

# 紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的谱效关系研究<sup>Δ</sup>

孙慧玲<sup>1,2\*</sup>, 何楠<sup>1,2</sup>, 史梦珺<sup>1,2</sup>, Adel Fahmi Ahmed<sup>1,3</sup>, 李昌勤<sup>1#</sup>(1.河南大学药学院/河南省药食两用资源功能研究国际联合实验室, 河南开封 475004; 2.开封市保健食品功效成分研究重点实验室, 河南开封 475004; 3.埃及国家农业研究中心药用与芳香植物研究所, 埃及吉萨 12619)

中图分类号 R285;O657.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3340-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.07

**摘要** 目的:研究紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的谱效关系。方法:取不同采收时期的紫荆叶样品16批,以70%乙醇进行加热提取。采用高效液相色谱法对紫荆叶提取物进行分析,色谱柱为InertSustain C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.1%冰醋酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为254 nm,进样量为10 μL。将所获得的16个批次紫荆叶提取物色谱图采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004(A版)》进行匹配,获得量化特征色谱图并确定共有峰。采用体外酪氨酸酶多巴速率氧化微量法测定紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率。采用偏最小二乘回归分析法,以紫荆叶提取物特征共有峰峰面积为自变量、其对酪氨酸酶活性的抑制率为因变量进行谱效关系分析,筛选出与酪氨酸酶活性抑制作用有显著相关性的色谱峰。结果与结论:匹配得到紫荆叶提取物的16个特征共有峰;酪氨酸酶活性抑制试验结果显示,紫荆叶提取物质量浓度为100 mg/mL(按生药计)时对酪氨酸酶活性的抑制作用最强;谱效关系分析结果显示,紫荆叶提取物特征色谱图中P5、P8、P10、P12、P15、P16号共有峰与其对酪氨酸酶活性的抑制作用呈正相关(相关系数 $R > 0.1$ ),P2、P4号共有峰与其对酪氨酸酶活性的抑制作用呈负相关(相关系数绝对值 $|R| > 0.1$ ),提示上述特征共有峰代表的化合物可能对酪氨酸酶活性具有抑制或激活作用。

**关键词** 紫荆叶;提取物;活性成分;酪氨酸酶;抑制作用;谱效关系

## Study on Spectrum-effect Relationship of Inhibitory Effects of the Extract of *Cercis chinensis* Leaves on the Activity of Tyrosinase

SUN Huiling<sup>1,2</sup>, HE Nan<sup>1,2</sup>, SHI Mengjun<sup>1,2</sup>, Adel Fahmi Ahmed<sup>1,3</sup>, LI Changqin<sup>1</sup>(1. School of Pharmacy, Henan University/Joint International Research Lab of Food & Medicine Resource Function, Henan Kaifeng 475004, China; 2. Kaifeng Key Lab of Functional Components in Health Food, Henan Kaifeng 475004, China; 3. Institute of Medicinal and Aromatic Plants Research, Egypt National Agricultural Research Center, Giza 12619, Egypt)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the spectrum-effect relationship of inhibitory effects of the extract of *Cercis chinensis* leaves on the activity of tyrosinase. METHODS: Totally 16 batches of samples of *C. chinensis* leaves were collected at different harvesting periods, and were heated and extracted with 70% ethanol. The extract of *C. chinensis* leaves was analyzed by HPLC. The determination was performed on InertSustain C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-0.1% glacial acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 254 nm. The sample size was 10 μL. The chromatograms of 16 batches of extract of *C. chinensis* leaves were matched with *Similarity Evaluation System for Fingerprint Chromatogram of TCM 2004* (A edition) to obtain characteristic chromatogram and define common peak. The inhibitory rate of the extract of *C. chinensis* leaves on the activity of tyrosinase was detected by *in vitro* tyrosinase dopamine rate oxidation microassay. Partial least squares regression analysis was used to analyze the spectrum-effect relationship of the extract of *C. chinensis* leaves using common peak area as independent variable, inhibitory rate to tyrosinase as dependent variable. The chromatographic peaks with significant correlation with tyrosinase inhibition effects were screened out. RESULTS & CONCLUSIONS: Totally 16 characteristic common peaks were obtained for the extract of *C. chinensis* leaves. Tyrosinase activity test showed that the inhibition effect of the extract of *C. chinensis* leaves was the strongest to tyrosinase when the concentration of the extract was 100 mg/mL (by crude drug). The common peaks P5, P8, P10, P12, P15, P16 had positive correlation with tyrosinase inhibition effects (correlation coefficient  $R > 0.1$ ), while the common peaks P2 and P4 had negative correlation with tyrosinase inhibition effects (absolute correlation coefficient  $|R| > 0.1$ ), indicating compounds represented by these common peaks may inhibit or activate tyrosinase activity.

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家重点研发计划重点专项(No.2018YFD0400200);  
河南省高校科技创新团队支持计划(No.16IRTSTHN019)  
\* 高级实验师。研究方向:中药活性成分。电话:0371-23880680。E-mail:971913092@qq.com  
# 通信作者:教授。研究方向:中药活性成分。电话:0371-23880680。E-mail:lcq@henu.edu.cn

**KEYWORDS** *Cercis chinensis* leaves; Extract; Active component; Tyrosinase; Inhibition effect; Spectrum-effect relationship

紫荆(*Cercis chinensis*)为豆科紫荆属植物,是一种常见的栽培植物,在全国各地均有分布<sup>[1]</sup>。紫荆作为传统中药,其花可用于治疗鼻中疳疮、风湿骨痛,其果可用于治疗咳嗽,其树皮可用于治疗风湿寒痹、血气疼痛、痈肿等<sup>[2-3]</sup>。相关文献表明,紫荆属植物中的化学成分有黄酮类、木脂素类以及二苯乙烯类等,其中以黄酮类化合物为主<sup>[4]</sup>。

随着人们生活水平的提高,越来越多的女性对皮肤的白暂度十分关注。但是受紫外线照射、环境污染等因素的影响,会导致人体黑色素代谢异常、黑色素细胞分泌的黑色素增加并使局部皮肤变黑,从而发生雀斑和黄褐斑等色素沉着性疾病<sup>[5]</sup>。酪氨酸酶是一种含铜氧化酶,是黑色素细胞合成黑色素的关键性酶,而通过抑制酪氨酸酶活性,可减少黑色素的形成,从而发挥美白的功效<sup>[6-7]</sup>。因此,可通过考察药物对酪氨酸酶活性的抑制作用来评价其美白效果。研究表明,紫荆属植物中的黄酮类化合物对酪氨酸酶活性具有竞争性抑制作用<sup>[8-9]</sup>,如紫荆叶中就含有此类酪氨酸酶活性抑制成分<sup>[10]</sup>。

中药成分复杂,要阐明某种成分与相应药效活性的关系较为困难,而中药谱效学能够将中药指纹图谱和药效学结合起来,既能标示出中药含有的多种成分,又能很好地揭示成分与药效的关系<sup>[11-13]</sup>。因此,中药谱效学常用于阐明中药中各成分对药效的贡献程度,其主要方法包括多元线性回归分析法、偏最小二乘回归分析法等<sup>[14]</sup>。本研究采用最小偏二乘回归分析法,根据紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用,考察其特征图谱所代表的不同成分对该抑制作用的贡献程度,以期筛选具有酪氨酸酶活性抑制作用的天然美白原料提供理论基础和试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

AB135-S型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(包括DGU-20A5R在线脱气机、LC-20AT输液泵、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-M20A紫外检测器及LC-Solution色谱数据处理系统,日本岛津公司);Multiskan MK3型全波长酶标仪(美国Thermo Electron公司);分样筛(上虞市五四仪器厂);TGL-16型高速离心机(金坛市中大仪器厂);GRP-9270型隔水式恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);HH-S型数显恒温水浴锅(常州翔天实验仪器厂)。

### 1.2 试剂

左旋多巴对照品(上海Alfa Aesar公司,批号:10102261,纯度:98%);酪氨酸酶(美国Worthingto Biochemical公司,批号:33K14431,活性:1 050 U/mg);冰醋酸(分析纯)、甲醇(色谱纯)均购自天津市大茂化学试剂厂;水为杭州娃哈哈集团有限公司纯净水。

## 1.3 药材

紫荆叶采集于河南大学金明校区,每隔半个月采收一批,共16个批次(分别采收于2016年4月21日、5月4日、5月19日、6月3日、6月18日、7月3日、7月18日、8月2日,2017年4月19日、5月4日、5月19日、6月4日、6月19日、7月4日、7月19日、8月4日,批次编号依次为S1~S16),经河南大学药学院李昌勤教授鉴定为紫荆属植物紫荆(*C. chinensis*)的叶。标本存放于河南省药食两用资源功能研究国际联合实验室。

## 2 方法

### 2.1 紫荆叶提取物供试品溶液的制备

取干燥紫荆叶,粉碎后过70目筛,精密称取粉末500 mg,置于10 mL EP管中,加入70%乙醇5 mL,在50 ℃水浴条件下加热提取2 h;3 000 r/min离心3 min,取上清液用70%乙醇稀释,依次得到100、50、25 mg/mL(按生药计)的紫荆叶提取物供试品溶液。

### 2.2 紫荆叶提取物量化特征色谱图的生成及共有峰的确

采用HPLC法测定。色谱条件:色谱柱为InertSustain C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0→13 min,30% A→43% A;13→15 min,43% A→50% A;15→22 min,50% A;22→35 min,50% A→68% A);流速为0.8 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为254 nm;进样量为10 μL。

取16个批次紫荆叶,分别按“2.1”项下方法制备质量浓度为100 mg/mL(按生药计)的紫荆叶提取物供试品溶液,进样测定,得到相应色谱图。以各批次供试品溶液的色谱图作为参照图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004(A版)》,设时间窗口为0.5,选择各批次样品中均含有的、含量相对较高且分离度较好的色谱峰位进行多点校正,采用峰面积平均数法生成量化特征色谱图,并匹配共有峰。

### 2.3 紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率测定

采用体外酪氨酸酶多巴速率氧化微量法<sup>[15]</sup>测定酪氨酸酶活性抑制率。(1)向96孔板中依次加入磷酸盐缓冲液(pH 6.8)45 μL、50%甲醇5 μL、0.2 U/mL酪氨酸酶溶液25 μL,30 ℃温育10 min;然后加入0.5 mg/mL左旋多巴对照品溶液25 μL,振荡混匀,30 ℃反应5 min。用酶标仪在492 nm波长处测定吸光度( $A_{\text{溶剂}}$ )。(2)用不同质量浓度的紫荆叶提取物供试品溶液(100、50、25 mg/mL)5 μL代替50%甲醇5 μL,按“(1)”项下方法操作,测定吸光度( $A_{\text{样品}}$ )。(3)不加入酪氨酸酶,分别按“(1)”“(2)”项下方法操作,测定不加酶的溶剂空白组、不加酶的样品空白组的吸光度( $A_{\text{溶剂空白}}$ 、 $A_{\text{样品空白}}$ )。(4)按公式计算酪氨酸酶活性抑制率:抑制率(%)=[( $A_{\text{样品}}$ - $A_{\text{样品空白}}$ )/( $A_{\text{溶剂}}$ - $A_{\text{溶剂空白}}$ )-1]×100%。

## 2.4 谱效关系的数据分析

采用偏最小二乘回归分析法进行谱效分析。以紫荆叶提取物的量化特征图谱中共有峰的峰面积为自变量( $X$ )、紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率为因变量( $Y$ )，采用DPS 7.05分析软件建立偏最小二乘回归方程，分别筛选出与酪氨酸酶活性抑制作用有显著相关性的色谱峰。

## 3 结果

### 3.1 紫荆叶提取物特征色谱图中的共有峰

16个批次紫荆叶提取物的特征色谱图匹配出16个共有峰(分别命名为P1~P16)。其量化特征色谱图见图1。

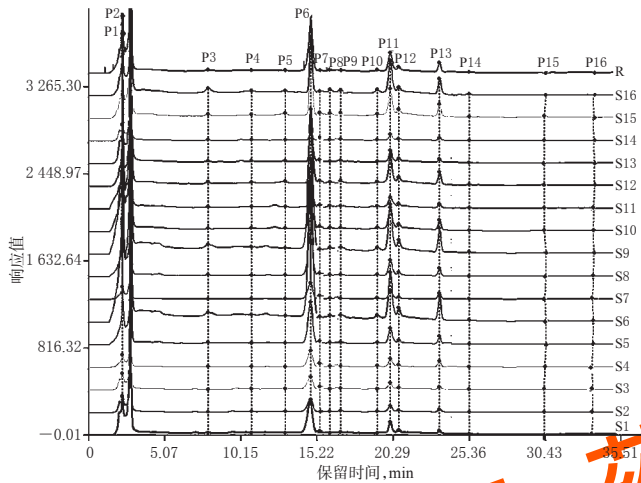


图1 16个批次紫荆叶提取物的量化特征色谱图

Fig 1 Quantitative characteristic chromatogram of the extract of 16 batches of *C. chinensis* leaves

### 3.2 紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率

16个批次紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率测定结果见表1。

表1 16个批次紫荆叶提取物的酪氨酸酶活性抑制率

Tab 1 Inhibition rate of 16 batches of the extract of *C. chinensis* leaves on tyrosinase activity

样品批次	不同质量浓度供试品溶液对酪氨酸酶活性的抑制率, %		
	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
S1	80.26 ± 0.90	60.66 ± 2.47	55.49 ± 2.47
S2	87.96 ± 1.26	80.67 ± 1.76	69.80 ± 0.56
S3	88.34 ± 0.65	82.12 ± 1.63	83.58 ± 1.51
S4	94.02 ± 5.34	85.29 ± 2.83	60.58 ± 3.28
S5	90.17 ± 4.75	97.61 ± 2.45	86.55 ± 1.97
S6	97.78 ± 4.64	100.28 ± 0.38	86.04 ± 1.93
S7	86.44 ± 4.75	86.08 ± 3.86	57.15 ± 9.82
S8	65.49 ± 5.04	30.73 ± 0.29	17.88 ± 3.10
S9	77.04 ± 1.83	37.75 ± 3.07	38.32 ± 0.30
S10	92.92 ± 1.34	87.35 ± 1.48	72.14 ± 2.03
S11	86.39 ± 2.21	92.95 ± 1.29	95.14 ± 0.26
S12	91.38 ± 1.18	89.40 ± 0.02	83.57 ± 2.13
S13	94.53 ± 3.21	92.93 ± 1.81	91.21 ± 0.80
S14	70.92 ± 4.83	87.49 ± 3.02	88.29 ± 3.69
S15	88.88 ± 1.33	82.48 ± 1.83	72.41 ± 3.53
S16	93.36 ± 5.54	81.00 ± 2.67	84.79 ± 1.42

由表1可见,不同批次紫荆叶提取物的酪氨酸酶活性抑制率存在明显差别;总体上看,其质量浓度越高,对酪氨酸酶活性的抑制作用越强,但其质量浓度与酶活性抑制率不呈线性相关性。

### 3.3 谱效关系分析结果

3.3.1 偏最小二乘回归方程的建立 由表1可见,紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性抑制作用最强(即抑制率最高)的质量浓度为100 mg/mL,因此以该质量浓度紫荆叶提取物供试品溶液对应的酪氨酸酶活性抑制率作为因变量( $Y$ )进行偏最小二乘回归分析。数据经标准化处理后模型误差平方和随着潜在因子的增加而逐渐增大,当潜在因子达到3时,误差平方和达到最大值,此时得到回归方程: $Y = -0.047423X_1 - 0.150273X_2 - 0.056010X_3 - 0.236157X_4 + 0.173663X_5 + 0.045081X_6 + 0.071250X_7 + 0.139081X_8 - 0.056328X_9 + 0.216580X_{10} + 0.082024X_{11} + 0.160168X_{12} - 0.032678X_{13} - 0.038361X_{14} + 0.344516X_{15} + 0.103491X_{16}$ (注: $Y$ 表示酪氨酸酶抑制率, $X_i$ 表示各共有峰峰面积)。特征共有峰-酪氨酸酶活性抑制率的偏最小二乘回归模型标准化回归系数图见图2。

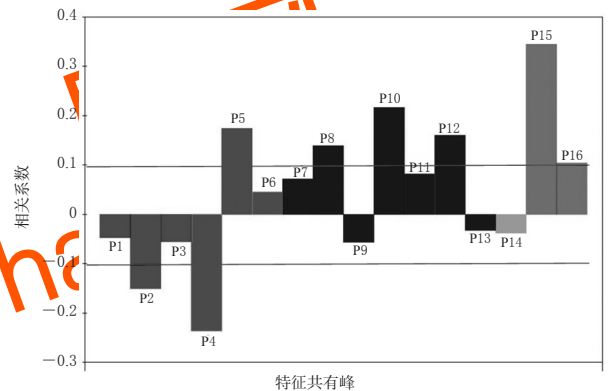


图2 特征共有峰-酪氨酸酶活性抑制率的偏最小二乘回归模型标准化回归系数图

Fig 2 Standardization regression coefficient of PLSR model of characteristics common peak-tyrosinase inhibition activity

3.3.2 酶活性抑制作用相关的特征共有峰的确定 由图2可知,P5、P8、P10、P12、P15、P16号共有峰与紫荆叶提取物的酪氨酸酶活性抑制作用呈正相关,且相关系数较大( $R > 0.1$ )<sup>[6]</sup>,这提示当这些峰代表的化合物含量增加时,紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用增强;P2、P4号共有峰与紫荆叶提取物的酪氨酸酶活性抑制作用呈负相关,且相关系数的绝对值较大( $|R| > 0.1$ )<sup>[6]</sup>,这提示当这些峰代表的化合物含量增加时,紫荆叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用减弱。

## 4 讨论

中药成分复杂多样,在其物质基础研究过程中会得到大量数据,而计算机强大的编程和建模功能可为其复杂的物质基础研究提供可靠而有力的帮助。李戎等<sup>[7]</sup>

在2002年正式提出了“谱效关系”的概念,指出将中药指纹图谱与药效联系起来,建立与中药疗效基本一致的成分控制质量标准。而用于谱效关系数据处理的偏最小二乘回归分析法,是一种包括了多因变量对多自变量的回归建模以及主成分分析在内的多元数据分析方法,具有计算量小、预测精度高、无需剔除样本点、易于定性解释等优点,能最大限度地利用有限的信息,并具有较好的预测性<sup>[18]</sup>。目前,中药谱效关系主要应用于控制不同产地、来源、采收期、批次中药饮片的质量<sup>[19-24]</sup>。

本研究对紫荆叶提取物的化学成分进行HPLC分析前,在预试验中曾采用二极管阵列检测器对紫荆叶提取物进行全波长扫描。结果显示,检测波长为254 nm时所获得的HPLC图谱信息比较丰富、基线较为平稳、整体吸收强度较为均衡,因此选择254 nm为检测波长。

本研究对紫荆叶提取物的酪氨酸酶活性抑制作用考察显示,不同采收时期的紫荆叶样品的提取物对酪氨酸酶活性的抑制率存在明显差别,且提取物浓度与其酶活性抑制率不呈线性相关性。这提示紫荆叶中存在多种可影响酪氨酸酶活性的化学成分,有的可抑制酪氨酸酶,有的可激活酪氨酸酶,有的可能具有双向调节作用。

本研究通过谱效关系分析证实,紫荆叶提取物质量浓度为100 mg/mL(以生药计)时,P5、P8、P10、P12、P15、P16号共有峰与其对酪氨酸酶活性的抑制作用呈正相关,P2、P4号共有峰与其对酪氨酸酶活性的抑制作用呈负相关。但上述共有峰面积(代表化合物的含量)与酪氨酸酶活性抑制作用的正负相关性只能表示其作用趋势,并不表示这些化合物直接对酪氨酸酶活性起抑制或激活作用;且谱效关系分析是以各个峰作为独立样本为假设前提,而忽略了不同化合物之间的相互作用。因此,这些特征色谱峰所代表的化合物的结构仍需进一步鉴定,化合物之间的相互作用仍需进一步深入探索。

#### 参考文献

[1] 中国科学院,中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第39卷[M]. 北京:科学出版社,1988:141.

[2] 聂晶,邵爱华. 紫荆皮药材品种鉴别[J]. 时珍国医国药,2000,11(5):422.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:2364.

[4] 张娟娟. 紫荆花和禹白芷化学成分与生物活性研究[D]. 郑州:河南大学,2015.

[5] 穆燕,魏海柳,李琳,等. 白附子酪氨酸酶活性抑制成分的提取与分离[J]. 食品工业科技,2012,33(11):247-249.

[6] STURM RA, TEASDALE RD, BOX NF. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation[J]. *Gene*, 2001, 277(1/2):49-62.

[7] 邹先伟,蒋志胜. 植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 中

草药,2004,35(6):702-705.

[8] 曾鸣,徐良. 化妆品用植物提取物美白潜力评估的研究进展[J]. 日用化学工业,2013,43(5):382-385.

[9] XIE LP, CHEN QX, HUANG H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. *Biochemistry*, 2003, 68(4):487-491.

[10] LEE SH, KIM SY, KIM JJ, et al. Isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*[J]. *Saengyak Hakhoechi*, 1999, 30(4):397-403.

[11] 曾令军,林兵,宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.

[12] 秦昆明,郑礼娟,沈保家,等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考[J]. 中国中药杂志,2013,38(1):26-31.

[13] 张丽杰,刘丽娟,齐凤琴,等. 中药谱效关系研究进展[J]. 中国现代应用药学,2010,27(11):971-975.

[14] 吕邵娃,董书羽,郭玉岩,等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):226-230.

[15] 张伟,尹震花,彭涛,等. 高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):71-73.

[16] 段小菊. 基于化学计量学的白花丹参质量评价及谱效关系的研究[D]. 济南:山东大学,2014.

[17] 李斌,闫智勇,李文军,等. 创建中药谱效关系学[J]. 中医教育,2002,21(2):62.

[18] 叶莺,陈崇楠,林熙. 偏最小二乘回归的原理及应用[J]. 海峡预防医学杂志,2005,11(3):3-6.

[19] 张华锋,刘炯,张杰,等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J]. 中草药,2013,44(19):2696-2702.

[20] WANG JM, YAO C, LI CQ, et al. Spectrum-effect relation of antioxidant activity of *Flos Carthami* based on DPPH, ABTS and FRAP assay [J]. *Chin Pharm J*, 2017, 52(10):825-831.

[21] 肖遂. 基于谱效关系的中药铁苋菜抑菌物质辨识方法研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

[22] 赵小梅,浦仕彪,赵庆国,等. 基于谱-效相关分析的雷公藤致肝毒性物质基础的初步研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(15):2915-2921.

[23] 王金梅,姚辰,陆程灿,等. 酒女贞子抗氧化谱效关系研究[J]. 中国药学杂志,2016,51(22):1907-1912.

[24] WANG JM, PENG LN, SHI MJ, et al. Spectrum effect relationship and component knock-out in *Angelica dahurica* Radix by high performance liquid chromatography-Q exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer[J]. *Molecules*, 2017, 22(7):1231-1255.

(收稿日期:2018-06-03 修回日期:2018-10-25)

(编辑:段思怡)