

鸢尾不同部位体外抗氧化和酪氨酸酶抑制活性研究

沈晓溪¹,那立亚²,王 昭¹,董传栋¹,贺晓明^{1*}

¹北京百方益生物科技有限公司;²北京蓝色美城科技有限公司,北京 100000

摘要:鸢尾提取物是国家批准的化妆品原料,含鸢尾提取物成分的多个种类的化妆品在国内上市。为了比较鸢尾不同部位提取物的体外抗氧化能力和对酪氨酸酶的抑制活性,选取鸢尾的根、果和叶为研究对象,测定其 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力、总抗氧化能力和酪氨酸酶抑制率。实验结果表明,鸢尾果、鸢尾根和鸢尾叶均具有明显的抗氧化能力,但不同部位的抗氧化能力不同。鸢尾果、鸢尾根和鸢尾叶酪氨酸酶抑制能力略强于鸢尾果,但鸢尾的三个部位均未表现出很强的酪氨酸酶抑制效果。

关键词:鸢尾;DPPH 自由基清除能力;羟自由基清除能力;总抗氧化能力;酪氨酸酶抑制

中图分类号:TQ658

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022) Suppl-0053-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.008

Study on *in vitro* antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of different parts of *Iris tectorum* Maxim.

SHEN Xiao-xi¹, NA Li-ya², WANG Zhao¹, DONG Chuan-dong¹, HE Xiao-ming^{1*}

¹Beijing Biofound Care Co., Ltd.; ²Beijing Blue City Technology Co., Ltd., Beijing 100000, China

Abstract: *Iris tectorum* Maxim. extract is a cosmetic raw material approved by the state, various types of cosmetics containing *I. tectorum* extract appear in the domestic market. In order to compare the antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of different parts of *I. tectorum in vitro*, DPPH radical scavenging capacity, hydroxyl radical scavenging capacity, the total antioxidant capacity (T-AOC) and the inhibition rate of tyrosinase of *I. tectorum* root, fruit and leaf were measured. The result showed that all of the *I. tectorum* fruit, root and leaf had obviously antioxidant capacity. However, the antioxidant capacity of different parts of *I. tectorum* was different. DPPH radical scavenging capacity in the order: fruit > leaf > root; hydroxyl radical scavenging capacity in the order: fruit > leaf > root; and T-AOC in the order: fruit > root > leaf. The tyrosinase inhibition capacity of *I. tectorum* root and leaf was slightly stronger than that of *I. tectorum* fruit, but all the three parts of *I. tectorum* did not show strong tyrosinase inhibition activity. The inhibition rate of tyrosinase in the order: root > leaf > fruit.

Key words: *I. tectorum*; DPPH radical scavenging capacity; hydroxyl radical scavenging capacity; the total antioxidant capacity; tyrosinase activity inhibition capacity

鸢尾(*Iris tectorum* Maxim.)植物是鸢尾科(Iridaceae)鸢尾属(*Iris* L.)多年生草本,为世界著名宿根花卉之一,属内植物种类繁多,花色多样,花型奇特^[1]。鸢尾的根状茎也是一味中药,其性味苦、辛、平,具有活血祛瘀、祛风利湿、解毒、消积等功效^[2]。鸢尾提取物是国家批准的化妆品原料,国内也有含鸢尾提取物成分的化妆品上市^[3]。鸢尾的不同部位有不同的化学成分,鸢尾叶含很多维生素C,鸢尾花含恩比宁,鸢尾根茎含鸢尾黄酮甙、鸢尾黄酮新甙A、鸢尾黄酮新甙B、香荚兰己酮二葡萄糖甙等^[4,5]。

鸢尾浸膏、鸢尾净油和鸢尾凝脂等鸢尾香料制品是国际上公认的紫罗兰系列名贵香料,鸢尾香料制品中主要香气成分为鸢尾酮,它具有柔和的甜香,香气清新纯正^[6]。鸢尾香料还具有特殊的香韵和优良的定香能力,被广泛用于化妆品、食品、卷烟等产品中^[7]。鸢尾哪个部位的提取物用于化妆品更有效,目前国内外都还没有报道。本文对鸢尾的根、果、叶提取物的体外抗氧化和酪氨酸酶抑制作用进行了评价研究,为其在化妆品中的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸢尾:采集自北京市房山区中粮健康科技园

区内,品种为宿根鸢尾;1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH,上海梯希爱化工业,批号 Z6B8N-TF);L-酪氨酸(生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 F221BA0020);酪氨酸酶(北京索莱宝科技有限公司,批号 822S011);水杨酸(天津市北辰方正试剂厂,批号 20210702);硫酸亚铁七水(生工生物工程上海股份有限公司,批号 H317BA0023);总抗氧化能力检测试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 I716AD0374)。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(745PC,上海菁华科技仪器有限公司);超声破碎仪(JY92-IIIN,宁波新芝生物科技股份有限公司);高速冷冻离心机(TGL-16M,济南鑫驰医疗科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样本处理

分别取新鲜、干净的鸢尾根、果、叶,按料水比为1:10(g/mL)进行水煮法提取。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除能力测定参照 Qiao^[8]的方法并稍作修改。配制 0.05 mg/mL DPPH 溶液。30、40、50、60、70 mL/100 mL 的鸢尾根稀释液,4、5、6、7、8 mL/100 mL 的鸢尾果稀释液和 10、20、30、40、50 mL/100 mL 的鸢尾叶稀释液。按照表 1 配置反应混合液。室温避光 30 min,于 517 nm 处测定吸光度。DPPH 自由基清除率计算如式(1)。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [(A_0 - A_x) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

表 1 DPPH 自由基清除实验反应混合液配制比例

Table 1 Proportion of reaction mixture for DPPH radical scavenging experiment

试剂 Reagent	A ₀ (mL)	A _x (mL)
DPPH 溶液 DPPH solution	2	2
95% 乙醇 95% ethanol	1	-
样品稀释液 Sample diluent	-	1

注:A₀ 为未添加样品反应体系;A_x 为添加样品反应体系;-表示不添加相应试剂。

Note:A₀ is the reaction system without sample;A_x is the reaction system with sample;“-” indicates that there is no corresponding reagent.

1.3.3 羟自由基清除能力测定

羟自由基清除能力测定参照 Huang 等^[9]的实验方法并稍作修改。分别配制 9 mmol/L FeSO₄、9 mmol/L 乙醇-水杨酸溶液、8.8 mmol/L H₂O₂,按照表 2 配置反应混合液。37 °C 水浴加热 15 min 后取出,测其吸光度 A₀(参比溶液为不加 H₂O₂ 的体系)。

羟自由基清除率计算式(2)。

$$\text{羟自由基清除率} = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

表 2 羟自由基清除实验反应混合液配制

Table 2 Proportion of reaction mixture for hydroxyl radical scavenging experiment

试剂 Reagent	A ₀ (μL)	A _x (μL)	A _{x₀} (μL)
FeSO ₄	133	133	133
水杨酸 Salicylic acid	133	133	133
样品 Sample	0	400	400
去离子水 Deionized water	1600	1200	1200
H ₂ O ₂	133	133	0

注:A₀ 为空白对照;A_x 为添加样品;A_{x₀} 为不添加 H₂O₂。

Note:A₀ is the blank control;A_x is the reaction system with sample;A_{x₀} is the reaction system without H₂O₂.

1.3.4 总抗氧化能力测定

采用总抗氧化能力检测试剂盒测定样品的总抗氧化能力。将 FeSO₄ 标准溶液稀释至梯度浓度,反应后测定波长 593 nm 处吸光度 A(去离子水作空白测得 A₀),计算 ΔA = A - A₀。以 Fe²⁺ 终浓度为横坐标,以 ΔA 为纵坐标绘制标准曲线 y = 20.194x - 0.0011。

按照试剂盒操作说明,取得鸢尾根、果、叶部位提取液,按照表 3 配制反应溶液,测定样品吸光度 A_x。计算 ΔA' = A_x - A₀。总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)计算如式(3)。

$$\text{T-AOC} = (X \times V) / V_x = 34 \times X \quad (3)$$

式中,X 为测定样品的 ΔA' 带入标准曲线方程求得的标准离子浓度,μmol/mL;V 为反应总体积;V_x 为反应中样品体积;T-AOC 为每毫升样品抗氧化能力达到同样吸光度变化值(ΔA)所需的标准离子(Fe²⁺)浓度,μmol/mL。

表 3 总抗氧化实验反应混合液配置

Table 3 Proportion of reaction mixture for T-AOC

试剂 Reagent	测定管 Test tube(μL)	空白管 Blank tube(μL)
混合液 Mixture	900	900
样品 Sample	30	-
去离子水 Deionized water	90	120

1.3.5 酪氨酸酶活力抑制测定

本实验参考 Liu^[10]体外酪氨酸酶活性抑制实验的方法,并稍作改进。分别配制磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH = 6.8)、L-酪氨酸溶液(0.3 mmol/L)与酪

氨酸酶溶液(0.15 mg/mL)。按照表4配制反应溶液,实验开始向每个管中依次加入配置好的PBS,样品液和L-酪氨酸溶液,于37℃水浴中恒温10 min,然后加入所需的酪氨酸酶溶液,再于37℃水浴中加热反应20 min,测475 nm各溶液的吸光值。结果计算如式(4)。

酪氨酸酶抑制率 =

$$[1 - (T_2 - T_1) / (C_2 - C_1)] \times 100\% \quad (4)$$

表4 酪氨酸酶活力抑制实验反应体系设计

Table 4 Proportion of reaction mixture for tyrosinase activity inhibition test

试剂 Reagent	C ₁ (mL)	C ₂ (mL)	T ₁ (mL)	T ₂ (mL)
PBS	1.5	1	1	0.5
样品 Sample	0	0	0.5	0.5
酪氨酸酶 Tyrosinase	0	0.5	0	0.5
酪氨酸 Tyrosine	0.5	0.5	0.5	0.5
合计体积 Total volume	2	2	2	2

注:C₁为未添加样品和酶溶液;C₂为添加酶溶液、未添加样品;T₁为添加样品、未添加酶溶液;T₂为添加样品和酶溶液。

Note:C₁ is the reaction system without sample and tyrosinase;C₂ is the reaction system with tyrosinase and no sample;T₁ is the reaction system with sample and no tyrosinase;T₂ is the reaction system with sample and tyrosinase.

2 结果与分析

2.1 鸢尾花不同部位 DPPH 自由基清除能力

由图1可知,鸢尾不同部位均表现出一定的DPPH自由基清除能力,且与浓度成正相关。其中鸢尾果对DPPH自由基的清除能力最强。鸢尾果、鸢尾根及鸢尾叶的IC₅₀分别为11.03、94.24、31.61 mL/100 mL,鸢尾根的用量是鸢尾果的8.54倍,鸢尾叶的用量是鸢尾果的2.86倍,DPPH自由基清除

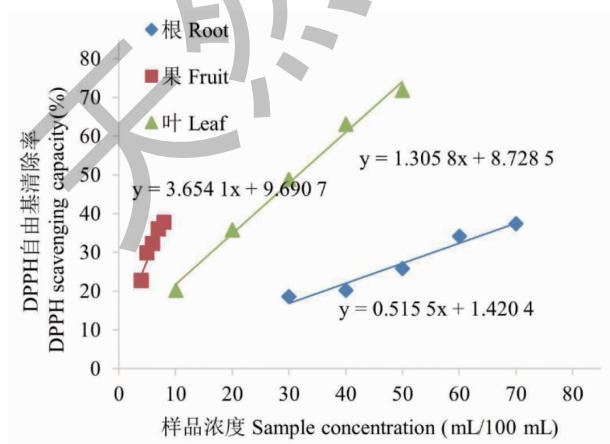


图1 不同部位 DPPH 自由基清除能力比较

Fig. 1 DPPH scavenging capacity of different samples

能力顺序为:鸢尾果 > 鸢尾叶 > 鸢尾根。

2.2 鸢尾不同部位羟自由基清除能力

如图2所示,鸢尾各部位对羟自由基清除能力随提取物的浓度增大而逐渐增强。其中鸢尾果部位对羟自由基清除能力最强,当鸢尾果部位浓度为80 mL/100 mL时,羟自由基清除能力可以达到76.8%。鸢尾果、鸢尾叶与鸢尾根羟自由基清除能力依次减弱,IC₅₀分别为44.60、72.39、603.31 mL/100 mL。鸢尾不同部位羟自由基清除能力顺序为:鸢尾果 > 鸢尾叶 > 鸢尾根。

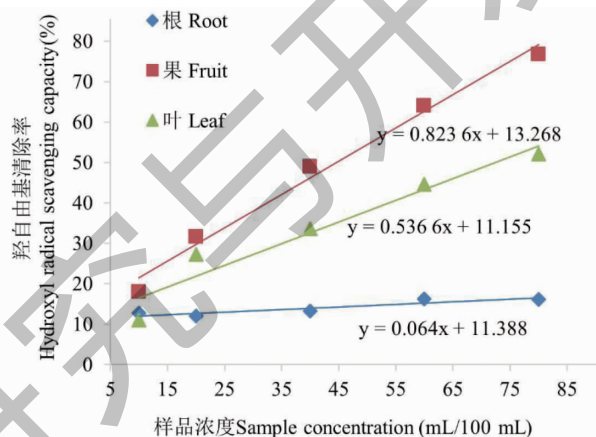


图2 不同样品羟自由基清除率对比

Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging capacity of different samples

2.3 鸢尾不同部位总抗氧化能力

如图3所示,将处理过鸢尾花不同部位样品均稀释一百倍后,在510 nm处平行测得三次吸光度取平均值,根据液体总抗氧化计算公式得到总抗氧化能力,鸢尾根:146.18 μmol/mL,鸢尾叶:49.39 μmol/mL,鸢尾果:217.57 μmol/mL,其中鸢尾果总抗氧化效果最强,分别为鸢尾根的1.49倍和鸢尾叶的4.41倍。鸢尾不同部位总抗氧化能力顺序为:鸢尾果 > 鸢尾根 > 鸢尾叶。

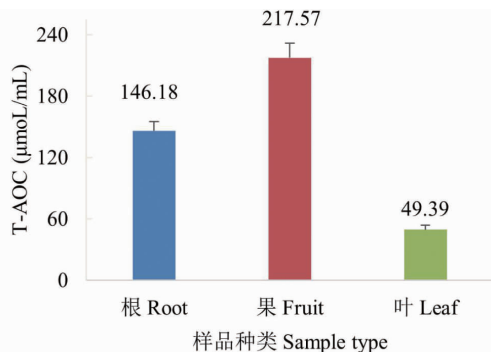


图3 各样品总抗氧化能力

Fig. 3 T-AOC of different samples

2.4 鸢尾不同部位酪氨酸酶抑制率

测定同一浓度不同部位的酪氨酸抑制率,在相同测试条件下,每组数据均测三组平行数据,得出平均值,结果表明,鸢尾根和鸢尾叶酪氨酸酶抑制率接近,但三个部位酪氨酸酶抑制率均不强(见表5)。

按照公式(4)确定鸢尾果的酪氨酸酶抑制率表现为计算上的负值。出现这一现象的原因,可能是样品酪氨酸酶抑制能力较弱,同时在抑制反应过程中酪氨酸酶与样品中某些化学成分反应产生了其他颜色物质,在测定波长处的吸光度甚至低于对照管吸光度。

表5 各样品酪氨酸酶抑制率

Table 5 Tyrosinase inhibition rate of different samples

样品种类 Sample type	酪氨酸酶抑制率 The inhibition rate of tyrosinase(%)
鸢尾根 <i>I. tectorum</i> root	17.05 ± 2.94
鸢尾叶 <i>I. tectorum</i> fruit	15.6 ± 1.51
鸢尾果 <i>I. tectorum</i> leaf	-13.7 ± 0.94

3 讨论与结论

本实验采用体外 DPPH 自由基清除、羟自由基清除、总抗氧化和酪氨酸酶抑制等方法,对鸢尾不同部位提取物进行了评价和比较,结果显示,鸢尾的不同部位均具有明显的抗氧化性。其中,鸢尾果的各项体外抗氧化指标均强于其他两个部位。鸢尾的不同部位抗氧化能力存在差异,原因可能与鸢尾果、鸢尾根以及鸢尾叶部位活性成分种类及其含量不同有关。研究表明,鸢尾的不同部位含有丰富的维生素 C、恩比宁、鸢尾黄酮甙、鸢尾黄酮新甙 A、鸢尾黄酮新甙 B、香荚兰己酮二葡萄糖甙等^[4,5],而维生素 C 和黄酮类成分具有显著的抗氧化活性^[11-13],这导致了鸢尾不同部位的具有明显的抗氧化性。酪氨酸酶活性抑制实验结果显示,鸢尾根与鸢尾叶的抑制率接近,但鸢尾的不同部位均未表现出较强的酪氨酸酶活性抑制作用。

本实验主要对鸢尾不同部位体外抗氧化和酪氨酸酶抑制效果进行评价,其体内抗氧化和酪氨酸酶抑制作用还有待进一步研究。实验结果表明鸢尾根、鸢尾叶和鸢尾果均具有抗氧化性,且鸢尾果抗氧化效果显著,有望为鸢尾不同部位用于美白和抗氧化

化产品提供参考。

参考文献

- Cheng L, Feng SC, Zhu SX, et al. Advances in molecular phylogeny of iris [J]. Guihaia (广西植物), 2021, 41(1): 31-39.
- Xiang Q, Duan FY, Zou YW, et al. Research progress of iris in China [J]. Rural Sci Technol (乡村科技), 2020(36): 50-51.
- Huang SS, Wu JJ, Li ZH, et al. Analysis of volatile components in iris concrete and its application [J]. Flavour Frag Cosmet (香料香精化妆品), 2020(4): 1-4.
- Zhang L, Jia QZ, Chen GY. Chemical test and thin-layer chromatography analyses of *Iris halophila* in Xinjiang [J]. Hubei Agr Sci (湖北农业科学), 2015, 54: 1702-1706.
- Wang Z, Yuan CJ, You YG, et al. Determination of tectoridin in *Rhizma Iridis Tectori* by HPLC [J]. China Pharm (中国药房), 2008, 19: 440-441.
- Ye ZH, Liu XY, Hu XF, et al. Study on chemical components in volatile oils obtained from different natural aged *Iris tectorum* Maxim. [J]. Flavour Frag Cosmet (香料香精化妆品), 2020(2): 1-4.
- Guo SP, Zeng SH, Zhang LQ. Study on producing *Iris* spice from fresh rhizome of *Iris pallida* by fungi fermentation [J]. Tobacco Sci Technol (烟草科技), 2009(5): 57-59.
- Qiao D, Wang F, Cheng SN, et al. Study on okra flower beverage and the scavenging ability of DPPH free radical [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2020, 41(13): 114-118.
- Huang XF, Liu ZM, Lei P, et al. *In vitro* antioxidant properties of different polar extracts of *Bupleuri Radix* [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2021, 19: 203-208.
- Liu XD, Huang H, Chen QX. Studies on inhibitory effects of benzoic acid on mushroom tyrosinase [J]. J Xiamen Univ: Nat Sci (厦门大学学报: 自然科学版), 2003, 42(1): 102-106.
- Li D, Qi JH, Feng H, et al. Antioxidant effect of total flavonoids of *Iris* on several vegetable oils [J]. Shaanxi J Agric Sci (陕西农业科学), 2014, 60(4): 1-2.
- Zhu HY, Zeng HL. Research progress on pharmacological effects of flavonoids [J]. Shandong Med J (山东医药), 2009, 49(17): 114-115.
- Ge YH, Zhong XM. Research progress on antioxidant mechanism and application of vitamin C and vitamin E [J]. Jilin Med J (吉林医学), 2007, 28: 707-708.