

文章编号:1673-1689(2009)01-0014-04

## 8种蜂花粉醇提物对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用

张红城<sup>1,2</sup>, 李春阳<sup>3</sup>, 董捷<sup>\*1,2</sup>, 尹策<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业部国家蜂产品加工专业分中心, 北京 100093; 3. 江苏省农科院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:** 研究了杏花花粉、茶花花粉、油菜花粉、向日葵花粉、荷花花粉、荞麦花粉、玫瑰花粉、五味子花粉等8种花粉醇提物对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用。结果表明,这8种花粉醇提物对以酪氨酸为底物的酪氨酸酶抑制作用存在显著性差异。其中杏花花粉醇提物表现出最好的抑制作用,IC<sub>50</sub>为(0.124±0.020) mg/mL,荞麦花粉醇提物的抑制作用相对较弱,IC<sub>50</sub>为(2.658±0.092) mg/mL。

**关键词:** 花粉醇提物; 酪氨酸酶; 抑制作用

**中图分类号:** S 896.4; TS 201.25

**文献标识码:** A

### Inhibiting Effect of Ethanolic Extracts of Eight Kinds of Bee Pollens on the Activity of Tyrosinase to Oxidize Monophenol

ZHANG Hong-cheng<sup>1,2</sup>, LI Chun-yang<sup>3</sup>, DONG Jie<sup>\*1,2</sup>, YIN Ce<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China; 2. National Research Center of Bee Product Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China; 3. Institute of Agro-food Science & Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The inhibition effect of ethanolic extracts of eight kinds of bee pollens, on tyrosinase activity were studied in this study, which were apricot pollen, camellia pollen, rape pollen, sunflower pollen, lotus pollen, buckwheat pollen, rose pollen and schisandra pollen. The result indicated that those ethanolic extracts exhibited a significant inhibition effect on tyrosinase which with tyrosine as substrate. Among of them, apricot pollen had the strongest inhibitive activity(IC<sub>50</sub> was 0.124±0.020 mg/mL). As a control, buckwheat pollen had the weakest activity(IC<sub>50</sub> was 2.658±0.092 mg/mL).

**Key words:** ethanolic extracts of bee pollens, tyrosinase, inhibition

收稿日期:2007-10-17

基金项目:国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD14B07-5-0);农业部基本科研业务费专项(200703);中国农业科学院蜜蜂研究所研发基金项目(200702)。

作者简介:张红城(1967-)男,黑龙江哈尔滨人,助理研究员,工学博士,主要从事食品生物技术的研发。

Email:zzhc@sohu.com

\* 通讯作者:董捷(1966-)女,北京人,副研究员,农学硕士,主要从事蜂产品开发与利用的研究。

Email:jiedon@126.com

酪氨酸酶(EC.1.14.18.1)又称多酚氧化酶,是一种含铜的金属酶,它广泛存在于动植物体内,是生物体合成黑色素的关键酶。酪氨酸酶催化反应分为两步,第一步能够催化单酚羟化成二酚,表现出单酚氧化活性,即以酪氨酸为底物生成多巴;第二步把二酚氧化成醌,表现出二酚氧化活性,即以多巴为底物生成多巴醌。醌又在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素<sup>[1]</sup>。

酪氨酸酶是黑色素产生途径中的主要限速酶,人体的许多疾病与黑色素代谢异常密切相关。缺乏此酶将导致代谢性病变——白化病;相反,如果该酶活力过高,又可形成黑色素瘤<sup>[2]</sup>。同样雀斑、黄褐斑、老人斑的形成,实际上也是体内酪氨酸代谢的失调和色素的异常沉积造成。抑制酪氨酸酶活性,可改善皮肤中色素细胞的酪氨酸酶的代谢,阻止色素沉着形成<sup>[3]</sup>。

蜂花粉常作为美容保健食品为大家食用,许多人认为服用茶花花粉可以起到美容的作用。蜂花粉醇提取物中主要成分是黄酮和多酚类物质,黄酮类化合物具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗衰老、减少自由基的产生和清除自由基的作用<sup>[4-6]</sup>。这可能与抑制酪氨酸酶活性有一定的联系。

为了揭示花粉的美容功效机理,作者研究了8种花粉醇提取物对以酪氨酸为底物的酪氨酸酶的抑制作用,即酪氨酸酶的第一步催化反应——单酚氧化活性的抑制作用,从而为传统的花粉美容说法提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 材料** 杏花花粉、茶花花粉、向日葵花粉、油菜花粉、荞麦花粉、荷花花粉、玫瑰花粉、五味子花粉,中国农业科学院蜜蜂研究所提供。

**1.1.2 试剂** L-酪氨酸、酪氨酸酶, Sigma 公司产品;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇,国产分析纯。

**1.1.3 仪器** UV-2100 型紫外可见分光光度计, UNICO 公司制造; PL303 型电子分析天平, 梅特勒-托利多公司制造; DZF-6090 型真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司制造; TDL-5 型低速离心机, 上海安亭科学仪器厂制造; HZS-H 型水浴振荡器, 哈尔滨市东明医疗仪器厂制造; SY21-K 型恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司制造。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品制备** 每种花粉各称取 30 g, 以每克

花粉加入 9 mL 无水乙醇, 置于室温条件下水浴振荡提取 24 h, 离心取上清液, 将上清液在 50 °C 条件下浓缩, 将浓缩液置于真空干燥箱中抽干得花粉固体醇提取物。各称取一定量花粉固体醇提取物, 以无水乙醇作为溶剂制备成 25 mg/mL 醇提取物溶液备用。

**1.2.2 试剂配制** 0.1 mol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液(PBS); 质量分数 0.03% 的 L-酪氨酸溶液(PBS 为溶剂); 酪氨酸酶溶液 1 000 U/mL(PBS 为溶剂)。

**1.2.3 酪氨酸酶活性的测定** 取 1.9 mL pH 6.8 的 PBS, 加入 1 mL 质量分数 0.03% 的酪氨酸溶液, 37 °C 水浴 10 min, 再加入 0.1 mL 1 000 U/mL 的酪氨酸酶溶液。每隔 1 min 记录 1 次 475 nm 处的吸光度。取线性增长阶段最大吸光值所对应的时间, 该时间为酶与底物反应的时间。

### 1.2.4 花粉醇提取物对酪氨酸酶活性抑制率的测定

$A_1$  值的测定: 取不同浓度的花粉醇提取物乙醇溶液, 用 pH=6.8, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液定容至 1.9 mL, 加入 1 mL 质量分数 0.03% 的酪氨酸溶液, 37 °C 水浴 10 min, 再加入 0.1 mL 酪氨酸酶溶液 37 °C 反应(反应时间为 2.2 确定的时间), 测定 475 nm 处的吸光值。

$A_1$  值的测定: 以 0.1 mL 磷酸盐缓冲液替代酪氨酸酶溶液, 其他同  $A_1$  值测定方法, 测定 475 nm 处的吸光值。

$A_b$  值的测定: 以同体积样品溶剂替代样品, 其他同  $A_1$  值测定方法, 测定 475 nm 处的吸光值。

$A_0$  值的测定: 以同体积样品溶剂替代样品, 以 0.1 mL 磷酸盐缓冲液替代酪氨酸酶溶液, 其他同  $A_1$  值测定方法, 测定 475 nm 处的吸光值。

抑制率 =  $\frac{((A_b - A_0) - (A_1 - A_1))}{(A_b - A_0)} \times 100\%$

以醇提取物质量浓度为横坐标, 以抑制率为纵坐标作图; 通过回归方程计算  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  为当抑制率达到 50% 时样品的质量浓度。

**1.2.5 数据分析** 使用 SPSS 软件, 采用邓肯法对数据进行方差分析。

## 2 结果与讨论

图 1 分别显示了 8 种不同的花粉醇提取物在不同质量浓度时的抑制率情况。可以看出, 各种花粉醇提取物对酪氨酸酶的单酚氧化活性, 有明显的抑制作用。随着醇提取物质量浓度的增加, 抑制率也增加。通过统计学分析, 进一步验证了 8 种花粉对酪氨酸酶的抑制作用存在着显著性的差异( $p < 0.05$ ) (表 1)。其中杏花花粉醇提取物与茶花花粉醇提取物之间

没有显著性差异,向日葵花粉醇提取物和五味子花粉醇提取物之间没有显著性差异,五味子花粉醇提取物与玫瑰花粉醇提取物之间没有显著性差异,油菜花粉醇提取物与荷花花粉醇提取物之间没有显著性差异,荞麦花粉醇提取物和各种花粉醇提取物之间均存在显著性差异。其中,杏花花粉醇提取物的  $IC_{50}$  最小,茶花花粉醇提取物、向日葵花粉醇提取物、五味子花粉醇提取物、玫瑰花粉醇提取物的居中,油菜花粉醇提取物、荷花花粉醇提取物、荞麦花粉醇提取物的  $IC_{50}$  比较大,大约是前几者的 3~20 倍不等。其中杏花花粉醇提取物的  $IC_{50}$  为  $(0.124 \pm 0.020)$  mg/mL,仅是最大的荞麦花粉醇提取物  $IC_{50}$  的 1/20。8 种花粉醇提取物对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用由大到小排列为:杏花花粉醇提取物>茶花花粉醇提取物>向日葵花粉醇提取物>五味子花粉醇提取物>玫瑰花粉醇提取物>油菜花粉

醇提取物>荷花花粉醇提取物>荞麦花粉醇提取物。

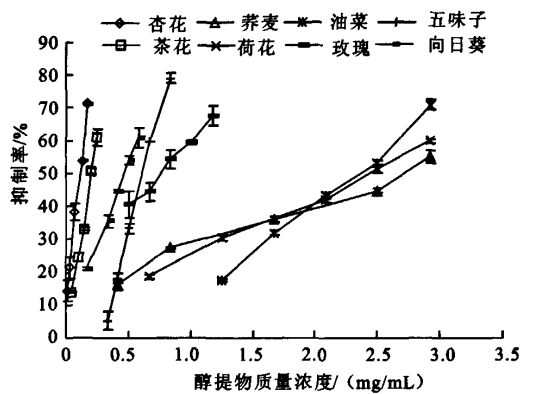


图1 8种花粉醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用

Fig.1 The inhibition of ethanolic extract of eight kind pollens on tyrosinase activity

表1 8种花粉醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用

Tab.1 The inhibition of ethanolic extract of eight kind pollens on tyrosinase activity

花粉名称	图1中各曲线线性回归方程	$R^2$	半抑制率时的质量浓度/(mg/mL)
杏花	$Y=359.22x+9.9271$	0.9817	$0.124 \pm 0.020^a$
茶花	$Y=242.85x+0.2762$	0.9869	$0.211 \pm 0.016^a$
向日葵	$Y=98.468x+3.9671$	0.9969	$0.468 \pm 0.022^b$
五味子	$Y=150x-43.255$	0.9943	$0.622 \pm 0.021^{bc}$
玫瑰	$Y=41.937x+18.581$	0.9859	$0.747 \pm 0.068^c$
油菜	$Y=30.81x-20.637$	0.9909	$2.283 \pm 0.038^d$
荷花	$Y=17.883x+6.9777$	0.9944	$2.409 \pm 0.163^d$
荞麦	$Y=14.12x+12.509$	0.972	$2.658 \pm 0.092^e$

注:1. 线性回归方程中自变量为花粉醇提取物质量浓度,应变量为抑制率。2. 不同字母表示彼此之间存在显著性差异( $p < 0.05$ ),使用统计软件 SPSS11.0 进行统计分析,统计方法为单因素方差分析,使用邓肯法进行多重比较。

以上结果证实了花粉醇提取物确实对酪氨酸酶第一步催化反应有明显的抑制作用。推断其作用机理有以下3点:

其一,花粉醇提取物阻止了酪氨酸酶与氧结合发生氧化,阻止自由基引发黑色素的产生。在产生黑色素的过程中氧起了引发作用,而氧自由基的存在加快了黑色素形成的速度<sup>[7]</sup>,花粉醇提取物中的主要成分是黄酮类化合物,作为良好的天然抗氧化剂,可以阻止酪氨酸酶与氧结合,同时花粉醇提取物可以有效地清除和抑制多种自由基,阻止自由基引发黑色素的产生。在对各种花粉醇提取物抗氧化研究中发现,通过对花粉醇提取物的还原力检测,表明各花粉醇提取物的还原力大小为油菜>茶花>向日葵>杏花>荷花>荞麦<sup>[4]</sup>。由于还原力主要检测的是捕捉过氧化氢的能力,茶花、向日葵花粉醇提取物有较好的还原过氧化氢中氧的能力,阻止了氧与酪氨酸酶的结合,从而减少了黑色素的产生。荞麦、荷

花花粉醇提取物还原力较弱,对酪氨酸酶的抑制作用也相对较弱。

其二,含有酚羟基的化合物对酪氨酸酶具有良好的竞争抑制作用。研究中发现,杏花花粉中含有苦杏仁苷,具有良好的抗氧化能力,而苦杏仁苷的结构中含有一分子的  $\alpha$ -羟基苯乙腈,分解后还会产生苯甲醛<sup>[8-9]</sup>,这些结构都是酪氨酸酶竞争抑制结构。这可能是杏花花粉醇提取物比其它7种花粉醇提取物抑制效果明显的原因。

其三,羟基与酪氨酸酶分子中的铜离子络和,影响酶的活性。酪氨酸酶是以二价铜离子为辅助因子的金属酶<sup>[10]</sup>。花粉醇提取物中的大量化合物在结构上存在一定数量的羟基,羟基有孤对电子,与酪氨酸酶分子中的铜离子络和,影响酶的活性。推测这可能是花粉醇提取物抑制作用的主要机理。

另外,花粉醇提取物中除含有黄酮类化合物外,还含酚羟基化合物、醛类化合物、芪类化合物及其

类似物、羧基化合物、含硫化合物、杂环类化合物等,这些成分都可以有效抑制酪氨酸酶的活性<sup>[11]</sup>。不同的花粉中含有不同种类的组分,这些大量而又复杂的组分之间会产生交互作用,这些复杂的机理还有待进一步的研究验证。

### 3 结 语

8种蜂花粉醇提取物对酪氨酸酶第一步催化反应有明显的抑制作用。结果表明,对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用由大到小为:杏花花粉醇提取物>茶花花粉醇提取物>向日葵花粉醇提取物>五味子花粉醇提取物>玫瑰花粉醇提取物>油菜花粉醇提取物>荷花花粉醇提取物>荞麦花粉醇提取物。

长久以来,人们普遍认为茶花花粉、荷花花粉具有美容、美白的功效,而从本实验中可以看出,杏花花粉醇提取物抑制酪氨酸酶单酚酶活性最强,明显好于其它几种花粉。过去对杏花花粉的研究很少,没有认识到杏花花粉在美容美白方面可开发利用的巨大潜力。

通过实验可以看出花粉醇提取物具有良好的抑制酪氨酸酶活性的作用,这也为人们长久以来认为服用花粉可以美容的说法提供了理论依据。具体的抑制类型还需要进行酶动力学的研究进行论证。而花粉醇提取物可以作为天然美白活性物质应用于美白护肤品和功能食品,也可以作为预防和治疗黑色素瘤等色斑疾病的药物进行开发。

### 参考文献(References):

- [1] 龚盛昭,杨卓如,林希. 香草酸对酪氨酸酶催化活性的抑制作用[J]. 精细化工,2005,22(12):927-930.  
GONG Sheng-zhao, YANG Zhuo-ru, LIN Xi. The inhibitory effect of vanillic acid on tyrosinase activity[J]. *Fine Chemicals*, 2005, 22(12):927-930. (in Chinese)
- [2] 徐鹏,钱竹,章克昌. 27味中药醇提取物对酪氨酸酶体外活性的影响[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:986-988.  
XU Peng, QIAN Zhu, ZHANG Ke-chan. In vitro tyrosinase inhibitory effect of 27 traditional Chinese medicinal herbs extracted with ethanol[J]. *Natural Product Research And Development*, 2006, 18:986-988. (in Chinese)
- [3] 傅博强,李欢,王小如. 甘草黄酮类化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(4):391-395.  
FU Bo-qiang, LI Huan, WANG Xiao-ru. Inhibitory effects of several licorice flavonoids on the monophenolase activity of tyrosinase[J]. *Natural Product Research and Development*, 2005, 17(4):391-395. (in Chinese)
- [4] 张红城,董捷,李慧. 六种蜂花粉多酚和黄酮类物质含量测定及抗氧化性的研究[J]. 食品科学,2007,28(9):500-504.  
ZHANG Hong-cheng, DONG Jie, LI Hui. Antioxidant activity and contents of total polyphenols and flavonoids in six kinds of bee pollens[J]. *Food Science*, 2007, 28(9):500-504. (in Chinese)
- [5] 王立,姚惠源,陶冠军. 乌饭树叶中黄酮类色素的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(4):81-84.  
WANG Li, YAO Hui-yuan, TAO Guan-jun. Scavenging [ $O_2^{\cdot -}$ ] and [ $\cdot OH$ ] of extracts from the leaves of *vaccinium bracteatum* thunb[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4):81-84. (in Chinese)
- [6] 陈向东,刘晓雯,吴梧桐. 灰树花多酚的提取和活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):26-30.  
CHEN Xiang-dong, LIU Xiao-wen, WU Wu-tong. Extraction and activities of polyphenol from *grifola frondosa* mycelium[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(4):26-30. (in Chinese)
- [7] 刘英华,欧阳红,徐庆. 桑叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 中国临床康复,2005,9(3):164-165.  
LIU Ying-Hua, OUYANG Hong, XU Qing. Inhibition of extract from mulberry leaves on tyrosinase activity[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9(3):164-165. (in Chinese)
- [8] 张红城,尹策,董捷. 杏花花粉中苦杏仁苷的提取工艺研究[J]. 食品科学,2007,28(7):236-241.  
ZHANG Hong-cheng, YIN Ce, DONG Jie. Study on extracting process of amygdalin from almond pollen[J]. *Food Science*, 2007, 28(7):236-241. (in Chinese)
- [9] 董捷,尹策,张红城. 杏花花粉中苦杏仁苷的抗氧化性研究[J]. 食品科学,2007,28(8):65-68.  
DONG Jie, YIN Ce, ZHANG Hong-cheng. Research on antioxidative activities of amygdlin from almond pollen[J]. *Food Science*, 2007, 28(8):65-68. (in Chinese)
- [10] CHANG Te-sheng, DING Hsiou-yu, LIN Hang-ching. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(10):1999-2001.
- [11] 陈清西,林建峰,宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报,2007,47(2):274-282.  
CHEN Qing-xi, LIN Jian-feng, SONG Kang-kang. Development of tyrosinase inhibitors[J]. *Journal of Xiamen University*, 2007, 47(2):274-282. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,杨萌)