

石榴皮多酚抑制酪氨酸酶机制及黑色素生成活性

左云会¹, 潘翠萍², 朱永清², 温靖¹, 邹波¹, 徐玉娟¹, 余元善¹, 胡腾根^{1*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室广东广州 510610) (2. 四川省农业科学院园艺研究所, 四川成都 610066)

摘要: 石榴皮作为富含多酚的加工副产物, 具有极高的天然美白与抗褐变潜力, 但其核心大分子成分理化稳定性差及跨膜吸收率低, 严重制约了其高值化应用。本研究首先通过定向纯化策略获得了安石榴苷高度富集物(主成分含量高达 826.28 mg g⁻¹)。酶动力学与分子对接深度解析表明, 该纯化多酚对酪氨酸酶表现出高效的混合型抑制作用: 其庞大的多酚骨架不仅能通过强空间位阻封锁酶活性口袋入口并诱导酶构象松散, 还能通过有效整合微环境游离铜离子及淬灭多巴醌中间体, 发挥双重协同抑制效能。为突破多酚的吸收屏障, 本研究构建了负载多酚的双层乳液, 细胞学证实该递送体系有效提升了生物利用度, 在 0.9 μg·mL⁻¹ 的安全干预剂量下, 促使 B16 黑色素瘤细胞内酪氨酸酶活性及黑色素含量分别大幅降至 69.79% 和 64.24%, 其降黑素功效显著优于游离多酚及阳性对照曲酸 ($P<0.05$)。本研究不仅系统揭示了石榴大分子多酚抑制黑色素合成的多维靶向机制, 更为天然活性物新型递送体系在功能性化妆品中的应用提供了坚实的理论与数据支撑。

关键词: 石榴皮多酚; 安石榴苷; 酪氨酸酶; 双层乳液; 混合型抑制剂; B16 黑色素瘤细胞

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.6.0759

The Mechanism by Which Pomegranate Peel Polyphenols Inhibit Tyrosinase and Their Effectiveness in Inhibiting Melanin Production

ZUO Yunhui¹, PAN Cuiping², ZHU Yongqing², WEN Jing¹, ZOU Bo¹, XU Yujuan¹, YU Yuanshan¹, HU Tenggen^{1*}

(1. Sericulture and Agricultural Products Processing Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Agricultural Products Processing of Guangdong Province, Guangzhou 510610, China) (2. Institute of Horticulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: As a processing byproduct rich in polyphenols, pomegranate peel possesses significant natural skin-lightening and anti-browning potential; however, the poor physicochemical stability and low trans-membrane absorption rate of its core macromolecular components severely limit its high-value applications. In this study, a directed purification strategy was first employed to obtain a highly enriched fraction of anachardins (with a main component concentration as high as 826.28 mg g⁻¹). In-depth analysis via enzyme kinetics and molecular docking revealed that this purified polyphenol exhibits highly efficient mixed-type inhibition of tyrosinase: its bulky polyphenolic skeleton not only blocks the entrance to the enzyme's active site through strong steric hindrance and induces a relaxed enzyme conformation, but also exerts a dual synergistic inhibitory effect by effectively chelating free copper ions in the microenvironment and quenching the dopaquinone intermediate. To overcome the absorption barrier of polyphenols, this study developed a polyphenol-loaded bilayer emulsion. Cytological analysis confirmed that this delivery system effectively enhanced bioavailability; at a safe therapeutic dose of 0.9 μg·mL⁻¹, it significantly reduced tyrosinase activity and melanin content in B16 melanoma cells to 69.79% and 64.24%, respectively, with its melanin-reducing efficacy significantly outperforming that of free polyphenols and the positive control, kojic acid ($P<0.05$). This study not only systematically elucidates the multidimensional, targeted mechanisms by which pomegranate macromolecular polyphenols inhibit melanin synthesis but also provides robust theoretical and empirical support for the application of novel delivery systems for natural bioactive compounds in functional cosmetics.

Keywords: pomegranate peel polyphenols; punicalagin; tyrosinase; double emulsion; mixed-type inhibitor; B16 melanoma cells

收稿日期: 2026-05-18; 修回日期: 2026-07-01; 接受日期: 2026-07-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1600800); 广东省农业科学院现代种业创新能力提升工程; 广东省科学技术协会青年科技人才培养计划(SKXRC2025476)

作者简介: 左云会(2000-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1198177784@qq.com

通讯作者: 胡腾根(1989-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: hu.tenggen@foxmail.com

石榴 (*Punica granatum* L.) 不仅营养价值高, 且具备良好的保健与医用功效。在石榴加工过程中产生的石榴皮废料占比较大, 除少部分药用外大多未被开发利用, 造成极大的资源浪费。研究表明, 石榴皮中富含多酚、黄酮等活性成分^[1], 相比果肉与种子, 石榴果皮中的多酚含量尤为丰富, 部分品种提取量可高达 523.05 mg g⁻¹^[2]。因此, 高效提取并应用石榴皮多酚, 对促进石榴副产物的高值化利用具有重要意义。

人体皮肤色素沉着主要由黑色素的过量合成引起, 极易导致老年斑并影响正常肤色^[3]。酪氨酸酶是黑色素生物合成的关键限速酶, 抑制其活性是减少黑色素生成、实现美白的核心机制^[4]。传统美白化妆品多通过添加曲酸、熊果苷等化学合成美白剂来实现, 但往往伴随一定的毒副作用。因此, 开发安全、高效的天然植物源美白剂已成为行业的主要研究趋势^[5]。近年来研究证实, 植物多酚具备优异的抗氧化及抑制酪氨酸酶作用^[6]; 例如草莓多酚^[7]和猕猴桃皮多酚^[8]均对酪氨酸酶表现出显著的抑制率, 在生化水平上展现出极佳的美白潜力。

石榴皮多酚以水解单宁为主^[9], 富含以安石榴苷和鞣花酸等为代表的多酚类物质, 其结构中极易被氧化的邻位酚羟基不仅赋予其极强的抗氧化性, 更在抑制黑色素生成方面展现出优异功效。近年来, 国内外多项研究表明, 石榴皮多酚具有卓越的抗氧化和抑制酪氨酸酶活性的潜力, 是极具开发前景的天然抗褐变与美白活性物^[10,11]。Yoshimura 等^[12]研究表明石榴皮中的酚类物质在体外对酪氨酸酶表现出抑制作用, 并在体内对紫外线诱导的褐豚鼠皮肤色素沉着具有美白作用。Mayuree 等^[13]通过志愿者参与的石榴皮多酚面膜及精华评估实验证明富含酚类的石榴皮提取物是一种安全的草本衍生材料, 有望促进皮肤色素沉着治疗。然而, 纵观当前关于石榴皮多酚降黑素活性的研究, 仍存在明显的局限性, 严重制约了其进一步的应用。现有研究大多仅停留在体外酶促反应的表象水平, 关于其核心活性大分子 (如安石榴苷) 与酪氨酸酶活性中心在分子与空间构象层面的靶向结合机制仍未被系统阐明。其次, 多酚类物质结构中含有丰富的游离羟基, 极易在光、热及氧气作用下发生氧化降解; 且大分子多酚的水脂分配系数不佳, 导致其在细胞水平上的穿透能力和生物利用度较低^[14]。因此, 亟需寻找一种能够克服大分子多酚理化局限性的策略, 并深入剖析其作用的微观机制。脂质递送体系 (如乳液) 能够为多酚提供物理隔离屏障, 显著提升其理化稳定性, 同时改善细胞对活性物质的摄取效率。

基于此, 本研究拟对石榴皮多酚进行提取纯化, 系统评价其对酪氨酸酶的抑制活性与作用机制, 并基于前期已成功表征的高稳定乳液体系^[15]构建多酚双层乳液递送体系以评估其在细胞水平的抑制黑色素合成的功效。旨在提升石榴加工废料的高值化利用水平, 并为天然安全美白化妆品的开发提供理论依据与实践参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

AB-8 大孔树脂、LX-17 大孔树脂、D101 大孔树脂、X-5 大孔树脂、LX-28 大孔树脂; 安石榴苷、没食子酸、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、芦丁、鞣花酸标准品 (HPLC $\geq$ 98%)、酪氨酸酶 ($\geq$ 1 000 U/mg)、L-多巴 ($\geq$ 99%), 上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清、青链霉素、胰酶, 美国 Gibco 公司; CCK-8 细胞活性检测试剂盒, 日本东仁化学科技有限公司; α -促黑素细胞激素 (α -Melanocyte-Stimulating Hormone, α -MSH)、左旋多巴, Sigma 公司。B16 小鼠黑色素瘤细胞, 北纳生物细胞库。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本岛津有限公司; T25 digital ULTRA-TURRAX®均质机, 艾卡 (广州) 仪器设备有限公司; SW-CJ-1F 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 3111 二氧化碳恒温培养箱, 赛默飞世尔科技有限公司; Infinite M200pro 多功能微孔板酶标仪, 奥地利 TECAN 公司。

1.3 方法

1.3.1 石榴皮多酚的提取

新鲜石榴采自四川省会理市, 处于果实完全成熟期, 品种为突尼斯软籽石榴。新鲜石榴剥去可食部分后, 收集石榴果皮, 经纯水洗净、表面吸干并切碎。随后, 将石榴皮置于 50 °C 下恒温干燥至恒重 (水分含量 $<$ 8%), 粉碎后过 80 目筛。精确称取 10 g 石榴皮粉末于 500 mL 锥形瓶中, 加入 250 mL 70% (V/V) 甲醇混匀, 320 W 超声提取 30 min 后, 10 000 r min⁻¹ (相对离心力为 11 091 $\times$ g) 离心 4 min, 去除残渣, 收集上层清液, 即为石榴皮多

酚粗提液。按上述工艺条件完成提取后,将提取液离心并经过滤纸过滤,收集上清液。随后使用旋转蒸发仪在 35 ℃ 下减压浓缩,最终得到体积约为 50 mL、外观呈深褐色的黏稠状石榴皮多酚粗提液。经福林酚 (Folin-Ciocalteu) 比色法测定,该粗提液的总多酚含量为 23.52 mg GAE/mL。此粗提液随后被置于 4 ℃ 下避光保存,用于后续实验。

1.3.2 石榴皮多酚的纯化

1.3.2.1 筛选大孔树脂

参照王华斌^[16]的方法,略作修改。分别准确称取 5 种经过预处理的树脂各 2 g 于 100 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 多酚粗提液,在摇床中以 25 ℃, 160 r min⁻¹ 的条件振荡吸附 24 h,树脂吸附前溶液中的总多酚浓度,记为 C_0 。待大孔树脂吸附饱和后,滤出滤液,测定滤液中的总多酚浓度,记为 C_e 。用去离子水清洗树脂表面至无提取液残留后,用滤纸吸干树脂表面,将清洗后的树脂转移至 100 mL 锥形瓶中,再加入 50 mL 70 % (V/V) 乙醇作为洗脱液,在摇床中以 30 ℃, 160 r min⁻¹ 的条件振荡解吸 24 h,测量树脂解吸后上清液中多酚浓度,记为 C_d 。按下列公式(1-4) 计算不同树脂的吸附率、吸附量、解吸率和解吸量。

$$Y = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{M} \quad (2)$$

$$D = \frac{C_d}{C_0 - C_e} \times 100\% \quad (3)$$

$$Q_d = \frac{V_d \times C_d}{M} \quad (4)$$

式中:

Y ——吸附率;

Q_e ——吸附量;

D ——解吸率;

Q_d ——解吸量;

C_0 ——石榴皮多酚样品溶液的初始浓度 (mg mL⁻¹);

C_e ——树脂吸附后溶液中石榴皮多酚的浓度 (mg mL⁻¹);

V ——石榴皮多酚的体积 (mL);

M ——树脂的质量 (g);

C_d ——解析液中石榴皮多酚的浓度 (mg mL⁻¹);

V_d ——解析液的体积 (mL)。

1.3.2.2 纯化石榴皮多酚

取 10 g LX-17 大孔树脂树脂,湿法装柱,将提取液配制成浓度为 1.226 mg mL⁻¹ 的上样液进行上样,并控制上样流速分别为 0.9 mL min⁻¹,当流出液浓度与上样液浓度接近时,停止进样。分管收集流出液,每 10 mL 收集 1 管,分别计算各管中石榴皮多酚的浓度。以流出液体积为横坐标,流出液中的总多酚浓度为纵坐标,绘制多酚解吸曲线。吸附完成后,用蒸馏水洗去附着于树脂表面的多酚及杂质。然后用 50 mL 无水甲醇以 0.9 mL min⁻¹ 速度进行洗脱,分管收集流出液,分别测洗脱液中多酚的浓度。最后将收集到的洗脱液进行旋转蒸发浓缩后,冷冻干燥称重,并置于 -20 ℃ 下避光保存备用。按照公式 (5) 计算石榴皮多酚的纯度。

$$P = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

P ——纯度;

m_1 ——洗脱液中多酚的质量, mg;

m_2 ——洗脱液干燥后多酚的质量, mg。

1.3.3 石榴皮多酚的物质鉴定

样品经 0.45 μm 滤膜过滤。流动相: A 0.1% (V/V) 甲酸 B 乙腈; 流速: 0.5 mL min^{-1} , 进样 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。洗脱程序: 0~24 min 10%~26% B; 24~28 min 26%~10% B; 28~40 min 10% B。以峰面积为纵坐标, 摩尔浓度为横坐标, 分别制作标准曲线, 求得回归方程, 计算样品中各个单体酚的含量。0.15~0.80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 没食子酸回归方程为 $y=88\ 847x+157\ 526$, $R^2=0.99$; 0.01~0.06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 安石榴苷回归方程为 $y=22\ 423\ 843.83x+170\ 792.50$, $R^2=0.99$; 0.07~0.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸回归方程为 $y=22\ 270\ 072.12x+244\ 041.10$, $R^2=0.99$; 0.08~0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素回归方程为 $y=6\ 246\ 758.26x+74\ 877.50$, $R^2=0.99$; 0.10~0.70 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡酸回归方程为 $y=24\ 499\ 372.52x-109\ 566.90$, $R^2=1.00$; 0.08~0.43 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表儿茶素回归方程为 $y=8\ 598\ 734.54x-7\ 515.00$, $R^2=1.00$; 0.04~0.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁回归方程为 $y=17\ 572\ 092.69x+21\ 486.50$, $R^2=1.00$; 0.20~1.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内鞣花酸回归方程为 $y=13\ 170\ 655.21x-885\ 528.46$, $R^2=0.99$ 。

1.3.4 石榴皮多酚对酪氨酸酶活抑制机制研究

1.3.4.1 石榴皮多酚对酪氨酸酶的抑制能力

将样品用 PBS 缓冲液溶解并稀释成不同浓度。阳性对照选用曲酸。设置溶剂本底孔 (T_a)、溶剂反应孔 (T_b)、样品本底孔 (T_c)、样品反应孔 (T_d)。参照表 1 试剂添加量, 在 96 孔板各孔依次加入 2 mg mL^{-1} L-多巴溶液、样品溶液/溶剂、PBS 缓冲液, 充分混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温环境下孵育 10 min 后加入 20 μL 的酪氨酸酶溶液 (500 U mL^{-1}), 37 $^{\circ}\text{C}$ 混匀反应 15 min 后即刻测定 475 nm 处吸光度。并按照公式 (6) 计算酪氨酸酶活性抑制率和半数抑制浓度 IC_{50} 。

$$Y = (1 - \frac{A_d - A_c}{A_b - A_a}) \times 100\%$$

(6)

式中:

Y ——酪氨酸酶活性抑制率;

A_d ——样品反应孔吸光度;

A_c ——样品本底孔吸光度;

A_b ——溶剂反应孔吸光度平均值;

A_a ——溶剂本底孔吸光度平均值。

表 1 酪氨酸酶活性抑制试验的加样表

Table 1 Dosing Table for Tyrosinase Inhibition Assay (μL)

试剂	T_a	T_b	T_c	T_d
L-多巴溶液	0	40	0	40
样品溶液	0	0	40	40
溶剂 (PBS 缓冲液)	40	40	0	0
PBS 缓冲液	70	30	70	30
酪氨酸酶溶液	20	20	20	20
总计	130	130	130	130

1.3.4.2 石榴皮多酚对酪氨酸酶抑制动力学分析

在上述测活体系中, 底物浓度不变, 改变反应体系中酪氨酸酶浓度, 测定产物形成量 $\text{OD}_{475\text{ nm}}$ 随时间的增长过程, 测定不同浓度石榴皮多酚对酪氨酸酶催化初速度的影响, 以酶反应的初速度对酶浓度作图。分子消光系数 $\varepsilon=3\ 700\ (\text{mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1})$ 。

在测活体系中, 酶浓度不变, 加入不同浓度的石榴皮多酚及底物, 监测 $\text{OD}_{475\text{ nm}}$ 的增长过程。绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图, 判断石榴皮多酚对酪氨酸酶的抑制类型。

1.3.4.3 酪氨酸酶的荧光光谱变化

向 200 μL 0.24 mg mL^{-1} 酪氨酸酶中分别加入 100 μL 不同浓度石榴皮多酚, 振荡混匀后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min。在 280 nm 下激发荧光, 扫描发射波长 280~420 nm。

1.3.4.4 石榴皮多酚对高碘酸钠氧化多巴光谱的影响

在 100 μL 10 mmol L^{-1} L-多巴中加入 100 μL 1.8 mmol L^{-1} NaIO_4 , 再加入 50 μL 不同浓度的石榴皮多酚, 实时跟踪不同浓度石榴皮多酚对 L-多巴的氧化产物在 240~800 nm 光谱范围内吸收光谱的变化。

1.3.4.5 石榴皮多酚与铜离子的相互作用

参照吴悦^[17]的方法, 制备 0.2 mol L^{-1} 的 HAc-NaAc 缓冲液 (pH 值=3.8)。利用该缓冲液分别溶解并配制浓度为 1 mmol L^{-1} 的 CuCl_2 溶液以及紫脲酸铵溶液。将 50 μL 的 CuCl_2 溶液与 50 μL 的缓冲液混合后充分振荡, 随后加入 100 μL 紫脲酸铵溶液, 在波长 480 nm 与 540 nm 处测定溶液的吸光度。在构建标准曲线时, 以 $\text{OD}_{480\text{ nm}}/\text{OD}_{540\text{ nm}}$ 的比值作为纵轴, 以铜离子浓度作为横轴。

将样品与 0.4 mmol L^{-1} 的 CuCl_2 溶液按等体积混合, 混合后在室温条件下孵育 1 h。取 50 μL 的反应液与 50 μL 缓冲液进行混合, 参照标曲方法进行反应, 测定吸光度, 并依据公式 (7) 计算出 Cu^{2+} 螯合率。

$$Z = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

Z—— Cu^{2+} 螯合率;

C_0 ——体系中含有的总铜离子浓度;

C_1 ——反应后未结合铜离子浓度。

1.3.4.6 分子对接模拟计算

采用 AutoDock Vina 软件进行安石榴苷与酪氨酸酶的分子对接。从 PDB 数据库下载酪氨酸酶的三维结构 (PDB ID: 2Y9X), 利用 PyMOL 软件剔除水分子及原配体。通过 AutoDock Tools 对受体蛋白及配体安石榴苷进行添加极性氢、计算 Gasteiger 电荷等标准预处理, 并统一转化为 PDBQT 格式。对接网格盒子的中心坐标设定为 (X: -5.04, Y: -0.754, Z: -96.432), 尺寸为 87.85×87.85×87.85。对接完成后, 选取结合能最低的最佳对接构象, 进行受体-配体 3D 结合模式的可视化, 以及 2D 氨基酸残基相互作用 (如氢键网络和疏水作用) 的详细分析。

1.3.5 W/O/W 乳液制备

在室温环境下称取 5% (m/V) Span80 加入到葵花油中, 搅拌均匀, 随后加入纯化后的 0.7 mg mL^{-1} 多酚溶液 (含 5 mmol L^{-1} NaCl) 使得油相和内水相比例为 9:1, 在 10 000 r min^{-1} 下均质 2 min, 制备 W/O 乳液。外水相中 1 wt.% 乳清蛋白:1 wt.% 低酯果胶=2:1 (V/V), 最后将外水相和 W/O 乳液按照 6:4 (V/V) 混合 7 000 r min^{-1} 下均质 2 min 即得多酚乳液。测得乳液粒径 220.54 nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.4, 多酚乳液对多酚的包封率达到 87.36%, 此外, 前期的稳定性测试^[15]证实该乳液在和 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存 7 天后, 仍能保持良好的粒径分布, 未出现分层或破乳现象, 表明其具有极高的物理稳定性。

1.3.6 B16 石榴皮多酚对黑色素瘤细胞黑色素含量的影响

1.3.6.1 细胞培养

将 B16 黑色素瘤细胞接种在 25 cm^2 培养瓶中, 培养基为含 10% (V/V) 胎牛血清和 1% (V/V) 双抗溶液的 RPMI1640。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 每天固定时间换液。当细胞生长融合度达 80% 以上后, 进行传代。

1.3.6.2 B16 黑色素瘤细胞增殖率测定

选择对数生长期的细胞, 用 0.25% (V/V) 胰酶消化, 调整细胞悬浮液浓度为 5×10^4 个/mL, 每孔 100 μL 细胞悬浮液接种于 96 孔培养板, 置于培养箱内培养 24 h 后, 吸出旧培养基, 加入含不同浓度样品的培养基, 每个浓度设置 6 个复孔, 以不加样品的培养基为空白对照^[18]。培养 24 h 后, 吸出旧培养基, 用 PBS 洗两次, 加入含 10% (V/V) CCK-8 的培养基, 放入培养箱内反应 4 h 后, 小心吸出液体到新的 96 孔板中用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 按公式 (8) 计算各样品的细胞增殖率。

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100\% \quad (8)$$

式中:

Y ——细胞增殖率;

A_1 ——含有细胞、cck-8 溶液和药物浓度的孔的吸光度;

A_2 ——含有 CCK-8 溶液, 没有细胞, 也不含样品的孔的吸光度;

A_3 ——含有细胞、CCK-8 溶液而没有样品的孔的吸光度。

1.3.6.3 B16 黑色素瘤细胞内酪氨酸酶抑制率测定

取 B16 细胞以 5×10^4 个/孔的量接种于 12 孔板培养板, 用终浓度为 400 nmol L^{-1} 的 α -MSH 预处理, 24 h 后按分组加入不同药液, 培养 48 h 后, 用 PBS 洗涤, 细胞溶解在 50 mmol L^{-1} $100 \mu\text{L}$ 包含 1% (V/V) Triton x-100 (σ) 的缓冲液 (pH 值=6.8) 中, 然后在 -80°C 冻结 30 min。在室温下解冻后, 细胞提取物在 $15\,000 \text{ r min}^{-1}$ (相对离心力为 $21\,890 \times g$) 离心 5 min。取 $80 \mu\text{L}$ 上清液和 $20 \mu\text{L}$ L-多巴 (2 mg mL^{-1}) 置于 96 孔板中, 在 37°C 下孵育 2 h, 读取 490 nm 吸光度。按照公式 (9) 计算酪氨酸酶激活率。

$$Y = \frac{OD_1}{OD_{\alpha\text{-MSH}}} \times 100\% \quad (9)$$

式中:

Y ——酪氨酸酶激活率;

OD_1 ——样品组的吸光值;

$OD_{\alpha\text{-MSH}}$ ——模型组的吸光值。

1.3.6.4 B16 黑色素瘤细胞黑色素生成量测定

取 B16 细胞, 以 5×10^4 个/孔的量接种于 12 孔板培养板, α -MSH 干预 24 h 后加入不同药液。培养 72 h 后, 用 PBS 清洗 1 次, 加入 0.25% (V/V) 胰蛋白酶消化细胞并收集到 1.5 mL 离心管中, $10\,000 \text{ r min}^{-1}$ (相对离心力为 $9\,729 \times g$) 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 含 10% (V/V) DMSO 的 1 mol L^{-1} NaOH 溶液, 将离心管用封口膜封口后于 80°C 水浴中加热 30 min, 于 405 nm 处测各孔吸光度值。按照公式 (10) 计算相对黑色素含量。

$$C = \frac{OD_1}{OD_{\alpha\text{-MSH}}} \times 100\% \quad (10)$$

式中:

C ——相对黑色素含量;

OD_1 ——样品组的吸光值;

$OD_{\alpha\text{-MSH}}$ ——模型组的吸光值。

1.3.7 数据统计与分析

实验数据采用软件 Graphpad Prism 9.5 作图并分析计算, 采用 SPSS 26 进行方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著。所有数据均为平行测定 3 次的结果。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂法纯化石榴皮多酚

如图 1a 所示, 不同树脂对多酚的吸附量在 $1.26 \sim 2.97 \text{ mg g}^{-1}$, 其中 AB-8 大孔树脂对石榴皮多酚的吸附能力最强, LX-28 与 LX-17 吸附能力不相上下, X-5 对石榴皮多酚的吸附能力最弱。解吸能力方面 LX-17 大孔树脂则表现出优越的解吸能力, 达到 0.85 mg g^{-1} , 而 AB-8 大孔树脂的解吸量仅有 0.43 mg g^{-1} , 仅为 LX-17 洗脱能力的 50.59%。因此选择 LX-17 大孔树脂对石榴皮多酚进行纯化。通过单因素实验优化吸附与解吸的参数, 其结果如图 1b、c 所示。首先保持进样浓度与体积恒定不变进行吸附, 采用不同体积分数的解吸溶剂解吸, 随着体积分数的增加, 其解吸量逐渐增加, 当体积分数为 100% 时, 其解吸量为 1.14 mg g^{-1} , 与吸附量 1.17 mg g^{-1} 接近, 解析率达到 97.44%。接着改变进样浓度, 采用无水甲醇进行解吸, 随着进样浓度的逐渐增加, 大孔树脂对石榴皮多酚的吸附量和解吸量均逐渐增加, 然而解吸率则呈现低浓度时在 20% 上下波动, 浓度增大到 1.226 mg mL^{-1} 时解吸率突增至 75.36%, 接着增加浓度则出现解吸率下降的趋势。综上, 本研究选取的纯化参数为提取液上样浓度为 1.226 mg mL^{-1} , pH

值为 3，上样流速为 0.9 mL min⁻¹，洗脱剂选用无水甲醇，洗脱流速为 0.9 mL min⁻¹。在此参数下进行吸附并解吸，对洗脱液进行分管收集，测定多酚浓度并绘制洗脱曲线。结果如图 1d 所示。从图中可以看出石榴皮多酚主要在 60~90 min 时间段被富集。收集并合并此部分的多酚即为纯化后的石榴皮多酚，其纯度为 66.62%，相比未纯化的多酚（22.15%），纯度上升了 200.77%。

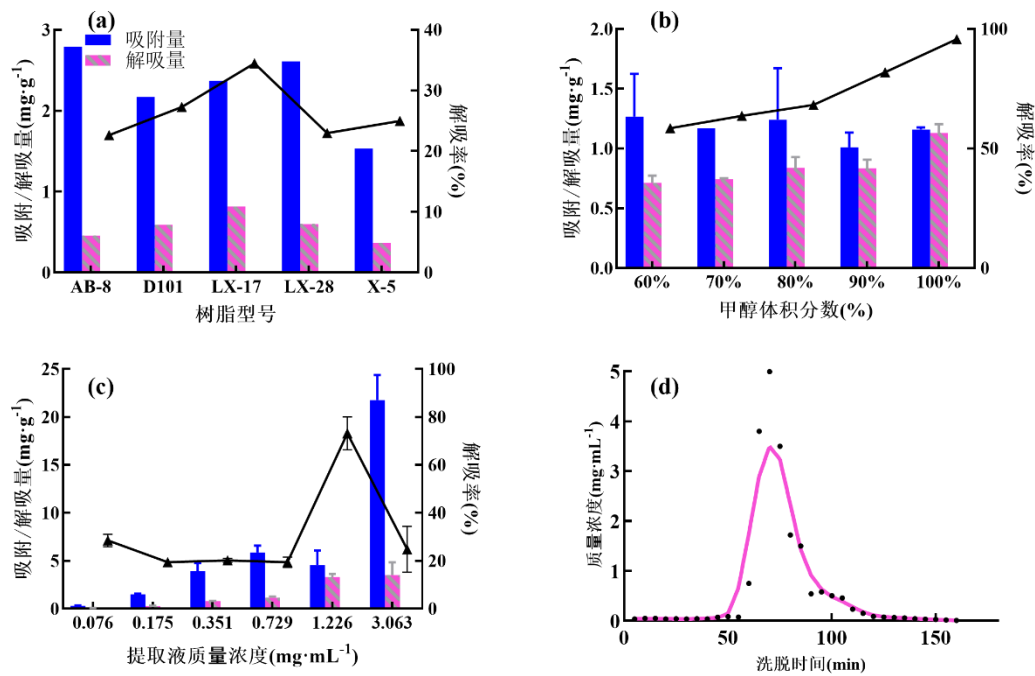


图 1 大孔树脂纯化石榴皮多酚结果

Fig.1 Results of the Purification of Pomegranate Peel Polyphenols Using Macroporous Resin

2.2 石榴皮纯化多酚单体鉴定

将收集到的产物进行 HPLC 分析鉴定，结果如图 2 所示。石榴皮多酚中单体物质含量从多到少依次为安石榴苷、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、芦丁、鞣花酸、没食子酸、咖啡酸。有研究发现石榴中含有大量的多酚类成分，且在多酚类成分中，安石榴苷的含量较高，占其干重的 10%左右^[19]。范高福等^[20]采用 RP-HPLC 法同时检测石榴皮 3 种多酚类提取物的含量，结果表明不同品种的石榴皮中，安石榴苷的含量都远高于其他多酚，是石榴皮多酚中的核心物质。纯化前安石榴苷含量为 386.49 mg g⁻¹，纯化后含量达到 826.28 mg g⁻¹，其纯度提升了 2.14 倍。

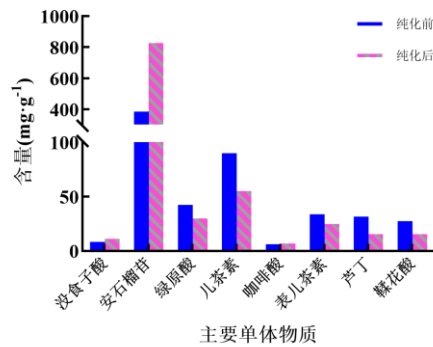


图 2 石榴皮多酚纯化物中单体物质含量

Fig.2 Monomer content in purified pomegranate peel polyphenols

2.3 石榴皮纯化多酚对酪氨酸酶抑制作用

如图3所示,石榴皮多酚对酪氨酸酶展现出极其显著的剂量依赖型抑制效应。随着多酚质量浓度的增加,其对酶活性的抑制率呈现出先急剧上升,后趋于平缓的非线性增长动力学特征。经拟合计算,多酚粗提液对酪氨酸酶的半数抑制浓度(IC_{50})为 0.64 mg mL^{-1} ;而纯化多酚的 IC_{50} 值显著降低至 0.35 mg mL^{-1} 。这一数据表明,纯化工艺使石榴皮多酚对酪氨酸酶的抑制能力提升了近一倍。Vc具有极低的 IC_{50} 值(0.08 mg mL^{-1}),但其分子结构极不稳定,极易在光热或水相环境中发生氧化降解而彻底失活。尽管纯化多酚的绝对 IC_{50} 值高于纯化合物Vc,但相较之下,纯化石榴皮多酚具备更加稳定的多环芳香结构,这种天然多组分体系在复杂生理环境中的持久性与抑制黑色素合成的能力,是单一纯化学物质难以比拟的^[21]。因此纯化石榴皮多酚作为一种复杂的天然植物提取物,在抑制黑色素合成方面具有应用前景。

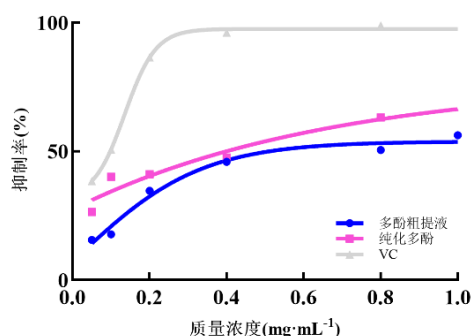


图3 石榴皮多酚对酪氨酸酶抑制率

Fig.3 Inhibition rate of tyrosinase by pomegranate peel polyphenols

2.4 石榴皮纯化多酚对酪氨酸酶抑制的可逆性分析

为明确纯化多酚对酪氨酸酶的抑制类型,探究了高($2IC_{50}$)中(IC_{50})低($1/2IC_{50}$)三个剂量组的纯化多酚以及主要单体安石榴苷对酪氨酸酶的抑制能力。如图4所示不同抑制剂浓度下,反应初速率与酶浓度的拟合直线均交于原点,表明两者均未引起酶不可逆失活,同属于可逆抑制。许多天然活性成分都是通过可逆抑制作用抑制酪氨酸酶的活性,比如苹果多酚^[22]、铜藻多酚^[23]、枇杷花纯化物^[24]等。

进一步分析表征酶表现活性的直线斜率发现显著差异:安石榴苷组斜率随浓度增加持续减小(图4b),呈典型剂量依赖性;而纯化多酚组斜率却呈先减小后增大的趋势(图4a)。该高浓度抑制反转现象并非安石榴苷单体特性所致,而源于混合物体系复杂的基质效应。低浓度时分子呈游离态高效抑酶;但浓度升高超过临界值后,多酚组分通过疏水作用或 $\pi-\pi$ 堆积发生共聚集形成微胶束,将核心活性成分包裹,导致游离的有效单体浓度不升反降^[25,26]。Yu等^[27]研究表明复杂多酚混合物在抑制酶时,物理化学因素包括 $\pi-\pi$ 堆积、自缔合或瞬态聚集等,会降低体系中游离抑制剂的有效浓度,从而导致抑制效果的拮抗或反转。另一方面组分间会发生竞争排挤。低浓度下安石榴苷等强效成分优先结合;高浓度下,原本弱亲和力、低活性的次要伴随物绝对量剧增,通过空间位阻或位点竞争,将强效抑制剂从酶口袋中排挤,最终导致混合物整体抑酶效能出现衰减^[28]。

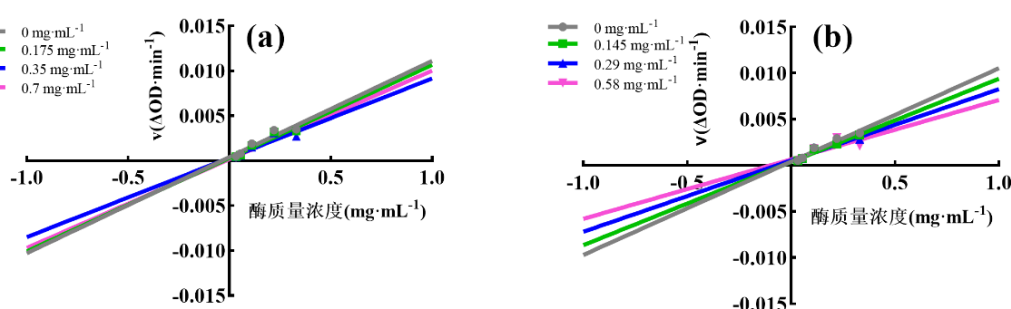


图4 纯化多酚与安石榴苷对酪氨酸酶抑制作用的可逆性分析

Fig.4 Determination of the reversible inhibition of tyrosinase by purified polyphenols and punicalagin

2.5 石榴皮多酚对酪氨酸酶抑制类型分析

由图 5a 可知,随纯化多酚浓度增加,拟合直线交于第二象限,表明其对游离酶的亲和力大于酶-底物复合物,呈现以竞争性为主的混合型抑制机制,经过计算其表观抑制常数 (K_i) 为 0.16 mg mL^{-1} 。相比之下,单体安石榴苷的直线交于 Y 轴附近 (图 5c),即仅增大米氏常数 (K_m) 而不改变最大反应速率 ($V_{\max}$),属于竞争性抑制, K_i 为 0.87 mg mL^{-1} (图 5d)。这是因为安石榴苷富含没食子酰基,它能精准整合酶口袋深处的双核铜离子,与底物发生直接空间竞争,因仅靶向游离酶而表现为纯竞争性抑制^[29]。然而,纯化多酚作为多组分体系,作用网络更为立体,除主要成分占据活性中心外,小分子黄酮、鞣花酸等伴随物还能结合酶的非催化区或酶-底物复合物,引发蛋白构象重排,导致 $V_{\max}$ 降低,从而表现为混合型抑制^[30,31]。另一方面纯化多酚极低的 K_i 值表明其整体亲和力远超单体安石榴苷,揭示了体系内部的强效协同作用^[32]。

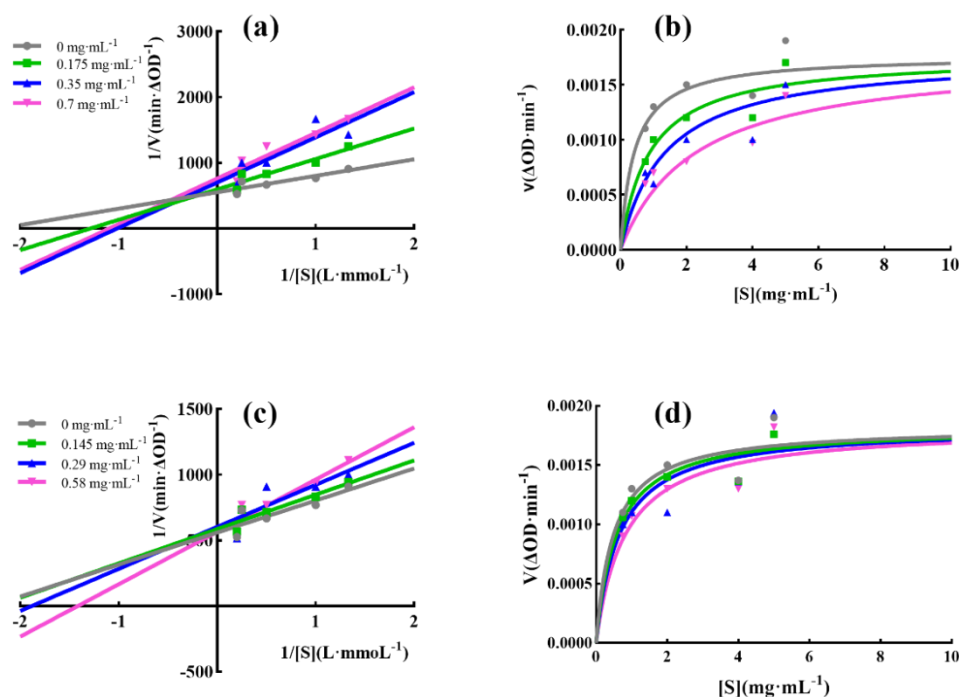


图 5 纯化多酚与安石榴苷对酪氨酸酶抑制作用的抑制类型分析

Fig.5 Analysis of the Inhibition Mechanisms of Purified Polyphenols and Peltinidin on Tyrosinase Activity

2.6 石榴皮纯化多酚对酪氨酸酶荧光光谱及构象的影响

如图 6 所示,单独的酪氨酸酶在 314 nm 处呈现出极强的最大荧光发射峰 (荧光强度 $>3 \times 10^4$),表明发光残基深埋于非极性的疏水核心。随着纯化多酚和安石榴苷浓度的不断增加,酪氨酸酶的荧光强度发生显著的浓度依赖性淬灭,荧光强度降至 2000 以下,证实抑制剂与酶产生强烈结合,形成了非发光复合物^[33]。同时,最大发射峰从 314 nm 显著红移至 340 nm 。这种高达 26 nm 的红移表明多酚类物质的结合破坏了酶原有的致密空间结构,引发构象部分去折叠,使得内部残基暴露于极性更强的水相环境中^[34]。李帅浩等^[35]在研究茶多酚对酪氨酸酶的抑制作用时发现加入茶多酚后酪氨酸酶的内源荧光发生淬灭,同时最大发射波长发生红移,表明酪氨酸酶的部分结构发生展开,其空间结构发生较大改变。安石榴苷作为大分子 (1084 Da),凭借连苯三酚基团挤入酶狭窄的催化口袋时产生巨大空间位阻,迫使酶骨架发生柔性扩张扭曲从而暴露内部残基,但本质上仍属于对活性位点的单一竞争性抑制^[29]。相比之下,纯化多酚作为复杂提取物体系,不仅由主要大分子占据催化中心,其他伴随组分还与酶的非催化区域广泛结合。这种多位点协同附着从外部诱导了酶整体骨架更深度的构象重排,因此表现出混合型抑制特征^[32]。

Stern-Volmer 方程拟合显示, F_0/F 与浓度呈良好线性关系 (图 6d)。纯化多酚和安石榴苷的淬灭速率常数 (K_q) 分别为 6.22×10^9 和 $7.49 \times 10^9 \text{ mL mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 远超最大扩散碰撞速率,表明二者通过形成稳定的基态复合物引发了静态淬灭^[34]。进一步计算结合位点数 (n) 分别为 0.94 和 0.92 (约等于 1),表明两者均主要靶向结合于酪氨酸酶的

单一催化活性中心。纯化多酚催化抑制力更强 (K_i 更小), 但其荧光结合常数 ($K_a=60.42 \text{ L g}^{-1}$) 略低于安石榴苷 ($K_a=71.61 \text{ L g}^{-1}$)。这是因为纯化多酚的强烈空间位阻和多组分竞争干扰了其内部残基的深度结合导致 K_a 偏低^[36,37], 但这并不妨碍其有效封堵活性口袋入口, 从而发挥抑制功能^[38]。

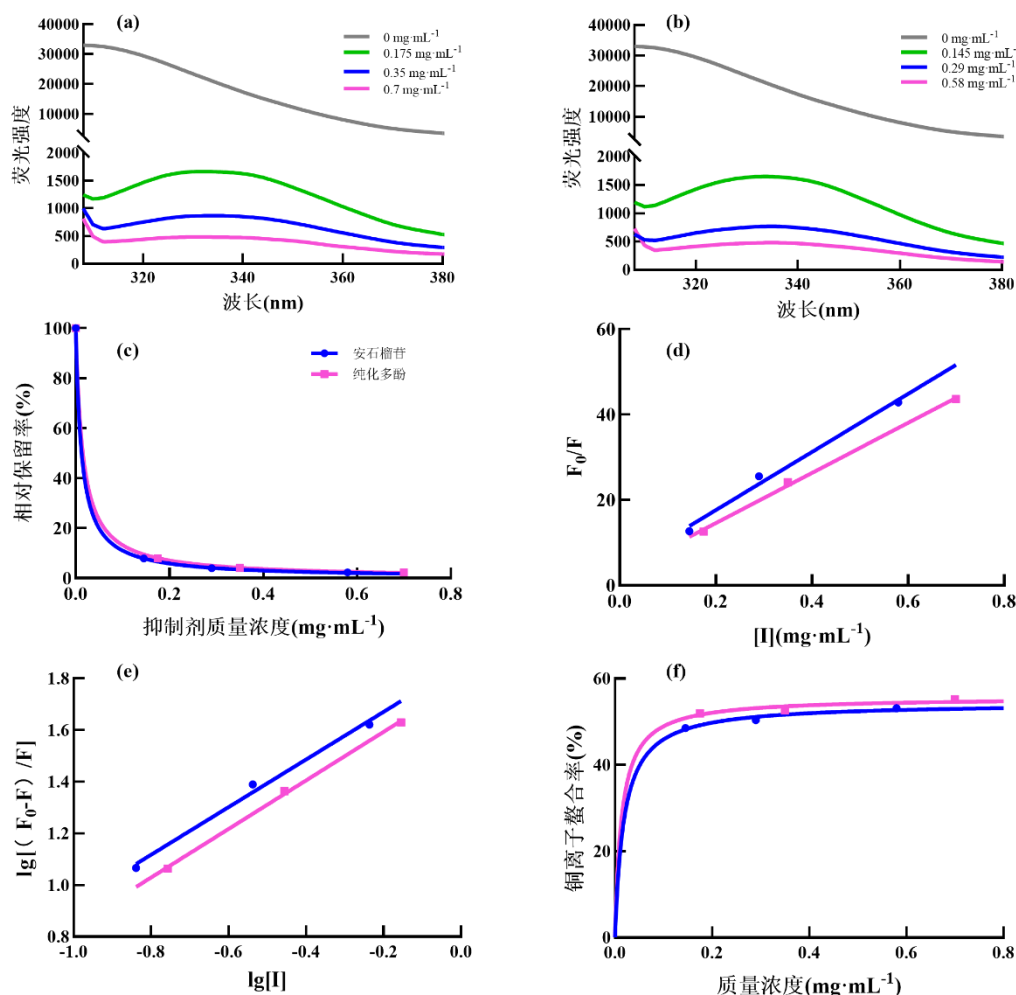


图6 石榴皮纯化多酚对酪氨酸酶荧光光谱变化的影响以及铜离子螯合率

Fig.6 The Effect of Polyphenols Purified from Pomegranate Peel on the Fluorescence Spectral Changes of Tyrosinase and Their Copper Ion Chelation Rates

2.7 石榴皮纯化多酚对高碘酸钠氧化多巴的影响

为明确抑制剂是否直接清除醌类中间体, 本研究构建了高碘酸钠氧化多巴的非酶促反应体系, 监测 475 nm 多巴色素特征峰。结果如图 7a 显示, 加入纯化多酚后吸收峰呈极其显著的浓度依赖性衰减。这表明纯化多酚除抑制酶活外, 还能作为强还原剂或亲核试剂, 将中间体多巴醌还原为多巴或加成为无色复合物, 从而抑制黑色素的生成^[32,39]。然而安石榴苷虽能降低吸收峰, 但只在跃迁至高浓度时才出现二次显著下降, 这可能受限于大分子鞣花单宁特有的空间构型与动力学阻碍。而纯化多酚作为多组分混合物, 蕴含多尺度、不同氧化还原电位的酚类物质。该体系构筑了互补的梯级抗氧化与协同增效作用, 成功克服了单一超大分子的位阻缺陷, 展现出更好的清除动力学特征。有研究表明槲皮素等黄酮类及银杏叶等复杂提取物, 均能依靠多酚结构与多巴醌发生氧化还原或亲核加成反应, 阻断色素前体积聚^[40,41]。相较于单一靶点的化学美白剂, 纯化多酚这种多组分天然体系在抑制黑色素合成通路上, 展现出良好的协同与理化优势。

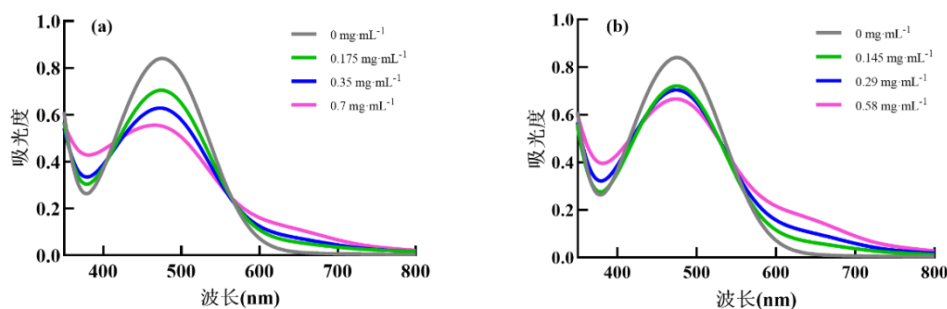


图7 纯化多酚与安石榴苷对非酶促多巴氧化体系的化学清除作用结果

Fig.7 Results of the chemically induced clearance of the non-enzymatic dopamine oxidation system by purified polyphenols and delphinidin

2.8 石榴皮纯化多酚螯合铜离子的测定

酪氨酸酶的催化功能高度依赖其活性口袋深处的双核铜离子^[42]。由图 6f 可知安石榴苷与纯化多酚均具极强的铜离子螯合活性 (EC_{50} 分别为 0.021 和 0.025 $mg\ mL^{-1}$)。安石榴苷的强螯合力源于其高度富集的没食子酰基等基团^[43]，但在酶反应中，其庞大体积不可避免地产生空间位阻，难以深入狭窄的酶口袋配位。相比之下，纯化多酚作为多组分体系展现出卓越的基质协同优势：体系内的小分子易克服位阻，深入口袋底部靶向夺取并螯合铜离子；大分子组分则结合于口袋外围引发蛋白构象改变，形成“小分子内部配位-大分子外部构象封堵”的协同机制。结合经典天然多酚（如 EGCG^[44]和槲皮素^[45]）的作用规律，强效的底物位点铜离子螯合是发挥竞争性抑制的核心机制，多酚骨架中高密度的没食子酰基结构是石榴皮多酚实现抑制酪氨酸酶活性的关键物质基础。

2.9 分子对接结果

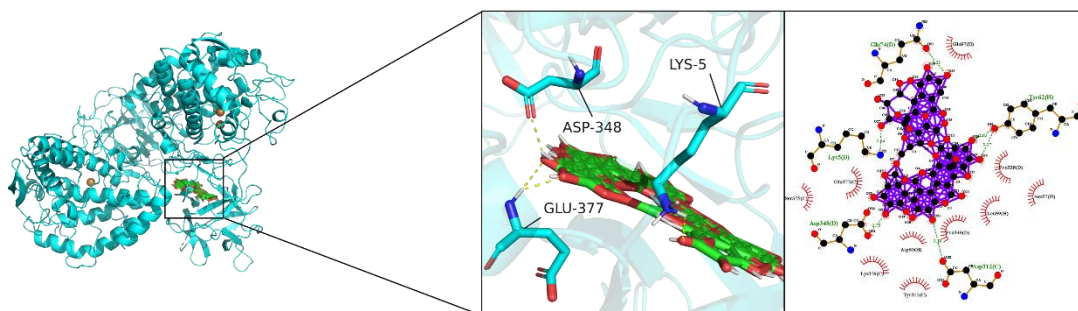


图8 安石榴苷与酪氨酸酶的分子对接

Fig.8 Molecular docking of Punicalagin and tyrosinase

本研究在分子水平上探究了安石榴苷对酪氨酸酶的抑制机制，结果如图 8 所示。能量打分结果显示安石榴苷与酪氨酸酶结合的最佳构象的结合能低至 $-19.90\ kcal\ mol^{-1}$ ，证明了安石榴苷与酪氨酸酶之间具有极强的自发结合趋势和高度的复合物稳定性。从整体对接构象可以看出安石榴苷分子能够精确且稳固地结合在酪氨酸酶活性口袋的入口区域中。通过局部 3D 细节图和 2D 相互作用平面图的分析表明，氢键网络和疏水作用是维持该高亲和力的主要驱动力。安石榴苷丰富的多酚羟基结构使其与口袋内的关键氨基酸残基形成了多条强氢键，包括 Asp348 (2.75 Å)、Lys5 (2.84 Å)、Tyr62 (2.63 Å 和 3.27 Å)、Gln74 (3.22 Å) 以及 Asp312 (3.19 Å)。同时，其庞大的芳香环骨架与周围的 Glu377、Ser375、Lys376、Tyr311、Asp60、Pro349、Leu59、Asn57 等氨基酸残基产生了广泛的疏水相互作用和范德华力，进一步锚定了配体的空间构象。然而，对接结果显示安石榴苷并未与酪氨酸酶活性中心的双核铜离子发生直接的配位螯合。这与前文体外实验中安石榴苷表现出的强铜离子螯合能力 ($EC_{50}=0.021\ mg\ mL^{-1}$) 存在差异。这种现象主要可由分子的空间位阻效应与多途径协同抑制机制来解释。首先，

酪氨酸酶的双核铜中心深埋于狭窄的疏水口袋底部,而安石榴苷作为大分子鞣质(分子量约 1 084 Da)具有极其庞大的空间体积,强烈的空间位阻使其难以深入活性口袋底部直接接触铜离子。其次,在真实的溶剂体系中,安石榴苷丰富的多酚羟基极有可能通过活性通道内的水分子网络与双核铜离子形成间接的氢键或长程静电作用^[46]。此外,体外铜整合实验反映的是安石榴苷对反应微环境中游离铜离子的极强亲和力。结合其极强的结合亲和力与空间占位特征推测,一方面,安石榴苷凭借较大的分子体积可与结合通道附近的氨基酸残基紧密结合,有效阻断天然底物进入酶活性中心的路径,同时有研究表明其结合会导致酪氨酸酶的蛋白骨架发生松散,并降低了酶的表面疏水性^[47];另一方面,它能高效捕获环境中的游离铜离子,破坏维持酪氨酸酶活性的金属微环境,从而表现出优异的酶抑制活性。

2.10 石榴皮多酚乳液抑制 B16 细胞黑色素合成的研究结果

石榴皮多酚极其不稳定,容易在光照、高温等条件下发生降解^[15]。同时考虑到在真实的复杂生物体系中,具有强亲水性的多酚类物质往往难以自由穿透疏水的细胞膜脂双层,其绝对生物利用度通常受到极大的限制。双层乳液系统能有效隔绝外界不利环境的损害,为多酚类物质提供保护屏障,不仅大幅改善了其稳定性,还能显著提高其生物利用率与透皮吸收效率。基于此,本研究构建了多酚乳液递送体系,随后引入了 B16 黑色素瘤细胞模型,对其在细胞水平上的黑色素合成抑制活性与生物安全性进行了深入评估。

2.10.1 B16 黑色素瘤细胞细胞增殖率

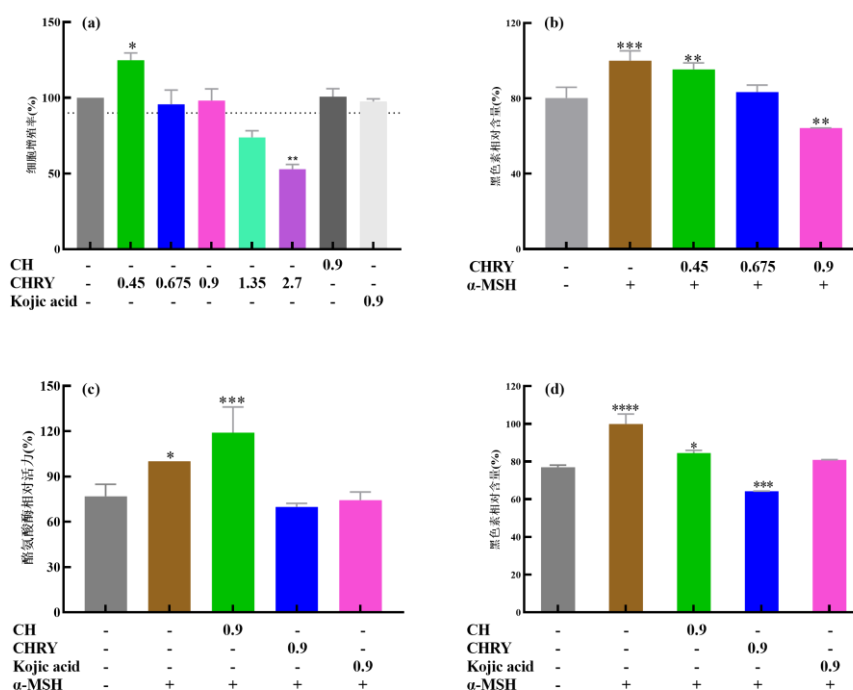


图9 石榴皮多酚及乳液对 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成的影响

Fig.9 The Effects of Pomegranate Peel Polyphenols and an Emulsion on Melanin Synthesis in B16 Melanoma Cells

注: 虚线代表安全存活率阈值 (90%); *表示与空白组相比具有显著差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.002$, **** $P < 0.001$).

在评估活性物质的抑制黑色素合成能力时,必须首先排除因活性物质剂量太大引发的细胞毒性或细胞大量死亡而导致的黑色素下降的假阳性现象。因此,本研究采用 CCK-8 法系统评估了不同质量浓度的多酚乳液对 B16 黑色素瘤细胞存活率的影响。由图 9a 可知, B16 细胞经不同浓度的多酚乳液(以纯化多酚计)处理 24 h 后,呈现出明显的剂量依赖性效应。当乳液中纯化多酚的等效质量浓度低于 1.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时,细胞相对增殖率均保持在 90% 以上,显微镜下观察细胞形态正常,与空白对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。值得注意的是, 0.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 乳液甚至表现出轻微的细胞增殖促进作用;而当给药浓度升高至 2.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时,乳液对 B16 细胞活力产生了显著的抑制作用。为了进一步证实该乳液在抑制黑色素合成方面的有效性与特异性,本研究考察了安全浓度范围内不

同剂量 (0.45、0.675、0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对细胞内黑色素合成的剂量-效应关系。如图 9b 所示, 与对照组相比, 多酚乳液能够呈浓度依赖性地显著降低细胞内黑色素的含量。其中, 在 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下抑制效果最为显著。为了在确保后续检测到的胞内酪氨酸酶抑制与黑色素清除效果, 纯粹源于多酚对细胞生理性代谢路径的调控, 同时在后续研究中观察到最明显的干预效果, 本研究选择 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为乳液的后续最佳功能干预剂量。未包埋的游离纯化多酚 (CH) 与阳性对照曲酸 (Kojic acid) 作用于细胞后, 其细胞增殖率均接近 100%, 表现出极佳的生物相容性。因此后续对比这三者对活细胞内黑色素合成的干预能力。

2.10.2 B16 黑色素瘤细胞内酪氨酸酶抑制率测定

酪氨酸酶作为黑色素合成途径的核心限速酶, 其胞内催化活性的高低直接决定了黑色素的最终沉积量^[48]。如图 9c 所示, 以 α -MSH 刺激后的模型组细胞内酪氨酸酶相对活力为 100%, 未经诱导的空白组细胞酶活力仅为 76.33% ($P<0.05$), 这表明 α -MSH 成功上调了胞内酪氨酸酶的激活与表达, 高产黑素细胞模型构建成功。在此模型基准下, 多酚乳液组与曲酸均对 B16 细胞内酪氨酸酶活性产生了极为显著的抑制作用 ($P<0.05$)。然而在相同给药浓度下, 游离纯化多酚组对胞内酪氨酸酶几乎完全丧失了抑制效能, 其酶活力甚至略高于模型组 ($P>0.05$)。结合前文动力学结果可知, 纯化多酚本源具有极强的靶向游离酪氨酸酶的竞争性抑制能力, 但在真实的活细胞微环境中, 由于石榴皮多酚具有极强的水溶性与庞大的空间体积, 极难自发穿透由疏水性磷脂双分子层构成的细胞膜屏障, 导致其实际进入细胞质内的有效剂量远低于抑制酶阈值^[49,50]。相反, 本研究构建的乳液递送系统成功打破了这一物理壁垒。乳液凭借其界面脂质相容性与优异的膜融合潜能, 极大地促进了多酚分子通过内吞等途径的跨膜摄取, 使其得以在胞内微环境中精准锚定并强效竞争酪氨酸酶的催化活性中心, 从而从源头上切断了黑色素的合成通路^[51]。这一结果证实乳液包埋技术不仅是对石榴皮多酚物理稳定性的保护, 更是实现抑制黑色素合成的关键。

2.10.3 B16 黑色素瘤细胞内黑色素含量测定

为全面确证该多酚乳液体系在活细胞层面的抑制黑色素合成的能力, 本研究以 α -MSH 诱导的 B16 细胞为模型, 对其胞内黑色素含量进行了定量分析。如图 9d 所示, 以 α -MSH 高表达模型组的胞内黑色素含量为基准 (100%), 未经刺激的空白组黑色素相对含量为 76.95%, 表明细胞处于正常的生理性基础分泌水平。在等效给药剂量 (0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 干预下, 游离多酚组与阳性对照组仅表现出中等程度的抑制作用, 其黑色素相对含量分别降至 84.49% 和 80.85%。经过多酚乳液处理的 B16 细胞, 其胞内黑色素相对含量极具显著性地降至 64.24%, 低于空白对照组 (76.95%), 且抑制效果显著优于了同浓度的阳性对照。这是因为乳液脂质界面的跨膜融合优势, 成功克服了水溶性游离大分子多酚无法穿透细胞膜的致命物理屏障, 使得活性物质得以在胞质内高浓度富集, 从而在源头上阻断酪氨酸酶的催化活性^[52,53], 同时进入胞内的石榴皮多酚提取物作为一个复杂的强抗氧化网络, 不仅能直接捕获并清除细胞内因应激产生的超氧阴离子与羟基自由基, 阻断氧化信号诱导的黑素生成通路; 还能直接将黑色素合成途径中的多巴醌等中间体逆向还原^[40,54]。因此乳液包埋技术不仅赋予了石榴皮多酚优异的跨膜生物利用度, 更使其在细胞内部彻底释放了多重拦截效能。Zhang 等^[55]证实白藜芦醇纳米脂质体能够通过增强 B16 细胞的跨膜摄取, 展现出优于游离态抑制黑色素合成的能力; 针对同样具有高亲水性的大分子绿茶多酚 (EGCG), 纳米乳液技术也被确证是打破其细胞渗透屏障的核心手段^[50]。因此石榴皮多酚乳液作为新一代高效、安全、多靶点天然美白制剂具有巨大应用潜力。

3 结论

本研究系统揭示了安石榴苷高度富集的石榴皮多酚在上游通道阻滞-微环境破坏-下游中间体清除三个维度上的抑制黑色素机制。本研究证实了安石榴苷等大分子多酚对酪氨酸酶的抑制并非依赖于直接螯合酶活性中心的铜离子, 而是凭借其庞大的分子骨架在底物结合通道入口处产生巨大的空间位阻, 同时叠加对游离铜离子的环境螯合与多巴醌的还原猝灭, 形成了一套区别于传统小分子抑制剂 (如曲酸) 的抑制理论模型。其次, 在功效转化层面, 针对大分子多酚跨膜吸收率极低、理化稳定性差的行业痛点, 本研究成功验证了双层乳液递送体系能有效突破上述生理屏障。该体系在极低的安全干预剂量下, 即可实现 B16 细胞内酪氨酸酶活性的深度抑制, 实现了大分子多酚生物利用度的显著跃升。值得注意的是, 本研究在体外细胞层面的初步评价仍存在一定的局限性, 有待后续研究进一步完善。细胞水平的 CCK-8 结果显示, 该乳液的起效浓度 (0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与出现细胞毒性的浓度 (2.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 之间差距较小, 表现出相对狭窄的体外安全窗。同时 B16 细胞属于鼠源性黑色素瘤细胞, 其黑色素代谢途径的调控网络及对天然大分子的敏感性, 与人类正常表皮细胞仍存在一定的物种及病理学差异。本研究

选用 B16 细胞旨在为该新型递送体系的透皮吸收潜力与基础抑酶机制提供初步的概念验证。为了真正实现其在功能性天然美白化妆品中的临床转化与高值化应用,未来的研究不仅需要通过正常人体表皮黑素细胞(NHEM)乃至三维(3D)人体表皮等效模型进行深入的安全性及功效学验证,还需进一步探究其对入源细胞特异性信号通路的调控机制。此外,虽然本研究通过降低细胞内黑色素含量间接证实了乳液递送体系有助于多酚突破脂质双分子层发挥功效,但由于缺乏 Franz 扩散池等体外透皮吸收动力学实验,尚不能直接定量揭示该双层乳液在完整角质层中的渗透行为及药物储库效应。因此,在未来该原料的产业化推进中,系统评估其在复杂皮肤屏障中的渗透透过程率及长效缓释特性,将是实现其化妆品高值化应用的关键核心内容。

综上所述,本研究不仅重构了石榴皮大分子多酚抑制黑色素合成的立体微观机制,更打通了从农林副产物定向富集到高效跨膜递送体系构建的全链条转化路径,为开发安全、高效的新型天然靶向抑制黑色素原料提供了理论基础。

参考文献

- [1] 苏娜,张丽,段龙艳,等.响应面优化热浸提法提取石榴皮总多酚的工艺研究[J].安徽农业科学,2017,45(9):78-83.
- [2] 刘佩,杜国荣,赵鹏涛,等.9种植物源多酚的分离提取及其涩感评价[J].江苏农业学报,2021,37(4):1025-1032.
- [3] MICHAELA B, HEARING V J. The protective role of melanin against UV damage in human skin [J]. Photochemistry and photobiology, 2008, 84(3): 539-549.
- [4] FERNANDEZ-JULIA P J, TUDELA-SERRANO J, GARCIA-MOLINA F, et al. Study of tyrosine and dopa enantiomers as tyrosinase substrates initiating L- and D-melanogenesis pathways [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 68(4): 823-831.
- [5] 尹德航,施乐洋,叶雨涵,等.天然产物及其有效成分在化妆品领域的研究与开发[J].化学试剂,2022,44(7):960-967.
- [6] 李薄薄,马洁,朱士强,等.抑制黑色素合成信号通路的植物美白原料的研究与开发[J].日用化学品科学,2023,46(3):21-28.
- [7] 王娟.草莓多酚的提取及其在美白化妆品中的应用研究[D].广州:暨南大学,2017.
- [8] 张娅妮.猕猴桃果皮多酚类物质的提取、分离及对 B16 细胞黑色素抑制作用的研究[D].西安:陕西师范大学,2022.
- [9] ÇAM M, HIŞİL Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels [J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 878-885.
- [10] 付建红,郭丽艳.新疆石榴皮多酚的提取及其对酪氨酸酶的抑制作用[J].生物加工过程,2015,13(3):59-63+69.
- [11] FAWOLE O A, MAKUNGA N P, OPARA U L. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract [J]. BMC complementary and alternative medicine, 2012, 12(1): 200.
- [12] MINEKA Y, YUKO W, KOUICHI K, et al. Inhibitory Effect of an Ellagic Acid-Rich Pomegranate Extract on Tyrosinase Activity and Ultraviolet-Induced Pigmentation [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(12): 2368-2373.
- [13] KANLAYAVATTANAKUL M, CHONGNATIVISIT W, CHAIKUL P, et al. Phenolic-rich pomegranate peel extract: in vitro, cellular, and in vivo activities for skin hyperpigmentation treatment [J]. Planta Medica, 2020, 86(11): 749-759.
- [14] 杨俊琪.石榴皮多酚的肠道代谢转化及与菌群互作关系研究[D].西安:陕西师范大学,2020.
- [15] 左云会,胡腾根,朱永清,等.石榴皮活性物质提取及其 W/O/W 乳液稳态化包埋研究[J].中国食品学报,2024,24(9):167-183.
- [16] 王华斌.石榴皮多酚提取纯化及纳米乳制备工艺研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2011.
- [17] 吴悦.酵母来源酪氨酸酶抑制多肽的制备及其活性研究[D].无锡:江南大学,2014.
- [18] 安全,王亚琳,李魁,等.云南白药发酵液的抗衰老及美白功效探究[J].日用化学工业,2018,48(2):103-108.
- [19] 张晓霞,马强,陈振东,等.安石榴苷及石榴植物药的研究进展[J].中国药物经济学,2023,18(7):114-117.
- [20] 范高福,韦梦强,吴丹,等. RP-HPLC 法同时检测石榴皮 3 种多酚类提取物含量研究[J].长春师范大学学报,2023,42(6):133-138.
- [21] 宋子欣,孙倩茹,方嘉璇,等.石榴皮主要活性成分及其在化妆品中的应用研究进展[J].日用化学工业,2023,53(10):1211-1219.
- [22] 刘东茹.根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶的抑制作用研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [23] 罗海涛.铜藻多酚提取、结构鉴定及酪氨酸酶抑制效应研究[D].福州:福州大学,2023.
- [24] 陈倩倩.枇杷花酪氨酸酶活性抑制成分分离鉴定及其体外抑制机理研究[D].金华:浙江师范大学,2023.
- [25] BAXTER N J, LILLEY T H, HASLAM E, et al. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation [J]. Biochemistry, 1997, 36(18): 5566-5577.
- [26] OWEN S C, DOAK A K, WASSAM P, et al. Colloidal Aggregation Affects the Efficacy of Anticancer Drugs in Cell Culture [J]. ACS chemical biology, 2012, 7(8): 1429-1435.

- [27] YU L X, ZHU X, LV X, et al. Antagonistic Polyphenol Interactions Underlie the α -Glucosidase Inhibitory Activity of Keemun Black Tea [J]. *Foods*, 2026, 15(6): 1061.
- [28] SOARES S, BRANDÃO E, GUERREIRO C, et al. Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2590.
- [29] YU Z Y, XU K, WANG X, et al. Punicalagin as a novel tyrosinase and melanin inhibitor: Inhibitory activity and mechanism [J]. *LWT*, 2022, 161: 113318.
- [30] YU Q, FAN L P. Understanding the combined effect and inhibition mechanism of 4-hydroxycinnamic acid and ferulic acid as tyrosinase inhibitors [J]. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129369.
- [31] PILLAIYAR T, MANICKAM M, NAMASIVAYAM V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1): 403-425.
- [32] ZOLGHADRI S, BAHRAMI A, HASSAN KHAN M T, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019, 34(1): 279-309.
- [33] 管骁,杨城,刘静,等.槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用与分子机理[J].现代食品科技,2015,31(8):71-76+109.
- [34] SUN L, WARREN F J, GIDLEY M J, et al. Mechanism of binding interactions between young apple polyphenols and porcine pancreatic α -amylase [J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 468-474.
- [35] 李帅浩,谭充,冯子健,等.茶多酚对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制研究[J].食品安全质量检测学报,2023,14(15):40-46.
- [36] SEKOWSKI S, BITUICKI M, IONOV M, et al. Influence of valoneoyl groups on the interactions between Euphorbia tannins and human serum albumin [J]. *Journal of Luminescence*, 2018, 194: 170-178.
- [37] ENGSTRÖM M T, VIRTANEN V, SALMINEN J P. Influence of the Hydrolyzable Tannin Structure on the Characteristics of Insoluble Hydrolyzable Tannin-Protein Complexes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(41): 13036-13048.
- [38] STEFANIA F, BATEL D, PAOLA M G, et al. Targeting Tyrosinase: Development and Structural Insights of Novel Inhibitors Bearing Arylpiperidine and Arylpiperazine Fragments [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2018, 61(9): 3908-3917.
- [39] BEATA G, HUBERT W. Reactions of Flavonoids with o-Quinones Interfere with the Spectrophotometric Assay of Tyrosinase Activity [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 64(26):5417-5427.
- [40] CHANG T S. An updated review of tyrosinase inhibitors [J]. *International journal of molecular sciences*, 2009, 10(6): 2440-2475.
- [41] KLOMSAKUL P, AIUMSUBTUB A, CHALOPAGORN P. Evaluation of Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Effects of Ginkgo biloba Tea Extract [J]. *The Scientific World Journal*, 2022, 2022(1): 889.
- [42] GOLDFEDER M, KANTEEV M, ISASCHAR-OVDAT S, et al. Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4505.
- [43] AQIL F, MUNAGALA R, VADHANAM M V, et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 345-353.
- [44] SATO K, TORIYAMA M. Depigmenting effect of catechins [J]. *Molecules*, 2009, 14(11): 4425-4432.
- [45] KUBO I, KINST-HORI I, Chaudhuri S K, et al. Flavonols from Heterotheca inuloides: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, 8(7): 1749-1755.
- [46] ZOLGHADRI S, BAHRAMI A, HASSAN KHAN M T, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2019, 34(1): 279-309.
- [47] 于子怡.壳斗科植物单宁和安石榴苷抗酪氨酸酶及抗黑色素生成机制研究[D].南昌:江西师范大学,2022.
- [48] 杨小玉,刘金俊,刘蕾,等.黑色素的生成代谢机制及研究方法进展[J].日用化学工业,2023,53(10):1194-1203.
- [49] CERDÁ B, LLORACH R, CERÓN J J, et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice [J]. *European journal of nutrition*, 2003, 42(1): 18-28.
- [50] D'ARCHIVIO M, FILESI C, VARÌ R, et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies [J]. *International journal of molecular sciences*, 2010, 11(4): 1321-1342.
- [51] PENG Y, MENG Q, ZHOU J, et al. Nanoemulsion delivery system of tea polyphenols enhanced the bioavailability of catechins in rats [J]. *Food chemistry*, 2018, 242: 527-532.

- [52] TING Y, JIANG Y, HO C T, et al. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 112-128.
- [53] MCCLEMENTS D J, LI F, XIAO H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability [J]. Annual review of food science and technology, 2015, 6(1): 299-327.
- [54] DENAT L, KADEKARO A L, MARROT L, et al. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134(6): 1512-1518.
- [55] ZHANG X, CHEN S, LUO D, et al. Systematic study of resveratrol nanoliposomes transdermal delivery system for enhancing anti-aging and skin-brightening efficacy [J]. Molecules, 2023, 28(6): 2738.