

# 黑木耳甲醇提取物抑制黑色素的研究

陈易彬<sup>1</sup>, 徐锦<sup>1,\*</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 耿秀<sup>1</sup>, 李志平<sup>2</sup>

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021;

2. 陕西汉王药业有限公司, 陕西汉中 723000)

**摘要:**为确证黑木耳与黑色素的关系, 鉴于已有的研究, 以甲醇为溶剂对黑木耳进行提取, 提取物采用 TLC 检测与化学显色鉴别相结合的方法, 明确其组成的物质类别; 并以熊果苷为阳性对照, 以鼠黑色素瘤 B16 细胞株作靶标, 采用  $A_{405}$  测定黑色素含量, MTT 法测定细胞增殖能力, 对提取物进行黑色素抑制活性研究和细胞毒性评价。结果显示, 黑木耳甲醇提取物含有多酚、萜类、多糖和氨基酸; 此提取物在浓度较高时, 具有黑色素抑制活性和较低的细胞毒性。

**关键词:**黑木耳, 黑色素, 细胞毒性

## Study on extraction of methanol and inhibition of melanin from *Auricularia auricular*

CHEN Yi-bin<sup>1</sup>, XU Jin<sup>1,\*</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, GENG Xiu<sup>1</sup>, LI Zhi-ping<sup>2</sup>

(1. College of Food and Biotechnology, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

2. Shaanxi Hanwang Pharmaceutical Company, Hanzhong 723000, China)

**Abstract:** To explore the relationship between melanin and *Auricularia auricular*, according to existing research, taking methanol as solvent, the sort of compound in extraction was identified by TLC etc. B16 melanoma cells were used as indicator cells, melanin content was determined by measuring the absorbance at 405 nm. Cell viability or cytotoxicity effect was assayed by determining the number of living cell using MTT assay and comparing with arbutin. The results showed that *Auricularia auricular* extract had polyphenols, terpenoids, polysaccharides and amino acids, and it had strong inhibitory effect on melanin biosynthesis and had low cytotoxicity to B16 melanoma cells when the concentration was high.

**Key words:** *Auricularia auricular*; melanin biosynthesis; cytotoxicity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0111-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.014

当今, 随着生活节奏加快、空气污染加剧, 肤色暗沉、色素沉着等皮肤问题愈发严重, 不论是功能性食品还是护肤品领域, 开发安全有效的美白制品愈显重要<sup>[1]</sup>。能否以黑治黑, 李时珍有指出: “将木耳研磨, 饭后用热汤送服一钱, 一日三服, 可祛面上黑斑<sup>[2]</sup>”。黑木耳何以祛黑, 现代药理工作者指出: 黑木耳具有抗氧化和降血脂、抗血栓、抗辐射等功效<sup>[3]</sup>。将抗氧化功效与祛黑斑相关联, 提示黑木耳对黑色素有抑制活性。按照药物化学和中药成分组合效应<sup>[4-5]</sup>的观点, 可抑制黑色素的化学成分多为多酚、羟基香豆素、不饱和有机酸等有还原性的极性化合物或其组合。据此, 本文选择甲醇为提取溶剂, 研究黑木耳极性化合物成分组合与抑制黑色素的关系。黑木耳是传统的药食兼用菌, 其柔韧适中, 清脆爽口, 颇受国人喜爱, 本研究可为其合理食用或药用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑木耳 (*Auricularia auricular*) 产地黑龙江; 硅胶 GF254 青岛海洋化工有限公司; 噻唑蓝 北京索莱宝科技有限公司; 熊果苷 (含量 99.7%, 批号 111951-201301) 中国药品生物制品检定所; 茶碱、胰蛋白酶 美国 Sigma 公司; L-谷氨酰胺 大连美仑生物技术有限公司; Eagle 培养基粉末 日本 Nissui 公司; 鼠黑色素瘤 B16 细胞 上海桥杜生物科技有限公司; 胎牛血清 美国 Invitrogen 公司; 甲醇、丙酮、氯化钾、乙二胺四乙酸四钠 (EDTA-4Na)、二甲基亚砜 (DMSO)、异丙醇-盐酸溶液、噻唑蓝 (MTT) 等均为分析纯。本研究所用磷酸盐缓冲液 (PBS) 为标准浓度, 121 °C 灭菌 20 min; 所用黄色 EMEM 培养液原液, Eagle 浓度为  $9.4 \times 10^{-3}$  g/mL; 所用噻唑蓝溶液, 浓度为 0.5% (w/v), 微膜过滤除菌; 以上溶液, 均于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

FA1104 电子分析天平 上海精天电子仪器厂;

收稿日期: 2015-03-09

作者简介: 陈易彬 (1955-), 男, 本科, 副教授, 研究方向: 天然产物的纯化与修饰, E-mail: cheniyibin@sust.cn。

\* 通讯作者: 徐锦 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药与医药材, E-mail: ayuhoney@qq.com。

Ti-S100-Ph-1 倒立显微镜 日本 Nikon 公司;  
ELx800 酶标仪 美国 BioTek 仪器有限公司; UV-1800 紫外分光光度计 日本岛津公司; SW-CJ-1FD 型超净工作台 苏州净化仪器设备厂。

## 1.2 实验方法

1.2.1 甲醇提取物的制备 溶剂的选择:从已有的研究结果可知,可抑制黑色素的化学成分多为多酚、羟基香豆素、不饱和有机酸等有还原性的极性化合物或其组合。按照相似相容原理,提取溶剂应选极性溶剂。最常用的极性溶剂是水,但水对树胶、粘液质有好的溶解性,尤其是在温度较高时溶解能力更强,而它们对抑制黑色素无效,因此,不选用水作为提取溶剂。以溶剂的溶解度参数为线索,由大到小排列,依次为水、甘油、乙二醇、氯仿、甲醇。甘油和乙二醇因沸点高粘度大,因此,也予以排除。氯仿和甲醇溶解度参数完全相等,区别在于氯仿为非质子溶剂,偶极距比甲醇小,并且毒性较大,所以不予选用。甲醇对小分子极性化合物有良好的溶解性,对树胶、粘液质不溶解性小;虽然甲醇不如水常用,但在此处尤为适合。因此选择甲醇作为溶剂,进行黑木耳中的极性化合物组合的提取。

提取方法:按照一般回流提取的常规方法,取干黑木耳,粉碎,过 40 目筛,取筛下物 150 g 置于圆底烧瓶,加 5 倍(v/w)量甲醇,回流提取 3 次,每次 1 h,提取液减压蒸发得浓缩物,再真空干燥制成粉末,称为供试品 G,备用。依据黑木耳一般食用习惯和有效成分组合效应的观点,本研究对甲醇总提取物不做进一步的成分分离,用供试品 G 进行定性研究及抑制黑色素研究实验。

1.2.2 甲醇提取物的定性研究 为了明确黑木耳甲醇提取物的成分组成,以借鉴已有的成分与药效研究结果对提取物的生物活性进行判断,以初步明确黑木耳以何祛黑。

1.2.2.1 甲醇提取物组分类别个数的测定 测定采用薄层层析法,按斑点计数。取 0.04 g 供试品 G,用甲醇定容至 10 mL。为了获取较多待测定物,采用条状点样;以硅胶 GF254 薄层为固定相,正丁醇:醋酸:水=6:2:2 展开,紫外仪 254 nm 下薄层硅胶显色观察谱带条数,一条谱带,判定为一类物质,以 Rf 值大小为序,依次编号列出。分别定位刮取各条色谱带,甲醇洗脱,洗脱液供定性鉴别;并于同一薄层板无色谱带处,刮取与相应色谱带等面积硅胶,同法处理,作为阴性对照。

1.2.2.2 甲醇提取成分类别的测定 测定采用天然产物物质类别鉴定通用方法<sup>[6]</sup>,以文献<sup>[7]</sup>报道的组成为线索,逐一鉴定糖类、皂苷类、黄酮类、挥发油、萜类、生物碱、多酚类、氨基酸等物质。每种物质,同时符合两种该类物质的特征反应,阴性对照反应为阴性,即可判断。将有效实验使用的方法和反应结果记入表 1 中。

1.2.3 甲醇提取物抑制黑色素测试方法

1.2.3.1 培养液及溶液的配制 粉色 EMEM 培养液:将冰箱保存的标准浓度磷酸盐缓冲液(FBS)解冻,在

无菌操作台中用微孔滤膜过滤除菌,取滤液 40 mL;称取 0.3 g L-谷氨酰胺加 10 mL 灭菌超纯水,溶解完全;取 400 mL 黄色 EMEM 培养液原液;将三种液体混合,搅拌下加入 7 mL 10% NaHCO<sub>3</sub>,至培养液呈粉红色;4 °C 冰箱中保存。

供试品溶液:称取供试品 G 1.000 g,加 DMSO 配制浓度为 100 mg/mL 溶液,然后稀释制备 100、50、25、12.5、6.25 mg/mL 供试溶液。

对照品溶液:精密称取熊果苷对照品,加 DMSO 配制成 100 mg/mL 的溶液,然后稀释制备 100、50、25、12.5、6.25 mg/mL 对照品溶液。

1.2.3.2 细胞的复苏 冻存细胞的融化:为保证 B16 细胞的活性,冻存的细胞采用快速融化复苏。为了防止骤热而引起的喷瓶,采用逐步升温的方法进行融化。

离心分离与培养:保存 B16 细胞时培养基中加有冻存剂 DMSO,在培养前需离心除去。将细胞从冻存管中转移出并加入 1 mL 新鲜培养基洗涤冻存管一次。将 B16 细胞离心除去上清液,加入 10 mL 新鲜培养基,将细胞混匀后转移至培养皿中,在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。2 d 后更换培养基,细胞培养期间要对细胞的生长状况进行显微监测。

1.2.3.3 B16 细胞的前培养 为获得足够的细胞考察试样对 B16 细胞黑色素生合成的抑制作用及细胞毒性,需要对 B16 细胞进行前培养。主要过程和操作如下:

洗涤: B16 细胞经复苏培养后铺满培养皿的底表面,此时培养基呈浅红或暗黄色。弃去此培养基,加入 5 mL PBS 对细胞进行清洗。

消化:使用胰蛋白酶消化法进行消化<sup>[8]</sup>, B16 细胞为贴壁细胞,为使其脱离壁面,需用消化液处理。加入 5 mL 的 Trypsin-EDTA 溶液,在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中处理 3 min。

离心分离:将消化后得到的细胞悬液离心,弃去上清液。

培养:加入 2 mL 新鲜培养基,充分混匀。再加 10 mL 培养基,混匀后将细胞悬液移至 250 mL 组织培养瓶中,于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至细胞铺满瓶底。培养前后及培养过程要对细胞进行显微观察,确认其生长正常。

重复上述操作直至得到足够量的细胞。

1.2.3.4 B16 细胞 24 孔板的制备 主要过程和操作如下:

细胞处理:采用 1.2.3.3 项下的操作方法对细胞进行处理。

细胞计数<sup>[8]</sup>:加入若干新鲜培养液,充分混匀后取 10 μL 加到单细胞计数盘上,在倒立显微镜下数出细胞数,进而计算细胞悬液的细胞浓度。

24 孔板的制备:加入培养液,将细胞悬液稀释为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL。在充分混匀的情况下,用微量移液器分别取 1 mL 细胞悬液加入到 24 孔板的 24 个孔穴中。

培养:在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。

1.2.3.5 B16 细胞的加样培养 24 孔板中的 B16 细

表1 黑木耳甲醇提取物定性实验结果

Table 1 The qualitative results of *Auricularia auricular* methanol extract

斑点号	Rf 值	检测方法	样品现象	对照品现象	结论
1	0.61	薄层 5% 的磷钼酸显示	斑点呈深蓝色	无色斑	萜类
		薄层 10% 硫酸-乙醇显色	斑点呈蓝紫色	无色斑	
2	0.66	薄层 茛三酮显色	斑点呈紫红色	无色斑	氨基酸
		薄层 1,2-萘醌-4-磺酸显色	斑点呈深红色	无色斑	
3	0.69	茴香醛-浓硫酸实验	溶液呈粉红色	无色变	糖类
		$\alpha$ -萘酚-浓硫酸实验 摇匀	溶液呈蓝色	无色变	
4	0.73	1% 三氯化铁乙醇溶液显色	溶液呈黄绿色	无色变	多酚
		铁氰化钾氨溶液显色	溶液呈暗红色	无色变	

表2 黑木耳提取物对黑色素合成的抑制作用实验结果及处理

Table 2 Effect of *Auricularia auricular* extract on melanin biosynthesis and data processing

$A_{405}$	空白组	熊果苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
平均值	0.365	0.191	0.264	0.322	0.344	0.337	0.344	0.355
相对比	100	52.385	72.427	88.182	94.289	92.343	94.206	97.341
标准偏差	0.0127	0.0045	0.0254	0.0096	0.0076	0.0272	0.0329	0.0163
MC 值	99.873	52.380	72.402	88.172	94.281	92.316	94.173	97.325
双尾检验		2.3787E-05	0.003526	0.049343	0.032128	0.189815	0.360801	0.4479352

胞经 24 h 的培养后,弃去培养液,加入 998  $\mu\text{L}$  新鲜培养液和 2  $\mu\text{L}$  的试样、熊果苷溶液或 DMSO。此时试样和熊果苷对照品的最终浓度均一致。B16 细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,48 h 后,更新培养液并加入同样的试样,继续培养 24 h。同时进行 2 盘 24 孔板的加样和培养处理,分别用于对黑色素的抑制作用和 B16 细胞毒性的考察。

**1.2.3.6 B16 黑色素瘤细胞的测定** B16 细胞中黑色素含量的测定:按文献<sup>[9]</sup>所述,加样培养后,除去培养液并用 PBS 清洗一次。在每个孔穴中加入 4% NaOH 溶液 1 mL,对细胞球进行溶解。8~24h 内后用吸收光酶标仪测定  $A_{405}$ ,黑色素含量用相对于空白对照吸光度的百分比表示。经试样处理的细胞黑色素含量百分比越小,说明其对黑色素生合成的抑制作用越强。

细胞生存能力的测定:依据文献<sup>[9]</sup>,采用 MTT 法测定:加样培养后,除去培养液并加入 50  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液,继续培养 4 h;经 4 h 的染色后,除去培养液,加入异丙醇-盐酸溶液 1 mL 对甲瓚进行溶解,4 h 后用吸收光酶标仪测定  $A_{570}$ ;B16 细胞的生存能力用相对于空白对照  $A_{570}$  的百分比表示。经试样处理的细胞的  $A_{570}$  百分比越大,说明试样对细胞的生长增殖影响越小,即对细胞的毒性越小。

平行测定三次每个不同浓度的供试品的  $A_{570}$  及  $A_{405}$ ,求其平均值,实验结果用相对于空白对照的百分比表示,MC 值、CV 值均为相对百分比与标准偏差的差值。利用软件 SPSS16.0 中的“two-tailed t-test”检验对试样测试结果平均值与空白对照平均值的差异显著性进行分析,得到双尾检验的显著性值。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲醇提取物的制备

按 1.2.1 所述方法,制得淡黄色粉状甲醇提取物

12.42 g,收率为 8.28%。

### 2.2 甲醇提取物的定性鉴别结果

按 1.2.2.1 所述方法层析,显示有四种物质;定性检测结果如表 1 所示。

TLC 的显色定性检测结果表明,在展开剂为正丁醇:醋酸:水 = 6:2:2 条件下,黑木耳甲醇提取物中含有萜类、氨基酸、多糖及多酚等具有还原性的物质。

### 2.3 黑色素抑制活性和细胞毒性实验结果

按 1.2.3.6 所述方法,用吸收光酶标仪分别测定了黑木耳的甲醇提取物  $A_{405}$ 、 $A_{570}$  的值,表明了其对 B16 抑制黑色素合成(melanin content, MC)和黑色素瘤细胞生存能力(cell viability, CV)的影响,结果如表 2、表 3 所示。

由表 2 数据统计处理结果显示,不同浓度下的供试品 G 与空白组相比,  $A_{405}$  均低于空白组,这说明黑木耳甲醇提取物具有黑色素抑制作用;且供试品浓度在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对黑色素抑制的能力更佳。其中,在供试品浓度达到 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,MC 值为 72.402 ( $p < 0.01, n = 3$ ),显著低于 MC 值为 99.873 的空白组 ( $p < 0.01, n = 3$ )。从 50~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  起,黑木耳甲醇提取物对黑色素的抑制呈现出良好的量效关系,与空白组相比具有差异显著性 ( $p < 0.05, n = 3$ )。

由表 3 数据统计处理结果显示,黑木耳甲醇提取物对 B16 黑色素瘤细胞有生长抑制作用,且在 6.25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内,随着药物浓度的增加,对细胞生长的抑制作用也随之增加,但最高浓度 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下的 CV 值为 72.285 ( $p < 0.01, n = 3$ ),与阳性对照组熊果苷 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CV 值(80.043)相差不多。12.5~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,黑木耳甲醇提取物对 B16 黑色素瘤细胞的生存能力呈现出良好的量效关系,与



表3 黑木耳提取物对单位 B16 黑色素瘤细胞生存能力的影响实验结果及处理

Table 3 Effect of *Auricularia auricular* extract on B16 melanin cell viability and data processing

A <sub>570</sub>	空白组	熊果苷 100 μg/mL	200 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL	6.25 μg/mL
平均值	0.552	0.416	0.376	0.396	0.418	0.419	0.544	0.499
相对比	100	80.051	72.338	76.208	80.421	80.5535	104.662	96.066
标准偏差	0.0352	0.0080	0.0528	0.0105	0.0146	0.0199	0.034	0.0204
CV 值	99.965	80.043	72.285	76.198	80.406	80.534	104.628	96.046
双尾检验		0.002824	0.008615	0.001801	0.003677	0.0046887	0.7744719	0.087191

空白组相比具有差异显著性( $p < 0.01, n = 3$ )。

### 3 讨论

根据已有文献报道<sup>[10]</sup>,多酚抑制黑色素的机制有:多酚对酪氨酸酶具有抑制作用,酪氨酸酶对黑色素细胞代谢过程起催化的作用,使黑色素分泌增加;多酚具有与维生素类似的抗氧化效果,黑色素的邻苯二醌结构在强还原剂作用下很易还原成酚型结构,使色素褪色;多酚作为氢供体对自由基的清除能力与常用抗氧化剂 V<sub>c</sub>、V<sub>s</sub> 相当,自由基清除剂可通过清除皮肤细胞中的活性氧,来减少 MDA 的生成,美白皮肤,抑制衰老。

本研究表明,黑木耳甲醇提取物在浓度较高时,具有良好的抑制黑色素细胞形成活性,且毒性较低。这可能是由于黑木耳甲醇提取物含有多酚、萜类、多糖,或其组合。具体是何种成分发挥主导作用,及其抑制黑色素的明确机理,还需要更进一步的探讨。

### 4 结论

黑木耳的甲醇提取物含有多酚、萜类、多糖和氨基酸 4 种化学成分;这些成分是黑木耳抑制黑色素细胞形成的物质基础。从已有的研究结果可知,可抑制黑色素的化学成分多为有还原性的极性化合物或其组合。多酚物质广泛存在于植物界,具有强还

原性,是一种很有潜力的天然护肤成分。

### 参考文献

- [1] 贾爱群,孙洋,王建新,等.美白剂的发展现状及其黑色素抑制机理的研究进展[J].日用化学工业,2001,2(1):41-44.
- [2] 李时珍.本草纲目[M].北京:朝华出版社,2005:293.
- [3] 陈凤莲,杨春瑜,刘科伟.木耳粉的保健功能及在面包中的应用[J].食品工业科技,2006(6):84-86,206.
- [4] 朱心红,沈群,高天明,等.中药成分组合效应假说及实验研究[J].中草药,2004,35(2):122-125.
- [5] 杜冠华.中药复方有效成分组学研究[J].中成药,2002,24(11):878-880.
- [6] 邱峰,天然药物化学[M].北京:清华大学出版社,2013:90,130,165,190,237,448.
- [7] 刘雅静,袁廷强,刘秀河,等.黑木耳营养保健研究进展[J].中国食物与营养,2010,10:66-69.
- [8] 鄂征,组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1994,12,82-91.
- [9] Arung ET, Yoshikawa K, Shimizu K, et al. The effect of chlorophorin and its derivative on melanin biosynthesis. [J]. *Holzforchung* 2005, 59:514-518.
- [10] 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.

(上接第 110 页)

血小板聚集性的药理作用观察[J].首都医学院学报,1994,15(4):291-294.

[11] Iannucci N, Camperi S, Cascone O. Purification of lumbrokinase from *Eisenia fetida* using aqueous two-phase systems and anion-exchange chromatography[J]. *Separation and purification technology*, 2008, 64(1):131-134.

[12] 王雪英,伍晓斌,徐凤彩.蚯蚓纤溶酶的分离纯化及其部分酶学性质的研究[J].药物生物技术,2003,10(2):88-91.

[13] 李莉,刘艳玲,吴红艳,等.蚯蚓纤溶酶分离及部分生化性质的研究[J].中医药理学,2001,19(3):283-284.

[14] 赵晓瑜,侯艳,高珊,等.蚯蚓纤溶酶组分的抗原性分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(2):147-153.

[15] Sharma A, Sonah H, Deshmukh R K, et al. Cloning of fibrinolytic protease - 0 (Efp - 0) gene from diverse earthworm

individuals[J]. *Indian journal of biotechnology*, 2011, 10(3):270-273.

[16] Li D, Tong W, Yang Y. Functional expression of an earthworm fibrinolytic enzyme in *Escherichia coli* [J]. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2008, 24(5):613-618.

[17] Dong G Q, Yuan X L, Shan Y J, et al. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic enzyme - 3 from earthworm *Eisenia foetida* [J]. *Acta biochimica et biophysica sinica*, 2004, 36(4):303-308.

[18] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1952, 40(2):346-351.

[19] 李菁华,赵伟.蚯蚓纤溶酶的分离纯化研究[J].中国生化药物杂志,2005,26(5):288-291.