

本文引用:何 微,王建芬,杜玉菲,刘 鹰,马 迎.基于酪氨酸酶抑制活性的八白散组方研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):1009-1011.

基于酪氨酸酶抑制活性的八白散组方研究

何 微¹,王建芬^{1*},杜玉菲¹,刘 鹰²,马 迎¹

(1.长沙医学院药学院,湖南 长沙 410219;2.湖南九典制药股份有限公司,湖南 浏阳 410329)

【摘要】目的 优化八白散中具有酪氨酸酶抑制活性的组方配伍,提高该组方的美白功效。**方法** 通过紫外分光光度法测定八白散组方水提物对酪氨酸酶的抑制率。以酪氨酸酶抑制率为评价指标,运用均匀设计法探索八白散剂量比例与酪氨酸酶抑制率的关系。**结果** 均匀设计实验中,八白散组方中m(白芷):m(白及):m(白附子):m(白茯苓):m(白牵牛)=42:21:2:4:51时,对酪氨酸酶活性的抑制率为86%,多元线性回归分析表明白芷、白茯苓为酪氨酸酶抑制主要药材,白牵牛和白附子在组方中对酪氨酸酶抑制活性存在负相关作用,随着二者配伍比例增加,抑制活性呈下降的趋势,而白及药材未显现出对酪氨酸酶有抑制作用。**结论** 八白散组方配伍优化后,对酪氨酸酶抑制活性与单味药材相比存在差异,可为八白散组方配伍的进一步研究提供参考。

【关键词】 酪氨酸酶;均匀设计;八白散;紫外分光光度法

【中图分类号】R285.5 **【文献标志码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.009

Prescription Formulation of Babai Powder Based on Tyrosinase Inhibitory Activity

HE Wei¹, WANG Jianfen^{1*}, DU Yufei¹, LIU Ying², MA Ying¹

(1. School of Pharmacy, Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China; 2. Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd., Liuyang, Hunan 410329, China)

【Abstract】Objective To optimize the prescription formulation and compatibility of Babai powder with tyrosinase inhibitory activity, and to improve the whitening effect of this prescription. **Methods** Ultraviolet spectrophotometry was used to measure the inhibition rate of tyrosinase by water extract of Babai powder. With the inhibition rate of tyrosinase as the assessment index, uniform design was used to investigate the correlation between the dosage ratio of Babai powder and tyrosinase inhibition rate. **Results** In the uniform design experiment, when m (Radix Angelicae Dahuricae):m (Rhizoma Bletillae):m (Rhizoma Typhonii):m (white *Poria cocos*): m (*Pharbitis nil*) was 42:21:2:4:51, the inhibition rate of tyrosinase activity was 86%. The multivariate linear regression analysis showed that Radix Angelicae Dahuricae and white *Poria cocos* were the main herbal medicines for tyrosinase inhibition. The ratios of *Pharbitis nil* and Rhizoma Typhonii were negatively correlated with tyrosinase inhibitory activity, and their inhibitory activity tended to decrease with the increase in their ratios. Rhizoma Bletillae had no significant inhibitory effect on tyrosinase. **Conclusion** There is a significant difference in tyrosinase inhibitory activity between the optimized prescription formulation and compatibility of Babai powder and each single medicine, which provides a reference for further research on the prescription formulation and compatibility of Babai powder.

【Keywords】 tyrosinase; uniform design; Babai powder; ultraviolet spectrophotometry

黑色素(melanin)主要由人体皮肤表皮基底层的黑色素细胞(melanocyte)产生,其在基底层的异常蓄积会造成色素沉着过度引起黄褐斑、雀斑、老年

斑等,影响人们的生活质量^[1]。随着对黑色素生物合成研究的不断深入,研究者发现酪氨酸酶是黑色素转变过程中的主要限速酶,它的过量表达是导致色

【收稿日期】2018-03-06

【基金项目】2014年湖南省校企合作人才培养示范基地项目(湘教通[2014]272号);长沙医学院2014年度大学生研究性学习与创新性课题(长医教[2014]10号)。

【作者简介】何 微,女,在读本科生,研究方向:中药美容。

【通讯作者】*王建芬,女,硕士,副教授,E-mail:lightysun@163.com。

素沉着过度的主要原因,抑制酪氨酸酶的活性可以阻断黑色素的生物合成反应链,减少黑色素的生成,实现美白的效果^[2-3],同时氧自由基的存在加速了酪氨酸酶的催化过程,使黑色素不能及时代谢而沉积于表皮^[4-6]。八白散最早出自明代的《必用全书》,作为宫中美白之品。随着临床对八白散应用的新发展,新八白散除去被国家法规禁止使用的中草药白丁香加入白芍,其组成为白僵蚕、白牵牛、白蒺藜、白及、白芷、白附子、白茯苓、白芍^[7]。体外实验发现八白散的各味药材对酪氨酸酶的活化都有不同程度的抑制作用^[8]。而组方配伍中提取物对酪氨酸酶抑制情况未见报道。本文运用多巴速率氧化法^[9],在考察八白散组方中单味药材水提物对酪氨酸酶的抑制作用的基础上,采用均匀设计法^[10-12]探讨新八白散剂量比例与酪氨酸酶抑制的关系。为进一步优化该组方的配伍提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 试剂

白僵蚕(批号 20140301)、白牵牛(批号 20140204)、白蒺藜(批号 20131209)、白及(批号 20140509)、白芷(批号 20131007)、白附子(批号 20140401)、白茯苓(批号 20131218)、白芍(批号 20130911)购自湖南省长沙市楚仁堂大药房,经长沙医学院生药教研室龚邦老师鉴定为正品。酪氨酸酶标准品(上海宝曼生物科技有限公司,批号:R5428 Y72);L-多巴标准品(上海宝曼生物科技有限公司,批号:D1054);无水乙醇、磷酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠等购置国药集团,均为分析纯。

1.2 仪器

AS系列超声波清洗机(天津奥特塞恩斯仪器有限公司);精密酸度计 PHS-3C(上海雷磁仪器厂);梅特勒 AL204101 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);752型紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);TDL-60B离心机(济南赛畅科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 试剂的配置

2.1.1 磷酸盐缓冲溶液的配制 分别称取干燥至恒重的无水磷酸氢二钠3.55 g和磷酸二氢钾 3.40 g,调节pH值至6.8,加水溶解并稀释至1 000 mL。

2.1.2 多巴溶液的配制 取多巴适量,加0.1 mol/L的盐酸将其完全溶解,再用磷酸盐缓冲溶液配制成1.5 g/L的多巴溶液,在4℃下避光保存,备用。

2.1.3 酪氨酸酶溶液的配制 精确称取160 kU/mg

的酪氨酸酶,用磷酸盐缓冲溶液配成100 U/mg的酶液,-20℃下保存,使用前在4℃下解冻。

2.2 八白散组方供试品溶液的制备

将饮片粉碎(过60目筛)后,根据组方配伍剂量比,混合均匀后取样约0.5 g,精密称定后,置于试管中,加入5 mL水,充分振摇后超声处理30 min,过滤,水提液留存作为供试品溶液。

2.3 八白散水提液对酪氨酸酶抑制率的测定

采用酪氨酸酶多巴速率氧化法^[9]检测,根据表1顺序分别加入试剂并进行反应,在加入酪氨酸酶溶液后于37℃水浴中混合10 min后,分别加入1.5 g/L的L-多巴溶液0.8 mL,5 min后测定溶液在475 nm处吸光度值。按照以下公式计算八白散组方水提液对酪氨酸酶活性的抑制率为65.4%。

$$\text{酪氨酸酶活性抑制率(\%)} = \frac{[(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)] \times 100\%}{(A_1 - A_2)}$$

表1 反应液的组成 (mL)

试验号	磷酸盐缓冲液	供试品提取液	酪氨酸酶溶液	L-多巴溶液	总计
A ₁	6.6	-	0.6	0.8	8.0
A ₂	7.2	-	-	0.8	8.0
A ₃	5.2	1.4	0.6	0.8	8.0
A ₄	5.8	1.4	-	0.8	8.0

2.4 八白散对酪氨酸酶抑制活性的剂量关系探讨

2.4.1 八白散中单味药材水提物对酪氨酸酶抑制率

分别取八白散中单味药材,按照“2.2”项八白散组方供试品溶液的制备,以及“2.3”项酪氨酸酶抑制率测定方法,测定各单味药材对酪氨酸酶的抑制率,结果见表2。

表2 单味药材水提物对酪氨酸酶抑制率 (n=3)

药材	白芍	白茯苓	白附子	白牵牛	白僵蚕	白蒺藜	白及	白芷
酪氨酸酶抑制率/%	15.14	42.24	36.74	34.93	18.49	19.16	38.71	48.60

从表2可以看出,八味药材均有酪氨酸酶抑制作用,其中白芷、白茯苓、白及、白附子、白牵牛对酪氨酸酶抑制率均高于30%以上,为了进一步探讨该组方中各味药材与酪氨酸酶的抑制关系,故选取上述五味药材对酪氨酸酶抑制活性进行组方配比考察,进而确定八白散中组方中酪氨酸酶抑制活性的较佳配方。

2.4.2 均匀设计表的选定 根据均匀设计法“水平数应大于因素数2倍”的原则以及一般数学统计均要求样本数要大于因素数的3~4倍,实验设计为5因素16水平,选用均匀设计表U₁₆*(16¹²)每味药以质量为单位,设计16个水平研究八白散组方中酪氨

酸酶抑制活性的剂量比例关系。为了避免量效关系对药效的干扰,在保持各组分药味比例不变的前提下,将各组剂量调节至相同(12.0 g),调整后各组分剂量见表3。

表3 均匀设计实验结果 (n=3)

组别	m(白芷)/g	m(白及)/g	m(白附子)/g	m(白茯苓)/g	m(白牵牛)/g	Tyr抑制率/%
1	1.20	2.40	0.45	0.70	7.25	24.00
2	1.50	3.90	0.85	0.50	5.25	11.00
3	1.80	5.40	0.4	0.30	4.10	13.00
4	2.10	1.80	0.8	0.10	7.20	17.00
5	2.40	3.30	0.35	0.75	5.20	12.00
6	2.70	4.80	0.75	0.55	3.20	4.00
7	3.00	1.20	0.3	0.35	7.15	11.00
8	3.30	2.70	0.7	0.15	5.15	10.00
9	3.60	4.20	0.25	0.80	3.15	57.00
10	3.90	5.70	0.65	0.60	1.15	75.00
11	4.20	2.10	0.2	0.40	5.10	86.00
12	4.50	3.60	0.6	0.20	3.10	75.00
13	4.80	5.10	0.15	0.85	1.10	76.00
14	5.10	1.50	0.55	0.65	4.20	79.00
15	5.40	3.00	0.1	0.45	3.05	81.00
16	5.70	4.50	0.5	0.25	1.05	80.00

注:Tyr表示酪氨酸酶。

2.4.3 功效关系实验与评价结果 按表3中各组分剂量,以“2.2”中的操作步骤进行八白散组方中活性成分提取,得到供试品原液。按照“2.3”所述进行酪氨酸酶抑制率的实验。将16个水平(样品),平行试验3次,每个水平的酪氨酸抑制率数据以平均值表示,结果见表3。直观分析可知,第11组对酪氨酸酶抑制率最大,即m(白芷):m(白及):m(白附子):m(白茯苓):m(白牵牛)=42:21:2:4:51。将实验结果输入SPSS Statistics 17.0统计软件进行多元线性回归分析,得到酪氨酸酶抑制率回归方程为:

$$Y = -20.159 + 18.667X_1 - 9.743X_2 + 16.965X_3 - 7.8X_4, P < 0.05$$

方程有显著意义,方差分析见表4。式中 X_1 为白芷的质量, X_2 为白附子, X_3 为白茯苓, X_4 为白牵牛。八白散组方中对酪氨酸酶主要起抑制作用的依次为白芷和白茯苓,而白牵牛和白附子在组方中对酪氨酸酶抑制活性存在负相关作用,随着二者配伍比例增加,抑制活性呈下降的趋势,而白及药材未显现出对酪氨酸酶有抑制作用。

表4 方差分析

	平方和	d_f	均方	F	Sig.
回归	12 824.238	4	3 206.060	8.839	0.002
残差	3 989.699	11	362.700		
总计	16 813.938	15			

3 讨论

八白散组方中各单味药材水提取液均有抑制酪氨酸酶作用。通过均匀设计法对酪氨酸抑制率高的五味药材进行组方配伍研究后,结果表明,白芷和白茯苓在组方中主要起抑制酪氨酸酶的作用,白及对酪氨酸酶抑制作用不明显,白牵牛和白附子对酪氨酸酶抑制活性存在负相关作用。该结果进一步证实组方配伍研究具有不可替代的作用,在八白散组方后,对酪氨酸酶抑制活性与单味药材相比存在差异。八白散组方研究中需要进一步阐释组方中其他药材美白功效,为后续中药美容化妆品的组方研究和开发提供参考依据。

参考文献:

- [1] SIMA V H, PATRIS S, AYDOGMUS Z, et al. Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to the skin whitening agents [J]. *Talanta*, 2011, 83(3): 980-987.
- [2] CHANG TS. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(6):2440-2475.
- [3] FENOLL L G, PENALVER M J, RODRÍGUEZLÓPEZ JN, et al. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(2):235-246.
- [4] SEIBERG M, PAINE C, SHARLOW E, et al. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening[J]. *J Invest Dermatology*, 2000, 115(2):162-167.
- [5] 姚彬,任清.皮肤黑色素的形成及美白剂美白机制[J].*北京日化*, 2007, 32(2):18-22.
- [6] 王玉林,何锦风,王维民,等.皮肤黑色素的产生及美白浅析[J].*日用化学品科学*, 2013, 36(2):33-35.
- [7] 刘琳,王红梅,李虹,等.八白散面膜治疗黄褐斑的现代医学理论阐释[J].*中国美容医学*, 2013, 13(21):56-57.
- [8] 陈学艳,王艳晶.12种中药的水及乙醇提取液对酪氨酸酶抑制作用的比较[J].*天津中医药*, 2010, 33(5):44-48.
- [9] 屈长青,张传开,林莉,等.荆芥水提取物对马铃薯酪氨酸酶作用的研究[J].*天然产物研究与开发*, 2013, 25(3):110-115.
- [10] 曾昭灼.均匀设计及其应用[M].北京:中国医药科技出版社, 2005: 46-53.
- [11] 杨鸿,吴彦,马琰岩,等.基于均匀设计的中药有效组分复方配伍研究[J].*环球中医药*, 2012, 24(3):190-193.
- [12] 尤卓莹,何秋星,李馨恩,等.四物汤美白功效评价及其药效关系研究[J].*日用化学工业*, 2015, 45(1):45-47.

(本文编辑 苏维)