

# 胀果甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

张麦茹 樊金玲\* 朱文学 李欣

(河南科技大学食品与生物工程学院 洛阳 471003)

**摘要** 筛选胀果甘草是对蘑菇酪氨酸酶抑制活性最强的提取物,并研究其对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型,探究其抑制作用机理。考察了胀果甘草7种不同溶剂包括甘草酸、提酸废液、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇及水提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用和对2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)自由基阳离子( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ )、羟基自由基( $\text{HO}\cdot$ )的清除作用,根据双倒数曲线图判断对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用类型,结合抗氧化能力探究对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理。在胀果甘草7种溶剂提取物中,以乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶具有最强的抑制作用, $\text{IC}_{50}$ 为3.477 5 g/L,双倒数曲线做图得到了一组纵轴截距不变的曲线,抑制常数 $K_i$ 为0.666 7 g/L,胀果甘草乙酸乙酯提取物也具有最强的清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 $\text{HO}\cdot$ 的能力,半清除浓度和速率常数分别为0.044 2 g/L和 $4.634 \times 10^8 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{s})$ 。胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用是可逆竞争性抑制,推测其对酪氨酸酶的抑制是通过清除了氧自由基和作为竞争性底物而实现的。

**关键词** 胀果甘草,蘑菇酪氨酸酶,ABTS 自由基阳离子,羟基自由基,竞争性抑制

中图分类号:O643

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2012)08-0898-08

DOI:10.3724/SP.J.1095.2012.00362

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是一种含铜的氧化还原酶,普遍存在于人和动植物体内,是黑色素生物合成过程中的关键酶和限速酶<sup>[1-3]</sup>。酪氨酸酶抑制剂通过抑制酪氨酸酶活性从而减少黑色素生成,不但可作为美白剂用于化妆品,而且可用于色素增加性皮肤病(黄褐斑和雀斑等)的临床治疗,还可作为食品添加剂用于控制果蔬及其产品的酶促褐变。

甘草(*Radix Glycyrrhiza*)为豆科植物甘草属乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza Uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*G. inflata* Bat.)或光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根及根茎<sup>[4-6]</sup>,是一种药食两用植物<sup>[7]</sup>。近来的研究表明,甘草提取物对酪氨酸酶具有显著的抑制活性<sup>[8-12]</sup>。从光果甘草中发现的酪氨酸酶抑制剂有光甘草定<sup>[13]</sup>(活性为曲酸的15倍)、光甘草烯、异甘草素<sup>[14]</sup>;从乌拉尔甘草中发现的酪氨酸酶抑制剂有甘草素、甘草苷、异甘草苷、异甘草素葡萄糖洋芫荽糖苷<sup>[15]</sup>、西北甘草异黄酮和粗毛甘草素C<sup>[16]</sup>(其活性为光甘草定的2倍);从胀果甘草中发现的酪氨酸酶抑制剂除了异甘草素、异甘草苷,还有其特异性查尔酮类成分甘草查尔酮A<sup>[15]</sup>(活性为曲酸的5.4倍)。但迄今为止,在3种药用甘草中,仅有光果甘草中酪氨酸酶抑制活性成分光甘草定得到了深入研究,并已作为美白剂应用于高档化妆品中<sup>[15,17-19]</sup>。

胀果甘草是我国蕴藏量较大的药用品种( $9 \times 10^8 \text{ kg}$ ,占总蕴藏量60%),其主要的利用形式之一是提取甘草酸,提酸后的甘草药渣和残液则被遗弃,造成了极大的环境污染和资源浪费。本文以胀果甘草为研究对象,从甘草酸的工业生产路线出发,对提酸后的甘草药渣进行梯度提取,研究不同溶剂提取物的酪氨酸酶抑制活性,并结合对2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)自由基阳离子( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ )、羟基自由基( $\text{HO}\cdot$ )的清除作用,探讨抑制活性最强的提取物对酪氨酸酶的抑制作用机理。本研究为胀果甘草的综合开发利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

RE52CS-1 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);80-2 型台式低速离心机(上海医疗器械有限公司);SY3200-T 型超声波清洗器(上海声源超声波仪器设备有限公司);QYC 2102C 型全温空气摇床(上海福玛实验设备有限公司);LG-0.2 型真空冷冻干燥机(沈阳航天新阳速冻设备制造有限公司);Stat Fax-2100 型酶标仪(Awareness Technology 公司);722N 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)、蘑菇酪氨酸酶(mushroom tyrosinase)、2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、脱氧核糖均购于 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯,提取部分用水为实验室自制二次蒸馏水,其余均为超纯水。

1.2 胀果甘草不同溶剂提取物的制备

甘草粉碎过 0.38 mm 筛孔,按料液比 1:5 加入 2% 氨水(体积比)室温超声提取 60 min 后离心,收集滤液;滤渣按上述操作重复提取 2 次;合并滤液得到甘草酸提取液,提酸后的甘草渣备用。在甘草酸提取液中缓慢加入 98% 硫酸至 pH 值为 1.6~1.8,使甘草酸沉淀,离心,沉淀物经真空冷冻干燥得到甘草酸粗品(Ⅰ),上清液浓缩并经真空冷冻干燥得到提酸废液干物质(Ⅱ)。冷藏备用,临用前溶解。

在甘草渣中按料液比 1:10 加入 80% 乙醇(体积比),室温振荡提取 24 h,重复提取 3 次;合并提取液,经真空浓缩成膏状;加少量水使膏状物溶解,分别用体积比 1:3 的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取各 3 次,合并各萃取液。各萃取液经真空浓缩和真空冷冻干燥分别得到石油醚(Ⅲ)、氯仿(Ⅳ)、乙酸乙酯(Ⅴ)、正丁醇(Ⅵ)和水(Ⅶ)提取物。冷藏备用,临用前溶解。

按式(1)计算不同溶剂提取物的得率:

得率/% = \frac{m\_1}{m\_0} \times 100 \tag{1}

式中, $m_1$ 为不同溶剂提取物的质量, $m_0$ 为总甘草粉末质量。

1.3 胀果甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用测定

本实验以 L-DOPA 为反应底物,研究甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活性的抑制作用。

酶活力测定:参考文献<sup>[20-21]</sup>,并做适当修改:蘑菇酪氨酸酶和 L-DOPA 均溶于 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(0.05 mol/L,pH=6.8),样品Ⅰ、Ⅱ和Ⅶ用水溶解,其余溶于 DMSO,反应体系为 200 μL。在 96 孔板中依次加入 10 μL 样品(5 g/L)、75 μL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L,pH=6.8)和 100 μL L-DOPA 溶液(6 mmol/L),混匀并于 37 ℃保温 10 min,加入 15 μL 蘑菇酪氨酸酶(333 U/mL),迅速混匀,于 37 ℃保温 20 min,测定反应液在 492 nm 下的吸光度值 A。每组样品做 3 个平行实验,取平均值。按式(2)计算样品对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活性的抑制率:

抑制率/% = \frac{(A\_1 - A\_2) - (A\_3 - A\_4)}{(A\_1 - A\_2)} \times 100 \tag{2}

式中, $A_1 = A_{492 - \text{样} + \text{底} + \text{酶}}$ ;  $A_2 = A_{492 - \text{样} - \text{底} + \text{酶}}$ ;  $A_3 = A_{492 + \text{样} + \text{底} + \text{酶}}$ ;  $A_4 = A_{492 + \text{样} - \text{底} + \text{酶}}$ 。

1.4 胀果甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的判断及抑制类型、抑制常数的测定

参考文献[22],采用动力学的方法鉴别抑制剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用,并做适当修改:固定底物浓度不变,改变加入的酶量,测定在不同浓度抑制剂存在的条件下反应初速度的变化。以 0~3 min 内吸光度值 A 的平均变化率为反应初速度。以反应初速度-酶浓度作图,若为一组通过原点的直线则为可逆抑制,若为一组平行直线则为不可逆抑制<sup>[22-24]</sup>。

酶催化反应的动力学参数,包括米氏常数( $K_m$ )和最大反应速度( $v_{\max}$ ),可根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图求出,根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图形及动力学参数的比较,可判断抑制剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用类型。

1.5 胀果甘草提取物对 ABTS<sup>•+</sup> 清除活性的测定

ABTS 法被广泛用于评价抗氧化剂清除自由基的能力<sup>[25]</sup>。实验参考文献<sup>[26-27]</sup> 并做适当修改:将 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>按体积比 1:1 混合,在室温避光条件下静置过夜 12 ~ 16 h 生成 ABTS 自由基阳离子( ABTS<sup>•+</sup> )溶液,用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(0.2 mol/L,pH = 7.4)稀释,使其在室温 734 nm 波长下吸光度为 0.70 ± 0.02,即得到 ABTS<sup>•+</sup> 工作液。取一定浓度的样品溶液 0.2 mL,加入 3.8 mL ABTS<sup>•+</sup> 工作液,迅速混匀后,室温下静止 7 min,测定 734 nm 下的吸光度值。按式(3)计算清除率:

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

(3)

式中,A<sub>0</sub>为不加样品反应液所测的吸光度值,A<sub>1</sub>为加样品反应液所测的吸光度值。

1.6 胀果甘草提取物对 HO·清除活性的测定

甘草提取物对 HO·清除活性的测定参考文献<sup>[28]</sup>。参照 Barry 等<sup>[29]</sup> 报道的方法计算反应速率常数。

2 结果与讨论

2.1 胀果甘草不同溶剂提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用比较

溶剂极性不同,提取物中的化学成分不同,所得提取物的生物活性也有很大差异。浓度均为 5 g/L 的胀果甘草不同溶剂提取物 I ~ VII对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制作用如图 1 所示。从图 1 可以看出,不同提取物的抑制作用差异较大:乙酸乙酯提取物( V,得率 0.59%)的抑制作用显著高于其它溶剂提取物(*p* < 0.01),抑制率达到 91.55%;氯仿提取物( IV,得率 0.71%)和正丁醇提取物( VI,得率 1.24%)也具有较强的抑制活性,抑制率分别为 47.36%和 28.35%。甘草酸粗品( I,得率 13.81%)、石油醚提取物( III,得率 0.02%)和水提取物( VII,得率 1.23%)的抑制作用较弱,抑制率均小于 10%,且三者之间差异不显著。提酸废液(得率为 37%)不仅没有酪氨酸酶抑制活性,反而表现出微弱的激活作用,但是这种激活作用不具有统计学意义。实验进一步研究了乙酸乙酯提取物( V)对酪氨酸酶抑制作用的量效关系,如图 2 所示。结果表明,量效关系显著。根据图中数据的拟合方程(*R*<sup>2</sup> = 0.9859)得到的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 3.477 5 g/L(甘草药渣经过梯度提取后剩余的废渣占总得率的 42.33%,在此不做研究)。

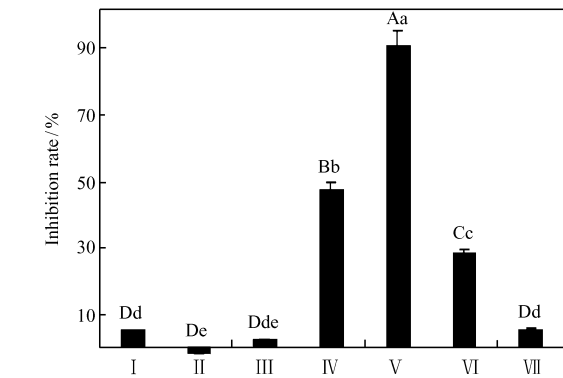


图 1 胀果甘草不同溶剂提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用比较

Fig.1 Inhibition effect of *G. inflata* Bat. extracts with different extraction solvents on mushroom tyrosinase  
I. glycyrrhizic acid; II. waste liquid from glycyrrhizic acid extraction; III. petroleum ether; IV. chloroform; V. ethyl acetate; VI. *n*-butyl alcohol; VII. water

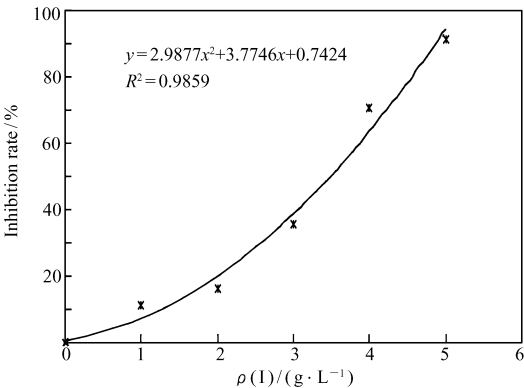


图 2 胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

Fig.2 Inhibition effect of the ethyl acetate extract of *G. inflata* Bat. on mushroom tyrosinase for the catalysis of *L*-DOPA  
Enzyme concentration was 333 U/mL, *L*-DOPA concentration was 6 mmol/L

根据相似相溶原理,通常,石油醚提取物多为亲脂苷元、叶绿素和油脂等小极性物质的混合物,氯仿

提取物一般含有生物碱、多数苷元及脂肪酸, 乙酸乙酯提取物多为亲脂性单糖苷和酚性物质, 正丁醇提取物为多数苷类、水溶性生物碱的混合物, 余下的水相一般含有糖类、氨基酸以及可水解性的鞣质, 因此, Fu 等<sup>[15]</sup>发现的在胀果甘草中对酪氨酸酶具有抑制作用的活性成分异甘草素、异甘草苷和甘草查尔酮 A, 应分布在氯仿或乙酸乙酯提取物中, 这与本文胀果甘草乙酸乙酯和氯仿提取物具有较强的酶抑制作用相符。刘之力等<sup>[30-32]</sup>则报道了甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶有激活作用。此外, 赵会科等<sup>[10]</sup>报道了以甘草酸为主要成分的甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶有较强的抑制作用, 但本研究却发现甘草酸粗品对酪氨酸酶的抑制作用较弱。抑制作用的差异可能均与采用了不同的提取方式有关。

2.2 胀果甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理和抑制类型

胀果甘草乙酸乙酯提取物具有最强的酪氨酸酶抑制活性。在不同浓度乙酸乙酯提取物作用下, 反应初速度  $v$  对加入酶量作图得到了一组通过原点的直线, 如图 3 所示。随着抑制剂浓度的不断增大, 直线的斜率不断降低, 说明抑制剂使酪氨酸酶的活力下降是通过抑制剂浓度的增大引起, 而不是有效酶量的减少<sup>[22]</sup>。因此, 胀果甘草乙酸乙酯提取物对酪氨酸酶的抑制属于可逆抑制。

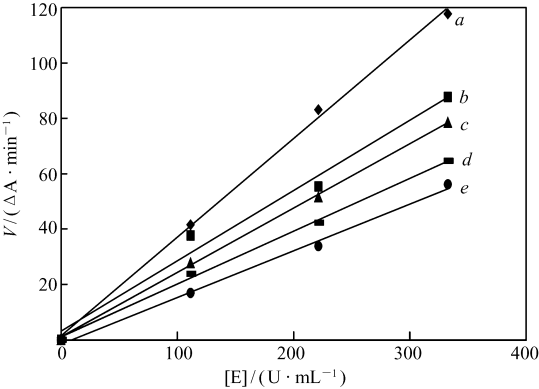


图 3 不同浓度胀果甘草乙酸乙酯提取物作用下酶反应初速度与酶浓度的关系

Fig. 3 Relationship of the initial reaction rate with the enzyme concentrations under different concentrations of ethyl acetate extract of *G. inflata* Bat.

Concentrations of the ethyl acetate extract for curves a ~ e were 1, 2, 3, 4, and 5 g/L, respectively

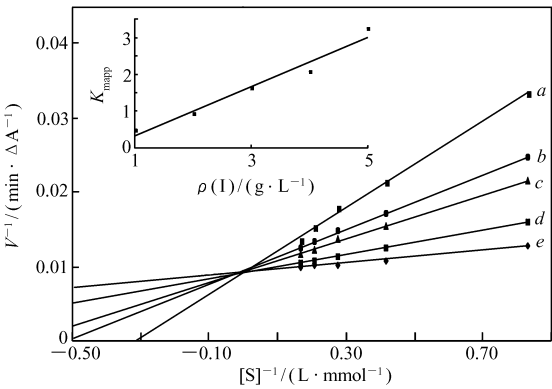


图 4 胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition effect of ethyl acetate extract on mushroom tyrosinase for the catalysis of *L*-DOPA

Concentrations of ethyl acetate extract for curves a ~ e were 1, 2, 3, 4, and 5 g/L, respectively. The enzyme concentration was 333 U/mL. The inset represents the plot of  $K_{\text{mapp}}$  versus the concentration of ethyl acetate extract for determining the inhibition constant  $K_i$

在反应体系中, 固定酶浓度为 333 U/mL, 改变底物 *L*-DOPA 浓度, 以酶促反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线 (图略), 这说明在蘑菇酪氨酸酶的作用下, *L*-DOPA 的氧化反应遵循 Michaelis-Menten 动力学方程。Lineweaver-Burk 双倒数作图如图 4 所示。从图 4 可以看出, 随着乙酸乙酯提取物浓度的增大, 纵轴截距不变, 斜率增大, 即  $v_{\text{max}}$  不随着抑制剂浓度增大而变化, 米氏常数  $K_m$  值随着抑制剂浓度的增大而不断增大, 表明抑制剂浓度增大时, 酶对底物的亲和力在不断下降, 抑制剂的存在阻碍了底物和酶的结合, 增加底物或抑制剂浓度均可排除对方对酶的效应, 抑制剂对酶的抑制作用表现为竞争性抑制。竞争性抑制剂只能与游离酶 ( $E$ ) 结合而不能与酶-底物配合物 ( $ES$ ) 结合。以不同浓度抑制剂下测定的表观米氏常数值 ( $K_{\text{mapp}}$ ) 对抑制剂浓度作图为一组直线, 见图 4 内插图, 从直线的斜率可以求得抑制常数  $K_i$  为 0.666 7 g/L。

胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学参数列于表 1。

表 1 胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学参数  
Table 1 Kinetics parameters of mushroom tyrosinase by ethyl acetate extract of *G. inflata* Bat.

$IC_{50}/(g \cdot L^{-1})$	$v_{max}/(U \cdot min^{-1})$	Inhibition	Inhibition type	$K_i/(g \cdot L^{-1})$
3.477 5	111.11	Reversible	Competitive	0.666 7

2.3 胀果甘草提取物对 ABTS<sup>·+</sup> 的清除作用

胀果甘草7个不同溶剂提取物对 ABTS<sup>·+</sup> 清除作用的半清除浓度见表2。在这 7 个不同溶剂提取物中,对 ABTS<sup>·+</sup> 的清除能力由大到小依次为乙酸乙酯提取物>氯仿提取物>正丁醇提取物>石油醚提取物>甘草酸>水提取物>提酸废液。酶抑制活性最强的乙酸乙酯提取物对 ABTS<sup>·+</sup> 的清除作用也最强,其半清除浓度为 0.044 2 g/L。

表 2 胀果甘草乙酸乙酯提取物对 ABTS<sup>·+</sup> 和 HO· 的清除作用  
Table 2 The scavenging activity on ABTS<sup>·+</sup> and HO· of different extracts of *G. inflata* Bat.

Extract	$IC_{50}$ of ABTS <sup>·+</sup> scavenging/ $(g \cdot L^{-1})$	$K_s/(L \cdot g^{-1} \cdot s^{-1})$
Glycyrrhizic acid	0.867 6	$4.757 \times 10^7$
Waste liquid from glycyrrhizic acid extraction	1.066 9	$5.766 \times 10^7$
Petroleum ether extract	0.238 9	—
Chloroform extract	0.061 2	$3.356 \times 10^8$
Ethyl acetate extract	0.044 2	$4.634 \times 10^8$
<i>n</i> -Butyl alcohol extract	0.093 3	$2.038 \times 10^8$
Water extract	0.916 4	$3.183 \times 10^7$

—:represents that the activity value can not be detected;  $K_s$ :rate constants for HO· scavenging reaction.

2.4 胀果甘草提取物对 HO· 的清除作用

按 Barry 等<sup>[29]</sup>报道的方法,计算胀果甘草不同溶剂提取物与 HO· 的反应速率常数,1/A-S 作图(图略),可从斜率求出速率常数  $K_s$ ,结果详见表 2。 $K_s$  越大,表明清除效力越强。在这 7 个不同溶剂提取物中,对 HO· 的反应速率常数由大到小依次为乙酸乙酯提取物>氯仿提取物>正丁醇提取物>提酸废液>甘草酸>水提取物,说明酶抑制活性最强的乙酸乙酯提取物对 HO· 的清除作用也最强,其速率常数为  $4.634 \times 10^8 L/(g \cdot s)$ 。Bhat 等<sup>[33]</sup>用同样方法,测得尿酸与 HO· 反应的速率常数为  $8.929 \times 10^8 L/(g \cdot s)$ (尿酸作为有效的内源抗氧化剂,参与阻止人体内的氧化损伤),且多数简单多酚与 HO· 反应的速率常数均小于  $10^8 L/(g \cdot s)$ <sup>[34]</sup>,可见乙酸乙酯、氯仿、正丁醇提取物均对 HO· 有较强的清除活性,且乙酸乙酯提取物的清除活性最强。

2.5 胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制机理的探讨

酪氨酸酶是一种含铜需氧酶,在黑色素形成的过程中,必须有氧自由基参加,通过氧自由基的引发<sup>[2]</sup>和酪氨酸酶的催化作用使酪氨酸逐步氧化,最终形成黑色素。也就是说,氧自由基既是引发剂又是反应物,酪氨酸酶的催化氧化过程,其实也是生物体内清除自由基的过程<sup>[24]</sup>。氧自由基的清除可以阻断酪氨酸酶的催化反应,从而使酪氨酸氧化反应的强度减弱<sup>[24]</sup>。在胀果甘草 7 个不同溶剂提取物中,乙酸乙酯提取物具有最强的清除 ABTS<sup>·+</sup> 和 HO· 的能力,也具有最强的酪氨酸酶抑制活性。有研究报道,对氧自由基的清除作用是含有多羟基的黄酮类化合物的共性<sup>[36]</sup>,我们的后期研究也证明,如胀果甘草乙酸乙酯和氯仿提取物中酶抑制活性成分有多种,且均是含有多羟基的黄酮类化合物。所以综合分析,推测胀果甘草乙酸乙酯提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理如下:

- 1)清除了氧自由基,阻断了因氧自由基而引发的氧化反应进程,使得 *L*-DOPA 的氧化反应强度减弱,也就是削弱了酪氨酸酶的作用。推测对氧自由基的清除作用是胀果甘草乙酸乙酯提取物具有强酪氨酸酶抑制活性的重要原因;
- 2)是酪氨酸酶的竞争性底物,与底物竞争和酶的结合。推测胀果甘草乙酸乙酯提取物中活性成分和底物 *L*-DOPA 结构相似,它可与底物竞争性地结合酶,妨碍了底物与酶的结合,减少了酶的作用机会,

即削弱了酪氨酸酶的催化氧化作用,降低了酶的活力。

### 3 结 论

胀果甘草乙酸乙酯提取物在胀果甘草7个不同溶剂提取物中对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用最强,半抑制浓度( $IC_{50}$ )为3.4775 g/L,抑制类型表现为竞争性抑制,抑制常数 $K_i=0.6667$  g/L。根据抗氧化试验结果初步推测,清除了氧自由基和作为酪氨酸酶的竞争性底物是胀果甘草乙酸乙酯提取物有效阻止蘑菇酪氨酸酶表达的主要方式。但由于该乙酸乙酯提取物不是纯品,对酪氨酸酶的抑制作用也是其中多种成分的综合效应,后期实验也表明,在胀果甘草乙酸乙酯提取物中,既存在有多种对酪氨酸酶有抑制作用的活性成分,也含有少量对酪氨酸酶有激活作用的单体化合物,这均很可能导致提取物对酪氨酸酶的抑制效应减弱、抵消或增强。如何进一步分离得到抑制酪氨酸酶活性的单体,并研究其对酪氨酸酶抑制的构效关系及黑色素合成的作用机制,应是甘草提取物在化妆品及临床医学应用上致力的方向。

### 参 考 文 献

- [1] Kima Y J, Uyama H. Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources; Structure, Inhibition Mechanism and Perspective for the Future[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, (62):1707-1723.
- [2] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: a Comprehensive Review of Its Mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, (1247):1-11.
- [3] Chang T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, (10):2440-2475.
- [4] XING Guoxiu, LI Nan, WANG Tong, et al. Advances in Studies on Flavonoids of Licorice[J]. *Chinese J Chin Mater Med*, 2003, **28**(7):593-597 (in Chinese).  
邢国秀, 李楠, 王童, 等. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2003, **28**(7):593-597.
- [5] JI Yubin, JIANG Wei, FAN Yuling, et al. Advances in Studies on Flavonoids of Licorice[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2004, **35**(9):5-6 (in Chinese).  
季宇彬, 姜薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2004, **35**(9):5-6.
- [6] Zhang Q Y, Ye M. Chemical Analysis of the Chinese Herbal Medicine Gan-Cao (Licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, (1216):1954-1969.
- [7] LI Minghua, YANG Wenjian, ZHAO Zheng, et al. Study on Antioxidant Activity of the Different Polar Solvent Extracts of Radix Glycyrrhiza[J]. *J Cereal Oil*, 2009, (3):25-27 (in Chinese).  
李铭花, 杨文建, 赵政, 等. 甘草不同极性溶剂提取物抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2009, (3):25-27.
- [8] WANG Jianguo, ZHOU Zhong, LIU Haifeng, et al. Study of Inhibitory Capability of Active Constituents from Glycyrrhiza Fisch against Tyrosinase Activity[J]. *China Surfactant Deterg Cosmet*, 2003, **33**(4):268-270 (in Chinese).  
王建国, 周忠, 刘海峰, 等. 甘草有效成分抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 日用化学工业, 2003, **33**(4):268-270.
- [9] FU Boqiang. Purification, the Structure Identification, Biological Activity Determination and Active Fingerprint's Study of the Effective Compositions from Licorice[D]. Xiamen: Xiamen University, 2005 (in Chinese).  
傅博强. 甘草中有效成分的分离纯化、结构鉴定、生物活性测定及活性指纹图谱研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- [10] ZHAO Huike, JIANG Yan. Preparation of Beautiful Whitening Cream with Licorice[J]. *Adv Fine Petrochem*, 2007, **8**(6):31-33 (in Chinese).  
赵会科, 姜艳. 甘草美白日霜的研制[J]. 精细石油化工进展, 2007, **8**(6):31-33.
- [11] FU Boqiang, LI Huan, WANG Xiaoru, et al. Inhibitory Effects of Several Licorice Flavonoids on the Monophenolase Activity of Tyrosinase[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2005, **17**(4):391-395 (in Chinese).  
傅博强, 李欢, 王小如, 等. 甘草黄酮类化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制[J]. 天然产物研究与开发, 2005, **17**(4):391-395.
- [12] FU Guoqiang, MA Pengcheng, WU Qinxue, et al. Inhibitory Effects of Ethanolic Extract from 196 Kind of Chinese Herbs on Tyrosinase[J]. *Chinese J Dermatol*, 2003, **36**(2):103-106 (in Chinese).  
傅国强, 马鹏程, 吴勤学, 等. 196 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, **36**(2):103-106.
- [13] Yokota T, Nishio H, Kubota Y, et al. The Inhibitory Effect of Glabridin from Licorice Extracts on Melanogenesis and Inflammation[J]. *Pigm Cell Res*, 1998, **11**(6):355-361.
- [14] Nerya O, Vaya J, Musa R, et al. Glabrene and Isoliquiritigenin as Tyrosinase Inhibitors from Licorice Roots[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, **51**(5):1201-1207.

- [15] Fu B Q, Li H, Wang X R, *et al.* Isolation and Identification of Flavonoids in Licorice and a Study of Their Inhibitory Effects on Tyrosinase[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, **53**(19):7408-7414.
- [16] Kim H J, Seo S H, Lee B, *et al.* Identification of Tyrosinase Inhibitors from Glycyrrhiza Uralensis[J]. *Planta Med*, 2005, **71**(8):785-787.
- [17] Mizutani K. Biological Activities, Production, and Use of Chemical Constituents of Licorice[R]. ACS Symp Ser, 1994, (547):322-328.
- [18] Hadas N, Gan R, Israel. Skin Whitening Composition; US, 402445[P]. 1997-03-11.
- [19] Piamphongsat T, MD. Treatment of Melasma: A Review with Personal Experience[J]. *Int J Dermatol*, 1998, **37**:897-903.
- [20] ZHOU Zhong, WANG Jianguo, ZHOU Lei, *et al.* A Testing Method for Evaluation of Inhibitory Performance of Oil Soluble Lighteners against Tyrosinase[J]. *China Surfactant Deterg Cosmet*, 2003, **33**(5):326-328 (in Chinese).  
周忠, 王建国, 周蕾, 等. 油溶性美白剂对酪氨酸酶抑制性能的测试方法[J]. 日用化学工业, 2003, **33**(5):326-328.
- [21] WANG Jilong, LI Jiangnan, ZHAO Wei, *et al.* Effects of 16 Kinds of Plant Extracts on Tyrosinase[J]. *Chinese Wild Plant Resour*, 2008, **27**(3):42-44 (in Chinese).  
王继龙, 李江楠, 赵伟, 等. 16种长白山野生植物提取物对酪氨酸酶抑制作用[J]. 中国野生植物资源, 2008, **27**(3):42-44.
- [22] WANG Jingyan, ZHU Shenggeng, XU Changfa. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002 (in Chinese).  
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [23] HUANG Huang, LIU Xiaodan, CHEN Qingxi. Studies on Mushroom Tyrosinase Inhibited by Benzaldehyde Family Compounds[J]. *Nat Sci J Xiamen Univ*, 2003, **42**(1):98-101 (in Chinese).  
黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活力的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, **42**(1):98-101.
- [24] QIU Ling. Study of the Inhibition Mechanism of Tyrosinase of the Active Substances from Natural Plant[D]. Xiamen: Xiamen University, 2008 (in Chinese).  
邱凌. 天然植物活性物质对酪氨酸酶作用机理的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [25] WANG Hui, GUO Li, XIE Wenlei. Methods for Determining Antioxidative Activity of Antioxidants[J]. *Food Ferment Ind*, 2006, **32**(3):92-98 (in Chinese).  
王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2006, **32**(3):92-98.
- [26] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al.* Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay[J]. *Free Radical Biol Med*, 1999, **26**:1231-1237.
- [27] Li G, Min B, Zheng C, *et al.* Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from Hovenia Dulcis[J]. *Arch Pharm Res*, 2005, **28**(7):804-809.
- [28] FAN Jinling. Study on Proanthocyanidins from Sea Buckthorn Seed[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006 (in Chinese).  
樊金玲. 沙棘籽原花色素的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [29] Barry H, John M, Okezie I. The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals[J]. *Anal Biochem*, 1987, **165**(1):215-219.
- [30] TU Caixia, LIU Zhili, REN Feng, *et al.* The Effect of 47 Traditional Chinese Herbs on the Activity of Tyrosinase and Enzyme Kinetics[J]. *China J Lepr Skin Dis*, 2006, **22**(6):456-458 (in Chinese).  
涂彩霞, 刘之力, 任凤, 等. 47种中药对酪氨酸酶活性的影响及酶动力学研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, **22**(6):456-458.
- [31] LIU Zhili, XU Yuefei, TU Caixia, *et al.* Studies on the Effect of Ethanol Extracts of 56 Traditional Chinese Drugs of Tyrosinase[J]. *J Dalian Med Univ*, 2000, **22**(1):7-10 (in Chinese).  
刘之力, 徐跃飞, 涂彩霞, 等. 56味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性影响的研究[J]. 大连医科大学学报, 2000, **22**(1):7-10.
- [32] YAN Jun, LI Changsheng, CHEN Shengli, *et al.* The Effects of Twenty-one Traditional Chinese Medicines on Tyrosinase[J]. *J Chinese Med Mater*, 2002, **25**(10):724-726 (in Chinese).  
闫军, 李昌生, 陈声利, 等. 21味中药对酪氨酸酶活性影响的研究[J]. 中药材, 2002, **25**(10):724-726.
- [33] Bhat V B, Sridhar G R, Madyastha K M. Efficient Scavenging of Hydroxyl Radicals and Inhibition of Lipid Peroxidation by Novel Analogues of 1,3,7-Trimethyluric Acid[J]. *Life Sci*, 2001, **70**:381-393.
- [34] Cheng Z Y, Li Y Z, Chang W B. Kinetic Deoxyribose Degradation Assay and Its Application in Assessing the Antioxidant Activities of Phenolic Compounds in a Fenton-type Reaction System[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, **478**(1):129-137.
- [35] FANG Ye. Study of the Inhibition Kinetics on Tyrosinase by SD[J]. *Chinese Tradit Herb Drugs*, 1999, **30**(7):526-528 (in Chinese).  
方冶. 黄芩素诱导体抑制酪氨酸酶作用的动力学研究[J]. 中草药, 1999, **30**(7):526-528.

# Inhibition Effect of Extracts of *G. inflata* Bat. on Mushroom Tyrosinase

ZHANG Mairu, FAN Jinling<sup>\*</sup>, ZHU Wenxue, LI Xin

( College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China )

**Abstract** A study on the inhibition type and mechanism was performed to screen the extract of *G. inflata* Bat. with the strongest inhibition effect on mushroom tyrosinase. The roots of *G. inflata* Bat. were extracted using different solvents sequentially. The inhibitory potencies and capacities of various extracts of *G. inflata* Bat. , which were obtained from solvents including glycyrrhizic acid, waste liquid from glycyrrhizic acid extraction, petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract, *n*-butyl alcohol extract and water extract, toward mushroom tyrosinase with *L*-DOPA as the substrate were investigated. Radicals scavenging activity were examined using 2, 2'-azino-bis ( 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid ) diammonium salt ( ABTS ) radical cation( ABTS<sup>·+</sup> ), hydroxyl radical( HO· ) assay. The inhibition type on mushroom tyrosinase was obtained from Lineweaver-Burk plots. The inhibition mechanism on mushroom tyrosinase was explored combining its radicals scavenging ability. The results showed that the ethyl acetate extract had the strongest inhibitory capacity among seven extracts with IC<sub>50</sub> = 3.4775 g/L, which also exhibited the strongest radical scavenging ability with IC<sub>50</sub> of 0.0442 g/L for ABTS<sup>·+</sup> and rate constant of 4.634 × 10<sup>8</sup> L/( g · s ) for HO· scavenging reaction. There was a family of lines with a common intercept on the 1/*v* axis but with different slopes on Lineweaver-Burk plots with *K*<sub>1</sub> value of 0.6667 g/L. In summary, the ethyl acetate extract is a reversible and competitive inhibitor, its inhibition mechanism on mushroom tyrosinase can be described as combining the capacity of scavenging oxygen free radicals with the ability of binding to the enzyme competitively.

**Keywords** *G. inflata* Bat. , mushroom tyrosinase, ABTS radical cation, hydroxyl radical, competitive inhibition