

红树植物桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性抑制及抗自由基和抗菌活性分析

黄晓冬^{1,2}, 吴雅清², 许瑞安², 刘嘉², 俞愉¹, 蔡建秀¹

(1. 泉州师范学院 分子生物与药物化学福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362000;

2. 华侨大学 分子药物教育部工程中心, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用超声波辅助-乙酸乙酯提取方法获得桐花树 [*Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco] 叶片多酚提取物, 研究了该提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用及其动力学特征, 并分析了该提取物对 DPPH· 自由基的清除作用及其抗菌活性。结果显示: 多酚提取物得率约为 $(122.0 \pm 31.4) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 提取物中多酚含量约为 $(521.8 \pm 17.2) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。该提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用呈明显正相关的量效关系, IC_{50} 为 $0.650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 与阳性对照槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制能力相近; 该提取物通过降低酶活性实现对酪氨酸酶活性的抑制, 且该抑制作用具有可逆性; 随提取物质量浓度的提高酶促反应 K_m 值增大、 v_m 值减小, 其动力学特征符合混合 I 型抑制类型; 对游离酶的抑制常数 K_i 为 $0.833 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对酶-底物络合物的抑制常数 K_{is} 为 $1.823 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明该提取物与游离酶的亲和力大于其与酶-底物络合物的亲和力。随质量浓度提高, 该提取物对 DPPH· 自由基的清除率逐渐增大并在 $0.000 \sim 0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈明显量效关系, 且 IC_{50} 为 $0.304 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 与 $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素等效, 显示该多酚提取物对自由基的清除能力较强。随质量浓度提高, 该提取物对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的抑菌圈直径均逐渐增大, 显示该提取物对 3 种供试菌均有抑菌作用, 最小抑菌浓度均为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明: 通过深入的开发研究, 桐花树叶片多酚提取物可作为兼具辅助防腐抑菌功能的新型酪氨酸酶抑制剂。

关键词: 桐花树叶片; 多酚提取物; 酪氨酸酶活性; 动力学特征; 清除自由基; 抗菌活性

中图分类号: Q946.8; Q949.96 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)01-0030-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.01.05

Analyses on inhibition of polyphenol extracts from leaf of mangrove plant *Aegiceras corniculatum* to tyrosinase activity and its anti-free radical and antibacterial activities HUANG Xiaodong^{1,2}, WU Yaqing², XU Rui'an², LIU Jia², YU Yu¹, CAI Jianxiu¹

(1. Advanced Education Key Laboratory of Molecular Biology and Pharmaceutical Chemistry of Fujian Province, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China; 2. Ministry of Education Engineering Center of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(1): 30-38

Abstract: Polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco were obtained by ultrasonic assisted-ethyl acetate extraction method, inhibition effect of the extracts on tyrosinase activity and its kinetic characteristics were researched, and its scavenging effect on DPPH· free radical and antibacterial activity were analyzed. The results show that yield of polyphenol extracts is about $(122.0 \pm 31.4) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, in which polyphenol content in the extracts is about $(521.8 \pm 17.2) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The inhibition effect of the extracts on tyrosinase activity appears dose-effect relationship with obviously positive correlation, its IC_{50} is $0.650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which is close to inhibition capacity of quercetin, a positive control, to tyrosinase activity. The extracts achieve inhibiting tyrosinase activity by reducing its activity and its inhibition effect is reversible. With rising of mass concentration of the extracts, K_m value of enzymatic reaction increases and v_m value decreases, its kinetic characteristics is accord with the mixed

I type inhibition. The inhibition constant for free enzyme (K_i) is $0.833 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and that for enzyme-substrate complex (K_{is}) is $1.823 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and it means that affinity of the extracts with free enzyme is higher than that with enzyme-substrate complex. With rising of mass concentration, scavenging rate of the extracts to DPPH· free radical increases gradually and appears obviously dose-effect relationship in range of $0.000\text{--}0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and its IC_{50} is $0.304 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which is equivalent to $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ quercetin, and it means that the polyphenol extracts has a stronger scavenging capability to free radical. With rising of mass concentration, antibacterial annulus diameters of the extracts to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* all increase gradually, which shows that the extracts have an antibacterial effect on the three tested bacteria, the minimum inhibitory concentration is $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. It is suggested that by deep development and research, polyphenol extracts from leaf of *A. corniculatum* can be used as a new tyrosinase inhibitor with auxiliary antiputrefactive and bacteriostatic function.

Key words: leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco; polyphenol extracts; tyrosinase activity; kinetic characteristics; scavenging free radical; antibacterial activity

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, tyrosinase)是一种含铜的多酚氧化酶,广泛存在于动植物、真菌及微生物体内^[1],是生物体合成黑色素的关键酶,具有独特的双重催化功能,能先后催化黑色素生成过程中的3个反应途径:单酚(L-酪氨酸)的羟基化、二酚(L-多巴)的氧化及二羟基吲哚(DHI)的脱氢^[2]。它首先催化L-酪氨酸羟基化形成L-多巴,再氧化L-多巴形成多巴醌,多巴醌经一系列的酶促和非酶促反应生成中间体DHI,后者最终形成黑色素^[2-4]。在人体内,酪氨酸酶引起皮肤、眼和头发等的黑化,但其异常过量表达可导致人体雀斑、黄褐斑与老年斑等色素沉着^[5];植物源食品包含的酪氨酸酶会引发不利的酶促褐变,使其营养质量下降,并导致经济损失^[6];昆虫表皮的酪氨酸酶催化产生的黑色素可以保护其免受紫外线辐射,酪氨酸酶还与昆虫蜕皮过程中的鞣化作用有关,并影响昆虫的免疫系统和生长^[5,7]。因此,研发与应用酪氨酸酶抑制剂(tyrosinase inhibitors, TI)抑制酪氨酸酶活性,是防止果蔬褐变和色素沉着^[8]、研制美白化妆品和生物源杀虫剂^[9]的一种重要途径。

迄今,研究者发现了大量天然或合成的酪氨酸酶抑制剂^[10],但同时也发现一些酪氨酸酶抑制剂存在着黑色素细胞毒性与副作用^[11],比如氢醌的致敏作用^[12]和曲酸的致癌作用^[13]等。因此,许多学者致力于寻找和开发无毒、高效和特异性强的酪氨酸酶抑制剂。由于植物次生代谢产物种类多样且含量较丰富,并具有多种生物活性且相对较安全,成为酪氨酸酶抑制剂筛选的主要来源与热点。近年来的研究表明:植物来源的酪氨酸酶抑制剂涵盖糖苷类、黄酮及多酚类和醛类等多种化学成分,其中,植物多酚(plant polyphenols)广泛存在于植物体内,含量仅次于纤维

素、半纤维素与木质素;其具有的1个或多个酚羟基能及时清除过氧自由基,进而可减弱酪氨酸的氧化作用,并且酚羟基还可能与酪氨酸酶分子中的 Cu^{2+} 络合而抑制该酶活性^[14]。因而,植物多酚被普遍认为是理想的且有开发前景的酪氨酸酶抑制剂之一。据报道,从蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus* Linn.)植物青梅(*P. mume* Sieb. et Zucc.)花中提取的多酚提取物^[15]、从蔷薇科苹果属(*Malus* Mill.)植物苹果(*M. pumila* Mill.)中纯化的苹果多酚^[5]和茶多酚(TPP)^[16]、从柿树科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros* Linn.)植物柿树(*D. kaki* Thunb.)中分离的多酚^[17]、从桑科(Moraceae)桑属(*Morus* Linn.)植物鲁桑[*M. lhou* (Ser.) Koidz.]中分离的多酚^[18]等均具有酪氨酸酶抑制活性。

桐花树[*Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco]为紫金牛科(Myrsinaceae)蜡烛果属(*Aegiceras* Gaertn.)的红树植物,是红树林的广布种之一,生于海边滩涂上,为了适应海洋盐生环境该种体内富含单宁等多酚类化合物^[19-20]。目前,对桐花树多酚作为酪氨酸酶抑制剂的研究尚未见报道。作者以自然分布于泉州湾河口湿地的桐花树叶片为实验材料,初步制备桐花树叶片多酚提取物,并研究该多酚提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用,同时测定其对DPPH·自由基的清除能力及对化妆品中常见腐败菌的抑菌作用,以期对桐花树叶片多酚提取物的开发应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料、仪器和试剂

1.1.1 多酚提取物获得和样液配制 供试桐花树叶片于2012年5月份采自福建泉州湾红树林湿地,洗

净去杂后用水蒸气加热 2~5 min,使样品中酚氧化酶 PPO 等丧失活性^[20];沥干并阴干后磨成粉末,过 60 目筛;为去除叶绿素并脱脂和脱蜡,置于索氏提取器中用石油醚(30 ℃~60 ℃)提取至浸出液无色为止;自然挥发去除石油醚后,密封遮光冷藏(-20 ℃)备用。取处理后的桐花树粉末按料液比(W:V)1:20 的比例加入体积分数 50% 乙醇,于温度 70 ℃ 条件下超声波(功率 210 W、频率 80 kHz)辅助提取 70 min,抽滤后的滤液即为多酚提取液。将提取液减压浓缩(约 50 ℃, -0.01 kPa)去醇至一定体积后,按 30 mL 加 0.5 g 的比例加入 AlCl₃,并用 1 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 调节至 pH 5.1~pH 6.0,静置待多酚沉淀,离心;沉淀用 0.5 mol·L⁻¹ HCl 转溶,再按照 V:V=1:1 的比例用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 5 min;合并乙酸乙酯萃取液并减压蒸馏(40 ℃, -0.01 kPa)除去乙酸乙酯,残渣干燥后即得多酚提取物,避光保存于-20 ℃,备用。

使用时用 DMSO 配成质量浓度 1.000 g·L⁻¹ 母液,并稀释成质量浓度 0.100~1.000 g·L⁻¹ 的多酚提取物样液 I,供酪氨酸酶活性抑制测定与自由基清除能力测定;另将多酚提取物预先用体积分数 95% 乙醇助溶,以无菌水稀释配成 2 倍比浓度系列的样液 II (12.5~100 g·L⁻¹),对应溶媒乙醇的体积分数为 4.75%~38.00%,供抗菌活性测定;取一定量的多酚提取物,用体积分数 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL,作为供测样液 III。

1.1.2 仪器和试剂 主要仪器:L5 紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);PHB-4 便携式酸度计(上海伟业仪器厂);TGL-10B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-300VDE 台式双频数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

主要试剂:酪氨酸酶(1 680 U·mg⁻¹,美国 Worthington 公司),用 50 mmol·L⁻¹ PBS 配制相应浓度;没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,纯度 89.9%,批号 110831-201204);槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,纯度 97.3%,批号 100081-200406);左旋多巴(L-DOPA)(美国 Sigma 公司);防腐剂布罗波尔 Bronopol(日用化工级,广州冠志化工有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠等均为国产分析纯。

1.1.3 供试菌种 供试菌种大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)均由福建师范大学生物工

程学院微生物教研组提供。

1.2 方法

1.2.1 多酚提取物中多酚含量测定 采用 Folin-Ciocalteu 法^[21]测定多酚含量。取 0.2 mL 样液 III,加入 1.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL Folin 酚试剂,漩涡振荡,暗处放置 8 min 后加入 1.0 mL 质量体积分数 7.5% Na₂CO₃ 溶液,用蒸馏水定容至 25 mL,充分混合,室温静置 120 min 显色,于波长 760 nm 处测定吸光度值。按同法用没食子酸对照品作标准曲线,1 g 提取物中的多酚含量以没食子酸当量(gallic acid equivalent, GAE)计。

1.2.2 多酚提取物抑制酪氨酸酶活性的测定 酪氨酸酶活性测定参照石嘉悻^[15]的方法并略加修改。在总体积 3.0 mL 的酶活反应测定体系中,依次加入多酚提取物样液 I 0.1 mL、200 U·mL⁻¹ 酪氨酸酶溶液 0.1 mL 和 0.5 mmol·L⁻¹ L-DOPA 底物溶液 2.8 mL,充分混匀,37 ℃ 水浴保温 10 min 后,于波长 475 nm 处测得样液组吸光度值 A₃;以 DMSO 代替样液 I,测得空白对照组吸光度值 A₁;以 50 mmol·L⁻¹ PBS (pH 6.8)代替样液 I 和酪氨酸酶溶液,测得空白对照组背景吸光度值 A₂;以 50 mmol·L⁻¹ PBS (pH 6.8)代替酪氨酸酶溶液,测得样液组背景吸光度值 A₄。提取物对酪氨酸酶活性的抑制率(I)按下式计算: $I = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100\%$ 。以槲皮素为阳性对照,实验重复 3 次。

在上述的酶活反应测定体系中,改变酪氨酸酶浓度([E]分别为 25、50、100、150 和 200 U·mL⁻¹),分别测定质量浓度 0.000、0.650 和 0.950 g·L⁻¹ 的多酚提取物样液 I 对不同浓度酪氨酸酶活性的影响,于波长 475 nm 处测定吸光度值,实验重复 3 次。酪氨酸酶催化反应速率 v 以酶活反应测定体系反应终止后测得的吸光度值 A₄₇₅ 定量表征^[22]。A₄₇₅ 的计算公式为 A₄₇₅ = A₃ - A₄,其中, A₃ 和 A₄ 分别是样液组吸光度值和样液组背景吸光度值。以酪氨酸酶浓度[E]为 X 轴、以 A₄₇₅ 为 Y 轴作图,并依此判断多酚提取物样液对酪氨酸酶活性抑制作用的类型。

1.2.3 多酚提取物对酪氨酸酶活性抑制的动力学分析 上述酶活反应测定体系中,改变 L-DOPA 底物浓度([S]分别为 0.200、0.250、0.333、0.500、1.000 和 2.000 mmol·L⁻¹),测定不同质量浓度([I]分别为 0.000、0.350 和 0.650 g·L⁻¹)多酚提取物样液 I 对酪氨酸酶活性的影响,于波长 475 nm 处测定吸光度

值,实验重复3次。按上法表征酪氨酸酶催化反应的速率 v 。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法^{[23]79}作图,通过米氏常数 K_m 和酶促反应最大速率 v_m 的变化来判断抑制类型。

若为线性混合型抑制,其 Lineweaver-Burk 双倒数方程为: $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} (1 + \frac{[I]}{K_{is}}) + \frac{K_m}{v_m} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \frac{1}{[S]}$ 。以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图得一直线,其斜率与截距的计算公式分别为:斜率 $= \frac{K_m}{v_m} (1 + \frac{[I]}{K_i})$;截距 $= \frac{1}{v_m} (1 + \frac{[I]}{K_{is}})$ 。再以斜率和截距分别对样液浓度 $[I]$ 作图,可以求得多酚提取物对游离酪氨酸酶的抑制常数 K_i 和多酚提取物对酶-底物络合物(ES)的抑制常数 K_{is} ^{[23]120}。

1.2.4 多酚提取物对 DPPH·自由基清除能力的测定 多酚提取物对 DPPH·自由基清除能力的测定参照钟瑞敏等^[24]的方法并略加修改。分别取 200 μL 各浓度测试样液 I,与 0.06 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH·甲醇溶液 4 mL 混匀,15 min 后于波长 517 nm 处测得吸光度值 A_s ;以 200 μL 甲醇代替样液测得空白对照组吸光度值 A_0 ;考虑样液本身的颜色,以甲醇代替 DPPH·甲醇溶液测得样液本底吸光度值 A_B ;自由基清除率(D)的计算公式为: $D = [1 - (A_s - A_B) / A_0] \times 100\%$ 。以槲皮素为阳性对照,DPPH·自由基清除能力以自由基清除率 D 与等量槲皮素(quercetin equivalent, QE)表示,实验设3次重复。

1.2.5 多酚提取物抗菌活性的测定 采用管碟法^[25]测定抑菌圈直径。用无菌移液枪分别吸取 0.2 mL 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌悬液($0.5 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)均匀涂布于平板(内径 90 mm)表面,在每平板上等距离放入 4 只灭菌牛津杯(10.0 mm \times 7.8 mm \times 6.0 mm),并在每个牛津杯中加入样液 II 200 μL ,以相应溶媒作空白对照;37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后观察并用游标卡尺测量抑菌圈直径,以抑菌圈直径(d)评价抑菌效果,计算公式为: $d = \text{样液抑制圈直径} - \text{空白对照抑制圈直径}$ 。实验重复 3 次并计算平均值。

参考文献[25]测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。用无菌移液枪吸取 1.0 mL 样液 II,与 15 mL 无菌营养琼脂培养基(温度低于 45 $^{\circ}\text{C}$)充分混匀,冷却后制成含样液平板,以相应溶媒作空白对照、Bronopol 为阳性对照;吸取上述菌悬液 0.1 mL 均匀涂布于各平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温倒置培

养 24 h 后观察 3 种细菌的生长状况,以完全无细菌生长的最低样液浓度作为最低抑菌浓度。

1.3 数据统计分析

桐花树叶片醇提取物和多酚提取物得率的计算公式分别为:醇提取物得率=醇提取物质量/桐花树叶片粉末质量;多酚提取物得率=多酚提取物质量/桐花树叶片粉末质量。

采用 EXCEL 2003 和 SPSS Statistics V17.0 等软件进行数据处理与统计分析,采用 EXCEL 软件作图;实验数据均为 3 次重复的平均值,采用独立样本 t 检验进行组间均值方差分析。

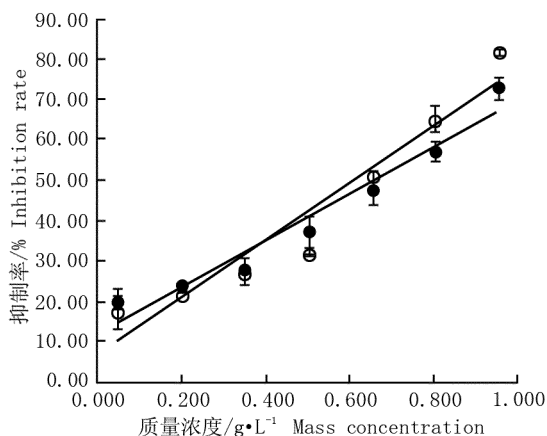
2 结果和分析

2.1 桐花树叶片多酚提取物的得率与多酚含量

经超声波辅助提取,桐花树叶片醇提取物得率为(281.2 ± 25.6) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,醇提液经金属盐沉淀、盐酸转溶沉淀和乙酸乙酯萃取后获得多酚提取物,得率约为(122.0 ± 31.4) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,经 Folin-Ciocalteu 法测得该多酚提取物中多酚含量为(521.8 ± 17.2) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用分析

2.2.1 多酚提取物对酪氨酸酶活性的影响 桐花树叶片多酚提取物和槲皮素对酪氨酸酶活性抑制率的量效关系见图1。由图1可见:多酚提取物和阳性对



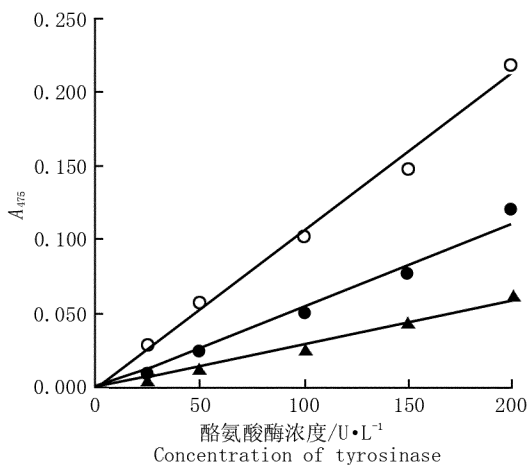
●: 多酚提取物 Polyphenol extracts; ○: 槲皮素 Quercetin.

图1 桐花树叶片多酚提取物和槲皮素对酪氨酸酶活性抑制率的量效关系

Fig. 1 Dose-effect relationship of inhibition rate of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco and quercetin to tyrosinase activity

照槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制率均随其质量浓度的提高而增大,呈明显正相关的量效关系(R^2 分别为 0.957 1 和 0.930 4)。质量浓度 $0.950 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多酚提取物和槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制率分别高达 73.36% 和 82.17%,但二者差异不显著($P>0.05$)。根据二者的线性回归方程获得多酚提取物与槲皮素对酪氨酸酶活性的半抑制浓度(IC_{50})分别为 0.650 和 $0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,提示桐花树叶片多酚提取物和槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制能力相近。

2.2.2 多酚提取物对不同浓度酪氨酸酶活性的抑制作用 实验结果显示(图 2):在底物浓度和桐花树叶片多酚提取物质量浓度不变的条件下,随着酪氨酸酶浓度的提高,反应体系的吸光度值 A_{475} 呈线性增加;而在底物浓度和酪氨酸酶浓度不变的情况下, A_{475} 随多酚提取物质量浓度的提高而下降。以 A_{475} 对酪氨酸酶浓度 $[E]$ 作图可得 3 条通过原点的直线(图 2),直线斜率随提取物质量浓度增加而下降,说明桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用不是通过降低有效酶量而是通过降低酶活性实现的,表现为可逆性抑制作用。



○: $0.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多酚提取物 $0.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ polyphenol extracts;
●: $0.650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多酚提取物 $0.650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ polyphenol extracts;
▲: $0.950 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多酚提取物 $0.950 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ polyphenol extracts.

图 2 不同浓度桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用
Fig. 2 Inhibition effect of different concentrations of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco to tyrosinase activity

2.2.3 多酚提取物对酪氨酸酶活性的抑制动力学 由 Lineweaver-Burk 方程(表 1)可见:随提取物质量浓度的提高,米氏常数 K_m 值增大、酶促反应最大速率

v_m 值减小,这与混合 I 型抑制类型的动力学特征相符,即桐花树叶片多酚提取物既可以与游离酶(E)结合,也可以与酶-底物络合物(ES)在非活性中心结合,导致酪氨酸酶活性降低。以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 进行 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到 1 组相交于第二象限的直线(图 3-a)。进一步以 Lineweaver-Burk 双倒数图的斜率与截距对相应的多酚提取物浓度二次作图均呈直线(见图 3-b,c)。计算结果显示:桐花树叶片多酚提取物对游离酪氨酸酶活性的抑制常数 K_i 为 $0.833 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、对酶-底物络合物的抑制常数 K_{is} 为 $1.823 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_{is} 为 K_i 的 2.19 倍,说明桐花树叶片多酚提取物与游离酶的亲和力大于其与酶-底物络合物的亲和力。

表 1 不同浓度桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的动力学参数¹⁾

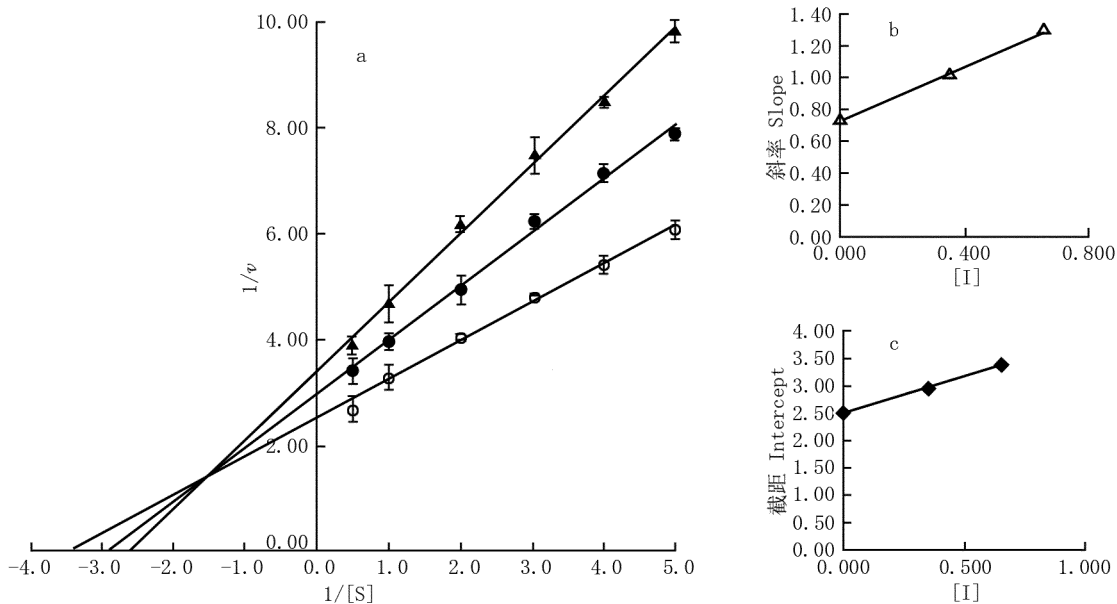
Table 1 Kinetic parameter of inhibition effect of different concentrations of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco to tyrosinase activity¹⁾

提取物浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of extracts	Lineweaver-Burk 方程 Lineweaver-Burk equation	$K_m/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	v_m
0.000	$1/v=0.7294/[S]+2.5034$	0.291	0.399
0.350	$1/v=1.0134/[S]+2.9661$	0.342	0.337
0.650	$1/v=1.2947/[S]+3.3952$	0.381	0.295

¹⁾ v : 用波长 475 nm 处的吸光度值 A_{475} 表征 Represented by absorbance value A_{475} in wavelength 475 nm; $[S]$: *L*-DOPA 浓度 Concentration of *L*-DOPA ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); K_m : 米氏常数 Michaelis constant; v_m : 酶促反应最大速率 The maximum velocity of enzymatic reaction.

2.3 桐花树叶片多酚提取物对 DPPH·自由基的清除能力

自由基能上调酪氨酸酶 mRNA 的表达,抗氧化作用是酪氨酸酶抑制机制之一^[26]。DPPH·自由基反应体系由于具有简便、快速、重复性好等特点而广泛应用于自由基清除剂的筛选及纯抗氧化剂或植物提取物的体外抗氧化活性测定^[27]。不同浓度桐花树叶片多酚提取物对 DPPH·自由基的清除作用见表 2。由表 2 可知:桐花树叶片多酚提取物对 DPPH·自由基表现出较强的清除能力,清除率随提取物质量浓度的提高而增大。在质量浓度 $0.000 \sim 0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内提取物与 DPPH·自由基清除率有明显的量效关系,线性回归方程为: $y=106.45x+17.638$ ($R^2=0.9710$, $P<0.01$)。以此计算出桐花树叶片多酚提取物对 DPPH·自由基的半抑制浓度 IC_{50} 为 $0.304 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,与 $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素等效。



○: 0.000 g · L⁻¹ 多酚提取物 0.000 g · L⁻¹ polyphenol extracts; ●: 0.350 g · L⁻¹ 多酚提取物 0.350 g · L⁻¹ polyphenol extracts; ▲: 0.650 g · L⁻¹ 多酚提取物 0.650 g · L⁻¹ polyphenol extracts. [S]: L-DOPA 浓度 Concentration of L-DOPA (mmol · L⁻¹); v: 用波长 475 nm 处的吸光度值 A₄₇₅ 表征 Represented by absorbance value A₄₇₅ in wavelength 475 nm; [I]: 多酚提取物浓度 Concentration of polyphenol extracts (g · L⁻¹).

a: Lineweaver-Burk 双倒数图 Lineweaver-Burk double reciprocal graph; b: 双倒数直线斜率对多酚提取物浓度图 Graph of slope of double reciprocal straight line versus concentration of polyphenol extracts; c: 双倒数直线截距对多酚提取物浓度图 Graph of intercept of double reciprocal straight line versus concentration of polyphenol extracts.

图 3 不同浓度桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 3 Lineweaver-Burk graph of inhibition effect of different concentrations of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco to tyrosinase activity

表 2 不同浓度桐花树叶片多酚提取物对 DPPH· 自由基的清除作用 (X̄±SD)

Table 2 Scavenging effect of different concentrations of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco on DPPH· radical (X̄±SD)

提取物浓度/g · L ⁻¹ Conc. of extracts	清除率/% Scavenging rate	等量槲皮素/g · L ⁻¹ Quercetin equivalent
0.100	23.30±0.24	0.023±0.000
0.200	42.96±1.77	0.032±0.001
0.300	51.94±2.68	0.037±0.002
0.400	62.38±2.06	0.044±0.002
0.500	68.20±0.80	0.049±0.001
0.600	80.58±1.06	0.066±0.002
0.700	80.10±1.99	0.065±0.004
0.800	83.74±0.53	0.072±0.001
0.900	86.17±0.17	0.079±0.001
1.000	85.92±1.43	0.079±0.004

2.4 桐花树叶片多酚提取物的抑菌活性

不同浓度桐花树叶片多酚提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径见表 3。由表 3 可知:多酚提取物对 3 种供试菌的抑菌圈直径

均随提取物质量浓度的提高而增大,50 g · L⁻¹ 多酚提取物对 3 种供试菌均表现出抑菌作用,质量浓度为 100 g · L⁻¹ 时,多酚提取物对 3 种供试菌的抑菌圈直径均达 15 mm 以上,其中对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达 20 mm 以上。最小抑菌浓度(MIC)测定结果进一步显示:桐花树叶片多酚提取物对供试 3 种细菌的 MIC 均为 25 g · L⁻¹,相当于化妆品防腐剂 Bronopol

表 3 不同浓度桐花树叶片多酚提取物的抑菌圈直径比较 (X̄±SD)
Table 3 Comparison on antibacterial annulus diameter of different concentrations of polyphenol extracts from leaf of *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco (X̄±SD)

提取物浓度/g · L ⁻¹ Conc. of extracts	对不同细菌的抑菌圈直径/mm Antibacterial annulus diameter to different bacteria		
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
12.5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
25	11.41±0.53	12.43±0.74	0.00±0.00
50	13.09±0.87	15.37±0.65	14.48±1.45
100	15.10±0.98	20.48±0.57	17.33±0.58

对供试 3 种细菌的 MIC(对大肠杆菌的 MIC 小于或等于 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对枯草芽孢杆菌的 MIC 为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3 讨 论

人体皮肤黑化、色素沉着性疾病及黑色素瘤的发生与黑色素合成最关键的限速酶——酪氨酸酶的催化活力升高和过量表达有关。酪氨酸酶抑制剂(TI)可以通过抑制酪氨酸酶的活性来预防和治疗色素沉着并使皮肤美白。为了筛选 TI 并探明其作用机制,研究者常采用体外化学模型体系的酪氨酸酶活性抑制实验、动力学分析^[26]以及基于细胞培养的酪氨酸酶活性检测技术^[28]。从天然植物组织中分离提取、从商品化合物中筛选和有机合成新化合物是目前寻找 TI 的 3 个主要路径^[5],其中植物源 TI 因具有高效、无毒的特点而备受青睐,并已广泛应用于增白美容化妆品中。植物多酚就是美白化妆品 TI 的理想选项之一,其吸收紫外线、抗氧化与清除自由基以及对酪氨酸酶活性抑制能力强等特点使之具有与众不同的美白综合效应^[29]。

红树植物是一类常年生长于盐生环境中的特殊植物,较高含量的多酚(单宁)是一些红树植物提高抗腐蚀性以适应盐生环境的生存策略之一^[19]。柴纬明等^[30]从红树植物秋茄树 [*Kandelia candel* (Linn.) Druce] 叶片中获得缩合单宁,并发现它对蘑菇酪氨酸酶具有很强的抑制作用, IC_{50} 仅为 $30.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,这一研究结果显示出红树植物中的多酚类物质作为 TI 开发的可能性与独特性。同为红树植物的桐花树,叶片解剖结构及成分分析的研究结果均显示其体内含有较高水平的多酚^[19,31]。鉴于此,作者选用金属盐沉淀-乙酸乙酯萃取相结合的方法获得桐花树叶片多酚提取物,其叶片多酚提取物的多酚含量约为 $521.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;根据酚类分子量与乙酸乙酯溶剂的关系,初步判断经乙酸乙酯萃取获得的多酚可能主要为中等分子量的多酚类成分^[32],相比于大分子量多酚的强收敛性所产生的皮肤刺激副作用,桐花树叶片多酚提取物更适合作为化妆品添加剂。

为了探明桐花树叶片多酚提取物的酪氨酸酶活性抑制能力,作者选用相对简单、便捷的体外化学模型体系进行酪氨酸酶抑制活性检测,由于桐花树叶片多酚提取物在水溶液中的溶解度相对较小,一般的有

机溶剂(如乙醇等)对酪氨酸酶又具有一定的抑制作用^{[33]25},故而选用 DMSO 作为溶媒。邱凌^{[33]25}认为 DMSO-H₂O 体系不会对酪氨酸酶活性产生抑制作用;但陈懿等^[34]研究了 DMSO 对酪氨酸酶活性的影响,认为 DMSO 体积分数大于 25% 时酪氨酸酶活性会急剧下降;而更多的研究者通常将反应体系中 DMSO 的用量控制为体积分数 3.33%^{[26],[33]26},以尽量避免 DMSO 的影响并保证实验效果。因此,在本研究中作者也将反应体系中 DMSO 的用量设定为体积分数 3.33%。研究表明:桐花树叶片多酚提取物具有明显的酪氨酸酶活性抑制作用, IC_{50} 为 $0.650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其酪氨酸酶活性抑制能力与槲皮素(IC_{50} 为 $0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)相近,而在黄酮类化合物中槲皮素是对酪氨酸酶活性抑制率较高的可逆抑制剂^[35]。由此可见,桐花树叶片多酚提取物是一种潜在的、有效的酪氨酸酶活性抑制剂,可通过柱色谱分离技术和活性追踪方法进一步筛选出该多酚提取物中高效的 TI 组分或单体成分。

根据抑制剂与酶作用的特点,酶抑制类型可分为可逆抑制和不可逆抑制 2 类,前者又可分为竞争性抑制、反竞争性抑制、非竞争性抑制和混合型抑制等 4 种类型。李航等^[14]认为:对酪氨酸酶活性的可逆抑制类型中还应包括一种缓慢结合型抑制,即抑制剂与酶快速形成 EI 复合物后缓慢的可逆异构化。在判定酶抑制类型时,Lineweaver-Burk 双倒数作图分析是一种常用的有效方法,作图后如果得到一组相交于 Y 轴的直线则为竞争性抑制,如果得到一组相交于 X 轴的直线则为非竞争性抑制,如果得到一组平行的直线则为反竞争性抑制,如果得到一组相交于第二或第四象限的直线则为混合 I 型(兼具竞争性与非竞争性抑制)或混合 II 型抑制(兼具反竞争性与非竞争性抑制)^[36]。在这些抑制类型中,混合型抑制较为常见^{[23]120}。本研究结果表明:桐花树叶片多酚提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图所得直线相交于第二象限,动力学参数表现为随提取物质量浓度提高 K_m 值增大、 v_m 值减小,抑制类型属于可逆的混合 I 型抑制,其实现对酶活性的抑制一方面是通过与底物的竞争,另一方面是通过与酶-底物络合物(ES)的亲合,这种抑制作用兼具竞争性和非竞争性抑制的特点。进一步的分析结果显示:桐花树叶片多酚提取物对游离酶活性的抑制常数 K_i ($0.833 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 小于该多酚提取物对酶-底物络合物的抑制

常数 K_{is} ($1.823 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 说明该多酚提取物对游离酶活性的抑制作用强于其对酶-底物络合物的抑制作用。这些特征与秋茄树叶片中的缩合单宁^[30]、青梅花提取物^[15]和叶下珠 (*Phyllanthus urinaria* Linn.) 提取物^[26]对酪氨酸酶活性的抑制类型相似。

有关酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶活性抑制的机制主要包括 3 个方面: 结构与酶底物相似; 络合酪氨酸酶的 Cu^{2+} ; 清除活性氧并拮抗氧对酪氨酸酶的激活^[37]。根据桐花树叶片多酚提取物具有酚羟基的结构特点及其对酪氨酸酶活性抑制作用的混合 I 型抑制作用特征, 初步判断其对酪氨酸酶活性的抑制具有多维机制。一方面, 该提取物含有与 *L*-DOPA 分子结构相似的多羟基化学成分^[30], 可以被酪氨酸酶催化^[15]并作为竞争性底物与酪氨酸酶结合, 削弱酪氨酸酶的催化氧化作用^[9]; 酚羟基的孤对电子可与酪氨酸酶分子中的 Cu^{2+} 络合而抑制酶活性, 酚羟基还可与酶-底物络合物的非活性中心结合并可能对酶活性中心双核铜间的内源桥基产生影响^[14], 体现出该提取物混合 I 型抑制剂的特点。另一方面, 酪氨酸酶是一种含铜需氧酶, 其催化功能必须在氧自由基参与下才能完成, 通过清除氧自由基可以减弱或阻断酪氨酸酶的催化反应^[33]^{6,157}; 桐花树叶片多酚提取物清除 DPPH· 自由基的 IC_{50} 为 $0.304 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明其具有较强的抗氧化与清除自由基能力, 清除氧自由基、终止自由基链的引发以及拮抗氧对酪氨酸酶的激活也是桐花树叶片多酚提取物抑制酪氨酸酶活性的一个重要机制。除了抑制酪氨酸酶活性, 桐花树叶片多酚提取物是否可以通过下调酪氨酸酶 mRNA 表达来降低酪氨酸酶水平? 以及是否影响酪氨酸酶表达的信号通路? 这些疑问均有待综合运用细胞培养、RT-PCR 和 Western Blot 等实验手段加以揭示与探明。

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌是引起化妆品变质、腐败以及色泽和气味变化的常见腐败菌。防止化妆品腐败变质的简单有效方法是向化妆品中加入防腐剂, 但是合成防腐剂往往具有一定的皮肤毒性且易诱发过敏反应^[38], 因而, 人们倾向于以植物源防腐剂代替化学合成防腐剂。本实验结果表明: 桐花树叶片多酚提取物对 3 种常见的化妆品腐败菌 (大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌) 均有抑菌作用, 其抑菌强度随提取物浓度提高而增加; 其中, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用较为突出, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提取物的抑菌圈直径达 20 mm 以上。从 MIC 来看,

桐花树叶片多酚提取物对供试 3 种细菌的 MIC 均为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大于化妆品防腐剂 Bronopol 的 MIC。由于国家对化妆品防腐剂的使用量有严格规定, 《化妆品卫生规范》(2007 版) 规定 Bronopol 最大允许使用浓度为质量分数 0.1%^[39], 均低于 Bronopol 对 3 种供试菌的 MIC, 对化妆品的防腐性有一定影响。因此, 将具有抑菌活性的桐花树叶片多酚提取物用于化妆品中, 既可以提升化妆品的防腐性, 也可降低 Bronopol 等化学合成防腐剂的使用量与副作用。研究结果显示: 桐花树叶片多酚提取物可作为具有辅助防腐抑菌功能的新颖酪氨酸酶抑制剂应用于美白化妆品的研制。

参考文献:

- [1] SABOURY A A, ZOLGHADRI S, HAGHBEEN K, et al. The inhibitory effect of benzenethiol on the cresolase and catecholase activities of mushroom tyrosinase [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2006, 21: 711-717.
- [2] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation [J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84: 1155-1228.
- [3] 陈清西, 宋康康. 酪氨酸酶的研究进展 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(5): 731-737.
- [4] NOH J M, KWAK S Y, SEO H S, et al. Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19: 5586-5589.
- [5] 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: 自然科学版*, 2007, 46(2): 274-282.
- [6] KIM Y J, UYAMA H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62: 1707-1723.
- [7] 孟凤霞, 高希武, 张 岚, 等. 昆虫酪氨酸酶的研究进展 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2004, 15(6): 496-499.
- [8] SATO K, TORIYAMA M. The inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12: 3998-4008.
- [9] 李 娜, 鲁晓翔. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(7): 406-409.
- [10] JIMÉNEZ M, CHAZARRA S, ESCRIBANO J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 4060-4063.
- [11] ZHANG X D, HU X, HOU A J, et al. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 32: 86-90.

- [12] 熊 雄, 单连海. 天然植物酪氨酸酶活性抑制剂研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3777-3784.
- [13] KIM J H, KIM M R, LEE E S, et al. Inhibitory effects of calycosin isolated from the root of *Astragalus membranaceus* on melanin biosynthesis[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32: 264-268.
- [14] 李 航, 赵国华, 阚建全, 等. 天然产物对酪氨酸酶的抑制及抑制机理的研究进展[J]. 日用化学工业, 2003, 33(6): 383-386.
- [15] 石嘉悻. 青梅花提取物的酪氨酸酶抑制作用及机理研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 205-207, 211.
- [16] WEI X L, LIU Y, XIAO J B, et al. Protective effects of tea polysaccharides and polyphenols on skin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 7757-7762.
- [17] XUE Y L, TAKUYA M, HAYASHI Y, et al. Isolation and tyrosinase inhibitory effects of polyphenols from the leaves of persimmon, *Diospyros kaki* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 6011-6017.
- [18] JEONG S H, RYU Y B, CURTIS-LONG M. J, et al. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 1195-1203.
- [19] 李元跃, 林 鹏. 3种红树植物叶片结构及其生态适应[J]. 海洋科学, 2006, 30(7): 53-57.
- [20] 林益明, 向 平, 林 鹏. 红树林单宁的研究进展[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 59-63.
- [21] 韩 菊, 魏福祥. Folin-Ciocalteu 比色法测定苹果渣中的多酚[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 179-182.
- [22] 龚 静, 张飞伟, 韩 锐, 等. 红景天水提液对酪氨酸酶抑制效果的初步研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2006, 43(2): 468-471.
- [23] 陈清西. 酶学及其研究技术[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2010.
- [24] 钟瑞敏, 张振明, 王羽梅, 等. 杨梅叶芳香精油的成分鉴定及抗氧化活性[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2006, 34(3): 49-53.
- [25] 黄晓冬. 赤楠叶不同极性提取物体外抗菌活性比较研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 355-357.
- [26] 陈良华, 刘 轩, 明艳林, 等. 叶下珠提取物对酪氨酸酶的抑制和抗氧化作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(3): 410-414.
- [27] 陆占国, 郭红转, 封 丹. 芫荽茎叶精油成分及清除 DPPH 自由基能力研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 24-27.
- [28] 邵邻相, 吕学维, 邓 刚, 等. 佛手挥发油对 B16 细胞增殖及其酪氨酸酶活性的影响[J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2011, 34(2): 202-206.
- [29] 车景俊, 李 明, 金哲雄. 植物多酚作为护肤因子在化妆品领域的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(2): 97-99.
- [30] 柴纬明, 邓紫薇, 石 艳, 等. 秋茄叶缩合单宁对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(6): 1070-1073.
- [31] LIN Y M, LIU J W, XIANG P, et al. Tannins and nitrogen dynamics in mangrove leaves at different age and decay stages (Jiulong River Estuary, China) [J]. Hydrobiologia, 2007, 583: 285-295.
- [32] 韩丙军, 彭黎旭. 植物多酚提取技术及其开发应用现状[J]. 华南热带农业大学学报, 2005, 11(1): 21-26.
- [33] 邱 凌. 天然植物活性物质对酪氨酸酶作用机理的研究[D]. 厦门: 厦门大学生命科学学院, 2008.
- [34] 陈 懿, 汤洪敏, 樊明涛. 二甲基亚砜对酪氨酸酶活性影响的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(6): 1-3.
- [35] XIE L P, CHEN Q X, HUANG H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase[J]. Biochemistry (Moscow), 2003, 68: 487-491.
- [36] 张耀东, 蔡亚楠, 张 琦, 等. 淫羊藿苷对乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 药学报, 2012, 47(9): 1141-1146.
- [37] 王 芳. 桑叶中酪氨酸酶抑制成分的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学食品与生物工程学院, 2008: 108.
- [38] 孙爱兰, 谭天伟, 朱中伟. 几种抑菌材料对化妆品中腐败菌的抑制作用比较[J]. 日用化学工业, 2005, 32(2): 84-87.
- [39] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2007: 70.

(责任编辑: 张明霞)