

약용식물 추출물의 Tyrosinase 억제 활성

나민균^a, 최승열^{b, *}, 김동희^b, 김진표^b, 이찬복^b, 김경동^c

^a 한국생명공학연구원, ^b (주)한국신약 자광연구소, ^c (주)한생 화장품

Inhibitory Activity of Medicinal Plant Extracts against Tyrosinase

Min Kyun Na^a, Seung Youl Choi^{b, *}, Dong Hee Kim^b, Jin Pyo Kim^b,
Chan Bok Lee^b, Kyung Dong Kim^c

^a Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
Daejeon 305-333, Korea

^b Jakwang Research Institute, Han Kook Sin Yak Co., Ltd, Nonsan 320-854, Korea

^c Hansaeng Natural Cosmetics Co., Ltd, Daejeon 302-243, Korea

* Correspondence authors: MinKyun Na, Ph.D., or Seung Youl Choi, Oriental M.D.,
Jakwang Research Institute, Han Kook Sin Yak Co., Ltd, Nonsan 320-854, Korea
Tel: +82-41-740-2403
Fax: +82-42-740-2429
E-mail: nmk1010@kribb.re.kr, or meganuga@hanmail.net

ABSTRACT

- ① Objectives: To discover natural skin-lightening agents, we have evaluated the inhibitory activity of EtOH extracts from 20 medicinal plants against mushroom tyrosinase.
- ② Methods: Tyrosinase activity was determined by the dopachrome method using L-tyrosine as the substrates.
- ③ Results: Of the plant extracts tested, the extracts of 4 plants, Albizzia julibrissin, Curcuma longa, Anethum graveolens and Sophora flavescens, exhibited potent inhibitory

activity (> 50%) in mushroom tyrosinase assay. Four plant extract, extracts of *Agrimonia pilosa*, *Paeonia moutan*, *Magnolia obovata* and *Eugenia caryophyllata* also showed relatively strong inhibitory (> 40%) against mushroom tyrosinase.

- ④ Conclusion: These active medicinal plants may be useful for the development of skin-whitening agents. Since the active medicinal plants may contain effective tyrosinase inhibitors even more than kojic acid, further study to identify the active constituents from the plants is expected.

피부의 색소 침착은 멜라닌(melanin) 합성 세포인 멜라노사이트(melanocytes)에서 과잉으로 생성되는 멜라닌 때문인 것으로 알려져 있다.¹⁾ 멜라닌은 L-tyrosine이 hydroxylation 반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenylalanine (L-DOPA)으로 전환되고, 이것이 다시 phenylalanine-3,4-quinone (dopaquinone)으로 산화된 후 dopachrome, indole-5,6-quinone 등의 여러 중간체를 거쳐 합성된다.¹⁾ 이와 같은 멜라닌의 합성 과정에서 tyrosinase는 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydrolase로서의 역할 뿐만 아니라, dopa를 산화시켜 결국 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로써 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다.¹⁾ 따라서 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서 멜라닌 중합체 합성을 저해할 수 있다고 여겨지므로, 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 평가 방법으로 인식되고 있다.¹⁻¹³⁾

최근 생활수준이 향상됨에 따라 천연 성분에 관한 선호도가 높아져 천연물을 이용한 많은 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성 억제 물질로는 누룩곰팡이로부터 분리된 kojic acid, 우바우르시에서 분리된 arbutin, 상백피에서 분리된 oxyresveratrol 등이 있으며, 이 외에도 여러 가지 stilbenes, chalcones, flavonoids 등의 천연 성분이 tyrosinase 억제 활성을 나타내는 것으로 보고되었다.¹⁻⁸⁾ 특히, kojic acid와 arbutin은 현재 피부 미백 화장품의 원료로 상용화 되고 있다. 식물 추출물으로써는 고삼, 상백피, 작약, 고본, 백급, 빈랑자, 감초, 속수자 등이 활성이 있는 것으로 보고되었다.⁷⁻¹³⁾ 이와 같이, 많은 식물은 여러 가지 피부 미백 활성 성분을 함유하고 있는 중요한 자원이 될 수 있다. 따라서, 식물에 대한 tyrosinase 억제 활성 검색은 피부 미백제 개발을 위해 가치가 있을 것으로 사료된다. 대부분의 약용식물은 오래 전부터 이용되었기 때문에 그 안전성이 입증되었고, 자원 확보 또한 용이하므로 피부 미백제 개발 시 상용화에 적합하다고 판단하였다. 이에 대한 기초 자료로서 본 실험에서는 국내에서 유통되는 20여 종의 생약 에탄올 (EtOH) 추출물에 대하여 tyrosinase 억제 활성을 조사하였다.

1. 재료 및 방법

식물 재료 - 본 실험에 사용한 생약은 (주)한국신약에서 구입하여 감정한 것을 사용하였으며, 확증표본은 (주)한국신약 자광연구소 생약실험실에 보관되어 있다. 건조된 추출물을 DMSO에 녹인 후 완충용액에 희석하여 stock solution을 제조하였다. 각각의 실험에서 DMSO 1%는 결과에 영향이 없었으므로, DMSO의 최종농도가 1% 이하가 되도록 stock solution을 희석하여 스크리닝 시험에 사용하였다.

시약 및 기기 - Mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1), L-tyrosine, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 및 kojic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였으며, 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 흡광도 (optical density, OD) 측정은 VERSAmax microplate reader (Molecular Devices Co., USA)를 사용하였다.

추출 및 시료의 제조 - 건조된 생약 재료를 적당히 세절한 후 EtOH을 넣고 실온에서 2주간 추출하였다. 여과한 후 추출액 일부를 microcentrifuge tube에 넣고 완전히 농축하여 용매를 제거한 다음 추출물의 무게를 측정하였다. 건조된 추출물에 DMSO를 넣어 최종농도가 100 g/ml이 되도록 하여 tyrosinase 억제 활성 검색에 사용하였다.

Tyrosinase 억제 활성 측정 - Tyrosinase 활성은 L-tyrosine을 기질로 하여 생성되는 반응산물인 dopachrome을 이용하여 분광학적 방법으로 측정하였다.⁵⁹⁾ 즉, 96 well microplate에 시료 10 l, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM L-tyrosinase를 넣은 다음, mushroom tyrosinase (100 units) 10 l를 첨가하여 최종 volume을 210 l로 맞추었다. 이때 대조구는 시료 대신 같은 양의 DMSO (1%) 용액을 넣은 것으로 하였다. 25°C에서 30분간 반응 시킨 후 생성된 dopachrome의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 정량하였다. 효소 억제 활성은 다음과 같이 %로 나타내었는데, 여기에서 Acontrol은 대조구의 흡광도를, Atest는 시료의 흡광도를 나타낸다.

$$\text{Tyrosinase 억제 활성 (\%)} = (\text{Acontrol} - \text{Atest}) / \text{Acontrol} \times 100$$

II. 결과 및 고찰

Tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정 중 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydrolase와, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로써 작용함으로써 결과적으로 멜라닌을 합성하는데 중요한 역할을 하는 효소로 작용한다.¹⁾ 따라서, tyrosinase 억제제는 멜라닌 생성을 억제함으로써 피부 미백효과를 기대할 수 있다.¹⁻¹³⁾ 이에 근거하여 본 연구에서는 20여 종의 약용식물 추출물을 대상으로 tyrosinase 억제 활성을 측정하였다. 각각의 약용식물을 EtOH로 추출한 후 반응계에서 추출물의 최종농도를 100 g/ml로 처리하였을 경우, 합환피 (*Albizia julibrissin*), 울금 (*Curcuma longa*), 소회향 (*Anethum graveolens*) 및 고삼 (*Sophora flavescens*) 등이 각각 58.1, 52.9, 51.0 및 52.2 %의 강한 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다 (Table 1). 고삼 (*S. flavescens*)의 tyrosinase 억제 효과는 resorcinol 기를 갖고 있는 flavonoids 성분에 기인하는 것으로 보고되었지만,^{7, 8)} 나머지 합환피 (*A. julibrissin*), 울금 (*C. longa*) 및 소회향 (*A. graveolens*)의 활성 성분에 관한 보고는 아직 없다. 그러므로, 앞으로 이들 약용식물에 대한 tyrosinase 억제 활성 성분 연구가 이루어져야 할 것이다. 특히, 합환피의 활성에 관해서는 본 연구에서 처음 밝혀졌다. 비록 saponins과 flavonoids를 비롯한 몇 가지 화합물들이 합환피의 성분으로 분리되었지만,¹⁴⁻¹⁶⁾ 아직까지 이들 성분에 대한 tyrosinase 억제 활성은 연구되지 않았기 때문에 이 생약에 대한 연구가 우선적으로 진행될 예정이다. 이 외에도 용아초 (*Agrimonia pilosa*), 목단피 (*Paeonia moutan*), 후박 (*Magnolia obovata*) 및 정향 (*Eugenia caryophyllata*) 등이 각각 45.8, 45.5, 42.1 및 40.1%의 상대적으로 강한 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다 (Table 1). 그 외 12 종의 생약은 40% 이하의 약한 활성을 나타내었다. 이것과 비교하여 positive control로 사용했던 kojic acid는 같은 농도에서 90.1%의 tyrosinase 활성을 억제하였다 (Table 1). 추출물 자체의 tyrosinase에 대한 억제 활성은 kojic acid보다 낮을지라도, Son 및 Kim 등의 보고^{7, 8)}에서 알 수 있듯이 그 추출물에 함유된 성분은 kojic acid보다 강력한 활성을 나타낼 수 있으므로, 50% 이상 강한 억제 활성을 나타낸 합환피 (*A. julibrissin*), 울금 (*C. longa*), 소회향 (*A. graveolens*) 및 고삼 (*S. flavescens*)은 물론, 40% 이상 상대적으로 강한 억제 활성을 나타낸 용아초 (*A. pilosa*), 목단피 (*P. moutan*), 후박 (*M. obovata*) 및 정향 (*E. caryophyllata*) 등에 대해서도 활성 성분 연구가 이루어진다면 활성이 강한 천연 미백제를 개발 할 수 있으리라 기대된다.

Table 1. Inhibitory activity of the medicinal plant extracts against mushroom tyrosinase

Crude drug	Botanical name	Family name	Used part	Inhibition (%)
용아초	<i>Agrimonia pilosa</i>	Rosaceae	Wp	45.8
함환피	<i>Albizzia julibrissin</i>	Leguminosae	Sb	58.1
택사	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	Alismataceae	Rh	10.6
소회향	<i>Anethum graveolens</i>	Umbelliferae	Fr	51.0
참취	<i>Aster scaber</i>	Compositae	Ap	20.5
계피	<i>Cinamomum cassia</i>	Lauraceae	Sb	30.2
자형목(피)	<i>Cercis chinensis</i>	Leguminosae	St, Sb	31.0
위령선	<i>Clematis mandshurica</i>	Ranunculaceae	R	15.1
울금	<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rh	52.9
관중	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Aspidiaceae	Rh	30.4
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Myrtaceae	Fl	40.1
연교	<i>Forsythia suspensa</i>	Oleaceae	Fr	25.5
용담	<i>Gentiana scabra</i>	Gentianaceae	R	13.6
후박	<i>Magnolia obovata</i>	Magnoliaceae	Sb	42.1
목단피	<i>Paeonia moutan</i>	Paeoniaceae	Rb	45.5
반하	<i>Pinellia ternata</i>	Araceae	Tb	21.8
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Campanulaceae	R	22.3
석류	<i>Punica granatum</i>	Punicaceae	Fr	20.6
고삼	<i>Sophora flavescens</i>	Leguminosae	R	52.2
산초	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	Rutaceae	Fr	15.2
	Kojic acid			90.1

Tyrosinase activity was determined by the dopachrome method using L-tyrosine as the substrates.

- a) Each MeOH extract of plant was treated at 100 g/ml as the final concentration.

- b) Ap: aerial part, Fl: flower, Fr: fruit, L: leaf, R: root, Rb: root bark, Rh: rhizome, Sb: stem bark, St: stem, Tb: tuber, Wp: whole plant.
- c) The values represent the mean standard deviation of three independent experiments.

III. 결론

천연 미백제 개발을 위한 기초 자료로써 20여 종의 약용식물 추출물을 대상으로 tyrosinase 억제 활성을 측정할 결과, 합환피 (*A. julibrissin*), 울금 (*C. longa*), 소회향 (*A. graveolens*) 및 고삼 (*S. flavescens*) 등이 50% 이상의 강한 tyrosinase 억제 활성을 나타내었으며, 그 다음으로 용아초 (*A. pilosa*), 목단피 (*P. moutan*), 후박 (*M. obovata*) 및 정향 (*E. caryophyllata*) 등도 40% 이상의 상대적으로 강한 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다. 그러므로, 앞으로 이들 약용 식물에 대한 tyrosinase 억제 활성 성분 연구가 이루어진다면 활성이 강한 천연 미백제를 개발 할 수 있으리라 기대된다.

IV. 참고 문헌

- 1) Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51: 2837-53.
- 2) Shimizu K, Kondo R, Sakai K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: Structure-activity investigations. *Planta Med.* 2000;66: 11-5.
- 3) Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998;243: 801-3.
- 4) Nerya O, Musa R, Khatib S, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry.* 2004;65: 1389-95.
- 5) Kubo I, Kinst-Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Snchez Y, Ogura T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and

- structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 2000;8: 1749-55.
- 6) No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 1999;65: 241-6.
 - 7) Son JK, Park JS, Kim JA, Kim Y, Chung SR, Lee SH. Prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* with tyrosinase inhibitory activity. *Planta Med.* 2003;69: 559-61.
 - 8) Kim SJ, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 2003;26: 1348-50.
 - 9) Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 2002;82: 155-8.
 - 10) Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003;67: 631-4.
 - 11) Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrane and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from Licorice Roots. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51: 1201-7.
 - 12) Park JH, Shin YG, Shin UK, Baek SK, Lee SK, Chung MH, Park YI. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji.* 1997;41: 518-23.
 - 13) Choi SS, Noh HS, Cho SH, Kong KH. Screening of inhibitors against tyrosinase activity from natural products. *Yakhak Hoeji.* 2001;45: 522-8.
 - 14) Ikeda T, Kajimoto T, Nohara T, Kinjo J, Wong CH. Preparation of a neoglycolipid carrying the oligosaccharide component of saponin from *Albizzia julibrissin*. *Tetrahedron Lett.* 1995;36: 1509-10.
 - 15) Une HD, Sarveiya VP, Pal SC, Kasture VS, Kasture SB. Nootropic and anxiolytic activity of saponins of *Albizzia lebeck* leaves. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001;69: 439-44.
 - 16) Jung MJ, Kang SS, Jung HA, Kim GJ, Chio JS. Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizzia julibrissin*. *Arch. Pharm. Res.* 2004;27: 593-9.