槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用与分子机理

管骁[1]，杨城[1]，刘静[2]，王文高[3,4]，韩飞[5]
（1.上海理工大学医疗器械与食品学院，上海 200093）（2.上海海事大学信息工程学院，上海 201306）
（3.上海良友(集团)有限公司，上海 200333）（4.上海市粮食科学研究所，上海 200333）
（5.国家粮食局科学研究院，北京 100037）

摘要：本文以 L-多巴为底物，采用酶抑制动力学法研究了槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用大小及类型，并采用荧光光谱技术分析其与酪氨酸酶的猝灭作用类型、结合位点、作用力类型。在此基础上，进一步利用柔性分子对接技术分析槲皮素对酪氨酸酶的抑制机理。结果表明，槲皮素对酪氨酸酶具有抑制作用，抑制常数 K_I 为 36 mM，以竞争性抑制剂形式抑制酪氨酸酶活性，是一种可逆性抑制剂；槲皮素以 1:1 比例通过氢键和疏水作用力结合于酪氨酸酶活性中心，且对酪氨酸酶的荧光产生静态淬灭作用，具有氢键及疏水作用力；分子对接结果验证了以上实验结论：槲皮素占据了酪氨酸酶活性中心，且与活性中心部位的 Asn260 和 Gly62 残基形成了强烈的氢键作用，同时伴有疏水作用共同稳定复合物的结构。

关键词：槲皮素；酪氨酸酶；抑制作用；机理；分子对接
文章篇号：1673-9078(2015)8-71-76 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.013

Inhibitory Effect of Quercetin on Tyrosinase and Its Molecular Mechanism

GUAN Xiao[1], YANG Cheng[1], LIU Jing[2], WANG Wen-gao[3,4], HAN Fei[5]
(1.School of Medical Instruments and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China) (2.College of Information Engineering, Shanghai Maritime University, Shanghai 201306, China)
(3.Shanghai Liangyou (Group) Co., Ltd, Shanghai 200333) (4.Shanghai Grain Science Research Institute, Shanghai 200333)
(5.Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

Abstract: The type and intensity of the inhibitory effect of quercetin on tyrosinase were studied using enzyme inhibition kinetics with L-dopa as a substrate. The type of fluorescence quenching, binding sites, and the type of interaction between quercetin and tyrosinase were analyzed using fluorescence spectroscopy. Furthermore, the molecular mechanism of the inhibitory effect was investigated using flexible molecular docking. The results showed that quercetin inhibited the activity of tyrosinase with an inhibitor constant (K_I) of 36 mM. Quercetin can be regarded as a competitive and reversible inhibitor of tyrosinase. Quercetin bound to the active site of tyrosinase via hydrophobic interactions and hydrogen bonds at a ratioof 1 : 1, and quenched the fluorescence of tyrosinase by static quenching. Concomitantly, molecular docking results confirmed that quercetin occupied the active site of tyrosinase and formed strong hydrogen bonds with residues Asn260 and Gly62 located at the active site of tyrosinase. Moreover, hydrophobic interaction played a key role in stabilizing the structure of the complex formed.

Keywords: quercetin; tyrosinase; inhibitory effect; molecular docking

酪氨酸酶又称酚氧化酶、多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶，是一种广泛存在于生物体内的催化黑色素合成的关键限速酶[1~2]，与生物体的诸多重要生理过程密切相关。酪氨酸酶在生物体内活性的过量表达不仅易导致脊椎动物色素沉着性疾病的产生[3]、果蔬的快速褐变等[4~5]，而且与昆虫的蜕皮过程和伤口愈合作用息息相关[6]。如何有效抑制生物体内酪氨酸酶活性在医学、农业、化妆品等多个领域都是重要的命题，深入开展酪氨酸酶的抑制作用机理研究以及开发高效低毒的酪氨酸酶抑制剂已成为当前的研究热点。

槲皮素（quercetin，QUE）是一类黄酮物质，广泛存在于植物的花、叶、果实中，具有多种生物活性，如抗炎、降血压、抗血糖升高、癌细胞生长抑制等。QUE 由 A、B 和 C 三个芳香环组成，其骨架结构 3，5，7，3′和 4′氢原子被羟基取代形成五羟基黄酮[7~9]。前人研究证实了槲皮素是一种良好的酪氨酸酶抑制剂，并就槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用进行了部分实验研究，但未涉及到槲皮素与酪氨酸酶相互作用的分子机理，因此对其抑制酪氨酸酶活性机制仍不明确。本文拟通过酶抑制动力学实验、荧光光谱技术研究槲

收稿日期：2014-11-11
基金项目：国家自然科学基金项目（31101348）；上海市自然科学基金项目（14ZR1419200）
作者简介：管骁（1979-），男，博士，副教授

皮素与酪氨酸酶的相互作用问题，并利用分子对接技术在分子水平上阐明槲皮素抑制酪氨酸酶的作用机理，为了解酪氨酸酶的活性机理与开发酪氨酸酶具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Dual-FL 型三维荧光光谱仪，德国 HORIBA 公司；UV-6000 紫外可见光分光光度计，海元析仪器有限公司；FA2004 型分析电子天平，海良单仪器仪表有限公司；B220 型恒温水浴锅，海亚荣生化仪器厂；KQ5200DB 型数控超声波清洗器，山市超声仪器有限公司。酪氨酸酶，Sigma 公司；槲皮素 quercetin，沪试；L-DOPA，Aladdin 公司；二甲基亚砜、磷酸缓冲液、磷酸氢二钠，磷酸二氢钠：分析纯；所有的溶液均用二次蒸馏水配置，50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，PH6.8）由 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配制。

1.2 实验方法

1.2.1 酪氨酸酶活性测定

参照 Xie[10]的方法进行。在 3 mL pH 6.8 50 mmol/LPBS 缓冲液的测活体系中，先加入 2.8 mL 1 mmol/L L-多巴（L-DOPA）溶液，然后加入 0.1 mL 不同浓度的槲皮素溶液，置于 30 ℃水浴中孵育 30 min，最后加入 0.1 mL 酪氨酸酶溶液混匀，并迅速转移到比色皿中，在 30 ℃恒温条件下、475 nm[11]处测定混合液吸光度随时间的增长曲线。规定以每分钟反应液在 475 nm 波长的吸光度值增加 0.001 为一个酪氨酸酶活力单位(U/min)。

1.2.2 酪氨酸酶抑制率的测定

实验中 L-多巴溶液、酪氨酸酶溶液及样品溶液均以 pH 6.8、50 mmol/L PBS 缓冲液配制。取 4 支试管，分别标记 A、B、C、D 号，每支试管中均先加入 2.8 mL、1 mmol/L 的 L-DOPA 溶液，置于 30 ℃水浴 30 min，之后 A 管中加入 PBS 缓冲液和酪氨酸酶液各 0.1 mL，B 管中加入 PBS 缓冲液 0.2 mL，C 管中加入槲皮素溶液与酪氨酸酶液各 0.1 mL，D 管中加入槲皮素与磷酸缓冲液各 0.1 mL，之后迅速放入比色皿中测定其在 475 nm 处的吸光度值，酪氨酸酶抑制率通过下式计算：

$$抑制率=[(A-B)-(C-D)]/(A-B)\times 100 \quad (1)$$

注：A 表示 A 管反应液在 475 nm 下的吸光度值；B 表示 B 管反应液在 475 nm 下的吸光度值；C 表示 C 管反应液在 475 nm 下的吸光度值；D 表示 D 管反应液在 475 nm 下的吸光度值

1.2.3 荧光光谱测定

荧光光谱采用德国 HORIBA 公司的 Dual-FL 型三维荧光光谱仪采集。在 4 mL 离心管中，依次加入本实验条件下最适浓度的酪氨酸酶溶液 50 μL 和一定量的槲皮素储备液，用 pH 6.8、50 mmol/L PBS 缓冲液补充至 3 mL[12]。采用 280 nm 为激发波长，激发和扫描光谱狭缝宽度均为 5 nm，扫描速度与电压都为默认值，分别在 15 ℃和 30 ℃下扫描各样品在 295~525 nm 处的发射光谱。

1.2.4 分子对接

对接软件采用 Discovery Studio 2.5（Accelrys 公司），运行环境为 windows 7 系统。采用蘑菇酪氨酸酶分子结构（AbTYR；PDB code：2Y9X）为受体[13]，配体槲皮素结构采用画图软件 ChemDraw Ultra 画出保存为 mol 格式，导入软件中经过预处理，运行柔性对接模块。

运用 DS Visulizer3.5 分析软件，综合考虑 LibDockScore 的高低、配体-受体复合物的 CDocker Energy、CDocker Interaction Energy、软件中打分函数（Ligscore 1、Ligscore 2、PLP1、PLP2、Jain、PMF、PMFO4）打分值的高低及氢键作用和结合能大小选取最优最稳定的对接构象。

1.2.5 数据分析

酶抑制动力学与荧光光谱实验所得数据为 3 次平行试验平均值，采用 Excel 和 Origin 软件数据分析和作图。对接图片通过 DS visulizer3.5 显示软件所得。

2 结果与讨论

2.1 槲皮素对酪氨酸酶的抑制动力学

图 1a 所示为在 1 mmol/L 的 L-DOPA、16 μg/mL 的酪氨酸酶测活体系中，不同浓度槲皮素对酪氨酸酶催化 L-DOPA 反应进程的影响曲线。由图 1a 可知，当无槲皮素存在时，酶促反应开始后吸光值迅速增加，表明产物快速生成，120 s 后，反应基本达到稳定态[14]。当槲皮素存在于反应体系中，酶促反应速度明显减慢，且随着槲皮素浓度的增大减缓趋势越明显，表明槲皮素对酪氨酸酶活性有明显抑制作用。

图 1b 所示为在 L-DOPA 浓度为 0.33 mmol/l，酪氨酸酶浓度为 10 μg/mL 的测活体系中，不同浓度槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制率情况。由图可知，当槲皮素浓度为 50 μmol/L 时对酪氨酸酶活性抑制率为 50.9%，浓度为 200 μmol/L 时抑制率达到 93.8%，通过曲线拟合计算出槲皮素对酪氨酸酶的 IC_{50} 值为 49.12 μmol/L。

固定 L-DOPA 浓度为 1mmol/L，改变酪氨酸酶的浓度，测定不同浓度槲皮素存在条件下酪氨酸酶活力情况，结果如图 1c 所示。由图可知，酶活力对酶浓度作图为一组通过原点的直线，随着体系中槲皮素浓度的增大，直线的斜率逐渐下降，表明槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用属于可逆过程，增加槲皮素的含量导致酶活力的下降，说明槲皮素与酪氨酸酶的结合使酶活力受到抑制，但并不导致酶的分子构象的永久变化而失活。

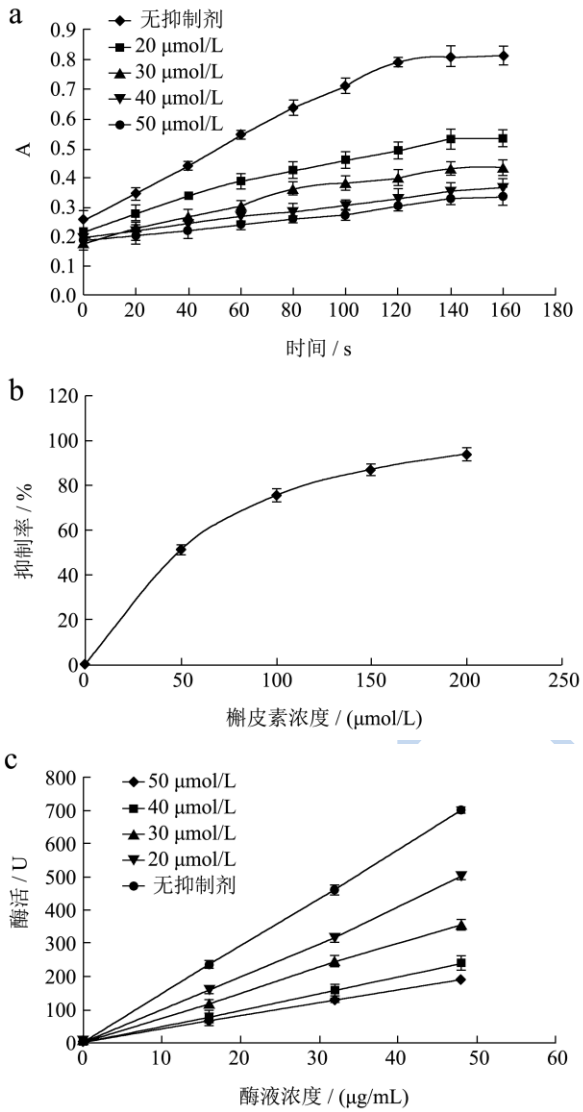


图 1 槲皮素对酪氨酸酶活性的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of quercetin on tyrosinase activity

在不同浓度槲皮素存在的测活体系中，测定酶催化不同浓度的 L-DOPA 反应速率，经 Lineweaver-Burk 双倒数作图，如图 2a 所示。由图可知，槲皮素作为酪氨酸酶的抑制剂，最大反应速度 Vmax 保持不变，而米氏常数 Km 随槲皮素浓度的增大而变大，表明槲皮素对酶的抑制类型为竞争性抑制[15]。以 Km 对槲皮素浓度作图得到一条直线（图 2b），由直线的斜率求得抑制常数 K_I 为 36 mmol/L。

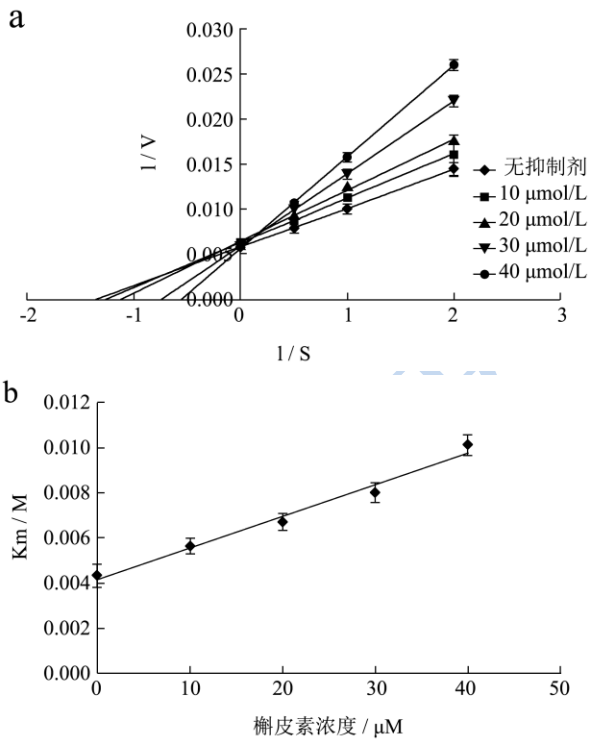


图 2 槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用 Lineweaver－Burk 图

Fig.2 Lineweaver-Burk plot for the inhibition of tyrosinase by quercetin

2.2 荧光光谱法研究槲皮素与酪氨酸酶的相互作用

2.2.1 槲皮素对酪氨酸酶的荧光猝灭作用

酪氨酸酶浓度越大，其荧光信号越强。然而在温度较高时，酶浓度越大，分子间碰撞加剧，容易产生荧光自熄现象[16]。通过扫描不同浓度酪氨酸酶的 3D 荧光光谱，最终选择 0.444 μmol/L 的酪氨酸酶进行实验，280 nm 作为酪氨酸酶荧光的激发波长。

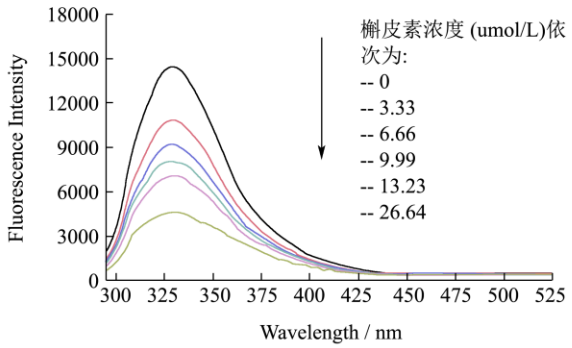


图 3 不同浓度槲皮素条件下酪氨酸酶的荧光光谱

Fig.3 Emission spectrum of tyrosinase with various concentrations of quercetin

图 3 所示为温度 288 K 时，不同浓度槲皮素存在

条件下酪氨酸酶的荧光发射光谱。由图 3 可知，随槲皮素浓度的增加，酪氨酸酶的荧光强度呈单调性降低，表明槲皮素与酪氨酶相互作用后，对其荧光产生猝灭作用[17]。酪氨酸酶的最大发射波长为 295 nm，加入槲皮素后，酪氨酸酶的最大发射波长没有发生红移或者蓝移，表明槲皮素与酪氨酸酶相互作用时，没有改变发生荧光猝灭的氨基酸残基（色氨酸等）的疏水性环境。

2.2.2 槲皮素对酪氨酸酶的荧光猝灭机理

荧光猝灭可分为动态猝灭和静态猝灭。蛋白质与小分子结合后其荧光强度的变化可由式(2)的 Stern-volmer 方程表示：

$$\frac{F_0}{F}=1+K_q\tau_0[Q]=K_{sv}[Q] \quad (2)$$

$$K_q=\frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (3)$$

注：F_0 为荧光物质的初始荧光强度；F 为相互作用后荧光物质的荧光强度；Kq 为双分子猝灭过程的速率常数，L/mol/s；Ksv 为 Stern-Volmer 方程猝灭常数，L/mol；τ_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的荧光平均寿命，一般为 10^{-8} s；[Q]为荧光淬灭剂浓度。

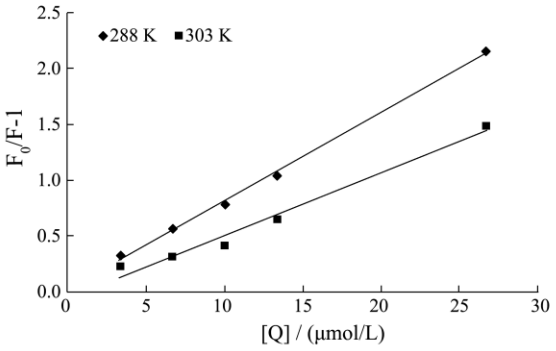


图 4 槲皮素浓度对酪氨酸酶荧光猝灭的影响

Fig.4 Effect of quercetin concentration on the fluorescence quenching of tyrosinase

将槲皮素浓度对 $\frac{F_0}{F}-1$ 作图，结果如图 4 所示。由图 4 可知，$\frac{F_0}{F}-1$ 与[Q]呈良好的线性关系。由此计算的 Stern-Volmer 方程及其猝灭常数 K_{sv} 见表 1。从表 1 可知，随着温度的升高，K_{sv} 减小，可判断槲皮素对酪氨酸酶的荧光猝灭方式属于静态猝灭。

表 1 槲皮素-酪氨酸酶相互作用的 Stern-Volmer 方程参数

Table 1 Parameters of the Stern-Volmer equation for the interaction between tyrosinase and quercetin

T/K	Stern-Volmer 方程	R^2	Ksv/(L/mol)	Kq/(L/mol/s)
288	$\frac{F_0}{F}-1=7.86\times10^4[Q]+0.0361$	0.9977	7.86×10^4	7.86×10^{12}
303	$\frac{F_0}{F}-1=5.59\times10^4[Q]-0.0459$	0.9795	5.59×10^4	5.59×10^{12}

通过式(2)可以得到不同温度下的猝灭常数 Ksv，代入式（3）可求得 288 K、298 K 下对应的 Kq 分别为 7.86×10^{12} 和 5.59×10^{12}，远大于生物分子的最大碰撞扩散速率常数(2.0×10^{10} L/mol/s) [18]，由此可进一步判断，槲皮素对酪氨酸酶的荧光猝灭是由于槲皮素与酪氨酸酶形成了没有荧光或者荧光信号较弱的复合物引起的静态猝灭。

2.2.3 槲皮素与酪氨酸酶的结合常数和结合位点数

为进一步计算槲皮素与酪氨酸酶的结合常数和结合位点，静态猝灭中，假定它们之间有 n 个独立的结合位点，我们描述结合常数与荧光强度、猝灭剂浓度以及结合位点数之间的关系可用式（4）所示的双对数方程：

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)=\log K+n\log[Q] \quad (4)$$

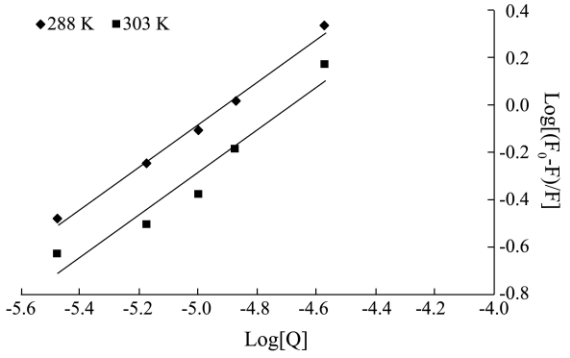


图 5 槲皮素与酪氨酸酶荧光猝灭的双对数图

Fig.5 Double logarithm plot of the fluorescence quenching of tyrosinase by quercetin

在不同温度下，以不同浓度槲皮素相应酪氨酸酶荧光光谱的 log[Q]值对 $\log\frac{F_0-F}{F}$ 作双倒数图，并进行线性回归(图 5)示。由图 5 的直线斜率可得到槲皮素与

酪氨酸酶的结合常数。结果于表 2 所示。由表 2 可知，槲皮素与酪氨酸酶的结合位点数约为 1，表明槲皮素与酪氨酸酶的结合只有一类独立的结合位点[19]。槲皮素与酪氨酸酶的结合常数之所以随着温度的升高而减小，是由于槲皮素对酪氨酸酶的猝灭机理是静态猝灭，温度升高，不利于复合物的稳定，因此结合常数减小。

表 2 槲皮素和酪氨酸酶作用双对数方程参数

Table 2 Parameters of double logarithm for the interaction between tyrosinase and quercetin

T/K	双对数方程	R^2	K_A/(L/mol)	n
288	$\log(\frac{F_0-F}{F})=\log K+0.8933\log[Q]$	0.9929	1.06×10^5	0.8933
303	$\log(\frac{F_0-F}{F})=\log K+0.8956\log[Q]$	0.9362	7.84×10^4	0.8956

2.2.4 槲皮素与酪氨酸酶相互作用力类型

小分子与蛋白质的作用力类型主要包括氢键、范德华力、静电作用力、疏水相互作用等[20]。通过研究槲皮素与酪氨酸酶相互作用的结合自由能(ΔG)、焓变(ΔH)、和熵变(ΔS)等热力学参数可探究作用力类型。温度变化不大时，结合作用的焓变和熵变可以近似看做常数。根据之前求得的 288 K 和 303 K 下得到的结合常数 K_1、K_2 以及公式(5)、(6)求解出各项参数，结果见表 3。

$$\Delta G=-2.303RT\ln K=\Delta H-T\Delta S \quad (5)$$

$$\ln\frac{K_2}{K_1}=(\frac{1}{T_1}-\frac{1}{T_2})\Delta H\cdot\frac{1}{R} \quad (6)$$

注：K 为对应温度下的结合常数，L/mol；R 为气体常数，8.314 J/(mol·K)。

由表 3 可知，在不同温度下自由能均为负值，说明槲皮素-酪氨酸酶相互作用是自发进行的。同时，槲皮素与酪氨酸酶相互作用过程的熵变 ΔS 为正值，这表明二者在相互作用中存在疏水作用，并干扰了酶分子表面的水化补丁的有序排列，引起熵值增加。另外，计算所得体系的焓变(ΔH)为-7.29×10^3 J/mol，负焓变说明槲皮素与酪氨酸酶相互作用时有氢键作用发生[21]。由此可说明槲皮素与酪氨酸酶形成的复合物中，氢键与疏水作用力起着至关重要的作用。

表 3 槲皮素−酪氨酸酶作用体系热力学参数

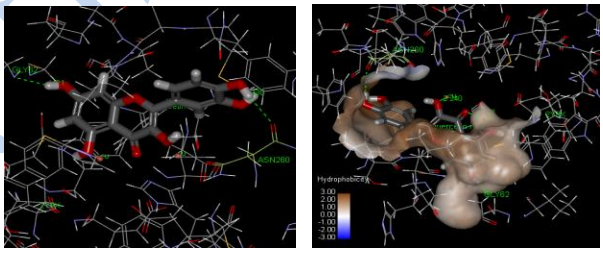
Table 3 Parameters of thermodynamics for the interaction between tyrosinase and quercetin

T/K	ΔH/(J/mol)	ΔS/[J/(mol·K)]	ΔG/(J/mol)
288	-7.294×10^3	196.2	-6.381×10^4
303			-6.538×10^4

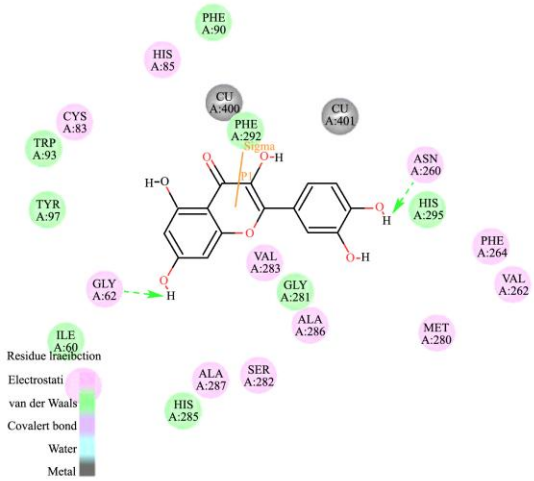
2.3 槲皮素与酪氨酸酶的分子对接

以上通过实验分析了槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用，为进一步从分子水平上理解槲皮素与酪氨酸酶的相互作用模式，采用分子对接技术研究了槲皮素与酪氨酸酶的相互作用问题。

槲皮素与酪氨酸酶的分子对接结果如图 8 所示。图 6(a)、(b)、(c)分别为槲皮素与酪氨酸酶之间的氢键，疏水作用以及相对位置平面投影示意图。由图可知，槲皮素与酶相互作用时，占据了酶中两铜离子[11]附近的活性中心部位，并与酪氨酸酶活性中心的 Asn260，Gly62 形成了氢键（表 4）；同时，疏水作用力对酪氨酸酶与槲皮素的结合也起着重要作用，产生疏水作用的疏水残基包括 Met280、Val283、Phe264、Phe292、Ala286、Phe90。由此可见，槲皮素与酪氨酸酶的作用方式是与底物竞争其活性中心，表明槲皮素对酪氨酸酶为竞争性抑制作用。这与之前的实验结果是相吻合的。



(a) (b)



(c)

图 6 槲皮素、酪氨酸与酪氨酸酶的分子对接

Fig.6 Molecular docking interaction of tyrosinase with quercetin and tyrosine

注：a：槲皮素与酪氨酸酶氢键作用；b：槲皮素与酪氨酸酶疏水作用；c：槲皮素与酪氨酸酶作用平面投影图。

表 4 槲皮素与酪氨酸酶形成的最佳结合构象的氢键信息

Table 4 Hydrogen bonds observed between tyrosinase and the best quercetin pose

quercetin	d(X…Y)	(XHY)
Asn260:O…quercetin:H30	2.357	149.377
Gly62:N…quercetin:H31	2.097	162.516

3 结论

本文通过酶抑制动力学实验、荧光光谱分析以及分子对接技术深入研究了槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用及其机理。研究结果表明：槲皮素以竞争性抑制剂的形式与酪氨酸酶相互作用，抑制常数为 36 mM，且与酪氨酸酶形成了复合物，结合位点数为 1，并以氢键和疏水作用稳定其结构。该研究结论可为酪氨酸酶竞争性抑制剂的分子设计提供有用参考依据。

参考文献

[1] 穆燕,李琳,董方圆,等.对甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制机理[J].华南理工大学学报(自然科学版),2012,40(12):134-137
MU Yan, LI Lin, DONG Fang-yuan, et al. Inhibition Mechanism of 4-Methoxycinnamic Acid to Tyrosinase [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2012, 40(12): 134-137

[2] Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroomtyrosinase:recent prospects [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 2837-2853

[3] Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef V S, et al. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity [J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 405(1): 227-237

[4] Chen Q X, Song K K, Qiu L, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by p-alkoxybenzoic acids [J]. Food Chemistry, 2005, 91(2): 269-274

[5] Shi Y, Chen Q X, Wang Q, et al. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (Agaricus bisporus) tyrosinase [J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 707-712

[6] Arung E T, Kusuma I W, Iskandar Y M, et al. Screening of Indonesian plants for tyrosinase inhibitory activity [J]. Journal of Wood Science, 2005, 51(5): 520-525

[7] 董学艳,姚惠芳,任发政,等.牛血清白蛋白与槲皮素在不同溶剂中相互作用特征及抗氧化性的研究[J].光谱学与光谱分析,2014,34(1):162-166
DONG Xue-hua,YAO Hui-fang, RENG Fa-zheng, et al. Characteristics and antioxidant activity of bovine serumin and qercetin interaction in diffferent solvent systems [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(1): 162-166

[8] 李方.黄酮类有机金属配合物及其生物构效和协同作用的研究[D].成都:四川大学,2004
LI Fang. Study on relation of molecular structure-bioactivity and cooperative action flavonoid coordination complexes [D]. Cheng Du: Sichuan University, 2004

[9] 侯巍,杨铭,赵宏,等.槲皮素与金属元素配合物的制备及抗氧化活性研究[J].微量元素与健康研究,2014,31(1):1-3
HOU Wei, YANG Ming, et al. Study on the preparation and the antioxidant activity of quercetin metal complexes [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2014, 31(1): 1-3

[10] Xie L P, Chen Q X, Huang H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Biochemistry (Moscow), 2003, 68(4): 487-491

[11] Kang S M, Heo S J, Kim K N, et al. Isolation and identification of new compound, 2, 7 ″-phloroglucinol-6, 6′-bieckol from brown algae ecklonia cava and its antioxidant effect [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 158-166

[12] Kim D, Park J, Kim J, et al. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 935-941

[13] Mu Y, Li L, Hu S Q. Molecular inhibitory mechanism of tricin on tyrosinase [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013, 107: 235-240

[14] 马燕燕,鲁晓翔.柿叶黄酮对酪氨酸酶的抑制动力学研究[J].食品科技,2010,9:76-79
MA Yan-yan, NU Xiao-xiang. Inhibitory kinetics of persimmon leaf flavonoids on tyrosinase [J]. Food Science and Technology, 2010, 9: 76-79

[15] Si D, Wang Y, Zhou Y H, et al. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2009, 37(3): 629-634

[16] Ware W R. Oxygenquenching of fluorescence insolution: anexperimental studyof thediffusionprocess [J]. Journal of Physical Chemistry, 1962, 66(3): 455-458

[17] Shaikh S M T, Seetharamappa J, Kandagal P B, et al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin [J]. Dyes and Pigments, 2007, 74(3): 665-671

[18] Cui F L, Fan J, Li J P, et al. Interactions between 1-benzoyl-4-p-chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(1): 151-157

[19] 徐学涛,张瑞瑞,杜志云,等.荧光猝灭法研究单羰基姜黄素衍生物与酪氨酸酶间的相互作用[J].光谱实验室,2011, 28(4):1862-1865
XU Xue-tao, ZHANG Rui-rui, DU Zhi-yun, er al .Interaction between curcumin derivant and tyrosiase by fluorescence quenching method [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(4): 1862-1865

[20] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102

[21] Tian J N, Liu J Q, Xie J P, et al. Bingding of wogonin to human serum albumin acommon binding site of wogonin in subdomain IIA [J]. J Photochem Photoboil B: Biol, 2004, 74: 39-45

现代食品科技