

# 曲酸作为化妆品添加剂的增白作用机理研究

黄 璜, 宋康康, 陈清西\*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:**以曲酸为效应物, 研究对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力的影响. 结果表明, 曲酸对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性均有抑制作用, 其效应为可逆抑制效应. 测定导致单酚酶活力和二酚酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 31.0 和 20.0  $\mu\text{mol/L}$ . 曲酸对酪氨酸酶的单酚酶的迟滞时间有明显的延长效应, 60  $\mu\text{mol/L}$  曲酸使得单酚酶的迟滞时间从 52 s 延长到 390 s. 曲酸对二酚酶的抑制作用表现为混合型抑制类型, 抑制常数  $K_I$  和  $K_{IS}$  分别为 13.0 和 100.0  $\mu\text{mol/L}$ . 曲酸和酶的结合导致天然酶的内源荧光的量子产率下降, 但荧光发射峰没有位移. 通过曲酸对酪氨酸酶的抑制作用研究阐明曲酸作为化妆品添加剂的增白作用机理.

**关键词:**酪氨酸酶; 曲酸; 抑制作用; 增白作用机理; 化妆品

**中图分类号:** Q 356.1

**文献标识码:** A

酪氨酸酶 (EC. 1. 14. 18. 1) 又称多酚氧化酶, 广泛存在于微生物、动植物和人体, 它能将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴) (单酚酶活性), 然后再将多巴氧化成多巴醌 (二酚酶活性), 进而生成一系列引起褐化的色素物. 近些年来, 由于白化病等色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤和老年性痴呆的发生与治疗, 均与酪氨酸酶直接相关, 国内外对该酶的活力调控十分重视, 目前主要集中在医药方面<sup>[1~3]</sup>的研究. 对该酶抑制剂的研究, 主要是一些用于皮肤保健和治疗的常规抑制剂的研究<sup>[4~6]</sup>. 美国加州 Berkeley 大学的 Kubo 教授对酪氨酸酶抑制剂的研究最为前沿, 他们已从天然植物中提取了几种酪氨酸酶抑制剂, 测定了它们对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用<sup>[7~10]</sup>.

有报道利用曲酸作为化妆品添加剂<sup>[11]</sup>, 可以防止皮肤产生黑斑, 具有皮肤增白效果. 推测可能是通过抑制皮肤酪氨酸酶活性, 防止由于受到紫外线的

照射所引起的皮肤酪氨酸酶活性的增加. 前文我们报导了苯甲醛类<sup>[12]</sup>、苯甲酸<sup>[13]</sup>对酪氨酸酶活力的影响, 研究其抑制作用机理. 在此基础上, 我们采用曲酸为效应物, 研究对酪氨酸酶活力的影响, 探讨对酶的抑制作用机理, 提出抑制剂和酶分子间结合作用的分子模型, 以期阐明曲酸用于化妆品作为增白剂的分子机理提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酪氨酸酶购置于 Sigma 化学公司, 从蘑菇提取纯化, 酶的比活力为 6 680 U/mg (25 $^{\circ}\text{C}$ ). 曲酸和二甲亚砜 (DMSO) 也为 Sigma 化学公司产品; L-3, 4-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA)、L-酪氨酸 (Tyr) 为 Aldrich 化学公司产品. 其它试剂为国产分析纯, 使用的蒸馏水为玻璃重蒸水.

### 1.2 方法

酪氨酸酶的单酚酶活力测定是以 0.5 mmol/L Tyr 为底物, 二酚酶活力的测定是以 0.5 mmol/L L-DOPA 为底物, 在 3 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 的测活体系中, 先加入 0.1 mL 含不同浓度的曲酸 (溶于 DMSO 溶液) 于比色杯中, 再加进 2.8 mL 预先在 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴保温的底物溶液, 然

收稿日期: 2002-12-09

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金和福建省自然科学基金 (B0110002) 资助

作者简介: 黄璜 (1977 - ), 男, 硕士研究生.

\* Corresponding author: Tel/ Fax : 0592-2185487

E-mail : chenqx @jingxian. xmu. edu. cn

后加入 0.1 mL 蘑菇酪氨酸酶水溶液,立刻混匀,在 30 °C 恒温条件下测定波长为 475 nm 的光密度值随时间的增长直线,从直线的斜率求得酶活力,消光系数按:  $\epsilon = 3700 \text{ (mol/L} \cdot \text{cm)}^{-1}$ <sup>[12]</sup> 计算.测定单酚酶活力时,酶的终浓度为 33.3  $\mu\text{g/mL}$ ,测定二酚酶时,酶的终浓度为 6.67  $\mu\text{g/mL}$ ; DMSO 终浓度为 3.33%.测定仪器 UV-6000 分光光度计.曲酸对酶的抑制作用的机理判断是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_m$ ) 的变化来判断.曲酸对酪氨酸酶的内源荧光发射光谱影响的测定:40.0  $\mu\text{g}$  酶溶解在 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8),加入不同浓度的曲酸,在 30 °C 恒温下,以激发光波长为 281.5 nm,Hitachi 850 荧光分光仪中进行测定酶的荧光发射光谱,测定波长范围为 300 ~ 400 nm.

## 2 实验结果

### 2.1 曲酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响

以 Tyr 为底物,酪氨酸酶催化反应的进行曲线见图 1 曲线 1,开始时,产物的形成量缓慢地上升,到一定时间后成直线上升,反应体系达到恒定的斜率,说明反应达到稳定态.直线外推得到横轴截距为迟滞时间<sup>[13]</sup>.以曲酸为效应物,酪氨酸酶催化 Tyr 氧化的进程曲线 2~6,表明酶反应的迟滞时间随着

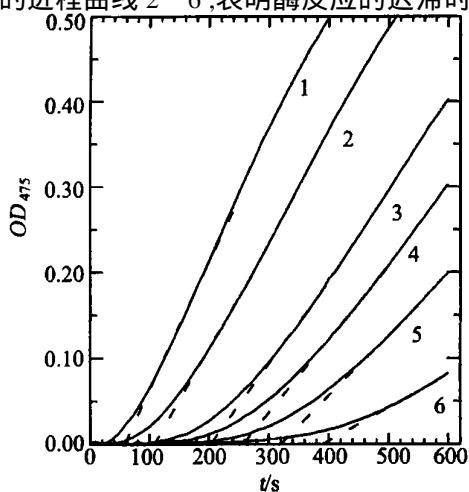


图 1 曲酸对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线  
曲线 1~6 的曲酸浓度分别为:0,10,20,30,40  
和 60  $\mu\text{mol/L}$

Fig.1 Progress curves for the inhibition of monophenolase of mushroom tyrosinase by kojic acid

抑制剂浓度的增大而延长,稳态的酶活力(直线部分的斜率)也随着抑制剂浓度的增大而下降,说明曲酸对酪氨酸酶的单酚酶活力有显著的抑制作用.图 2 显示曲酸对酪氨酸酶催化 Tyr 的迟滞时间和稳态酶活力的影响.随着抑制剂浓度的增大,酶反应的迟滞时间迅速增大,不加抑制剂时,酶反应的迟滞时间为 52 s,当曲酸浓度为 60  $\mu\text{mol/L}$  时,迟滞时间延长到 390 s,迟滞时间增大 6.5 倍.而稳定态的酶活力下降到 23%,测定酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 31  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.2 曲酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-DOPA 为底物,测定酪氨酸酶的二酚酶活力,酶反应的进行曲线为通过原点的一直线,产物的形成量与反应时间成正比关系,直线的斜率即为酶活力.表明酶催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞过程.而在反应体系中加入曲酸后,直线的斜率下降,说明曲酸对酪氨酸酶的二酚酶活力也有抑制作用.图 3 为曲酸对酪氨酸酶的二酚酶活力的抑制曲线,随着抑制剂浓度的增大,酶活力呈指数的下降,导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 20  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.3 曲酸对酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应

研究曲酸对酪氨酸酶的抑制效应.以 0.5 mmol/L L-DOPA 为底物,改变加入的酶蛋白的量,测定不同浓度曲酸对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响.图 4 表示酶经曲酸作用后的剩余酶活力与加入的酶量间的关系,酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线,随着效应物浓度的增大,直线的斜率降低.说明曲酸对酶的抑制作用属于可逆过程,曲酸是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低,而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降.

### 2.4 曲酸对酪氨酸酶的抑制机理及抑制常数的测定

研究曲酸对酪氨酸酶二酚酶抑制作用机理,在测活体系中,固定酶的浓度,改变底物 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,判断抑制剂的抑制类型. Lineweaver-Burk 双倒数作图为相交在第二象限的一组直线,横轴截距和纵轴截距都因曲酸浓度的变化而改变,说明米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_m$ ) 随着曲酸浓度增大而变化,  $K_m$  值增大而  $V_m$

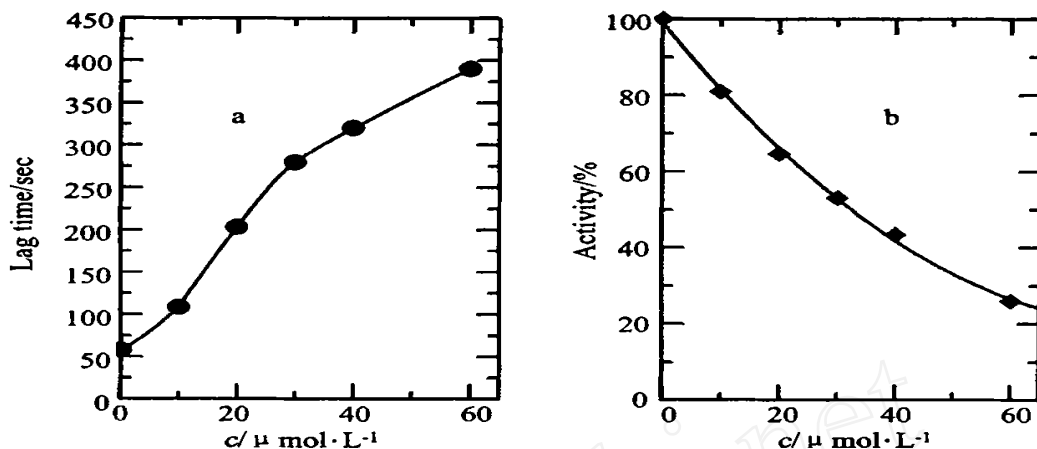


图 2 曲酸对酪氨酸酶单酚酶迟滞时间 (a) 和稳态酶活力 (b) 的影响

Fig. 2 Effect of kojic acid on the lag time

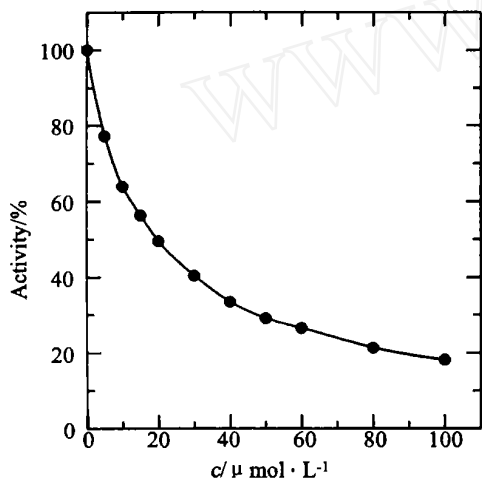


图 3 曲酸对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Fig. 3 Effect of kojic acid on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

值下降,其抑制机理表现为混合型效应.曲酸对游离酶的抑制作用较对酶-底物络合物强.二次作图,以斜率(图 5b)和纵轴截距(图 5c)对曲酸浓度作图为直线,分别可以求出曲酸对游离酶抑制常数( $K_I$ )和对酶-底物络合物抑制常数( $K_{IS}$ )分别为 13.0 和 100.0  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.5 曲酸对酪氨酸酶荧光发射光谱的影响

酪氨酸酶在含不同浓度曲酸的磷酸盐缓冲体系中的荧光发射光谱变化见图 6.天然酶的内源荧光发射峰在 338.5 nm,随着曲酸浓度的增高,酶的荧光发射峰基本没有位移,但荧光强度有明显的下降.

## 3 讨论

酪氨酸酶是一种活性中心含有双核金属铜的氧

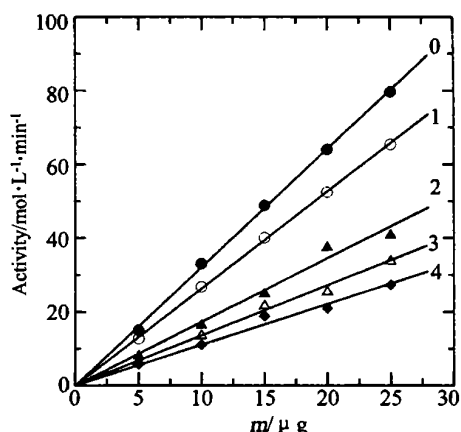


图 4 曲酸对酪氨酸酶抑制效应机理的判断

曲线 0~4 的曲酸浓度分别为:0,5,10,20 和 30  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 4 Determination of the inhibitory mechanism of kojic acid on mushroom tyrosinase

化还原酶,铜离子直接参与催化作用.在催化反应过程中酶的存在形式有 3 种<sup>[15]</sup>:还原型(met)、氧化型(oxy)和脱氧型(deoxy), $E_{\text{met}}$ 和  $E_{\text{oxy}}$ 型酶具有二酚氧化酶活性,而只有  $E_{\text{oxy}}$ 型酶才有单酚加羟酶活性,只有  $E_{\text{deoxy}}$ 型的酶能够结合氧分子.本研究是在反应溶液体系氧分子饱和的前提下进行的,因此,实验中测定的米氏常数( $K_m$ )和最大反应速度( $V_m$ )值均为表观常数,氧气浓度对这些常数的影响尚不清楚.

曲酸(Kojic Acid)学名 5-羟基-2-羟甲基-1,4-吡喃酮,是一种由微生物经发酵途径制成的具弱酸性的有机化合物,曲酸具有酪氨酸酶抑制活性,作用安全,不留白斑,在一定浓度下还有抑菌作用,因此 90 年代初就由日本率先应用于化妆品中作为美白添加剂<sup>[11]</sup>.

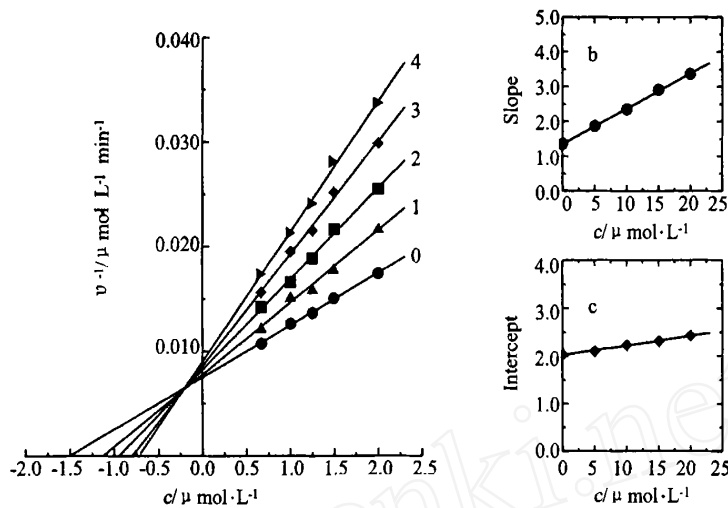


图 5 曲酸对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定  
曲线 0 ~ 4 的曲酸浓度分别为: 0, 5, 10, 15 和 20  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 5 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of kojic acid on mushroom tyrosinase

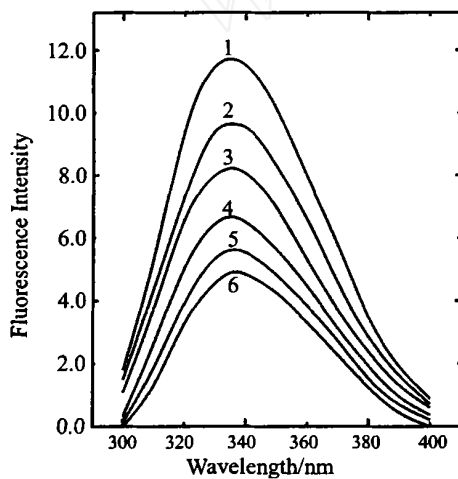


图 6 酪氨酸酶经曲酸作用后的荧光发射光谱  
曲线 1 ~ 6 的曲酸浓度分别为: 0, 25, 50, 75, 100 和 125  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 6 Fluorescence emission spectra of mushroom tyrosinase inhibited by kojic acid

通过曲酸对酪氨酸酶的抑制作用的研究,阐明曲酸作为化妆品的增白效应机理.实验结果表明曲酸对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力有显著的抑制作用,通过抑制重要中间产物的生成而抑制黑色素的生成.其抑制机理类似于栎精,通过 5 位羟基和 4 位酮基与酪氨酸酶活性中心上的  $\text{Cu}^{2+}$  络合,从而抑制酶活力<sup>[16]</sup>.曲酸对酪氨酸抑制作用表现为可逆效应,曲酸和酶的结合导致酶活力受抑制.曲酸对二酚酶活力表现为混合型抑制作用,说明曲酸可以和游离酶 ( $E_{\text{met}}$  或  $E_{\text{oxy}}$ ) 以及酶-底物的络合物 ( $E_{\text{met}}D$  或  $E_{\text{oxy}}D$ ) 结合,抑制常数分别为 13.0 和 100.0  $\mu\text{mol/}$

$L$ ,曲酸对游离酶抑制强度是对酶-底物的络合物抑制的 8 倍.

以 Tyr 为底物时,测得酪氨酸酶的单酚酶活性有一个显著的迟滞时间,这是酪氨酸酶的单酚酶的活性特点,迟滞过后,系统才达到稳态速率.当抑制剂曲酸加入后,迟滞时间延长,稳态速率下降(图 2),表明曲酸也降低了酪氨酸酶的单酚酶活性.曲酸与游离酶  $E_{\text{met}}$  型结合,可以导致而酶催化单酚羟化过程的迟滞时间延长.迟滞时间的长短:(1) 取决于反应溶液中酶和底物的浓度,(2) 能够通过加入过渡金属离子或者二酚的加入而被缩短甚至消除的<sup>[12]</sup>,(3) 因为加入了一些诸如环庚三烯酚酮等一些抑制剂而延长<sup>[15]</sup>.

我们采用的抑制剂曲酸也延长了迟滞时间.究其原因,可能是由于在酪氨酸酶的单酚酶活性循环催化反应模型中, $E_{\text{met}}$ 型和  $E_{\text{oxy}}$ 型的酶既可以与二酚底物结合,催化其进入正常的循环反应中,也可以与单酚底物结合,其中  $E_{\text{oxy}}$ 型的酶与单酚结合也可以促其进入正常反应循环,而  $E_{\text{met}}$ 型的酶与单酚结合后却走出了循环,进入了死路,当然这些过程都是可逆的,但该步骤与整个反应的平衡导致了催化反应体系进入稳态所需要的时间延长,即出现了迟滞时间,而迟滞时间的长短也与此步骤密切相关.

### 参考文献:

[1] Fitzpatrick T B, Eisen A Z, Wolff K, et al. Dermatology in General Medicine [M]. New York: McGraw-Hill, 1983. 205 - 225.

- [2] Sugumaran M. , Tan S, Sun H L . Tyrosinase-catalyzed oxidation of 3,4-dihydrophenylglycine [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics ,1996 ,329(2) : 175 - 180.
- [3] 潘兴华,陈志龙,黄丽娜. 黑素细胞及黑素的生成与调节[J]. 生理科学进展 ,1998 ,29(2) :179 - 181.
- [4] 高秀蕊,石双群,宋秀芹. 某些药物对酪氨酸酶的抑制和对氧自由基的清除[J]. 生物化学与生物物理进展 ,1992 ,19(1) : 70 - 71.
- [5] 刘德育,雷焕强. 杨梅黄素及蛇葡萄素对酪氨酸酶的抑制作用[J],生物化学杂志 ,1996 ,12(5) : 618 - 620.
- [6] 赵荧,郑玉娟,高波,等. 对羟基苯甲酸对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 吉林大学自然科学学报 ,1998 ,4 : 89 - 90.
- [7] Kubo I, Kinoshita Hori I. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism [J]. J. Agric. Food Chem. , 1999 , 47 : 4 121 - 4 125.
- [8] Kubo I, Kinoshita Hori I. Tyrosinase inhibitors from Cumin [J]. J. Agric. Food Chem. ,1998 , 46 : 5 338 - 5 341.
- [9] Kubo I, Kinoshita Hori I. Tyrosinase inhibitors from Anise Oil [J]. J. Agric. Food Chem. , 1998 , 46 : 1 268 - 1 271.
- [10] Kubo I, Kinoshita Hori I, Yokokawa Y. Tyrosinase inhibitors from Anacardium Occidentale fruits [J]. Journal of Nature Products , 1994 , 57(4) : 545 - 551.
- [11] 杨跃飞. 曲酸及其衍生物在美白化妆品中的应用 [J]. 日用化学工业 ,1995 , 1 : 28 - 32.
- [12] 黄璜,刘晓丹,陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版) ,2003 ,42(1) : 97 - 101.
- [13] 刘晓丹,黄璜,陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版) , 2003 ,42(1) : 102 - 106.
- [14] Jimenez M , Chazarra S , Escribano J , et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes [J]. J. Agric. Food Chem , 2001 , 49 (8) : 4 060 - 4 063.
- [15] Fenoll L G , Rodriguez-Lopez J N , Garcia-Sevilla F , et al. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones [J]. Biochim. Biophys. Acta , 2001 , 1548 : 1 - 22.
- [16] Chen Qingxi , Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 2002 ,50(14) : 4 108 - 4 112.

## Studies on Whitening Effect of Kojic Acid as Cosmetic Additive

HUANG Huang , SONG Kang-kang , CHEN Qing-xi \*

(School of Life Sciences , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

**Abstract:** Tyrosinase (1. 14. 18. 1) is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis—the hydroxylation of a monophenol and the oxidation of o-diphenol to the corresponding o-quinone. Kojic acid was found to inhibit the monophenolase and o-diphenolase activity of mushroom tyrosinase. The inhibition kinetics and mechanism of the enzyme were further studied. The results show that the inhibition of tyrosinase by kojic acid is a reversible reaction with remaining enzyme activity. The inhibitor concentrations leading to 50 % ( $IC_{50}$ ) activity lost were estimated to be 31  $\mu\text{mol/L}$  for monophenolase activity and 20  $\mu\text{mol/L}$  for diphenolase , respectively. Kojic acid can extend the lag time of the enzyme for oxidation of L-tyrosine. 60  $\mu\text{mol/L}$  of kojic acid resulted in the lag time extension from 52 sec to 390 sec. The inhibition kinetics analyzed by Lineweaver-Burk plots showed kojic acid to be a mixed typed inhibitor for the oxidation of L-DOPA ,and the inhibition constants were determined to be 13.0  $\mu\text{mol/L}$  for the free enzyme and 100.0  $\mu\text{mol/L}$  for the enzyme-substrate complex. The combining of kojic acid with the enzyme molecule resulted in the decreasing of the quantum rate of the enzyme intrinsic fluorescence without appearance position-shifted. The whitening mechanism of kojic acid as cosmetic additive was discussed.

**Key words:** tyrosinase ; kojic acid ; inhibitory ; whitening mechanism ; cosmetic