약학회지 제42권 제4호 353~358(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 4

목단피로부터 멜라닌 생성 억제성분의 분리

이승호# · 박지수 · 김소영 · 김진준 · 정시련
영남대학교 약학대학

(Received May 2, 1998)

Isolation of Inhibitory Components on Tyrosinase Activity from the Bark of *Paeonia moutan*

Seung-Ho Lee, Ji Soo Park, So Young Kim,
Jin Joon Kim and See Ryun Chung
College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract - The MeOH extract of the bark of Paeonia moutan showed potent inhibitory effect on the mushroom tyrosinase activity in vitro. The activity-guided fractionation of the MeOH extract resulted in the isolation of three active compounds. The chemical structures of these compounds were elucidated by chemical and spectroscopic evidence as catechin, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose and 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose, respectively. Among them, the inhibitory activity by 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β -D-glucose on mushroom tyrosinase was more potent (IC_{50}=3.5 μM) than that of kojic acid (IC_{50}=8.7 μM), but catechin enhanced the mushroom tyrosinase activity 50% in the concentration of 34.5 M.

Keywords *Paeonia moutan*, catechin, galloyl glucose, tyrosinase, melanin polymer, skin-whitening agent, cosmetics.

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리우는 색소세포내의 melanosome에서 생합성된다. 즉 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다. 활성화된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 항진되어 이를 표피밖으로 운반 배출하게 된다.[1,2] Tyrosinase는 피부melanin 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하는데 있어서 key enzyme으로 작용한다. 그러므로 tyrosine 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제실험은 유용한 일차평가법으로 인정되고 있다.[3,4]

저자 등은 피부 멜라닌 생성억제제 개발을 최종 목표로 하여, tyrosinase에 대하여 억제활성을 갖는 물질을 천연물로부터 개발할 목적으로, 문헌 등에서 미백효과가 있는 것으로 소개되고 있는 전통한약과 전국 각지에서 무작위로 채집한 고등식물을 확보하였고, 이들의 MeOH 추출물에 대하여 tyrosinase 활성 억제효과를 탐색 보고한 바 있다.[5,6] 그 결과 목단피(Moutan Cortex Radicis)의 ethyl acetate 분획이 강한 억제효과(IC_{50}(10 μg/ml)를 나타내어, 이 시료로부터 활성물질을 추적 단리하였기에 보고하고자 한다. 목단피는 모란(Paeonia moutan, Paeoniaceae)의 근피로, 외면은 암갈색-암적색이고 가로로 작은 타원형의 곁뿌리 자국이 있으며 세로주름이 있다.[7] 성분으로는 oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoyloxypaeoniflorin 등이 분리 보고되었으며, 70% MeOH 엑스는 항염

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2818 (팩스) 053-811-3871

증작용, 항알레르기 작용과, 실험적 혈전증에 대하여 혈소판 수의 감소, fibrinogen 양의 감소, prothrombin 시간의 연장과 ADP양의 증가에 대하여 개선작용이 있다고 보고되고 있다.[8] 한방에서는 淸熱, 凉血, 和血, 消瘀 등의 효능이 있고, 吐血, 鼻血, 筮垂炎初期, 血帶, 經閉, 月經腹痛, 高血壓의 치료에 응용하고, 催眠, 鎭痛, 降壓, 抗菌作用 등이 보고되고 있다.[9]

재료 및 방법

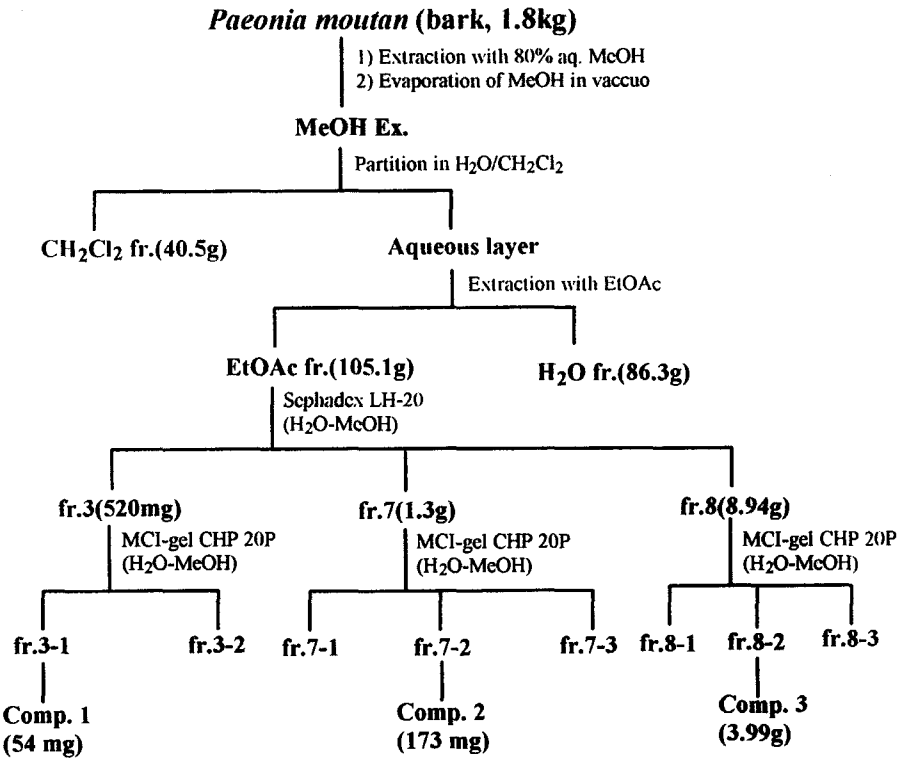
재료, 기기 및 시약 – 실험에 사용한 목단피는 대구시내 약국에서 구입하였고, 전문가의 감정을 거쳐 사용하였으며 표본은 본 실험실에 보관하고 있다.

융점은 Fisher-Johns사의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-100(digital polarimeter)를 사용하였다. UV는 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였고, HPLC는 Shimadzu의 LC-10A를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec SF-160을 사용하였으며, ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR spectrum은 Bruker ARX 300(300 MHz)를 사용하였고, chemical shift value는 trimethyl silane(TMS)를 내부 표준물질로 하여 part per million(ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F_{254}(Merck) 및 RP-18(Wattman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silicagel(70~230 mesh, Merck), Sephadex LH-20(25~100 , Sigma), MCI-gel CHP 20P(75~150 μ, Mitsubishi Chem. Co), RP-18(40~63 μ, Merck), Toyopearl HW-40F (Toso) 등을 사용하였다. 발색시약으로는 1% ethanolic ferric chloride 용액, anisaldehyde 황산 용액, vanillin 황산 용액, 10% 황산 용액 등을 사용하였다. Tyrosinase 활성시험에 사용된 시약은 mushroom tyrosinase(EC1.14.18.1, Sigma), L-tyrosine(Sigma), 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA, Sigma) 등이며, buffer로는 $NaHPO_4$ buffer를 사용하였다.

추출 및 분리 – 목단피 1.8 kg을 80% MeOH로 상온에서 일주일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 한데 모아 감압 농축하였다. MeOH 추출물을 2L의 증류수에 현탁시키고 동량의 dichloromethane을 가하여 3회반복 추출하여 dichloromethane 분획(40.5 g)을 얻었다. 나머지 물층을 ethyl acetate로 3회반복 추출하여 ethyl acetate 분획(105.1 g)을 얻고, 나머지를 물분획(86.3 g)으로 하였다. 각각의 분획에 대하여 tyrosinase에 대한 억제활성을 다시 검토하여 ethyl acetate 분획에서 활성을 확인하고 활성물질의 분리를 시도하였다. Ethyl acetate 분획 15g을 Sephadex LH-20 column (5 cm×42 cm)에 loading 하고, 용출액을 TLC로 추적하면서 MeOH : H_2O=1:1부터 시작하여 6:4, 7:3, 8:2, MeOH : Me_2CO=1:1, Me_2CO의 순으로 용출시켜 Fr. 1-Fr. 8로 분획하였다. 각각의 분획에 대하여 tyrosinase 활성억제 실험을 실시하여 negative 활성을 나타낸 Fr. 3과 positive 활성을 나타낸 Fr. 7, Fr. 8에 대하여 scheme에 나타낸 바와 같이 분리를 계속하였다. 즉 Fr. 3(520 mg)과 Fr. 7(1.3 g)을 각각 MCI-gel CHP 20P column(H_2O-MeOH=1:0→0:1) 및 HP-LC(Shim-pak prep ODS column 20 mm×250 mm, Shimadzu, flow rate 6ml/Min, 50% MeOH)로 정제하여 Fr. 3으로부터 화합물 1(54 mg), Fr.7로부터 화합물 2(173 mg)을 얻었다. Fr. 8(8.94 g)을 MCI-gel CHP 20P(H_2O-MeOH=1:0→0:1)로 분획하여 Fr. 8-1, 8-2, 8-3을 얻고, Fr. 8-2로부터 무정형 분말의 형태로 화합물 3(3.99 g)을 얻었다(Scheme 1).

Tyrosinase활성 억제실험 – Tyrosinase는 두가지 기능(tyrosine hydroxylase, dopa oxidase)이 있으므로 assay 방법도 두가지가 있다. 그러나 tyrosine hydroxylase의 assay는 3H-labled tyrosine을 이용하므로 실험에 제약이 따르기 때문에 본 연구에서는 dopa oxidase의 방법을 채택하였다.[10] Dopaoxidase의 활성측정은 dopa를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome이 475 nm에서 흡광도를 나타내는 점을 이용하여 시행한다. 즉, 일정한 반응조건에서 생성된 dopachrome의 양을 A475로 정량해서 tyrosinase의 활성을 측정하며 시료의 첨가에 의한 activity의 변화를 관찰하여 효소 활성저해 정도를 평가하였다.

구체적으로는 반응액에 L-tyrosine 900 μl, L-dopa 90 μl, 시료용액(0, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml)을 가한다. Sample은 MeOH-H_2O(1:1)에 용해시키고 MeOH에 의한 enzyme 저해효과를 보정하기 위하여 측정하고자 하는 sample용액의 volume에 해당하는 MeOH-H_2O(1:1)용액을 가하여 control로 한다. 각 반응액은 전체 volume이 1890 μl가 되도록 Sod. phos-



Scheme I — The isolation of active compounds from the bark of Paeonia moutan.

phate buffer(PH 6.8)를 가하고 tyrosinase 900 μl를 가한다. 이때 blank에는 enzyme용액 대신 buffer 900 μl를 넣어준다. 반응액을 37°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 ice bath내에서 enzyme의 반응을 정지시키고 spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해율은 아래와 같이 계산하고, enzyme의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC_{50} value로 한다.

$$\text{저해율}(\%) = \frac{\text{Control의 } A_{475} - \text{시료용액이 첨가된 것의 } A_{475}}{\text{Control의 } A_{475}} \times 100$$

화합물 1 - 회백색무정형분말(H_2O), mp. 175~177°, $[\alpha]_D^{25}$ -16°(c, 0.5 in MeOH), ^{1}H-NMR (acetone-d_6, 300 MHz, ppm) : 2.52(1H, *dd*, *J*=8.5, 16Hz, H-4), 2.91(1H, dd, *J*=5, 16Hz, H-4), 3.98 (2H in total, brs, H-3, 3-OH), 4.56(1H, d, *J*=8Hz, H-2), 5.88(1H, d, *J*=2Hz, H-6), 6.02(1H, d, *J*=2Hz, H-8), 6.77(1H, dd, *J*=2, 8Hz, H-6′), 6.78(1H, d, *J*=8Hz, H-5′), 6.90(1H, d, *J*=2Hz, H-2′), 8.05 (4H in total, brs, D_2O exchangeable, 7, 5, 3′, 4′-OH). ^{13}C-NMR(acetone-d_6, 75 MHz, ppm) : 28.7 (C-4), 68.2(C-3), 82.6(C-2), 95.3(C-8), 96.0(C-6), 100.5(C-10), 115.1(C-2′), 115.6(C-5′), 120.0(C-6′), 132.0(C-1′), 145.5(C-4′), 145.6(C-3′), 156.8(C-7), 157.1(C-5), 157.6(C-9).

화합물 2 - 무색침정(H_2O), mp. 198~200°, $[\alpha]_D^{20}$ +32.8°(c, 0.9 in Me_2CO), ^{1}H-NMR(acetone-d_6, 300 MHz, ppm) : 4.61(1H, brs, glc-6), 5.49(1H, t, *J*=8Hz, glc-2), 5.68(1H, t, *J*=8Hz, glc-3), 6.18(1H, *d*, *J*=8Hz, glc-1), 7.00, 7.07, 7.08, 7.18(each 2H, s, galloyl H).

화합물 2의 산가수분해 - Compound 2(15 mg)을 H_2O-MeOH(1:1) 1 ml에 녹인 후 50% HCl 5 방울을 가하여 80°C에서 30분간 reflux 시켰다. 반응액에 동량의 물을 가하여 methanol을 농축 제거한 뒤 ethyl acetate로 분획하였다. 물분획으로부터 D-glucose를, ethyl acetate 분획으로부터 gallic acid를 표품과 co-TLC를 실시하여 확인하였다.

화합물 3 - 회백색무정형분말(H_2O), mp. $[\alpha]_D^{20}$

+18.0°(c, 0.8, Me_2CO), ^{1}H-NMR(acetone-d_6, 300 MHz, ppm) : 4.56(1H, d, J=12Hz, glc-6), 5.63 (1H, t, J=8Hz, glc-2), 5.67(1H, t, J=8Hz, glc-4), 6.03(1H, t, J=8Hz, glc-3), 6.34(1H, d, J=8Hz, glc-1), 6.98, 7.02, 7.07, 7.11, 7.17(each 2H, s, galloyl H).

결과 및 고찰

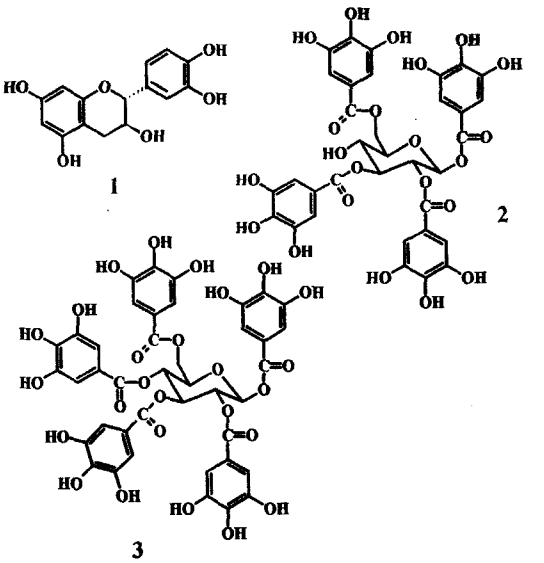
목단피로부터 피부 melanin 생합성에서 key enzyme으로 작용하는 tyrosinase 활성을 억제하거나 증가시키는 작용을 나타내는 물질을 3종 단리하였다.

화합물 1은 담황색 분말로 얻어졌으며 anisaldehyde 시액에 의하여 오렌지색으로, $FeCl_3$/ethanol 용액에 의하여 청록색으로 발색된다. ^{1}H-NMR spectrum의 aliphatic field에서는 δ2.51, δ2.91에 methylene proton signals가 관찰되고 이들은 각각 δ3.98의 methine proton signal과 coupling 하고 있다. 또 이 methine proton signal은 δ4.56의 methine proton signal과 coupling하고 있어, -CH2-CH(O)-CH(O)-의 부분구조가 예상된다. Aromatic field에서는 δ5.88, δ6.02에 서로 *m*-coupling 하고 있는 1H분의 doublet이 관찰되고, δ6.77~6.90사이에 ABX type의 3H분의 aromatic proton signal이 관찰된다. ^{13}C-NMR spectrum에서는 aliphatic field에서 한 개의 methylene signal(δ28.7), 2개의 oxygen bearing methine signal(δ68.2, 82.6)이 관찰되고, 5개의 sp^2 methine carbon signal(δ95.3, δ96.0, δ115.1, δ115.6, δ120.0) 및 sp^2 quarternary carbon signal(δ100.5, δ132.0, 145.5, δ145.6, δ156.8, δ157.1 157.6)이 관찰된다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 1은 flavan-3-ol을 골격으로 하는 catechine으로 추정하였다. 2, 3위의 configuration은 선광도, ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR spectrum data를 문헌치와 비교하여 (+)-catechine으로 결정하였다.[11]

화합물 2는 무색침상정으로 $FeCl_3$/ethanol 용액에 청색으로 정색하였다. 1H-NMR spectrum의 aliphatic field에서는 저자장 shift한 anomeric proton signal(δ6.18, J=8Hz)을 포함하여 모두 7H분의 proton signal이 관찰되고, aromatic field에서는 δ7.00~7.18에서 각각 2H분의 singlet이 4개 관찰된다. 따라서 본 화합물은 tetra galloyl hexose 임을 추정할 수 있으며, 산으로 가수분해 하여 gallic acid와 함께 D-glucose를 얻음으로서 tetragalloyl glucose 임을 알 수 있다. Galloyl기의 결합위치는 ^{1}H-NMR spectrum에서 저자장 shift하여 관찰되는 δ6.18, δ5.68, δ5.49, δ4.61의 위치로 추정할 수 있고, 이들 signal의 coupling pattern을 고찰한 결과 glucose의 1, 2, 3, 6 위치로 결정되었다. 또 anomeric center의 배위는 proton signal의 coupling constant가 8Hz로 큰 것으로 보아 위로 결정하였다. 이상의 spectal data 및 가수분해의 결과를 종합하여 화합물 2는 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose[12]라고 결론짓고, 표품과 co-TLC 및 각종 spectral data를 직접 비교하여 확인하였다. 화합물 3은 담갈색 무정형분말로 $FeCl_3$/ethanol 용액에 청색으로 발색한다. ^{1}H-NMR spectrum의 aliphatic field에서는 7H분의 methine 및 methylene signal이 저자장 shift하여 관찰되고, aromatic field에서는 δ6.98, δ7.02, δ7.07, δ7.11, δ7.17에서 각각 2H분의 signal이 관찰되어 5개의 galloyl group이 존재하는 것을 예상할 수 있다. 화합물 2에서와 같이 가수분해 하여 gallic acid와 glucose가 생성되는 것으로 보아 penta galloyl glucose로 추정되며, anomeric center의 배위는 anomeric proton signal의 coupling constant(J=8Hz)로부터 β위로 결론짓고 표품과 co-TLC 및 각종 spectral data를 직접 비교하여 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose[13]로 동정하였다.

Tyrosinase의 활성을 억제하는 천연물에 관한 연구로는 감초로부터 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol 등이, 상백피로부터 oxyresveratrol 등이 분리되어 보고되었고,[14] Shimazu[15] 등이 *Artocarpus incisus*로부터 분자내에 catechol 핵을 가진 7종의 phenolic compound를 분리 보고하였다. Shirota[16] 등은 *Alphinia oxyphilla*로부터 ferulic acid, curcumin등 10종의 vanillyl compound를 분리하고 aromatic ring에 α, β-unsaturated carbonyl conjugation이 tyrosinase 활성저해에 중요한 역할을 한다고 보고하였고, Misasa[17] 등은 *Albatrellus confluens*로부터 tyrosinase 활성저해물질로 farnesyl group이 결합된 catechol 유도체인 neogrifolin, grifolin을 분리 보고하였다. 목단피로부터 분리된 3종의 화합물은 모두 탄닌계열의 화합물로, 화합물 1은 분자내에 catechol 핵을 가진 축합형탄닌이고, 화합물 2와 3은 가수분해형 탄닌이다. 이들의 tyrosinase에

Table I — Inhibitory effects of active compounds



Compound Name	IC_{50} value (μM)*
Kojic acid	8.7
Catechin	-34.5
1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-β-D-glucose	3.5
1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose	48.9

* Values represent the concentration required for a 50% decrease (+) or increase (−) of the tyrosinase activity.

대한 활성저해효과를 kojic acid를 대조군으로 하여 Table I에 나타내었다. 화합물 1은 34.5 μM 농도에서 오히려 tyrosinase의 활성을 control에 비하여 50% 증가시켰으며, 화합물 2는 IC_{50}가 3.5 μM로 대조약물인 kojic acid 보다 강한 활성 억제효과를 보였다. Tyrosinase에 대하여 positive 활성과 negative활성을 갖는 화합물이 동일식물체내에서 단리되었다. 화합물 1은 분자내에 catechol 구조를 가진 화합물로, 이제까지 알려진 tyrosinase 활성억제 효과를 가진 천연물들의 활성이 분자내의 catechol 부분과 관련이 있다는 주장과 비교하여 흥미있다고 할 수 있다. 또 화합물 2와 3의 구조가 glucose 모핵에 결합된 galloyl group의 숫자가 하나밖에 차이나지 않는 매우 유사한 구조를 하고 있는데 비하여 활성에 있어서는 약 15배의 큰 차이를 보이는 점도 구조-활성 상관관계에 있어서 흥미롭다.

결 론

목단피의 MeOH 추출물로부터 tyrosinase의 활성에 영향을 주는 물질을 3종 단리하여 구조를 구명하고, 활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 분리된 화합물은 각종 spectral data의 해석 및 화학반응의 결과를 종합 검토하여 각각 catechin, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D- glucose로 동정하였다.

2. Catechin은 tyrosinase에 대하여 활성을 증가시켰으며, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose는 대조약물인 kojic acid 보다 2배 높은 억제활성을 나타내었다.

3. 목단피에는 tyrosinase에 대하여 활성을 증가시키는 물질과 활성을 억제하는 물질이 공존하므로 피부 멜라닌의 생성과 관련하여 멜라닌생성 억제제 혹은 촉진제로 개발될 가능성을 제시하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) 小磯一郎 : 最近のメラニン抑制劑と美白化粧品の開發, *Fragrance Journal* **1990**(6), 29 (1990).
2) 三島豊, 芝田孝一 : メラニン色素生成のメカニズムとその抑制, *Fragrance Journal* **1990**(6), 29 (1990).
3) Prota G. : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.* **75**, 122 (1990).
4) Pavel S., Muskiet F. A. : Eumelanin(precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report, *Cancer Detection and Prevention* **6**, 311 (1980).
5) 이승호, 박지수, 김소영, 김진준, 정시련 : 고등식물로부터 피부멜라닌 생성에 관여 하는 티로시나제 활성 억제물질의 탐색, 약학회지 **41**(4), 456 (1997).
6) Shin N., Lee K. S., Kang S., Min K. R., Lee S.-H. and Kim Y. : Inhibitory effects of herbal extracts on DOPA oxidase activity of tyrosinase, *Natural Product Sciences* **3**(2), 111 (1997).
7) 생약학연구회 : 현대생약학, 학창사, 서울 (1995).
8) Kubo M., Nagao T., Matsuda H., Tani T., Arichi S. and Kitagawa I. : Studies on Moutan Cortex

IX. 藥學雜誌, **105**(1) 26 (1986).
9) 金在吉, 肖培根 : 東洋傳統藥物原色圖鑑, 영림사, 서울 (1995).
10) Laskin J. D. and Piccinini L. A. : Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma, *J. Biol. Chem*, **261**(35), 16626 (1986).
11) Foo L. Y. and Porter L. J. : Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **I**, 1535 (1983).
12) Haddock E. A., Gupta R. K., Al-Shafi M. K., Haslam E. and Magnolata D. : The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **I**, 1535 (1983).
13) Nonaka G. I., Ishimatsu M., Tanaka T., Nishioka I., Nishizawa M. and Yamagishi T. : Tannins and related compounds LVIII. Novel gallotannins possessing α-glucose core from *Nuphar japonicum, Chem. Pharm. Bull*, **35**(8), 3127 (1987).
14) 池田孝夫, 堤龍彦 : 生藥の機能と美白效果, *Fragrance Journal* **90**(6), 59 (1990).
15) Shimizu K., Kondo R. Sakai K. and Sato H. : The tyrosinase inhibitory components from *Artocarpus incisus*. Proceeding of International Symposium of Natural Products, Tokyo, 257p (1997).
16) Shibata S., Miyazaki K., Aiyama R. and Ichioka M. : Tyrosinase inhibitors from crude drugs, *Biol. Pharm. Bull*, **17**(2), 266 (1994).
17) Misasa H., Matsui H., Uehara H., Tanaka H., Ishihara M. and Shibata H. : Tyrosinase inhibitors from *Albatrellus confluens, Biosci. Biotech. Biochem*, **56**(10), 1660 (1992).