

HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TYROSINASE CỦA HỢP CHẤT AXIT *o*-COUMARIC

Lê Hoàng Trâm, Trần Thị Hồng Hạnh, Châu Văn Minh, Nguyễn Tiến Đạt\*

Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 18-12-2012

## Abstract

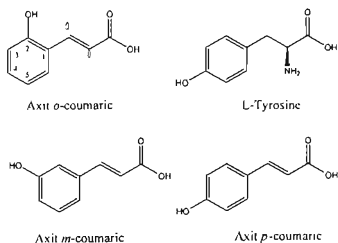
The compound *o*-coumaric acid showed inhibitory effect against tyrosinase activity with the  $IC_{50}$  of 2.8 mM. Enzyme kinetics analysis indicated that *o*-coumaric acid inhibited tyrosinase by a mixed type. The inhibition constant  $K_i$  of *o*-coumaric acid was determined to be 1.3 mM.

**Keywords:** *o*-Coumaric acid, tyrosinase inhibition, enzyme kinetics.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tyrosinase còn được gọi là polyphenol oxidase (PPO), là một enzyme được tìm thấy trong vi sinh vật, động vật và thực vật. Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành melanin, một chất màu có mặt trong hầu hết sinh vật. Melanin chính là một trong những thành phần chính của sắc tố da, có vai trò bảo vệ da khỏi tia tử ngoại và các chất oxy hoá. Tuy nhiên khi melanin được sản sinh và tích tụ quá nhiều ở da dẫn đến hiện tượng da bị sạm màu, rối loạn sắc tố. Việc ức chế sự hoạt động của enzyme tyrosinase là điểm mấu chốt để ngăn ngừa quá trình sạm màu da và rối loạn sắc tố [1]. Người ta đã phát hiện ra nhiều chất ức chế tyrosinase gồm các hoạt chất từ thiên nhiên cũng như tổng hợp, tuy nhiên trong sản phẩm mỹ phẩm người ta ưu tiên các hoạt chất có nguồn gốc thiên nhiên do an toàn đối với con người. Một số hợp chất thiên nhiên có tác dụng ức chế mạnh tyrosinase có thể liệt kê như axit kojic, quercetin, kaempferol, oxysresveratrol, chloropirin, aloesin, trilineolein, axit arjunilic, physcion, lyoni-resinol... [1, 2]. Hợp chất axit *o*-coumaric (OCA) đã được nhóm nghiên cứu chúng tôi phân lập từ dịch chiết metanol cây mần tưới *Eupatorium fortunei* [3]. Hợp chất này được biết có khả năng cải thiện béo phì do ức chế enzyme glucerol-3-phosphate dehydrogenase, loại bỏ tác hại của chất gây ung thư, ức chế các triglyceride nội bào nhằm phát hiện biểu hiện của rối loạn trao đổi chất [4]. Về mặt hoá học, axit *o*-coumaric là đồng phân của axit *p*-coumaric và axit *m*-coumaric (hình 1), hai hợp chất này đã được chứng minh có khả năng ức

chế enzyme tyrosinase [5, 6]. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính ức chế và động học ức chế enzyme tyrosinase của hợp chất axit *o*-coumaric.



Hình 1: Cấu trúc hoá học của các hợp chất axit *o*-, *m*-, *p*-coumaric và L-tyrosine

## 2. THỰC NGHIỆM

## 2.1. Thiết bị và hóa chất

Hợp chất axit *o*-coumaric được phân lập trước đây từ cây mần tưới, đạt độ sạch  $\geq 95\%$  theo HPLC [3]. Enzyme tyrosinase, L-tyrosine, hydroquinone được cung cấp từ hãng Sigma-Aldrich. Mật độ quang được đo bằng máy đọc x-Mark<sup>TM</sup> Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Mỹ).

## 2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase

Hoạt tính ức chế tyrosinase được đánh giá theo phương pháp đã được mô tả trước đó [6]. Phương pháp này sử dụng phiên 96-giếng, trong mỗi giếng chứa mẫu nghiên cứu (2  $\mu$ L) pha trong DMSO ở các nồng độ khác nhau được ủ với 80  $\mu$ L dung dịch 0,2 mM L-tyrosine pha trong đệm phot-phát (pH 7,0) trong 5 phút sau đó bổ sung 20  $\mu$ L tyrosinase (nồng độ 1000 U/ml, pha trong đệm phot-phát). Hỗn hợp được lắc đều rồi ủ tiếp trong 30 phút ở 37°C. Mật độ quang của các giếng được đo ở bước sóng 490 nm. Hydroquinon được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = (C - A)/(B - A) \times 100$$

Trong đó:

*A* là mật độ quang trung bình của mẫu chứng dương (không có mẫu nghiên cứu, có tyrosinase; trường hợp này coi như giá trị ức chế 0%);

*B* là mật độ quang trung bình của mẫu trắng (không có mẫu nghiên cứu và tyrosinase; trường hợp này coi như giá trị ức chế 100%);

*C* là mật độ quang trung bình của mẫu thử

## 2.3. Đánh giá động học của axit *o*-coumaric trong hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase

Động học ức chế enzyme tyrosinase của axit *o*-coumaric được xác định dựa vào hoạt tính chuyển hoá L-tyrosine ở các nồng độ khác nhau 2, 3, 4, 5, 6 và 10 mM của enzyme tyrosinase khi có và không có mặt axit *o*-coumaric (1, 2,5 và 5 mM). Kiểu ức chế và hằng số ức chế  $K_i$  được đánh giá dựa vào đồ thị Lineweaver-Burk và đồ thị Dixon [7]

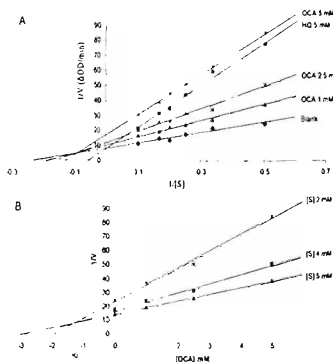
## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính ức chế tyrosinase được xác định thông qua khả năng chuyển hoá L-tyrosine nhờ enzyme tyrosinase. Hợp chất axit *o*-coumaric có tác dụng ức chế tyrosinase mạnh hơn so với đối chứng dương hydroquinone (HQ) là một hoạt chất sử dụng rất nhiều trong các dược phẩm, mỹ phẩm làm trắng da (bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính ức chế tyrosinase của OCA

Mẫu	IC <sub>50</sub> (mM)	K <sub>i</sub>	Cơ chế
OCA	2,8	1,3	Ức chế hỗn hợp
Hydroquinon	3,1		

Để xác định kiểu ức chế của OCA, tác dụng ức chế tyrosinase của OCA ở dải nồng độ 0, 1, 2,5 và 5 mM được xác định khi sử dụng dãy nồng độ cơ chất tyrosine 2, 3, 4, 5, 6 và 10 mM. Đồ thị Lineweaver-Burk biểu thị mối tương quan giữa tốc độ phản ứng và nồng độ cơ chất (hình 2A) cho thấy đây là kiểu ức chế hỗn hợp. Kết quả này cũng tương đồng với công bố trước đó về tác dụng ức chế kiểu hỗn hợp của hai đồng phân axit *m*- và *p*-coumaric [5, 6]. Điều này có thể giải thích dựa vào cấu trúc hoá học của các hợp chất này tương tự với cấu trúc của cơ chất L-tyrosine (hình 1). Khi đó các axit này có khả năng cạnh tranh với cơ chất khi liên kết vào tâm hoạt động của enzyme hoặc liên kết vào tâm hoạt động của phức enzyme-cơ chất [8]. Dựa vào đồ thị Dixon biểu diễn mối quan hệ giữa tốc độ phản ứng và nồng độ chất ức chế (hình 2B), hằng số ức chế tyrosinase K<sub>i</sub> của OCA được xác định bằng 1,3 mM.



Hình 2: Đồ thị Lineweaver-Burk (A) và đồ thị Dixon (B) biểu thị động học ức chế của hợp chất axit *o*-coumaric (OCA)

## 4. KẾT LUẬN

Hợp chất axit *o*-coumaric thể hiện tác dụng ức chế hoạt tính tyrosinase theo cơ chế hỗn hợp với giá trị IC<sub>50</sub> là 2,8 mM và K<sub>i</sub> là 1,3 mM. Kết quả này tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm ứng dụng hợp chất axit *o*-coumaric cũng như cây mần tưới vào việc điều trị các bệnh nám da và rối loạn sắc tố.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim YJ and Uyama H. *Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources. structure, inhibition mechanism and perspective for the future*, Cell. Mol. Life Sci., **62**, 1707-1723 (2005).
2. Chang TS. *An update review of tyrosinase inhibitors*, Int. J. Mol. Sci., **10**, 2440-2475 (2009).
3. Trần Hồng Hạnh, Nguyễn Trường Tuấn, Đan Thị Thủy Hằng, Châu Văn Minh, Trần Huy Thái, Nguyễn Tiến Đạt. *Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học của cây mần tưới (Eupatorium fortunei Turcz.)*, Tạp chí Hóa học, **49(2ABC)**, 264-266 (2011).
4. Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. *Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats*, J. Agric. Food Chem., **57**, 425-431 (2009).
5. JY. Lim, K. Ishiguro, I. Kubo. *Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves*, Phytother. Res. **13**, 371-375 (1999).
6. Cabanes J, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F, Iborra JL, Lozano JA. *Kinetic study on the slow inhibition of epidermis tyrosinase by m-coumaric acid*, Biochim. Biophys. Acta **790**, 101-110 (1984).
7. Li ZC, Chen LH, Yu XJ, Hu YH, Song KK, Zhou XW, Chen QX. *Inhibition Kinetics of Chlorobenzaldehyde Thiosemicarbazones on Mushroom Tyrosinase*, J. Agric. Food Chem., **58**, 12537-12540 (2010).
8. An SM, Koh JS, Boo YC. *p-Coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB*, Phytother. Res., **24**, 1175-1180 (2010).

Liên hệ: Nguyễn Tiến Đạt

Viện Hoá sinh biển,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Email: ngtiend@hotmail.com.