

枸杞子水提物提取工艺优化及其对酪氨酸酶活性影响

刘 恋,黎 莉*,方继德,吕 萌

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:研究了枸杞子水提物的提取工艺及对酪氨酸酶活性的影响.通过正交实验优化枸杞子水提物的提取工艺,研究了料液比、提取时间、提取次数对枸杞子水提物中多糖质量分数的影响.采用蒽酮-硫酸法比色测定多糖质量分数,并用体外酪氨酸酶氧化法测定枸杞子水提物对酪氨酸酶活性的影响.枸杞子水提物的最佳提取工艺为料液比 1:20,提取时间 30 min,提取次数 3 次,在此条件下测定枸杞子水提物的多糖质量分数为 28.43%.枸杞子水提物对酪氨酸酶具有明显抑制作用,其半数抑制质量浓度 IC_{50} 为 0.73 mg/mL,阳性对照品熊果苷 IC_{50} 为 0.28 mg/mL.说明枸杞子水提物对酪氨酸酶的抑制作用与熊果苷相当.

关键词:枸杞;水提物;提取工艺;酪氨酸酶

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2011.12.007

0 引 言

枸杞为茄科 Solanaceae 枸杞属落叶灌木植物,是我国传统的药食兼用的名贵中药材,主要分布于我国西北地区,其中以宁夏枸杞的应用最为广泛.明朝李时珍在《本草纲目》中记载枸杞具有久服坚筋骨,补精气诸不足,明目安神,令人长寿等功效^[1].现代科学研究表明,枸杞的药用和生物活性与其所含的多糖有很大关系,它具有调节免疫、清除自由基、抑制肿瘤、降血脂、降血糖、抗氧化和抗衰老等多方面的作用^[2].

酪氨酸酶是皮肤黑色素生成过程中的关键酶,它具有催化酪氨酸并进一步氧化生成黑色素的作用.因此,可以应用酪氨酸酶抑制剂来抑制酪氨酸酶的活性,从而阻断黑色素的合成反应链^[3].而宁夏枸杞水提物显著的抗氧化活性已得到相关的研究证明^[4].另据文献报道,枸杞子水提物的抗氧化活性高于其经过纯化的多糖,这是因为枸杞子粗提物中含有类胡萝卜素、核黄素、抗坏血酸、硫氨酸和烟酸等,这些物质可能也参与了抗氧化反应^[5];并且在相关文献中,还未见枸杞子影响酪氨酸酶活性的报道.因此,本实验对枸杞子采用水提法进行提取^[6],并运用酪氨酸酶氧化法测定枸杞子水提物对酪氨酸酶活性的影响.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司生产;AB204-N 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司生产;TD5-2 台式低速多管架自动平衡离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司生产;DZ-1BC 型真空干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司生产.枸杞子购于宁夏银川市,经中南民族大学万定荣教授鉴定为茄科植物宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 的干燥成熟果实;无水葡萄糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产, T20090515);熊果苷分析标准品(上海晶纯试剂有限公司生产, 35648);其它试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 枸杞子水提物的提取工艺研究 **a.** 正交试验设计.参考相关文献^[7],选取料液比 *A*,提取时间 *B*,提取次数 *C* 作为三个考察因素,每个因素选择三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以提取所得的枸杞多糖质量分数为指标.因素水平见表 1. **b.** 提取工艺.按表 1 排定的 1 号实验为例,称取一定量于 50 °C 烘干的枸杞子,加 10 倍量蒸馏水,回流提取 1 次,每次提取时间为 15 min.其余样品按正交表设定的条件进行实验.

收稿日期:2011-12-05

作者简介:刘 恋(1986-),女,湖北咸宁人,硕士研究生.研究方向:中药活性成分及制剂.

指导老师:黎 莉,女,研究员,硕士研究生导师.研究方向:中药活性成分及制剂.*通信联系人

表 1 因素水平表

Table 1 Lists of facts and levels

水平	料液比 A/倍	提取时间 B/min	提取次数 C/次
1	1:10	15	1
2	1:20	30	2
3	1:30	45	3

1.2.2 枸杞子水提物多糖的质量分数测定

a. 对照品溶液的配制. 精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖 0.025 0 g 于 250 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,充分混匀. 葡萄糖对照品溶液的浓度为 0.1 mg/mL. **b.** 显色剂的配制. 称取蒽酮 0.2 g 置于棕色瓶中,再加入 100 mL 质量分数为 95% 的浓硫酸,充分溶解后待用. **c.** 标准曲线的绘制. 精密吸取 5、10、15、20、25 mL 葡萄糖对照品溶液 0 于 5 个 50 mL 容量瓶中,加水定容,分别配制浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液. 取 5 种不同浓度的葡萄糖对照品溶液各 2 mL 分别置于 5 支试管中,标号为 1、2、3、4、5. 再往 5 支试管中均加入 4 mL 显色剂,于 100 ℃沸水浴中放置 10 min,接着迅速放入冰水浴中冷却,然后室温放置 8 min. 以 2 mL 水加 4 mL 显色剂作为空白对照,在 625 nm 处测定吸光度^[8]. 以浓度 C(mg/mL) 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $A = 55.961C - 0.0998$ $R^2 = 0.9994$. 结果表明多糖浓度在 0.003 3~0.016 7 mg/mL 之间与吸光度有较好的线性关系. **d.** 样品含量测定. 将制备的枸杞子水提液经室温冷却后,于 4 000 r/min 离心 10 min,然后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤器过滤. 精密吸取样品溶液 1 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加水定容. 再按照“1.2.2”项 **c** 中的方法操作,测得的吸光度代入回归方程中计算样品的多糖含量.

1.2.3 酪氨酸酶活性影响的测定 **a.** 溶液的配制. 缓冲液:用磷酸氢二钠和磷酸二氢钾配制成 pH6.8 的磷酸盐缓冲液;底物溶液:用 L-酪氨酸配成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液. 酶溶液:称取适量酪氨酸酶溶于缓冲液中. **b.** 酶活力测定. 空白:取 L-酪氨酸溶液 0.35 mL,加入缓冲液 0.4 mL,再加入纯净水 0.75 mL;样品:取 L-酪氨酸溶液 0.35 mL,加入磷酸盐缓冲液 0.4 mL,再加入纯净水 0.25 mL. 将空白和样品均放入 30 ℃水浴锅中,保温 10 min 后取出,再往样品中加入酪氨酸酶溶液 0.5 mL,迅速用紫外分光光度计检测其在

317 nm 处的吸光度变化,并连续记录 3 min,得酶促反应曲线. **c.** 抑制率测定. 将在最佳工艺条件下制备的样品溶液于 50 ℃真空干燥. 精密称取一定量的干燥样品,分别置于 6 个容量瓶中,加水定容,配成浓度为 0.08、0.26、0.79、1.12、2.24、5.08 mg/mL 的 6 种不同质量浓度的样品溶液. 按照“1.2.3”项 **b** 中的方法,分别测定这 6 份样品溶液对酪氨酸酶的抑制率. 以不加样品液为空白对照,并以熊果苷分析标准品为阳性对照,测定酶相对的剩余活力. 枸杞子水提物对酪氨酸酶的抑制率计算公式为:抑制率(%) = $(A_0 - A_t)/A_0 \times 100\%$, A_0 为无抑制剂时的酶活力, A_t 为有抑制剂时的酶活力.

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果

正交试验结果见表 2. 从表 2 得出最佳提取工艺条件为 $A_2B_2C_3$. 即在料液比为 1:20,提取时间为 30 min,提取次数为 3 次的条件下,提取的多糖含量较高. 由表 2 中的极差大小得知影响提取效果的主次因素顺序为: $A > C > B$, 即料液比的影响最显著,其次为提取次数,最后为提取时间.

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal tests

编号	A	B	C	误差	多糖质量分数/%
1	1	1	1	1	6.96
2	1	2	2	2	14.23
3	1	3	3	3	20.75
4	2	1	2	3	27.68
5	2	2	3	1	28.43
6	2	3	1	2	22.50
7	3	1	3	2	23.42
8	3	2	1	3	25.91
9	3	3	2	1	24.36
k_1	13.980	19.353	18.457	19.917	
k_2	26.203	22.857	22.090	20.050	
k_3	24.563	22.537	24.200	24.780	
R	12.223	3.504	5.743	4.863	

2.2 酪氨酸酶的酶促反应时间曲线

据文献报道,在波长 317 nm 处测定酪氨酸酶活力灵敏度较高^[9]. 由图 1 可看出,0~1 min 吸光度变化较明显,曲线上升幅度较大,之后 2 min 吸光度变化较小,曲线上升趋势减缓.

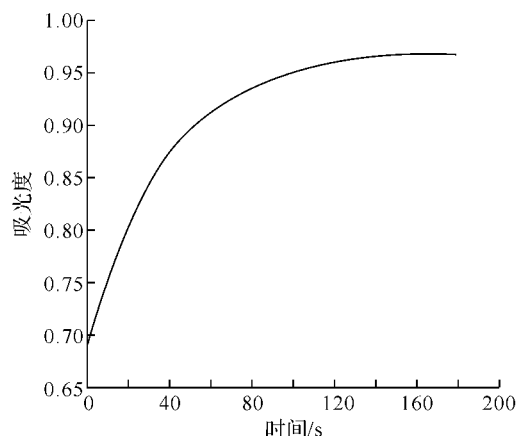


图 1 吸光度与时间的关系曲线

Fig. 1 The relation curve between Absorbance and time

2.3 枸杞子水提物对酪氨酸酶的抑制作用

枸杞子水提物对酪氨酸酶活性的影响见图 2, 枸杞子水提物对酪氨酸酶具有明显的抑制作用, 并对酪氨酸酶的抑制效率随着样品质量浓度的增加而增强. 由曲线所得的回归方程为: $Y = -19.482\ln(x) + 43.890$; $R^2 = 0.9924$. 通过回归方程计算得出: 枸杞子水提物对酪氨酸酶抑制率为 50% 时的质量浓度为 0.73 mg/mL. 同样方法测定熊果苷的 IC_{50} 为 0.28 mg/mL.

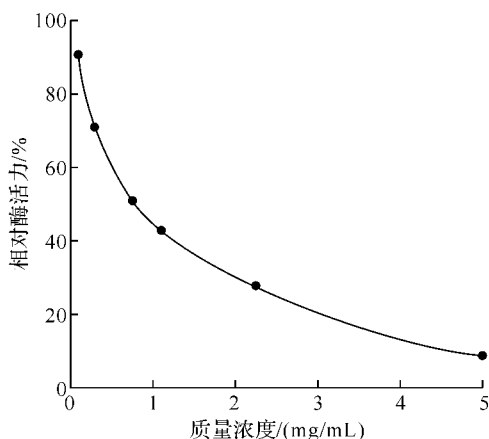


图 2 抑制率与样品浓度的关系曲线

Fig. 2 The relation curve between inhibitory effect and sample concentration

3 结 语

近年来,国内外学者对枸杞的提取纯化、组分

分离以及生物活性等方面进行了深入的研究,为枸杞多糖的进一步开发和利用奠定了基础^[10]. 然而迄今为止,枸杞仍主要是作为食用保健品被广泛应用. 因此,如何根据现代实验研究的结果,并结合中医药理论知识,对枸杞其它方面的药理作用进行更加深入地研究,如用于研究色素沉着性皮肤病的治疗,还有待进一步地探讨. 本实验已证明枸杞子水提物对酪氨酸酶催化酪氨酸形成多巴的过程具有明显的抑制作用,这将为枸杞子水提物作为一种新型酪氨酸酶抑制剂提供了一定的实验依据.

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,1975: 1452-1455.
- [2] 王金章,王秀娟. 枸杞子的化学成分和药理研究概况[J]. 天津药学,1999,11(3):14-16.
- [3] 丁大鹏,马文丽,郑文岭. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 实用医学杂志,2005,21(12):1364-1365.
- [4] Wu S J, Ng L T, Lin C C. Antioxidant activities of some common ingredients of traditional chinese medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Poria cocos*[J]. *Phytother Res*, 2004, 18(12):1008-1012.
- [5] Luo Qiong, Cai Yi Zhong, Yan Jun, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*[J]. *Life Sciences*, 2004, 76(2):137-149.
- [6] Cai Yi Zhong, Luo Qiong, Sun Mei, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer [J]. *Life Sciences*, 2004, 74(6):2157-2184.
- [7] 邱敏芳,黎莉,方继德,等. 番石榴多糖提取工艺的优化[J]. 武汉工程大学学报,2011,33(1):22-24.
- [8] 易剑平,毕雅静,宋秀荣,等. 蒽酮-硫酸法测定枸杞多糖质量分数的研究[J]. 北京工业大学学报,2005, 31(6):641-646.
- [9] 蒋萌蒙,田呈瑞,王向军. 双孢蘑菇中酪氨酸酶的特性[J]. 江苏农业学报,2008,24(2):194-198.
- [10] 魏永祥,商希礼. 枸杞多糖的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(11):5834-5836.

(下转第 104 页)