

绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶的活性影响及动力学分析

纪 桢*, 叱千家助, 孟现星, 许佳林, 白巧秀, 孙安霞

安康学院化学化工学院, 安康 725000

摘要:为考察绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶的动力学参数和作用机理。本研究采用体外酶促反应,以 L-酪氨酸和 L-DOPA 为底物,模拟了酪氨酸酶单酚和二酚酶的体外催化氧化过程。绞股蓝总皂苷在 50%、70% 乙醇洗脱段和 50%、70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物在酪氨酸酶上的 K_i 值分别为 1.533、1.767、1.312 和 1.210 mmol/L。 K_i 值越低,对酪氨酸酶的抑制作用越强,单酚酶的氧化阶段越快,表明硒元素显著提高了绞股蓝皂苷对酪氨酸酶的抑制作用。酶反应动力学分析表明,四种绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶的抑制作用均为混合竞争抑制。其独特的药理学特性为绞股蓝及硒系美白化妆品的进一步研究开发提供了理论依据和参考。

关键词:绞股蓝皂苷-硒配合物;酪氨酸酶;抑制作用;

中图分类号:R284;Q946.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)1-0093-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.1.015

Kinetics and effect of Gypenoside-selenium complex on tyrosinase activity

Ji Zhen*, CHIGAN Jia-zhu, MENG Xian-xing, XU Jia-lin, BAI Qiao-xiu, SUN An-xia

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Ankang University, Ankang 725000

Abstract: By *in vitro* enzymatic reaction, the kinetic parameters and mechanism of Gypenosides on tyrosinase were compared with their selenium-complexes. L-tyrosine and L-DOPA were used as substrates to simulate the catalytic oxidation process of tyrosinase monophenol and diphenol enzyme *in vitro*. The K_i values of gypenoside on 50%, 70% ethanol elution segments and gypenoside-selenium complexes on 50%, 70% ethanol eluting gypenoside on tyrosinase were 1.533, 1.767, 1.312, and 1.210 mmol/L respectively. The lower K_i value indicated that higher concentrations of Selenium could enhance higher inhibitory effect of *Gynostemma pentaphyllum* on tyrosinase, otherwise, the oxidation stage of monophenolase was a quick step. The kinetic analysis of enzyme reaction showed that the inhibitory effects of four gypenosides and its selenium-complexes on tyrosinase were all mixed-competitive inhibition. The specific pharmacological and chemical characteristics provided a theoretical basis and reference for further research and development of *Gynostemma pentaphyllum* and selenium related whitening cosmetics.

Key words: Gypenoside-selenium complex; tyrosinase; inhibition

酪氨酸酶即多酚氧化酶,是由两个铜离子与酶蛋白结合的金属酶,具有单酚加羟酶和二酚氧化酶的活性^[1]。其能将酪氨酸羟化,产生邻位二羟基苯丙氨酸,可将多巴氧化为多巴醌,进而产生一系列引起褐变的色素类物质,是黑色素形成的关键酶^[2]。

绞股蓝属(*Gynostemma pentaphyllum*)是葫芦科植物,在我国主要分布于秦岭、长江流域及西南地

区,例如陕西安康平利、福建等地^[3]。绞股蓝的主要活性成分是绞股蓝皂苷,其主要结构如图 1 所示,为四环三萜的达玛烷型,结构类似于人参皂苷^[4],具有保护神经^[5]、抗氧化、增强免疫的的药理和食用功效^[6],属于药食同源类植物。硒元素是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的组成成分,该酶的作用是催化还原性谷胱甘肽(GSH)与过氧化物的氧化还原反应,所以可发挥抗氧化作用,是重要的自由基清除剂^[7]。本试验从绞股蓝茎叶中,采用乙醇提取法得到绞股蓝粗皂苷,在经过大孔树脂纯化,采用 50%、70% 乙醇洗脱的绞股蓝皂苷与硒元素合成配合物,测定其在不同浓度下对酪氨酸酶的活性影响

收稿日期:2018-05-30 接受日期:2018-11-19

基金项目:安康市科学技术研究发展计划(2016AK-01-04);陕西省自然科学基金基础研究计划(2014JM2-2012);安康学院脱贫攻坚应急专项(2017FPZX005);安康学院校级专项科研计划(2014AYPYZ02);安康学院专项经费科研项目(2015AYQDZR02)

* 通信作者 E-mail:jjzhen@aku.edu.cn

及反应机理,探索其最佳活性组分,以及硒元素对该反应的影响,为绞股蓝皂苷—硒配合物美白化妆品的开发提供必要的理论依据。

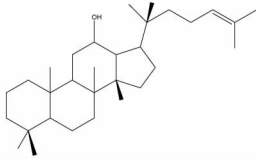


图1 四环三萜达玛烷型基本结构

Fig. 1 The basic tetracyclic triterpenoids structure of the dammarane-type

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SP-1901UV 双光束紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);FA2104 型分析电子天平(上海良平仪器有限公司);85-2 型恒温磁力搅拌计(常州国华电器有限公司);FT-IR2000 傅里叶红外光谱仪(美国 Niccolet 公司);FD-1A-50 型真空冷冻干燥机(上海比浪仪器有限公司)。

酪氨酸酶(沃什顿生物化学有限公司);L-酪氨酸、L-DOPA(南京奥多福尼生物科技有限公司);绞股蓝皂苷(实验室自制)盐酸、氢氧化钠、二氧化硒、吡啶、无水乙醇等试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 绞股蓝皂苷提取及制备

称取一定量乙醇法制备的绞股蓝粗皂苷(来源为绞股蓝茎叶部分),50℃水溶解完全后,上柱静态吸附2h。用4BV蒸馏水除去多糖及水溶性物质,后采用浓度为30%、50%、70%、90%的乙醇分别洗脱,洗脱液浓缩后,真空冷冻干燥24h后称量。

1.2.2 绞股蓝皂苷-硒配合物的制备

分别称取少许等量50%和70%浓度梯度乙醇洗脱的绞股蓝总皂苷置于两个100mL单口烧瓶中,依次分别向单口烧瓶中加入无水乙醇和盐各15mL,再滴入几滴吡啶,随后将定量的二氧化硒溶于无水乙醇后分别缓慢滴入两个烧瓶中。将其放在恒温加热磁力搅拌器中,加热反应6h。将温度调到50℃,用氢氧化钠饱和溶液将pH值调至6.5进行

过滤。过滤出棕褐色固体粉末,用无水乙醇将其洗涤数次,烘干、称重。

1.2.3 绞股蓝皂苷-硒配合物红外光谱测定

称取少量制得的绞股蓝皂苷-硒配合物、100mg溴化钾粉末置于玛瑙研钵中研磨,红外灯下烘烤半小时,压片,在400~4000 cm^{-1} 的波数下扫描。

1.2.4 抑制酪氨酸酶活性测定

酪氨酸酶单酚酶的活力测定是以2.0mmol/L的L-酪氨酸为底物,二酚酶活力的测定则以0.5mmol/L的L-DOPA为底物。在0.05mmol/L的磷酸缓冲液1.5mL测活体系中,先分别加入0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0mmol/L不同的效应物于比色皿中,本实验中的效应物分别为不同浓度的50%乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物、50%乙醇洗脱绞股蓝皂苷、70%乙醇洗脱的绞股蓝皂苷、70%乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物等四种绞股蓝皂苷-硒配合物溶液。然后将事先在30℃恒温水浴中制备好的底物1.4mL加入比色皿,最后加入0.1mL的3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酪氨酸酶水溶液,立即混匀测定其在475nm波长下的光密度变化值。由反应曲线直线部分外推得到横轴截距为迟滞时间。对照组加入3.33%(体积比)DMSO以排除DMSO对实验结果的影响。并且根据475nm波长下的吸光度增加0.001为一个酪氨酸酶活力单位(U/min)^[8,9]。

在测活体系中,固定酪氨酸酶的浓度不变,改变四种绞股蓝皂苷相关溶液底物浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响程度。在含不同浓度的效应物(四种绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物浓度分别为:0、0.1、0.5、1.0、2.0mmol/L)的测活体系中,改变底物L-DOPA的浓度,测定不同底物下的酶促反应速度,通过Lineweaver-Burk双倒数作图,通过比较酶催化反应的动力学参数 K_m 和 V_m 的变化来判断绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制类型^[10-12]。

2 结果与分析

2.1 不同乙醇浓度下绞股蓝皂苷的得率

如表1所示,洗脱后皂苷的总得率为46.2%,其中50%、70%的乙醇洗脱皂苷得率较高,30%

表1 不同乙醇浓度下绞股蓝皂苷的得率($n=3$, Mean \pm SD)

Table 1 The yield of Gypenosides under the different ethanol concentrations($n=3$, Mean \pm SD)

| 乙醇浓度 Ethanol concentration (%) | 30 | 50 | 70 | 90 | 总得率 Total yield (%) |
|-----------------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|------------------------|
| 得率 Purification yield (%) | 6.4 \pm 0.2 | 18.4 \pm 0.4 | 19.4 \pm 0.3 | 2.0 \pm 0.1 | 46.2 |

及 90% 相对较低, 说明在绞股蓝皂苷主要存在于 50%、70% 乙醇洗脱段, 因此, 本文选择以上两部分

皂苷进行配合物合成及其动力学研究。

2.2 绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物红外谱图

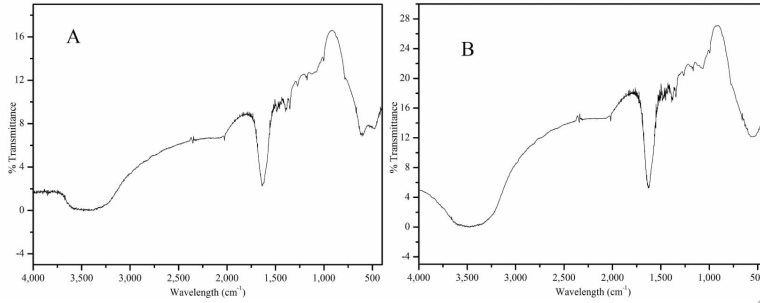


图 2 绞股蓝皂苷红外光谱图

Fig. 2 The infrared spectra of Gypenosides

注: A、B 分别为 50%、70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷红外谱图。

Note: A: 50% ethanol eluent saponins; B: 70% ethanol eluent saponins.

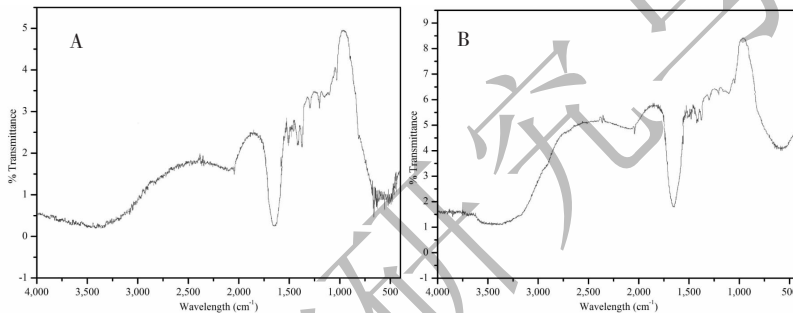


图 3 绞股蓝皂苷-硒配合物红外光谱图

Fig. 3 The infrared spectra of Gypenoside selenium complexes

注: A、B 分别为 50%、70% 乙醇洗脱皂苷-硒配合物红外谱图。

Note: A: 50% ethanol eluent saponins; B: 70% ethanol eluent saponins.

绞股蓝皂苷已分离得到了 100 多种皂苷, 其中 25% 与人参皂苷相类似^[13]。如图 2 所示, 50%、70% 乙醇洗脱的绞股蓝皂苷出峰特征基本一致, 故二者所含皂苷的种类差异小。在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 波长处-OH 峰面较为宽阔, 说明该峰为苯环上的-OH 基团的特征峰。 $1\,625\text{ cm}^{-1}$ 为含有取代基联苯的特征峰。70% 乙醇洗脱皂苷在 $3\,400$ 、 $1\,150\text{ cm}^{-1}$ 峰强度略大于 50% 的, 说明其环上-OH 数量略多于 50% 的, 形成配合物的位点多于 50% 乙醇洗脱皂苷。如图 3 所示, $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 波长处-OH 吸收峰的变得更为平缓, 说明皂苷四环三萜结构中环上-OH 可以与 Se 产生配位键, 形成配合物。

2.3 绞股蓝皂苷及其绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶单酚酶的反应影响

酪氨酸酶单酚酶的催化氧化进程反应的初始阶段, 酪氨酸酶单酚酶的活性可以根据其氧化反应的

第一阶段产物 L-DOPA 出现观察, 反向即表现为迟滞时间以及出现稳定速率的快慢。如表 2 所示, 分别为系列浓度的 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物、70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物、50% 乙醇洗脱的绞股蓝皂苷以及 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷对酪氨酸酶单酚酶的活性影响, 表 2 中用迟滞时间来表现效应物对 L-酪氨酸的抑制影响。结果表明底物的氧化过程随着四种绞股蓝皂苷及其硒配合物相关溶液的加入, 都产生了一定的迟滞时间, 并且随着四种绞股蓝皂苷及其硒配合物相关溶液的浓度升高, 各反应进程的迟滞时间都有加大的趋势。说明 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物、70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物、50% 乙醇洗脱的绞股蓝皂苷以及 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷对酪氨酸酶单酚酶有抑制影响。相比较 50% 和 70% 乙醇洗脱的绞股蓝皂苷, 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷的迟滞时间

更长,说明在 70% 乙醇洗脱物中所包含的皂苷更多或者酪氨酸酶抑制成分;相同乙醇洗脱浓度的绞股蓝皂苷与皂苷-硒配合物相比较,绞股蓝皂苷-硒配合物的迟滞时间更长,绞股蓝皂苷与硒的配合更好

地发挥了抗氧化作用。总体来看,70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制效果最明显,50% 绞股蓝皂苷抑制作用最弱。绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶活性抑制比较绞股蓝皂苷强。

表 2 酪氨酸酶单酚酶的氧化进程迟滞时间影响

Table 2 The effect of retardation time on tyrosinase mono phenoloxidase oxidation process

| 效应物浓度 Effector concentration (mmol/L) | 迟滞时间 Lag time (s) | | | | | |
|--|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 1 | 2 |
| 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷 50% ethanol extract gypenosides | 160 | 179 | 197 | 211 | 225 | 230 |
| 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物 50% ethanol extract gypenosides-Se complex | 160 | 197 | 214 | 237 | 253 | 282 |
| 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷 70% ethanol extract gypenosides | 160 | 180 | 200 | 219 | 237 | 245 |
| 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物 70% ethanol extract gypenosides-Se complex | 160 | 203 | 227 | 259 | 272 | 298 |

2.4 绞股蓝皂苷及其绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶二酚酶的反应影响

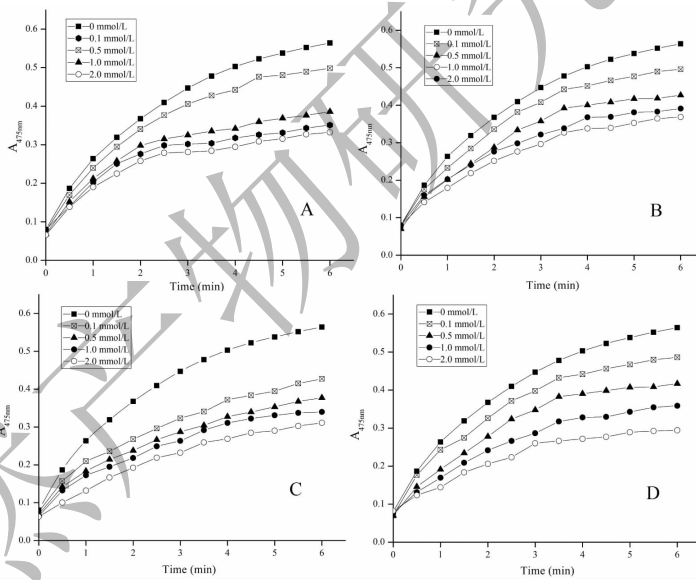


图 4 绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶二酚酶氧化进程影响

Fig. 4 The effect of gypenosides and its complexes on diphenolase activity of tyrosinase

注:A. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷;B. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物;C. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷;D. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物。

Note: A. 50% ethanol extract gypenosides; B. 50% ethanol extract gypenosides-Se complex; C. 70% ethanol extract gypenosides; D. 70% ethanol extract gypenosides-Se complex.

不同浓度的四种绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物对 L-DOPA 的氧化进程影响如图 4 所示。与酪氨酸单酚酶反应进程不同的是,在酪氨酸二酚酶的氧化进程中并无明显的迟滞现象出现。四种物质对酪氨酸酶的抑制效果都随着浓度增加而增加。50% 乙

醇洗脱绞股蓝皂苷和 70% 乙醇绞股蓝皂苷影响酪氨酸酶二酚酶的氧化进程基本相似,反应速度增长率随效应物浓度增高而呈梯度下降。50% 绞股蓝皂苷-硒配合物在效应物浓度为 0.5 mmol/L 时就表现出较好的抑制效果;而 70% 绞股蓝皂苷-硒配合物

在加入 0.1 mmol/L 就有明显的抑制作用显现。从剂量上看, 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用最大, 即硒元素促进了抑制作用。

2.5 绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物对酪氨酸酶的作用机理

如图 5 所示, 绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶的抑制作用随浓度增加而增加, 酶活力与酶用

量呈线性关系, 且通过原点。在酶用量一定时, 随着绞股蓝皂苷及其硒配合物浓度的增加, 斜率下降, 说明绞股蓝皂苷及其硒配合物与酪氨酸酶是以非共价键的形式结合, 通过抑制酪氨酸酶的活力来达到抑制反应进程, 并非减小有效的酪氨酸酶量或造成酶活性的不可逆丧失来控制反应, 故此该抑制属于可逆抑制作用。

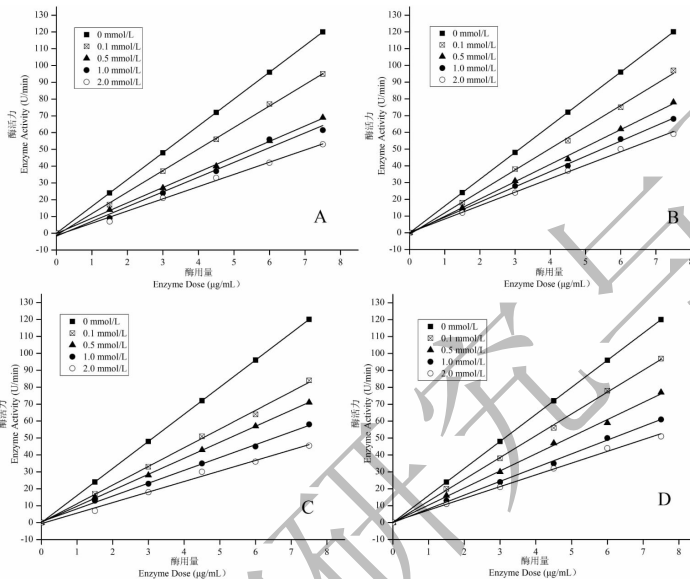


图 5 绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制机理

Fig. 5 The inhibition mechanism of gypenosides and its complexes on diphenolase activity of tyrosinase

注: A. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷; B. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物; C. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷; D. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物。

Note: A. 50% ethanol extract gypenosides; B. 50% ethanol extract gypenosides-Se complex; C. 70% ethanol extract gypenosides;

D. 70% ethanol extract gypenosides-Se complex.

2.6 绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物对酪氨酸酶二酚酶抑制的动力学分析

2.6.1 绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物对酪氨酸酶催化氧化抑制作用

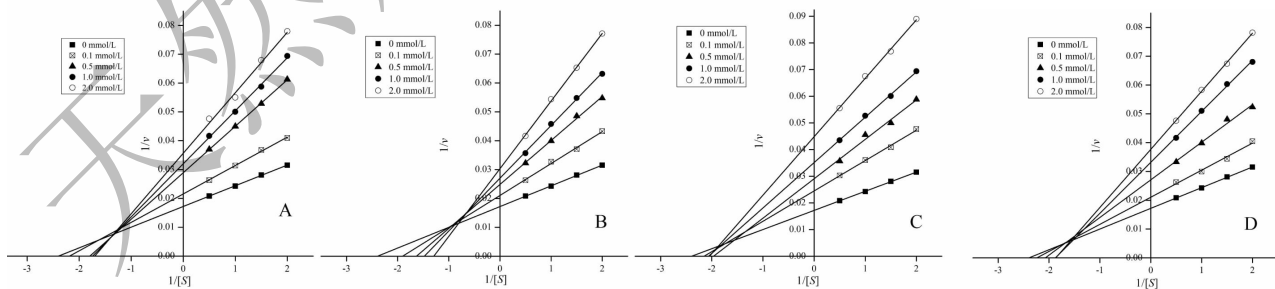


图 6 绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶催化氧化 L-多巴抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线图

Fig. 6 The lineweaver-Burk curve of the inhibition effect of gypenosides and its complexes on tyrosinase catalyzed oxidation of L- DOPA

注: A. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷; B. 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物; C. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷;

D. 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物。

Note: A. 50% ethanol extract gypenosides; B. 50% ethanol extract gypenosides-Se complex; C. 70% ethanol extract gypenosides;

D. 70% ethanol extract gypenosides-Se complex.

在该体系中,固定酪氨酸酶的浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不变,改变四种绞股蓝皂苷及其硒配合物与 L-DO-PA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响程度^[14-18]。如图 6 所示,为绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶二酚酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线。系列直线相交于第二象限,并且随着绞股蓝皂苷及其皂苷-硒配合物浓度的增加,曲线纵轴截距也增大,则表示 K_m 值增加, V_m 值减小,抑制效果随

着四种效应物浓度的增加而增加,随着底物浓度减小而变弱,由此可见绞股蓝皂苷及其硒配合物对黑色素形成过程的抑制,既可以通过效应物在酪氨酸酶上的占位,也可以与反应底物结合减少底物与酶发生反应的概率,达到抑制效果,抑制类型属于混合竞争抑制。

2.6.2 绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶抑制动力学参数

表 3 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷对酪氨酸酶抑制动力学参数

Table 3 The kinetic parameters of tyrosinase inhibition by 50% ethanol elution gypenosides

| 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷 50% ethanol elution gypenosides (mmol/L) | Lineweaver-Burk 方程 Lineweaver-Burk equation | K_m (mmol/L) | v_m | K_i (mmol/L) | K_{is} (mmol/L) |
|---|--|-------------------|--------|-------------------|----------------------|
| 0.00 | $1/v = 0.00718/[S] + 0.0172$ | 0.417 | 58.140 | 1.533 | 2.488 |
| 0.10 | $1/v = 0.00986/[S] + 0.02154$ | 0.458 | 46.425 | | |
| 0.50 | $1/v = 0.01612/[S] + 0.02889$ | 0.558 | 34.602 | | |
| 1.00 | $1/v = 0.01839/[S] + 0.03199$ | 0.575 | 31.260 | | |
| 2.00 | $1/v = 0.02099/[S] + 0.03565$ | 0.589 | 28.050 | | |

表 4 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶抑制动力学参数

Table 4 The kinetic parameters of tyrosinase inhibition by 50% ethanol elution gypenosides-selenium complex

| 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物 50% ethanol elution gypenosides-selenium complex (mmol/L) | Lineweaver-Burk 方程 Lineweaver-Burk equation | K_m (mmol/L) | v_m | K_i (mmol/L) | K_{is} (mmol/L) |
|---|--|-------------------|--------|-------------------|----------------------|
| 0.00 | $1/v = 0.00718/[S] + 0.0172$ | 0.417 | 58.140 | 1.312 | 3.432 |
| 0.10 | $1/v = 0.01106/[S] + 0.02104$ | 0.526 | 47.529 | | |
| 0.50 | $1/v = 0.01523/[S] + 0.02485$ | 0.613 | 40.241 | | |
| 1.00 | $1/v = 0.01828/[S] + 0.02702$ | 0.677 | 37.010 | | |
| 2.00 | $1/v = 0.02343/[S] + 0.03031$ | 0.874 | 32.992 | | |

表 5 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷对酪氨酸酶抑制动力学参数

Table 5 The kinetic parameters of tyrosinase inhibition by 70% ethanol elution gypenosides

| 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷 70% ethanol elution gypenosides (mmol/L) | Lineweaver-Burk 方程 Lineweaver-Burk equation | K_m (mmol/L) | v_m | K_i (mmol/L) | K_{is} (mmol/L) |
|---|--|-------------------|--------|-------------------|----------------------|
| 0.00 | $1/v = 0.00718/[S] + 0.0172$ | 0.417 | 58.140 | 1.767 | 2.715 |
| 0.10 | $1/v = 0.00940/[S] + 0.02105$ | 0.447 | 47.506 | | |
| 0.50 | $1/v = 0.01306/[S] + 0.02709$ | 0.482 | 36.914 | | |
| 1.00 | $1/v = 0.01703/[S] + 0.03513$ | 0.485 | 28.466 | | |
| 2.00 | $1/v = 0.02193/[S] + 0.04483$ | 0.489 | 22.306 | | |

表 6 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶抑制动力学参数

Table 6 The kinetic parameters of tyrosinase inhibition by 70% ethanol elution gypenosides-selenium complex

| 70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物 70% ethanol elution gypenosides- selenium complex (mmol/L) | Lineweaver-Burk 方程 Lineweaver-Burk equation | K_m (mmol/L) | v_m | K_i (mmol/L) | K_{is} (mmol/L) |
|---|--|-------------------|--------|-------------------|----------------------|
| 0.00 | $1/v = 0.00718/[S] + 0.0172$ | 0.417 | 58.140 | 1.210 | 1.444 |
| 0.10 | $1/v = 0.01139/[S] + 0.02457$ | 0.464 | 40.700 | | |
| 0.50 | $1/v = 0.01479/[S] + 0.02906$ | 0.509 | 34.412 | | |
| 1.00 | $1/v = 0.01763/[S] + 0.03316$ | 0.531 | 30.157 | | |
| 2.00 | $1/v = 0.02017/[S] + 0.03767$ | 0.535 | 26.546 | | |

表 3~6 为 4 种绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶抑制影响的动力学参数,由表可知,随着效应物的加入, K_m 值增大,即底物 L-多巴与酪氨酸酶结合程度或亲和力下降。绞股蓝皂苷大于绞股蓝皂苷-硒配合物的 K_i 值,表明硒元素与绞股蓝皂苷结合,增强了对酪氨酸酶催化氧化进程的抑制作用。70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷大于 50% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷的 K_i ,表明在洗脱过程中,50% 乙醇先将绞股蓝中带有较多极性基团的皂苷洗脱,其获得的绞股蓝皂苷结构与酪氨酸酶底物相似,达到竞争性抑制,并在抑制原因方面起主要作用。两种洗脱浓度绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶的抑制活性差异主要受是洗脱皂苷基团差异影响。 K_{is} 大于 K_i ,说明 4 种效应物与游离酶的结合度大于其与酶-底物络合物的结合度。

3 结论

绞股蓝皂苷及其硒配合物对酪氨酸酶具有明显的抑制作用,抑制类型为混合竞争性抑制。70% 乙醇洗脱绞股蓝皂苷-硒配合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制效果最明显,50% 绞股蓝皂苷抑制作用最弱。50%、70% 绞股蓝皂苷-硒配合物的 K_i 值分别为 1.312、1.210 mmol/L,50%、70% 绞股蓝皂苷的 K_i 值分别为 1.533、1.767 mmol/L,前二者值均小于后二者值,说明硒元素可以增强绞股蓝皂苷对酪氨酸酶的活性抑制作用。实验结果,对开发绞股蓝皂苷及其硒配合物美白产品提供了理论参考。

参考文献

- Bi YF, Song FR, Liu ZQ. Research progress on types of natural tyrosinase inhibitors and their inhibitory effects on tyrosinase[J]. J Jilin Univ: Med (吉林大学学报:医药版), 2014, 40: 454-459.
- Chen QX, Song KK. Research progress in tyrosinase[J]. J

- Xiamen Univ: Nat Sci (厦门大学学报:自科版), 2006, 45: 731-737.
- Hong XY. Extraction, isolation and purification of Gypenosides and their antioxidation effects [D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2012.
- Chen SK. Classification system and distribution of Gynostemma[J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1995, 33: 403-410.
- Bao FX, Tao LX, Zhang HY. Research progress on pharmacological effects of active ingredients of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Chin J New Drug and Clin Med (中国新药与临床医学杂志), 2018, 37: 11-17.
- Guo JJ, Ren DY, Li Z. Protective effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins on vascular endothelial damage in mice induced by high choline diet [J]. Food Bio J (食品与生物技术杂志), 2017, 36: 1131-1136.
- Qu LZ, Yang SJ, Zhuo S, et al. Role of trace essential elements in selenium [J]. Chin Agr Bul (中国农业通报), 2010, 26(7): 94-97.
- Chen LH, Liu X, Ming YL, et al. Inhibition and antioxidant effect of extracts from leaves of leaves to tyrosinase [J]. J Xiamen Univ: Nat Sci (厦门大学学报:自科版), 2012, 51: 410-414.
- Wang J, Xu DP. Tyrosinase-Inhibition components from buckwheat bee pollen extract [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 101-105.
- Mu Y. Purification and inhibition mechanism of a thousand day red tyrosinase inhibitor [D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2012.
- Stadtman TC. Selenoproteins-tracing the role of a trace element in protein function [J]. P Biol, 2005, 3: 2077-2079.
- Su TJ, Wu C, Liu Q, et al. Tyrosinase inhibition activity of the fermented product of endophytic fungi isolated from *Fritillariae cirrhosae* Bulbus [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1368-1373.