

## 甘草甜味素中酪氨酸酶抑制剂的筛选

邢珍珍<sup>1,2</sup>, 孟庆艳<sup>1\*</sup>, 卢亚玲<sup>1,2</sup>, 张红喜<sup>2</sup>, 申雪花<sup>2</sup>, 刘文杰<sup>1,2\*</sup>

(1. 塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300;  
2. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

**[摘要]** 目的:从生产甘草酸的副产品甘草甜味素中寻找酪氨酸酶抑制剂。方法:采用高效液相色谱与酶抑制分析相结合,利用电喷雾 MS-MS 串联质谱方法及紫外光谱对活性成分进行结构确认,建立了甘草甜味素中酪氨酸酶抑制活性成分快速筛选与鉴别方法。HPLC 色谱柱分离后,利用二极管阵列检测器得到各活性组分的紫外光谱图,流出液与在 96 孔板中与酪氨酸酶、L-多巴作用,利用酶标仪检测酶剩余活力,从而实现筛选的目的。结果:利用此方法从甘草甜味素中筛选出 4 个具有明显酪氨酸酶抑制活性的化合物,通过 ESI-MS/MS 分析和紫外光谱图,结合相关文献,实现了各化合物的快速鉴别。结论:4 个化合物均为已知化合物,分别为甘草苷、18 $\alpha$ -羟基甘草次酸甲酯、甘草查耳酮 C 和 18 $\alpha$ -甘草次酸。

**[关键词]** 甘草甜味素; 高效液相色谱; 筛选; 酪氨酸酶

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0163-04

## Screening and Identification of Tyrosinase Inhibitors in Glycyrrhiza Extract by High Performance Liquid Chromatography

XING Zhen-zhen<sup>1,2</sup>, MENG Qing-yan<sup>1\*</sup>, LU Ya-ling<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-xi<sup>2</sup>, SHEN Xue-hua<sup>2</sup>, LIU Wen-jie<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Groups, Tarim University, Alar 843300, China;  
2. College of life Science Taxin University, Alar 893300, China)

**[Abstract]** **Objective:** A new method based on the HPLC scavenging enzyme inhibition activity and HPLC MS/MS method for the identification of active constituent from glycyrrhiza extract was developed. **Method:** Glycyrrhiza extract was separated by HPLC and the outlet of HPLC photo diode array detector flow cell was receiving every 30s. Enzyme inhibition react with tyrosinase in post column reaction and IMARK detect at 419 nm. **Result and Conclusion:** The results showed that 4 compounds in glycyrrhiza extract have scavenging enzyme inhibition activity, and all the 4 compounds including Liquiritin, methyl 18 $\alpha$ -hydroxyglycyrrhetate, licochalcone C, 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid were identified by MS/MS spectrogram and UV spectrum.

**[Key words]** glycyrrhiza extract; high performance liquid chromatography; screening; tyrosinase

甘草甜味素是一种纯天然甜味剂,其主要包括甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮等化合物<sup>[1-3]</sup>,具有抗氧化、保健、解毒、护肝、消炎、增香等功效<sup>[4,6]</sup>。由于其中含有大量黄酮类化合物,甘草

甜味素也被用作化妆品的功效成分,以实现抗炎、美白的的作用。

酪氨酸酶(tyrosinase)(EC1.14.18.1)又称多酚氧化酶(PPO),在黑色素的生物合成过程中起着关键性的作用,与果蔬褐化、昆虫表皮鞣化、人的色素障碍性疾病及恶性黑色素肿瘤的发生与治疗有重要关系<sup>[7-9]</sup>。目前,酪氨酸酶抑制剂已被用于果蔬保鲜、化妆品中的增白剂、生物农药的杀虫剂添加物。对酪氨酸酶抑制剂的研究已引起国内外的广泛重视,由于酪氨酸酶参与黑色素合成的前两步反应,是

**[收稿日期]** 20120520(003)

**[基金项目]** 兵团青年科技创新资金专项(2012CB028);新疆生产建设兵团科技攻关项目(2011AB030)

**[通讯作者]** \*孟庆艳, E-mail: hongyan\_meng@sina.com

\*刘文杰, Tel: 0997-4681610, E-mail: lury@sina.com

黑色素合成的限速酶,其活性与黑素合成量相关,因此,可以选择应用酪氨酸酶抑制剂通过抑制酪氨酸酶的活性,阻断黑色素的合成反应链,减少其在皮肤内的生成<sup>[10-14]</sup>。

已从天然产物中发现很多酪氨酸酶抑制剂,如熊果苷、槲皮素、仙鹤草素、曲酸、杨梅黄素和光甘草定等<sup>[15-19]</sup>,有些已经在护肤化妆品中应用。许多植物的提取物对酪氨酸酶表现出较强的抑制作用,如白术、藁本、白及、白附子、沙苑子、苦参等<sup>[20-22]</sup>,但研究主要停留在粗提物的阶段,对其活性成分的研究有待进一步深入。

为充分了解和利用甘草中的主要成分,明确其作用机制,本实验利用高效液相色谱分离与柱后酶抑制活性微量分析相结合,利用电喷雾 MS-MS 串联质谱方法及紫外光谱甘草甜味素的酪氨酸酶抑制活性成分进行了筛选和鉴定,旨在为充分利用具有丰富资源量的特色资源的开发提供新的依据,为明确其化学成分奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有二极管阵列(DAD)检测器,四元低压梯度泵,自动进样器等;Agilent 1260 液相色谱仪(美国安捷伦公司),配在线脱气装置、二极管阵列检测器;6410B 三重四级杆质谱仪,配 ESI 源、Masshunter 数据处理系统。Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司);TDL-20M 高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机公司);Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Waters 公司)。BIO-RAD 550 酶标仪(美国伯乐),Maxi Dry Lyo 真空离心浓缩仪(丹麦 Heto 公司)。

甲醇、甲酸为色谱纯,蘑菇酪氨酸酶(Sigma-Aldrich, 5 000 U·mg<sup>-1</sup>);二甲基亚砜(分析纯,上海沪试),磷酸(分析纯),L-多巴(分析纯,东京化成),甘草甜味素样品为新疆阿拉尔新农甘草产业有限责任公司提供。

**1.2 待测溶液的配制** 准确称取 0.050 g 甘草甜味素样品于 5 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇水溶解,定容至刻度,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取上层清液过 0.45 μm 水相滤膜,待用。

**1.3 色谱及质谱条件** Waters symmetry (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) C<sub>18</sub> 色谱柱,流动相甲醇-水,分别含 0.1% 的甲酸,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,样品溶液进样体积 40 μL。

质谱条件:离子源为 ESI(-),检测方式为多反

应监测(multiple reaction monitor, MRM)方式,利用保留时间和碎片信号比值判断定性结果。毛细管电压为 4 000 V,干燥气温度 350 °C,雾化气压力 35 psi,干燥气流量 6 L·min<sup>-1</sup>,碎裂电压 135 V。

## 2 结果与讨论

**2.1 HPLC 分离** 10 g·L<sup>-1</sup> 的甘草甜味素溶液取 20 μL 注入液相色谱仪分离。用甲醇-水梯度洗脱(0~60 min, 40%~100% 甲醇),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。检测器为二极管阵列检测器,检测波长 360 nm,色谱柱流出物按每 30 s 接于 1.5 mL 离心管中,每管接 0.5 mL,于真空离心浓缩仪中室温下离心浓缩至干,浓缩温度为室温,冷阱温度为 -100 °C。浓缩后的离心管中加入 DMSO 溶液 10 μL,溶解,待用。

**2.2 酶活性分析** 离心管中加入 90 μL pH 6.8 的 0.07 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液,混匀后取 40 μL 加入 96 孔板中,另取 40 μL 作为参比。96 孔板中继续加入 20 U·mL<sup>-1</sup> 的酪氨酸酶 40 μL,37 °C 孵育 10 min 后,加入 L-多巴,迅速用移液枪混匀,用酶标仪在 419 nm 波长处检测吸光度,酪氨酸酶的剩余活性用其吸光度表示。

根据色谱图以及其流出物对应的时间,可将二者的谱图进行合成(图 1),可以清楚的看出,色谱峰 1~4 具有明显的酪氨酸酶抑制活性,利用二极管阵列检测器色谱峰对应的色谱图可得到甘草甜味素中酪氨酸酶抑制成分的紫外光谱图。

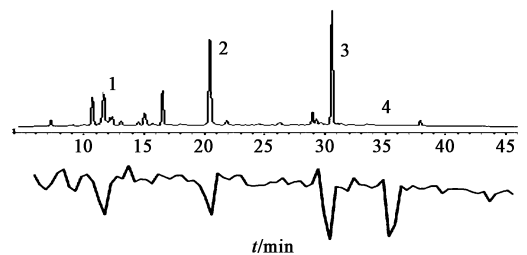


图 1 甘草甜味素中酪氨酸酶抑制活性成分的 HPLC 筛选

**2.3 活性成分的 HPLC-MS-MS 分析** 在 ESI 负离子全扫描模式下,对雾化器压力、干燥气流速和温度、碎裂电压等条件进行了优化。在优化的条件下,甘草甜味素中各组分对质谱响应信号良好。通过全扫描,可得到图 1 中峰 1~4 各组分的 [M-H]<sup>-</sup> 准分子离子。在后续的分析中,选择各活性组分的 [M-H]<sup>-</sup> 作为母离子进行子离子扫描,碰撞能量为 10~40,扫描时间为 100 ms,以得到各组分的 MS-MS 二级质谱图。根据 [M-H]<sup>-</sup> 的相对分子质量以及二级谱图,结合组分的紫外光谱图推测化合物的结构<sup>[2-3]</sup>,并根据二级质谱图推测化合物可能的断裂方式。各活性组分的结构及其

ESI-MS-MS 质谱图见图 2。

从以上谱图结合其紫外光谱图及相关文献,可鉴定出组分 1~4 的结构分别为甘草苷(liquiritin)、

18 $\alpha$ -羟基甘草次酸甲酯(methyl 18 $\alpha$ -hydroxyglycyrrhetate)、甘草查耳酮 C(licochalcone C)、18 $\alpha$ -甘草次酸(18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid)。见表 1。

表 1 甘草甜味素中抗氧化成分的 HPLC-ESI MS/MS 鉴定

峰号	$t_R/h$	$[M-H]^-$	分子式	二级离子	化合物
1	13.11	416.9	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	91.5, 118.7, 147.8, 254.8	甘草苷(liquiritin)
2	15.20	499.0	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	82.7, 168.7, 317.0	18 $\alpha$ -羟基甘草次酸甲酯(methyl 18 $\alpha$ -hydroxyglycyrrhetate)
3	19.67	337.0	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	93.1, 161.0, 187.1, 201.2	甘草查耳酮 C(licochalcone C)
4	20.42	469.1	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	354.9, 425.1	18 $\alpha$ -甘草次酸(18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid)

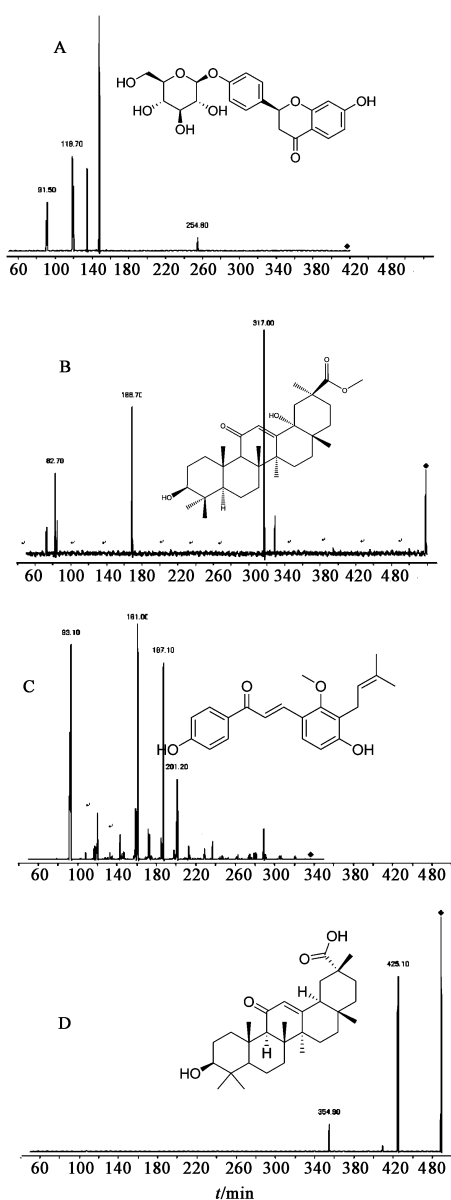


图 2 甘草甜味素中酪氨酸酶抑制成分 1-4 的 ESI-MS/MS

#### 4 结论

本研究利用高效液相色谱法结合微量酶活性分

析法快速筛选鉴别甘草甜素中酪氨酸酶抑制活性成分,并利用二极管阵列检测器及串联质谱仪鉴定其活性成分。利用本文的方法,从甘草甜素中共鉴定出 4 个明显具有酪氨酸酶抑制活性的化合物,分别为甘草苷、18 $\alpha$ -羟基甘草次酸甲酯、甘草查耳酮 C、18 $\alpha$ -甘草次酸。可以看出,甘草甜味素不但具有甜味剂、杀菌剂的功能,同时具有良好的抗氧化作用及酪氨酸酶抑制活性,具有良好的开发应用前途。

#### [参考文献]

- [1] 濮润,王卫星,王京辉,等. 甘草药材的快速 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志,2008,33(22):2650.
- [2] 周燕,王明奎,廖循,等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学,2004,32:174.
- [3] 孙明谦. 甘草中化学成分的研究[D]. 长春:吉林大学,2006.
- [4] 彭雪萍,马庆一. 甘草甜素废渣中抗氧化物的提取及活性研究[J]. 食品研究与开发,2006,9:41.
- [5] 张雷,韩丽琴. 甘草中金属元素与总黄酮含量测定与抗氧化研究[J]. 光谱实验室,2011,3:1258.
- [6] 刘娅,韩新年,陈玲. 新疆甘草的开发利用[J]. 食品研究与开发,2012,1:209.
- [7] Fenoll L G, Penalver M J, Rodriguez-lopez J N, et al. Tyrosinase kinetics: Discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates [J]. Inter Biochem Biol, 2004, 36: 235.
- [8] Kubo I, Chen Q X, Nihei K I, et al. Molecular design of antibrowning agents; Antioxidative tyrosinase inhibitors [J]. Food Chem, 2003, 81: 241.
- [9] Kubo I, Yokokawa Y, Kinoshita H. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants [J]. Nat Prod, 1995, 58(5): 739.
- [10] Kubo I, Kinoshita H, Yokokawa Y. Tyrosinase inhibitors from Anacardium occidentale fruits [J]. Nat Prod, 1994, 57: 545.

# 近红外光谱鉴别法在中成药领域应用之初探

韩吴琦<sup>1</sup>, 黄永丽<sup>2\*</sup>, 郭兴辉<sup>3</sup>

(1. 开封市食品药品检验所, 河南 开封 475000;

2. 河南大学淮河临床学院, 河南 开封 475000; 3. 河南省食品药品检验所, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的: 研究近红外光谱快速鉴别法在中成药领域应用的可行性。方法: 选择17种常见的假中成药品种, 研究建立近红外光谱鉴别模型, 并进行实验室验证和实际应用验证。结果: 该方法能较准确地鉴别中成药的真伪, 不同品种近红外鉴别法的准确率达到80%~100%。结论: 近红外鉴别法在中成药领域有其实用价值, 目前相关的研究还存在一定的空白, 值得进一步研究推广应用。

**[关键词]** 近红外光谱; 鉴别; 中成药

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0166-04

## Explored Research of Application of Near Infrared Spectroscopy Identification Method in Chinese Patent Medicine

HAN Wu-qi<sup>1</sup>, HUANG Yong-li<sup>2\*</sup>, GUO Xing-hui<sup>3</sup>

(1. Kaifeng Institute for Food and Drug Control, Kaifeng 475000, China;

2. Huaihe Clinical College of Henan University, Kaifeng 475000, China;

3. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** The feasibility of application of near infrared spectroscopy fast identification method in Chinese patent medicine was studied. **Method:** Seventeen species of commonly false Chinese patent

**[收稿日期]** 20111223(001)

**[第一作者]** 韩吴琦, 主管中药师, 从事中药质量评价、标准研究及中药快检研究, Tel: 13903788376, E-mail: shying19811112@126.com

**[通讯作者]** \* 黄永丽, 讲师, 主治医师, Tel: 13837819539, E-mail: hndxhyl@126.com

- [11] Kubol, Kinst-Horil. Flavonols from saffron flower; tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism [J]. *Agrie Food Chem*, 1999, 47(10): 4121.
- [12] Kubol, Kinst-Horil. Tyrosinase inhibitors from cumin [J]. *Agrie Food Chem*, 1998, 46: 5338.
- [13] Kubol, Kinst-Horil. Tyrosinase inhibitors from Oil [J]. *Agrie Food Chem*, 1998, 46: 1268.
- [14] Kubol, Kinst-Horil. Ishiguro K, et al. Flavonols from *Heterotheca inuloide*, tyrosinase inhibitory activity and structural criteria [J]. *Bioorg Chem*, 2000, 8: 1585.
- [15] 石嘉悻. 青梅花提取物的酪氨酸酶抑制作用及机理研究 [J]. *食品工业科技*, 2011(10): 205.
- [16] 朴香兰, 朴香淑. 利用生物活性-液质联用跟踪方法快速分析苦参的酪氨酸酶抑制成分 [J]. *药物分析杂志*, 2009(9): 1407.
- [17] 朴香兰, 田燕泽, 秘效媛, 等. 光叉叶委陵菜的酪氨酸酶抑制作用 [J]. *中国中药杂志*, 2009, (15): 1952.
- [18] 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(4): 391.
- [19] 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(4): 268.
- [20] 杨柳依, 曹煌, 魏羽佳. 114种中药提取成分对酪氨酸酶活性的抑制作用 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36(4): 266.
- [21] 何蓉蓉, 李维熙, 李怡芳, 等. 火棘果实提取物的美白作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(2): 184.
- [22] 王强, 刘玲玲, 唐军, 等. 新疆产孜然抗氧化活性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(16): 313.

[责任编辑 邹晓翠]