

# 枸骨叶提取物对酪氨酸酶的抑制与抗氧化作用

刘 衬, 杨志刚\*

常熟理工学院生物工程系, 常熟 215500

**摘要:** 本实验以枸骨叶为研究对象, 经 75% 乙醇浸提, 用极性递增的溶剂分离制备获得枸骨叶提取物, 测定了枸骨叶提取物对酪氨酸酶的抑制作用, 并使用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除的方法检测了枸骨叶提取物抗氧化能力。实验结果表明: 枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物对酪氨酸酶具有较强的抑制作用,  $IC_{50}$  值分别达到 0.414 mg/mL 和 0.667 mg/mL, 均为混合型可逆抑制类型。同时, 二者均具有一定的清除 DPPH 自由基的能力,  $IC_{50}$  值分别为 0.132 mg/mL 和 0.039 mg/mL, 表明枸骨叶提取物同时具有抑制酪氨酸酶活性和抗氧化的功效, 在美容、药物及食品等行业具有潜在的应用价值。

**关键词:** 枸骨叶; 酪氨酸酶; 抑制; 动力学; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH); 抗氧化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.020

## Antio-tyrosinase and Antioxidant Activities of *Ilex cornuta* Leaves Extract

LIU Chen, YANG Zhi-gang\*

Department of Bioengineering, Changshu Institute of Technology, Jiangsu Changshu 215500, China

**Abstract:** In this experiment, the anti-tyrosinase and antioxidant activities of *Ilex cornuta* leaves extract (LIC) were measured. Ethanol extraction and increasing solvent polarity separation was used to obtain the component of LIC, its inhibition on tyrosinase and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical were measured. The result showed that the trichloromethane extract and butyl alcohol extract had strong inhibition on tyrosinase, the value of  $IC_{50}$  reached 0.414 and 0.667 mg/mL respectively. The kinetics study showed that their inhibition on tyrosinase were both reversible and inhibition types were both mixed. The trichloromethane extract of  $K_1$  and  $K_{IS}$  were 0.269 mg/mL and 0.555 mg/mL;  $K_1$  and  $K_{IS}$  of butyl alcohol extract were 0.273 mg/mL and 0.944 mg/mL. Meanwhile, both of them was found to have certain scavenging effect,  $IC_{50}$  was 0.132 and 0.039 mg/mL, which showed that LIC extract both had anti-tyrosinase and antioxidant efficacy, revealed it had potential application value in cosmetic, medicine and food, etc.

**Key words:** leaves of *Ilex cornuta*; tyrosinase; inhibition; kinetics; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; antioxidant

酪氨酸酶 (EC: 1.14.18, Tyrosinase), 又名多酚氧化酶, 是一种结构复杂的具有多个亚基的含铜氧化还原酶, 具有独特的双重催化活性, 广泛存在于微生物、动植物以及人体中的不同部位, 是引起果蔬褐变以及产生黑色素的关键酶<sup>[1]</sup>。而酪氨酸酶抑制剂可通过抑制酪氨酸酶活性减少黑色素的生成, 因此在美容、食品及医药等领域具有广阔的应用前景。酪氨酸酶抑制剂主要分为天然提取的抑制剂以及化学合成抑制剂 2 种, 但研究与应用较多的依然是从植物中提取的天然有机化合物。自 1988 年 Akiu 等从杜鹃花科植物熊果 *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. 的叶中分离到一种具有脱色作用的单体物

质熊果苷 (arbutin) 起<sup>[2]</sup>, 人们便对从植物及微生物中分离天然酪氨酸酶抑制剂的研究产生了极大地兴趣。如陈清西等<sup>[3]</sup> 人发现叶下珠乙酸乙酯和正丁醇提取物对多酚氧化酶具有较强的抑制作用, 其半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 值分别达到 0.26 和 0.49 mg/mL; 铁钉菜甲醇提取物中也存在酪氨酸酶抑制剂,  $IC_{50}$  值为 1.823 mg/mL<sup>[4]</sup>; 以及沈晓佳等<sup>[5]</sup> 研究发现, 紫娟茶 3 种提取物对二酚酶具有显著地抑制效果,  $IC_{50}$  值分别达到了 0.637、0.762 和 1.353 mg/mL, 等等。

枸骨叶作为一种中草药, 具有清热养阴, 益肾, 平肝的功效, 主治肺癆咳血, 骨蒸潮热, 头晕目眩等症<sup>[6]</sup>。枸骨叶来源于冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 (*Ilex*) 植物枸骨 (*Ilex cornuta* Lindl.) 的干燥叶, 又名功劳叶。主要产于浙江、江苏、安徽和江西等地区, 具有清热养阴、平肝、益肾的功效, 是苦丁茶的原

料之一。经研究发现, 枸骨叶中含有多种化学成分, 包括黄酮类<sup>[7]</sup>、多酚类<sup>[8]</sup>、三萜<sup>[9]</sup>、皂苷<sup>[10]</sup>以及人体所必需的多种微量元素, 具有抗菌、抗氧化、抗生育、免疫抑制和降血脂等药理作用<sup>[11]</sup>。李艳芝等<sup>[12]</sup>通过高效液相色谱法测定枸骨叶中芦丁和槲皮素的含量最高可分别达到 1.237 和 0.826 mg/g, 叶片的新鲜程度以及采收季节对芦丁及槲皮素的含量影响较大。同时, 通过一定优化的提取工艺, 从枸骨叶中也可提取到可观的三萜, 提取率为 3.61%。同时研究发现, 黄酮类、萜类、酚类等多种物质可作为良好的酪氨酸酶抑制剂, 为本实验研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

枸骨叶购自皖北李氏中药堂, 秋季采收, 除去杂质, 晒干; 多酚氧化酶, 购自美国 BOMEI 公司, 纯度 99%; L-多巴 (L-DOPA, 纯度 ≥98%), 购自上海源叶生物科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DP-PH, 纯度 >99%), 购自东京化成工业株式会社。所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。实验用水为去离子水。

### 1.2 仪器与设备

鼓风干燥箱 (型号 G003408, 生工生物工程股份有限公司); 旋转蒸发仪 (型号 YRE-2011, 巩义市予华仪器有限责任公司); 真空冷冻干燥机 (型号 SCIENTZ-10N 普通型 LGJ 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 电热恒温水浴锅 (型号 HH·S21-4-S, 上海新苗医疗器械制造有限公司); 分光光度计 (型号 722 型, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司) 等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 枸骨叶的提取与分离

将采集的枸骨叶除杂, 于鼓风干燥机 55 °C 烘干

后经粉碎机粉碎, 然后过 400 目的目筛得到枸骨叶粉末。按照 1:10 的料液比加入体积分数为 75% 的乙醇溶液, 60 °C 水浴 (用带塞子的锥形瓶以防溶液挥发) 24 h 后取上液, 经 0.45 μm 有机膜减压抽滤, 得到枸骨叶乙醇提取液。减压浓缩后用蒸馏水溶解提取物, 采用溶剂极性递增的分离方法, 分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇于分液漏斗中萃取提取物, 每种溶剂萃取 3 次, 得到的各萃取液经旋转蒸发仪减压浓缩后去除溶剂, 然后经冷冻干燥机冻干制备成枸骨叶石油醚提取物、三氯甲烷提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和经 0.2 μm 水膜抽滤得到的水提取物 5 种活性测定效应物, 然后分别用二甲亚砜 (DMSO) 溶解这 5 种效应物, 配制成质量浓度为 20 mg/mL 的样品。

#### 1.3.2 效应物对多酚氧化酶的活力测定及其动力学研究

主要参照陈清西等<sup>[13]</sup>的方法, 并进行相应的调整。在 3 mL 的测活体系 (含 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 pH6.8, 5.0 μmol/L L-DOPA 底物) 中, 依次加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 pH6.8, 5 mmol/L 的 L-DOPA 溶液、枸骨叶不同浓度提取液和 0.1 mg/mL 酪氨酸酶溶液, 充分混匀, 在 30 °C 的条件下反应 10 min, 然后测定其在 475 nm 处的吸光值。产物的消光系数按  $\epsilon$  为 3700 (mol/L · cm)<sup>-1</sup> 计算。样品对酶的抑制率 I (%) 可表示为:

$$I\% = \left(1 - \frac{ACT_i}{ACT_0}\right) \times 100\% = \left[1 - \frac{(A_3 - A_4)}{(A_1 - A_2)}\right] \times 100\%$$

式中:  $ACT_i$  表示酶反应活性;  $ACT_0$  表示在不存在抑制剂时的酶反应活性;  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$  分别是表 1 中 1、2、3、4 组反应液的吸光值。

以效应物对酶活的抑制率对样品浓度作图, 求得效应物的  $IC_{50}$  值。

表 1 酶活抑制测定中各反应液的组成 (mL)

Table 1 The composition of each reaction solution in the determination of enzyme activity (mL)

试剂 Reagent	1 组	2 组	3 组	4 组
磷酸缓冲液 Phosphoric acid buffer	1.7	1.9	1.7	1.9
L-DOPA	1.0	1.0	1.0	1.0
效应物 Testing solution	-	-	0.1	0.1
DMSO	0.1	0.1	-	-
酪氨酸酶溶 Tyrosinase	0.2	-	0.2	-

改变加入的酶量和样品浓度,以酶促反应速率对酶浓度作图,由此判断效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理;改变底物和样品浓度,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,从而判断出效应物对多酚氧化酶的抑制类型,然后分别以 L-B 双倒数图的斜率和截距对效应物浓度二次作图,求出抑制常数  $K_I$  和  $K_{IS}$ 。每个实验做 3 个平行。

### 1.3.3 DPPH 法测定效应物的抗氧化作用

在 3 mL 的测试体系中,依次加入 1 mL 醋酸缓冲液(0.1 mol/L pH5.5),1.8 mL 无水乙醇,0.1 mL 的 DPPH(3 mmol/L,溶于无水乙醇),最后加入 0.1 mL 不同浓度的效应物溶液,混匀之后在 25 °C 的恒温条件下反应 20 min,测定其在 517 nm 处的吸光值 A。同理,分别取 1 mL 醋酸缓冲液、1.9 mL 无水乙醇以及 0.1 mL 相应浓度的效应物溶液,测定其在 517 nm 处的吸光值  $A_0$ 。同样地,依次取 1 mL 醋酸缓冲液、1.8 mL 无水乙醇以及 0.1 mL DMSO,测定在 517 nm 处的吸光值  $A_0$ 。根据以下公式求出相应的自由基清除率。每个实验做 3 个平行。

$$\text{自由基的清除率}\% = \frac{[A_0 - (A - Ab)]}{A_0} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

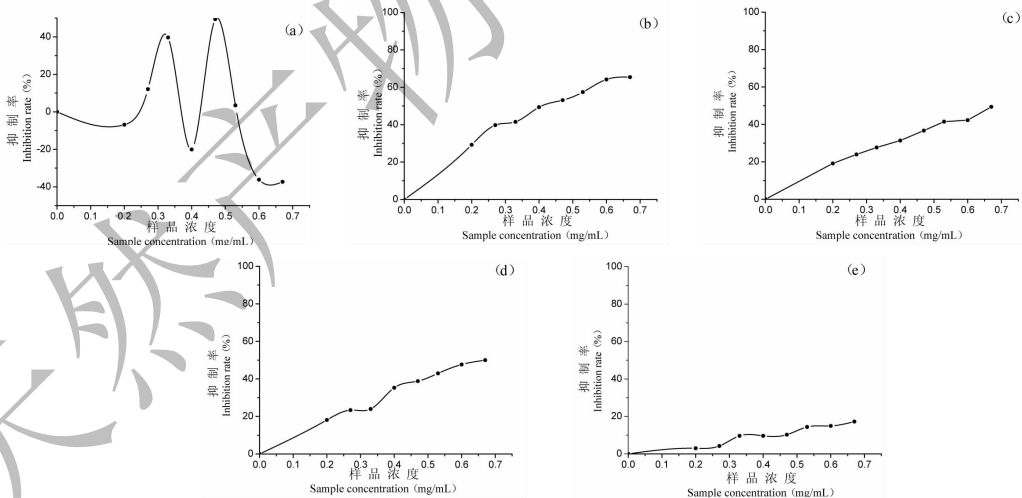


图 1 枸骨叶石油醚(a)、三氯甲烷(b)、乙酸乙酯(c)、正丁醇(d)及水(e)提取物对多酚氧化酶活性的抑制作用

Fig. 1 Effect of *I. cornuta* petroleum ether (a), chloroform (b), ethyl acetate (c), n-butanol (d) and water (e) extract on the polyphenol oxidase activity

### 2.2 枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对多酚氧化酶的抑制动力学

根据对枸骨叶提取物对酪氨酸酶活性影响的研

### 2.1 枸骨叶提取物对酪氨酸酶的抑制作用

通过对 5 种不同提取物对酪氨酸酶活性影响的研究,结果(图 1)表明,枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用较为显著,当效应物的质量浓度达到 0.667 mg/mL 时,对酪氨酸酶活性的抑制率分别达到了 65.4% 和 50.0%,  $IC_{50}$  值分别达到 0.414 mg/mL 和 0.667 mg/mL。而枸骨叶石油醚提取物、乙酸乙酯提取物和水提取物对多酚氧化酶活性的抑制作用则较弱,在实验测定的范围内(效应物浓度达到 0.667 mg/mL)其抑制率均未达到 50%。乙酸乙酯提取物与正丁醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用相差不大,提示二者的萃取物中可能含有具有相同效应的有效成分,含量存在微量的区别。而在石油醚、乙酸乙酯和水提取物中,尤以石油醚的抑制作用变化性最大,抑制率波动较大,有些浓度的石油醚提取物对酪氨酸酶活性反而具有明显的增强作用,推测其中可能含有一些不稳定的对酪氨酸酶活性具有激活作用的化学成分,如可溶于石油醚的香豆素类物质可使酪氨酸酶活性增加,促进黑色素的合成<sup>[14]</sup>;同时,龚盛昭研究发现,同一种中药的不同提取物得到的提取液对酪氨酸酶的抑制率不同,甚至相反<sup>[15]</sup>。

究,结果表明三氯甲烷、正丁醇提取物具有较强的抑制作用。以这两种提取物为研究对象,并且以质量浓度为 5 mmol/L 的 L-DOPA 为底物,继续研究其对

酪氨酸酶的抑制动力学。改变加入的酶量和样品浓度, 得到一组酶的相对剩余活力对酶量的变化曲线 (图 2), 从图中可以看出, 效应物浓度越大, 直线斜率越小, 这表示枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用为可逆抑制, 即效应物是通过抑制酪氨酸酶的活力而导致酶活下降, 而这种抑制作用随着效应物浓度的增加而加强。通过改变底物和样品浓度来研究效应物对多酚氧化酶的抑

制类型, 结果 (图 3) 表明, 底物浓度不同, 直线的斜率和截距也不同, 但直线在第二象限相交, 这说明枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对酪氨酸酶的抑制类型属于混合型, 并且是介于竞争型与非竞争型之间<sup>[16]</sup>。以双倒数的斜线和纵轴截距对所含的枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物的质量浓度二次作图, 通过斜率对效应物浓度作图得到的横轴截距, 可计算得出枸骨叶三氯甲烷提取物对游离酶

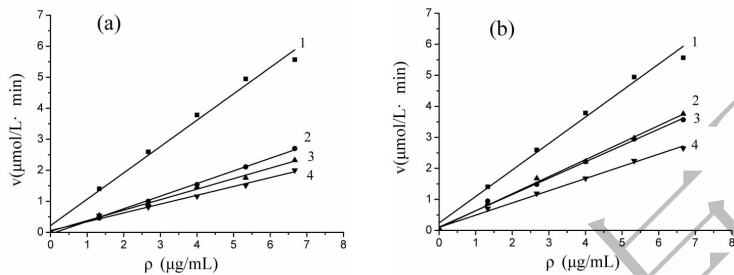


图 2 枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物对酪氨酸酶的抑制机理

Fig. 2 Determination of the inhibitory mechanism of *I. cornuta* leaves trichloromethane (a) and butyl alcohol (b) extracts on the tyrosinase activity

注: 直线 1~4 的提取物质量浓度分别为 0, 0.2, 0.4 和 0.6 mg/mL

Note: Line 1-4 represented the concentration of extract were 0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg/mL, respectively

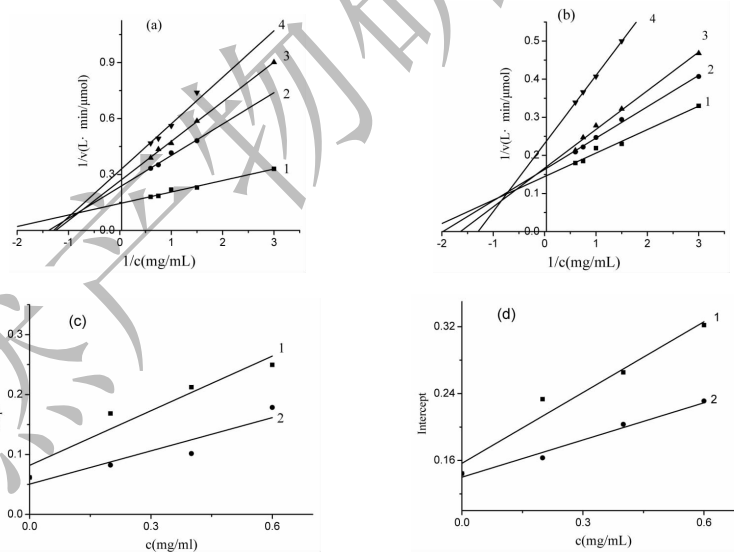


图 3 枸骨叶提取物三氯甲烷提取物 (a) 和正丁醇提取物 (b) 对多酚氧化酶的抑制类型和抑制常数的测定

Fig. 3 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of trichloromethane (a) and butyl alcohol (b) extract from *I. cornuta* leaves on the polyphenol oxidase activity

注: 直线 1~4 的提取物质量浓度分别为 0, 0.2, 0.4 和 0.6 mg/mL; (c) 和 (d) 分别为斜率和截距对效应物浓度作图, 直线 1 和 2 分别代表三氯甲烷提取物和正丁醇提取物

Note: Line 1-4 represented the concentration of extract were 0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg/mL, respectively; (c) and (d) were slope vs sample concentration and intercept vs sample concentration, respectively; Line 1 and 2 in (c) and (d) represented trichloromethane extract and butyl alcohol extract, respectively

表 2 枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用

Table 2 Inhibition effect of trichloromethane and butyl alcohol extracts from *I. cornuta* leaves on tyrosinase

效应物 Testing sample	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	抑制常数 Inhibition constant (mg/mL)		抑制类型 Inhibitory type	抑制机理 Inhibition mechanism
		K <sub>IS</sub>	K <sub>I</sub>		
枸骨叶三氯甲烷提取物 Trichloromethane extract	0.414	0.555	0.269	混合型 Mixed-type	可逆 Reversible
枸骨叶正丁醇提取物 Butyl alcohol extract	0.667	0.944	0.273	混合型 Mixed-type	可逆 Reversible

的抑制常数 ( $K_I$ ) 为 0.269 mg/mL, 对酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_{IS}$ ) 为 0.555 mg/mL。枸骨叶三氯甲烷提取物的  $K_I$  小于  $K_{IS}$ , 说明其对酶-底物络合物的解离程度要小于其对于游离酶的解离程度; 枸骨叶正丁醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用与三氯甲烷提取物类似,  $K_I$  为 0.273 mg/mL,  $K_{IS}$  为 0.944 mg/mL 二者对多酚氧化酶的抑制作用及动力学常数对比如表 2 所示。

### 2.3 枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物清除 DPPH 自由基能力测定

抗氧化作用可能是多酚氧化酶抑制机理之一, 自由基通过上调多酚氧化酶 mRNA 的表达从而增强酶活。因此本实验采用 DPPH 法来测定枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物的抗氧化活性, 以初步判断其抗氧化能力。结果 (图 4) 显示, 枸骨叶三

氯甲烷提取物与正丁醇提取物具有较强的清除 DPPH 自由基的能力, 在试验测定浓度范围内, 均能使 0.1 mmol/L 的 DPPH 产生的自由基的清除率达到 80%, IC<sub>50</sub> 值分别为 0.132 mg/mL 和 0.039 mg/mL。其中, 正丁醇提取物的抗氧化作用显著高于三氯甲烷提取物, 在 0.08 ~ 0.13 mg/mL 的浓度下抗氧化作用最佳, 而三氯甲烷提取物在 0.08 ~ 0.13 mg/mL 的浓度下其 DPPH 的清除率未达到 50%。而我们发现, 在枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物中, 其对酪氨酸酶的抑制作用与抗氧化作用并不呈正相关, 即三氯甲烷提取物对酪氨酸酶的抑制作用要比正丁醇的强, 但其清除 DPPH 自由基的能力较正丁醇提取物稍弱, 这提示提取物中对酪氨酸酶活性抑制与氧化的有效活性成分可能不是同一种物质, 从而导致了两种效应相反的现象。

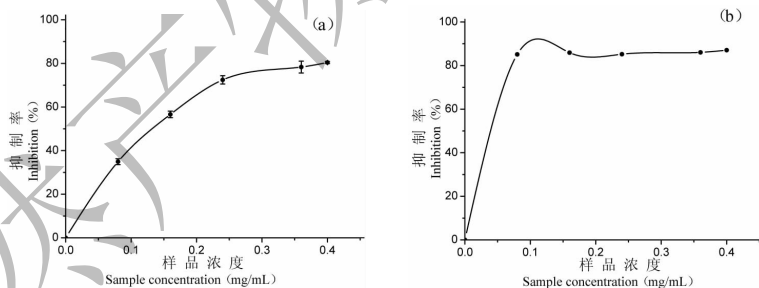


图 4 枸骨叶三氯甲烷提取物 (a) 和正丁醇提取物 (b) 对 DPPH 自由基清除作用

Fig. 4 DPPH free radicals scavenging effects of trichloromethane (a) and butyl alcohol (b) extracts of *I. cornuta* leaves

## 3 结论与展望

实验研究表明枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对多酚氧化酶具有较强的抑制作用, IC<sub>50</sub> 值分别为 0.414 mg/mL 和 0.667 mg/mL, 此半抑制浓度与陈清西等人研究的叶下珠正丁醇提取物相近, 而明显低于铁钉菜甲醇提取物 (1.823 mg/mL) 和紫娟茶提取物 (0.762 和 1.353 mg/mL)。研究发现,

多种植物提取物 (叶下珠、紫娟茶、茶花粉<sup>[17]</sup>、芦荟<sup>[18]</sup> 和当归<sup>[19]</sup> 等多种天然植物) 的 IC<sub>50</sub> 值在 0.099 ~ 6.59 mg/mL 之间, 表明枸骨叶提取物对具有较强的酪氨酸酶的抑制作用, 可作为一种新型的植物源美白剂。动力学研究表明, 枸骨叶三氯甲烷提取物和正丁醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用为可逆抑制, 抑制机理为混合型。通过抗氧化作用研究, 结果显示枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物具有较强的清

除 DPPH 自由基的能力,其  $IC_{50}$  值分别为 0.132 mg/mL 和 0.039 mg/mL。因此,枸骨叶三氯甲烷和正丁醇提取物可作为很好的美白化妆品的功效成分进行开发。

目前,国内外很多学者致力于从天然植物中提取酪氨酸酶抑制剂并取得了一定的研究成果,植物提取物对酪氨酸酶具有较强的抑制作用,但对于植物提取物,包括枸骨叶提取物中对酪氨酸酶具有抑制作用的单一抑制剂的分离与纯化却很少有研究,希望在以后的研究中能够分离出植物提取物中对酪氨酸酶具有较强抑制作用的单一活性成分并能够应用于美容、食品、医药等行业,为人类生活带来切实益处。

#### 参考文献

- 1 Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1247: 1-11.
- 2 Zou XW (邹先伟), Jiang ZS (蒋志胜). Advances in studies on botanical inhibitors of tyrosinase [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2004, 35: 702-705.
- 3 Chen LH (陈良华), Chen QX (陈清西), Liu X (刘轩), et al. Anti-tyrosinase and antioxidation activities of extract from *Phyllanthus urinaria*. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2012, 51: 411-414.
- 4 Chen JM (陈景明), Huang XD (黄晓冬), Cai JX (蔡建秀). Inhibitory effect of the methanol extracts from *Ishige okamurai* Yendo on tyrosinase [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2015, 31(35): 79-83.
- 5 Shen XJ (沈晓佳), Zhao LM (赵黎明), Zhou JC (周家春), et al. Inhibitory effect of extract from Zijuan tea on tyrosinase activity [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33(24): 75-80.
- 6 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一部) [M]. Beijing: China Chemical Industry Press, 2010: 233.
- 7 Hong YP (洪艳平), Shanguan XC (上官新晨), Liu N (刘楠), et al. Extraction and determination of total flavonoids *Ilex cornuta* Lindl [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2008, 30: 529-533.
- 8 Kuang CT (旷春桃), Chen RF (陈如锋), Wu B (吴斌), et al. Study on extraction and antioxidation property of polyphenols from leaves of *Ilex cornuta* [J]. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2009, 2: 427-429.
- 9 Yao ZR (姚志荣), Li J (李军), Zhou SX (周思祥), et al. Triterpenoids from leaves of *Ilex cornuta* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34: 999-1001.
- 10 Zhou GL (周国莉), Shu K (舒柯), Nie LX (聂骊晓), et al. Content determination of total saponins in *Folium ilicis cornutae* from different area [J]. *J TCM Univ Human* (湖南中医药大学学报), 2010, 7: 33-35.
- 11 Li GW (李国文), Wu T (吴弢), Xie Y (谢燕), et al. Leaves of *Ilex cornuta*: research advances [J]. *J Int Pharm Res* (国际药学研究杂志), 2011, 38: 356-361.
- 12 Li YZ (李艳芝), Jiang JJ (姜静静). Determination of rutin and quercetin in *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt [J]. *J Jining Med Univ* (济宁医学院学报), 2015, 38: 96-98.
- 13 Li ZC, Chen LH, Yu XJ, et al. Inhibition kinetics of chlorobenzaldehyde thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12537-12540.
- 14 Wang XY (王锡元). Studies on tyrosinase inhibitors and activators [D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), MSc. 2007.
- 15 Gong SZ (龚盛昭). Microwave-assisted extraction and separation of 3-phenylacrylic acid family compounds and their effects on tyrosinase activity [D]. South China University of Technology (华南理工大学), MSc. 2006.
- 16 Guo Y (郭勇), Zheng SP (郑穗平). *Enzymology* (酶学) [M]. Guangzhou: South China Science and Technology University Press (华南理工大学出版社), 2000: 115-117.
- 17 Fu JY (傅佳愈), Yang YF (杨远帆), Ni H (倪辉), et al. The Anti-tyrosinase effect of extract from *Camellia Pollen* [J]. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2015, 15(7): 66-72.
- 18 Gupta SD, Masakapallia SK. Mushroom tyrosinase inhibition activity of *Aloe vera* L. gel from different germplasm [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11: 616-620.
- 19 Ye XZ (叶孝兆), Gong SZ (龚盛昭), Liao GJ (廖国俊), et al. Tyrosinase inhibition by extract of *Radix Angelica Sinensis* [J]. *China Surfact Deterg Cosmet* (日用化学工业), 2010, 40: 98-100.