DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.05.030

白及多糖脂质体的制备及对酪氨酸酶活性的影响

Preparation of polysaccharde liposomes from *Bettila striata* and their effects on tyrosinase activity

孔令悦[1] 向 华[2] 唐克华[3] 董爱文[3] 唐忠海[2]

KONG Ling-yue[1] *XIANG Hua*[2] *TANG Ke-hua*[3] *DONG Ai-wen*[3] *TANG Zhong-hai*[2]

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院,湖南 长沙 410128;2. 湖南农业大学食品科学技术学院,湖南 长沙 410128;
3. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室,湖南 张家界 427000)

(1. *College of Bioscience and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha*, *Hunan* 410128, *China*;
2. *College of Food Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha*, *Hunan* 410128, *China*;
3. *Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering*, *Jishou University*, *Zhangjiajie*, *Hunan* 427000, *China*)

摘要:采用纳米脂质体法制备高含量白及多糖脂质体,并研究其与酪氨酸酶的相互作用机制。结果表明,制备的白及多糖脂质体平均粒径为 5.72 μm,粒径分布均匀;当浓度为 12.8 mg/mL 时,白及多糖脂质体对酪氨酸酶活性抑制率为 51%,半抑制浓度为 11.56 mg/mL。光谱分析表明,白及多糖脂质体与酪氨酸酶发生了相互作用,结合常数为 6.58×10^5 L/mol;其荧光猝灭机制主要为静态猝灭,并且随着白及多糖浓度的增大,猝灭作用增强,结合位点数为 1.071 1。

关键词:白及;多糖;脂质体;酪氨酸酶

Abstract: Nano-liposome method was used to prepare high-content polysaccharide liposomes from *Bettila striata*, and the interaction mechanism between them and tyrosinase were studied. The results showed that the average particle size of the prepared polysaccharide liposomes was 5.72 μm and the particle size distribution was uniform; when the concentration was 12.8 mg/mL, the inhibition rate of these polysaccharide liposomes on tyrosinase activity was 51%, and the half inhibitory concentration was 11.56 mg/mL. Spectral analysis showed that the polysaccharide liposomes from *B. striata* could interact with tyrosinase, with the binding constant of 6.58×10^5 L/mol; the fluorescence quenching mechanism was mainly static quenching, whose effect enhanced with the increase of polysaccharide concentration, and the number of binding sites was 1.071 1.

Keywords: *Bettila striata*; polysaccharde; liposome; tyrosinase

白及多糖(Bettila striata polysaccharde,BSP)为无味白色细纤维状,易溶于热水,不溶于高浓度有机溶剂。具有止血[1]、抗肿瘤[2]、抗菌[3]等生物活性。其提取物对光敏感、易氧化、易醇沉。现有的白及多糖修饰方法主要为通过有机酸(胆甾醇琥珀酸、硬脂酸、磷酸、叶酸等)对其进行酯化和醛化等化学修饰法,该方法降低了白及多糖的还原性。酪氨酸酶是一种氧化酶,可通过氧化 *L*-多巴的羟基,调控人体黑色素和瓜果褐变的生成[4]。

脂质体是由与皮肤结构相似的双亲性分子组成[5],可以使白及多糖更好地透过人体表皮,并在皮肤细胞中积累,达到美白效果。试验拟采用纳米脂质体法制备高含量白及多糖脂质体,并研究其对酪氨酸酶的影响,旨在为白及多糖在美白化妆品、保健食品、食品添加剂等方面的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 材料与试剂

白及块茎:广州民信药业连锁有限公司;

酪氨酸酶:上海源叶生物科技有限公司;

辛酸/癸酸甘油三酯 PEG-8 辛酸/癸酸甘油酯类:广州市衡拓贸易有限公司;

鲸蜡硬脂醇聚醚-25:广州合孚化工有限公司;

月桂醇聚醚-23:广州市奥源贸易有限公司;

乙氧基二甘醇:上海蒲恩生化科技有限公司;

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31671858);湖南省自然科学基金项目(编号:2019JJ40114);湖南省教育厅重点项目(编号:18A108);林产化工工程湖南省重点实验室开放基金项目(编号:JDZ201701)

作者简介:孔令悦,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:唐忠海(1979—),男,湖南农业大学教授,博士。
E-mail:tangzh@hunau.edu.cn

收稿日期:2020-03-20

PEG-30 二聚羟基硬脂酸酯:广州利美达进出口商贸有限公司;

辛酸/癸酸甘油三酯:美国英狄士公司;

1,2 戊二醇:广州艾比特贸易有限公司;

1,2 己二醇:广州露途化工有限公司;

对羟基苯乙酮:广州欣浪生物化工有限公司;

生理盐水:辰欣药业股份有限公司。

1.1.2　仪器与设备

中草药破碎机:1000Y 型,天向九太(大连)商贸有限公司;

电子分析天平:FA2204N 型,上海力辰仪器有限公司;

旋转蒸发仪:RE-52A 型,上海亚荣生化仪器厂;

台式离心机:TGL-16B 型,上海圣科仪器设备有限公司;

紫外—可见分光光度计:722S 型,上海菁华科技仪器有限公司;

电动搅拌机:GZI20 型,江阴科研器械有限公司;

均质机:500W 型,北京海福达科技有限公司;

激光粒度仪:3000 HSA 型,英国马尔文仪器公司;

全自动酶标仪:MR-96A 型,南京贝登医疗股份有限公司;

荧光分光光度计:F-380 型,天津港东科技发展股份有限公司。

1.2　**试验方法**

1.2.1　白及多糖的提取与纯化　采用热水回流提取法提取、醇沉法纯化[6]。

1.2.2　白及多糖脂质体的制备　将油相(1%～10%辛酸/癸酸甘油三酯 PEG-8 辛酸/癸酸甘油酯类、1%～10%鲸蜡硬脂醇聚醚-25、1%～10%月桂醇聚醚-23、1%～10%乙氧基二甘醇、5%～25% PEG-30 二聚羟基硬脂酸酯、5%～20%辛酸/癸酸甘油三酯)与水相(水、25%白及多糖)分别加热至 85～90 ℃,12 000 r/min 下将油相快速倒入水相中均质 3 min;搅拌降温至 70 ℃时加入防腐剂(1, 2 戊二醇,1, 2 己二醇,对羟基苯乙酮),冷却,即制得 25%白及多糖脂质体。

1.2.3　透皮渗透行为　猪腹部皮肤(未经开水烫,去除毛发)裁剪成适当大小,皮肤角质层朝上,固定于 Franz-type 扩散池中。用去离子水配制 0.50 mg/mL 白及多糖溶液和 100 mg/mL 白及多糖脂质体溶液。取待测样品 100 mL均匀涂布于皮肤上,接受池中加入 100 mL 生理盐水,37 ℃恒温水浴并搅拌。分别于涂布后定时吸取接受液 1 mL,采用苯酚—硫酸法测定白及多糖浓度。待测样品为白及多糖脂质体、白及多糖,去离子水为对照。

1.2.4　酪氨酸酶活力及其抑制率的测定

(1) 白及多糖脂质体溶液的配制:将 128 mg 白及多糖脂质体溶于 10 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液中,再分别稀释成 6.4,3.2,1.6 mg/mL 溶液。

(2) 酪氨酸酶抑制率的测定:参照文献[7]的方法并稍作改动。取 3 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液于 10 mL 试管中,加入 0.1 mg/mL 酪氨酸酶溶液(用 0.2 mol/mL pH 7.5 的磷酸缓冲溶液溶解)1 mL。加入浓度为 12.8,6.4,3.2,1.6 mg/mL 的白及多糖脂质体溶液各 1 mL,混匀,以 1 mL 磷酸缓冲溶液为空白组,37 ℃孵育 30 min。用酶标仪测定 $OD_{475\ nm}$ 值,并按式(1)计算抑制率。

$$R=\left(1-\frac{Fco}{Fob}\right)\times 100\%\ , \tag{1}$$

式中:

R——酪氨酸酶抑制率,%;

Fco——白及多糖脂质体的 $OD_{475\ nm}$ 值;

Fob——空白组的 $OD_{475\ nm}$ 值。

(3) 半抑制浓度的测定:以白及多糖脂质体浓度为横坐标,酪氨酸酶抑制率为纵坐标,绘制回归曲线,并计算半抑制浓度 IC_{50}[8]。

1.2.5　荧光光谱分析　向 10 mL 试管中加入 2 mg/mL 的酪氨酸酶溶液 1 mL,加入浓度为 0.0,1.6,3.2,6.4,12.8 mg/mL 的白及多糖脂质体溶液各 1 mL,混匀,分别加入 20,15,10,5 mg 多巴粉末,用 3 mL 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L)进行溶解。37 ℃孵育 30 min,于荧光分光光度计上进行荧光谱扫描和测定。光谱条件:扫描温度 25 ℃,激发波长 295 nm,扫描范围 295～400 nm,激发狭缝 2.5 nm,扫描速度 240 nm/min,发射狭缝 2.5 nm。

1.2.6　荧光猝灭机制分析　按式(2)确定荧光猝灭类型。

$$F_o/F_c=1+K_s[Q]=1+K_q\tau_0[Q], \tag{2}$$

式中:

F_o——荧光体不含抑制剂时的最大荧光强度;

F_c——荧光体含白及多糖脂质体的最大荧光强度;

K_s——Stern-Volmer 猝灭常数;

$[Q]$——抑制剂浓度,mg/mL;

K_q——双分子猝灭过程速率常数,L/mol;

τ_0——生物大分子的荧光寿命,约为 10^{-8} s。

当小分子与大分子结合时,其结合位点数 n 与结合常数 K_a 按式(3)计算。

$$\lg[(F_o-F_c)/F_c]=n\lg K_a-n\log\{1/\{[Q_d]-(F_o-F_c)[Q_p]/F_o\}\}, \tag{3}$$

式中:

n——药物小分子与生物大分子相互作用的结合位点数;

K_a——结合常数,L/(mol·s);

$[Q_d]$——猝灭剂浓度,mg/mL;

$[Q_p]$——L-多巴浓度,mg/mL。

1.2.7　紫外光谱分析　取浓度为 2 mg/mL 的酪氨酸酶

溶液 1 mL，加入浓度为 12.8 mg/mL 的白及多糖脂质体溶液 1 mL，用磷酸缓冲溶液补齐使溶液总体积为 5 mL，混匀，37 ℃孵育 30 min，空白组为不加白及多糖脂质体，于 420～500 nm 处进行紫外吸收光谱扫描。

1.2.8　数据处理　采用 Origin 6.1 软件进行数据分析处理和绘图。

2　结果与分析

2.1　稳定性

白及多糖脂质体为半透明液体、无味，3 000 r/min 离心 30 min 未出现分层现象。28 d 耐热/耐寒试验发现，白及多糖脂质体未出现变色、变味、分层、浑浊等异常现象，自然光照条件下连续放置 28 d 也未出现变色、变味、分层、浑浊等异常现象。初步判断制得的白及多糖脂质体稳定性良好。

2.2　粒径和包封率

由图 1 可知，样品径粒分布均匀，分布范围适当。经动态光散射处理，制备的脂质体平均粒径为 5.72 μm。

试验发现，脂质体包封率数据离散度较小，平均包封率为 87.15%，说明该工艺重现性良好。

2.3　透皮吸收情况

颗粒进入皮肤的方式主要有 3 种：① 粒径＞10 μm 的颗粒不能渗入，保留在皮肤表面；② 粒径为 3～10 μm 的颗粒适合渗入皮脂腺—毛囊单元；③ 可通过在毛干周围开口的毛囊漏斗渗入，粒径＜3μm的颗粒可渗入角蛋白细胞胞间。由图 2 可知，当透皮吸收时间为 8 h 时，白及多糖达最大透过量，其透皮效果较差。白及多糖脂质体粒径为3～10 μm，显著增加了白及多糖的透皮渗透效果，其透过量为白及多糖的 3 倍，当透皮吸收时间为 16 h 时接近最大透过量，说明该脂质体已渗入皮脂腺—毛囊中。

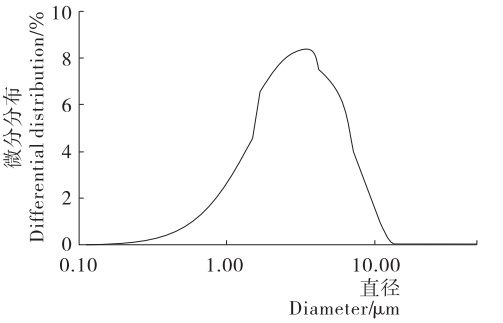

图 1　25%白及多糖脂质体的粒径分布图

Figure 1　Particle size distribution of 25% *Bettila striata* polysaccharde liposomes

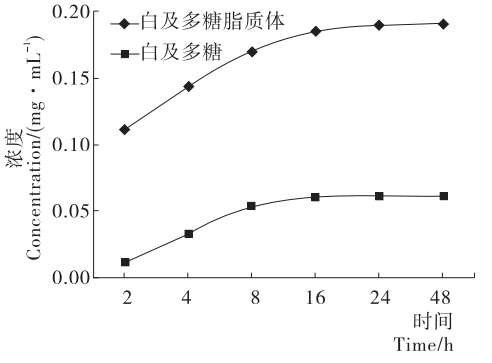

图 2　白及多糖及其脂质体透皮吸收效果

Figure 2　Transdermal absorption of *Bettila striata* polysaccharde and their liposomes

2.4　白及多糖脂质体对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 3 可知，白及多糖脂质体对酪氨酸酶的抑制率随脂质体浓度的增加而增大，且具有一定的线性关系，当白及多糖脂质体浓度为 2 mg/mL 时，抑制率达 40%，说明脂质体保留了白及多糖的还原性。白及多糖的 IC_{50} 为 11.56 mg/mL。

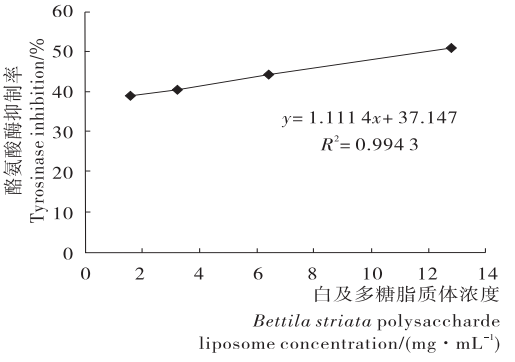

图 3　白及多糖脂质体对酪氨酸酶抑制率的影响

Figure 3　Inhibition rates of tyrosinase by *Bettila striata* polysaccharde liposomes at different concentrations

2.5　紫外吸收光谱分析

由图 4 可知，随着白及多糖脂质体含量的增加，酪氨酸酶紫外吸收最大波长向右偏移，波峰由 282 nm 漂移至 286 nm，属于红移，表明该脂质体与酪氨酸酶位点结合，使酪氨酸酶发生了变化。282，286 nm 处出现新物质，而白及多糖脂质体的位于 282 nm 处，说明此处为白及多糖和酪氨酸酶的结合物。

2.6　荧光光谱分析

由图 5 可知，酪氨酸酶的最大荧光峰出现在 334 nm 处。加入白及多糖脂质体后，酪氨酸酶的荧光强度逐渐降低，说明白及多糖脂质体对酪氨酸酶的荧光具有猝灭作用，且猝灭作用随酪氨酸酶浓度的增加而变强；同时也表明白及多糖脂质体与酪氨酸酶发生了相互作用，改变了酪氨酸酶构象。

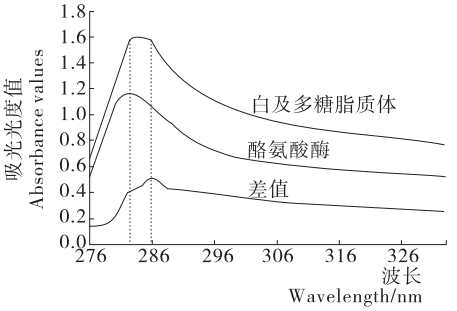

图 4　紫外吸收光谱

Figure 4　Ultraviolet absorption spectrum of *Bettila striata* polysaccharde liposomes on tyrosinase

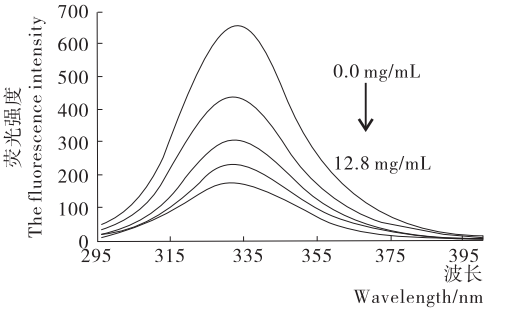

图 5　荧光猝灭图

Figure 5　Fluorescence quenching of tyrosinase by *Bettila striata* polysaccharide liposomes

2.7　白及多糖脂质体对酪氨酸酶的荧光猝灭机制

以速度倒数 $1/v$ 为纵坐标,底物浓度倒数 $1/[s]$ 为横坐标作 LINEWEAVER-BWK 双倒数法图如图 6 所示。

抑制类型的判断标准为:① 竞争性,V_{max} 不变,K_m 值增加;② 非竞争性,V_{max} 增加,K_m 值不变;③ 混合性,V_{max} 增加,K_m 值减小;④ 反竞争性:V_{max} 减小,K_m 减小。由表 1可知,随着白及多糖脂质体浓度的增加,V_{max} 基本保持不变,K_m 值逐渐增大,说明白及多糖脂质体为竞争性抑制。白及多糖类似于底物,可与底物竞争酪氨酸酶活性中心的结合位点,从而抑制酪氨酸酶活性。

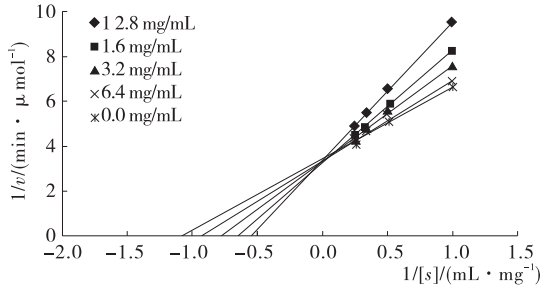

图 6　白及多糖脂质体对酪氨酸酶抑制的 LINEWEAVER-BWK 图

Figure6　LINEWEAVER-BWK diagram of tyrosinase inhibition by *Bettila striata* polysaccharde liposomes

表 1　白及多糖脂质体抑制酪氨酸酶活性的动力学参数

Table 1　Kinetic parameters of the inhibition of tyrosinase activity by *Bettila striata* polysaccharide liposomes

浓度/(mg · mL^{-1})	K_m	V_{max}
0.0	0.940 5	0.292 6
1.6	1.107 7	0.307 6
3.2	1.270 7	0.298 4
6.4	1.548 3	0.298 7
12.8	1.796 8	0.289 6

假设抑制剂对酪氨酸酶荧光猝灭机制为动态猝灭,以 F_o/F_c 为纵坐标,白及多糖脂质体浓度为横坐标作图,分析猝灭机制。

由图 7 可知,白及多糖脂质体 K_q 为 5×10^{12} L/(mol · s),各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散常数为 2.0×10^{10} L/(mol · s);白及多糖脂质体对酪氨酸酶的荧光猝灭可能不是通过扩散进行的动态猝灭,而是静态猝灭,说明白及多糖脂质体与酪氨酸酶的相互作用为非共价反应,形成了特定结构的化合物。

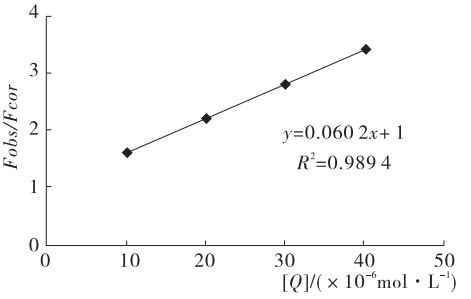

图 7　白及多糖脂质体对酪氨酸酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Figure 7　Stern-Volmer diagram of tyrosinase fluorescence quenching by *Bettila* striata polysaccharide liposomes

由图 8 可知,线性方程为 $y=-1.071\ 1x+5.160\ 9$,$R^2=0.999\ 8$,斜率即白及多糖脂质体与酪氨酸酶的结合位点数 $n=1.071\ 1$,截距即结合常数 $K_a=6.58\times10^5$ L/mol。

3　结论

通过纳米脂质体制备技术制备了白及多糖脂质体,其粒径分布均匀,稳定性良好。该脂质体保留了白及多

(下转第 174 页)

中成药，2014，36(3)：554-558.
[2] 郭良君，谭兴起，郑巍，等. 地瓜藤化学成分研究[J]. 中草药，2011，42(9)：1 709-1 711.
[3] WEI Shao-peng，LU Li-na，JI Zhi-qin，et al. Chemical constituents from *Ficus tikoua*[J]. Chem Nat Compd，2012，48(3)：484-485.
[4] 张文平，张晓平，时瑞梓，等. 民族药地板藤止血抗炎及镇痛作用研究[J]. 时珍国医国药，2017，28(12)：2 905-2 906.
[5] 田民义，刘婷婷，洪怡，等. 地果化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材，2018，41(9)：1 868-1 871.
[6] 杨世波，王韦，张润芝，等. 地板藤根的抗氧化和抑菌活性研究[J]. 云南民族大学学报：自然科学版，2013，22(4)：235-238.
[7] 谢国芳，徐小燕，王瑞，等. 金刺梨果实和叶中酚类、V_C含量及其抗氧化能力分析[J]. 植物科学学报，2017，35(1)：122-127.
[8] DRAGOIC-UZELA V，SAVIC Z，BRALA A，et al. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the northwest Croatia[J]. Food Technol Biotech，2010，48(2)：214-221.
[9] NUNCIO-JAUREGUI N，MUNERA-PICAZO S，CALIN-SANCHEZ A，et al. Bio-active compound composition of pomegranate fruits removed during thinning[J]. J Food Compos Anal，2015，37：11-19.
[10] XIE Guo-fang，TAN Shu-ming. Effect of Cultivar on quality of the common bean during storage[J]. Int Agr Eng J，2015，24(2)：69-78.
[11] TAUCHEN J，MARSIK P，KVASNICOVA M，et al. In vitro antioxidant activity and phenolic composition of Georgian，central and westeuropean wines[J]. J Food Compos Anal，2015，41：113-121.
[12] OLIVEIRA I，BAPTISTA P，MALHEIROR，et al. Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity[J]. Food Res Int，2011，44(5)：1 401-1 407.
[13] SCHAICH K M，TIAN X，XIE J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy：A critical evaluation of ABTS，DPPH，and ORAC assays[J]. J Functional Foods，2015，14：111-125.
[14] 李孟秋，翟俊乐，田欢，等. 黄秋葵提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂，2015(10)：65-69.
[15] 刘永玲，谢国芳，王威，等. 八月瓜叶、果皮和果肉中酚类、V_C含量及其抗氧化能力分析[J]. 食品研究与开发，2019，40(15)：66-72.
[16] 李欣，薛治浦，朱文学. 丹参不同部位总酚酸和总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学，2011，32(3)：108-111.
[17] 李晓英，薛梅，樊汶樵. 蓝莓花、茎、叶酚类物质含量及抗氧化活性比较[J]. 食品科学，2017，38(3)：142-147.
[18] 周婧，李钢，徐静. 红海榄不同部位总酚和总黄酮含量分析及抗氧化活性研究[J]. 食品科技，2017，42(6)：220-224.
[19] 吴本培，雷波. 新疆红枣主栽品种不同部位的总酚含量和抗氧化活性比较[J]. 食品研究与开发，2019，40(7)：59-63.
[20] 金银萍，曲正义，崔丽丽，等. 五味子不同部位黄酮和酚酸类成分的含量测定及抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(19)：79-84.

(上接第 163 页)

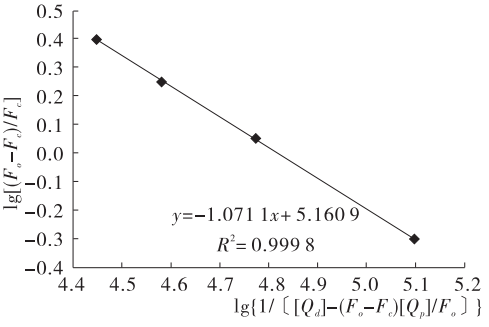

图 8　白及多糖脂质体对酪氨酸酶的双倒数图

Figure 8　Double reciprocal plot of tyrosinase to *Bettila striata* polysaccharide liposomes

糖抑制酪氨酸酶活性的特征，通过竞争酪氨酸酶的结合点(n=1.071 1)，从而抑制酪氨酸酶活性，能有效地渗入皮肤且其输送能力强于传统基质介质的。后续可利用白及多糖打造新型的保健食品或美白功效的化妆品。

参考文献

[1] 吴久健，孟岳良，邹俪华，等. 白及不同提取部位对小鼠止血活性实验[J]. 药学实践杂志，2011，29(3)：206-207，234.
[2] 罗惠娟，肖小敏，徐建平，等. 中药多糖、胸腺肽对 U14 宫颈癌荷瘤鼠外周血 TLC 亚群及 NK 细胞的影响[J]. 海南医学，2012(23)：15-18.
[3] 吴永祥，程满怀，江海涛，等. 白及萃取物的抑菌活性及其二氯甲烷萃取物化学成分分析[J]. 食品与机械，2017，33(12)：76-79.
[4] 赵丹，曹玉峰，丁文玉，等. 玫瑰发酵液的抗氧化及美白功效探究[J]. 食品与机械，2017，33(9)：141-145，196.
[5] 侯丽芬，宗珊盈，张海臣，等. β-谷甾醇乙酸酯对脂质膜结构稳定性的影响[J]. 食品与机械，2019，35(9)：20-25.
[6] 董建新，俞涵，姜伟，等. 响应面法优化白及多糖的提取和醇沉工艺[J]. 基因组学与应用生物学，2019，38(8)：3 681-3 689.
[7] 穆丹丹，俞桂新. 15 种中药活性单体化合物对酪氨酸酶抑制作用研究[J]. 世界最新医学信息，2019，19(70)：153-154.
[8] 褚盼盼，门玉倩，孔令悦，等. 黑豆红色素抑制胰脂肪酶催化反应动力学研究[J]. 食品科技，2018，43(5)：302-307.