

两种熊果甙同系物的合成及其 对酪氨酸酶的影响

郭华云, 宋康康, 陈清西*

(厦大学生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 熊果甙作为化妆品添加剂具有增白效果, 主要是由于它对皮肤酪氨酸酶有抑制作用. 以葡萄糖为原料合成了两种熊果甙同系物: 1-对异丙基苯基葡萄糖甙和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙. 并对其结构进行红外光谱分析. 以熊果甙及上述其两种同系物为效应物, 研究对酪氨酸酶活力的影响, 以探讨抑制剂分子结构与其对酪氨酸酶抑制效果的关系. 结果表明, 这 3 种效应物对酪氨酸酶活性的抑制效果为: 熊果甙 > 1-对异丙基苯基葡萄糖甙 > 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙.

关键词: 酪氨酸酶; 熊果甙; 1-对异丙基苯基葡萄糖甙; 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙; 抑制作用

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

酪氨酸酶 (EC. 1. 14. 18. 1) 是生物体合成黑色素等色素的关键酶, 与人体某些疾病如色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤、白化病和老年性痴呆直接相关^[1-3]. 因此, 酪氨酸酶抑制剂在医药治疗及美白化妆品上有较好的应用价值. 熊果甙是目前开发应用较多的化妆品美白有效成分, 其对酪氨酸酶的抑制机理已有研究^[4]. 为了进一步探讨其分子结构中有效基团对酪氨酸酶活力的影响, 我们化学合成了两种熊果甙同系物, 比较研究它们对酪氨酸酶的影响.

由于糖苷类在医药、化工等方面的广泛应用, 糖苷类的合成具有重要意义. 目前, 常规使用的合成方法产率较低, 我们改用三乙胺、BF₃·乙醚液法得到较高的产率. 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙是一种熊果甙植物提取物中的副产物, 具有尿道消毒的功效. 还未有报道其化学合成方法.

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

酪氨酸酶购于 Sigma 化学公司, 从蘑菇提取纯化, 酶的比活力为 6 680 U/mg (25 °C); 熊果甙和二甲基亚砜 (DMSO) 也为 Sigma 化学公司产品; L-3, 4-二羟基苯氨酸 (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试剂, 使用的蒸馏水为玻璃重蒸水.

分光光度计为 Beckman DU 650, 红外光谱仪为 Nicolet Avatar FT-IR360.

1.2 方法

1-对异丙基苯基葡萄糖甙和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙合成的条件方法见结果部分, 中间产物检测采用薄板层析, 终产物的鉴定采用薄板层析和红外光谱分析.

酪氨酸酶活力的测定是以 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 含不同浓度的样品于比色杯中, 再加进 2.8 mL 预先在 30 °C 恒温水浴保温的底物溶液和 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, 从直线斜率求得酶活力^[5,6]. 测定所用仪器为 UV-650 分光光度

收稿日期: 2004-06-09

基金项目: 福建省科技攻关课题 (2004N002) 和福建省自然科学基金 (B0410003) 资助

作者简介: 郭华云 (1961 -), 女, 硕士研究生.

* Corresponding author,

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

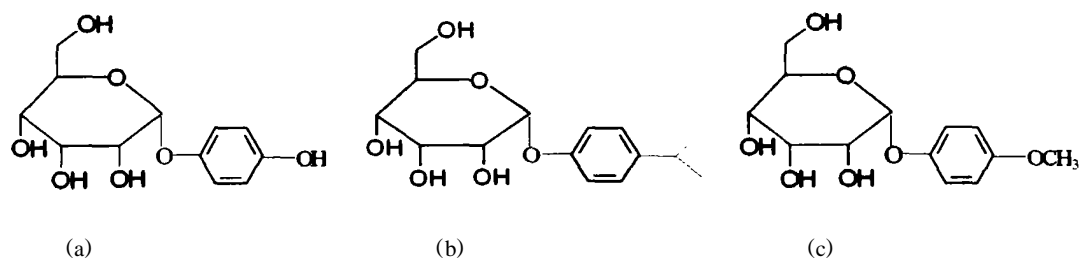


图 1 熊果甙(a)、1-对异丙基苯基葡萄糖甙(b)和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙(c)的化学结构式

Fig. 1 Structure of arbutin (a), *p*-isopropylphenyl-D-glycopyranose (b) and *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose (c)

计.

2 实验结果

2.1 化合物 1-对异丙基苯基葡萄糖甙和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙的合成

熊果甙(a)、1-对异丙基苯基葡萄糖甙(b)和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙(c)的化学结构式见图 1. 分子结构差异在于苯环上的对位取代基不同,分别为羟基、异丙基和甲氧基.

2.1.1 五-乙酰葡萄糖的合成及鉴定

取无水葡萄糖 60 g (0.333 mol), NaOH 48 g, 醋酸酐 300 mL 于 500 mL 带有机机械搅拌、回流冷凝管、温度计的三颈瓶中, 缓慢加热, 控制反应温度 90 ~ 110, 反应 2 h, 冷却后倒入 3 L 的冰水混合物, 待析出白色结晶, 抽滤, 用 1 050 mL 甲醇和水的混合溶液(体积比为 1:2)进行重结晶. 得白色结晶产物 107.4 g, 产率为 82.6%.

2.1.2 对异丙基苯基葡萄糖甙(b)的合成及鉴定

取五-乙酰葡萄糖 19.5 g (0.05 mol), 对异丙基苯酚 10.6 g (0.075 mol), 三乙胺 5.7 g (0.055 mol), 溶解于 35 mL 经干燥的二氯甲烷, 于 30 下, 0.5 h 内滴加 $\text{BF}_3 \cdot \text{乙醚液}$ 15.0 g, 在 30 ~ 45 温度反应 18 h, 加入 50 mL 水, 分离油层, 油层再用 30 mL 水洗涤, 有机相旋转蒸发干燥得白色针状结晶 14.8 g, 经薄板层析鉴定(展开剂为二氯甲烷/乙酸乙酯(3/1)混合液)为单一斑点, 说明五-乙酰葡萄糖在此条件下可以有效与异丙基苯酚缩合反应生成 1-对异丙基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙, 分析测定合成的产率为 75.8%.

取 1-对异丙基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙 12.5 g 于 63 mL 甲醇, 63 mL 20% Na_2CO_3 水溶液中进行水解反应, 反应温度控制在 60 ~ 65 值之间, 反应 2 h 后除去溶剂, 再用异丙醇、乙醇结晶, 获得所要的终产物——对异丙基苯基葡萄糖甙(b). 采

用薄板层析(展开剂为甲苯/甲醇等体积混合)鉴定, 获得单一斑点. 采用 KBr 压片制样, 经红外光谱鉴定, 测得产物(b)的红外光谱特征为: 3462 (O-H) cm^{-1} , 1 429, 1 375, 1 231, 1 136 (C-O) cm^{-1} , 1 514 cm^{-1} .

2.1.3 对甲氧基苯基葡萄糖甙(c)的合成及鉴定

取五-乙酰葡萄糖 19.5 g (0.05 mol), 对甲氧基苯酚 9.8 g (0.075 mol), 三乙胺 5.7 g (0.055 mol), 溶解于 35 mL 经干燥的二氯甲烷, 于 30 下, 0.5 h 内滴加 $\text{BF}_3 \cdot \text{乙醚液}$ 15.0 g, 在 30 ~ 45 温度范围反应 18 h, 加入 50 mL 水, 分离油层, 油层再用 30 mL 水洗涤, 有机相旋转蒸发干燥得白色针状结晶 9.94 g, 经薄板层析鉴定(展开剂为二氯甲烷/乙酸乙酯(3/1)混合液)为单一斑点, 经红外光谱鉴定, 采用 KBr 压片制样, 测得中间物-1-对甲氧基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙的红外光谱特征为: 1 747 (C=O) cm^{-1} , 1 445, 1 373, 1 225, 1 118 (C-O) cm^{-1} , 1 509 cm^{-1} (苯环 C-H), 1 077 cm^{-1} , 1 048 cm^{-1} , 909 cm^{-1} , 831 cm^{-1} . 说明五-乙酰葡萄糖在此条件下可以有效与甲氧基苯酚缩合反应生成 1-对甲氧基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙, 分析测定合成的产率为 42.3%.

取 1-对甲氧基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙 12.5 g 于 63 mL 甲醇, 63 mL 20% Na_2CO_3 水溶液中进行水解反应, 反应温度控制在 60 ~ 65 之间, 反应 2 h 后除去溶剂, 再用异丙醇、乙醇结晶, 得所要的终产物-对甲氧基苯基葡萄糖甙(c). 采用薄板层析(展开剂为甲苯/甲醇等体积混合)鉴定, 获得单一斑点. 经红外光谱鉴定, 采用 KBr 压片制样, 测得产物(c)的红外光谱特征为: 3 386 (O-H) cm^{-1} , 1 410, 1 246, 1 218, 1 102 (C-O) cm^{-1} , 1 565, 1 510 cm^{-1} (苯环 C-H), 其结果见图 2.

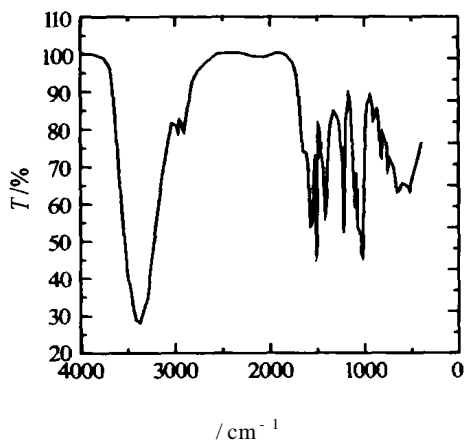


图2 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙的红外光谱谱图

Fig. 2 The IR spectra of *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose (c)

2.2 化合物 1-对异丙基苯基葡萄糖甙和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙的红外光谱及分析

如图 2 所示,化合物 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙具有糖类物质的特征吸收峰,3 420 cm^{-1} 左右有强的-OH 键的伸缩振动,1 640 cm^{-1} 左右有 C=O 非对称伸缩振动峰,1 083 cm^{-1} 左右有 O-H 变角振动峰.而化合物 1-对甲氧基苯基-2,3,4,6-四乙酰葡萄糖甙在 1 751 和 1 228 cm^{-1} 左右有明显的乙酰基峰.化合物 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙乙酰基峰消失,3 420 cm^{-1} 左右出现明显强的羟基吸收峰,说明水解完全.化合物 1-对异丙基苯基葡萄糖甙和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙在 1 600 ~ 1 450 cm^{-1} 均有吸收峰,表明有苯环存在.1 644 cm^{-1} 附近有吸收峰,是苯环上的 C=C 伸缩振动引起的.

2.3 化合物对酪氨酸酶酶活力的影响

测定熊果甙 (a)、1-对异丙基苯基葡萄糖甙 (b) 和 1-对甲氧基苯基葡萄糖甙 (c) 对酪氨酸酶活力的影响,结果见图 3,可以看出,3 种物质对酪氨酸酶活力均有一定的抑制作用,抑制作用强度依次为: (a) > (b) > (c). 当效应物浓度为 10 mmol/L 时,分别可以使酶活力下降 56%、35% 和 12%.

3 讨论

研究结果表明,采用醋酸酐-醋酸钠法合成五乙酰葡萄糖,产率达到 80% 以上,而且后处理步骤简单,产物易于分离纯化.三乙胺和 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2$ 醚液用于糖苷化合物的合成在国内尚未见报道,我们以其

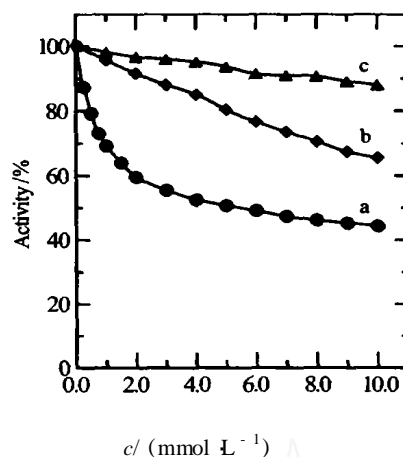


图3 熊果甙 (a)、对异丙基苯基葡萄糖甙 (b) 和对甲氧基苯基葡萄糖甙 (c) 对酪氨酸酶活力的影响

Fig. 3 Effects of arbutin (a), *p*-isopropylphenyl-D-glycopyranose (b) and *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose (c) on the activity of mushroom tyrosinase

用于目标化合物的合成,取得了较高的产率,并用红外光谱鉴定结构,证明了目标产物的结构.

熊果甙已广泛应用于美白化妆品,90 年代初就由日本率先应用于化妆品而作为美白添加剂^[7]. 对于其对酪氨酸酶的抑制机理,我们已较深入进行了研究^[4]. 现已基本阐明分子中具有强的亲水葡萄糖部分可以有效对皮肤保水并能容易透入皮肤外层,而酚基是酪氨酸酶的竞争性抑制剂,可以有效降低酪氨酸酶的活性,限制黑色素的形成.为了进一步验证其抑制机理及探讨抑制剂分子结构与其对酪氨酸酶活力抑制效果的关系.我们合成了对甲氧基苯基葡萄糖甙和对异丙基苯基葡萄糖甙,与熊果甙相比较,研究其对酪氨酸酶酶活力的影响.研究结果表明,对异丙基苯基葡萄糖甙和对甲氧基苯基葡萄糖甙对酪氨酸酶的抑制效果均不如熊果甙.而高浓度对异丙基苯基葡萄糖甙可能是通过苯环上的异丙基引起酪氨酸酶构象细微变化,导致了酶活性的下降.

参考文献:

- [1] 赵会全,刘望夷.酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J].国外医学分子生物学分册,1999,13(6):273-292.
- [2] Sanchezferrer A, Rodríguez-López J N, Gavarró C, Álvarez F, et al. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-protein and molecular Enzymology, 1995, 1247: 1-11.
- [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] 宋康康,丘陵,黄璜,等.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(6):791-794.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 杨跃飞.熊果甙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.

The Synthesis of two Arbutin Derivatives and Inhibitory Effect of Them on Mushroom Tyrosinase

GUO Hua-yun ,SONG Kang-kang ,CHEN Qing-xi *

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering ,
School of Life Sciences , Xiamen University , Xiamen 361005 ,China)

Abstract: Tyrosinase (1.14.18.1) is a metalloenzyme oxidase, known as a key enzyme in melanin biosynthesis, involved in determining the color of mammalian skin and hair. Its abnormal expressing would contribute to various dermatological disorders, such as melasma, age spots, and sites of actinic damage. The inhibitors of tyrosinase can become potent whitening agents to meet the medical requirements for depigmenting agents. Arbutin is a cosmetic additive for whitening, according to that it can inhibit tyrosinase activity. In this paper, two kinds of arbutin derivatives were synthesized derived from D-glucose. The derivatives were *p*-isopropylphenyl-D-glycopyranose and *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose. Adding to triethylamine and BF₃ ether, 1',2',3',4',6'-*pent*-O-acetyl-D-glycose was reacted with *p*-isopropylphenol and *p*-methoxyphenol to afford the target product, respectively. The structure of products were identified by IR spectra. Thesis three compounds acted as effector study the inhibit effect of them on mushroom tyrosinase when L-DOPA is substrate. It can help study deeply the relationship between the structure of inhibitors and the inhibitor capacity of them on the tyrosinase. The result elucidated the sequence of inhibitor capacity: arbutin > *p*-isopropylphenyl-D-glycopyranose > *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose. It showed that the hydroxy group on the benzene ring acted important effect on inhibitory capacity, which according with the result reported that arbutin was a competitive inhibitor.

Key words: tyrosinase; arbutin; *p*-isopropylphenyl-D-glycopyranose; *p*-methoxyphenyl-D-glycopyranose; inhibitory effect