

# 3,5-二羟基甲苯与L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用

刘临<sup>1,2</sup>, 黄浩<sup>1,2</sup>

(1. 江西宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000; 2. 江西宜春学院应用化学与化学生物学重点实验室, 江西宜春 336000)

**摘要** [目的] 研究3,5-二羟基甲苯与L-肌肽对酪氨酸酶活性的抑制作用。[方法] 从新鲜雪梨中提取酪氨酸酶, 以邻苯二酚为底物, 研究3,5-二羟基甲苯、L-肌肽对酪氨酸酶活性的影响。[结果] 3,5-二羟基甲苯与L-肌肽对酪氨酸酶均有一定的抑制作用。[结论] L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用强于3,5-二羟基甲苯。

**关键词** 酪氨酸酶; 3,5-二羟基甲苯; L-肌肽; 抑制率

**中图分类号** Q55 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)19-119-02

## Inhibition Effect of 3,5-dihydroxytoluene and L-carnosine on Tyrosinase Activity

LIU Lin<sup>1,2</sup>, HUANG Hao<sup>1,2</sup> (1. College of Biological and Chemical Engineering, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000; 2. Key Laboratory of Jiangxi University for Applied Chemistry and Chemical Biology, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

**Abstract** [Objective] To study the inhibition effect of 3,5-dihydroxytoluene (DHT) and L-carnosine on tyrosinase activity. [Method] The effects of 3,5-dihydroxytoluene and L-carnosine on the activity of tyrosinase extracted from fresh snow pear were analyzed with catechol as substrate. [Result] Both 3,5-dihydroxytoluene and L-carnosine had certain inhibition effect on tyrosinase activity. [Conclusion] The inhibition effect of L-carnosine on tyrosinase activity was stronger than that of 3,5-dihydroxytoluene.

**Key words** Tyrosinase; 3,5-dihydroxytoluene; L-carnosine; Inhibition rate

酪氨酸酶(EC1.14.18.1)<sup>[1-3]</sup> 又称多酚氧化酶, 是黑色素代谢的关键酶, 存在于植物、人和动物等多种生物组织中。黑色素对皮肤颜色和色素的沉积起决定性作用。它是一种金属酶, 含有铜离子, 构成酪氨酸酶催化反应的活性中心, 能够催化单酚和二酚氧化成醌, 并使醌在非酶促条件下形成终产物黑色素<sup>[4]</sup>。皮肤美白剂种类繁多, 其中一大类通过抑制皮肤酪氨酸酶活性或阻断生成黑色素的氧化反应, 从而减少黑色素的生成达到增白美肤之效。皮肤美白剂的开发研究已成为推动美容护肤化妆品发展的一个重要方向, 该类美白剂对酪氨酸酶活性抑制作用的强弱成为衡量其美白效果的重要指标<sup>[5-6]</sup>。

雪梨酪氨酸酶具有单酚羟化酶和二酚加氧酶双酶活性, 单酚酶可以先羟化酪氨酸产生邻二羟基苯丙氨酸(即L-多巴), 二酚酶再将其氧化成为相应的多巴醌, 进一步反应后生成一系列引起褐化的色素类物质<sup>[7]</sup>。笔者通过酪氨酸酶催化反应后生成醌, 而醌有颜色, 在某个可见波长上有明显吸收峰。生成醌的量越多, 在此可见波长上的吸收值越大。同等条件下, 加入3,5-二羟基甲苯、L-肌肽后醌的生成量会减少, 在此可见波长上的吸收值变小。笔者以邻苯二酚代替酪氨酸为底物, 研究3,5-二羟基甲苯、L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 供试材料为市场上购买的新鲜雪梨。

**1.2 主要试剂** 3,5-二羟基甲苯(国药集团化学试剂有限公司, 化学纯), L-肌肽(天津一方科技有限公司, 对照品), 邻苯二酚(天津市永大化学试剂有限公司, 分析纯), 丙酮、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠(国产分析纯)。

**1.3 主要仪器** TGL20M 高速台式冷冻离心机(湖南凯达

科学仪器有限公司), Lamada35 紫外可见分光光度计(美国PE), JJ-2B 组织捣碎匀浆机(常州华冠仪器有限公司), JB-5 定时双向恒温磁力搅拌器(常州华冠仪器有限公司), BSA224S-CW 电子分析天平(上海皖宁精密科学仪器有限公司), HH-4 数显恒温水浴箱(国华电器)。

## 1.4 方法

**1.4.1 酪氨酸酶的提取。**

**1.4.1.1 丙酮粉的制备**<sup>[8]</sup>。取新鲜雪梨果肉组织 200 g, 用塑料刀切碎块放入高速组织捣碎机, 同时加入冰丙酮 320 mL (-25 °C 预冷), 搅拌 8 min, 混合液真空抽滤, 直至成白色粉末, 即得丙酮粉, -25 °C 下保存。

**1.4.1.2 酪氨酸酶液的制备。**称取丙酮粉 4 g, 加入 80 mL 磷酸缓冲液(pH 6.5)<sup>[9]</sup>, 在 -1 °C 下用磁力搅拌机匀浆 40 min, 放入冰冻高速离心机于 -1 °C、12 000 r/min 离心 40 min, 取上清液即得酪氨酸酶粗提液。

**1.4.2 以邻苯二酚为底物的酪氨酸酶最大吸收波长的确定。**在比色杯中用微量移液管加入 0.2 mL 酶液, 再将 3.0 mL 邻苯二酚溶液(0.2 mol/L)用移液管加入, 以 3.0 mL 邻苯二酚溶液(0.2 mol/L)中加入 0.2 mL 双蒸馏水为对照, 在波长 375~600 nm 测定吸光度变化。

**1.4.3 抑制剂对酪氨酸酶的抑制。**

**1.4.3.1 不同浓度 3,5-二羟基甲苯对酪氨酸酶的抑制**<sup>[10]</sup>。用 pH 6.5 的磷酸缓冲液配制 0.2 mol/L 的邻苯二酚和 1.0、3.0、5.0、8.0、10.0 mmol/L 的 3,5-二羟基甲苯。

在比色杯中按顺序加入 0.1 mL 酶液、0.1 mL 蒸馏水、2.8 mL 邻苯二酚(0.3 mol/L), 以 2.8 mL 邻苯二酚(0.2 mol/L)中加入 0.2 mL 双蒸馏水为对照, 立即于 425 nm 处扫描, 并记录 30 s 处的 OD 值(A)。

在比色杯中按顺序加入 0.1 mL 酶液、0.1 mL 各浓度的 3,5-二羟基甲苯(分别做 5 个浓度的试验), 再加入 2.8 mL 邻苯二酚(0.2 mol/L), 以 2.8 mL 邻苯二酚(0.3 mol/L)中加

**作者简介** 刘临(1964-), 男, 江西高安人, 高级实验师, 从事分析化学教学与研究。

**收稿日期** 2016-05-09

入0.2 mL双蒸馏水为对照,立即于425 nm处进行扫描,并记录30 s处的OD(B)。

3,5-二羟基甲苯以邻苯二酚为底物对酪氨酸酶的抑制率计算公式: $I = (A - B) / A \times 100\%$ 。

**1.4.3.2 不同浓度L-肌肽(L-carnosine)对酪氨酸酶的抑制<sup>[11]</sup>。**用pH 6.5的磷酸缓冲液分别配制0.1、0.25、0.50、0.75、1.0 mmol/L的L-肌肽。在比色杯中按顺序加入0.1 mL酶液、0.1 mL各浓度的L-肌肽(分别做5个浓度的试验),再加入2.8 mL邻苯二酚(0.2 mol/L),以2.8 mL邻苯二酚(0.3 mol/L)中加入0.2 mL双蒸馏水为对照,立即于425 nm处进行扫描,并记录30 s处的OD值(C)。

L-肌肽以邻苯二酚为底物对酪氨酸酶的抑制率计算公式: $I = (A - C) / A \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 酪氨酸酶的最大吸收波长** 经紫外可见分光光度计在波长375~600 nm处扫描,结果见图1。由图1可知,以邻苯二酚为底物,在425 nm处有最大吸收峰,故蜜梨酪氨酸酶以邻苯二酚为底物时,最大吸收波长为425 nm。

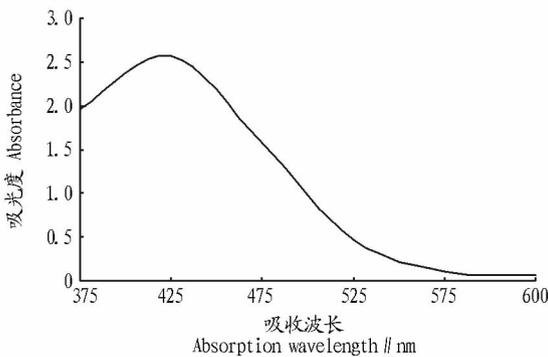


图1 酪氨酸酶以邻苯二酚为底物的吸收波长

Fig. 1 Absorption wavelength of tyrosinase with catechol as substrate

## 2.2 以邻苯二酚为底物时2种药物对酪氨酸酶的影响

**2.2.1 不同浓度3,5-二羟基甲苯对酪氨酸酶的抑制。**由图2可知,3,5-二羟基甲苯对酪氨酸酶的抑制作用与浓度相关,浓度越大,抑制效果越明显。当3,5-二羟基甲苯浓度达10 mmol/L时,其对酪氨酸酶的抑制率可达66.69%。

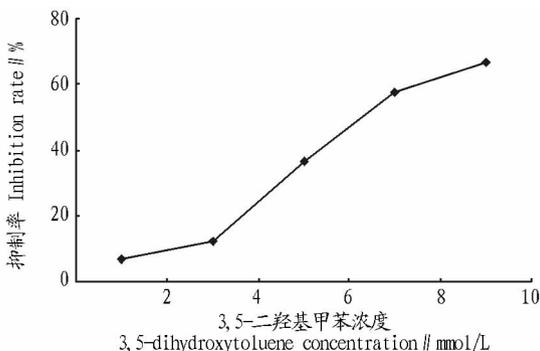


图2 3,5-二羟基甲苯浓度与抑制率

Fig. 2 3,5-dihydroxytoluene concentration and inhibition rate

**2.2.2 不同浓度L-肌肽对酪氨酸酶的抑制。**由图3可知,

L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用分为低浓度组(L-肌肽浓度在0.5 mmol/L以下)和高浓度组(L-肌肽浓度在0.5 mmol/L以上),2种浓度的效果不同。L-肌肽低浓度组基本上对酪氨酸酶无抑制作用,L-肌肽高浓度组,浓度越大对酪氨酸酶的抑制作用越强。当L-肌肽浓度为1 mmol/L时,其对酪氨酸酶的抑制率为21.25%。

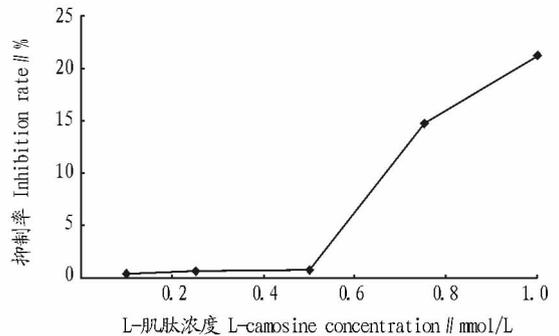


图3 L-肌肽浓度与抑制率

Fig. 3 L-carnosine concentration and inhibition rate

## 3 结论与讨论

3,5-二羟基甲苯又名荭黑酚或地衣酚,是一种重要的有机合成中间体,临床上可做消炎药,在医药领域有广泛应用。L-肌肽是由β-丙氨酸和组氨酸构成的二肽(β-Ala-L-His),临床可做抗白内障药物。以酪氨酸酶筛选化妆品美白添加剂时,经试验比较,选择从蜜梨提取酪氨酸酶,其酶活力较强,酶的最适pH和热稳定性接近,但与从雪梨中提取的酪氨酸酶最大吸收波长有所不同<sup>[12]</sup>。由于酶活性对作用条件温和的特殊要求,酪氨酸酶的提取和酶活测定极其重要,它直接关系到后面一系列试验结果的准确性,因此,整个过程要严格按照要求进行试验操作。

该研究结果表明,3,5-二羟基甲苯、L-肌肽对酪氨酸酶均有一定的抑制作用;在相同浓度下(3,5-二羟基甲苯、L-肌肽2种药剂的浓度均为1 mmol/L时),L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用(抑制率为21.25%)高于3,5-二羟基甲苯(抑制率为6.88%)。以邻苯二酚为底物,L-肌肽对酪氨酸酶的抑制作用强于3,5-二羟基甲苯,且二者的抑制率均随着浓度的增大而增大。该研究为2种药剂作为化妆品美白添加剂以抑制黑色素的形成、祛除皮肤色斑提供了理论依据<sup>[12]</sup>。

## 参考文献

- [1] 李诚让,朱文元,王大光,等. 芦荟素抑制人表皮黑色素细胞酪氨酸酶的最佳浓度选择[J]. 临床皮肤科杂志,2006,35(8):1-2.
- [2] 吴梧桐. 生物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:132-163.
- [3] SANCHEZ-FERRER A, RODRIGUEZ-LOPEZ J N, GARCIA-CONNOVAS F, et al. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1247: 1-11.
- [4] 陈清西,宋康康. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(5): 1-4.
- [5] 张彩华,徐国清. 化妆品美白剂[J]. 萍乡高等专科学校学报, 2004(4): 1-3.
- [6] 江志洁,朱育新. 黑色素形成机理的新概念及复合美白剂的应用[J]. 环球科技, 1998(4): 1-3.

表6 不同时期3种基质的理化性质

Table 6 Physical and chemical properties of the three matrices in different periods

处理 Treatment	时间 Time	速效氮 Available nitrogen mg/kg	速效磷 Available phosphorus mg/kg	速效钾 Available potassium mg/kg	有机质 Organic matter %	pH	含盐量 Salt content g/kg	容重 Bulk density g/cm <sup>3</sup>	总孔隙度 Total porosity %	田间持水量 Field capacity %
基质1 Matrix 1	2014-03	89.59	90.56	219.61	16.29	7.10	7.84	0.79	52.86	71.91
	2014-09	81.09	83.66	184.96	16.75	7.03	4.47	0.72	53.97	77.20
基质2 Matrix 2	2014-03	149.75	165.91	321.30	18.05	6.70	6.79	0.66	61.11	75.77
	2014-09	113.07	128.24	290.56	18.59	6.83	3.73	0.63	62.68	81.68
基质3 Matrix 3	2014-03	56.80	81.33	931.46	15.00	6.50	8.90	0.68	45.15	76.91
	2014-09	49.38	78.79	611.44	16.19	6.70	4.98	0.64	46.26	83.35

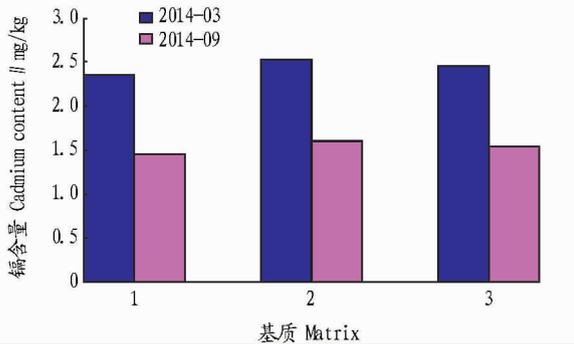


图4 不同时期3种基质中镉含量比较

Fig. 4 Comparison of cadmium content in the three matrices during different periods

### 3 结论

(1) 3种基质中氮、磷、钾、有机质等养分含量丰富,但盐分含量偏高,经过半年的种植和灌溉淋溶,盐分含量低于5.0 g/kg。若按照株行距60×80 cm定苗,基质1中地肤单茬产量约14 000 kg/hm<sup>2</sup>,基质2中约17 000 kg/hm<sup>2</sup>,基质3中产量高达18 000 kg/hm<sup>2</sup>,与正常土壤环境下的地肤产量相当。

(2) 所测基质中锌、镍、汞等7种重金属含量均在土壤环境二级标准值以内,只有镉含量超标。在镉含量超出土壤二级标准值6~8倍的情况下,地肤鲜样和干样中的镉含量均

未超出饲料卫生标准。经过半年的地肤生长和淋洗后,基质中镉含量降至二级标准值的4~6倍。可见,地肤的种植不仅可为畜禽提供饲料,而且对基质中镉的去除起到积极作用。

### 参考文献

- [1] 樊文化,李慧峰,白中科,等.黄土区大型露天煤矿煤矸石自然对复垦土壤质量的影响[J].农业工程学报,2010,26(2):319-324.
- [2] 徐占军,侯湖平,张绍良,等.采矿活动和气候变化对煤矿区生态环境损失的影响[J].农业工程学报,2012,28(5):232-240.
- [3] 豆飞飞,李萍,朱嘉伟.永城市陈四楼煤矿土地复垦适宜性评价研究[J].中国农学通报,2013,29(17):192-197.
- [4] 刘西敏.采煤塌陷地复垦基质中镉的植物去除研究[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [5] 胡振琪,赵艳玲,程玲玲.中国土地复垦目标与内涵扩展[J].中国土地科学,2004,18(3):3-8.
- [6] 索增山.煤矿采煤沉陷区充填复垦现状及改进措施[J].中国科技博览,2015(39):20.
- [7] 王晓玲,冯永军,李芬,等.沉陷废弃地新型复垦基质主要化学性质研究[J].水土保持学报,2005,19(3):42-45.
- [8] 刘西敏,冯永军,郑九华.采煤沉陷地新型复垦基质中Cd的植物去除效果研究[J].农业环境科学学报,2008,27(1):212-215.
- [9] 赵洪,郭传良,吴朝晖.海涂地肤规模高效栽培技术[J].华东森林经理,2010,24(4):24-26.
- [10] 张展羽,郭相平.微咸水灌溉对苗期玉米生长和生理性状的影响[J].灌溉排水,2009,18(1):18-22.
- [11] 肖玫,赵仁静.植物的矿物元素测定及其产业化发展前景[J].粮油食品科技,2006,16(1):48-49.
- [12] 樊瑞,冯永军,郝桂喜,等.富镉基质中紫花苜蓿的生长与利用研究[J].草业学报,2009,26(10):67-72.
- [13] 胡守林,王汉全,赵书珍.苜蓿营养价值分析[J].草业科学,2005,22(4):23-25.

(上接第120页)

- [7] SEO S Y, SHARMA V K, SHARMA N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects[J]. Agric Food Chem, 2003, 51: 2837-2853.
- [8] 田玉庭,岳田利,袁亚宏.澳洲青苹果多酚氧化酶的分离纯化研究[J].食品研究与开发,2006,127(5):1-3.
- [9] 王秀奇,秦淑媛,高天慧.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1997:278.

- [10] 陈清西,林建峰,宋康康.酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2007,46(2):1-2.
- [11] 吴长增,宋晓平.L-肌肽的合成与应用[J].许昌学院学报,2009,28(5):3-4.
- [12] 黄浩,周秀玲,吕美云.还原性谷胱甘肽、抗坏血酸对酪氨酸酶的抑制作用[J].中国生化药物杂志,2009,30(2):95-98,102.