酪氨酸酶抑制剂体外筛选方法的建立及应用

庄远杯[1,2]，叶勇劲[2]，杨悦琦[2]，魏爱红[2]，张声源[1,2]*

（1. 嘉应学院广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室，广东梅州 514015；2. 嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所，广东梅州 514031）

摘要：目前酪氨酸酶抑制剂筛选中采用的酪氨酸酶抑制活性评价方法难以用于中草药的筛选。因此，该研究建立了基于HPLC的酪氨酸酶抑制剂体外筛选新方法，并以底物左旋多巴含量为检测指标，对色谱条件和反应条件进行优化。所得优化色谱条件为：采用XBridge Peptide C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），检测波长为280 nm，流动相为0.1%甲酸和乙腈（体积比95∶5），等度洗脱，进样量20 μL，柱温30 ℃，流速0.8 mL/min。优化的酶反应体系为：pH 6.8的PBS 300 μL、待测样品150 μL、300 IU/mL的酪氨酸酶溶液300 μL。反应体系混匀后于37 ℃孵育10 min，加入10 mmol/L左旋多巴溶液150 μL，混匀后于37 ℃反应10 min，加入0.4 mol/L盐酸4.2 mL终止反应。采用该法和酶标仪法分别检测阳性对照维生素C与曲酸的酪氨酸酶抑制活性，结果显示所得的半数抑制浓度无显著性差异。应用该HPLC法对9种药用植物提取物进行体外酪氨酸酶筛选，结果显示9种均具有酪氨酸酶抑制活性；而酶标仪法仅检测到4种有抑制活性，且IC_{50}值高于HPLC法所得的测定结果。这表明该HPLC筛选方法在专属性、准确度与精密度方面均优于传统酶标仪法，为天然产物中酪氨酸酶抑制剂的筛选提供了可靠的分析方法，特别适用于复杂基质样品的活性筛选研究。

关键词：酪氨酸酶抑制剂；高效液相色谱法；体外活性；筛选方法；维生素C；曲酸；黑色素瘤；中草药

中图分类号：R965.2；R931.71；R979.1+9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)05-0619-10

引用：庄远杯，叶勇劲，杨悦琦，等. 酪氨酸酶抑制剂体外筛选方法的建立及应用[J]. 中国医药工业杂志，2025, 56(5)：619-628. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.008

Establishment and Application of *in vitro* Screening Method for Tyrosinase Inhibitors

ZHUANG Yuanbei[1,2], YE Yongjing[2], YANG Yueqi[2], WEI Aihong[1], ZHANG Shengyuan[1,2]*

(*1. Guangdong Provincial Key Lab. of Conservation and Precision Utilization of Characteristic Agricultural Resources in Mountainous Areas, Jiaying University, Meizhou 514015; 2. Institute of Hakka Medicinal Bio-resources, Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031*)

ABSTRACT: Currently, the methods used for evaluating tyrosinase inhibitory activity in tyrosinase inhibitor screening are not suitable for the screening of traditional Chinese medicinal plants. Therefore, this study established a novel *in vitro* screening method for tyrosinase inhibitors based on HPLC. With the substrate levodopa content as the detection indicator, the chromatographic and reaction conditions of this method were optimized. The optimized chromatographic conditions were as follows: XBridge Peptide C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 280 nm of detection wavelength, mobile phase consisting of 0.1% formic acid-acetonitrile (in a volume ratio of 95∶5) under isocratic elution, 20 μL of injection volume, 30 ℃ of column temperature, and 0.8 mL/min of flow rate. The optimized enzyme reaction system consisted of 300 μL of PBS (pH 6.8), 150 μL of test sample, 300 μL of 300 IU/mL tyrosinase solution. The system was mixed and incubated at 37 ℃ for 10 min, followed by the addition of 150 μL of 10 mmol/L levodopa sdution. After that, the above system was mixed and reacted at 37 ℃ for 10 min again, and then terminated with 4.2 mL of 0.4 mol/L hydrochloric acid. The tyrosinase inhibitory activities of the positive controls (vitamin C and kojic acid) were detected by both this method and the microplate reader method, and the results showed no significant difference in IC_{50}. When applied to screen nine medicinal plant extracts, the HPLC method detected tyrosinase inhibitory activity in all extracts, whereas the microplate reader method only detected activity in four extracts, with higher IC_{50} values compared with the HPLC results. These results indicated that the screening method based on HPLC outperformed the traditional microplate reader method in terms of specificity, accuracy, and precision, providing a reliable analytical approach for screening natural tyrosinase inhibitors, particularly suitable for complex matrix samples.

Key Words: tyrosinase inhibitor; high performance liquid chromatography; *in vitro* activity; screening method; vitamin C; kojic acid; melanoma; traditional Chinese medicinal plant

黑色素是人类皮肤、眼睛和头发中的重要色素，能维持人体肤色动态平衡，保护人体皮肤免受紫外线损伤，降低日光性皮炎和皮肤癌的发生风险，预防白化病和白癜风等。然而，黑色素的过量产生会导致雀斑[1]、黄褐斑[2]等问题，严重的甚至会发展为炎症后黑色素病和黑色素瘤[3]。研究[4]表明，酪氨酸酶是机体黑色素生成的限速酶，因此酪氨酸酶抑制剂可作为治疗与黑色素积累相关疾病的有效策略。现有的酪氨酸酶抑制剂有维生素 C、曲酸、对苯二酚等，但均存在不足。例如，维生素 C 对热敏感，容易降解[5]；曲酸有致癌性，且不稳定、不易储存[6]；对苯二酚对哺乳动物细胞具有潜在的诱变作用，不良反应包括接触性皮炎、短暂红斑、白斑病等[7]。因此，寻找新的高效、低毒的酪氨酸酶抑制剂十分迫切。

酪氨酸酶抑制活性的评价是酪氨酸酶抑制剂筛选中非常重要的一环。目前，主要采用紫外分光光度法和酶标仪法，通过检测终产物黑色素的吸光度值来评价受试物的酪氨酸酶抑制活性。但这 2 种方法存在以下不足：1）黑色素在溶液体系中容易沉淀，导致测定时吸光度值不稳定；2）黑色素生成过程中的中间产物 5,6- 二羟基吲哚、5,6- 吲哚醌等具有紫外吸收，会影响方法的准确性[8]；3）当采用紫外分光光度计测定时，未加入终止剂终止酶促反应，无法控制反应时间，导致测得的吸光度值差异大[9]；4）由于中草药含有多种成分，特别是色素类成分会干扰吸光度的测定，导致假阳性率高。因此，这 2 种方法均难以用于从中草药中筛选酪氨酸酶抑制剂。鉴于此，建立一种准确性高、稳定性强、适用范围广的酪氨酸酶抑制活性评价方法具有重要的现实意义和广阔的应用前景。

收稿日期：2024-11-13

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（81703662）、2022 年广东省基地嘉应学院客家研究院大客家平台研究团队项目（22KYKT03）、嘉应学院科研团队项目（2021JYUTDY28）、广东省大学生创新创业项目（202310582019）

作者简介：庄远杯（1994—），男，本科，从事天然产物研究与开发。

通信作者：张声源（1983—），男，副教授，博士，从事中药及天然药物活性成分的研究。

E-mail：1294632773@qq.com

HPLC 法具有出色的复杂样品分离能力，可通过调整保留时间将底物左旋多巴（levodopa，L- 多巴）与杂质分开[10]，避免中间产物、终产物及复杂成分对结果的干扰，从而提高检测结果的准确性，更适用于复杂样品的筛选。但至今尚未见采用 HPLC 法筛选酪氨酸酶抑制剂的报道。本研究利用 HPLC 技术建立酪氨酸酶抑制剂的体外筛选方法，首次以底物 L- 多巴的含量为检测指标，对检测波长、流动相、柱温、流速等色谱条件进行探索，对酶活力、底物浓度、孵育时间、反应时间、终止剂等反应条件进行优化，以维生素 C 和曲酸为阳性对照进行方法验证，最终采用新建立的方法对 9 种药用植物提取物进行酪氨酸酶抑制活性评价，并与酶标仪法进行比较，以验证所建立方法的适用性，为酪氨酸酶抑制剂的体外筛选提供新的方法。

1　仪器与试药

LC-20AD 型高效液相色谱仪［配备二极管阵列检测器，岛津企业管理（中国）有限公司］；INFINITE 200 PRO 型多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；TG16-WS 型台式高速离心机（长沙维尔康湘鹰离心机有限公司）；MING-CHE24UV 型超纯水机（美国 Merck Millipore 公司）。

展 萼 金 丝 桃（*Hypericum lancasteri*）、川 滇 金 丝 桃（*Hypericum forrestii*）、近无柄金丝桃（*Hypericum subsessile*）、西 藏 金 丝 桃（*Hypericum himalaicum*）、金 丝 梅（*Hypericum patulum*）、地桫（*Melastoma dodecandrum*）、桃金娘（*Rhodomyrtus tomentosa*）、番 石 榴（*Psidium guajava*）和 艾 叶（*Artemisia argyi*）经嘉应学院医学院张声源副教授鉴定为所属品种，样品标本（编号 2022001 ～ 2022009）保存于嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所。酪氨酸酶（上海源叶科技有限公司，500 IU/mg）；L- 多巴、十二水磷酸氢二钠、二水磷酸二氢钠、曲酸（分析纯）均购于上海麦克林生化科技有限公司；甲酸（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，色谱纯）；乙腈（北京迈瑞达科技有限公司，色谱纯）；维生素 C（国药集团化学试剂有限公司，分析纯）；0.22 μm 微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司，材料为尼龙 66）。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

pH 6.8 的 PBS：精密称取十二水磷酸氢二钠

7.162 8 g，用超纯水溶解并定容至 100 mL，得 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液。精密称取二水磷酸二氢钠 3.120 2 g，用超纯水溶解并定容至 100 mL，得 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。取 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 49.0 mL 和 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液 51.0 mL，混合均匀即得 pH 6.8 的 PBS。

酪氨酸酶溶液：用 PBS（pH 6.8）将 22.4 mg 酪氨酸酶溶解并制成酪氨酸酶母液（2 500 IU/mL），于 -20 ℃保存，备用[11]。

L- 多巴溶液：称取 L- 多巴 0.100 g，用 PBS（pH 6.8）溶解并定容至 50 mL，得 10.14 mmol/L 的 L- 多巴溶液。

样品溶液：9 种药用植物分别采用 95% 乙醇超声波辅助提取，浓缩得浸膏[12]。采用超纯水溶解、配制成不同质量浓度的待测样品溶液以供活性检测使用。

终止剂：取浓盐酸 15 mL，用超纯水稀释为 0.4 mol/L 盐酸。

2.2 数据分析与统计方法

试验重复 3 次，采用 Origin 8.5 和 SPSS26 软件进行数据处理，结果以“平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）”表示，组间均值比较使用单因素方差分析（one-way ANOVA），差异性检验使用 Duncan's 法，$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2.3 HPLC 色谱条件的建立

2.3.1 确定检测波长

称取 L- 多巴 0.005 g，置 10 mL 量瓶中，用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容，得 L- 多巴标准溶液。采用二极管阵列检测器进行全波长扫描（190 ～ 800 nm），根据最大吸收峰确定检测波长。结果如图 1 所示，L- 多巴在 280 nm 处有最大紫外吸收，故选作 HPLC 测定时的检测波长。

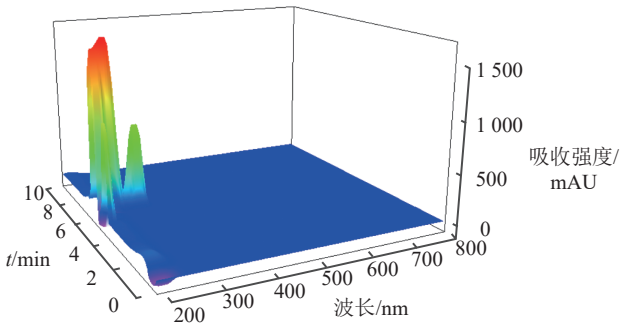


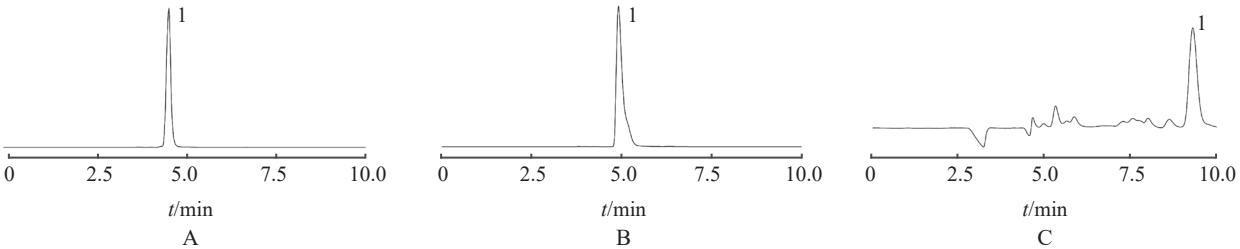
图 1 L- 多巴的全波长扫描 3D 图

Fig.1 Full-wavelength Scanning 3D Map of Levodopa

2.3.2 优化流动相及洗脱条件

初始色谱条件：色谱柱 XBridge Peptide C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1 mol/L 冰乙酸和甲醇（体积比 95 ∶ 5），等度洗脱；检测波长 280 nm；流速 0.8 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

选择 3 种流动相体系，分别为 0.1 mol/L 冰乙酸和甲醇（体积比 95 ∶ 5）[13]、0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）[14]、0.1% 三氟乙酸溶液和乙腈（体积比 96 ∶ 4）[15]，其他条件同上述初始色谱条件，考察流动相对 L- 多巴保留时间和峰形的影响。结果如图 2 所示，当流动相为 0.1 mol/L 冰乙酸和甲醇（体积比 95 ∶ 5）时，L- 多巴的色谱图呈现拖尾现象；当流动相为 0.1% 三氟乙酸溶液和乙腈（体积比



A—0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）；B—0.1 mol/L 冰乙酸和 - 甲醇（体积比 95 ∶ 5）；C—0.1% 三氟乙酸溶液和乙腈（体积比 96 ∶ 4）。

1—L- 多巴。

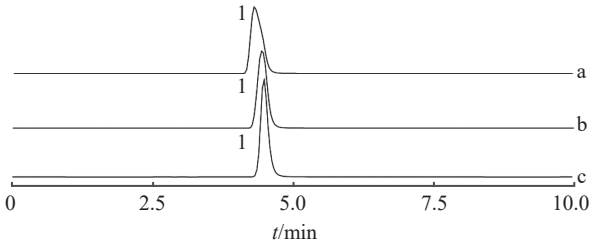
图 2 不同流动相条件下测得的 L- 多巴色谱图

Fig.2 Chromatograms of Levodopa Detected with Different Mobile Phases

96 ∶ 4）时，L- 多巴的保留时间延长且色谱图的基线不平、响应值低；当流动相为 0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）时，L- 多巴的保留时间适中，色谱峰的峰形对称。因此，选择 0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）作为流动相进行后续试验。

2.3.3　优化柱温

以 0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）为流动相，其他条件同“**2.3.2**”项下初始色谱条件，考察柱温为 25、30、35 ℃时，L- 多巴的保留时间和峰形。结果如图 3 所示，当柱温为 30 ℃时，L- 多巴的保留时间和峰形较合适，且此时响应值较高，因此采用柱温 30 ℃进行后续试验。



a—35 ℃；b—30 ℃；c—25 ℃。

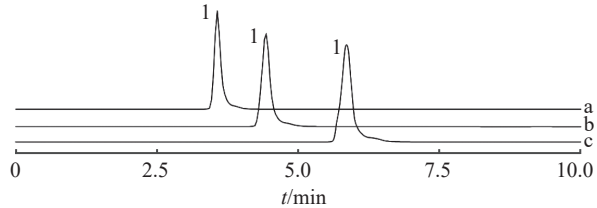
1—L- 多巴。

图 3　不同柱温下 L- 多巴色谱图

Fig.3　Chromatograms of Levodopa Detected at Different Column Temperatures

2.3.4　优化流速

以 0.1% 甲酸和乙腈（体积比 95 ∶ 5）为流动相，其他条件同“**2.3.2**”项下初始色谱条件，考察流速为 0.6、0.8、1.0 mL/min 时，L- 多巴的保留时间和峰形。结果如图 4 所示，当流速为 0.8 mL/min 时，



a—1.0 mL/min；b—0.8 mL/min；c—0.6 mL/min。

1—L- 多巴。

图 4　不同流速下测得的 L- 多巴色谱图

Fig.4　Chromatograms of Levodopa Detected at Different Flow Rates

L- 多巴的保留时间和峰形较佳，因此选定流速为 0.8 mL/min 进行后续试验。

2.3.5　优化的色谱条件

色谱柱 XBridge Peptide C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1% 甲酸和乙腈混合溶液（体积比 95 ∶ 5），等度洗脱；流速 0.8 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

2.4　基于 HPLC 的体外酪氨酸酶抑制活性检测法

2.4.1　酶标仪筛选酪氨酸酶抑制剂的检测反应体系

在酶标仪筛选酪氨酸酶抑制剂法[16—17]的基础上进行优化。具体反应体系为：取 pH 6.8 的 PBS 100 μL、待测样品 50 μL、250 IU/mL 的酪氨酸酶溶液 100 μL，于酶标板中振荡混匀，在 37 ℃孵育 10 min 后，加入 4 mmol/L L- 多巴溶液 50 μL，振荡混匀，在 37 ℃反应 3 min，在 475 nm 处测定吸光度值。

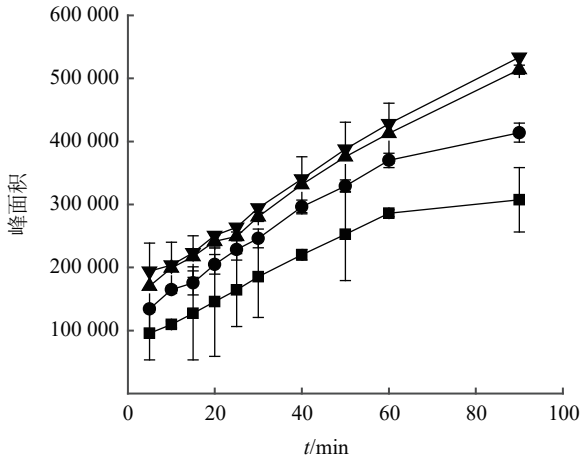
2.4.2　优化底物浓度

在测定酪氨酸酶抑制活性时，应确保酶促反应的底物过量，即酶被底物饱和。一般认为底物浓度（S）大于等于米氏常数（K_m）的 10 倍时，酶被底物饱和。设置 L- 多巴浓度为 4.06、6.08、8.11、10.14 mmol/L，分别在反应 5、10、15、20、25、30、40、50、60、90 min 时加入终止剂（盐酸），其他酶促反应条件同“**2.4.1**”项。反应结束后离心、过滤，取上清液检测 L- 多巴的峰面积。平行试验 3 次。然后，以时间（t）为横坐标、L- 多巴峰面积（A）为纵坐标作图，绘制酶促反应进程曲线，并计算酶促反应初速度（V，即为进程曲线斜率）。再采用双倒数作图法，以底物浓度的倒数（1/S）对反应初速度的倒数（1/V）进行线性拟合，其横轴截距即为 $-1/K_m$。

结果如图 5、表 1 所示，所得线性方程为 $1/V=0.000\ 6(1/S)+0.000\ 2$，$R^2=0.981\ 7$，即得 K_m= 3 mmol/L。因此，当 $S \geqslant 30$ mmol/L 时，可消除底物对酪氨酸酶活力的影响，但 L- 多巴在浓度达 30 mmol/L 时会饱和析出。进一步研究显示，L- 多巴的饱和浓度为 10.14 mmol/L。因此，综合上述结果，选择 S=10 mmol/L 进行后续试验。

2.4.3　优化酪氨酸酶浓度

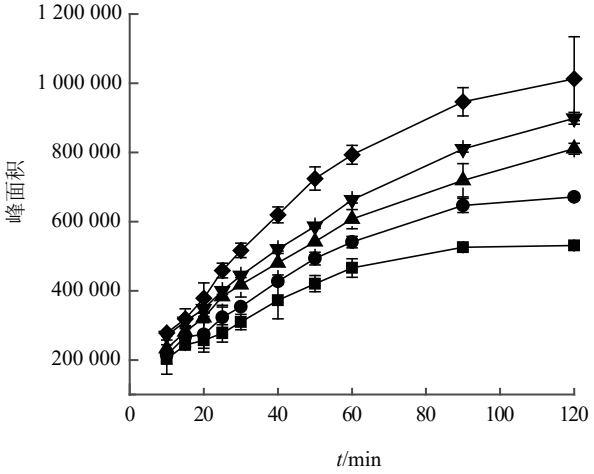
设置酪氨酸酶浓度为 150、200、250、300、



■—4.06 mmol/L；●—6.08 mmol/L；▲—8.11 mmol/L；▼—10.14 mmol/L。

图 5 不同底物浓度的酶促反应进程曲线（*n*=3）

Fig.5 Enzymatic Reaction Process Curves at Different Substrate Concentrations (*n*=3)



■—150 IU/mL；●—200 IU/mL；▲—250 IU/mL；▼—300 IU/mL；♦—400 IU/mL。

图 6 不同酶浓度的酶促反应进程曲线（*n*=3）

Fig.6 Enzymatic Reaction Process Curves at Different Enzyme Concentrations (*n*=3)

400 IU/mL，分别在反应 10、15、20、25、30、40、50、60、90、120 min 时加入终止剂，其他酶促反应条件同“**2.4.1**”项，检测 L- 多巴的含量变化。平行试验 3 次。

结果如图 6 所示，随着酪氨酸酶浓度的增加，相同时间内被分解的底物增多。50 min 内，酪氨酸酶浓度为 150 ～ 400 IU/mL 时，酶促反应进程曲线的线性良好，为一级反应。其中，酪氨酸酶浓度为 300 IU/mL 时，在 50 min 内酶促反应的线性拟合结果符合一级方程 y=8 050.8x+192 619，R^2=0.996 2，因此选择酪氨酸酶浓度为 300 IU/mL 进行后续试验。

2.4.4 优化反应时间

设置酪氨酸酶浓度为 150、200、250、300、400 IU/mL，反应时间为 10、15、20、25、30、40、50、60、90、120 min，其他酶促反应条件同“**2.4.1**”项，检测 L- 多巴的含量变化。

反应时间越长，被转化的底物越多。一般认为在酶促反应中，底物的转化率低于 20% 时得到的酶活性最佳。因此，选择底物转化率低于 20% 时的反应时间进行试验。由表 2 可知，在酪氨酸酶浓度为 300 IU/mL、反应为 10 min 时，底物的转化率为

表 2 不同酶浓度及不同反应时间时底物的转化率 /%

Tab.2 Conversion Rates of Substrate at Different Enzyme Concentrations and at Different Reaction Time/%

t/min	酶浓度 /(IU·mL^{-1})				
	150	200	250	300	400
10	13.77	14.53	15.84	18.36	18.88
15	16.55	18.15	19.11	21.14	21.71
20	17.47	18.62	21.92	23.64	25.74
25	18.82	21.98	26.09	27.18	31.17
30	21.05	24.06	28.41	30.16	35.12
40	25.30	29.00	32.67	35.39	42.14
50	28.60	33.53	36.85	39.83	49.26
60	31.67	36.77	41.28	45.07	53.91
90	35.74	43.97	48.90	55.10	64.35
120	36.10	45.65	55.14	61.11	68.89

表 1 不同底物浓度的酶促反应初速度（*n*=3）

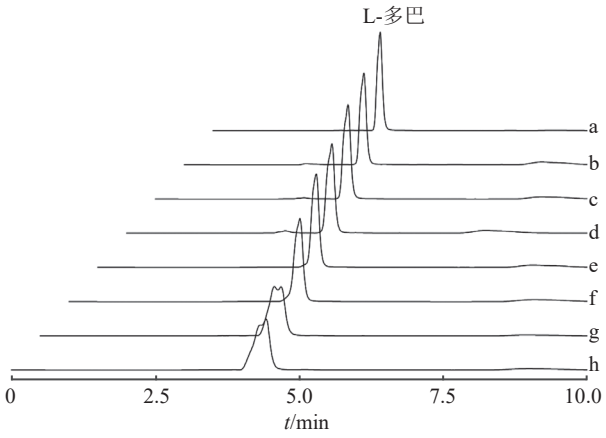
Tab.1 Initial Velocities of the Enzymatic Reactions at Different Substrate Concentrations (*n*=3)

L- 多巴浓度 /(mmol·L^{-1})	线性回归方程	R^2	V/(mmol·L^{-1}·min^{-1})
4.06	A=3 530.4t+76 234	0.999 1	3 530.4
6.08	A=4 274.4t+117 697	0.996 5	4 274.4
8.11	A=4 429.5t+149 832	0.996 0	4 429.5
10.14	A=4 441.6t+161 522	0.995 6	4 441.6

18.4%，符合条件。因此，后续试验的反应时间设置为 10 min。

2.4.5　优化终止剂

为了确保在 HPLC 检测时酶促反应不再进行，需要加入终止剂终止酶促反应。根据前期研究结果，pH<3 时，优化色谱条件下 L- 多巴的峰形较好，因此考虑使用酸性试剂作为酶促反应的终止剂。选择磷酸、甲酸、盐酸、冰乙酸 4 种酸性终止剂，均设置 0.1 和 0.2 mol/L 2 种浓度，其他酶促反应条件同“**2.4.1**”项，检测酶活力。结果（图 7）显示，以冰乙酸作为终止剂时出现分叉峰（曲线 g 和 h），使用甲酸则出现前沿峰（曲线 c 和 d），使用磷酸时峰形较宽（曲线 e 和 f），而采用盐酸作为终止剂时 L- 多巴的峰形对称、响应值较高。因此，选取盐酸为终止剂，并继续考察其浓度和用量对酶促反应的终止效果。

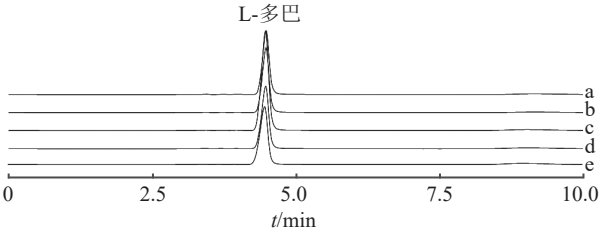


a—0.1 mol/L 盐酸；b—0.2 mol/L 盐酸；c—0.1 mol/L 甲酸；d—0.2 mol/L 甲酸；e—0.1 mol/L 磷酸；f—0.2 mol/L 磷酸；g—0.1 mol/L 冰乙酸；h—0.2 mol/L 冰乙酸。

图 7　4 种酸性终止剂条件下 L- 多巴的色谱图

Fig.7　Chromatograms of Levodopa Detected under the Conditions of Four Acid Terminators

设置盐酸浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L，分别取 2.4、3.0、3.6、4.2、4.8 mL 作为终止剂，其他酶促反应条件同“**2.4.1**”项，检测酶活力。如图 8、表 3 所示，不同浓度盐酸的终止效果差异小。但随着终止剂用量的增加，反应体系中的 L- 多巴会被稀释，导致响应值降低。综合考虑溶液配制的便利性和节省盐酸用量的因素，最终选择终止剂盐酸的浓度为 0.4 mol/L，加入量为 4.2 mL。



a—0.1 mol/L 盐酸；b—0.2 mol/L 盐酸；c—0.3 mol/L 盐酸；d—0.4 mol/L 盐酸；e—0.5 mol/L 盐酸。

图 8　不同浓度盐酸条件下的 L- 多巴色谱图

Fig.8　Chromatograms of Levodopa Detected under the Conditions of Different Concentrations of Hydrochloric Acid

2.4.6　优化孵育时间

加入底物前先加入质量浓度为 1.0 mg/mL 的维生素 C 150 μL，与酪氨酸酶孵育 10、15、20、25、30、35 min 后，再加入底物，按“**2.4.1**”项下条件进行酶促反应，检测 L- 多巴的含量。平行试验 3 次。

结果如图 9 所示，孵育 10 ～ 25 min，L- 多巴的峰面积基本稳定，表明在前 25 min 维生素 C 稳定，能较好地抑制酶活性；但 25 ～ 35 min，L- 多巴的峰面积开始降低，表明维生素 C 可能已经开始氧化，

表 3　不同浓度盐酸及其不同加入量时的 L- 多巴峰面积

Tab.3　Levodopa Peak Areas under the Conditions of Different Hydrochloric Acid Concentrations and Different Addition Amounts

加入量 /mL	盐酸浓度 /(mol·L^{-1})				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
2.4	1 736 910	1 783 453	1 772 336	1 757 461	1 705 691
3.0	1 486 727	1 502 344	1 487 442	1 459 023	1 429 795
3.6	1 275 987	1 269 511	1 260 976	1 230 732	1 202 077
4.2	1 109 333	1 100 939	1 095 280	1 082 980	1 051 113
4.8	994 450	981 621	982 104	960 370	932 253

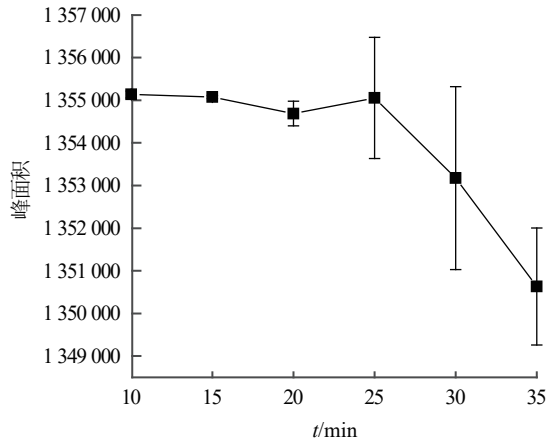


图 9 孵育时间对酪氨酸酶抑制剂活性的影响（n=3）

Fig.9 Effect of Incubation Time on Tyrosinase Inhbitor Activity (n=3)

对酶的抑制活性减弱。为避免维生素 C 自身氧化对试验结果的影响，应尽量缩短孵育时间。因此，后续试验选择孵育时间为 10 min。

2.4.7 基于 HPLC 法的体外酪氨酸酶抑制活性检测法及其优化反应体系

综上所述，基于 HPLC 法的酪氨酸酶抑制剂筛选方法为：取 10 mL 试管，依次加入 pH 6.8 PBS 300 μL、待测样品 150 μL、300 IU/mL 酪氨酸酶溶液 300 μL，振荡混匀，37 ℃孵育 10 min，加入 10 mmol/L L- 多巴溶液 150 μL，振荡混匀，37 ℃反应 10 min，再加入 0.4 mol/L 盐酸 4.2 mL 终止反应，4 ℃离心（12 000×g）15 min，上清液经 0.22 μm 滤膜过滤。

采用优化的色谱条件测定优化反应体系中 L- 多巴的峰面积。设置空白对照（T1）组、阴性对照（T2）组、样品空白（T3）组、样品（T4）组，反应体系各组别的组成及加液量如表 4 所示。根据下式可计算不同待测样品对酪氨酸酶的抑制率（I）。

$$I=[(A_{T1}-A_{T2})-(A_{T3}-A_{T4})]/(A_{T1}-A_{T2})\times100\%$$

式中：A_{T1}、A_{T2}、A_{T3}、A_{T4} 分别表示 T1 ～ T4 组测得的 L- 多巴峰面积。

2.5 L- 多巴标准曲线的绘制与方法学验证

称取 L- 多巴 0.02 g，用 PBS（pH 6.8）溶解并定容至 10 mL，配制成 10.14 mmol/L 标准贮备液。依次用 PBS（pH 6.8）将贮备液稀释为 10.14、5.07、2.53、1.26、0.63、0.31、0.15 mmol/L 的标准工作液。照表 4 中的 T1 组，分别取各标准工作液 150 μL 加至反应体系（总体积为 4 800 μL）中，使其中 L- 多巴的终浓度为 0.316 0、0.158 0、0.079 0、0.039 5、0.019 7、0.009 8、0.004 9 mmol/L。按优化后的 HPLC 检测条件进样分析，记录峰面积。以反应体系中 L- 多巴的终浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线，所得回归方程的相关系数 R^2=0.999 9，表明 L- 多巴浓度为 0.004 9 ～ 0.316 0 mmol/L 时线性良好，可用于 L- 多巴的含量测定。方法学验证结果表明，该方法的精密度、重复性良好，在 24 h 内稳定性良好。

表 4 各组别反应体系的组成 /μL

Tab.4 Compositions of the Reaction System for Each Group/μL

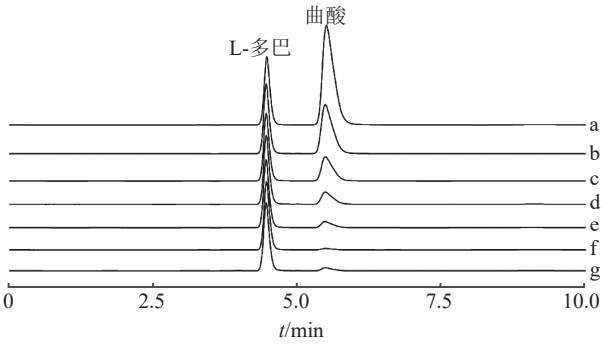
组别	PBS	超纯水	待测样品	酪氨酸酶溶液	L- 多巴溶液	终止剂
T1	300	150	0	0	150	4 200
T2	0	150	0	300	150	4 200
T3	300	0	150	0	150	4 200
T4	0	0	150	300	150	4 200

2.6 HPLC 酪氨酸酶抑制剂筛选方法的验证与应用

2.6.1 阳性对照维生素 C、曲酸对筛选方法的验证

采用基于 HPLC 法的体外酪氨酸酶抑制活性检测法，检测阳性对照维生素 C 和曲酸对酪氨酸酶的抑制活性[18]。以质量浓度（c）为横坐标、抑制率（I）为纵坐标作图，根据拟合曲线求得半数抑制浓度（IC_{50}），同时比较与酶标仪法检测结果的差异。

配制质量浓度分别为 2.0、1.7、1.4、1.1、0.8、0.5、0.2 mg/mL 的维生素 C 溶液，质量浓度分别为 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125、0.063、0.031 mg/mL 的曲酸溶液，分别采用酶标仪法和“**2.4.7**”项下方法检测，计算 IC_{50}。不同质量浓度曲酸对酪氨酸酶抑制活性的 HPLC 叠加色谱图（图 10）表明，该色谱条件可将底物 L- 多巴和抑制剂曲酸分开。由表 5 和图 11 可知，阳性对照维生素 C、曲酸在采用酶标仪法和“**2.4.7**”项下方法测定时，所得的 IC_{50} 值无显著差异（P>0.05），但“**2.4.7**”项下方法测得的维生素 C、曲酸 IC_{50} 值的 SD 值，分别为酶标仪法的 20.7% 和 8.3%，表明建立的基于 HPLC 法的酪氨酸



a—2.000 mg/mL；b—1.000 mg/mL；c—0.500 mg/mL；d—0.250 mg/mL；e—0.125 mg/mL；f—0.063 mg/mL；g—0.031 mg/mL。

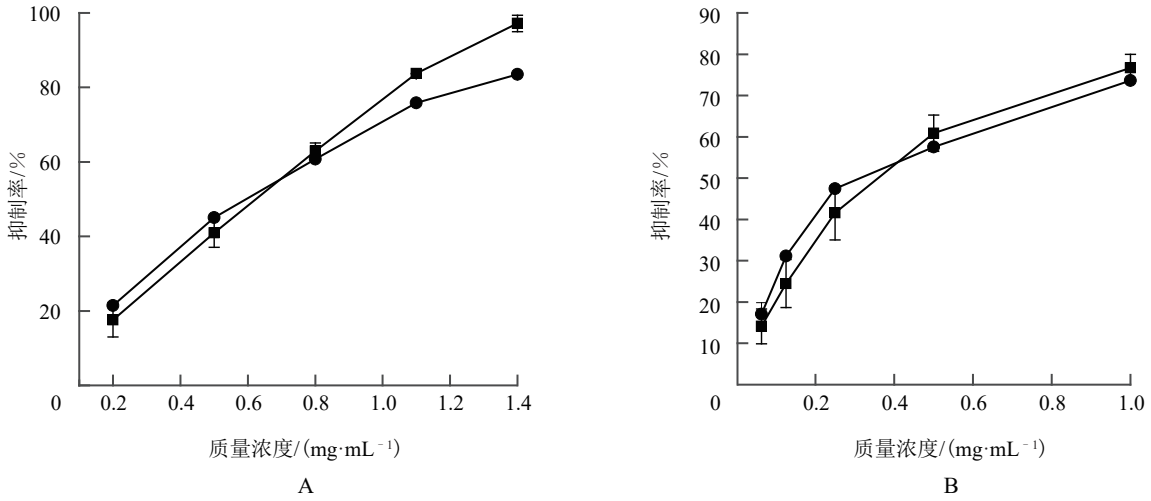
图 10　含不同浓度曲酸的体系中 L- 多巴的色谱图

Fig.10　Chromatograms of Levodopa in the Systems Containing Different Concentrations of Kojic Acid

酶抑制剂筛选方法稳定、可靠、精密度高。

2.6.2　9 种药用植物提取物对酪氨酸酶的抑制作用　以“**2.4.7**”项下方法，检测 9 种常用药用植物提取物对酪氨酸酶的抑制活性，以质量浓度为横坐标、抑制率为纵坐标，绘制抑制曲线图，根据拟合曲线求得其 IC_{50}，同时比较与酶标仪法检测结果的差异。

配制质量浓度分别为 100.0、50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6 mg/mL 的番石榴根、地棯、艾叶、西藏金丝桃、川滇金丝桃、近无柄金丝桃和金丝梅样品，质量浓度分别为 50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8 mg/mL 的桃金娘样品，质量浓度分别为 40.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.3、0.6 mg/mL 的展萼金丝桃样品，分别按“**2.4.7**”项下方法配制反应体系，采用酶标仪法和 HPLC 法检测，计算 IC_{50}。样品本身对 L- 多巴 HPLC 色谱峰的影响主要有 2 点，一是对 L- 多巴色谱峰峰形的影响，如出现前沿峰、拖尾峰、肩峰等；二是样品本身含有的物质与 L- 多巴的 HPLC 保留时间一致，则该保留时间下的色谱峰面积实际应为该物质与 L- 多巴峰面积的叠加。为排除



A—维生素 C；B—曲酸。

■—酶标仪法；●—HPLC 法。

图 11　酶标仪法与 HPLC 法测得的维生素 C 和曲酸对酪氨酸酶的抑制效果（n=3）

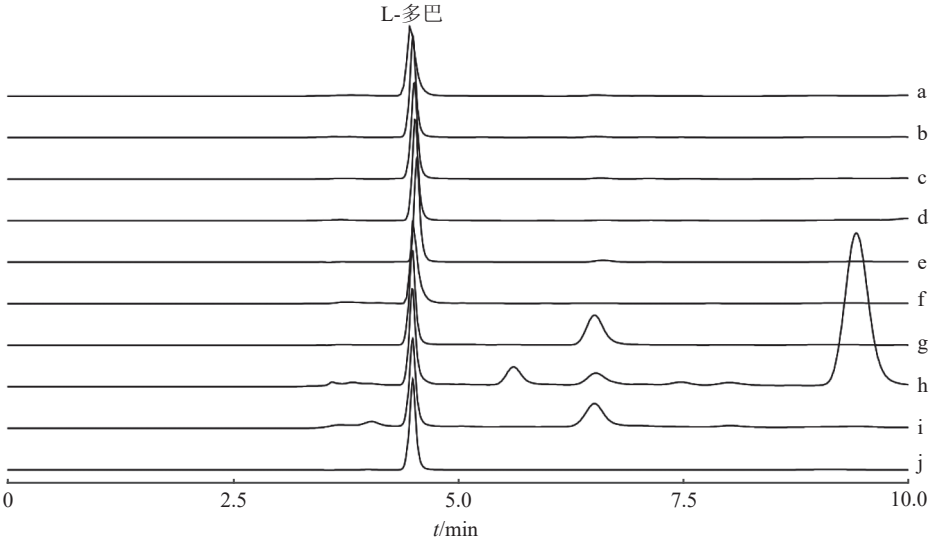
Fig.11　The Inhibitory Effects of Vitamin C and Kojic Acid on Tyrosinase Determined by Microplate Reader Method and HPLC Method (n=3)

表 5　酶标仪法与 HPLC 法测得的维生素 C 和曲酸的 IC_{50} 结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5　IC_{50} Results of Vitamin C and Kojic Acid Determined by Microplate Reader Method and HPLC Method ($\bar{x}\pm s$, n=3)

样品	酶标仪法		HPLC 法	
	拟合方程	IC_{50}/(mg·mL⁻¹)	拟合方程	IC_{50}/(mg·mL⁻¹)
维生素 C	I=67.334c+6.600 1	0.640±0.029	I=31.64ln$c$+70.387	0.520±0.006
曲酸	I=23.302ln$c$+75.856	0.350±0.072	I=20.068ln$c$+73.223	0.310±0.006

上述 2 项干扰，设置了 T3 组别。将 9 种药用植物提取物的最大质量浓度对应的 T3 组与 T1 组进行比较，以验证 9 种药用植物提取物对 L- 多巴 HPLC 色谱峰的影响。结果如图 12 所示，可见 L- 多巴色谱峰的峰形对称、无裂峰等，表明 9 种药用植物提取物对 L- 多巴色谱峰的峰形无影响。如图 12 所示，a ～ f 未检测杂质峰；g ～ i 检出少量杂质峰，但本色谱条件下杂质峰与 L- 多巴色谱峰的分离度良好。9 种药用植物提取物对酪氨酸酶的抑制活性结果如表 6 所示。9 种药用植物提取物在采用建立的 HPLC 法测定时，均检测出一定的抑制活性；而采用酶标仪法只检出 4 种具有酪氨酸酶抑制活性（分别为番石榴根、地榇、桃金娘、艾叶），且这 4 种提取物抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 值高于 HPLC 的检测结果。这可能是因为样品自身色素或中间产物的紫外吸收干扰了酶标仪对产物的检测。此外，其余 5 种金丝桃属植物溶液颜色较深，试验时黑色素沉淀的情况更为明显，导致使用酶标仪未能检出抑制活性。综上所述，酶标仪法受样品颜色或黑色素沉淀的影响而难以检测出样品对酪氨酸酶的抑制效果，而 HPLC 法能一定程度排除这些影响，准确检测出抑制效果，更适用于复杂样品的筛选，扩大了筛选范围。



a—金丝梅；b—近无柄金丝桃；c—川滇金丝桃；d—西藏金丝桃；e—展萼金丝桃；f—艾叶；g—桃金娘；h—地榇；i—番石榴根；j—T1 组。

图 12 T1 组及 9 种药用植物提取物 T3 组的色谱图

Fig.12 Chromatograms of T1 Group and T3 Groups of 9 Medicinal Plant Extracts

表 6 酶标仪法和 HPLC 法检测 9 种药用植物对酪氨酸酶抑制作用的结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.6 Results of Inhibition Effects of 9 Medicinal Plants on Tyrosinase Determined by Microplate Reader Method and HPLC Method ($\bar{x}\pm s$, n=3)

样品	酶标仪法			HPLC 法		
	拟合方程	R^2	IC_{50}/(mg·mL^{-1})	拟合方程	R^2	IC_{50}/(mg·mL^{-1})
番石榴根	I=18.624ln$c$－23.925	0.980 9	45.37±18.14	I=3.325c+7.723	0.984 0	12.73±0.06
地榇	I=0.523 4c+8.165	0.997 2	77.97±13.93	I=21.692ln$c$－29.763	0.991 2	35.51±3.75
桃金娘	I=1.325 6c+11.692	0.997 4	30.09±3.08	I=16.335ln$c$+28.415	0.996 2	3.72±0.12
艾叶	I=12.589ln$c$－8.398	0.972 1	103.08±2.34	I=17.818ln$c$－4.595	0.985 1	21.41±0.26
展萼金丝桃	—	—	—	I=16.655ln$c$+15.344	0.985 7	8.01±0.31
西藏金丝桃	—	—	—	I=26.407ln$c$－38.435	0.999 9	27.87±1.23
川滇金丝桃	—	—	—	I=18.787ln$c$+5.735	0.971 6	10.04±0.39
近无柄金丝桃	—	—	—	I=21.843ln$c$－12.489	0.961 0	17.24±0.82
金丝梅	—	—	—	I=0.810 1c+8.093	0.972 0	51.74±0.32

注：“—”表示在酶标仪法的检测条件下未检出抑制活性。

3 讨论

本研究建立了一种基于 HPLC 技术检测酪氨酸酶抑制剂的体外筛选方法。该方法首次以酪氨酸酶作用底物 L- 多巴为检测物质，以其含量变化反映酪氨酸酶活性，避免了中间产物、终产物及复杂成分对结果的干扰，具有良好的专属性、准确性及精密度，可用于中草药等复杂样品中酪氨酸酶抑制剂的筛选，为有同样检测难点的抑制剂筛选提供了技术参考，具有重要的科学意义和应用价值。同时，该方法首次引入酪氨酸酶的酶促反应终止剂，填补了酪氨酸酶抑制剂筛选无终止剂的空白，为此类酶促反应终止剂的选择提供了参考。然而，该方法数据采集耗时较长，难以满足大规模抑制剂库的高通量筛选需求，后续可尝试采用 UPLC 法缩短分析时间。同时，该方法仅测定反应终点处 L- 多巴的剩余量，难以获取抑制剂作用的动力学参数，难以通过酶促反应动力学方法区分抑制剂的可逆或不可逆抑制类型，但可以结合时间梯度采样，通过多时间点数据拟合得到动力学模型。

参考文献：

[1] LAI X L, WICHERS H J, SOLER-LOPEZ M, *et al*. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related rroteins [J]. *Chem*, 2018, **24**(1): 47-55.

[2] FAN Y F, ZHU S X, HOU F B, *et al*. Spectrophotometric assays for sensing tyrosinase activity and their applications [J]. *Biosensors* (Basel), 2021, **11**(8): 290.

[3] OH J H, KARADENIZ F, SEO Y, *et al*. Dietary flavonoid myricetin 3-*O*-galactoside suppresses α-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells by regulating PKA and ERK1/2 activation [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2023, **78**(11/12): 399-407.

[4] DICESARE S M, ORTEGA A J, COLLIER G E, *et al*. GSK3 inhibition reduces ECM production and prevents age-related macular degeneration-like pathology [J]. *JCI Insight*, 2024, **9**(15): e178050.

[5] ROH E J. Inhibitory effects of coumarin derivatives on tyrosinase [J]. *Molecules*, 2021, **26**(8): 2346.

[6] GONÇALEZ M L, CORRÊA M A, CHORILLI M. Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging [J]. *Biomed Res Int*, 2013, **2013**: 271276.

[7] OGBECHIE-GODEC O A, ELBULUK N. Melasma: an up-to-date comprehensive review [J]. *Dermatology Ther*, 2017, **7**(3): 305-318.

[8] EL-NASHAR H A S, EL-DIN M I G, HRITCU L, *et al*. Insights on the inhibitory power flavonoids on tyrosinase activity: a survey from 2016 to 2021 [J]. *Molecules*, 2021, **26**(24): 7546.

[9] 倪　丹, 蒋新元, 唐玉莲, 等. 鞣花酸抑制酪氨酸酶的动力学、荧光光谱分析及分子对接 [J]. 食品科学, 2024, **45**(2): 104-112.

[10] CHESLER K C, MOTZ C T, BALES K L, *et al*. Voluntary oral dosing for precise experimental compound delivery in adult rats [J]. *Lab Anim*, 2022, **56**(2): 147-156.

[11] NUNES J A, ARAÚJO R S A, SILVA F N D, *et al*. Coumarin-based compounds as inhibitors of tyrosinase/tyrosine hydroxylase: synthesis, kinetic studies, and *in silico* approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(6): 5216.

[12] TANASE C, NICOLESCU A, NISCA A, *et al*. Biological activity of bark extracts from northern red oak (*Quercus rubra* L.): an antioxidant, antimicrobial and enzymatic inhibitory evaluation [J]. *Plants* (Basel), 2022, **11**(18): 2357.

[13] 申士富, 钱　静, 刘　廷, 等. 青海蚕豆中原花青素和 L- 左旋多巴的含量测定和品种间差异的比较 [J]. 中国食物与营养, 2017, **23**(9): 36-40.

[14] 郑开斌, 李爱萍, 曹奕鸯, 等. 蚕豆花 L- 左旋多巴液相色谱检测方法的建立 [J]. 江苏农业学报, 2012, **28**(3): 688-690.

[15] 曹艺明, 冯　丹, 张世明, 等. HPLC 法测定冰片对 L- 左旋多巴血药和血脑浓度的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, **42**(3): 267-271.

[16] 陈艳梅. 酪氨酸酶新型抑制剂曲酸衍生物的合成及其抑制黑色素形成的作用机理 [D]. 厦门：厦门大学硕士学位论文, 2019.

[17] 马小弟, 杜雅娟, 张新国, 等. 酪氨酸酶抑制剂快速筛选方法的建立 [J]. 中国食品工业, 2020, (Z2): 69-71.

[18] 罗满平, 孟瑛瑛, 李德民, 等. AmpC 酶抑制剂筛选方法的建立及 136 种中药材活性评价 [J]. 中草药, 2023, **54**(19): 6351-6361.