行协同作用研究,结果(见表4)证实了这四个化合物存在明显的协同作用,化合物两两组合后的抑酶活

性均显著增高(在浓度为 0.625 mg/mL 时,抑制率分别为 53.6%、24.2%、17.7%、35.3%、51.9%、21.1%)。

表 3 4 种化合物抑制酪氨酸酶活性的 IC<sub>50</sub> 值

Table 3 The IC<sub>50</sub> values of four compounds from *F. suspensa* flower against mushroom tyrosinase

样品 Samples	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
(+)-松脂-β-D-葡萄糖苷 (+)-Pinoresinolmonomethyl ether β-D-glucoside	>10
连翘酯苷 A Forsythiaside A	-
连翘苷 (+)-Phillyrin	>2.5
芦丁 Rutin	>2.5
熊果苷 Arbutin	1.14

表 4 4 种化合物抑制酪氨酸酶活性协同作用

Table 4 Synergistic effect of four compounds for thetyrosinaseinhibition activity (at 0.625 mg/mL)

样品 Samples	抑制率 Inhibition (%)
P. g	6.85 ± 1.9
F	28.8 ± 3.3
P	-
R	-
P. g + P	24.2 ± 4.0
P. g + R	17.7 ± 1.1
P. g + F	53.6 ± 0.8
F + P	51.9 ± 1.7
F + R	35.3 ± 2.8
P + R	21.1 ± 4.0
A	34.0 ± 7.0

注: P. g:(+)-松脂-β-D-葡萄糖苷;F:连翘酯苷 A;P:连翘苷;R:芦丁;A:熊果苷。

Note:P. g:(+)-Pinoresinol monomethyl ether β-D-glucoside;F:Forsythiaside A;P:(+)-Phillyrin;R:Rutin;A:Arbutin.

## 4 讨论与结论

本研究对连翘的不同器官[叶、果实(青翘、老翘)、花]提取物进行了酪氨酸酶抑制活性分析,结果表明连翘花对酪氨酸酶的抑制表现出了浓度依赖性;然后采用活性导向分离法对连翘花 95% 乙醇提取物进行了化学成分分离,从中分离得到 5 个化合物,鉴定为:连翘酯苷 A (1)、芦丁(2)、(+)-松脂

素-β-D-葡萄糖苷(3)、(+)-甲基松脂素-β-D-葡萄糖苷(4)、连翘苷(5),其中化合物 4 是首次从连翘花中分离得到。并对化合物 1~3 和 5 进行酪氨酸酶抑制活性测试,表明化合物均显示出一定的抑酶活性,同时各化合物之间表现出明显的协同作用,这也是首次测定了连翘中连翘酯苷 A(1)、(+)-松脂-β-D-葡萄糖苷(3)和连翘苷(5)对蘑菇酪氨酸酶的体外抑制活性。

连翘花提取物和各相应组分的抑酶活性以及各化合物的协同作用均充分说明连翘花的确具有美白作用,这也解释了山西当地居民用连翘花水煮液洗脸达到祛斑目的的内涵。虽然化合物 1、2、3 和 5 显示出弱的酪氨酸酶抑制活性,但是两两组合后的抑酶活性远远强于单个化合物,同时有文献表明化合物 3 在 B16 黑色素瘤细胞中能减少酪氨酸酶的蛋白含量<sup>[23]</sup>,这也说明这些成分极有可能是连翘花美白作用的物质基础,它们极有可能是通过协同的方式达到美白作用的。

本文不仅解释了当地居民用连翘花水提取物洗脸的科学内涵。同时,从连翘花中分离得到的抑制酪氨酸酶活性组分作为天然酪氨酸酶抑制剂在美白化妆品领域将具有良好的应用前景,也为山西连翘花资源的开发利用提供了科学依据。本研究的不足之处是在活性导向分离过程中连翘花的用量较少,未能发现活性显著的有效成分,应该进一步深入研究。

## 参考文献

- Mommtaz S, Mapunya BM, Houghton PJ, *et al.* Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxyloninerm*, L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119:507-512.
- Curto EV, Kwong C, Hermersdorfer H, *et al.* Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57:663-672.
- Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 1707-1723.
- Choi H, Ahn S, Lee BG, *et al.* Inhibition of skin pigmentation by an extract of *Lepidiumapetalum* and its possible implication in IL-6 mediated signaling. *Pigment Cell Res*, 2005, 18:439-446.

- 5 Fu GQ (付国强), Ma PC (马鹏程), Wu QX (吴勤学), *et al.* Inhibitory effects of ethanolic extracts from 196 kind of Chinese herbs on tyrosinase. *Chin J Dermatol* (中华皮肤科杂志), 2003, 36: 103-106.
- 6 Pu XL (朴香兰), Yang J (杨静), Lou CX (楼彩霞), *et al.* Tyrosinase inhibitory activity from *Forsythia suspensa*. *J MUC, Nat Sci* (中央民族大学学报, 自科版), 2012, 21: 19-22.
- 7 Lee SY, Baek N, Nam T. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2016, 31: 1-13.
- 8 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 159-160.
- 9 Teng XH (滕训辉). Study on sustainable utilization and resource conservation in Shanxi wildforsythia. *China Med Herald* (中国医药导报), 2010, 7: 81-82.
- 10 Li AJ (李爱江), Gao HY (高辉耀). Product development and active components analysis of forsythia flowers tea. *Cereals Oils Proc, Elect* (粮油加工, 电子版), 2015, 57-61.
- 11 Wang JT (王金亭), Li QF (李秋凤). Extraction of the yellow pigment from *Forsythia* with microwave assisted method and study on its antioxidant activity. *China Brewing* (中国酿造), 2010, 29: 100-103.
- 12 Li XT (李兴泰), Li HC (李洪成), Liu Z (刘泽). Protective effects of ethanol extract of *Forsythia suspensa* flower on mitochondria and antioxidant activity. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2009, 31: 839-843.
- 13 Wu YH (武月红). Comparative study on antibacterial effects about plant extracts from different parts of *Forsythia suspensa*. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2014, 35: 44-47.
- 14 Hou YN (侯雅楠), Xu J (许佳), Chen TG (陈廷贵), *et al.* Study on the enzymolysis of crude enzyme in Fructus Forsythiae on forsythiaside A. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2013, 25: 660-664.
- 15 Xu J (许佳), Jiang T (姜涛), Chen TG (陈廷贵), *et al.* Determination of forsythoside A and forsythin in Forsythiae-Fructus by substitute reference substance. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 2013, 33: 1792-1795.
- 16 Liu JZ (刘建洲), Zhang LW (张立伟). Anti-inflammatory activity of forsythia suspensa extract on human airway epithelial cells inflammation model. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1248-1253.
- 17 Jia JP, Zhang FS, Li ZY, *et al.* Comparison of fruits of *Forsythia suspensa* at two different maturation stages by NMR-based metabolomics. *Molecules*, 2015, 20: 10065-10081.
- 18 Cheng QB (程启斌), Li SF (李石飞), Zhang LW (张立伟). Study on comparison of antioxidant activity and determination of total phenol content in different parts of *Forsythia suspensa*. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2016, 28: 610-616.
- 19 Tu CX (涂彩霞), Liu ZL (刘之力), Ren F (任凤), *et al.* The effects of 47 traditional Chinese herbs on the activity of tyrosinase and enzyme kinetics. *China J Lepr Skin Dis* (中国麻风皮肤病杂志), 2006, 22: 456-458.
- 20 Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, *et al.* Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bio-sci Biotech Bioch*, 2005, 69: 197-201.
- 21 Nan ZD (南泽东), Zhao MB (赵明波), Jiang Y (姜勇), *et al.* Lignans from stems of *Cistanchedeserticola* cultured in Tarim desert. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 463-468.
- 22 Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, *et al.* Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 1990, 29: 1971-1980.
- 23 Akihisa T, Orido M, Akazawa H, *et al.* Melanogenesis-inhibitory activity of aromatic glycosides from the stem bark of *Acer buergerianum*. *Chem Biodivers*, 2013, 10: 167-176.

(上接第 1657 页)

- 3 Zhang HM (张红梅), Jin ZY (金征宇), Zhu LX (朱立贤), *et al.* Study on the antioxidant activity of peanut skin. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2005, 6: 83-87.
- 4 Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharm Rev*, 1995, 47: 447-501.
- 5 Zhang DP (张大鹏), Yang XC (杨新春), Lu FH (路方红). Research status of pulse pressure. *Chin J Hypertension* (中华高血压杂志), 2006, 14(1): 15-18.
- 6 LI J, Bonaventura C, Bonaventura J. S-nitrosohemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 1996, 380: 221-226.
- 7 Yonehara N, Takemura M, Yoshimura M, *et al.* Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. *Jpn J Pharmacol*, 1997, 75: 327-335.
- 8 Towart R. Effects of nitrendipine, nifedipine, verapamil, phen-tolamine, papaverine and minoxidil on contractions of isolated rabbit aortic smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1982, 4: 895-902.