

박태기나무의 잎으로부터 피부멜라닌 색소생성 억제성분의 분리

이승호*, 김소영, 김진준, 장태수¹, 정시련

영남대학교 약학대학, ¹서라벌대학교피부미용과

The Isolation of the Inhibitory Constituents on Melanin Polymer Formation from the Leaves of *Cercis chinensis*

Seung-Ho Lee*, So Young Kim, Jin Joon Kim, Tae Soo Jang¹ and See Ryun Chung

College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Department of Cosmetics, Sorabol College, Kyongju 780-250, Korea¹

Abstract – Tyrosinase plays an important role in the process of melanin polymer biosynthesis. Therefore, the enzyme inhibitors have been of great concern as cosmetics to have skin-whitening effects on the local hyperpigmentation. During the search for new inhibitory compounds on melanin polymer biosynthesis from natural sources, MeOH extracts of 589 higher plants were tested for the inhibitory effect on tyrosinase activity by the mushroom tyrosinase assay *in vitro*. Among plants tested, the leaves of *Cercis chinensis* exhibited potent inhibitory effect on mushroom tyrosinase activity. Subsequently seven active compounds were isolated from the ethyl acetate soluble part of acetone extract of the leaves of *C. chinensis* by the activity guided fractionation monitoring the inhibitory effect on tyrosinase activity. Their chemical structures were identified as kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercitrin, myricetin-3-O- α -L-rhamnoside, myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamopyranoside (desmanthin), (-)-epicatechin-3-O-gallate, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate, and methyl gallate on the basis of the speculation of spectral data and chemical reaction. Among the flavonol rhamnosides, myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)-L-rhamnoside(desmanthin) showed most potent inhibitory effect on tyrosinase activity and the structure of B-ring in flavonol moiety was related to the activity. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate having pyrogallol group in flavan-3-ol moiety exhibited more potent inhibitory effect than (-)-epicatechin-3-O-gallate having catechol group in flavan-3-ol moiety on mushroom tyrosinase activity.

Key words – Tyrosinase, melanin polymer, hyperpigmentation; *Cercis chinensis*, flavonol glucoside, catechin.

Tyrosinase¹⁾는 동·식물계에 넓게 분포되어 있는 polyphenol oxidase로서 생체내에서 두가지의 다른 반응을 촉매한다. 그 하나는 monophenol을 *o*-diphenol로 산화시키는 tyrosine oxidase로서의 기능이고, 다른 하나는 *o*-diphenol을 *o*-quinone으로 산화시키는 dopa oxidase로서의 기능이다. Tyrosinase는 생체내에서의 이러한 기능 때문에 melanin polymer를 생합성 하는데 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 melanocyte에서의 tyrosinase의 활성은 피부 melanin생성에 결

*교신저자 : Fax-053-811-3871

정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 melanin생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase활성 억제제는 일차 screening 단계에서 매우 큰 의미를 갖게 된다.

현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase의 활성억제 물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol, 우마우르시의 arbutin, 상백피의 mulberine을 비롯하여 oxyresveratrol, dihydromorin, artocarbene, 4-prenyl oxyresveratrol, 누룩곰팡이의 secondary metabolite인 kojic acid 등이 있으며, 이중 arbutin, mulberin, kojic acid는 ascorbic acid 및 그 유도체

와 함께, 현재 미백을 목표로 한 기능성 화장품에 첨가제로 이용되고 있다.

본 연구자는 미백제 개발을 목표로, 피부 멜라닌 생성에 있어서 주요소인 tyrosinase에 대하여 억제활성을 갖는 물질을 천연물로부터 분리하고자 문헌에 소개되고 있는 미백효과를 갖는 전통 한약은 물론, 전국 각지에서 무작위로 채집한 589종의 고등식물을 확보하였다. 이들을 MeOH로 추출하여 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 *in vitro*에서의 tyrosinase 활성억제 효과를 탐색하여 data base화하였다.²⁾ 그중 tyrosinase에 대한 억제 활성이 인정된 박태기나무의 잎으로부터 activity guided fractionation에 의하여 활성 물질의 분리를 시도하여 7종의 화합물을 분리하였다.

박태기 나무(*Cercis chinensis*)는 콩과에 속하는 중국산의 낙엽관목으로서 관상용으로 널리 재식하고 있으며 높이가 3-5 m이고 小枝는 지름 3-4 m이며 피목이 많고 골속은 사각형 비슷하며 백색이지만 점차 연한 갈색으로 변하고 수관은 녹색, 목재는 연한 녹색이다. 잎은 호생하며 단엽이고 혁질이며 심장형이고 지름 6-11 cm로서 표면은 윤기가 있으며 털이 없고 기부에서 5출맥이 발달하여 뒷면은 황록색이고 엽맥 기부에 잔털이 있다. 엽병은 길이 3 cm정도로서 표면은 적자색, 뒷면은 황록색이다. 꽃은 4월 하순에 잎보다 먼저 피며 길이 1.2-1.8 cm로서 자홍색이고, 화경이 없으며 7-8개 많은 것은 20-30개씩 모여 달리고 소화경은 길이 6-15 cm로서 꽃받침과 더불어 적갈색이며 털이 없고 2/3정도 되는 곳에 마디가 있어 부러지며 수술은 연한 홍색이며 길이 10-20 cm이고 암술은 길이 10 mm로서 황록색이지만 끝은 적색이다. 꼬투리는 길이 7-12 cm로서 8-9월에 익으며 종자는 편평하고 타원형이며 길이 7-8 mm로서 황록색이다. 목재를 소방목이라고도 한다.³⁾

박태기나무로부터 분리된 성분은 malvidin 3-diglycoside⁴⁾가 보고되었으며, 현재 약용으로는 거의 사용되고 있지 않다.

재료 및 방법

실험재료 - 박태기나무는 1997년 8월 하순, 영남대학교 약학대학에 식재되어 있는 것을 채집하여 사용하였으며, 표본은 영남대학교 약학대학에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - 융점은 Fisher-Johns의 Melting Pot Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지

않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000(digital polarimeter)를 사용하였다. 자외선흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였으며, HPLC는 Shimadzu의 LC-10A를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. 1H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250 (250MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하여 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 column chromatography용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) 및 RP-18 (Merck)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 μm, Merck), Toyopearl HW-40F (Tosho) 등을 사용하였다. 발색시약으로는 FeCl₃/ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액, vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액을 사용하였다. Tyrosinase 활성시험에 사용된 시약은 mushroom tyrosinase (Sigma), L-tyrosine (Sigma), 3,4-dihydroxy phenylalanine(DOPA) (Sigma)등이며, buffer로는 NaHPO₄ buffer를 사용하였다. HPLC는 고정상으로 Shim-pack PREP-ODS column 20mm×250mm (Shimadzu)을 사용하였으며, detector는 자외선 흡광도 254 nm를 사용하였다. 이동상의 조성은 MeOH와 H₂O, acetonitrile의 이상 또는 삼상혼액을 사용하였으며, 시료에 따라서 비율을 달리하여 gradient로 하였다.

Mushroom Tyrosinase Assay법¹⁾에 의한 활성 측정 - Dopaoxidase의 활성측정은 dopa를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome이 475 nm에서 흡광도를 나타내는 점을 이용하여 시행한다. 즉, 일정한 반응조건에서 생성된 dopachrome의 양을 475 nm에서 UV로 정량해서 tyrosinase의 활성을 측정하며 시료의 첨가에 의한 activity의 변화를 관찰하여 효소 활성저해 정도를 평가하였다.

구체적으로는 반응액에 L-tyrosine 900 μl, L-dopa 90 l, 시료용액(0, 10, 20, 50, 100, 200 g/ml)을 가한다. Sample은 MeOH-H₂O(1:1)에 용해시키고 MeOH에 의한 enzyme 저해효과를 보정하기 위하여 측정하고자 하는 sample용액의 volume에 해당하는 MeOH-H₂O(1:1)용액을 가하여 control로 한다. 각 반응액은 전체 volume이 1890 μl가 되도록 buffer를 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 IC₅₀ value로 한다.

저해율(%)=

$$\frac{\text{Control의 } A_{475} - \text{시료용액이 첨가된 것의 } A_{475}}{\text{Control의 } A_{475}} \times 100$$

활성물질의 분리 - 박태기나무의 잎 10 kg을 80% 함수 acetone으로 상온에서 일주일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압농축하였다. Acetone 추출액을 증류수에 현탁시키고 동량의 CH₂Cl₂를 가하여, 분획갈때기로 CH₂Cl₂층과 수층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, CH₂Cl₂층을 감압농축하여 CH₂Cl₂ 분획을 얻었다. 수층에 동량의 ethyl acetate (EtOAc)를 가한 후 분획갈때기로 수층과 EtOAc층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, EtOAc분획을 얻고, 나머지를 물분획으로 하였다. 얻어진 CH₂Cl₂, EtOAc, H₂O분획에 대하여 효소활성 억제실험을 실시하여 활성분획을 결정하였다 (Table. I).

가장 강한 활성을 보인 EtOAc 분획(140 g)에 MeOH를 가하여 생성된 침전을 여과하여 진공건조시키고, 여액은 감압농축시켰다. 여과한 침전에 대하여 MeOH/H₂O를 이동상으로 한 Prep. HPLC를 실시하여 CE1과 CE2, CE3를 분리 정제하였다. 농축된 여액은 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 다음과 같이 분리하였다. 지름 10 cm인 Sephadex LH-20 column에 시료를 loading하여, MeOH : H₂O=1:1 부터 6:4, 7:3, 8:2, MeOH : acetone=1:1, acetone 순으로 용출시켜, fr.1-fr.5를 얻었다.

활성분획인 fr.5 (25 g)를 지름 10 cm의 silicagel column에 loading시켜 5% MeOH/CH₂Cl₂로 부터 MeOH비율을 5% 단위로 증가시킨 용매 2 L씩을 용출시켜, 분획 5-1~분획 5-9을 얻었다. 그 중 활성

Table I. IC₅₀ values of solvent fraction from *Cercis chinensis*

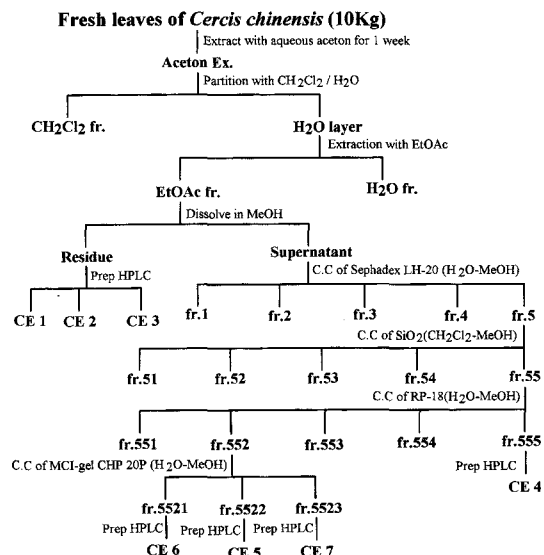
Fraction	IC ₅₀ (µg/ml)
CH ₂ Cl ₂ fr.	200<
EtOAc fr.	20-50
H ₂ O fr.	100-200

분획인 분획 5-5 (8.4 g)를 다시 지름 4 cm인 RP-18 column에 loading 한 후 MeOH : H₂O=3:7부터 시작하여 MeOH의 비율을 5% 단위로 높이면서 유출시켜 분획 5-5-1에서 분획 5-5-8을 얻었다. 상기 분획중 분획 5-5-5는 acetonitrile과 H₂O를 이동상으로 한 HPLC를 실시하여 CE4를 분리 정제하였다.

분획 5-5-2(5.043 g)은 지름 5 cm인 MCI-gel CHP-20P column column에 loading하였다. MeOH : H₂O =1:9 부터 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 50:50, MeOH 순으로 이동상을 유출하여, 분획 5-5-2-1~분획 5-5-2-4을 얻었다. 그 중 분획 5-5-2-1과 분획 5-5-2-2에 대하여 HPLC를 실시하여, 분획 5-5-2-1로부터 CE6를 분획 5-5-2-2로부터 CE5를 분리 정제하였다. 이때 사용된 이동상은 acetonitrile과 MeOH, 물의 3상으로 기울기 용리를 사용하였다. 분획 5-5-2-3에 대해서도 acetonitrile과 MeOH, 물의 혼합용매를 이용한 HPLC를 사용하여 CE7를 분리 정제하였다(Scheme 1).

CE1. Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside. ¹H-NMR (CD₃OD): δ 0.82 (3H, d, J=6Hz, H-6''), 3.22 (2H in total, m, H-4'',5''), 3.62 (1H, m, H-3''), 4.13 (1H, dd, J=1.5, 3 Hz, H-2''), 5.27 (1H, d, J=1.5 Hz, H-1''), 6.08 (1H, d, J=2 Hz, H-6), 6.25 (1H, d, J=2 Hz, H-8), 6.83, 7.65 (each 2H, d, J=9 Hz, H-2',3',5',6).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ 158.8 (C-2), 135.9 (C-3),



Scheme 1. Isolation of the tyrosinase inhibitory components from the fresh leaves of *Cercis chinensis*.

179.3 (C-4), 163.3 (C-5), 99.6 (C-6), 165.6 (C-7), 94.6 (C-8), 158.1 (C-9), 105.9 (C-10), 122.7 (C-1), 131.7 (C-2), 116.4 (C-3'), 160.9 (C-4'), 116.4 (C-5'), 131.7 (C-6')

CE2. Quercitrin. $^1\text{H-NMR}$ (250MHz, CD_3OD): δ 0.84 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, H-6"), 3.30 (2H, m, H-4", 5"), 3.65 (1H, dd, $J=3.5, 9.0\text{Hz}$, H-3"), 4.13 (1H, dd, $J=1.5, 3.0\text{Hz}$, H-2"), 5.24 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-1"), 6.08 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.25 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6.81 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$, H-5), 7.22 (1H, dd, $J=2.0, 8.0\text{Hz}$, H-6'), 7.23 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-2')

$^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz, CD_3OD): δ 16.7 (C-6"), 70.9 (C-5"), 71.0 (C-3"), 71.1 (C-2"), 72.3 (C-4"), 93.7 (C-8), 98.8 (C-6), 102.5 (C-1"), 104.9 (C-10), 115.4 (C-5), 116.0(C-2'), 121.9 (C-1'), 122.0 (C-6'), 135.2 (C-3), 145.4 (C-3'), 148.8 (C-4), 157.5 (C-9), 158.3 (C-2), 162.2 (C-5), 164.8 (C-7), 178.6 (C-4).

CE3. Myricetin-3-O-a-L-rhamopyranoside. $^1\text{H-NMR}$ (250MHz, CD_3OD): δ 0.85 (3H, d, $J=6\text{Hz}$, H-6"), 3.19 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-4"), 3.39 (1H, dd, $J=6, 9.5\text{Hz}$, H-3"), 3.68 (1H, dd, $J=3.5, 9.5\text{Hz}$, H-3"), 4.12 (1H, dd, $J=2.0, 3.5\text{Hz}$, H-2"), 5.21 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-1"), 6.09 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.25 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6.85 (2H, s, H-2',6')

$^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz, CD_3OD): δ 17.6 (C-6"), 71.8 (C-5"), 72.0 (C-3"), 72.1 (C-2"), 73.3 (C-4"), 94.7 (C-8), 99.8 (C-6), 103.6 (C-1"), 105.8 (C-10), 109.5 (C-2',6'), 121.9 (C-1'), 136.3 (C-3), 137.8 (C-4'), 146.8 (C-3',5'), 158.4 (C-9), 159.4 (C-2), 163.2 (C-5), 165.8 (C-7), 179.6 (C-4).

CE4. Myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamopyranoside (Desmanthin). $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6): δ 1.02 (3H, d, $J=5.5\text{Hz}$, H-6"), 3.52 (2H, m, H-4",5"), 4.06 (1H, dd, $J=3.5, 9.0\text{Hz}$, H-3), 5.66 (1H, d, $J=1.5, 3.5\text{Hz}$, H-2"), 5.73 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-1"), 6.25 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.47 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 7.14, 7.15 (each 2H, s, H-2',6', galloyl-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6): δ 17.9 (C-6"), 70.6 (C-3"), 71.6 (C-5"), 72.8 (C-2"), 73.6 (C-4"), 94.4 (C-8), 99.5 (C-1"), 99.7 (C-6), 105.6 (C-10), 109.3 (galloyl-2,6), 110.1 (C-2',6'), 121.5 (galloyl-1), 121.6 (C-1'), 135.0 (C-3), 137.1 (C-4'), 138.9 (galloyl-4), 146.0 (galloyl-3,5), 146.4 (C-3',5'), 157.9 (C-9), 158.4 (C-2), 163.1 (C-5), 165.0 (C-7), 166.0 (CO), 179.0 (C-4).

CE5. (-)-Epicatechin 3-O-gallate. Colorless needles (H_2O), mp. 266-269°C, $[\alpha]_D^{20} -190.2^\circ$ ($c=1.1$, Me_2CO). $^1\text{H-NMR}$ (250MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$): δ 2.96 (1H, dd, $J=3, 18\text{Hz}$, H-4), 3.06 (1H, dd, $J=4, 18.0\text{Hz}$, H-4), 5.14 (1H, s, H-2), 5.54 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-3), 6.04, 6.08 (each 1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6, 8), 6.75 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$, H-5'), 6.90 (1H, dd, $J=2.0, 8.0\text{Hz}$, H-6') 7.03 (2H, s, galloyl-H), 7.06 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$): δ 26.5 (C-4), 69.4 (C-3), 77.9 (C-2), 95.6, 96.4 (C-6,8), 98.8 (C-4a), 109.8 (Gal-2,6), 114.8, 115.5 (C-2',3'), 119.0 (C-5), 121.5 (Gal-1), 131.2 (C-1'), 138.8 (Gal-4), 145.4, 145.5 (C-3',4'), 145.8 (Gal-3,5), 156.9, 157.4, 157.6 (C-5,7,8a), 166.1 (COO). CD ($c=0.006$, MeOH) : -56 900(215), -4000(219), -49000(222), 0(237), 4700(240), -25 000(285)

CE6. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate. Colorless needles (H_2O), mp. 224-227°C, $[\alpha]_D^{20} -183.7^\circ$ ($c=1.0$, Me_2CO). $^1\text{H-NMR}$ (250MHz, acetone- d_6): δ 2.90 (1H, dd, $J=3, 18\text{Hz}$, H-4), 3.00 (1H, dd, $J=4, 18\text{Hz}$, H-4), 5.05 (1H, s, H-2), 5.55 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.10 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6.65 (2H, s, H-2',6'), 7.03 (2H, s, galloyl-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz, acetone- d_6): δ 26.5 (C-4), 69.3 (C-3), 78.0 (C-2), 95.7, 96.4 (C-6,8), 98.9 (C-4a), 106.7, 109.9 (each 2C, 2',6', galloyl 2,6), 121.7 (galloyl-1), 130.6 (C-1'), 133.1 (C-4'), 138.4 (C-4), 145.9, 146.2 (each 2C, 3',5', galloyl 3,5), 157.0, 157.4, 157.7 (C-5,7,8a), 166 (COO). CD($c=0.006$, MeOH): -9400 (221), 0(232), 4600(238), 400(249), 800(252), 0(260), -2500(275)

CE7. Methyl gallate. White powder (H_2O). $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6): δ 3.79 (3H, s, COOCH_3), 7.12 (2H, s, galloyl H). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6) : 51.4 (COCH_3), 109.3 (C-2,6), 121.3 (C-1), 138.3 (C-4), 145.6 (C-3,5), 166.7 (COO).

결과 및 고찰

피부의 멜라닌 생성에 주효소로 작용하는 tyrosinase 활성을 억제하는 물질을 천연물로부터 탐색, 분리, 구조를 구명하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 문헌 등에 소개되어 있거나, 민간에서 피부에 관련하여 사용되고 있는 식물과 전국 각지에서 무작위로 수

집한 고등식물 589종에 대하여 tyrosinase활성에 대한 억제효과를 screening하고, 이 screening data를 토대로 tyrosinase활성 억제효과가 뛰어난 박태기 나무의 잎에 대한 활성지향적 분리를 실시하여 7종의 화합물을 분리, 구조를 구명하였다.

CE1은 담황색 분말(MeOH)로 얻어졌으며, flavonoid 확인 반응에 양성을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 0.82 ppm에 3H분의 doublet ($J=6\text{Hz}$)이 관찰되었고, 3.22, 3.62, 4.13 ppm에 모두 4H분의 oxygen bearing methine proton peak가, 5.27 ppm에 anomeric proton peak가 doublet ($J=1.5\text{Hz}$)으로 관찰된다. Aromatic region에서는 6.08, 6.25, ppm에 서로 *m*-coupling하고 있는 doublet ($J=2\text{Hz}$)이 관찰되고, 6.83, 7.65 ppm에 서로 *o*-coupling하고 있는 각각 2H분의 doublet ($J=9\text{Hz}$)이 관찰된다. 따라서 본 화합물은 B 환에 *p*-disubstituted benzene 환을 갖고 있는 flavonoid인 kaempferol에 rhamnose가 결합되어 있는 화합물로 추정된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 16.7 ppm에 한 개의 methylene carbon peak를 비롯하여, 70.9-72.3 ppm사이에 산소와 결합된 methine peak가 4개 관찰되고 102.0 ppm에 한 개의 anomeric carbon peak가 관찰된다. 또, 모두 21개의 carbon peak중 rhamnose에 유래하는 6개의 peak를 제외하면, 나머지 15개의 carbon peak가 kaempferol의 carbon peak와 매우 유사한 pattern을 보이고 있고, C-3의 carbon peak가 저자장측에서 관찰되고 있다. 당의 종류를 확인하기 위하여 CE1을 5%황산으로 가수분해하여 kaempferol과 L-rhamnose를 확인하였다. 따라서 CE1은 kaempferol의 3위에 L-rhamnose가 α -결합을 하고있는 화합물로 결정하고 문헌에 소개된 spectral data와 비교하여 결정하였다.⁵⁾

CE2는 담황색 분말 Mg-HCl시약에 의하여 적색으로 변하는 것으로 보아 flavonoid유도체임을 알 수 있다. CE2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 CE1의 $^1\text{H-NMR}$ 과 매우 유사한 pattern을 보이고 있으나 aromatic region에서는 B환에 유래하는 proton peak인 δ 6.81 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), δ 7.22(1H, dd, $J=2, 8\text{Hz}$), δ 7.23 (1H, d, $J=2\text{Hz}$)의 peak가 1,3,4-trisubstituted benzene 환에 의한 proton peak pattern을 나타내어 quercetin으로 추정하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 aliphatic region에서 rhamnose에 기인하는 peak가 δ 16.7, 70.9, 71.0, 71.1, 72.3, 102.5 에서 관찰되고 있다. 이상의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 검토결과 CE2는 quercitrin 3-O- α -L-rhamnoside⁶⁾로

결론짓고, spectral data를 표품의 문헌치와 비교하여 동정하였다.

CE3은 담황색분말로 얻어졌으며 flavonoid확인 반응에 양성을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 CE1과 CE2와 유사한 pattern을 나타내고 있으나 aromatic region에서 flavonoid의 B환에 유래하는 proton peak가 δ 6.85의 2H분의 singlet만이 관찰되는 점으로 보아 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring의 존재를 추정할수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 109.6과 δ 146.8에 B환의 2', 6', 및 3', 5'에 기인하는 two carbon peak가 관찰되어 이와 같은 사실을 뒷받침해주고 있다. 따라서 CE3은 5, 7, 3', 4', 5'-pentahydroxy flavonol에 rhamnose가 결합한 myricetin-3-O- α -L-rhamnoside⁶⁾로 결론짓고 각종 spectral data를 표품의 문헌치와 비교하여 결정하였다.

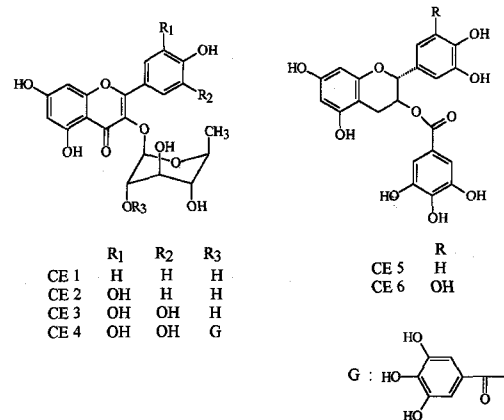
CE4는 황색분말로 FeCl_3 에 청색, flavonoid확인 반응에 양성을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 aliphatic region에서 1개의 rhamnose에 기인하는 proton peak (δ 1.02, 3.52, 4.05, 5.66, 5.73)가 관찰되고, flavonoid의 A환에 기인하는 2개의 proton peak (δ 6.25, 6.47)가 $J=2\text{Hz}$ 로 *m*-coupling 하여 관찰된다. 또한 7.14, 7.15에 각각 2H분의 singlet이 관찰되어 이중 하나는 flavonoid B환이 1, 3, 4, 5-tetrasubstituted benzene ring이 존재함을 추정할 수 있고, 나머지 하나는 galloyl group의 존재를 추정할 수 있다. 이와 같은 사실은 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서도 확인할 수 있다. 즉, δ 17.9, 70.6, 71.6, 72.8, 73.6, 99.5에 1개의 rhamnose에 기인하는 carbon peak외에 aromatic region에서는 모두 22개의 carbon peak중 myricetin moiety에 기인하는 carbon signal 15개를 제외하면 1개의 galloyl group에 의한 carbon peak [δ 109.3혹은 110.1(2C), 146.0혹은 146.4(2C), 121.5, 166.0(COO)]이 관찰된다. 따라서 본 화합물은 CE3에 1개의 galloyl group이 ester결합한 것으로 생각되며, 결합위치는 CE4에 있어서 rhamnose의 anomeric carbon peak가 CE3의 그것보다 4.1 ppm 고자장으로 shift한 점과 rhamnose의 C-2' carbon peak가 CE3에서 보다 1.54 ppm 저자장 shift한 점으로부터 rhamnose의 C-2'위치로 결론짓고, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 myricetin-3-O-(2'-O-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside (desmanthin)⁶⁾의 문헌치와 비교하여 확정하였다.

CE5는 무색침상정(H_2O)으로 분리되었으며 FeCl_3 에 청색, anisaldehyde 황산시약에 황색을 나타내었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum은 2.88, 3.10에 methylene proton peak가 관찰되고 이들은 각각 5.53 oxygen bearing methine proton peak와 coupling하고 있다. 또, 5.53의 methine proton peak는 5.14의 methine proton peak와 coupling하여 관찰되어 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}(\text{O})-$ 의 부분 구조가 예상된다. aromatic region에서는 6.04, 6.08에 서로 m-coupling하고 있는 proton peak가 각각 1H분의 doublet이 관찰되고, 6.80, 6.88, 7.04에 서로 coupling하고 있는 proton peak가 관찰되어 분자내에 1,3,4-trisubstituted benzene ring의 존재가 예상된다. 또, 7.05에 2H분의 singlet이 관찰되고 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 aliphatic region에서 1개의 methylene peak(26.5), 2개의 산소가 결합된 methine peak(69.4, 77.9)가 관찰되고, 7개의 sp^2 carbon peak(95.4, 96.1, 109.7(2C), 114.5, 115.3, 118.8)과 11개의 sp^2 quaternary carbon peak(119.0, 121.5, 131.2, 138.8, 145.4, 145.5 (2C), 156.9, 157.4, 157.6, 166.1)가 관찰되어 1개의 flavan-3-ol과 1개의 galloyl group의 존재가 예상된다. 이상의 결과를 종합하여 CE5는 (-)-epicatechin에 galloyl group이 ester결합한 화합물로 추정되며, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품의 문헌치와 비교하여 (-)-epicatechin 3-O-gallate⁷⁾로 결정하였다.

CE6은 담황색 분말로 FeCl_3 에 청색을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 CE5와 매우 유사하다. Aromatic region에서 CE5에서 관찰되었던 1,3,4-trisubstituted benzene ring에 기인하던 proton peak가 관찰되지 않고, 대신에 2H분의 singlet(δ 6.66)이 관찰된다. 이는 CE5의 B환이 catechol환이 아니고 pyrogallol환으로 된 것을 의미한다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서도 CE5에서 관찰되었던 각각 2H분의 sp^2 carbon peak(δ 109.8, 145.5)가 CE6에서는 4개(δ 106.6, 110.0, 145.8, 146.1)가 관찰되어 flavan-3-ol의 B환이 pyrogallol로 되고, 한 개의 galloyl group이 ester결합한 화합물로 추정하였다. 이상의 결과를 종합하여 CE6는 (-)-epigallocatechin-3-O-gallate⁷⁾로 결정하고 표품의 문헌치와 각종 spectral data를 비교하여 확정되었다.

CE7은 백색분말(H_2O)로 FeCl_3 에 황색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 25) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 26)은 매우 단순하여 1개의 carboxy methyl peak(δ 3.79(1H), 51.4, 166.7(13C))과 2H분의 singlet(δ 7.12) 및 1개의 ester carbon(δ 166.7) 및 6개의 carbon peak(δ 109.3(2C), 121.3, 138.3



(2C), 145.6)이 관찰된다. 이상의 결과로 CE7은 methyl gallate로 추정하고, 표품과 직접 CO-TLC를 실시하여 결정하였다. 본 화합물은 추출, 분리중 생성된 artefact일 가능성도 있는 것으로, 본 식물에 처음부터 함유되어 있는지에 대해서는 분명치 않다.

분리된 화합물의 tyrosinase활성 억제효과 - 박테기나무의 잎으로부터 분리된 활성 물질은 모두 phenolic 화합물로 flavonol rhamnoside류 (CE1, 2, 3, 4) 와 flavan-3-ol류 (CE5, 6) 및 methyl gallate였다. 이들 화합물의 tyrosinase에 대한 억제 활성을 kojic acid를 비교 물질로 하여 측정하였다(Table. II).

Flavonol rhamnoside류에 있어서는 B환의 구조에 따라 차이를 보였다. 즉 B환이 1,4-disubstituted benzene ring인 CE1에서는 거의 활성을 나타내지 않았으며 catechol환인 CE2, pyrogallol환인 CE3에서는 CE2의 쪽이 강한 활성을 나타내었다. 같은 pyrogallol

Table II. Inhibitory effects of the active compounds from the *Cercis. chinensis* on the mushroom tyrosinase activity *in vitro*

Comp. No	Comp. Name	IC ₅₀ values (μM)
CE1	Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside	450<
CE2	Quercitrin	67
CE3	Myricetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside	150
CE4	Myricetin-3-O-(2'-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside (Desmanthin)	63
CE5	(-)-Epicatechin-3-O-gallate	92
Cf.1	Catechin	-10
CE6	(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate	69
CE7	Methyl gallate	54
Cf.2	Gallic acid	10
Cf.3	Kojic acid	9

핵인 CE3과 CE4에서는 galloyl group 한개가 rhamnose에 ester결합하고 있는 CE4의 경우가 약 2배의 강한 활성을 나타내었다.

Flavan-3-ol moiety를 갖는 CE5, CE6의 경우에 있어서는 B환이 catechol핵을 갖는 CE5보다 pyrogallol핵을 갖는 CE6에서 더 강한 활성을 나타내었다.

본 연구실에서 목단피로부터 분리하여 보고한 바 있는 catechin의 경우 10 μ M농도에서 오히려 tyrosinase 활성을 50% 증가 시켰다.⁸⁾ 그러나 비슷한 moiety를 가진 CE5, CE6경우 galloyl group이 결합됨으로써 tyrosinase의 활성을 억제하고 있으며, 이런 현상은 CE3과 CE4의 비교에서도 확인되고 있다. 따라서 galloyl group은 tyrosinase활성 억제에 관여하고 있다고 생각된다.

이제까지 천연으로부터 분리되어 tyrosinase억제 활성이 보고 되어 있는 화합물은 대개가 phenolic compound로, phenyl chromone류나 flavan 3-ol류의 경우는 B환이 resorcinol핵을 갖고 있는 화합물이 주를 이루고 있고, 그 외에 stilbene계 화합물, vanilyl alcohol류, isoflavonoid류 등이 알려져 있다.

그러나 본 실험을 통하여 확인한 바와 같이 flavonol glycoside류도 활성물질로서 충분히 가능성이 있다고 사료되어, 자연계에 풍부하게 분포되어 있는 각종 flavonoid 류에 대한 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다

결 론

고등식물에서 tyrosinase활성을 억제하는 물질을 탐색, 분리하기 위하여 589종의 고등식물에 대하여 활성을 탐색하고, 박태기나무의 잎으로부터 7종의 활성 물질을 분리, 구조를 확인 하였다.

1) 분리된 화합물의 구조는 각종 spectral data 및 chemical reaction을 통하여 각각 *kaempferol-3-O-L-rhamnoside*, *quercitrin*, *myricetin-3-O-L-rhamnoside*, *myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamopyranoside(desmanthin)*, *(-)-epicatechin-3-O-gallate*, *(-)-epigallocatechin-3-O-gallate*, *methyl gallate*로 결정하였다.

2) Flavonol rhamnoside류 중에서는 B환의 구조에 따라 활성의 차이를 보였으며 catechol moiety를 갖는 CE2의 경우 가장 강한 활성을 나타냈다.

3) B환이 pyrogallol핵을 갖는 CE3, CE4의 경우 galloyl group이 결합하고 있는 CE4의 경우가 강한 활성을 나타냈다.

4) Flavan-3-ol계통의 화합물의 경우 B환이 pyrogallol moiety를 갖는 CE6이 catechol moiety를 갖는 CE5보다 강한 활성을 나타내었다.

5) Methyl gallate의 경우는 gallic acid와 비교하여 약한 활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 1998년도 핵심전문연구 과제(과제번호: 981-0716-122-1) 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다

인용문헌

1. V. J. Hearing, M. Jimenez (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment, *Int. J. Biochem*, 19(12), 1141
2. N. S. Shin, K. S. Lee, S. Y. Kang, K. R. Min, S. H. Lee and Y. Kim(1997) Inhibitory effects of herbal extracts on dopa oxidase activity of tyrosinase, *Natural Products Sciences*, 3(2), 111
3. 이창복(1980), 대한식물도감, 464. 향문사, 서울
4. Saleh, N.A.M. et al(1976), Anthocyanins of some Leguminosae flowers & their effect on colour variation. *Phytochemistry* 15, 835
5. Harborne, J. B. and Mabry, T. J., (1982) The flavonoids. advances in research, 306 Chapman and Hall, London
6. Nicollier, G. and Thompson, A. C. (1983) Flavonoids of *Desmanthus illinoensis*. *J. Nat. Prod.* 46 (1), 112-117
7. 栢田良樹 (1989) 各種大黃의フェノール類에關する化學的研究. 九州大學博士學位論文, 36. 九州大學, 福岡
8. S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim and S. R. Chung (1998) Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji* 42(4): 353-358

(1999년 10월 14일 접수)