

탄닌화합물의 Tyrosinase 억제 활성

조수민 · 김지현 · 이민원*

중앙대학교 약학대학 생약학교실

Inhibitory Effects of Tannins on Tyrosinase Activity

Su-Min Cho, Jee-Hun Kim and Min-Won Lee*

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract – For the use of tannins in the whitening-effect cosmetics, inhibitory effect against tyrosinase activity was determined. Three condensed tannins including gallo catechin, gallo catechin 3',4'-di-*O*-gallate and epicatechin 3-*O*-gallate and three hydrolyzable tannins, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose, 2,3-(*S*)-HHDP-D-glucose and pedunculagin showed 15-29% mild inhibitory effects against tyrosinase activity.

Key words – tannin, condensed tannin, hydrolyzable tannin, tyrosinase inhibitor.

색소세포 내에서의 멜라닌 생성과정은 초기단계에 key enzyme¹⁻²⁾으로 작용하는 tyrosinase 등의 효소 작용과 중합화 과정의 자동산화반응으로 이루어지며 이러한 효소반응과 자동산화반응은 자외선에 의해 촉진된다.

이와 같이 생성된 멜라닌은 인지질이나 단백질과 결합하여 멜라닌 과립으로 되고, 이것이 그 후 표피 세포인 keratinocyte로 전달되어 표피세포의 각화과정과 함께 피부의 상층으로 이동하고 각질층의 탈락과 함께 피부 밖으로 배출된다. 하지만 자외선에 의해 피부의 노화가 진행되면 melanocyte내 tyrosinase가 활성화되고 melanin 생성이 촉진되어 기미, 주근깨와 같은 색소침착이 일어나게 된다.

이러한 색소침착을 막기 위한 피부미백제 개발에 있어 여러 가지 평가방법들이 쓰이고 있으며, 그 중 tyrosinase 활성 억제 실험이 이용되고 있다³⁻⁴⁾.

한편 탄닌은 항세균⁵⁾, 항바이러스^{6,9)} 및 항산화 활성¹⁰⁾ 등을 나타내며 그 중에서도 효소활성의 저해작용¹¹⁻¹⁷⁾은 탄닌의 중요한 역할로 인식되어지고 있으며 최근 탄닌을 함유한 식물에 대한 tyrosinase 저해효과

가 보고되고 있다¹⁸⁻¹⁹⁾.

본 연구에서는 복분자 딸기(*Rubus coranum*)의 줄기와 잎, 일본산 소엽오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*) 및 인도네시아산 탄닌 자원식물인 *Pithecellobium lobatum* 등에서 분리한 바 있는 3종의 축합형 탄닌인 gallo catechin, (-)-epicatechin 3-*O*-gallate, gallo catechin 3',4'-di-*O*-gallate와 5종의 가수분해성 탄닌인 gallic acid, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose, 2,3-(*S*)-HHDP-D-glucose, pedunculagin, sanguin H-6의 tyrosinase에 대한 억제효과에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

화합물

본 실험에 사용한 화합물은 복분자 딸기(*Rubus coreanum*)의 줄기와 잎²⁰⁻²¹⁾, 일본산 소엽오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*)²²⁾ 및 인도네시아산 탄닌 자원식물인 *Pithecellobium labatum*²³⁾ 등에서 분리한 바 있는 3종의 축합형 탄닌인 gallo catechin (1), gallo catechin 3,4-di-*O*-gallate (2) (-)-epicatechin 3-*O*-gallate (3)과 5종의 가수분해성 탄닌인 gallic acid (4), 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (5), 2,3-(*S*)-HHDP

*교신저자 : Fax : 02-822-9778

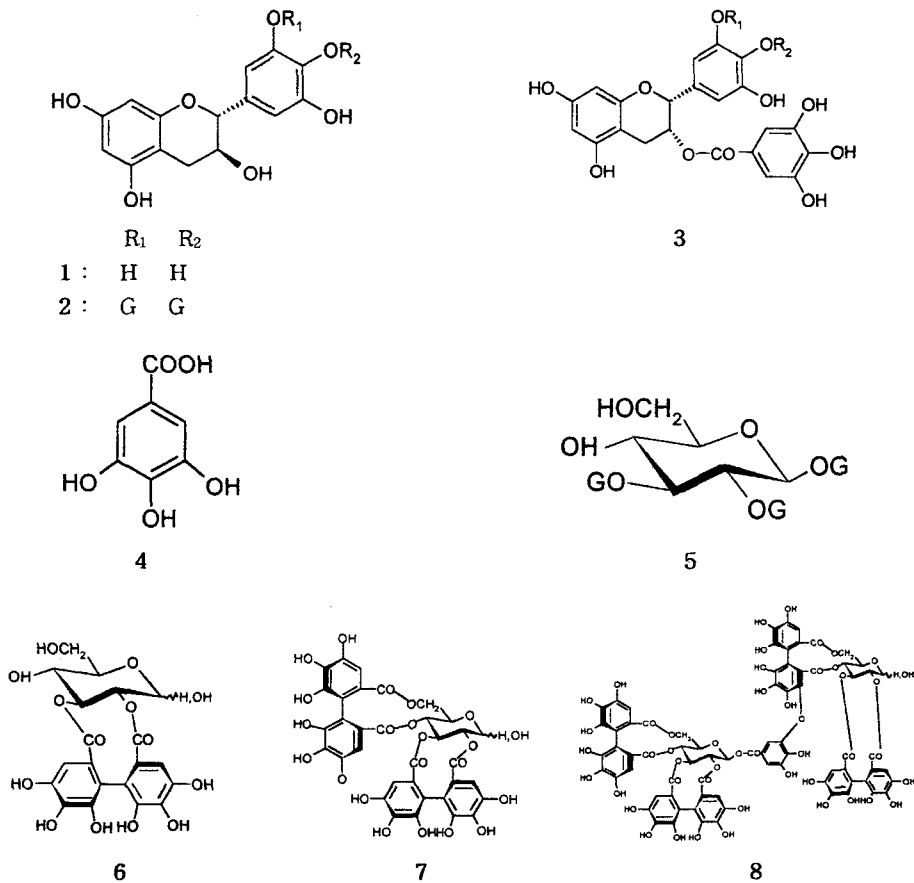


Fig. 1. Structures of compounds 1-8

-D-glucose (6), pedunculagin (7), sanguin H-6 (8) 를 사용하였다(Fig. 1).

시약 및 기기

UV는 Spectrophotometer(UV-VIS TU 1800 PC) 를 사용하였고, tyrosinase 활성시험에 사용된 시약은 mushroom tyrosinase(EC1.14.18.1, Sigma), 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA, Sigma) 등이며 buffer로는 $NaHPO_4$ buffer를 사용하였으며 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

Tyrosinase 활성 억제실험

Tyrosinase 저해활성 측정은 dopa oxidase의 방법²⁴⁾ 을 채택하였다. Dopa oxidase의 활성측정은 dopa를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome이 475 nm에서 흡광도를 나타내는 점을 이용하여 시행한다. 즉 일정한 반응조건에서 생성

된 dopachrome의 양을 흡광도 475 nm로 정량하여 tyrosinase의 활성을 측정하며 시료의 첨가에 의한 activity의 변화를 관찰하여 효소저해 정도를 평가하였다. 반응구는 1/15 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 1.5 ml, 10 mM DOPA 0.3 ml, 200 unit tyrosinase 0.2 ml와 탄닌용액 1.0 ml를 혼합하고 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 1.0 ml 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 ice bath내에서 enzyme의 반응을 정지시키고 spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = 1 - \frac{\text{반응구의 O.D.}}{\text{대조구의 O.D.}} \times 100$$

결과 및 고찰

Tyrosinase 억제제는 피부 melanin 생성을 억제함으로써 피부미백효과를 기대할 수 있다. 현재까지 천연

물로부터 분리된 tyrosinase 활성억제물질로는 iso-flavonoid인 formonetin, phenol glycoside인 arbutin, prenylated flavonoid인 mulberine 및 stilbene 화합물인 oxyresveratrol 등이 알려져 있다. 최근에는 탄닌화합물을 함유하는 생약에 의한 tyrosinase 억제활성¹⁸⁻¹⁹⁾이 보고되고 있어서 탄닌화합물이 미백 및 피부노화 억제활성이 있는 매우 유용한 천연자원이 될 수 있을 것으로 기대된다.

축합형탄닌인 gallocatechin (1), epicatechin 3-O-gallate (2), gallocatechin 3',4'-di-O-gallate (3)와 5종의 가수분해형 탄닌인 gallic acid (4), 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose (5), 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (6), pedunculagin (7), sanguin H-6 (8)의 tyrosinase에 대한 저해활성을 조사하였다. 그 결과 축합형 탄닌 (1-3)에서는 15~33%의 저해효과를 나타내었으며 이 3종의 화합물이 모두 galloyl group을 가지고 있어서 이러한 galloyl group이 활성에 큰 영향을 주는 것으로 판단되었다(Table I).

또한 가수분해형 탄닌에서는 화합물 5, 6, 7 등 galloyl 및 hexahydrodiphenoyl(HHDP)기를 가지고 있는 화합물이 22~29% 정도의 완전한 억제활성을 나타내어 역시 galloyl기 및 HHDP기가 활성에 영향을 주는 주요 요소임을 알 수 있었다(Table II).

한편 gallic acid (4) 및 sanguin H-6 (8)는 효과가 없는 것으로 나타나 가수분해형 탄닌에서는 glucose core가 필요하며 monomer가 tyrosinase 효소활성억제에 효과적인 형태로 판단되었다.

결 론

3종의 축합형 탄닌인 gallocatechin (1), epicatechin 3-O-gallate (2) gallocatechin 3',4'-di-O-gallate (3)과 5종의 가수분해형 탄닌인 gallic acid (4), 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose (5), 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (6), pedunculagin (7), sanguin H-6 (8)의 tyrosinase 효소에 대한 억제활성을 측정된 결과 축합형 탄닌 (1-3)과 일부 가수분해형 탄닌인 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose (5), 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (6), pedunculagin (7)이 15~33%에 이르는 완전한 억제활성을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로그램의 도움을 받아 수행한 결과임.

인용문헌

- Hearing, V. J., Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* **157**: 549-557.
- Prota, G. (1992) Melanin and melanogenesis. Academic Press, New York.
- Shin, N. H., Lee, K. S., Kang, S. H., Min, K. R., Lee, S. H. and Kim, Y. S. (1997) Inhibitory effects of herbal extracts on dopa oxidase activity of tyrosinase. *Natural Product Sciences* **3**(2): 111-121.

Table I. Inhibitory Effects of Condensed Tannins on Tyrosinase Activity

	concentration (μ g/ml)	Absorbance (475 nm)	Inhibition rate (%)
control	-	0.118	-
gallocatechin (1)	100	0.079	33
gallocatechin 3'and 4'-O-gallate (2)	100	0.088	25
epicatechin 3-O-gallate (3)	100	0.100	15

Table II. Inhibitory Effects of Hydrolyzable Tannins on Tyrosinase Activity

	concentration (μ m/ml)	Absorbance (475 nm)	Inhibition rate (%)
control	-	0.097	-
gallic acid (4)	100	>control	(-)
1,2,6-tri-O-galloyl--D-glucose (5)	100	0.084	29
2,3-(S)-HHDP-D-glucose (6)	100	0.076	22
pedunculagin (7)	100	0.071	27
sanguin H-6 (8)	100	>control	(-)

4. Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. (1997) The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* **41**(4): 456-461.
5. Serit, M., Okubo, T., Hagiwara, N., Kim, M. J., Nonaka, G., Nishioka, I. and Yamamoto, T. (1991) Comparative antibacterial activity of quercitol gallates. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1893-1894.
6. Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1985) Structure and anti herpetic activity among the tannins. *Phytochem.* **24**: 2245-2250.
7. Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, I., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bonder, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C. and Lee, K. H. (1990) Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53**: 587-595.
8. Lee, K. H., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E. and Cheng, Y. C. Natural products as antiviral agents, Chu, C. K. and Cutler, H. G.(Eds.). (1992) Tannins and related compounds as ant-HIV agents. *Plenum Press*, New York, 69-90.
9. Fukuchi, K. Sakagami, H., Ikeda, M., Kawazoe, Y., Oh, H. T., Konno, Ichikawa, S., Hata, N. Kondo, H. and Nonoyama, M. (1989) Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res.* **9**: 313-317.
10. Lee, Y. A. and Lee, M. W. (2000) Antioxidative activity of tannins from *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* **44**(4): 354-357.
11. Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1986) Effect of rhatannin on glutamine metabolism in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 2937-2943.
12. Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1988) Mechanism of the enhancing action of rhatannin on hepatic glutamine transamination in rat. *J. Med. Pharm. Soc. for Wakan-Yaku.* **5**: 61-67.
13. Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1985) Inhibition of angiotention-converting enzyme in crude drugs. II. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 264-269.
14. Uchida, S., Ikare, N., Ohta, H., Niwa, M., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M. (1987) Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme. *Japan. J. Pharmacol.* **43**: 242-246.
15. Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P. and Lee, K. H. (1992) Tannins as selective inhibitors of protein kinase C. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2**: 239-244.
16. Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Lee, K. J., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K. F. and Lee, K. H. (1993) Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* **82**: 487-492.
17. Kuramochi, M. A., Kuramochi, H., Kobayashi, F., Ekimoto, H., Takahshi, K., Kadota, S., Takamori, Y. and Kikuchi, T. (1992) Woodfruticosin (woodfordin C), a new inhibitor of DNA topoisomerase II. Experimental antitumor activity. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1961-1965.
18. Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y. and Chung, S. R. (1998) Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji.* **42**(4): 353-358.
19. Kim, J. K., Cha, W. S., Park, J. H., Oh, S. L., Cho, Y. J., Chun, S. S. and Choi, C. (1997) Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**(1): 173-177.
20. Pang, K. C., Kim, M. S. and Lee, M. W. (1996) Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(4): 366-370.
21. Kim, M. S., Pang, K. C. and Lee, M. W. (1996) Tannins from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* **40**(6): 666-669.
22. Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1992) Hirsunin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety, from *Alnu hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry.* **31**(3): 967-970.
23. Lee, M. W., Morimoto, S., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1992) Flavan-3-ol gallates and proanthocyanidins from *Pithellobium lobatum*. *Phytochem.* **31**(6): 2117-2120.
24. Laskin, J. D. and Piccinini L. A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**(35): 16226-16235.

(2001년 2월 9일 접수)