

羟基甲氧基苯甲醛在化妆品中起增白作用的研究

宋康康¹, 黄 璜¹, 陈清西¹, 陈丽娟², 温文忠², 陈盛阳²

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 漳州片仔癀皇后化妆品有限公司, 福建 漳州 363000)

摘要: 采用酶学动力学方法研究 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛 (HMB) 对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力的抑制效应。结果表明, HMB 对酪氨酸酶单酚酶的效应只表现对稳态活力有明显的抑制作用, 但对酶作用的迟滞时间没有影响; 随着抑制剂浓度增大, 单酚酶活力呈指数下降, 导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 $0.352 \text{ mmol L}^{-1}$ 。HMB 对二酚酶的抑制作用表现为可逆过程, IC_{50} 为 $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$; 抑制作用机理研究表明 HMB 是一种混合型抑制剂, 其抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 $0.131 \text{ mmol L}^{-1}$ 和 $0.253 \text{ mmol L}^{-1}$ 。通过对 HMB 抑制酪氨酸酶机理的研究, 阐明 HMB 作为化妆品添加剂的增白作用机理。

关键词: 化妆品添加剂; 增白作用; 酪氨酸酶; 抑制机理

中图分类号: TQ658.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-1803(2004)01-0065-04

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1), 是一种铜蛋白, 其活性中心的双铜离子在酶催化中起重要作用。该酶广泛存在于生物体中, 是生物合成黑色素的关键酶^[1], 与色素障碍性疾病及恶性黑色素肿瘤的发生与治疗有关^[2]。在美容保健上, 酪氨酸酶抑制剂作为化妆品添加剂, 用来美白、护肤及去除黑斑。早期的纯化学物氢醌、中期的果酸及组织提取物胎盘膏和近期的植物提取物-熊果苷、维生素 C 衍生物及甘草提取物等, 它们都有护肤、消除黑斑和增白的效果。最近, Kubo 等人^[3]从非洲产的萝藦科 *Mondia hitei* 和漆树科掌漆树 *Rhus vulgaris* 等中提取出一种酪氨酸酶抑制剂 (2-羟基-4-甲氧基苯甲醛), 并初步研究其对酪氨酸酶的抑制效应。此文报道 HMB 对酪氨酸酶抑制作用机理和抑制动力学的实验结果, 提出该抑制剂与酶分子间结合作用的分子模型, 以期阐明 HMB 用于化妆品具有增白作用的分子机理提供理论依据。

1 材料与方 法

(1) 材料: 酪氨酸酶、二甲亚砜 (DMSO) 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) 和 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛 (HMB) 为 Aldrich 化学公司产品; 其他试剂为国产分析纯; 蒸馏水为玻璃重蒸水。

(2) 方法: 酪氨酸酶的单酚酶活力的测定是以 2 mmol L^{-1} Tyr 为底物, 二酚酶活力的测定是以 0.5 mmol L^{-1} L-DOPA 为底物, 在 $3 \text{ mL } 0.05 \text{ mol L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 的测活体系中, 先加 0.1 mL 含不同浓度的 HMB (溶于 DMSO 溶液中) 于比色杯

中, 再加 2.8 mL 预先在 30°C 恒温水浴保温的底物溶液, 然后加 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液, 立刻混匀, 在 30°C 恒温下测定波长为 475 nm 的吸光值随时间的增长直线, 从直线斜率求得酶活力, 消光系数按 ($= 3700 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)^[4] 计算。测定单酚酶活力时, 酶的终质量浓度为 33.3 mg L^{-1} ; 测定二酚酶时, 酶的终质量浓度为 6.67 mg L^{-1} , DMSO 终质量分数为 3.33%。仪器为 UV-650 分光光度计。HMB 对酶的抑制作用机理判断是通过 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^[5]。

2 实验结果

2.1 HMB 对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

酪氨酸酶催化酪氨酸加羟并氧化的反应进行曲线显示有迟滞过程^[5], 此为该酶反应的特征之一。以 HMB 为效应物, 酪氨酸酶催化酪氨酸氧化过程见图 1 (纵坐标为 475 nm 处的吸光值, 曲线 1~6 的 HMB 的浓度分别为 0 、 0.2 mmol L^{-1} 、 0.4 mmol L^{-1} 、 0.6 mmol L^{-1} 、 0.8 mmol L^{-1} 和 1.0 mmol L^{-1}), 表明抑制剂浓度对酶反应的迟滞时间没有影响, 而稳态的酶活力 (直线部分的斜率) 随着抑制剂浓度的增大明显下降, 说明 HMB 对酪氨酸酶的单酚酶活性有抑制作用。图 2 显示 HMB 对酪氨酸酶催化酪氨酸的迟滞时间和稳态酶活力的影响。稳定态的酶活力随着 HMB 浓度的增大快速下降, 测定导致酶活力 A 下降 50% 的 HMB 浓度 (IC_{50}) 为 $0.352 \text{ mmol L}^{-1}$ 。

收稿日期: 2003-06-05; 修回日期: 2003-09-11

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (B0110002) 和教育部跨世纪人才培养计划经费 (陈清西)

作者简介: 宋康康 (1979-), 女 (汉族), 辽宁人, 硕士研究生。

通讯联系人: 陈清西, 教授, 博导, 联系电话: (0592) 2185487, E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn。

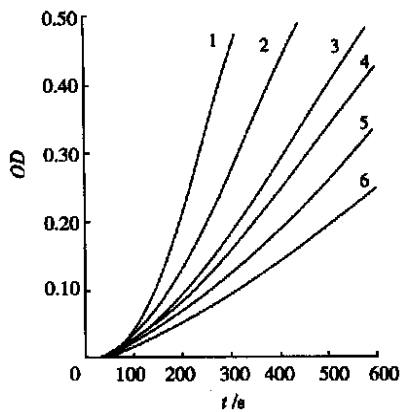


图 1 酪氨酸酶催化 L - Tyr 反应的进程曲线

Fig. 1 Progress curves for the oxidation of L - Tyr catalyzed by tyrosinase in presence of HMB

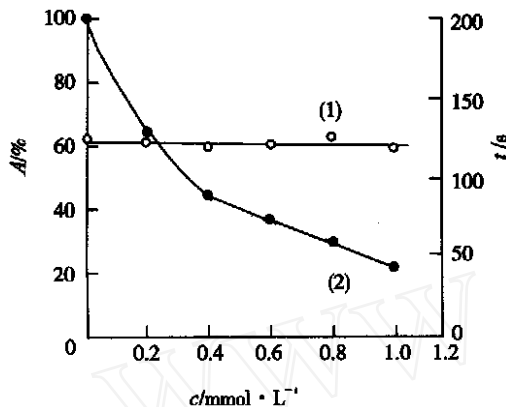


图 2 HMB 对酪氨酸酶单酚酶迟滞时间 (1) 和稳态酶活力 (2) 的影响

Fig. 2 Effects of HMB on the lag time (1) and the steady - state activity (2) of monophenolase of tyrosinase

2.2 HMB 对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性,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 HMB 后,直线的斜率下降,说明 HMB 对酪氨酸酶的二酚酶活力也有抑制作用。图 3 为 HMB 浓度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 $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$ 。

2.3 HMB 对酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应

研究 HMB 对酪氨酸酶的抑制效应。以 0.5 mmol L^{-1} 的 L - DOPA 为底物,改变加入酶蛋白的量,测定不同浓度 HMB 对酪氨酸酶催化 L - DOPA 氧化活力的影响。图 4 表示酶在含不同浓度 HMB 的测活体系中,酶的剩余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 HMB 对酶

的抑制作用属于可逆过程, HMB 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。

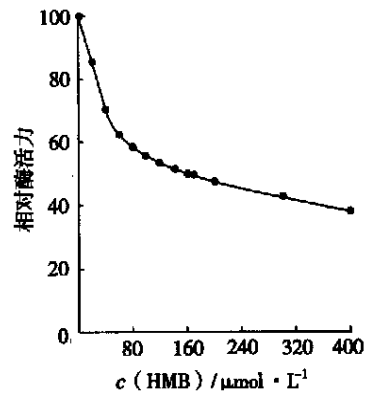
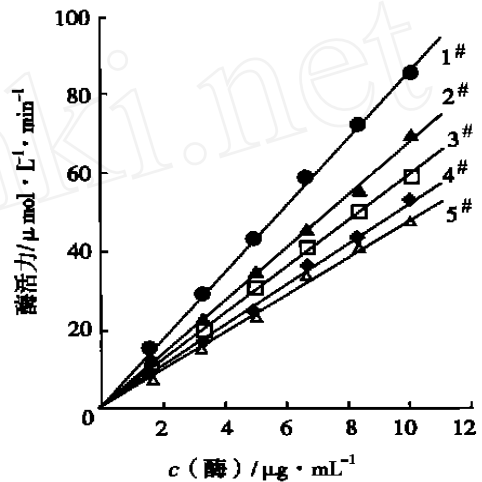


图 3 HMB 对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of HMB on the diphenolase activity of tyrosinase



$c(\text{HMB}) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别为:

1# 0 2# 10 3# 20 4# 30 5# 40

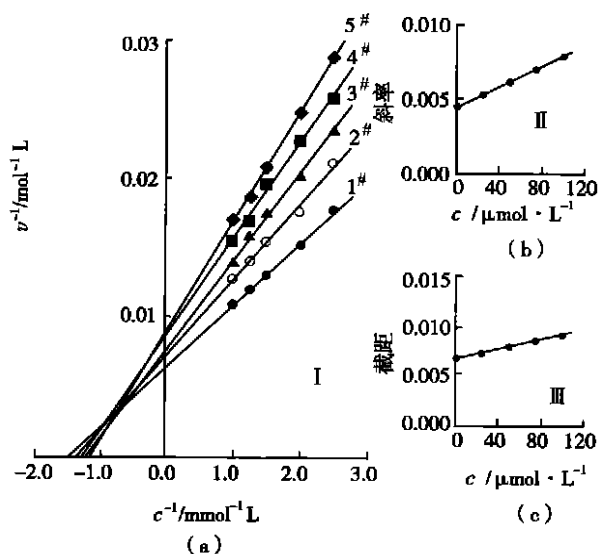
图 4 HMB 对酪氨酸酶抑制效应机理的判断

Fig. 4 Determination of the inhibitory mechanism of HMB on tyrosinase

2.4 HMB 对酪氨酸酶的抑制机理及抑制常数的测定

研究 HMB 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 (反应速度的倒数 (v^{-1}) 和底物浓度的倒数 (c^{-1})) 作图 (见图 5 (a)) 得到一组交于第二象限的直线,说明 HMB 作为酪氨酸酶抑制剂,它不仅影响酶促反应的最大反应速度 (v_{max}),还影响米氏常数 (K_m), K_m 值增大而 v_m 值下降,其抑制机理表现为混合型抑制类型。二次作图,以斜率 (图 5 (b)) 和纵轴截距 (图 5 (c)) 对抑制剂 HMB 浓度作图为直线,分别可以求出 HMB 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 $0.131 \text{ mmol L}^{-1}$ 和 $0.254 \text{ mmol L}^{-1}$ 。



c (HMB) / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别为:

1# 0 2# 25 3# 50 4# 75 5# 100

图 5 HMB 对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定

Fig. 5 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of HMB on tyrosinase

3 讨论

皮肤的颜色取决于黑色素的含量及分布。传统的皮肤生理学认为: 黑色素细胞内含有的酪氨酸, 在酪氨酸酶的作用下逐渐氧化成多巴、多巴醌。中间代谢产物多巴醌再经过一系列的代谢过程, 重新排列并聚合, 最后与蛋白质结合为黑色素蛋白^[6]。可见, 酪氨酸酶是控制黑色素形成的关键酶。通过对该酶活力的调控, 抑制该酶活力以限制皮肤黑斑的形成。目前用作化妆品添加剂, 具有增白效果的主要有曲酸、果酸、熊果苷、维生素 C、动物胎盘提取液和芦荟提取液等, 它们保护皮肤、消除黑斑, 具有增白效果。曲酸和维生素 C 虽然对酪氨酸酶有较强的抑制作用, 但它们相对较不稳定, 保质期较短; 果酸对人体皮肤有较大的刺激作用, 也得不到人们的好评; 动物胎盘提取液、芦荟提取液成本高而且成分较杂、易变质, 也有一定的不足之处^[7]; 熊果苷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 20 世纪 90 年代初就由日本率先应用于化妆品中作为美白添加剂。但熊果苷对酪氨酸酶活力的抑制作用不强^[8], 其 IC_{50} 高达 5.30 mmol L^{-1} , 因此作为化妆品添加剂需要用量大, 一般要高达 2% 才有效果。鉴于上述原因, 仍需不断开发新型化妆品添加剂。此实验结果表明 HMB 对酪氨酸酶的单酚酶稳态活力和二酚酶活力均有抑制作用, 其抑制效应表现为可逆混合型机理, HMB 对酪氨酸酶二酚酶的 IC_{50} 为 $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$, 抑制强度是熊果苷的 32 倍。所以

应用 HMB 作为化妆品添加剂, 具有美白效果, 它是通过与皮肤酪氨酸酶结合而抑制酶活力。此实验室检测了分别添加质量分数为 0.5% HMB 和 2% 熊果苷的化妆品对酪氨酸酶活力的影响, 等量的化妆品处理液和酶处理后, 以熊果苷为添加剂的酶剩余活力为 87.8%, 而以 HMB 为添加剂的酶剩余活力为 66.9%。由此可以看出, 作为不可逆酪氨酸酶抑制剂 (HMB) 可以作为一种有效的化妆品美白剂, 其美白作用是通过抑制酪氨酸酶活力。

近年来, 随着对酪氨酸酶抑制剂抑制机理研究的深入, 可推测出 HMB 的抑制机理可能是通过与酶形成稳定的希夫碱以及与酶活性中心上的铜离子螯合而产生作用。形成稳定的希夫碱结构, 是由于醛基对位的电子供体甲氧基的诱导效应以及邻位羟基的内消旋效应——氮原子上的未配对电子与分子内氢键作用产生一个稳定的类似六元环的螯合结构。同时, HMB 上的甲氧基提高了 HMB 与酶的结合力。另外, 与 HMB 形成希夫碱的氨基酸可能在酪氨酸酶的三级结构中起重要作用。它可能与氢键相关, 而氢键是维持酶的三级结构所必需的。所以, HMB 通过形成希夫碱破坏了酪氨酸酶的三级结构, 从而抑制其活性^[9]。

4 结论

HMB 对酪氨酸酶有显著的抑制作用, 可抑制酪氨酸酶单酚酶的稳态活力和二酚酶的活力。HMB 对二酚酶的抑制作用与曲酸的作用相同, 均表现为可逆的混合型类型。但不同于熊果苷, 后者是竞争性类型。HMB 对酪氨酸酶的抑制强度 (IC_{50} 为 $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$) 是熊果苷的 32 倍 (IC_{50} 为 5.30 mmol L^{-1})。采用 HMB 代替熊果苷作为化妆品增白剂将是一种大胆的尝试, 这是因为 HMB 作为一种植物提取物, 无毒无害, 对皮肤刺激性小, 作用安全且不留白斑, 在一定浓度下还有抑菌作用。植物提取物用于化妆品, 迎合了人们回归自然的意识, 有很强的市场号召力, 天然美白剂的生产与应用在未来的市场将有广阔的前景。

参考文献:

- [1] SÁNCHEZ - FERRER A, RLDRIQUEZ - LOPEZ J N, GARCÍA - CÁNOVAS F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism [J]. BBA - Protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247: 1 - 11.
- [2] 潘兴华, 陈志龙, 黄丽娜. 黑色素细胞及黑素的生成与调节 [J]. 生理科学进展, 1998, 29 (2): 179 - 181.
- [3] KUBO I, KINST - HORI. 2 - hydroxy - 4 - methoxybenzaldehyde: a potent tyrosinase inhibitor from african medicinal plants [J]. Planta Medica, 1996, 65: 19 - 22.
- [4] 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.

- [5] 刘晓丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 42(1): 102 - 106.
- [6] 阎世翔. 化妆品科学 (下册) [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1998. 186 - 191.
- [7] 宋琦如, 金锡鹏, 沈光祖. 几种皮肤美白剂的功效评价 [J]. 日用化学工业, 2002, 32 (2): 47 - 49.
- [8] 宋康康, 黄璜, 陈清西. 熊果甙作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 42 (5):
- [9] KUBO I, KINST- HORI I. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds [J]. Food Chem, 1999, 47: 4 574 - 4 578.

Study of whitening effect of 2 - hydroxy - 4 - methoxy - benzaldehyde used as cosmetic additive

SONG Kang - kang¹, HUANG Huang¹, CHEN Qing - xi¹, CHEN Li - juan², WEN Wen - zhong², CHEN Sheng - yang²

(1. School of Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Zhangzhou Pientzhuang - Queen Cosmetics Co. Ltd, Zhangzhou 363000, China)

Abstract : The inhibition effect of 2-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde (HMB) on the activity of monophenolase and diphenolase contained in tyrosinase was studied using enzymological kinetic method. The results show that the effect of HMB on monophenolase in tyrosinase appears significant inhibition to the stable activity while no effect on the time delay of the enzymatic activity. Following the increase of concentration of the inhibitor, the activity of the monophenolase decreases exponentially. The concentration corresponding to 50 % decline of enzymatic activity (IC_{50}) is $0.352 \text{ mmol L}^{-1}$. The inhibition effect on diphenolase appears a reversible action, with IC_{50} $0.164 \text{ mmol L}^{-1}$. Study on the mechanism of the inhibition action shows that HMB is a kind of mixed inhibitor with inhibition constant K_I and K_{IS} of $0.131 \text{ mmol L}^{-1}$ and $0.253 \text{ mmol L}^{-1}$ respectively.

Key words : additives of cosmetics; whitening effect; tyrosinase; inhibitory mechanism