

黑果枸杞果实提取物中 花色苷对酪氨酸酶活性的抑制作用初探

黄佳楠¹, 管福琴¹, 李林蔚¹, 李晓莺², 禄璐², 米佳², 刘兰英^{2,①}, 陈雨^{1,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室
江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 2. 宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所, 宁夏 银川 750002]

Preliminary study on inhibitory effect of anthocyanins from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* on tyrosinase activity HUANG Jianan¹, GUAN Fuqin¹, LI Linwei¹, LI Xiaoying², LU Lu², MI Jia², LIU Lanying^{2,①}, CHEN Yu^{1,①}
(1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Wolfberry Engineering Technology and Research Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(3): 75-77

Abstract: Taking anthocyanin 1 and anthocyanin 2 isolated by activity orientation from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* Murr. as materials, their inhibition rates on tyrosinase monophenolase and tyrosinase diphenolase activities were compared, and their structural identification and molecular docking research with tyrosinase were conducted. The results show that the inhibitory effect of anthocyanin 1 on tyrosinase activity is stronger, its semi-inhibitory concentration on tyrosinase monophenolase and tyrosinase diphenolase activities is 25.44 and 153.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Anthocyanin 1 and anthocyanin 2 are petunia-3-*O*-(6'''-*O*-*trans-p*-coumaroyl) rutinoside-5-*O*-glucoside and petunia-3-*O*-(6'''-*O*-(4''''-*O*-glucosyl) *trans-p*-coumaroyl) rutinoside-5-*O*-glucoside, respectively. The binding ability of anthocyanin 1 with tyrosinase is stronger, its binding energy is $-7.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. In conclusion, anthocyanin 1 has a stronger inhibitory effect on tyrosinase activity, so it can be used as an effective component of whitening products.

关键词: 黑果枸杞; 果实; 花色苷; 酪氨酸酶活性; 抑制作用

Key words: *Lycium ruthenicum* Murr.; fruit; anthocyanin; tyrosinase activity; inhibitory effect

中图分类号: Q946.83; S567.1⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)03-0075-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.03.11

酪氨酸酶广布生物体内,为催化黑色素合成的关键限速酶^[1],可催化 *L*-酪氨酸(*L*-Tyr)生成 *L*-多巴(*L*-DOPA),并氧化 *L*-DOPA 形成多巴醌,该酶在上述反应中分别被称为酪氨酸酶单酚酶和酪氨酸酶二酚酶^[2]。酪氨酸酶抑制剂是美白产品的重要成分,目前主要为曲酸和对苯二酚等,对人体有一定的副作用^[3]。植物体内天然的多酚类成分可安全、有效地抑制酪氨酸酶活性^[4-6],为近年来美白产品研发的重点。

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)可补肾益精、养肝明目、补血安神^[7],并具有抗氧化、抗衰老及调节免疫等作用^[8-9],其果实中的花色苷具有抗氧化、抗肿瘤、延缓衰老和美白保湿等作用^[9-10],可作为美白产品原料^[11]。为了明确黑果枸杞果实中花色苷的美白功效,作者鉴定了其果实提取物活性导向分离的 2 个花色苷的结构,比较了二者对酪氨酸酶

活性的抑制率,并研究了其与酪氨酸酶的分子对接状况,以期在黑果枸杞果实中花色苷的美白机制研究及其美白产品质量标准制定提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试花色苷 1 和花色苷 2 从黑果枸杞品系‘W-13-10-01’的成熟干燥果实(采自宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所芦花台枸杞种植基地)提取物中经活性导向分离获得。

主要试剂:*L*-Tyr、*L*-DOPA、酪氨酸酶和曲酸均为分析纯级,购自美国 Sigma 公司;乙腈为色谱纯级,购自美国 Tedia 公司;磷酸氢二钾和磷酸二氢钾均为分析纯级,购自南京化学试剂

收稿日期: 2019-11-13

基金项目: 宁夏农林科学院对外科技合作专项(DW-X-2018014; DW-X-2018009); 国家自然科学基金青年基金项目(31401898)

作者简介: 黄佳楠(1993—),女,江苏南通人,硕士研究生,主要从事天然药物化学研究工作。

①通信作者 E-mail: syndia1980@126.com; chenyu@cnbg.net

剂有限公司;水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 LC-MS 分析 使用 Agilent 1260 UPLC-DAD-6530 ESI Q-TOF MS 液质联用仪(美国 Agilent 公司)进行检测分析,色谱柱为 ZORBAX SB C₁₈(1.8 μm, 4.6 mm×100 mm)。流动相为乙腈(A)和体积分数 0.1% 甲酸溶液(B)的混合液,采用体积分数 18%A 等度洗脱 15 min,流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 310 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。质谱条件为:ESI 离子源,正离子模式(m/z 1 000-3 200);雾化器压力 50 psi;干燥气流速 10 mL·min⁻¹,温度 350 °C;毛细管电压 4 000 V,Fragmentor 电压 205 V;MS/MS 碰撞能量 35 V。

1.2.2 对酪氨酸酶活性的抑制分析 以 *L*-Tyr 和 *L*-DOPA 为底物,并对文献[12]的方法稍作调整。将 50 μL 花色苷溶液、50 μL PBS 缓冲液(pH 6.8)和 50 μL 100 U·mL⁻¹酪氨酸酶溶液加入 96 孔板中,每个花色苷设 4 个技术重复,37 °C 孵育 10 min;加入 100 μL 底物,37 °C 孵育 5 min;用 Infinite M200 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)测定反应液在波长 475 nm 处的 OD 值,每组实验重复 3 次。以 14.21 μg·mL⁻¹曲酸为阳性对照,初筛时,花色苷质量浓度为 200.00 μg·mL⁻¹,选择对酪氨酸酶活性抑制率高于 50% 的花色苷进行梯度分析,质量浓度设为 12.50、25.00、50.00、100.00 和 200.00 μg·mL⁻¹。花色苷对酪氨酸酶活性抑制率(*IR*)的计算公式为 $IR = [1 - (OD_C - OD_D) / (OD_A - OD_D)] \times 100\%$,式中,OD_A、OD_B、OD_C 和 OD_D 分别为阴性对照组(加 PBS 和酶)、空白组(只加 PBS)、实验组(加样品和酶)和实验对照组(加样品和 PBS)反应液的 OD 值。依据花色苷质量浓度-酪氨酸酶活性抑制率曲线计算花色苷对酪氨酸酶活性的半抑制浓度(*IC*₅₀)。

1.2.3 与酪氨酸酶的分子对接 采用 AutoDock-Vina 软件^[13]进行分子对接,采用拉马克遗传算法(LGA)进行计算,以半经验势函数为能量打分函数对小分子构象和位置进行全局搜索。计算过程中受体格点盒子为 20 Å×20 Å×20 Å,格点间距 1 Å,格点盒子包围配体活性腔;能量评估和生成最大值分别为 250 000 和 27 000;选择均方根偏差(RMSD)为评价标准,最大容忍范围 1 Å。

1.3 数据统计分析

采用 EXCEL 2013 和 SPSS 21.0 软件处理和统计实验数据,采用邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2 结果和分析

2.1 结构鉴定

花色苷 1 呈紫红色粉末,具有分子离子 m/z 933 ([M+H]⁺)以及 3 个碎片离子 m/z 317 ([M+H-162-308-146]⁺)、 m/z 771 ([M+H-162]⁺) 和 m/z 479 ([M+H-308-146]⁺),其裂解方式见图 1。¹H-NMR(700 MHz, CD₃CN, TFA-*d*₃) δ: 8.85 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H),

7.81 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H); 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H); 3.70-5.60; 3.72-5.22; 0.86-4.70。通过化学位移和偶合常数判断香豆酰基的顺反异构类型,结合文献[14-16]鉴定花色苷 1 为矮牵牛素-3-*O*-(6'''-*O*-反式对香豆酰)芸香糖苷-5-*O*-葡萄糖苷[petunia-3-*O*-(6'''-*O*-*trans-p*-coumaroyl) rutinose-5-*O*-glucoside]。

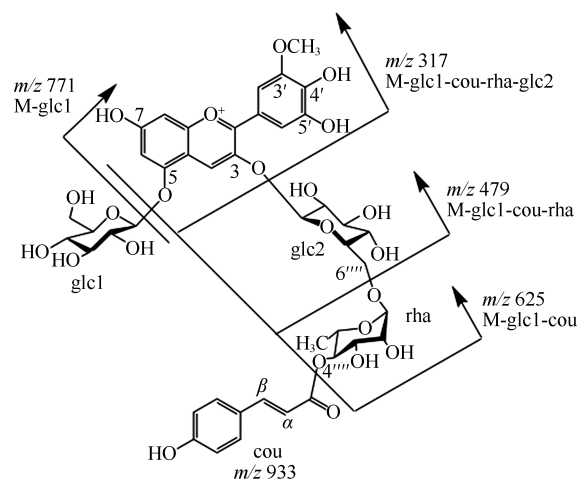


图 1 黑果枸杞果实提取物中花色苷 1 的 ESI-MS 裂解方式

Fig. 1 ESI-MS cracking mode of anthocyanin 1 from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* Murr.

花色苷 2 具有分子离子 m/z 1 095 ([M+H]⁺) 及与花色苷 1 相似的离子碎片 m/z 933 ([M+H-162]⁺)、 m/z 479 ([M+H-308-146-162]⁺) 和 m/z 317 ([M+H-162-308-146-162]⁺)。¹H-NMR(700 MHz, CD₃CN, TFA-*d*₃) δ: 8.85 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H); 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); 3.50-5.60; 3.72-5.22; 3.50-5.00; 0.86-4.70。结合文献[14, 16], 鉴定花色苷 2 为矮牵牛素-3-*O*-[6'''-*O*-(4''''-*O*-葡萄糖基)反式对香豆酰]芸香糖苷-5-*O*-葡萄糖苷[petunia-3-*O*-[6'''-*O*-(4''''-*O*-glucosyl) *trans-p*-coumaroyl] rutinose-5-*O*-glucoside]。

2.2 对酪氨酸酶活性的抑制作用

初筛时,黑果枸杞果实提取物中花色苷 1 对酪氨酸酶单酚酶和酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率分别为 97.1% 和 56.5%,而花色苷 2 对 2 种酶活性的抑制率仅分别为 35.1% 和 15.5%,故选择花色苷 1 进行梯度分析,结果见表 1。由表 1 可见:随着质量浓度的提高,花色苷 1 对酪氨酸酶单酚酶和酪氨酸二酚酶活性的抑制率均逐渐升高,经计算,其对 2 种酶活性的半抑制浓度(*IC*₅₀)分别为 25.44 和 153.10 μg·mL⁻¹。

表1 黑果枸杞果实提取物中花色苷1对酪氨酸酶活性的抑制率($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

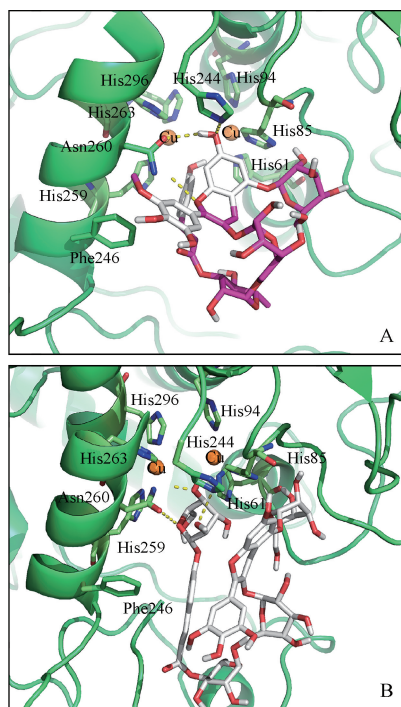
Table 1 Inhibition rate of anthocyanin 1 from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* Murr. on tyrosinase activity ($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

质量 浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Mass concentration	抑制率/% Inhibition rate	
	酪氨酸酶单酚酶 Tyrosinase monophenolase	酪氨酸酶二酚酶 Tyrosinase diphenolase
12.50	34.0 \pm 1.3a	3.1 \pm 1.1a
25.00	45.8 \pm 0.3a	10.6 \pm 1.4b
50.00	64.8 \pm 3.7b	22.7 \pm 2.2c
100.00	85.9 \pm 2.3c	39.1 \pm 3.4d
200.00	97.1 \pm 8.1c	56.5 \pm 3.6e

¹⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P<0.05$) difference.

2.3 与酪氨酸酶的分子对接

将黑果枸杞果实提取物中花色苷1和花色苷2与酪氨酸酶晶体(PDB ID:2Y9X)进行分子对接模拟,结果见图2。由图2可见:花色苷1和花色苷2的香豆酰基部分深入酪氨酸酶的活性位点,分别与His244和Asn260形成不同强度的氢键,阻止组氨酸与Cu离子间的电子传递,从而抑制酪氨酸酶



球棍表示花色苷和关键氨基酸残基 Sticks represent anthocyanins and key amino acid residues; 条带表示酪氨酸酶 Bands represent tyrosinase.

图2 黑果枸杞果实提取物中花色苷1(A)和花色苷2(B)与酪氨酸酶晶体结合模式图

Fig. 2 Binding pattern of anthocyanin 1 (A) and anthocyanin 2 (B) from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* Murr. with tyrosinase crystal

活性。花色苷1和花色苷2与酪氨酸酶的结合能分别为 -7.5 和 $-6.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

研究结果显示:黑果枸杞果实提取物中的花色苷1对酪氨酸酶活性的抑制作用较强,可作为美白产品的功效成分。

参考文献:

- [1] 穆燕,李琳,董方圆,等.对甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制机理[J].华南理工大学学报(自然科学版),2012,40(12):134-138.
- [2] FENOLL L G, PEÑALVER M J, RODRÍGUEZ-LÓPEZ J N, et al. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates[J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2004, 36(2): 235-246.
- [3] 樊美慧.黄酮类化合物对酪氨酸酶的抑制机制及其构效关系研究[D].南昌:南昌大学食品学院,2018:1-2.
- [4] 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.
- [5] 杨城,管骁,韩飞,等.木犀草素抑制酪氨酸酶活性的分子机制[J].分析测试学报,2015,34(5):532-538.
- [6] 段玉清,谢笔钧.原花青素在化妆品领域的研究与开发现状[J].香料香精化妆品,2002(6):23-26.
- [7] 马继雄.道地药材黑果枸杞的应用研究进展及青海的发展前景[J].青海师范大学学报(自然科学版),2012,28(3):53-56,85.
- [8] 郝媛媛,颀耀文,张文培,等.荒漠黑果枸杞研究进展[J].草业科学,2016,33(9):1835-1845.
- [9] 武睿,贺莉萍,石建业,等.黑果枸杞的保健作用研究进展[J].现代农业,2016(9):73-78.
- [10] 任小娜,曾俊,王玉涛.黑果枸杞的植物化学成分及生物活性研究现状[J].食品工业,2014,35(11):231-235.
- [11] 金玲,姜涛涛,陈天强,等.黑果枸杞色素研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(5):80-83.
- [12] 秦亚东,周娟娟,汪荣斌.白芍多糖抑制酪氨酸酶活性成分的筛选[J].中成药,2018,40(12):2755-2758.
- [13] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [14] 金红利.藏药黑果枸杞化学成分的系统分离纯化与表征[D].大连:大连理工大学化学学院,2015:52-54.
- [15] ANDO T, SAITO N, TATSUZAWA F, et al. Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1999, 27(6): 623-650.
- [16] GEORGE F, FIGUEIREDO P, TOKI K, et al. Influence of *trans-cis* isomerisation of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2001, 57(5): 791-795.

(责任编辑:佟金凤)