

# 白鲜皮不同极性部位的抗氧化活性及对酪氨酸酶活性的影响

张化为<sup>1,2\*</sup>,周林洪<sup>2,3</sup>,邓 翀<sup>2</sup>,冯改利<sup>2</sup>(1.成都中医药大学药学院,成都 611137;2.陕西中医药大学药学院,陕西咸阳 712083;3.西安交通大学苏州研究生院,江苏苏州 215123)

中图分类号 R961.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4401-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.21

**摘要** 目的:研究白鲜皮不同极性部位的抗氧化活性及对酪氨酸酶活性的影响。方法:白鲜皮通过95%乙醇提取得醇提物,用水溶解后分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取,得到不同极性部位。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法考察其抗氧化活性[以半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)表示],酪氨酸酶法考察不同极性部位活性。结果:白鲜皮石油醚、三氯甲烷和乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的IC<sub>50</sub>分别为0.875、0.824、0.407 mg/mL。当各极性部位质量浓度分别为25.0、50.0、100、200、300、400、500 μg/mL时,石油醚部位对酪氨酸酶的抑制率依次为-3.18%、-4.98%、0.160%、0.044%、2.31%、3.89%、4.29%,三氯甲烷部位对酪氨酸酶的抑制率依次为-33.39%、-31.48%、-10.14%、-5.42%、-9.70%、-4.06%、-0.42%,乙酸乙酯部位对酪氨酸酶的抑制率依次为-17.63%、-17.89%、-18.42%、-21.84%、-20.26%、-22.13%、-32.36%。结论:白鲜皮乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的能力明显强于其他两个萃取部位,且与浓度呈正相关;乙酸乙酯、三氯甲烷部位对酪氨酸酶有激活作用,三氯甲烷部位对酪氨酸酶的激活作用与浓度呈负相关;石油醚部位对酪氨酸酶的活性具有双向调节作用。

**关键词** 白鲜皮;极性部位;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼;酪氨酸酶;抗氧化

## Antioxidant Activity of the Different Polar Parts from *Dictamnus dasycarpus* and Its Effects on Tyrosinase Activity

ZHANG Huawei<sup>1,2</sup>, ZHOU Linhong<sup>2,3</sup>, DENG Chong<sup>2</sup>, FENG Gaili<sup>2</sup>(1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712083, China; 3.Suzhou Graduate School, Xi'an Jiaotong University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the antioxidant activity of the different polar parts from *Dictamnus dasycarpus* and its effects on tyrosinase activity. METHODS: Extract was extracted by 95% ethanol from *D. dasycarpus*, using petroleum ether, chloroform, ethyl acetate to obtain different polar parts after dissolved in water. 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) method was used to investigate its antioxidant activity [expressed as half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)], and tyrosinase method was used to investigate the related activity in different polar parts. RESULTS: The IC<sub>50</sub> of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate parts for scavenging DPPH free radicals were 0.875, 0.824, 0.407 mg/mL, respectively. When the mass concentration of each polar part were 25.0, 50.0, 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL, the inhibition rate of petroleum ether part to tyrosinase were -3.18%, -4.98%, 0.160%, 0.044%, 2.31%, 3.89%, 4.29%; that of trichloromethane part were -33.39%, -31.48%, -10.14%, -5.42%, -9.70%, -4.06%, -0.42%; and that of ethyl acetate part were -17.63%, -17.89%, -18.42%, -21.84%, -20.26%, -22.13%, -32.36%. CONCLUSIONS: The capacity in scavenging DPPH free radicals in ethyl acetate part is obviously stronger than the other 2 parts, showing positive correlation with the concentration. Ethyl acetate and chloroform have an activation effect on tyrosinase, the activation effect of chloroform part on tyrosinase was negatively correlated with the concentration and petroleum ether part has a two-way regulatory effect on the activity of tyrosinase.

**KEYWORDS** *Dictamnus dasycarpus*; Polar parts; 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine; Tyrosinase; Antioxidant

白癜风是一种临床较常见的色素减退性皮肤病,易诊断、难治疗<sup>[1]</sup>。自由基可对黑色素细胞造成损害,而黑色素细胞是黑色素合成的场所,其受损可导致黑色素合成减少。现代研究发现,酪氨酸酶是黑色素生成的关键

酶<sup>[2]</sup>。中医认为白癜风为湿热相搏于体表,又外感风邪,致血不容肌、肌肤失养形成的。

中药白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)为芸香科(Rutaceae)白鲜属多年生草本植物白鲜的根皮,其味苦、咸,性寒,具有清热燥湿、祛风止痒、解毒等功效<sup>[3]</sup>,可用于治疗白癜风。本研究采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

\* 讲师,博士研究生。研究方向:中药化学成分及活性研究。  
E-mail:307838553@qq.com

(DPPH)法、离体酶学法,考察不同极性部位的抗氧化活性及对酪氨酸酶活性的影响,从白鲜皮药材中筛选出治疗白癜风的有效部位,为缓解或治愈白癜风提供基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV1102 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);AL204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 1.2 药材与试剂

白鲜皮药材采自陕西省太白山区,经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为芸香科白鲜属多年生草本植物白鲜的根皮;维生素C(VC,天津市天力化学试剂有限公司,批号:2015608,规格:25 g);DPPH(日本东京化成工业株式会社,批号:CR0032,纯度:98%);左旋多巴(日本东京化成工业株式会社,批号:SZ150135J,纯度:98%);蘑菇酪氨酸酶(美国Sigma公司,批号:1001927785,纯度:98%,活性:5 771 U/mg);其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 各极性部位的制备

取白鲜皮药材粉末 500 g, 95%乙醇回流提取3次,每次 1.5 h,抽滤,合并滤液,减压回收至无醇味。分别以石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取,收集萃取液,减压回收溶剂,真空干燥,得3个极性部位的质量依次为10.52、18.62、21.56 g,密封备用。

### 2.2 DPPH 抗氧化活性测定

参考文献[4-5]的方法。以VC为阳性对照,称取各极性部位约125 mg,用95%乙醇溶解,定容于25 mL量瓶中,将各极性部位的乙醇溶液按照2倍量浓度梯度依次稀释至0.039 mg/mL,然后分别与100  $\mu$ L DPPH溶液混合,振摇30 s,静置30 min,于517 nm波长处测定吸光度( $A_i$ ),另外分别测定不加样品溶液和DPPH所制溶液的吸光度(分别为 $A_c$ 、 $A_j$ ),计算DPPH自由基清除率( $K$ ), $K=[1-(A_i-A_j)/A_c]\times 100\%$ 。

### 2.3 酪氨酸酶活性测定

2.3.1 白鲜皮各极性部位供试品制备 精密称取0.1 g白鲜皮不同极性部位,二甲基亚砷溶解,用适量的95%乙醇和0.005 mol/mL磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.8)定容至100 mL量瓶中,制成质量浓度均为1 mg/mL的样品溶液;再用95%乙醇稀释制成质量浓度分别为25、50、100、200、300、400、500  $\mu$ g/mL白鲜皮各极性部位供试品溶液。

2.3.2 蘑菇酪氨酸酶溶液的制备 精密称量0.333 mg蘑菇酪氨酸酶,用0.005 mol/mL的PBS(pH 6.8)定容至50 mL量瓶中,制成质量浓度为6.67  $\mu$ g/mL的蘑菇酪氨酸酶溶液,于室温或冰箱中冷藏保存。

2.3.3 左旋多巴溶液的制备 精密量取左旋多巴2.467 mg,用0.005 mol/mL的PBS(pH 6.8)定容至25 mL量瓶

中,制成质量浓度为0.01 mg/mL的左旋多巴溶液,立即避光贮存,置于冰箱中冷藏。

2.3.4 酪氨酸酶活性测定 参考文献[6]方法。取“2.3.1”~“2.3.3”项下溶液适量,准确按表1中1、2、3、4组反应液添加试剂,充分混匀后在37  $^{\circ}$ C水浴温育30 min,迅速转移至3 mL比色皿中。于475 nm波长处测定吸光度( $A$ ),并计算抑制率和半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),抑制率= $[1-(A_3-A_4)/(A_1-A_2)]\times 100\%$ 。

表1 各组反应液组成(mL)

Tab 1 Composition of reaction liquid in each group (mL)

试验组号	PBS(pH 6.8)	样品溶液	左旋多巴	酪氨酸酶溶液	合计
第1组( $A_1$ )	2.0	0	0.5	0.5	3
第2组( $A_2$ )	2.5	0	0	0.5	3
第3组( $A_3$ )	1.5	0.5	0.5	0.5	3
第4组( $A_4$ )	2.0	0.5	0	0.5	3

## 3 结果

### 3.1 白鲜皮不同极性部位的抗氧化活性

0.102、0.051、0.026、0.013、0.006、0.003、0.001 mg/mL VC对DPPH自由基的清除率分别为90.78%、88.03%、73.58%、32.47%、20.01%、14.28%、8.80%, $IC_{50}$ 为0.016 mg/mL。

白鲜皮不同极性部位对DPPH自由基清除率的测定结果见表2。

表2 白鲜皮不同极性部位对DPPH自由基清除率的测定结果

Tab 2 Determination results of scavenging rate by different polar parts from *D. dasycarpus* on DPPH free radical

质量浓度,mg/mL	自由基清除率,%		
	石油醚部位	三氯甲烷部位	乙酸乙酯部位
5.000	82.20	83.75	92.48
2.500	73.60	75.99	85.93
1.250	51.02	54.89	69.92
0.625	34.25	39.12	50.88
0.313	23.26	28.69	35.97
0.156	19.22	17.29	28.57
0.078	14.75	19.11	24.57
0.039	8.72	8.69	21.18

经计算,白鲜皮石油醚部位、三氯甲部位和乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的 $IC_{50}$ 分别为0.824、0.650、0.407 mg/mL。这说明白鲜皮3个极性部位均具有一定程度的抗氧化活性,和VC相比,其抗氧化活性稍差。在3个不同极性部位中,乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的能力明显强于其他2个部位。总体而言,白鲜皮3个不同极性部位均能清除DPPH自由基,减轻生命活动中产生的自由基对机体黑色素细胞的伤害,进而起到防治白癜风的作用。

### 3.2 白鲜皮不同极性部位对酪氨酸酶活性的影响

白鲜皮不同极性部位萃取物对酪氨酸酶活性的抑

制率测定结果见表3。

表3 白鲜皮不同极性部位对酪氨酸酶的抑制率测定结果

Tab 3 Determination results of inhibition rate of tyrosinase by different polar parts from *D. dasycarpus*

酪氨酸酶质量浓度, μg/mL	抑制率, %		
	石油醚部位	三氯甲烷部位	乙酸乙酯部位
25	-3.18	-33.39	-17.63
50	-4.98	-31.48	-17.89
100	0.16	-10.14	-18.42
200	0.44	-5.42	-21.84
300	2.31	-9.70	-20.26
400	3.89	-4.06	-22.13
500	4.29	-0.42	-32.36

白鲜皮乙酸乙酯部位中抑制率为负值,表明7个质量浓度(25~500 μg/mL)的乙酸乙酯部位均对酪氨酸酶有激活作用,当质量浓度为500 μg/mL时激活率达32.36%;且随白鲜皮乙酸乙酯部位浓度增加,其对酪氨酸酶的激活作用增强。白鲜皮三氯甲烷部位对酪氨酸酶也有不同程度的激活作用,当质量浓度为25 μg/mL时作用较为显著,激活率达33.39%;然而随着质量浓度增加,其对酪氨酸酶的激活作用反而减弱,表明三氯甲烷部位对酪氨酸酶的激活作用与浓度呈负相关。不同质量浓度石油醚部位对酪氨酸酶的抑制率有正有负,表明白鲜皮石油醚部位对酪氨酸酶的活性具有双向调节作用。

#### 4 讨论

研究发现,白癜风患者患病部位表皮细胞内的过氧化氢酶活性明显下降<sup>[7]</sup>,其抗氧化能力减弱。细胞受到过氧化物的损伤增加,黑色素细胞在持续氧化作用下,会引起蛋白变性,最终影响到黑色素细胞的功能,甚至使细胞死亡<sup>[8]</sup>。Chavan B等<sup>[9]</sup>研究发现,白癜风患者体内存在高水平的四氢生物蝶呤及其异构体。高水平的生物蝶呤可进一步刺激过氧化氢等活性氧簇的生成,并且可以抑制黑色素代谢相关酶活性,如甲基苯丙氨酸羟化酶、酪氨酸酶等,其对酪氨酸酶活性与黑色素合成量呈正相关<sup>[10]</sup>。在白癜风患者细胞内的氧化应激可以诱导二羟苯丙氨酸形成复合物与酪氨酸酶结合,抑制酪氨酸酶活性而干扰黑色素合成<sup>[11]</sup>。自由基在代谢过程中产生过多,不仅会导致白癜风,更会引起其他病症。如秦蒙等<sup>[12]</sup>研究发现,白鲜皮的水提物可通过降低血清中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶的含量,起到抑制早期动脉粥样硬化形成的作用;徐明亮等<sup>[13]</sup>发现白鲜皮水提液可以提高大鼠体内抗氧化酶的活性、减少氧化还原产物,对缺血再灌注大鼠心肌损伤具有明确的保护作用;王丽丽<sup>[14]</sup>研究发现,白鲜皮水提液对缺血再灌注心肌损伤的大鼠不仅可通过抗氧化

作用,还可通过线粒体途径产生显著的抗凋亡作用。

本试验结果表明,白鲜皮不同极性部位具有一定程度的抗氧化活性,通过抗氧化作用维持黑色素细胞的正常功能,减轻黑色素细胞可能受到的损伤。其中,白鲜皮乙酸乙酯部位对酪氨酸酶有明显的激活作用(500 μg/mL时激活率达32.36%),且该部位的抗氧化活性在白鲜皮3个极性部位中最好。酪氨酸酶激活,可促进机体黑色素合成,白鲜皮乙酸乙酯部位的抗氧化性(清除DPPH自由基的IC<sub>50</sub>为0.407 mg/mL)又降低了自由基对黑色素细胞的损伤,因此推断乙酸乙酯部位可能是白鲜皮防治白癜风的主要有效部位。白鲜皮三氯甲烷部位对酪氨酸酶作用的影响主要表现为激活作用(25 μg/mL时激活率达33.39%),对酪氨酸酶的激活作用较为显著;但随着质量浓度的增大,其激活作用越来越弱,结合其抗氧化活性,推测该极性部位可用于研究低剂量-高疗效的防治白癜风的药物治疗。白鲜皮石油醚部位对酪氨酸酶活性的影响表现为双向作用,在低浓度表现为激活作用,此后随着质量浓度的增大表现为抑制作用。据此可以将白鲜皮石油醚各萃取部位用于美白药物或产品的研究<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献

- [1] Kemp EH, Waterman EA, Weetman AP. Autoimmune aspects of vitiligo[J]. *Autoimmunity*, 2001, 34(1): 65-77.
- [2] Ines D, Sonia B, Riadh BM, et al. A comparative study of oxidant-antioxidant status in stable and active vitiligo patients[J]. *Arch Dermatol Res*, 2006, 298(4): 147-152.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:110-111.
- [4] 董秀英, 吕青涛, 张国英, 等. DPPH法测定九州虫草不同极性部位抗氧化活性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(10): 70-73.
- [5] 付影超, 严铭铭, 黄耀玲, 等. 节节草总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(10): 1580-1583.
- [6] 庞玉新, 袁蕾, 王中洋, 等. 艾纳香不同部位提取物的抗氧化活性及其对酪氨酸酶的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18): 4-8.
- [7] Maresca V, Roccella M, Roccella F, et al. Increased sensitivity to per-oxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo[J]. *Invest Dermatol*, 1997, 109(3): 310-313.
- [8] Jiménez-Cervantes C, Martínez Esparza M, Pérez C, et al. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor[J]. *Cell Sci*, 2001, 114(12): 2335-2344.
- [9] Chavan B, Beazley W, Wood JM, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases de novo synthesis of (6R)-L-erythro-5, 6, 7, 8-tetrahydro-

# 匹可硫酸钠的合成工艺改进

孙晋瑞\*,李丹,王洪臣,邓玉晓,杨利(山东省药学院/山东省化学药物重点实验室,济南 250101)

中图分类号 R914.5;R442.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4404-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.22

**摘要** 目的:改进匹可硫酸钠的合成工艺。方法:通过改变反应溶剂、加料方式、精制方法和形成结晶水等方法对匹可硫酸钠的合成工艺进行改进。以苯酚为起始原料,与2-吡啶甲醛缩合制得4,4'-(吡啶-2-基亚甲基)双苯酚,并考察其收率;然后经酯化、成盐,形成结晶水得到匹可硫酸钠,再考察其纯度。结果:关键中间体4,4'-(吡啶-2-基亚甲基)双苯酚的收率达88%以上,精制后的产品纯度达99.5%以上。匹可硫酸钠一水合物稳定,单一杂质含量小于0.1%。结论:改进后的工艺简单、条件温和,适合大规模生产。

**关键词** 匹可硫酸钠;合成工艺;4,4'-(吡啶-2-基亚甲基)双苯酚;改进

## Improvement of Synthesis Technology for Sodium Picosulfate

SUN Jinrui, LI Dan, WANG Hongchen, DENG Yuxiao, YANG Li (Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences/Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the synthesis technology of sodium picosulfate. METHODS: The synthesis technology of sodium picosulfate was improved by changing reaction solvent, charging sequence, refined method and formation of crystal water. Using phenol as raw material, it was condensed with 2-pyridinecarboxaldehyde to achieve 4,4'-(pyridin-2-ylmethylene) diphenol, and its yield rate was investigated. Sodium picosulfate was obtained after esterification, salification, formation of crystal water, and then its purity was determined. RESULTS: The yield rate of key intermediate 4,4'-(pyridin-2-ylmethylene) diphenol reached above 88%, and the purity of refined products reached over 99.5%. Sodium picosulfate monohydrate was stable, and the content of single impurity was less than 0.1%. CONCLUSIONS: The improved technology is simple with mild conditions, and suitable for large-scale production.

**KEYWORDS** Sodium picosulfate; Synthesis technology; 4,4'-(pyridin-2-ylmethylene) diphenol; Improvement

匹可硫酸钠(Sodium picosulfate)化学名为4,4'-(吡啶-2-基亚甲基)双苯基双硫酸酯钠盐一水合物,是由意大利De Angeli公司开发。1980年5月该药以Laxoberon的商品名获得上市许可,目前已在意大利、德国、日本、澳大利亚等多个国家广泛使用,2012年7月美国FDA批准匹可硫酸钠-氧化镁-枸橼酸口服散剂上市(商品名:Prepopik)<sup>[1]</sup>。临床上匹可硫酸钠主要用于治疗各种便秘症,如术后辅助排便、造影剂给药后促进排便、手术前肠

管内容物排除、大肠检查(内窥镜)前处理、肠道内容物排除等。该药临床效果好、副作用很小、安全系数高,作为日服1次的便秘药,匹可硫酸钠在治疗便秘方面与国内已上市的药物比较具有较大的优势特点,市场前景广阔<sup>[2-4]</sup>。

匹可硫酸钠的合成路线文献报道较多,根据起始原料的不同,主要分为以下3种:(1)以苯酚为起始原料,在硫酸作用下与2-吡啶甲醛进行缩合反应得4,4'-(吡

biopterin via GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein in vitiligo[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2009, 32(1):86-94.

[10] Abu Tahir M, Pramod K, Ansari SH, et al. Current remedies for vitiligo[J]. *Autommunity Reviews*, 2010, 9(7):516-520.

[11] Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, et al. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(6):1512-1518.

[12] 秦蒙,国汉邦,许扬.白鲜皮水提取物对ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化早期病变形成的抑制作用[J].中国实验动物学报,2010,18(3):191-195,281.

[13] 徐明亮,王丽丽,李琳,等.白鲜皮水提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国实验动物学报,2013,21(1):47-52,97-98.

[14] 王丽丽.白鲜皮水提取物抑制小鼠动脉粥样硬化晚期病变形成及对心肌细胞的保护作用[D].北京:北京协和医学院,2014.

[15] 严航,唐婷,干丽,等.薏苡仁提取物对酪氨酸酶抑制作用[J].中成药,2013,35(4):696-699.

\* 主任药师。研究方向:新药研发。电话:0531-81213291。E-mail:sjrcxl@126.com.cn

(收稿日期:2017-01-23 修回日期:2017-08-20)  
(编辑:刘明伟)