

# 桑叶黄酮抑制酪氨酸酶活性的动力学研究

付建红<sup>1</sup>, 祁瑞<sup>2</sup>, 郑静<sup>2</sup>, 周晨婕<sup>2</sup>, 陈清西<sup>2</sup>

(1. 新疆师范大学 生命科学学院 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005)

**摘要:**采用超声波辅助法,以体积分数为60%的乙醇水溶液从新疆桑叶粉末中提取桑叶黄酮。以L-多巴为底物,采用酶动力学方法研究该提取物对酪氨酸酶的抑制作用。实验结果表明,桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶有较强的抑制作用,其IC<sub>50</sub>为0.2 g·L<sup>-1</sup>。其对酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应,抑制类型为混合型抑制,对游离酶的抑制常数(K<sub>i</sub>)和对酶-底物络合物的抑制常数(K<sub>is</sub>)分别为366和873 mg·L<sup>-1</sup>。DPPH实验显示新疆桑叶黄酮提取物具有一定的抗氧化作用,对DPPH自由基氧化作用相对活性的IC<sub>50</sub>为25 mg·L<sup>-1</sup>,与V<sub>C</sub>效果相当。

**关键词:**美白化妆品添加剂;桑叶黄酮;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(2014)10-0564-04

DOI: 10.13218/j.cnki.csdc.2014.10.126

## Study of kinetics with respect to action of flavonoid from mulberry leaves on inhibition of activity of tyrosinase

FU Jian-hong<sup>1</sup>, QI Rui<sup>2</sup>, ZHENG Jing<sup>2</sup>, ZHOU Chen-jie<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Species Diversity Application and Control in Xinjiang, College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** Flavonoid was extracted from powder of mulberry leaves planted in Xinjiang with 60% (vol) ethanol aqueous solution under assistance of ultrasonic wave. Adopting enzymatic kinetic method, inhibitory action of the extract on tyrosinase activity was studied using L-dopa as the substrate. Results showed that the flavonoid extract displays rather strong inhibitory action on activity of tyrosinase. Its IC<sub>50</sub> was estimated as 0.2 g·L<sup>-1</sup>. The inhibition mechanism was studied and it was found that the reaction is reversible and type of the inhibition belongs to the mixed type, with the inhibition equilibrium constants for inhibitor binding with free enzyme K<sub>i</sub> and with enzyme-substrate complex K<sub>is</sub> were determined as 366 and 873 mg·L<sup>-1</sup> respectively. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical test results showed that the flavonoid extract has the antioxidant activity to a certain extent. The IC<sub>50</sub> is 25 mg·L<sup>-1</sup> that is similar to vitamin C.

**Key words:** whitening cosmetics additive; flavonoid from mulberry leaves; tyrosinase; inhibitory mechanism

黄酮类化合物广泛存在于植物中,研究表明,黄酮具有多种药理活性,如抗氧化、消炎、抗癌和抗基因突变等<sup>[1]</sup>。Kubo等<sup>[2]</sup>从天然植物(苜蓿、腰果等)中提取了一系列可抑制酪氨酸酶的物质,经检测主要为黄酮类化合物,并测定和研究了它们对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用与抑制效应机理。Xie等<sup>[3]</sup>研究了一系列黄

酮类化合物对酪氨酸酶活力的影响,实验结果表明,栝精、高良姜精、非瑟酮、3,7,4-三羟基黄酮和桑色素等黄酮类化合物都是酪氨酸酶的竞争性抑制剂。

近年来对桑叶化学成分的研究表明,桑叶中含有黄酮类、生物碱类、苯丙素类、有机酸类、甾体及三萜类等多种化合物<sup>[4]</sup>。桑叶中总黄酮含量(质量分数)约

收稿日期: 2014-08-08; 修回日期: 2014-09-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点资助项目(XJEDU2012I30); 新疆师范大学校级重点学科招标课题资助项目(XJMB-1)

作者简介: 付建红(1970-),女,河南人,副教授,博士,电话:(0991)3693666, E-mail: fjh\_719@163.com。

占桑叶干质量的 1.0% ~ 3.0% ,是所有植物茎叶中含量较高的<sup>[5]</sup> ,也是桑叶发挥抗氧化、抑制血清脂质增加以及抑制动脉粥样硬化形成等作用的主要活性成分之一。桑叶总黄酮主要包括芦丁、槲皮素、异槲皮苷及紫云英苷等。不同产地的桑叶中黄酮类化合物种类不同,对酶的抑制作用也不同<sup>[6-7]</sup>。姜玉兰<sup>[6]</sup>从长白山桑叶乙醇提取物中分离得到的山奈酚-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷和槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷均对酪氨酸酶活性有较好的抑制作用。王芳<sup>[7]</sup>从浙江湖州桑叶中提取得到的芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、桑色素和山奈酚等对酪氨酸酶活力具有抑制作用。笔者采用超声波辅助法提取新疆桑叶中的黄酮类物质,以桑叶黄酮提取物作为效应物,研究其对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响及抑制作用机理,探讨抑制剂和酶分子间结合作用的分子模型,为桑叶黄酮类物质在化妆品领域的开发和应用提供一定的理论依据。

## 1 实验方法

### 1.1 试剂与仪器

桑叶,采自新疆吐鲁番地区;芦丁标准品,购自中国药品生物制品检定所;蘑菇酪氨酸酶(比活力为 6 680 U · mg<sup>-1</sup>)、L-多巴(L-DOPA)、二甲亚砜(DMSO)和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯;实验用水为去离子重蒸水,无特别说明该文中溶液均为去离子重蒸水配制。KQ5200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SHB-III 型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;EYELA 旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;DU800 分光光度计,美国贝克曼库尔特有限公司;DKB-501A 型超级恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;高速粉碎机,姜堰市银河仪器厂。

### 1.2 桑叶黄酮类物质的提取

将新疆桑叶洗净、低温干燥后粉碎。称取桑叶粉末 6 g 加入 300 mL 体积分数为 60% 的乙醇水溶液,室温浸泡 3 h 后进行超声波处理,超声波功率为 200 W,超声温度为 30 °C,超声时间为 90 min;真空抽滤提取物,滤液用旋转蒸发仪蒸发浓缩,冷冻干燥后得到桑叶黄酮提取物。将提取物用含体积分数为 5% 的 DMSO 磷酸盐缓冲液溶解,制成 15 g · L<sup>-1</sup> 的提取物溶液,再分别吸取 0.25、0.50、0.75 和 100  $\mu$ L 提取物溶液加入到 3.0 mL 酪氨酸酶测活体系中,得到终质量浓度分别为 0.0125、0.025、0.0375 和 0.5 g · L<sup>-1</sup> 的桑叶黄酮提取物溶液。

### 1.3 芦丁标准曲线的绘制

精密称取芦丁标准品 13.2 mg,用体积分数为 60% 的乙醇水溶液溶解,配制质量浓度为 0.528 g · L<sup>-1</sup> 的芦丁标准溶液。分别准确吸取芦丁标准溶液 0.04、0.08、0.12、0.16 和 0.20 mL 置于 10 mL 容量瓶内,分别加入 2.0、1.6、1.2、0.8、0.4 和 0 mL 体积分数为 60% 的乙醇水溶液;在此体系中依次分别加入质量分数为 5% 的亚硝酸钠溶液 0.5 mL(摇匀静置 6 min)、质量分数为 10% 的硝酸铝溶液 0.5 mL(放置 6 min)和质量分数为 4% 的氢氧化钠溶液 4.0 mL,最后用体积分数为 60% 的乙醇水溶液定容,摇匀后静置 15 min,于 510 nm 处测定吸光度。用体积分数为 60% 的乙醇水溶液作空白参比液,以芦丁质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

### 1.4 对酪氨酸酶二酚酶活力影响测定

酪氨酸酶二酚酶活力的测定参考文献[8]。通过测定酶催化反应体系的  $A_{475}$  随着时间的增长直线,从直线斜率即可求得二酚酶活力。

桑叶黄酮提取物溶于含 DMSO 的磷酸盐缓冲液中,制成不同质量浓度的提取物溶液(同 1.2)。以 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 L-DOPA(终浓度)为底物,在 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH=6.8)的 3 mL 测活体系中,先加入 0.1 mL 不同质量浓度的提取物溶液于比色杯中,再加入 2.8 mL 预先在 30 °C 恒温水浴保温的底物溶液和 0.1 mL 蘑菇酪氨酸酶溶液,立刻混匀,在 30 °C 恒温条件下测定  $A_{475}$  随着时间的增长直线。产物的消光系数( $\epsilon$ )为 3 700 L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>[9],酶活力计算公式为:酶活力 = ( $A_{475} \times 1 000$ ) / 3.7。提取物的抑制强度以导致相对酶活力下降 50% 所需的提取物质量浓度(IC<sub>50</sub>)表示,以下式计算相对酶活力:

$$\text{相对酶活力} = \frac{\text{加提取物后的酶活力}}{\text{不加提取物的酶活力}} \times 100\%$$

### 1.5 对酪氨酸酶二酚酶的抑制机理考察

在酶活力测定体系中(同 1.4),固定底物(L-DOPA)浓度为 0.5 mmol · L<sup>-1</sup>,加入不同质量浓度的桑叶黄酮提取物溶液,改变酪氨酸酶的加入量,测定酶活力与酶质量浓度的关系,进而测定酶促反应速率与酶质量浓度的关系。当底物浓度相同时,酶活力与酶促反应速率呈正比关系。根据酶促反应速度与酶质量浓度的相关性来判断桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制作用机理。

在测活体系中固定酪氨酸酶的质量浓度,加入不

同质量浓度的桑叶黄酮提取物溶液,改变底物( $L - DOPA$ )的浓度,测定不同底物下的酶促反应初速度,初速度是通过吸光度的改变值求得,即酶反应初速度 $= (A_{475} \times 1000) / 3.7$ 。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( $V_{max}$ )的变化来判断抑制类型,并以双倒数斜率和纵轴截距对抑制剂(提取物)浓度二次作图,求得对游离酶的抑制常数( $K_I$ )和对酶-底物络合物的抑制常数( $K_{IS}$ )。

### 1.6 体外抗氧化活性测定

采用 DPPH 法测定桑叶黄酮提取物清除氧自由基的能力<sup>[10]</sup>,在 3.0 mL 测活体系中,依次加入 1.0 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup>的醋酸缓冲液(pH = 5.5),1.87 mL 无水乙醇 0.1 mL 3 mmol · L<sup>-1</sup>的 DPPH(溶于无水乙醇),最后加入 0.03 mL 终质量浓度为 0 ~ 0.5 g · L<sup>-1</sup>的桑叶黄酮提取物溶液,立刻混匀,在 25 °C 恒温条件下反应 20 min,测定 517 nm 处的吸光度。以不加提取物为对照,计算 DPPH 自由基的相对活性,计算方法参照文献[10]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 桑叶黄酮的提取工艺

以吸光度( $A$ )为纵坐标,芦丁质量浓度( $\rho$ )为横坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程 $A = 11.425\rho - 0.018$ ,相关系数 $r = 0.9999$ 在 0.02 ~ 0.10 g · L<sup>-1</sup>内吸光度和芦丁质量浓度线性关系良好。

桑叶黄酮类物质提取的单因素实验主要考察提取溶剂乙醇的体积分数、超声时间和料液比对黄酮提取率的影响。在单因素实验的基础上,运用正交试验设计优化提取工艺,确定超声波辅助法提取桑叶黄酮的较佳提取工艺为:6 g 桑叶粉末,加入体积分数为 60% 的乙醇溶液 300 mL 浸泡 3 h 后进行超声波处理,超声波功率为 200 W,超声温度 30 °C,超声时间 90 min。用 DMSO 溶解桑叶黄酮提取物,于 510 nm 下测定吸光度。根据回归方程计算桑叶黄酮提取物的 DMSO 溶液中黄酮的质量浓度为 21.1 mg · L<sup>-1</sup>,黄酮提取率为 3.61%。

### 2.2 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

在以  $L - DOPA$  为底物的测活体系(见 1.4)中,加入不同质量浓度的桑叶黄酮提取物(效应物)溶液,以不加效应物为对照,测定相对酶活力,结果见图 1。由图 1 可知,桑叶黄酮提取物的  $IC_{50}$  为 0.2 g · L<sup>-1</sup>,对蘑

菇酪氨酸酶二酚酶活力有较强的抑制作用,随着效应物质量浓度的增大,相对酶活力呈指数下降。

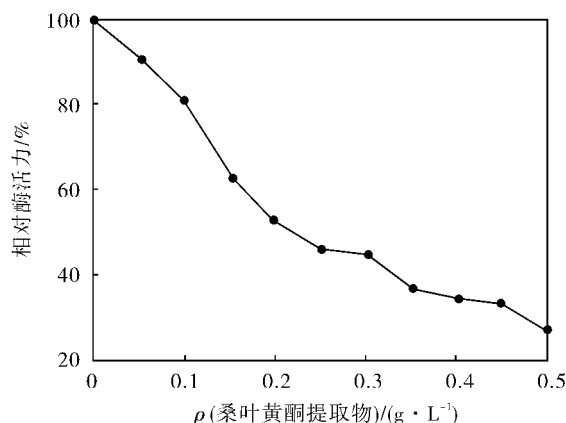


图 1 桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Fig. 1 Effect of flavonoid extract of mulberry leaves on the activity of diphenolase of tyrosinase

### 2.3 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制效应

在固定底物( $L - DOPA$ )浓度的测活体系(见 1.4)中,加入不同质量浓度的桑叶黄酮提取物溶液,改变酶的加入量,测定经桑叶黄酮提取物作用后酪氨酸酶二酚酶活力与加入酶量之间的关系,实验结果见图 2,直线 0—4 代表桑叶黄酮提取物的质量浓度分别为 0, 0.125, 0.25, 0.375 和 0.5 g · L<sup>-1</sup> 时对酶活力的影响。由图 2 可知,随着桑叶黄酮提取物质量浓度的增大,直线斜率逐渐下降,说明桑叶黄酮提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用属于可逆过程。也就是说桑叶黄酮提取物是通过抑制酶活力而导致催化效率降低,而不是通过减少有效酶量导致酶活力下降。若是不可逆抑制剂将会导致有效酶量下降而产生一组平行线,横轴的截距将随着不可逆抑制剂浓度的增大而增大<sup>[11]</sup>。

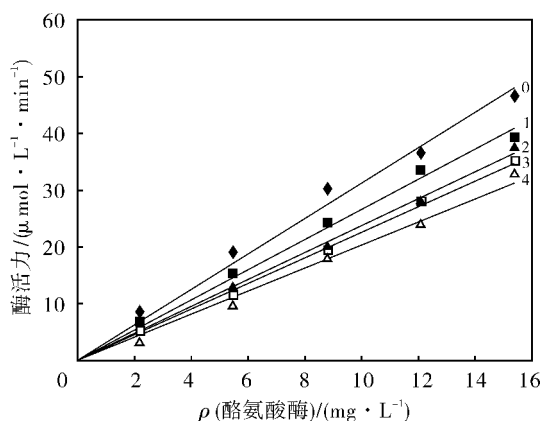


图 2 桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制作用机理曲线

Fig. 2 Inhibition mechanism of flavonoid extract from mulberry leaves on diphenolase of tyrosinase

## 2.4 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的动力学分析

在酶活力测定体系(见 1.4)中,固定酪氨酸酶的质量浓度,改变底物  $L-DOPA$  浓度,测定不同浓度底物对酶促反应速度的影响,以 Lineweaver - Burk 双倒数作图法来判断抑制机制类型,结果见图 3,图 3 中,横坐标  $c_s^{-1}$  表示底物浓度的倒数,  $\nu^{-1}$  表示反应速率的倒数,直线 1—5 代表桑叶黄酮提取物质量浓度分别为 0, 0.125, 0.25, 0.375 和 0.5  $g \cdot L^{-1}$ 。由图 3 可知,随着桑叶黄酮提取物质量浓度的增大,直线的斜率和截距也相应增大,  $K_m$  增大而  $V_{max}$  减小,表明效应物既影响酶对底物的亲和力也影响酶的催化作用,桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶的抑制类型表现为混合型,说明该提取物既能与游离酶(E)结合,也能与酶-底物络合物(ES)结合,但抑制作用强度不同。以双倒数直线的斜率和纵轴截距对桑叶黄酮提取物质量浓度二次作图,分别求出  $K_1 = 366 mg \cdot L^{-1}$  和  $K_{IS} = 873 mg \cdot L^{-1}$ 。  $K_1 < K_{IS}$ , 说明桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶游离酶的抑制作用较对酶-底物络合物的抑制作用强,底物对酶被桑叶黄酮提取物的抑制有一定的保护作用<sup>[11]</sup>。

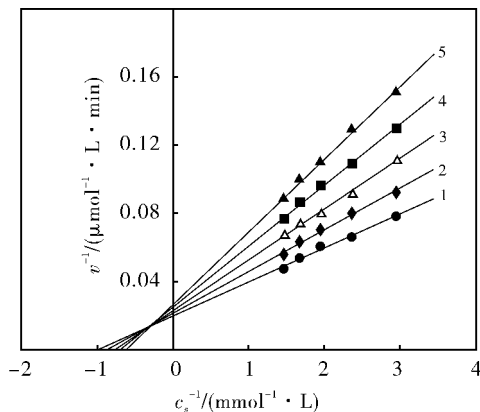


图 3 桑叶黄酮提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型和抑制常数的测定

Fig. 3 Determination of the inhibition type and inhibition constant of the flavonoid extract from mulberry leaves on diphenolase of tyrosinase

## 2.5 体外抗氧化活性

采用 DPPH 法研究桑叶黄酮提取物清除氧自由基的活性,实验结果见图 4。由图 4 可知,导致 DPPH 自由基氧化作用相对活性下降一半的桑叶黄酮提取物的终质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 25  $mg \cdot L^{-1}$ ,实验同时测定了阳性对照  $V_C$  的  $IC_{50}$  为 22  $mg \cdot L^{-1}$ ,两者抑制 DPPH 自由基活性的  $IC_{50}$  相当,可见桑叶黄酮提取物具有一定的清除 DPPH 自由基的能力。

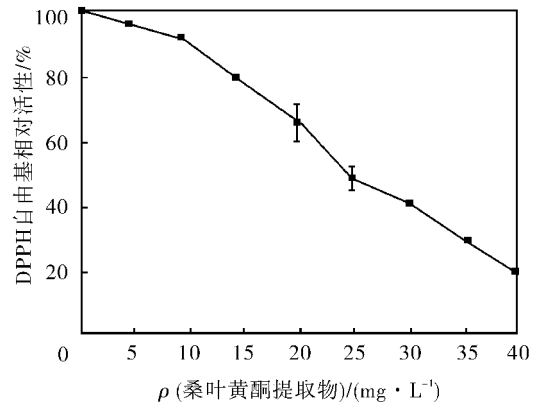


图 4 桑叶黄酮提取物的抗氧化活性

Fig. 4 Effect of the flavonoid extract from mulberry leaves on activity of antioxidation

## 3 结论

1) 采用超声波辅助法提取得到的新疆桑叶黄酮提取物可有效抑制酪氨酸酶二酚酶活性,其  $IC_{50}$  为 0.2  $g \cdot L^{-1}$ ,从而可有效阻止  $L$ -多巴的氧化,减少黑色素的生成。

2) 酶的抑制动力学研究表明,桑叶黄酮提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶表现为混合型可逆抑制类型。DPPH 实验显示桑叶黄酮提取物具有一定的抗氧化活性,其对酶的抑制作用机理可能与其抗氧化活性作用机理相关。

参考文献:

- [1] 李楠,刘元,侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性[J]. 食品研究与开发 2005 26(6): 139-141.
- [2] KUBO I, KINOSHITA H, HORI I, CHAUDHURI S K, et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria [J]. Bioorg Med Chem 2000 8: 1749-1755.
- [3] XIE L P, CHEN Q X, HUANG H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Biochemistry, 2003 68(4): 487-491.
- [4] 李明聪, 杨丹, 郭英, 等. 桑叶中黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志 2012 39(2): 377-380.
- [5] 杨海霞, 朱祥瑞, 陆洪省. 桑叶保健制品开发利用研究进展[J]. 科技通报 2003 19(1): 72-76.
- [6] 姜玉兰. 桑叶抑制酪氨酸酶活性成分的研究[D]. 吉林: 延边大学 2007: 1-2.
- [7] 王芳. 桑叶中酪氨酸酶活性抑制成分的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学 2008: 2.
- [8] CHEN Q X, SONG K K, WANG Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2003 18(6): 491-496.
- [9] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活性的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版 2003 42(1): 98-101.
- [10] KHATIB S, NERYA O, MUSA R. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2005 13(2): 433-441.
- [11] 陈清西. 酶学及其研究技术[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2010: 102-120.