

# 芦根の木脂素苷类成分抗氧化活性及酪氨酸酶活性研究

**【摘要】**目的: 研究芦根の木脂素苷类成分抗氧化活性及酪氨酸酶活性, 以期为芦根作为天然抗氧化剂和酪氨酸酶活性抑制剂提供理论依据。方法: 芦根用 95%乙醇 12 倍量、10 倍量各回流 3h, 浓缩成浸膏。加水混悬, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等萃取。取正丁醇部位, 分离纯化, 在实验前配制成相应浓度的芦根木脂素苷试剂后进行 DPPH 自由基清除实验、ABTS<sup>+</sup>自由基清除实验、生化酶实验。结果: 抗氧化实验结果表明, 芦根木脂素苷对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基有较为可观的清除效果, IC<sub>50</sub> 分别为 0.03694 mg/mL 和 0.02036 mg/mL。酪氨酸酶活性实验结果表明, 芦根木脂素苷可降低酪氨酸酶活性, 当浓度为 10 mg/mL 时, 其对酪氨酸酶的抑制率为 55.78%, 半数抑制率为 9.509mg/mL, 浓度-抑制率图中表示, 两者呈现良好的线性关系 (R<sup>2</sup>=0.9905)。结论: 芦根木脂素苷对自由基 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup>具有良好的清除作用, 芦根木脂素苷类成分对酪氨酸酶活性具有较好的抑制效果, 为芦根作为天然抗氧化剂、酪氨酸酶抑制剂的开发利用提供理论依据。

**【关键词】** 芦根; 木脂素苷; DPPH; ABTS; 抗氧化; 酪氨酸酶

## **Study on antioxidant activity and tyrosinase activity of lignan glycosides from Asparagus root**

**[Abstract] Objective:** The antioxidant activities and tyrosinase activities of lignan glycosides of reed root were studied in order to provide theoretical basis for reed root as natural antioxidant and tyrosinase inhibitor. **Methods:** Lug root was concentrated into extract by reflux of 12 times and 10 times of 95 % ethanol for 3h. It was suspended with water and extracted with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol, etc. The parts of n-butanol were isolated and purified, and the corresponding concentration of lignan glycosides was prepared before the experiment, and then DPPH radical scavenging experiment, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging experiment and biochemical enzyme experiment were conducted. **Results:** The results of antioxidant experiment showed that the lignan glycosides of reed root had significant scavenging effect on DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radicals, with IC<sub>50</sub> of 0.03694 mg/mL and 0.02036 mg/mL, respectively. The results of the tyrosinase activity experiment showed that the activity of tyrosinase could be reduced by Lug lignan glycoside. When the concentration was 10 mg/mL, the inhibition rate of its tyrosinase was 55.78%, and the half inhibition rate was 9.509mg/mL. As shown in the concentration-inhibition rate diagram, the two showed a good linear relationship (R<sup>2</sup>=0.9905). **Conclusion:** The lignans of reed root had a good scavenging effect on free radical DPPH and ABTS<sup>+</sup>, and the lignan glycosides of reed

root had a good inhibitory effect on the activity of tyrosine crude enzyme, which provided a theoretical basis for the development and utilization of reed root as a tyrosinase inhibitor and natural antioxidant.

**[Keywords]** Reed root Lignan glycosides DPPH ABTS Antioxidant tyrosinase

## 目 录

1. 前言 .....	1
2. 材料与方法 .....	3
2.1. 实验材料与仪器设备 .....	3
2.2. 样品及试剂的配制 .....	3
2.2.1. 芦根木脂素苷类成分的提取 .....	3
2.2.2. DPPH 溶液的配制 .....	4
2.2.3. ABTS <sup>+</sup> 溶液的配制 .....	4
2.2.4. 抗坏血酸 (Vc) 对照溶液的配制 .....	4
2.2.5. 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH6.8) 的配制 .....	4
2.2.6. L-多巴溶液的配制 .....	5
2.2.7. 酪氨酸酶粗酶液的制备 .....	5
2.3. 不同浓度芦根木脂素苷的抗氧化活性实验 .....	5
2.3.1. 芦根木脂素苷对 DPPH 自由基的清除作用 .....	5
2.3.2. 芦根木脂素苷对 ABTS <sup>+</sup> 自由基的清除作用 .....	6

<b>2.4. 芦根木脂素苷对酪氨酸酶活性实验.....</b>	<b>6</b>
2.4.1. 最大吸收波长的测定 .....	6
2.4.2. 芦根木脂素苷对酪氨酸酶抑制率的测定 .....	7
2.4.3. 芦根木脂素苷对酪氨酸酶的动力学分析 .....	7
<b>3. 结果 .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. 不同浓度芦根木脂素苷的抗氧化活性实验结果.....</b>	<b>9</b>
3.1.1. 芦根木脂素苷对 DPPH 自由基的清除作用 .....	9
3.1.2. 芦根木脂素苷对 ABTS <sup>+</sup> 自由基的清除作用 .....	10
<b>3.2. 芦根木脂素苷对酪氨酸酶活性实验结果.....</b>	<b>11</b>
3.2.1. 芦根木脂素苷对酪氨酸酶抑制率的测定 .....	11
3.2.2. 芦根木脂素苷类对酪氨酸酶的动力学分析 .....	12
<b>4. 讨论 .....</b>	<b>14</b>
<b>5. 结论 .....</b>	<b>16</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>17</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>19</b>



# 1 前言

芦根具有清热泻火，生津止渴，利尿，止呕，除烦的功效，多用于热病烦渴，肺热咳嗽，肺痈吐脓等证<sup>[1]</sup>。现代主要用于治疗大叶性肺炎、萎缩性肺炎、肾结石、痤疮等疾病。经研究表明，芦根含有有机酸、糖类、甾酮以及龙胆酸、阿魏酸、咖啡酸和香草酸等酚酸类化合物成分。近年来对芦根药理作用的研究主要集中于改善代谢和保护肝肾等方面，在化学成分研究方面，绝大多数是对多糖的药理作用研究，对其他成分药理作用的研究较少<sup>[2]</sup>。

关于化学成分的分离，骆昉<sup>[3]</sup>等将芦根水提液预处理后，利用硅胶柱色谱、液相色谱等纯化手段，首次从芦苇属植物中分离出木脂素类成分 3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基南烛木树脂酚。秦涛<sup>[4]</sup>等利用硅胶、反相 ODS 柱色谱及制备液相色谱等进行分离纯化，从芦根乙醇提取物中分离鉴定了 25 个化合物，主要包括木脂素苷类、黄酮类等成分，其中木脂素苷类成分的含量高，种类多，表现出强的抗氧化作用。此外，植物提取物中的抗氧化活性成分主要有多酚类、生物碱类、皂苷类等。其中酚酸类物质的抗氧化能力与其结构中酚羟基密不可分<sup>[5]</sup>。与此同时，与芳环连接的羟基的数量，彼此处于邻位或对位位置，增强了酚酸的抗氧化和抗自由基活性<sup>[6]</sup>。而芦根木脂素苷类化合物中多含有联苯三酚或邻酚的结构，具有较强的抗氧化活性。关于木脂素类成分对酪氨酸酶活性影响的研究，仅有少量的文献治疗。佐佐木稔等<sup>[7]</sup>发现木兰花木脂素可以通过阻碍酪氨酸酶的成熟，促进酪氨酸酶的分解，从而起到抑制黑色素合成的作用。Azhar-ul-Haq<sup>[8]</sup>等从 *Vitex negundo* 甲醇提取部位中得到的木脂素具有中等强度的酪氨酸酶抑制活性。本实验基于芦根的木脂素类化合物在抗氧化活性和对酪氨酸酶活性两方面的研究较少，以及酪氨酸酶的催化反应与自由基的存在有一定的关系的基础上，开展研究芦根木脂素苷类成分清除 DPPH 和 ABTS 两种自由基能力以及对酪氨酸酶活性的影响实验，以期为芦根作为天然抗氧化剂和酪氨酸酶抑制剂的应用和开发提供理论依据，扩大抗衰老、抑制黑色素生成、预防色素沉着性疾病等的药物来源。

酪氨酸酶（EC 1.14.18.1, Tyrosinase）又名单酚氧化酶，为多酚氧化酶的一种，普遍存在于微生物、植物和哺乳动物中<sup>[9]</sup>。酪氨酸酶是一种含铜的黑色素生成关键酶，经过一系列催化反应后氧化成黑色素。黑色素的过度积累会导致色素沉着过度，导致诸多例如雀斑、老年斑、黄褐斑、黑色素瘤等皮肤疾病<sup>[10]</sup>。酪氨酸酶是参与黑色素生成过程的限速酶，其表达水平和活性的高低决定着黑色素合成的速度和产量，控制其活性可控制黑色素的生成量<sup>[11]</sup>。天然酪氨酸酶活性抑制剂可能是一种替代非天然酪氨酸酶活性抑制剂的良好来源<sup>[12]</sup>。因此，研究芦根木脂素苷类对酪氨酸酶的抑制作用，对治疗黑色素合成过量所导致的人体疾病具有实际意义。L-多巴在酪氨酸酶的催化作用下可转变成多巴色素，在475nm波长处存在最大吸收波长，故以此为实验依据。

自由基指含有不成对电子的原子或基团，具有氧化性。活性氧是化学性质活跃的含氧原子或原子团，其中包括自由基羟自由基、超氧阴离子自由基。这些自由基具有强大的氧化活性，且极不稳定，它们攻击细胞膜、线粒体膜、酶和蛋白质，造成肌肉、细胞、核酸等损伤从而引起各种疾病<sup>[13]</sup>。目前，抗氧化剂的主要途径为化学合成和天然产物提取。但化学合成产物具有潜在的毒副作用，使用范围受到限制。因此，从天然中药材中提取抗氧化剂具有高效、低毒、经济的特点<sup>[14]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料与仪器设备

表 1 实验材料与仪器设备

名称	信息
芦根	购自康美药业股份有限公司
马铃薯	购自广州市番禺区黄编综合市场
DPPH (2,2-联苯基-1-苦基肼基)	购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
ABTS[2,2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐]	购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
L-抗坏血酸 (Vc)	购自 MedChemExpress 公司
磷酸二氢钠	购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
磷酸氢二钠	购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
过硫酸钾 ( $K_2S_2O_8$ )	购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
L-多巴 (3,4-二羟基苯丙氨酸)	购自上海创赛科技有限公司
旋转蒸发器	购自海道尔夫公司
XS205 十万分之一电子天平	购自广州黄河仪器科技有限公司

高速冷冻离心机	购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司
恒温水浴箱	购自天津市泰斯特仪器有限公司
超声仪	购自北京恒奥德仪器仪表有限公司
UV2600 紫外分光光度计	购自日本岛津公司
D101 大孔吸附树脂	购自天津市海光化工有限公司

---

## 2.2 样品及试剂的配制

### 2.2.1 芦根木脂素苷类成分的提取

参考秦涛等<sup>[4]</sup>提取分离芦根木脂素苷类成分的实验方法。取芦根药材干品，放置 60°C 恒温干燥器中干燥 24h，粉碎，过 60 目筛，精密称取芦根药材 6g，加入 95%乙醇 12 倍量、10 倍量各回流 3h，合并滤液，减压浓缩得到浸膏。浸膏加适量蒸馏水混悬，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取，减压浓缩，得到正丁醇部位 0.126g。将正丁醇部位分散于水中，用水、30%乙醇、95%乙醇依次在 D101 大孔吸附树脂柱上，收集洗脱部分，减压浓缩，得到 30%乙醇洗脱部分 0.0130g，用 30%乙醇定容至 10mL，即得浓度为 1.3mg/mL 的芦根木脂素苷溶液。

### 2.2.2 DPPH 溶液的配制

精确称取 0.004 g DPPH (2,2-联苯基-1-苦基肼基)，加入无水乙醇溶解，定容至 100 mL，转移至棕色瓶中，4°C 下避光保存。

### 2.2.3 ABTS<sup>+</sup>溶液的配制

实验前，分别配制浓度为 7mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup> 溶液和浓度为 2.45mmol/L 的过硫酸钾，置于室温下避光静置 12h，根据体积比 1:1 的比例，既得到 3.5mmol/mL ABTS<sup>+</sup>预备液。使用前需用 30%乙醇稀释 ABTS<sup>+</sup>预备液约 30 倍，并调节其在

734nm 波长处的 OD 值为 0.680-0.720 左右，即为 ABTS<sup>+</sup>试液，备用。实验前量取 2.64mL 的 ABTS<sup>+</sup>预备剂（3.5mmol/L），并转移至 100mL 容量瓶，并用 30%乙醇溶液定容，得到浓度为 0.0924mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup>试液，备用。

#### **2.2.4 抗坏血酸（Vc）对照溶液的配制**

精密称取 40mg、3.50mg 固体 Vc，分别加入适量蒸馏水溶解，定容至 100mL，即得到浓度为 0.40mg/mL、0.035 mg/mL 的 Vc 溶液，于 4°C 冷冻保存，备用。

#### **2.2.5 磷酸盐缓冲溶液（PBS，pH6.8）的配制**

精密称取磷酸二氢钠粉末 0.195g，加入 100mL 蒸馏水溶解，转移至 250mL 容量瓶，定容，得磷酸二氢钠溶液，备用。称取磷酸氢二钠粉末 4.480g，配制方法同上，得磷酸氢二钠溶液，备用。分别量取磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶液，按照体积比 1:1.2 进行混合均匀，得到 pH 约为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液，即 PBS 缓冲溶液，备用。

#### **2.2.6 L-多巴溶液的配制**

精密称量 0.148g L-多巴粉末，使用上述配制的 PBS 缓冲溶液（pH6.8）进行溶解，定容至 100mL，备用。

#### **2.2.7 酪氨酸酶粗酶液的制备**

取若干新鲜马铃薯，洗净，去皮，切成 1cm×1cm×1cm 的方块，装入密封袋中并置于冰箱冷冻室 -20°C 中，冷藏过夜，备用。称取冷冻马铃薯块 16g，粉碎，过 60 目筛，按 1:10（M/V）的比例加入 PBS 缓冲溶液（pH=6.8）100mL，混合均匀，用纱布过滤，滤液装入 2mL 的离心管中，置于 4°C 冷冻离心机 4000 r/min

离心 10 min, 分离, 取上清液, 即为粗酶液, 于 4°C 冷藏备用。

## 2.3 不同浓度芦根木脂素苷的抗氧化活性实验

### 2.3.1 芦根木脂素苷对 DPPH 自由基的清除作用

将制备好的芦根木脂素苷溶液用 30%乙醇稀释, 并配制成 0.08、0.16、0.24、0.32、0.40mg/mL 共 5 个浓度的样品溶液, 按体系比 1:8 的比例, 即量取 0.5mL 样品溶液, 加入 4mL 浓度为 0.2mmol/L 的 DPPH 溶液。分别准确量取不同浓度的样品供试液 0.5 mL 于 10mL 试管中, 按 1:8 的比例加入 4mL DPPH (2,2-联苯基-1-苦基肼基) 溶液。混合均匀后置于暗处反应 40min, 然后测定其在 516nm 波长处的吸收度值。以无水乙醇溶液作为空白对照组, 以 0.40 mg/mL 抗坏血酸 (Vc) 溶液作为阳性对照组。按以下公式计算芦根木脂素苷溶液对 DPPH 的清除率。

$$\text{DPPH 清除率 (\%)} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} * 100\%$$

式中,  $A_i$  表示含有芦根木脂素苷+DPPH 溶液的吸光度值;  $A_j$  表示含有供试溶液+无水乙醇的吸光度值;  $A_0$  表示含有 30%乙醇溶液+DPPH 溶液的吸光度值。

以芦根木脂素苷浓度-DPPH 自由基清除率 (%) 为坐标, 作线性回归线, 根据公式并计算得到芦根木脂素苷对 DPPH 自由基的半数清除率 ( $IC_{50}$ )。

### 2.3.2 芦根木脂素苷对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除作用

将制备好的芦根木脂素苷溶液用 30%乙醇稀释, 并配制成 0.015、0.020、0.025、0.030、0.035mg/mL 共 5 个浓度的样品溶液, 按体系比 1:30 的比例, 即量取 100uL 样品溶液, 加入 3mL 浓度为 0.0924mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup>溶液中。以蒸馏水作为空白对照组, 以 0.035 mg/mL 抗坏血酸 (Vc) 溶液作为阳性对照组, 分别精密吸取 100uL 的浓度梯度的样品溶液于试管中, 按体系规定的比例, 加入 3mLABTS<sup>+</sup>溶液并混合均匀。混合液在避光处反应 40min, 检测其在 734nm

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/695113013343011134>