

甘草总皂苷生物转化与抑制酪氨酸酶活性研究

李俊强, 李星辰, 刘晓静 (烟台市食品药品监督管理局, 烟台 264000)

摘要 目的: 采用不同方法对甘草皂苷进行生物转化, 同时进行抑制酪氨酸酶活性实验。方法: 采用水作为媒介提取甘草中的总皂苷, 再采用D101大孔树脂进行富集, 得到甘草总皂苷有效成分; 再分别采用蜗牛酶、酵母菌、黑曲霉对甘草总皂苷进行生物转化, 以HPLC作为测定仪器, 测出甘草苷转化为甘草酸铵的量。同时采用体外抑制酪氨酸酶活性的试验来比较各个不同生物转化液的活性大小。结果: 以甘草苷、甘草酸铵为对照品, 得出两者的标准曲线: $Y=2926525.09X+1632.2$ ($r=0.99996$), $Y=659561X+33746$ ($r=0.99998$), 结果表明甘草苷和甘草酸铵分别在0.4920~9.8400 μg 、0.4520~9.0400 μg 范围内线性关系良好。采用蜗牛酶、酵母菌、黑曲霉对甘草苷进行生物转化, 结果显示酵母菌并不能使甘草中的甘草苷转化为甘草酸铵。观察HPLC图谱, 蜗牛酶、黑曲霉转化液下的样品在68.13~71.48 min之间出现了甘草酸铵峰。抑制酪氨酸酶试验得出通过3种方法转化后的甘草溶液, 其活性顺序为酵母菌>蜗牛酶>黑曲霉。抑制率分别为39.45%、12.41%、9.42%。说明抑制酪氨酸酶活性的物质为总皂苷, 并不是其生物转化后的次生苷。结论: 甘草总皂苷抑制酪氨酸酶的活性要大于其生物转化后的次生产物, 可以很好地进行化妆品的后期开发。

关键词: 甘草总皂苷; 生物转化; 酪氨酸酶

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)02-0234-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.02.013

On Biotransformation of Total Saponins of Glycyrrhiza and Inhibition of Tyrosinase Activity

Li Junqiang, Li Xingchen, Liu Xiaojing (Yantai Center for Food and Drug Control, Yantai 264000, China)

Abstract Objective: Saponins of glycyrrhiza was biotransformed with different methods and inhibition of tyrosinase activity was carried out. **Methods:** Water was used as the media to extract total saponins from glycyrrhiza and D101 macroporous resin was used to enrich the effective fraction of total saponins. Then the biotransformation of total saponins of glycyrrhiza was carried out by using snail enzyme, yeast and *Aspergillus niger* enzyme respectively. HPLC was used as the measuring instrument to determine the amount of converted ammonium glycyrrhizinate. At the same time, the inhibition of tyrosinase activity in vitro was conducted to compare the different activity of biotransformed fluids. **Results:** The standard curves were $Y=2926525.09X+1632.2$ ($r=0.99996$), $Y=659561X+33746$ ($r=0.99998$) by using glycyrrhizin and ammonium glycyrrhizinate as controls, resulting in good linearity of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in the range of 0.4920~9.8400 μg , 0.4520~9.0400 μg respectively. The result of biotransformation of glycyrrhizin by snail enzyme, yeast and *Aspergillus niger* enzyme showed that yeast was unable to convert glycyrrhizin of licorice into ammonium glycyrrhizinate and the ammonium glycyrrhizinate peak appeared between 68.13 min and 71.48 min

of the samples converted by snail enzyme and *Aspergillus niger* enzyme. Tyrosinase inhibition test showed that the activity order of the transformed licorice solution by three enzymes was yeast > snail enzyme > *Aspergillus niger* enzyme and the inhibitory rates were 39.45%, 12.41% and 9.42% respectively, which indicates that the substance inhibiting tyrosinase activity was total saponin instead of the biotransformed secondary glycoside.

Conclusion: The anti-aging activity of total saponins of glycyrrhiza is greater than that of secondary products after biotransformation, and it can be used for the later development of cosmetics.

Keywords: total saponins of glycyrrhiza; biotransformation; tyrosinase

甘草为豆科植物甘草、胀果甘草或者光果甘草的干燥根及根茎,具有补脾益气、清热解毒、调和诸药的功效^[1],现代研究发现甘草中含有大量的甘草皂苷、黄酮、多糖成分,药理试验发现甘草中的黄酮成分具有抗炎、抗变态反应的作用,其总皂苷具有调节淋巴细胞数量和活性、抗衰老、美白的功效^[2-5]。

酪氨酸酶是体内存在的一种氧化酶,其活性是黑色素形成的关键,也是影响皮肤颜色深浅的内在重要因素,它参与黑色素形成的多个环节,主要包括催化酪氨酸转化为多巴,再催化多巴形成多巴醌,继续催化后形成黑色素^[6-8]。甘草皂苷具有美白作用,但是皂苷分子量大,不易被人体吸收,因此采用体外生物转化的作用实现皂苷的体外水解。本试验采用3种不同方法进行体外生物转化,并进行抑制酪氨酸酶活性试验。

1 试验材料与仪器

KQ-500B型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);AB-135S型十万分之一电子分析天平(瑞士酶特勒-托利多公司);DZKW-D-4型水浴锅(上海仪器仪表有限公司);UV-1100型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

甘草苷对照品(批号:111451-201507),甘草酸铵对照品(批号:111739-201501),对照品均来自中国食品药品检定研究院;L-多巴(批号:B21710),酪氨酸酶(蘑菇,活力500 U·mg⁻¹,批号:D900202),维生素C(批号:B21293),均购自上海源叶生物科技有限公司;10000 U·mL⁻¹β-葡糖苷酶(来源于黑曲霉,批号:S24786,购自上海源叶生物科技有限公司);蜗牛酶(批号:S10083,购自上海源叶生物科技有限公司);高活性干酵母菌粉(安琪酵母股份有限公司);乙腈(色谱纯),磷酸氢二钠,柠檬酸;娃哈哈纯净水;蒸馏水。

2 试验方法与结果

2.1 试验方法

2.1.1 甘草总皂苷制备

称取甘草药材100 g,加水10倍量,煎煮两次,每次1 h;过滤;合并滤液。浓缩至相对密度为1.05~1.10;加无水乙醇至70%,放置12 h;高速离心(5000 r·min⁻¹)5 min;上清液回收乙醇至无醇味。然后采用D101(预先处理好)进行分离,上样完成后,依次采用去离子水、30%乙醇、70%乙醇过量洗脱;收集70%乙醇洗脱部位,减压回收乙醇至无醇味;再采用正丁醇饱和水溶液对洗脱部位进行萃取,收集正丁醇液;冷冻干燥,经测定,甘草总皂苷含量达到51.8%。

2.1.2 生物转化试验

蜗牛酶转化试验:取“2.1.1”节下的甘草总皂苷粉末200 mg,加pH 7.1的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,40℃恒温培养箱内放置30 min,再加入30 mg蜗牛酶,继续培养6 h,时时振荡,取出。采用0.45 μm滤膜过滤制备供试样品1。

酵母菌转化试验:取“2.1.1”节下的甘草总皂苷粉末200 mg置于锥形瓶中,加pH 7.1的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液50 mL,再加入体积分数1.5%的干性酵母菌粉,置40℃恒温培养箱中,保温发酵6 h,并时时振摇,发酵结束后用蒸馏水补足失重,置85℃水浴10 min灭菌,4500 r·min⁻¹离心5 min;滤液蒸干,采用10 mL去离子水溶解,制备供试样品2。

黑曲霉转化试验:精密称取甘草总皂苷粉末200 mg置于锥形瓶中,加入适量pH 7.1的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,再加入1000 U活力的黑曲霉β-葡萄糖苷酶液,并补加缓冲溶液至反应体积为20 mL,置50℃恒温水浴锅中,保温酶解6 h,并时时振摇,滤液蒸干,采用10 mL去离子水溶解,制备供试样品3。

2.1.3 生物转化试验测定

30℃; 检测波长: 237 nm; 流动相: 以乙腈为流动相A, 以0.05%磷酸溶液为流动相B, 按表1中的规定进行梯度洗脱。

2.1.3.1 HPLC测定方法

色谱柱: kromasiol-C18硅胶色谱柱; 柱温:

表1 流动相梯度表

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 8	19	81
8 ~ 40	19 → 50	81 → 50
40 ~ 55	50 → 100	50 → 0
55 ~ 90	100 → 19	0 → 81

混合对照品溶液制备: 取甘草苷对照品、甘草苷铵对照品适量, 精密称定, 加70%乙醇分别制成每1 mL含甘草苷20 μg、甘草苷铵0.2 mg的溶液。

2.1.3.2 标准曲线绘制

精密吸取混合对照品溶液1、2、5、10、15、20 μL, 依次注入高效液相色谱仪, 按“2.1.3.1”节下色谱条件进行测定, 分别以甘草苷D、甘草酸铵对照品的进样量(μg)为横坐标(X), 对应峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归(结果见表3、表4、图1、图2)。

2.1.3.3 样品测定

分别取混合对照溶液、供试样品1、供试样品2、供试样品3各10 μL, 注入高效液相色谱仪, 分别测定转化结果。

2.1.4 抑制酪氨酸酶试验

2.1.4.1 试剂制备

pH 6.8的PBS缓冲溶液: A液, 每1 L蒸馏水中含 NaH₂PO₄ · 2H₂O 7.80 g; B液, 每1 L蒸馏水中含 Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.80 g; 将A液、B液灭菌后冷藏保存, 临用时取等体积混合, 调pH值为6.8, 即得。

酪氨酸酶溶液: 精密称取酪氨酸酶11.30 mg, 置25 mL棕色容量瓶中, 用pH 6.8的PBS缓冲溶液定容至刻度, 制备得226 U · mL⁻¹的酪氨酸酶溶液。

L-多巴溶液: 精密称取L-多巴25.41 mg, 置25 mL棕色容量瓶中, 用pH 6.8的PBS缓冲溶液定容至刻度, 制备得1.02 mg · mL⁻¹的L-多巴溶液。

2.1.4.2 供试样品溶液制备

维生素C阳性对照溶液: 精密称取2.546 mg的维生素C置25 mL棕色容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 制备成0.102 mg · mL⁻¹的维生素C储备液, 并稀释成0.005、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 mg · mL⁻¹不同浓度的维生素C阳性对照溶液, 避光保存, 备用。

甘草总皂苷溶液: 称取甘草总皂苷20 mg左右, 用pH 6.8的PBS缓冲溶液定容至10 mL容量瓶中, 混匀, 即得。

酶解液样品溶液: 精密量取“2.1.2”节下酶解液20 mL, 置85℃水浴保温10 min, 杀酶后进行冷冻干燥, 再用pH 6.8的PBS缓冲溶液定容至10 mL容量瓶中, 再取出1.5 mL用PBS缓冲溶液定容至另一10 mL容量瓶中, 混匀, 即得。

2.1.4.3 抑制酪氨酸酶活性测定方法

吸取“2.1.4.2”节下配制的一系列浓度的维生素C阳性对照溶液和供试样品溶液, 按表2方法加入反应试管中, 得到C1、C2、T1、T2 4组反应溶液, 每组设定3组平行试验, 先置30℃水浴保温反应20 min, 再将4组反应溶液混匀, 每组各自加入0.5 mL L-多巴溶液, 混匀后继续置30℃水浴保温反应20 min, 计时反应结束后立即用分光光度计于475 nm处测定各样品反应溶液的吸光度值, 记为AC1、AC2、AT1、AT2。

表2 反应溶液组成

试验溶液	反应液体积 /mL			
	C1	C2	T1	T2
酪氨酸酶	0.5	—	0.5	—
样品	—	—	0.5	0.5
PBS	1.5	2.0	1.0	1.5
合计	2.0	2.0	2.0	2.0

酪氨酸酶抑制率计算公式：

$$\text{酪氨酸酶抑制率}\% = \left(1 - \frac{A_{T1} - A_{T2}}{A_{C1} - A_{C2}} \right) \times 100\%$$

式中： $A_{T1}-A_{T2}$ ，样品溶液吸光度值改变；

$A_{C1}-A_{C2}$ ，空白对照吸光度值改变。

按照以上测定方法吸取供试样品溶液进行测定，得各组样品吸光度值后，计算各供试样品酪氨酸酶抑制率，以酪氨酸酶抑制率均值为纵坐标，样品溶液浓度为横坐标，得维生素C抑制酪氨酸酶活性曲线。

酸酶抑制率，以酪氨酸酶抑制率均值为纵坐标，样品溶液浓度为横坐标，得维生素C抑制酪氨酸酶活性曲线。

2.2 试验结果

2.2.1 标准曲线结果

标准曲线结果如表3、表4、图1、图2所示。

表3 甘草苷标准曲线数据

进样量 / μg	0.4920	0.9840	2.4600	4.9200	7.3800	9.8400
峰面积 /A	568118	1136576	2841330	5683008	8521112	11360753

表4 甘草酸铵标准曲线数据

进样量 / μg	0.4520	0.9040	2.2600	4.5200	6.7800	9.0400
峰面积 /A	332408	666576	1653330	3363008	6454753	6454753

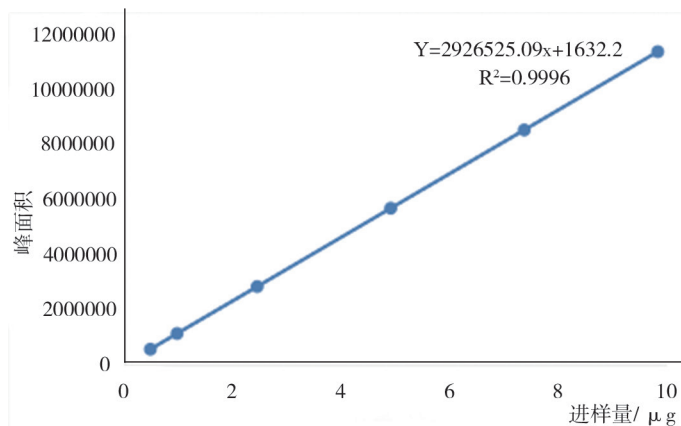


图1 甘草苷标准曲线

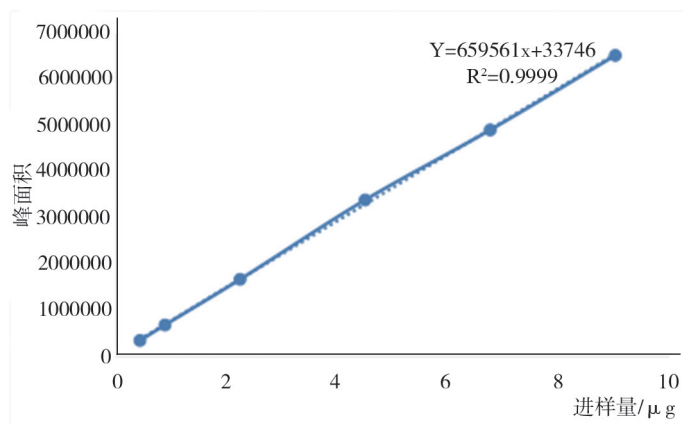


图2 甘草酸铵标准曲线

试验结果得出甘草苷及甘草次酸的回归方程分别为： $Y=2926525.09X+1632.2$ ($r=0.99996$)， $Y=659561X+33746$ ($r=0.99998$)，结果表明甘草苷和甘草酸铵分别在0.4920 ~ 9.8400 μg 、

0.4520 ~ 9.0400 μg 范围内线性关系良好。

2.2.2 生物转化测定结果

将甘草苷、甘草酸铵混合对照溶液注入高效液相色谱中，结果如图3所示。

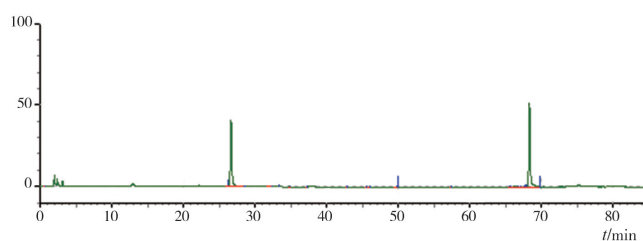


图3 混合对照结果

通过计算得出2个对照品分离度大于2.0，塔板数大于5000。

按照“2.1.3.1”液相测定方法对各样品进行测定；结果如图4、图5、图6、表5所示。

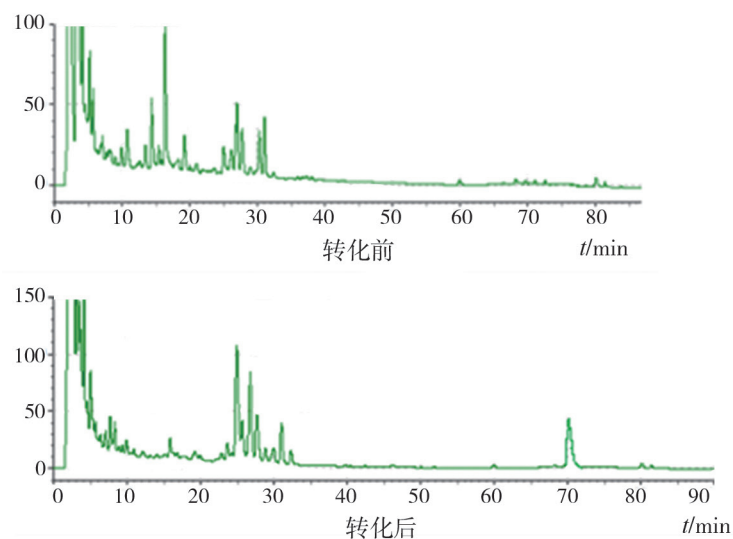


图4 蜗牛酶生物转化结果

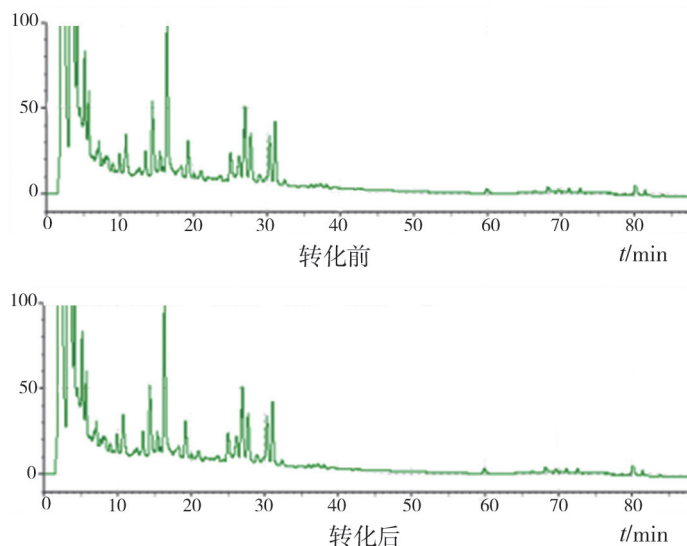


图5 酵母菌生物转化结果

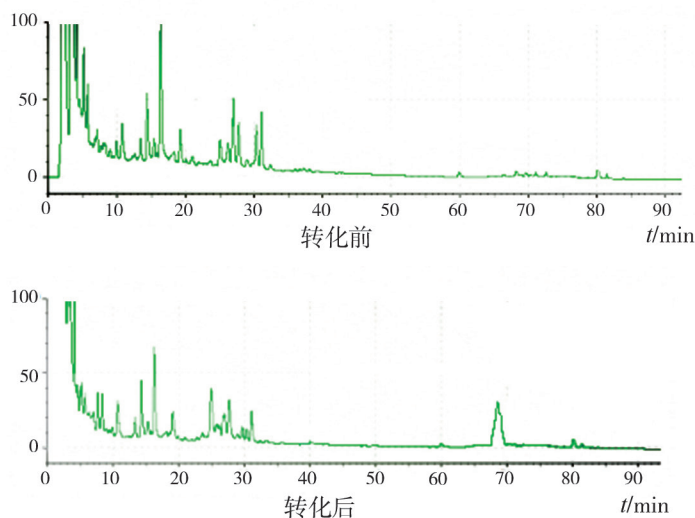


图6 黑曲霉生物转化结果

表5 各个样品生物转化试验结果

图例	转化前		转化后		转化率 / %
	峰面积	浓度 / (mg · mL ⁻¹)	峰面积	浓度 / (mg · mL ⁻¹)	
供试样品 1	3076654	0.2157	2573801	0.1555	28.14
供试样品 2	3113253	0.2183	3110887	0.2181	0.9162
供试样品 3	3082715	0.2161	1951430	0.1368	36.72

观察图3、图4、图5、图6得出，与甘草混合对照品溶液比较，蜗牛酶、黑曲霉下的样品在68.13~71.48 min之间出现了甘草酸铵峰，结合表5得出蜗牛酶、黑曲霉作用后的样品甘草苷峰面

积下降，计算得出两者的转化率分别为28.14%、36.72%。而经酵母菌发酵转化后测定甘草苷含量没有明显变化，说明酵母菌粉并不能水解甘草苷，甘草苷也没有发生转化反应。

2.2.3 抑制酪氨酸酶活性试验结果

生素C抑制酪氨酸酶活性曲线。结果如表6、图7所示。

2.2.3.1 维生素C抑制酪氨酸酶活性结果

按照“2.1.4.2”节下方法进行试验，得出维

表6 维生素C酪氨酸酶抑制率测定结果

浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率均值 / % ($n=3$)	IC_{50} / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0.05	32	0.073
0.1	50.24	
0.3	76.62	
0.5	94.57	
0.7	96.15	
0.9	98.32	

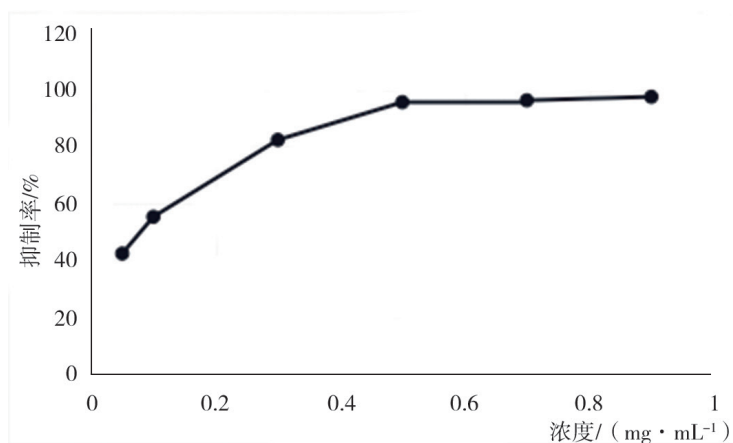


图7 维生素C酪氨酸酶抑制率测定结果

结果表明，在试验浓度范围内，维生素C对酪氨酸酶抑制率的趋势为先随维生素C浓度的增大而增大，抑制率达到最高值后则不再随样品浓度的增大而变化，运用SPSS17.0统计软件分析可知，半抑

制率 IC_{50} 为 $0.073 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3.2 生物转化样品抑制酪氨酸酶活性结果

对供试样品1、2、3和甘草总皂苷样品分别进行抑制酪氨酸酶试验，结果如表7、图8所示。

表7 甘草总皂苷及各酶解液酪氨酸酶抑制率测定结果

样品	浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率均值 / % ($n=3$)
甘草总皂苷	2.0	50.67 ± 1.96
蜗牛酶酶解液	2.0	12.41 ± 0.87
酵母菌发酵液	2.0	39.45 ± 0.49
黑曲霉酶解液	2.0	9.42 ± 0.23

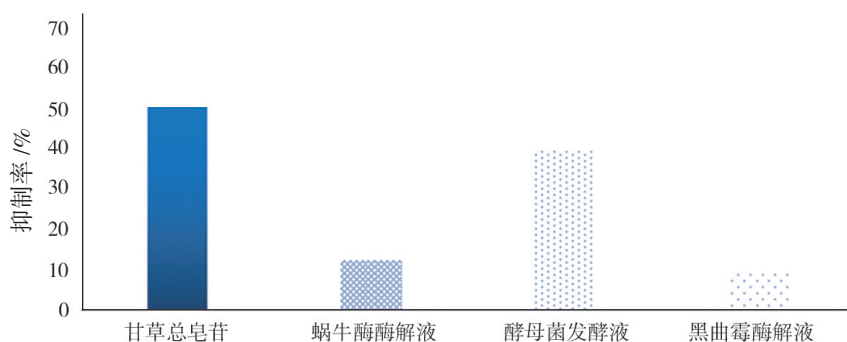


图8 甘草总皂苷及各酶解液酪氨酸酶抑制率测定

抑制率测定结果表明：各样品中蜗牛酶解液、酵母菌发酵液、黑曲霉发酵液对酪氨酸酶活性抑制作用基本没有或较弱，而甘草总皂苷抑制率为50.67%，有较好的抑制酪氨酸酶活性的作用，说明不同方法酶解后，甘草总皂苷抑制酪氨酸酶活性的作用受到严重弱化，单从抑制酪氨酸酶活性考虑，不宜采取上述酶解方法进行酶解。

3 讨论

试验分别采用蜗牛酶、酵母菌、黑曲霉3种媒介对甘草总皂苷溶液进行体外生物转化，结果发现采用蜗牛酶、黑曲霉可以实现甘草苷的部分转化，但是酵母菌不能使甘草苷转化为甘草酸铵。说明酵母菌作为真菌并不具备转化甘草苷作用。蜗牛酶、黑曲霉作为多糖苷酶来源可以使甘草苷的糖苷键断裂实现转化目的。

结合抑制酪氨酸酶活性试验得出，3种不同处理方法处理后的样品在抑制酪氨酸酶活性上存在一定差异。甘草总皂苷溶液抑制酪氨酸酶活性要强于3种转化溶液，而且酵母菌处理后的溶液活性也优于其他两个样品。

结合本试验结果，后期研究需要进行两方面试验：首先，测定甘草苷纯品与甘草总皂苷之间对于酪氨酸酶活性抑制的差异；其次，研究不同浓度的甘草总皂苷溶液对于酪氨酸酶活性抑制的差异，

充分研究其作用机理，为后期甘草类化妆品开发奠定理论基础。

参考文献：

- [1] 刘洋洋, 刘春生, 范冰舵, 等. 甘草种质资源研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(24): 3593-3598.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [3] 于鲁志. 中药甘草抗炎作用药理和临床研究进展[J]. 医药卫生, 文摘版: 00163-00164.
- [4] 周彪, 万传星. 甘草地上部分化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(1): 21-25.
- [5] 刘俊峰, 郭雪峰. 甘草皂苷对卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白IgA和IgG的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 172-174.
- [6] 王建华, 雷帆, 崔景荣. 20种中药对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(4): 232-234.
- [7] 陈清西, 宋康康. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然版), 2006, 45(5): 731-737.
- [8] 沈钧, 何莉萍, 张瑞斌. 甘草提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(8): 940-942.

(收稿日期 2017年7月12日 编辑 邹宇玲)