

솔잎에서 분리된 항산화 물질인
4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 멜라닌 생성 억제
작용

부용출, 전체옥, 오지연, 김은정, 이병곤
((주) 태평양 기술 연구원)

Anti-melanogenesis effect of
4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone, an antioxidant
isolated from pine needles

Yong-Chool Boo, Che-Ok Jeon, Ji-Yeon Oh, Eun-Joung Kim,
and Byeong-gon Lee
(Pacific R & D Center)

요 약

솔잎으로부터 프리 라디칼 소거 작용이 있는 물질을 분리하고, 여러 기기 분석 결과에 근거하여 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone (HMF)으로 동정하였다. 이 물질의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 프리 라디칼에 대한 소거 작용이 공지의 항산화 물질인 α -tocopherol, ascorbic acid와 유사하였다. HMF는 흰쥐 간 microsome분획에서 Fe(II)/ascorbate에 의해 유도된 지질 과산화를 억제하였으며, 배양 fibroblast 세포에서 자외선에 대한 보호효과를 나타내었다. 이 물질은 또한 tyrosine의 효소적 산화와 Dopa의 자동 산화를 억제하였을 뿐만 아니라 배양 murine melanoma 세포에서도 강력한 멜라닌 생성 억제 작용을 보였다. 피부 세포에서의 멜라닌 생성이 산화적 스트레스에 의해 유발되고 또 효소, 비효소적인 산화 반응을 통해 진행된다고 볼 때, HMF는 이러한 각 단계에서 항산화제로 작용하여 궁극적으로 세포에서의 멜라닌 생성을 막는 것으로 추론되었다.

1. 서 론

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하여 세포 생존율을 평가하였다(13).

6. Tyrosine의 효소적 산화에 대한 억제 작용

0.1mg/ml의 tyrosine, 70units/ml의 mushroom tyrosinase와 시료를 함유한 50mM 인산 완충액(pH 6.8) 1.5ml를 37°C에서 10분간 반응시키고 475nm에서 흡광도를 측정하였다(14).

7. Dopa의 자동 산화에 대한 억제 작용

500µM의 3,4-dihydroxyphenylalanine(Dopa)과 여러 농도의 시료를 함유한 50mM 인산 완충액(pH 6.8) 2.0ml를 37°C에서 48시간 동안 정치한 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다(15).

8. 세포의 멜라닌 생성에 대한 억제 작용

Murine melanoma cell을 10% fetal calf serum을 함유한 EMEM 배지에서 배양하면서 실험에 사용하였다. 이 배지 30ml를 함유한 T flask에 세포를 5×10^4 cells/flask가 되게 심고 시료를 첨가한 후 5% CO₂, 37°C에서 2일간 배양하였다. 배양 후 trypsin을 처리하고 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포의 흑화 정도를 육안으로 평가하고 사진을 촬영하였다.

3. 결과 및 고찰

활성 산소는 정상적인 세포 대사 과정(16), 약물 대사 과정(17), 허혈 재관류(18), 염증(19), 자외선(20)등에 의해 세포내에서 지속적으로 생성되며 따라서 생체는 이들에 의하여 일어나는 프리 라디칼 반응의 유해 효과에 항상 노출되어 있다. 특히 세포의 연령 증가에 따라 이들의 유해 효과가 점진적으로 축적되어 각종 노화 관련 질환을 유발할 수 있는 것으로 알려지고 있다(21,22,23). 결과적으로 활성 산소에 의한 생체내 프리 라디칼 반응을 억제시켜 줄 수 있는 항산화 물질은 노화 관련 질환에 대응하는 적절한 도구로 보아지고 있으며 이러한 관점에서의 연구들이 진행되고 있다(2,3).

지질 과산화의 연쇄 반응 등에 관여하는 산화성 프리 라디칼을 소거함으로써

또는 환원력에 의해 항산화 작용을 하는 물질을 검색함에 있어서, DPPH 프리 라디칼이 이용될 수 있다(4,11,24). 이 라디칼은 환원되어 hydrazine의 형태로 되면서 탈색되며 516nm에서의 흡광도 감소로 이를 측정할 수 있다. 슬임의 50% 수용성 에탄올 추출물은 ascorbic acid와 α -tocopherol에 비해 다소 높은 농도에서 프리 라디칼을 소거하는 것으로 나타났다(Table 1). 프리 라디칼 소거 작용이 높게 나타난 50% 에탄올 추출물에 대해서는 용매 분획과 액체 크로마토그래피를 순차적 실시하여 그 유효 성분으로 compound-A를 분리하였다.

Compound-A(mp 120-121°C)는 원소 분석 결과 그 화학식이 $C_5H_6O_3$ (분자량 114.0317)인 것으로 추정되었으며 고해상 MS스펙트럼에서 이를 확인하였다(m/z, 114.0311, M^+). IR스펙트럼에서 O-H, C-H, C=O, C=C기가 존재함을 추정할 수 있었다(ν_{max} cm^{-1} : 3190, 2953, 1698, 1639) 1H -NMR 스펙트럼에서 3종의 서로 다른 화학적 환경에 놓인 수소들의 존재를 알 수 있었으며(δ , ppm: 2.11(3H, s), 4.51(2H, s), 8.31(1H, s)) 중수 치환 실험에서 8.31ppm의 피크가 소실됨이 관찰되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 5종류의 탄소의 존재가 확인되었고(δ , ppm: 13.12, 72.58, 134.56, 173.03, 195.48), 이들 탄소와 수소들 간의 coupling 양상으로 보아 13.12ppm과 72.58ppm에 해당하는 탄소는 각각 methyl, methylene기의 형태로 존재함을 알 수 있었다. 이상의 기기 분석 결과에 근거하여 이 화합물은 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone(HMF)으로 동정되었다(Figure 1).

이 화합물은 몇몇 종의 식물체에서도 드물게 발견되며(25) 당류와 아미노산류의 Maillard반응에 의해서도 합성되는 것으로 알려져 있는 물질로서(26), 식품용 향료로 사용하고자 시도되어온 물질이다. 이 화합물의 DPPH라디칼에 대한 소거 작용(100 μ M의 DPPH의 50%를 환원시키는데 필요한 농도, SC_{50} =3.0 μ g/ml)은 α -tocopherol, ascorbic acid와 유사하였다(Table 1).

HMF는 흰쥐 간 조직의 microsome분획에서 Fe(II)/ascorbate계로 유도시킨 지질 과산화를 잘 억제하였다(Figure 2). 산소 존재하에서 Fe(II)/ascorbate계는 cyclic Fenton type반응을 일으키면서 각종 활성 산소를 발생시키고(27) 이들이 여러 산화 반응을 야기하는 것으로 보아지고 있다. 따라서 HMF는 활성 산소를 소거함으로써 지질 과산화 반응을 억제하는 것으로 사료된다. 물론 지질 과산화의 연쇄 반응에 관여하는 peroxy 라디칼을 소거함에 의해서도 항산화 작용을 보였을 수도 있다.

이 물질은 또 200ppm이하의 농도에서 배양된 human fibroblasts 세포의 자외선(UVA와 UVB)에 의한 치사를 농도 의존적으로 막아주었다(Figure 3). 그 방어 기전을 밝히기 위해서는 연구가 더 진행되어야 하겠지만 일단 자외선에 의한 광역학적 반응에서 생성되는 활성 산소(28), 그리고 이로 부터 유래한 각종 프리 라디칼을 소거하는 항산화 작용이 그 주된 기전으로 추정하고 있다. 또한 이 물질의 자외부 흡수 작용도 일부 관여하였을 것으로 보아진다.

한편, 멜라닌 생성 과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합 반응이다. 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 하며, 이 효소의

작용으로 생성되는 중간체인 Dopa quinone은 불안정하여 Dopa chrome을 거쳐 멜라닌 색소로 산화 중합되게 된다. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화 반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보아지고 있다. 실제로 kojic acid, arbutin 등의 물질은 tyrosinase 저해 작용과 항산화 작용에 의해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고된 바 있다(29).

HMF가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 먼저 tyrosinase 효소에 의한 tyrosine의 산화에 대한 영향을 조사한 결과 HMF(50% 억제 농도, 즉 $IC_{50}=70\mu\text{g/ml}$)는 kojic acid($IC_{50}=15\mu\text{g/ml}$)보다는 약하지만 arbutin($IC_{50}=600\mu\text{g/ml}$)보다는 매우 강력한 억제 작용을 나타냄을 알 수 있었다(Figure 4). 뿐만 아니라 이 물질은 Dopa의 자동 산화를 강력하게 억제하였으며(Figure 5, $IC_{50}=60\mu\text{g/ml}$) 이는 kojic acid($IC_{50}=170\mu\text{g/ml}$)보다 매우 강력한 것이다. 반면 arbutin은 이 자동 산화를 오히려 다소 촉진하는 것으로 나타났는데 이러한 현상은 다른 연구자들에 의해서도 관찰된 바 있다(30).

HMF는 배양 murine melanoma 세포에서 kojic acid 보다도 훨씬 강력하게 멜라닌의 생성을 억제하는 것으로 관찰되었다(Figure 6). Tyrosinase에 의한 멜라닌 생성에 대한 영향에 있어서 kojic acid보다 그 억제 작용이 상대적으로 약한 HMF가 세포 수준에서는 오히려 더 강력한 멜라닌 생성 억제 작용을 보였다는 사실은 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 또 다른 인자가 있음을 시사하는 것으로 사료된다(9). 본 연구자들은 HMF가 프리 라디칼 소거 능력이 뛰어나고, 자외선에 대한 세포 보호 작용을 보여줌을 감안하여 이 물질은 세포가 감내해야하는 산화적 스트레스를 경감함으로써 그러한 작용을 보이는 것으로 추정하고 있다(31). 즉 세포에서의 멜라닌 생성이 자외선 등 산화적 스트레스에 대응하기 위한 방어 기구이고, HMF는 이 원인적 스트레스를 경감시킴으로써 멜라닌 생성의 필요성을 감소시키는 것으로 보는 것이다. 여하튼 본 연구의 결과는 항산화 효과가 있는 물질이 세포 수준에서 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 보여 주었다.

본 연구의 결과로 솔잎 추출물은 산화성 프리 라디칼에 대한 강력한 소거 작용이 있고, 그 유효 성분 중 하나가 HMF임을 알 수 있었다. 또 이 물질이 자외선에 의한 세포의 치사를 현저하게 막아주고 또한 세포에서의 멜라닌 생성을 강력히 억제함을 알 수 있었다. 본 연구자들은 향후 이 화합물의 응용을 위한 연구들을 계속할 계획이다.

ABSTRACT

An antioxidative compound was isolated from pine needles. This compound was identified as 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone on the basis of spectroscopic

evidences. It scavenged 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals more efficiently than maltol and tocopherol did. It exhibited an inhibitory effect on the lipid peroxidation of rat liver microsome induced by Fe(II)/ascorbate, and the protective effect against UV cytotoxicity in cultured human fibroblasts. In addition, HMF appeared to prevent the cellular melanogenesis in the cultured murine melanoma cells, more effectively than kojic acid, a well known inhibitor of melanogenesis, while the former was not so effective as the latter for the inhibition of the tyrosinase. Considering that cellular melanogenesis is a metabolic process triggered by oxidative stress, it was tentatively deduced that the antioxidative property of HMF may afford the effect against cellular pigmentation by alleviating the causative stress. This study provided a novel inhibitor of melanogenesis, that might be useful for the cosmetic applications.

참고 문헌

1. Larson, R. A., *Phytochemistry* 27 (4), 969 (1988)
2. Lettron, P., G. Labbe, C. Degott, A. Berson, B. Fromenty, M. Delaforge, D. Larrey and D. Pessayre, *Biochem. Pharmacol.* 39, 2027 (1990)
3. Masuda, T., A. Jitoe, J. Isobe, N. Nakatani and S. Yonemori, *Phytochemistry* 32 (6), 1557 (1993)
4. Boo, Y. C. and C. O. Jeon, *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 36 (5), 326 (1993)
5. 김완희 최신 동의 보감, p. 960, 태평양출판공사, 서울, 한국(1983)
6. 백태홍, 이민수, 이준홍, 한국유화학회지. 4 (2), 25 (1987)
7. Ravel, S., *J. invest. Dermatol.* 100 (2), 162S (1993)
8. Black, H. S., *Photochem. Photobiol.* 46 (2), 213 (1987)
9. Coyne, V. E. and L. Al-Harthi, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9), 2861 (1992)
10. Rodriguez-Lopez, J. N., J. Tudela, R. Varon, F. Garcia-Carmona and F. Garcia-Canovas, *J. Biol. Chem.* 267 (6), 3801 (1992)
11. Fujita, Y., I. Uehara, Y. Morimoto, M. Nakashima, T. Hatano and T. Okuda, *Yakugaku zasshi* 108 (2), 129 (1988)
12. Bidlack, W. R. and A. L. Tappel, *Lipids* 8, 177 (1983)
13. Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, 63, 55 (1983)
14. Mason, W. S. and E. W. Peterson, *Biochem. Biophys. Acta*, 111, 134 (1965)
15. Joshi, P. C., C. Carraro and M. A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142 (1), 265 (1987)
16. Fridovich, I., *Science* 201, 875 (1978)
17. Trush, M. A., E. G. Mimnaugh and T. E. Gram, *Biochem. Pharmacol.* 31, 3335 (1982)
18. Simpson, P. J. and B. R. Lucchesi, *J. Lab. Clin. Med.*, 110 (1), 13 (1987)
19. Fantone, J. C. and P. A. Ward, *Ann. J. Path.*, 107, 397 (1982)
20. Tyrell, R. M. *Oxidative stress* (edited by H. Sies), Academic press, New York, 57 (1991)
21. Lunec, J., *Ann. Clin. Biochem.* 27, 173 (1990)
22. Halliwell, B. and M. Grootveld, *FEBS LETTERS*, 213 (1), 9 (1987)
23. Ames, B. N., *Basic Life Sci.* 39, 7 (1982)
24. Smith, R. C., J. C. Reeves, R. C. Dage and R. A. Schnettler, *Biochem. Pharmacol.* 36, 1457 (1987)
25. Idstein, H. and P. Schreier, *J. Agric. Food Chem.* 33, 138 (1985)
26. Heibl, J., F. Ledl and T. Severin, *J. Agric. Food Chem.* 35, 990 (1987)

27. Wong, S.F., B. Halliwell and R. Richmond, *J. Inorg. Biochem.* 14, 127 (1981)
28. Tyrell, R.M. and M. Pidoux, *Photochem. Photobiol.* 49 (4), 407 (1989)
29. Akiu, S. and M. Kukuda, *Fragrance J.* 6, 29 (1992)
30. Matsuda, H., S. Nakamura, H. Shiimoto, T. Tanaka and M. Kubo, *YAKUGAKU ZASSHI* 112 (3), 276 (1992)
31. Karg, E., G. Oth, A. Wittbjer, E. Rosengren and H. Rorsman, *J. invest. Dermatol.* 100(2), 209S(1993)

Table 1. Scavenging effect against DPPH free radicals¹⁾

materials	SC ₅₀ (μg/ml)
ascorbic acid	3.3
α-tocopherol	9.5
pine needle extract ²⁾	16
compound-A	3.0

1)The ethanolic solution of 100μM of DPPH free radicals with the addition of test materials was kept at 37°C for 30min, and then the absorbance was measured at 516nm. SC₅₀ denotes the concentration of the material which is required to scavenge 50% of 100μM DPPH radicals. 2)The 50% aqueous ethanol extract of dried pine needles.

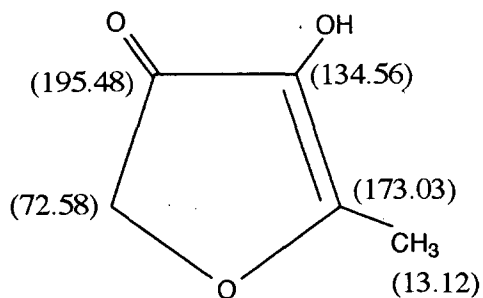


Figure 1. Structure of compound-A isolated from pine needles. The chemical shifts of NMR carbon signals are shown in parentheses.

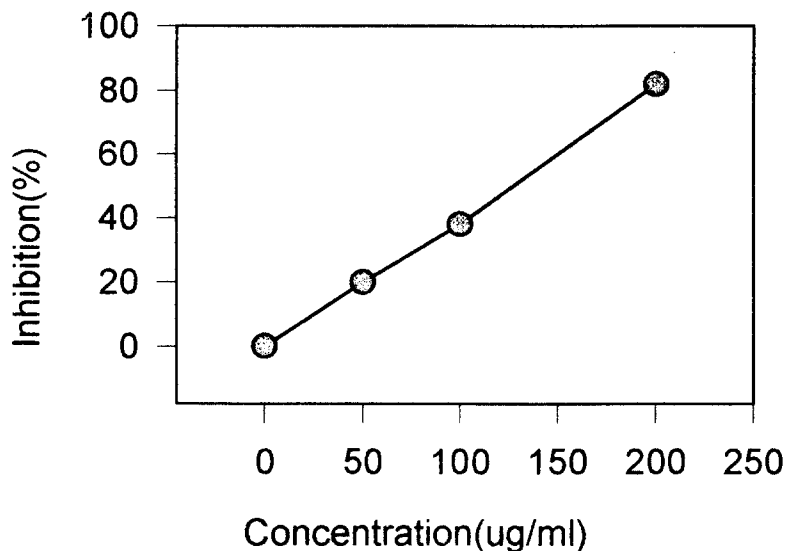


Figure 2. Inhibitory effect of HMF on the lipid peroxidation of rat liver microsome induced by Fe(II)/ascorbate. The reaction mixture(2.0ml) containing 1mg protein/ml microsome, 10uM FeSO₄, 0.1mM ascorbate and 50mM Tris-Cl(pH 7.4) in the absence and presence of HMF at various concentrations was incubated for 24 hours at 37°C. Then the lipid peroxidation was measured as the level of MDA by thiobarbituric acid method.

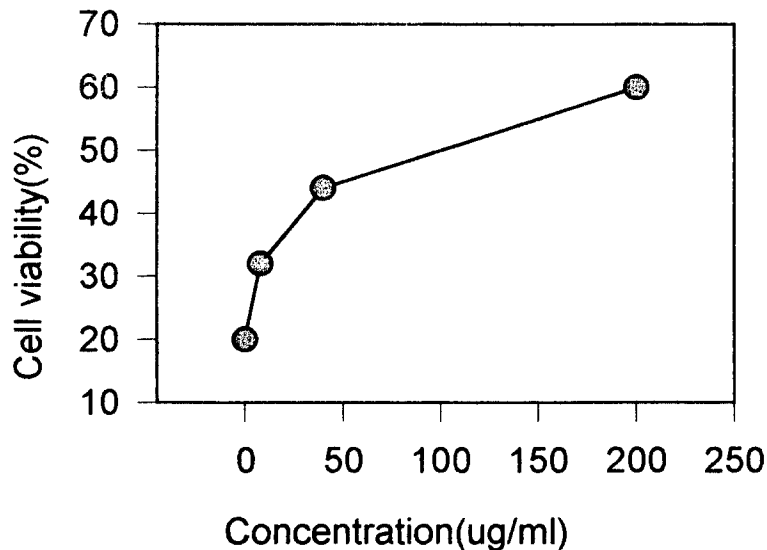


Figure 3. Protective effect of HMF against the UV cytotoxicity in human fibroblasts. The cells washed and dispersed in PBS containing each test compound, was kept for 30min and exposed to the UV radiation for 38min(fluence, UVA 7J/cm², UVB 1.8J/cm²). Then the cells were further cultured in EMEM medium for 24 hours to evaluate the viability by the MTT method

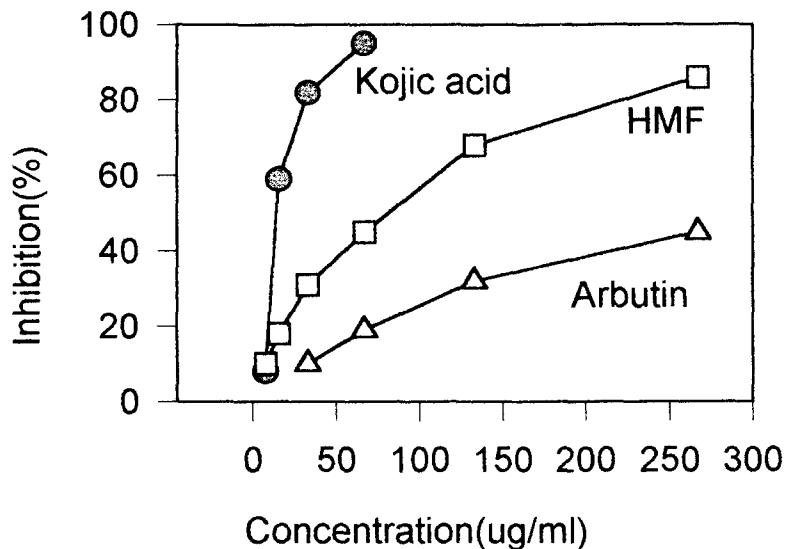


Figure 4. Effect against the tyrosinase-catalyzed oxidation of tyrosine. The reaction mixture containing 0.1mg/ml tyrosine, 70units/ml tyrosinase and 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.8) was incubated at 37°C for 10 min and the absorbance was measured at 475nm.

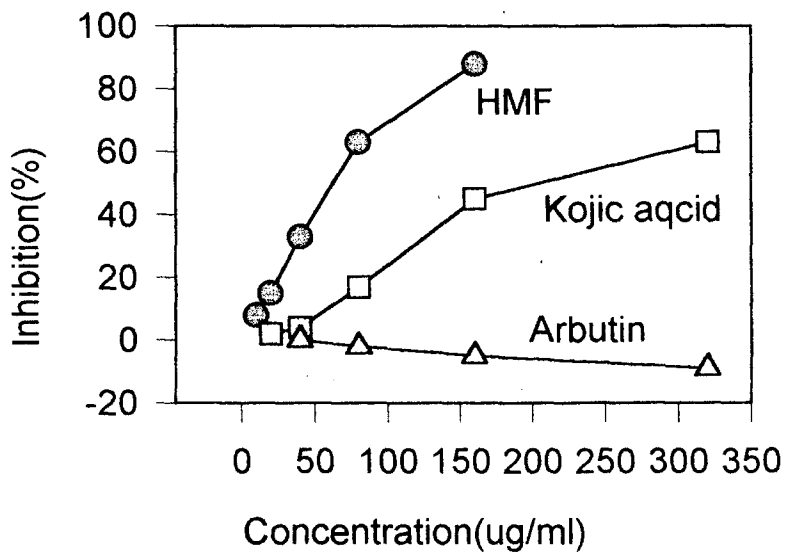


Figure 5. Antioxidative activity against the Dopa autoxidation. The reaction mixture(2.0ml) containing 500μM Dopa and 50mM potassium phosphate(pH 6.8) in the presence of each compound at various concentrations was incubated for 48 hours at 37°C, and then the absorbance at 475nm was measured.

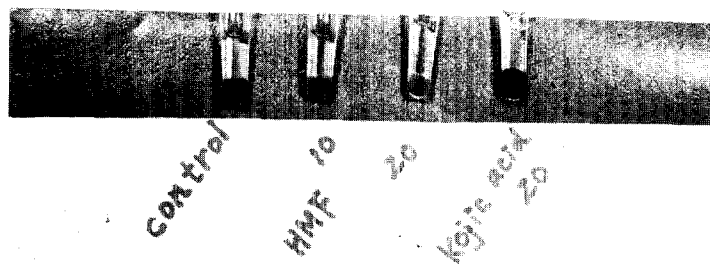


Figure 6. Effect of HMF and kojic acid on the melanogenesis in the cultured murine melanoma cells. The cells were cultured in an EMEM medium for 48 hours in the absence and presence of each compound, and harvested after trypsinization. The numerics are treated concentration($\mu\text{g/ml}$).