

# Synthesis and de-pigmentation effect of phenolic glucoconjugates

Ki Ho Kim<sup>1</sup>, Ki Soo Kim<sup>1</sup>, Jae Soeb Lee<sup>1</sup>, Kang Il Ko<sup>1</sup>, Soo Hee Lee<sup>1</sup>,  
Yeon-Soo Lee<sup>2</sup>, and Soo Nam Park<sup>3</sup>

<sup>1</sup>R&D Center, Bioland Ltd., Byongchon, Chonan, Chungnam, 330-860, Korea

<sup>2</sup>Bio-Organic Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yusong,  
Taejon, 305-600, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Fine Chemistry, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea

## Abstract

Novel glucoconjugates containing phenolic moiety, 3-(methoxycarbonyl)-4-(hydroxyphenyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(4), 3-(methoxyacetyl)-4-(hydroxyphenyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(7), 4-(hydroxyphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranoside(11), were synthesized. In order to investigate their depigmentation effect, inhibitory activity against mushroom tyrosinase and inhibitory activity of melanin synthesis in B16 melanoma cell were evaluated in vitro. Compound 11 showed 92.0 $\mu$ g/ml of tyrosinase inhibitory activity whereas compound 4 and 7 showed very low activity not less than 300 $\mu$ g/ml. Inhibitory activities of melanin synthesis in B16 melanoma cell of compound 4, 7, and 11 were 8.7, 18.1, and 36.0%, respectively, at the concentration of 100 $\mu$ g/ml. Inhibitory activity of compound 11 was much higher than that of arbutin at the same concentration.

## 서 론

피부에서 기미, 주근깨와 같은 색소침착은 자외선과 같은 인자에 의해서 멜라닌 생성의 과다생성 혹은 멜라노사이트의 증식에 의해서 야기된다.<sup>1)</sup> 피부에서의 색소침착은 멜라닌 합성에 있어서 중요한 효소인 tyrosinase 에 의해서도 야기되며<sup>2)</sup> 이 단계는 tyrosinase 기질유사체를 사용함으로써 저해할수 있다. 또한 멜라닌 생성과정에는 자외선에 의한 자동산화반응이 포함되어 있어 이러한 반응을 차단하는 방법도 피부색소침착을 막는 방법이 될수 있다. 최근에는 분자생물학적 수법에

의해 tyrosinase 뿐만 아니라 DOPAchrome tautomerase(TRP-2)<sup>3)</sup> 와 DHICA oxidase(TRP-1)<sup>4)</sup> 에 의해서도 멜라닌이 생성된다는 것이 새로이 밝혀져 이러한 효소들을 저해할수 있는 물질을 개발하는것도 피부색소침착을 방지할수 있는 방법이 될수 있다<sup>5)</sup>.

본 연구에서는 tyrosinase 활성을 억제할것으로 예측되는 페놀성 당접합체를 합성하여 미백제로 널리 사용되고 있는 arbutin 과의 미백활성을 in vitro 실험법으로 비교하였으며 구조와 활성간의 관계를 논의 하였다.

## 실험방법

### 1. 시 약

D-glucose, D-ribose, boron trifluoride etherate, triethyl amine, Sodium methoxide 등은 Sigma-Aldrich 사의 특급시약을 사용하였다. acetic anhydride 는 분별증류를 하여 사용하였으며, acetic acid 는 물을 제거하기 위하여 acetic anhydride 를 소량 첨가하여 반응시킨 후 CrO<sub>3</sub> 존재하에서 분별증류를 하여 사용하였다. Hydroquinone 은 acetone 에서 재결정 하였다. 용매들은 사용전 증류하여 사용하였으며 그외의 시약 들은 정제없이 사용하였다. Nmr 용매는 Sigma-Aldrich 사의 DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O 등을 사용하였으며 내부기준물질로는 TMS 를 사용하였다. 그외의 시약은 모두 특 급으로 사용하였으며 활성실험에 사용된 시약들은 배지이외의 것들은 Sigma-Aldrich 사 것을 구입하여 그대로 사용하였으며 배지는 DIFCO 의 것을 사용하였 다.

### 2. 측정기기

NMR 측정은 Varian-Gemini 200 spectrometer 를 사용하였고 chemical shift 는 TMS 를 기준물질로하여 δ 값(ppm)으로 나타내었다. UV 흡광도는 Hewlett Packard HP-8453 을 사용하여 측정하였다.

### 3. 합성

**3-(methoxycarbonyl)-4-hydroxyphenyl-2',3',4',5'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside(3)**

건조된 dichloromethane 30ml 에 methyl 2,5-dihydroxy benzoate(1.68g, 0.01mol)과  $\beta$ -D-glucopyranose pentaacetate(3.9g, 0.01mol)를 녹이고 실온에서 10 분간교반후 triethylamine( 2g, 0.02mol)과 boron trifluoride etherate(5.62g, 0.04mol)를 천천히 첨가하여 실온에서 48 시간 교반시켰다. 반응 종결후 물(40ml)과 methylene chloride(20ml)를 첨가하여 추출한후 유기층을 anhydrous MgSO<sub>4</sub> 로 건조 여과한 다음 감압증발 시키고 ethanol 15ml 로 재결정하였다.(mp: 94-96°C, 수율 : 55%) (<sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub> ; 2.1ppm(q, 12H), 3.80-4.00(m, 1H), 3.90(s, 3H), 4.10-4.40(m, 2H), 6.90(d, 1H), 7.17(m, 1H), 7.42(s, 1H), 10.5(s, 1H))

### **3-(methoxycarbonyl)-4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(4)**

화합물 3 에 methanol 50g 과 sodium methoxide 0.01g 을 넣고 6 시간동안 환류시켰다. 반응 종결후 0.01N HCl 로 중화 시킨후 감압 증발하고 ethanol 15ml 로 재결정하였다.(mp : 148-150°C , 수율 65%)(<sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O; 3.30-3.50 ppm (m, 4H), 3.65( s, 3H), 3.60-3.90(m, 2H), 4.60-4.80(d, 1H), 6.55(d, 1H), 7.00(q, 1H), 7.13(d, 1H))

### **3-acetic $\gamma$ -lactone -4-hydroxyphenyl -2',3',4',5'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(6)**

건조된 dichloro methane 30ml 에 2,5-dihydroxy phenylacetic  $\gamma$ -lactone(1.5g, 0.01mol)과  $\beta$ -D-glucopyranose pentaacetate(3.9g, 0.01mol)를 녹이고 실온에서 10 분간교반후 triethylamine( 2g, 0.02mol)과 boron trifluoride diethyl ether(5.62g, 0.04mol)를 천천히 첨가하여 실온에서 48 시간 교반시켰다. 반응 종결후 물(40ml)과 methylene chloride(20ml)를 첨가하여 추출한후 유기층을 anhydrous MgSO<sub>4</sub> 로 건조 여과한 다음 감압증발 시키고 hexane/ethanol 20ml 로 재결정하였다.(mp: 182-184°C, 수율 : 45%) (<sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub> ; 2.10ppm(q, 12H), 3.70(s, 2H), 3.70-3.90(m, 1H), 4.10-4.40(m, 2H), 5.00(d, 1H), 5.10-5.40(m, 3H))

### **3-(methoxyacetyl)-4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(7)**

위의 생성물에 methanol 50g 과 sodium methoxide 0.01g 을 넣고 6 시간동안 환류시켰다. 반응 종결후 0.01N HCl 로 중화 시킨후 감압 증발하고 ethyl acetate/ethanol 25ml 로 재결정하였다.(mp :154-156°C , 수율 50%)(<sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O; 3.40-3.70ppm(m, 3H), 3.70(s, 4H), 3.70-4.00(m, 2H), 6.80-7.10(m, 3H))

#### 4-(acetoxyphenyl)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranoside(10)

건조된 dichloro methane 30ml 에 monoacetyhydroquione(1.54g, 0.01mol)과 β-D-ribofuranose 1,2,3,5-tetraacetate 를 녹이고 실온에서 10 분간교반후 triethylamine( 2g, 0.02mol)과 boron trifluoride diethyl ether(5.62g, 0.04mol)를 천천히 첨가하여 실온에서 48 시간 교반시켰다. 반응 종결후 물(40ml)과 methylene chloride(20ml)를 첨가하여 추출한후 유기층을 anhydrous MgSO<sub>4</sub> 로 건조 여과한 다음 감압증발 시키고 ethylacetate/hexane 35ml 로 재결정하였다.(mp: 64-66°C , 수율 : 35%)(<sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub> ; 1.95ppm(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.15(s, 3H), 2.30(s, 3H), 4.00-4.10(m, 1H), 4.35-4.50(m, 2H), 5.45-5.55(m, 2H), 5.60(s, 1H), 7.00(s, 4H))

#### 4-hydroxyphenyl-β-D-ribofuranoside(11)

위의 생성물에 methanol 50g 과 sodium methoxide 0.01g 을 넣고 6 시간동안 환류시켰다. 반응 종결후 0.01N HCl로 중화 시킨후 감압 증발하고 isopropyl alcohol 25ml 로 재결정하였다.(mp :155-156 °C , 수율 75%)(<sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O; 3.50-3.60ppm(m, 2H), 3.70-4.10(m, 3H), 4.70(t, 1H), 5.00(d, 1H), 5.25(s, 2H), 6.60-6.90(q, 4H))

#### 4. Tyrosinase 의 저해효과

Tyrosinase 의 저해활성은 일반적으로 분광학적인 방법으로 측정되어지며 본 실험에서는 Vanni 등의 방법에 따라 측정되어졌다<sup>6)</sup>. 0.1M phosphate buffer(pH6.8) 1.0ml, 0.3mg/ml L-tyrosine 수용액 1.0ml, 1250U/ml mushroom tyrosinase 0.1ml 를 혼합 한후 여기에 시료용액을 농도에 따라 각각 0.2ml 를 첨가하여 37C 에서 분간 효소반응을 진행 시켰다. 반응용액의 흡광도를 475nm 에서 측정하여 시료의 효소저해활성을 다음식에 따라 구하고 효소활성의 50%를 저해하는 값을 IC<sub>50</sub>으로 나타 내었다.

$$\text{Inhibition \%} = [(A-B)/A] \times 100$$

A; 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 475nm 에서 흡광도

B; 시료를 첨가한 반응용액의 475nm 에서 흡광도

## 5. B-16 melanoma 세포에서 melanin 생합성 억제 효과 측정.

B16 melanoma 세포에서 melanogenesis 저해효과는 Maeda 와 Fukuda<sup>7)</sup> 의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 우선, B16 melanoma 세포 (ATCC CRL 6323)들을 T-25 플라스크나 32 mm petridish 에  $5 \times 10^5$  세포를 투입하고, 5% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics-antimycotic 시약이 처리된 Dulbecco' s modified Eagle' s 배지 (DMEM)에서 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)에서 10 시간정도 배양한다. 새롭게 합성한 시료들을 다양한 농도로 각 플라스크에 처리하고, 상기와 동일한 조건에서 2 일간 세포들을 배양한다. 그 후, melanin 이 배출 (secretion)된 배지를 수거하고, 세포들을 trypsin 으로 처리하여 수거한 후, haemocytometer 로 세포수를 측정한다. 미리 수거된 배지와 세포들을 원심분리 (16,000 g, 30 min)하여 상층액은 버리고, 세포와 melanin 을 취한다. 이들을 5% trichloroacetic acid (TCA)과 ether:ethanol (3:1) 용액으로 각각 씻어준다. 그 후, 이들을 ether 로 씻어준 후, 10% DMSO 를 포함하는 1 N NaOH 용액으로 melanin 을 용해시켜 475 nm 에서 흡광도를 측정하여 정량한다

## 결과 및 고찰

### 1. 합성

본 연구에서 목표로한 물질의 합성은 Scheme 1 에 따라 진행되어졌다.

### Scheme 1

**3-(methoxycarbonyl)-4-hydroxyphenyl-2',3',4',5'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside(3)** 와 **3-(methoxycarbonyl)-4-hydroxyphenyl-β-D-glucopyranoside(4)**, methyl gentisate 에 glucose pentaacetate 를 루이스촉매를 사용하여 반응시켜 화합물 3 을 합성하였다. methyl gentisate 의 위치는 당고리에 대하여 모두 베타위치로 치환되어졌으며 이것은 당고리 2 번위치의 acetyl 기가 neighboring group 으로 반응에 참여했기 때문이다. 또한 methyl gentisate 의 hydroxyl 기중 5 번 위치의 hydroxyl 기에만 결합된것으로 확인되어 졌으며 이것은 2 번 위치의 hydroxyl 기

carboxymethyl 의 steric hindrance 및 electron withdrawing 성질로 인해 당고리가 결합하기 어려운 것으로 해석될수 있다. 화합물 4 는 화합물 3 을 염기촉매인 sodium methoxide 를 사용하여 가수분해하여 얻을 수 있었으며 NMR 분석결과 구조와 일치함을 확인할수 있었다.

**3-acetic  $\gamma$ -lactone -4-hydroxyphenyl -2',3',4',5'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyran-oside(6) 와 3-(methoxyacetyl)-4-hydroxy-phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(7),**

2,5-dihydroxyphenyl acetic  $\gamma$ -lactone 에 glucose pentaacetate 를 루이스촉매인  $\text{BF}_3$  를 사용하여 반응시켜 화합물 6 을 합성하였다. 2,5-dihydroxyphenyl acetic  $\gamma$ -lactone 의 위치는 당고리에 대하여 모두 베타위치로 치환되어졌으며 이것도 화합물 4 의 경우와 동일하게 해석되어진다. 2,5-dihydroxyphenyl acetic  $\gamma$ -lactone 의 경우는 hydroxyl 기가 1 개밖에 없으므로 당에 연결되는 hydroxyl 기의 위치는 4 번으로 정해져 있다. 화합물 6 은 염기촉매인 sodium methoxide 를 사용하여 가수분해하여 화합물 7 을 얻었으며 NMR 분석결과 화합물 7 의 구조와 일치함을 확인할수 있었다

**4-(acetoxyphenyl)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranoside(10) 와**

**4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-ribofuranoside(11)**

monoacetylhydroquinone 에 glucose pentaacetate 를 루이스촉매를 사용하여 반응시켜 화합물 10 을 합성하였다. monoacetylhydroquinone 의 위치는 사용된 반응 조건하에서는 당고리에 대하여 모두 베타위치로 치환되어졌으며 이것도 화합물 4 의 경우와 동일하게 해석되어진다. Hydroquinone 을 사용할경우 2 개의 glucose pentaacetate 기가 결합될 가능성이 크기 때문에 이를 배제하기 위해 monoacetoxhydroquinone 을 사용하였다. NMR 분석결과 예상된 구조와 일치함을 알수 있었다. 화합물 10 은 염기촉매인 sodium methoxide 를 사용하여 가수분해하여 화합물 11 을 얻었으며 NMR 분석결과 화합물 11 의 구조와 일치함을 확인할수 있었다

## 2. 멜라닌 생성에 미치는 효과

기존에 알려진 미백메카니즘에서 멜라닌 생성에 관여하는 요인은 그 단계에 따라 여러가지가 작용할수 있으나 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 peroxidase 등이 관여하여 멜라닌이 생성된다는 메커니즘이 가장 일반적으로 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 본 연구에서는 tyrosinase 에 저해효과를 가져 미백효과를 나타내는 arbutin 과 유사한 구조로 미백효과가 보다 우수한 화합물을 합성하고자 시도한 초기단계 연구 결과이다. hydroquinone 의 경우에는 미백효과가 우수하나 독성이 커서 미백원료로 사용할수가 없으나 여기에 glucose 가 결합된 형태인 arbutin 은 독성도 낮고 효과도 비교적 높아 가장 널리 사용되는 원료임에 착안하여 arbutin 의 페놀기를 다른 유도체로 변화시켜 그 효과를 측정하였다. Hydroquinone 대신에 선택한 페놀화합물로는 독성이 적고 미백효과가 우수하다고 알려져 있는 methyl gentisate 그리고 토란이나 반하같은 천연물에 함유되어져 homogentisic acid 의 methyl ester 를 선택하였으며 또한 arbutin 의 glucose 대신에 ribose 를 사용하여 합성된 물질의 미백효과도 측정하였다.

최종적으로 합성되어진 화합물 4, 7, 11 의 멜라닌 생성저해 효과를 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase 의 활성저해 효과와 melanoma cell 에서의 멜라닌 합성저해 효과를 측정하였다.

합성되어진 화합물들의 멜라닌 생성저해 효과를 비교할수 있는 화합물로서는 이미 효과가 알려져 있는 arbutin 을 사용하였다. mushroom tyrosinase 저해활성 결과를 표 1 에 나타내었으며 arbutin 의 효과와 비교하여 볼때 화합물 4 와 7 의 저해활성이 매우 낮음을 볼수 있다. 화합물 4 에서 gentisic acid methyl ester 기만의 효과는 arbutin 보다 높은 값을 나타내는 것으로 알려져 있으나<sup>8)</sup> 당고리가 결합함으로써 저해효과가 낮아진 이유는 분자구조가 커져서 tyrosinase 의 활성부위에 결합하기 어렵기 때문이거나 당에 결합된 5 번 hydroxyl 기가 활성부위에 작용하는 것으로 추측할수 있다.

화합물 5 의 경우 homogentisic acid methyl ester 는 세포독성이 있는 것으로 나타났으나<sup>9)</sup> 당고리가 결합됨으로서 독성은 없어졌으나 tyrosinase 저해 활성은 낮은 값을 나타내는 것으로 보아 화합물 4 와 같은 결과로 해석할수 있다. 화합물 11 의 경우는 tyrosinase 저해활성이 arbutin 과 비슷한 값을 보이고 있으며 그 구조가 arbutin 과 거의 유사하고 분자 크기가 비교적 작기 때문인것으로 해석할수 있다.

B16 melanoma 를 이용하여 얻은 화합물들의 저해활성실험 결과를 표 2 에 나타내었다. Arbutin 과 비교하여 볼 때 화합물 4 와 7 은 비교적 낮은 활성을 보이고 있으나 화합물 11 의 경우는 arbutin 보다 1.8 배 높은 저해활성을 보이고 있음을 알 수 있다. 이러한 이유는 활성부위에 접근하는 페놀기 위치 및 구조가 arbutin 과 동일하나 분자크기의 감소로 인해 활성부위에 더 친화력이 있을것으로 예상되며 또한 당고리가 glucose 에서 ribose 로 바뀜에 따라 당고리의 hydroxyl 기가 감소되었고 따라서 친수성의 상대적 감소로 세포내로의 확산이 보다 용이하기 때문일 것으로 해석된다.

미백효과가 증가됨과 동시에 무독성의 새로운 미백물질의 개발하기 위해서는 미백메카니즘의 좀더 완전한 이해가 유전자 및 분자수준에서 이루어져야 할것으로 생각되나 본 연구에서는 화합물 분자가 미백활성에 미치는 영향을 구조적인 측면에서 알아보려고 하였다. 모델화합물로서 좀더 다양한 구조를 가지는 물질을 합성하여 체계적인 연구가 진행되어야 하며 본연구에서 합성되어진 화합물중 화합물 11 에 대한 in vivo 실험 및 안전성 시험은 현재 진행 중이며 그 결과는 다음 논고에 보고하고자 한다.



☒ 2. Inhibitory activity of compound 4, 7 and 11 against mushroom tyrosinase

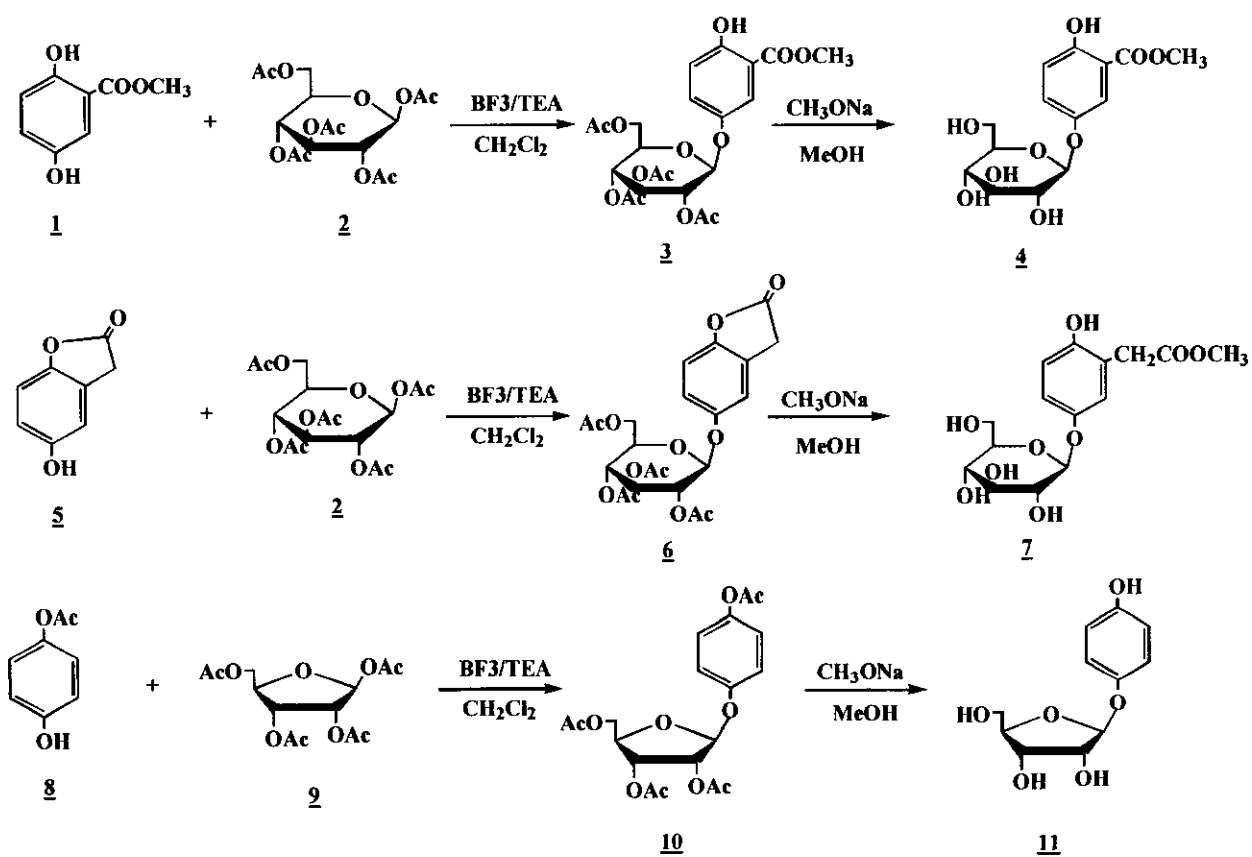
Compounds	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Arbutin	95
4	>300
7	>300
11	92

☒ 3. inhibitory activity of melanin synthesis on melanoma cell

Compounds	Concentration (μg/ml)	Melanin synthesized (mg)	Cells (x 10 <sup>6</sup> )	Melanin/cell (pg/cell)	Inhibition of melanogenesis (%)
Control	0	0.451	1.15	392	0.00
Arbutin	10	0.437	1.18	370	5.61
	50	0.375	1.14	329	16.10
	100	0.351	1.12	313	20.20
4	10	0.418	1.10	380	4.00
	50	0.348	1.12	311	20.70
	100	0.363	1.13	321	18.10
7	10	0.440	1.14	386	1.50
	50	0.419	1.16	361	7.70
	100	0.405	1.13	358	8.70
11	10	0.407	1.10	370	5.60
	50	0.335	1.14	294	25.00
	100	0.284	1.13	251	36.06

## 참고문헌

- 1) M. Kubo and H. Matsuda, *Fragrance Journal*, **8**, 48(1995)
- 2) M. Seji, K. Shimao, M. S. C. Birbeck and T. B. Fitzpatrick, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **100**, 497 (1963)
- 3) A. J. Winder, A. Wittbjer, G. Odh, E. Rosengren and H. Rosman, *Pigment Cell Research*, **7**, 305, (1994)
- 4) V. Marmol, del, S. Ito, I. J. Jackson, J. Vachtenheim, P. Berr, G. Ghanem, R. Morandini, K. Wakamatsu and G. Heuz, *FEBS Letter*, **327**, 307(1993)
- 5) Y. Mishima, S. Hatae, and H. Kondoh, *Fragrance J.* **1**, 13(1996)
- 6) A. Vanni et el, *Annali di Chimica*, **80**, 35(1990)
- 7) K. Maeda and M. Fukuda, *J. Soc. Cosmetic. Chem.*, **42**, 361(1991)
- 8) E. V. Curto, C. Kwong, H. Hermersdorfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. J. Jr. Hearing, and T. P. Dooley, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 663(1999)
- 9) K. H. Kim, unpublished data



Scheme 1