

감초의 Tyrosinase 활성 억제 성분

이주상 · 김정아 · 조세훈 · 손애량 · 장태수¹ · 소명숙² · 정시련 · 이승호*

영남대학교 약학대학, ¹서라벌대학교 피부미용과, ²대구보건대학 간호과

Tyrosinase Inhibitors isolated from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* L.

Joo Sang Lee, Jeong Ah Kim, Se Hoon Cho, Ae Ryang Son, Tae Soo Jang¹, Myung Suk So²,

See Ryun Chung, and Seung Ho Lee*

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

¹Department of Cosmetics, Sorabol College, Kyongju 780-250, Korea

²Department of Nursing, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract – Eight compounds were isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* by the tyrosinase inhibitory activity guided fractionation, and their structures were identified as liquiritigenin (1), isoliquiritigenin (2), isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether (3), liquiritin (4), isoliquiritin (5), ononin (6), glycoumarin (7), glycyrol (8) by analysis of spectral data. Compound 3 exhibited the most potent inhibitory effect on mushroom tyrosinase activity (IC₅₀, 47 M).

Key words – *Glycyrrhiza glabra*, tyrosinase, melanin polymer, flavonoid, isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether.

피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성된다. 멜라닌을 합성하는데 있어서의 출발물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosine은 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPAquinone으로 산화된다. 그 후 DOPAquinone이 DOPACHROME, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다.^{1,2,3} 종래, 이 반응의 유일한 율속단계는 tyrosinase가 촉매하는 step으로, 그 후의 반응은 자동산화에 의해 진행된다고 생각되고 있다. Tyrosinase는 상기한 바와 같이 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다.⁴ 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내에서의 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있으므로, 피부미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다. Tyrosinase 활성실험은 tyrosine hydroxylase 억제실험과

dopa oxidase 억제실험, 종합적인 멜라닌 합성 억제실험으로 구별되지만, tyrosinase hydroxylase 실험법과 멜라닌 합성 억제 실험은 방사성 동위원소를 이용하기 때문에 실험에 여러 가지 제약을 받으므로, 실제로는 DOPA를 기질로 하여 생성되는 DOPACHROME의 양을 측정하는 DOPA oxidase 저해실험을 채택하고 있다.⁵ 현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성 억제 물질로는 누룩곰팡이의 secondary metabolite인 kojic acid와 우바우르시葉으로부터 분리된 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 α -viniferin과 같은 stilbene계 화합물, ferulic acid와 같은 vinyl계통의 화합물, isoflavonoid류 등이 알려져 있다. 이 중 arbutin과 kojic acid는 미백제의 첨가제로 상용화되어 있다.

본 연구실에서는 천연미백제 개발을 목표로 피부의 melanin polymer 생합성에 key enzyme으로 작용하는 tyrosinase 활성을 억제하는 물질을 천연물로부터 탐색하기 위하여 문헌에 소개되고 있는 미백효과를 갖는 전통 한약은 물론, 전국 각지에서 무작위로 채집한 600여종의 고등식물을 확보하여 이들의 MeOH 추출물에 대하여 *in vitro*에서의 tyrosinase 활성 억제효과를 평가하여 data base화 하였다.⁶ 그 중 tyrosinase에 대한 억제 활성이 인정된 감초의 뿌리로부터 activity guided fractionation에 의하여 활성물질의 분리를 시도하였다.

감초 *Glycyrrhizae Radix*는 감초 *Glycyrrhiza glabra*의 뿌

*교신저자(E-mail) : seungho@yu.ac.kr
(FAX) : 053-811-3871

리와 주출경을 그대로 또는 주피를 제거한 것이다. 감초는 다년초이며 꽃은 연한 자주색으로 7~8월경에 총상화서로 달린다. 꽃받침은 종 모양이고 끝이 5개로 갈라진다. 열매는 협과로 납작한 선형이며 길이 3~4 cm, 너비 8 mm 가량이고 겉에 털이 별로 없다. 유세포 중에는 calcium oxalate의 단정과 전분립이 들어있다. 이 생약은 약간의 특이한 냄새가 나며, 맛은 달고 殘留性이다.⁷⁾ 감초의 성분은 대체로 triterpenoidal derivatives, flavone analogs, isoflavone계의 체계열로 구분된다. triterpenoid 계열로는 glycyrrhizin, liquoric acid, 18-β-glycyrrhetic acid, glycyrrhetol, uralenic acid, 24-hydroxyglycyrrhetic acid의 methylester, glabric acid가 분리되었고, isoflavone 계열로는 glycestrone, glycyrol, 5-O-methylglycyrol, isoglycyrol 외에 betulic acid도 분리되었으며, licoridin, 7-acetoxy-2-methylisoflavone, 7-methoxy-2-ethylisoflavone, 7-hydroxy-2-methyl soflavone도 함유되어 있다. flavone 계통으로는 liquiritigenin, liquiritin, neoliquiritin, liquirizide등이 분리되었다.⁸⁾ 감초의 생리활성으로는 18-β-glycyrrhetic acid의 3-acetylate 및 amide는 항궤양과 더불어 항염효과가 있으며, glycyrrhetic acid의 butyrate, salicylate는 항염증효과를 갖고 진통, 해열 효과가 있으며, glycyrrhetic acid의 hydrosuccinate는 상품화되어(carbenoxolone)있어 pyloric sphincter에 작용하여 강력한 항궤양작용을 나타낸다.⁸⁾

재료 및 방법

실험재료 - 시료로 사용한 감초의 뿌리는 1999년 11월에 대구시내 약전골목에서 구입하였고, MeOH extract의 TLC pattern 등을 통하여 예비실험시 사용한 시료와 같은 시료임을 확인하였으며, 충북대학교 이경순 교수로부터 감정을 받았고, 표본은 본대학의 표본실에 보관하고 있다(#960073).

시약 및 기기 - 용점은 Fisher-Johns의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000 (digital polarimeter)를 사용하였다. 자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였으며, HPLC는 Shimadzu의 LC-10A를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250 (250, 62.5 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하여 part per million (ppm) 단위로 나타내었다.

추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고

Table I. Inhibitory Effect of Solvent Fractions from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* on the Mushroom Tyrosinase Activity *in vitro*

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

정상은 silicagel (70-230 mesh, Merck), Sephadex LH-20 (25-100 μ, Sigma), MCI-gel CHP-20P (75-150 μ, Mitsubishi Chem. Co.), RP-18 (40-63 μm, Merck), Cosmosil (Nacalai tesque) 등을 사용하였다. 발색시약으로는 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다. Tyrosinase 활성시험에 사용된 시약은 mushroom tyrosinase (Sigma), L-tyrosine (Sigma), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) (Sigma) 등이며, buffer로는 Sodium-phosphate buffer를 사용하였다.

추출 및 분리 - 예비실험에서 감초의 MeOH ex를 CH₂Cl₂, EtOAc, H₂O로 분획하여 각 분획에 대한 효소활성 억제실험을 한 결과(Table I), 유기용매층에서의 효소활성억제효과가 우수한 것으로 확인되어 유기용매층을 활성분획으로 결정하였다 (Table I).

건조한 감초의 뿌리 10 kg을 MeOH로 상온에서 일주일씩 2회 반복 추출하여, 추출액을 감압농축하였다. MeOH 추출액을 증류수에 현탁시키고 동량의 ethyl acetate (EtOAc)를 가한 후 분획할때기로 수층과 EtOAc층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, 각각의 수층과 EtOAc층을 감압농축하여, EtOAc 분획과 H₂O 분획을 얻었다. 얻어진 EtOAc 분획 200 g을 silica gel column으로 다음과 같이 분획하였다. 지름 12 cm인 column에 silica gel을 60 cm 채우고 methylene chloride (MC)를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 이동상으로는 MeOH : MC=1 : 9 부터 MeOH의 비율을 10%씩 높이면서 유출시켜, 분획 1~3을 얻었다. 분획 1(105 g)을 지름 5 cm인 column에 MCI-gel CHP-20P를 40 cm 채우고, MeOH : H₂O=2 : 3 혼합용매를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 MeOH의 비율을 10% 단위로 높이면서 이동상을 유출시켜 분획 1-1부터 분획 1-4를 얻었다. 위 분획 중 분획 1-1 (39 g)은 지름 6 cm의 column에 silica gel을 40 cm 채운 뒤 MC로 column을 치환시키고, 시료를 silica gel 약 70 g에 흡착시켜 loading하였다. 먼저, 이동상을 10% acetone in MC부터 acetone 비율을 5%씩 증가시키면서 유출시켜 분획 1-1-1부터 1-1-3을 얻었다. 이들 분획중 분획 1-1-2를 MeOH-H₂O 혼합용매로 제

결정하여 comp. 1 (610 mg)을 얻고, 재결정하고 남은 모액은 지름 4 cm, 길이 60 cm인 column에 RP-18을 20 cm 채운 다음, MeOH : H₂O=1 : 1의 혼합용매로 column을 치환시킨 후 loading하였다. 그 후 MeOH : H₂O=1 : 1부터 MeOH의 비율을 5%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 comp. 2 (120 mg)를 분리, 정제하였다. 분획 1-3 (17 g)은 지름 5 cm인 column에 silica gel을 45 cm 채우고 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 silica gel에 coating하여 loading하였다. 이동상은 acetone : *n*-hexane=1 : 9부터 acetone의 비율을 10%씩 높여가면서 유출시켜 분획 1-3-1부터 1-3-3을 얻었다. 이들 중 분획 132 (2.27 g)를 지름 4 cm인 column에 cosmosil 35 cm를 채우고, MeOH : H₂O=1 : 1을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 MeOH : H₂O=1 : 1부터 MeOH의 농도를 10%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 comp. 3 (89 mg)을 얻었다. 분획 2 (34 g)는 MeOH-H₂O의 혼합용매로 재결정하여 comp. 4 (2.5 g)를 얻었고 그 모액은 지름 5 cm인 column에 cosmosil을 40 cm 채우고 100% H₂O를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 MeOH : H₂O=3 : 7부터 MeOH의 농도를 10%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 분획 2-1-1부터 2-1-3을 얻었다. 분획 2-1 (3.6 g)은 지름 4 cm의 column에 RP-18을 20 cm 채우고 100% H₂O를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 MeOH : H₂O=3 : 7부터 MeOH의 농도를 10%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 분획 2-1-1부터 2-1-3을 얻고, 분획 2-1-3을 MeOH-H₂O의 혼합용매로 재결정하여 comp. 5 (512 mg)를 얻었다. 또한 분획 2-2는 MCI-gel CHP-20P column을 이용하여 comp. 6 (10 mg)을 분리, 정제하였다. 분획 1-4 (34.3 g)는 지름 5 cm의 column에 silica gel을 45 cm 채우고 100% *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 silica gel에 coating하여 loading하였다. 그 후 acetone : *n*-hexane=1 : 9부터 acetone의 농도를 5%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 분획 1-4-1부터 1-4-6을 얻었다. 상기 분획 중 분획 1-4-4를 silica-gel column chromatography를 실시하여 (이동상 : acetone-hexane) comp. 7 (93 mg)을 분리, 정제하였다. 분획 1-4-2 (3.9 g)는 지름 4.5 cm의 column에 silica gel을 40 cm 채우고 MeOH : H₂O=1 : 1을 유출시켜 고정상을 균일하게 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 MeOH : H₂O=1 : 1부터 MeOH의 농도를 10%씩 높여가면서 이동상을 유출시켜 comp. 8 (110 mg)을 얻었다.

Mushroom Tyrosinase Assay에 의한 효소 활성측정¹⁵⁾
- DOPA oxidase의 활성측정은 DOPA를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 DOPochrome이

475 nm에서 흡광도를 나타내는 점을 이용하여 시행하였다. 즉, 일정한 반응조건에서 생성된 DOPochrome의 양을 A475 정량해서 tyrosinase의 활성을 측정하며 시료의 첨가에 의한 activity의 변화를 관찰하여 효소 활성저해 정도를 평가하였다. Vial에 L-tyrosine 900 μ l (0.96 g/ml), L-DOPA 90 μ l (0.012 g/ml)를 가하고, 시료는 MeOH-H₂O 혹은 DMSO-H₂O (1:1)에 용해시켜 최종농도가 각각 0, 10, 20, 50, 100, 200 g/ml이 되도록 하여 가한다. 각 반응액의 volume이 1890 μ l가 되도록 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer (50 mM, pH 6.8)를 가하고, tyrosinase (from mushroom, 3000 U/mg) 일정량을 buffer에 녹여 900 μ l를 가하여 전체 volume이 2790 μ l가 되도록 한다. 이때 blank에는 enzyme용액 대신 buffer 900 μ l를 넣어준다. 시료용액에 첨가된 MeOH 혹은 DMSO에 의한 enzyme 저해효과를 보정하기 위하여, 시료 대신에 시료용액의 volume에 해당하는 MeOH-H₂O 혹은 DMSO-H₂O (1:1) 용액을 만들어 control로 한다. 반응액을 37°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 ice bath 내에서 enzyme 반응을 정지시키고 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해율은 아래와 같이 계산하고, enzyme의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC₅₀ value로 한다.

저해율(%) =

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

Liquiritigenin (1) - ¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) : 2.85 (1H, dd, *J*=13.0, 16.9 Hz, H-3), 2.66 (1H, dd, *J*=2.9, 16.9 Hz, H-3), 5.34 (1H, dd, *J*=2.9, 13.0 Hz, H-2), 6.34 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H-8), 6.48 (1H, dd, *J*=2.3, 8.7 Hz, H-6),

Table II. Inhibitory Effect of Isolated Compounds from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* on the Mushroom Tyrosinase Activity *in vitro*

Compound No.	Compound name	IC ₅₀ value (M)
1	Liquiritigenin	200<
2	Isoliquiritigenin	200<
3	Isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether	47
4	Liquiritin	200<
5	Isoliquiritin	200<
6	Ononin	200<
7	Glycycoumarin	200<
8	Glycyrol	200<
Control	Kojic acid	15.4

6.81, 7.30 (each 2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2', 3', 5', 6'), 7.71 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CD_3OD) : 44.9 (C-3), 81.0 (C-2), 103.8 (C-8), 111.7 (C-6), 114.9 (C-10), 116.3 (C-3', 5'), 129.0 (C-2', 6'), 129.9 (C-5), 131.3 (C-1'), 158.9 (C-4'), 165.5 (C-9), 166.7 (C-7), 193.6 (C=O).

Isoliquiritigenin (**2**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : 6.28 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3'), 6.40 (1H, dd, $J=2.3, 8.8$ Hz, H-5'), 6.84 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3, 5), 7.59 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2, 6), 7.57 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H- α), 7.76 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H- β), 7.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6'), $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CD_3OD) : 102.8 (C-3'), 108.2 (C-5'), 113.7 (C-1'), 115.9 (C-3, 5), 117.3 (C- α), 126.9 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 132.4 (C-6'), 144.7 (C- β), 160.5 (C-4), 165.3 (C-2'), 166.5 (C-4'), 192.5 (C=O).

Isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether (**3**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : 3.85 (3H, s, OMe), 6.43 (2H, m, H-3', 5'), 6.87 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3, 5), 7.57 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H- α), 7.94 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2, 6), 8.02 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H- β). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CD_3OD) : 99.9 (C-3'), 109.2 (C-5'), 116.3 (C-3, 5), 116.7 (C-1'), 119.4 (C- α), 131.4 (C-1), 131.7 (C-6'), 132.1 (C-2, 6), 141.3 (C- β), 162.1 (C-2), 163.1 (C-4'), 163.5 (C-4), 56.2 (OMe), 191.7 (C=O).

Liquiritin (**4**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 2.66 (1H, dd, $J=2.7, 16.7$ Hz, H-3), 3.07–3.40 (5H, m, 2", 3", 4", 5" and H-3), 3.46 ((1H, dd, $J=5.4, 11.2$ Hz) and 3.68 (1H, dd, $J=3.8, 11.5$ Hz, H-6")), 4.88 (1H, d, $J=7.1$ Hz, H-1"), 5.52 (1H, dd, $J=2.5, 12.6$ Hz, H-2), 6.34 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.50 (1H, dd, $J=2.1, 8.7$ Hz, H-6), 7.06 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.44 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'), 7.64 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 78.9 (C-2), 43.4 (C-3), 190.2 (C-4), 132.6 (C-5), 110.8 (C-6), 164.9 (C-7), 102.8 (C-8), 163.3 (C-9), 113.8 (C-10), 132.6 (C-1'), 128.2 (C-2'), 116.4 (C-3'), 157.7 (C-4'), 116.4 (C-5'), 128.2 (C-6'), 100.5 (C-1"), 73.4 (C-2"), 76.8 (C-3") 69.9 (C-4"), 77.3 (C-5"), 60.9 (C-6").

Isoliquiritin (**5**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.19 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6'), 7.87 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H- α), 7.86 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2, 6), 7.76 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H- β), 7.07 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3, 5), 6.39 (1H, dd, $J=2.2, 9.0$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 4.98 (1H, d, $J=7.1$ Hz, H-1" of glc), 3.70 and 3.47 (2H, m, H-6"), 3.10–3.40 (4H, m, 2", 3", 4", 5"). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$) δ : 166.1 (C-2'), 165.4 (C-4'), 159.7 (C-4), 143.8 (C- α), 133.3 (C-6'), 131.1 (C-2, 6), 128.6 (C-1), 119.3 (C- β), 116.7 (C-3, 5), 113.3 (C-1'), 108.4 (C-5'), 102.8 (C-3'), 100.1 (C-1"), 77.4, 76.8, 73.4, 69.9 (C-2", 3", 4", 5"), 60.9 (C-6"), 191.8 (C=O).

Ononin (**6**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 8.43 (1H, s, H-2), 8.05 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 7.52 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 7.23 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 7.14 (1H, dd, $J=2.0, 8.8$ Hz, H-6), 6.99 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 5.09 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-1"), 3.78 (3H, s, -OMe), 3.10–3.80 (6H, m, 2", 3", 4", 5", 6"). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 74.9 (C-4), 175.0 (C-4), 161.7 (C-7), 159.2 (C-4'), 157.3 (C-9), 153.9 (C-2), 130.3 (C-2', 6'), 127.2 (C-5), 124.2 (C-3), 123.6 (C-1'), 118.7 (C-10), 115.8 (C-6), 113.8 (C-3', 5'), 103.6 (C-8), 100.2 (C-1"), 77.4, 76.7, 73.3, 69.8 (C-2", 3", 4", 5"), 60.8 (C-6"), 55.4 (OMe).

Glycycoumarin (**7**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, acetone- d_6) : 1.63, 1.75 (each 3H, s, $\text{CH}_3 \times 2$), 3.84 (3H, s, - OCH_3), 5.21 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2"), 6.40 (1H, dd, $J=2.4, 8.0$ Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.67 (1H, s, H-8), 7.20 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 7.94 (1H, s, H-4), 3.34 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-1"). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, acetone- d_6) δ : 161.1 (C=O), 159.7 (C-7), 158.7 (C-2'), 156.1 (C-4'), 155.7 (C-5), 153.5 (C-9), 137.1 (C-4), 131.7 (C-6'), 130.8 (C-3"), 122.7 (C-2"), 120.8 (C-3"), 118.9 (C-6), 114.2 (C-1'), 106.8, 106.7 (C-5', 10'), 103.1 (C-3'), 97.9 (C-8), 62.5 (OCH₃), 24.9 (C-5"), 22.4 (C-1"), 17.0 (C-4").

Glycyrol (**8**) – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.64 (3H, s, H-5'), 1.75 (3H, s, H-4'), 3.31 (2H, d, overlapped with H_2O , H-1'), 5.18 (1H, t, $J=6.1$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, s, H-4), 6.94 (1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-8), 7.15 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-10), 7.70 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 17.7 (C-5'), 22.0 (C-1'), 25.4 (C-4'), 62.3 (OMe), 98.5 (C-4), 99.2 (C-10), 99.7 (C-1a), 102.2 (C-6a), 114.0 (C-8), 114.3 (C-7a), 119.7 (C-2), 120.4 (C-7), 122.4 (C-2'), 130.8 (C-3'), 152.9 (C-4a), 153.8 (C-1), 156.1, 156.9 (C-9, 10a), 157.4, 158.1 (C-11a, 6), 159.4 (C-3).

결과 및 고찰

피부의 멜라닌 생성에 주효소로 작용하는 tyrosinase 활성을 억제하는 물질을 천연물로부터 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

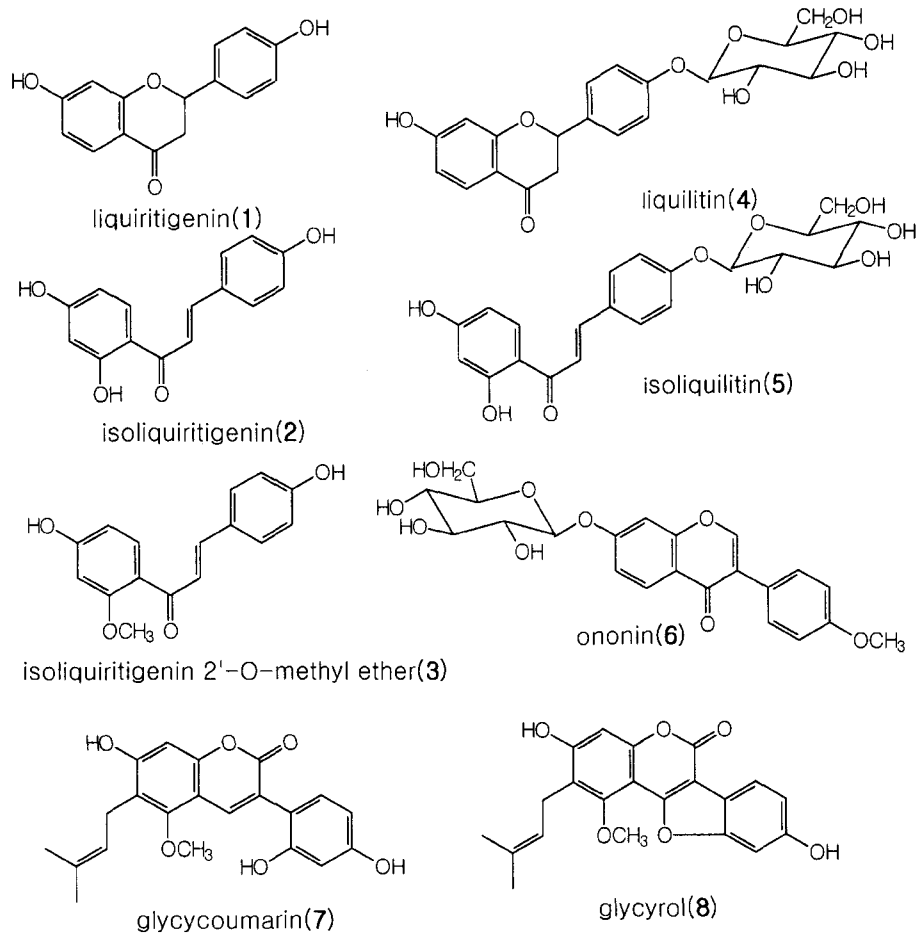


Fig. 1. Chemical structures of isolated components from the roots of *Glycyrrhiza glabra*.

본 연구실에서 확보하고 있는 600여종의 고등식물에 대한 효소활성 database를 토대로 tyrosinase 활성 억제효과가 뛰어난 감초의 뿌리를 MeOH로 추출하여 엑스를 만들고, EtOAc, H₂O로 분획하여 각각에 대한 활성을 검토한 결과, 유기용매 분획이 강한 활성을 보여 유기용매 분획에 대하여 활성물질의 분리를 시도하여 8종의 화합물을 분리하였다.

화합물 1은 백색 분말로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 주황색으로 발색하였다. ¹H-NMR spectrum에서는 aliphatic field에 methylene signal을 비롯하여 (δ 2.85) aromatic field에서는 δ 6.81, 7.30에 각각 두 개의 수소에 해당하는 A₂B₂ type의 1,4-2치환 benzene ring의 proton signal ($J=8.6$ Hz)들이 관찰되며 δ 7.71에 $J=8.7$ Hz로 o-coupling하고 있는 doublet, δ 6.48에 $J=2.3, 8.7$ Hz로 o- 및 m-coupling하고 있는 double doublet, δ 6.34에 $J=2.3$ Hz로 m-coupling하고 있는 doublet의 ABX type의 proton signal들이 관찰된다. ¹³C-NMR spectrum은 δ 193.6의 carbonyl carbon을 비롯하여 benzene ring에 oxygen bearing carbon signal이 3개(δ 158.9, 165.5, 166.7)가 관찰되고 80~135 ppm 사이에 10개

의 methine signal, 그리고 DEPT 135° spectrum에서 44.9의 methylene signal이 관찰되었다. 이상의 결과를 종합하여 본 화합물은 flavanone을 골격으로 하는 liquiritigenin으로 추정하고 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectral data를 표준품의 그것과 비교하여 liquiritigenin으로 결정하였다.¹⁰⁾

화합물 2는 황색 분말로 얻어졌으며, vanillin sulfuric acid 시약에 황색으로 발색하였다. ¹H-NMR spectrum에서는 aromatic field에서 δ 6.28에 $J=2.3$ Hz로 m-coupling하고 있는 doublet, δ 6.40에 $J=2.3, 8.8$ Hz로 o- 및 m-coupling하고 있는 double doublet, δ 7.94에 $J=8.8$ Hz로 o-coupling하고 있는 doublet의 ABX type의 signal들이 관찰되고, δ 6.84, 7.59에 각각 두 개의 수소에 해당하는 A₂B₂ type의 1,4-2 치환 benzene ring의 proton signal ($J=8.8$ Hz)들이 관찰되었다. 그리고 δ 7.57, 7.76에 trans-olefine type의 signal ($J=15.5$ Hz)들이 관찰되어 flavonoid의 C환이 개환된 chalcone 골격을 가진 화합물로 추정하였다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 192.5의 carbonyl carbon signal을 비롯하여 benzene ring에 산소가 결합된 signal이 3개 (δ 160.5, 165.3, 166.5)가

관찰되고 δ 100~150 사이에 11개의 methine signal들이 관찰되었다. 이상의 결과로 이 화합물을 isoliquiritigenin으로 추정하고 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품과 비교하여 isoliquiritigenin으로 결정하였다.¹¹⁾

화합물 3은 황색 분말로 얻어졌으며 vanillin sulfuric acid 시약에 분홍색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 comp. 2의 $^1\text{H-NMR}$ 과 매우 유사한 pattern을 보이고 있으나 aliphatic field의 δ 3.85에 methoxyl group으로 보이는 signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 모두 16개의 carbon signal이 관찰되었는데, methoxyl기를 제외하고 산소가 결합된 carbon signal이 comp. 1과 같이 3개(δ 162.1, 163.1, 163.5)가 관찰되는 것으로 보아 isoliquiritigenin에 결합된 hydroxyl기 중의 어느 하나가 methoxyl기로 치환된 것으로 추정하고, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품의 문헌치와 각종 spectral data를 비교하여 isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether로 결정하였다.¹²⁾

화합물 4는 백색 무정형 분말로 얻어졌으며 vanillin sulfuric acid 시약에 황색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 signal pattern이 화합물 1의 그것과 유사하나, 각 spectrum의 aliphatic region에서 당에 기인한 signal들이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 산소가 결합된 carbon signal이 3개(δ 157.7, 163.3, 164.9)가 관찰되는 것으로 보아 liquiritigenin에 결합되어 있는 3개의 hydroxy기 중 하나에 당이 ether결합되어 있는 것으로 추정하였다. 당의 종류를 확인하기 위하여 comp. 4를 8% 염산-dioxane용액으로 가수분해하여 liquiritigenin과 glucose를 co-TLC로 확인하였다. HMBC spectrum에서는 glucose의 anomeric proton과 4' 위의 carbon signal이 coupling하는 cross peak를 관찰할 수 있었다. 이를 종합하여 본 결과 liquiritigenin의 4' 위에 glucose가 결합된 liquiritin으로 결론짓고, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품의 문헌치와 비교하여 결정하였다.¹³⁾

화합물 5는 담황색 무정형 분말로 얻어졌으며, vanillin sulfuric acid 시약에 주황색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 signal pattern이 화합물 2의 그것과 유사하나, 각 spectrum의 aliphatic region에서 당에 기인한 signal들이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 산소가 결합된 carbon signal이 3개(δ 159.7, 165.4, 166.1)가 관찰되는 것으로 보아 liquiritigenin에 결합되어 있는 3개의 hydroxyl기 중 하나에 당이 ether결합되어 있는 것으로 추정하였다. 당의 종류를 확인하기 위하여 화합물 5를 화합물 4에서와 같은 방법으로 산 가수분해하여 liquiritigenin과 glucose를 co-TLC로 확인하였다. HMBC spectrum에서는 glucose의 anomeric proton과 4위의 carbon signal이 coupling하는 cross peak를 관찰할 수 있었다. 이를 종합하여 본 결과 liquiritigenin의 4

위에 glucose가 결합된 isoliquiritin으로 결론짓고, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품의 그것과 비교하여 결정하였다.¹⁴⁾

화합물 6은 백색 무정형 분말로 얻어졌으며, $^1\text{H-NMR}$ 에서는 aliphatic field에서 1개의 methoxyl기(δ 3.78)를 비롯하여 aromatic field에서 한 개의 singlet proton signal (δ 8.43), 6.99, 7.52에 각각 두 개의 수소에 해당하는 A_2B_2 type의 1,4-치환 benzene ring의 proton signal ($J=8.6$ Hz)들이 관찰되며 8.05에 $J=8.8$ Hz로 o-coupling하고 있는 doublet, δ 7.14에 $J=2.0$, 8.8 Hz로 o- 및 m-coupling하고 있는 double doublet, δ 7.23에 $J=2.0$ Hz로 m-coupling하고 있는 doublet의 ABX type signal들이 관찰되고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 aliphatic region에 당에 기인한 signal들이 관찰된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 175.0의 carbonyl carbon을 비롯하여 benzene ring에 산소가 결합되어 있는 carbon signal이 4개(δ 153.9, 157.3, 159.2, 161.7)가 관찰되어 이상의 결과로 comp. 6은 4-methoxyphenylchromone의 골격을 갖는 것으로 추정된다. 4-Methoxyphenyl group의 결합위치는 chromone핵의 2 혹은 3위로 추정되나, 2위에 귀속되는 proton signal이 δ 8.43으로 매우 저자장 shift하여 4-methoxyphenyl group은 chromone 핵의 3위에 결합된 것으로 결론지었다. HMBC spectrum에서 당의 anomeric proton과 chromone의 7위의 carbon이 coupling하는 cross peak를 확인할 수 있었으며, methoxyl proton과 4'위의 carbon이 coupling하는 cross peak를 확인할 수 있었다. 따라서 formononetin의 7위에 hydroxyl기 대신 glucose가 ether 결합된 ononin이라고 결론짓고 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 표품의 그것과 비교하여 결정하였다.^{13,15)}

화합물 7은 황색 분말로 얻어졌으며, vanillin sulfuric acid 시약에 보라색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 2개의 독립된 methyl proton signal (δ 1.63, 1.75)이 관찰되고, 1개의 geminal methylene proton signal (δ 3.34)과 저자장 shift하여 관찰되는 methine proton signal (δ 5.21)이 coupling하는 것이 관찰되고, 동시에 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 signal pattern으로 볼 때 isoprenyl기(δ 17.0, 22.4, 24.9, 122.7, 130.8)의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 aliphatic region에서 methoxyl기에 해당하는 proton signal (δ 3.84)이 관찰되었다. Aromatic region에서는 7.20에 $J=8.0$ Hz로 o-coupling하고 있는 doublet, δ 6.40에 $J=2.4$, 8.0 Hz로 o- 및 m-coupling하고 있는 double doublet, δ 6.46에 $J=2.4$ Hz로 m-coupling하고 있는 doublet이 관찰되어, 1,2,4-trisubstituted benzene ring의 존재를 추정할 수 있었다. 상기한 부분을 뺀 나머지 $^{13}\text{C-NMR}$ signal들과 aromatic region의 singlet proton signal 2개(δ 6.67, 7.94)를 종합적으로 미루어볼 때 coumarin에 1,2,4-3치환

benzene ring과 isoprenyl기, methoxyl기가 결합된 화합물로 추정하였다. HMBC spectrum에서 methoxyl proton과 5위의 carbon이 coupling하는 cross peak를 관찰할 수 있었으며, 동시에 5위의 carbon과 1" proton이 coupling하는 cross peak를 관찰할 수 있었다. 또 9위의 carbon이 4위, 8위의 singlet proton과 coupling하는 cross peak가 확인되었다. 이들 관계를 종합하여 본 결과, 이 화합물을 glycycomarin으로 결론 짓고 표품의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectral data를 비교하여 glycycomarin으로 결정하였다.¹⁶⁾

화합물 8은 백색 무정형 분말로 얻어졌으며, $^1\text{H-}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectrum에서 1,2,4-trisubstituted benzene ring, isoprenyl group, methoxyl group의 signal pattern이 관찰되는 등, 전체적인 signal pattern이 화합물 7의 그것과 유사하였다. 화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectrum을 화합물 8의 그것과 비교할 때, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 aromatic field에 존재하던 singlet signal 2개 중 하나가 소실됨이 관찰되었고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 aromatic field에 나타났던 11개의 signal 중 하나가, 160 ppm 근처로 저자장 shift한 것을 관찰할 수 있었다. 그리하여 이와 관련된 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectral data를 비교하여 glycyrol로 결정하였다.¹⁷⁾

분리된 화합물의 tyrosinase 활성 억제효과는 kojic acid를 비교물질로 하여 측정하였으며 결과를 Table 2에 나타내었다. 분리된 화합물 중 isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether의 효소활성억제효과가 가장 우수한 것으로 나타났으나, 분리된 화합물 모두 kojic acid 보다는 약한 활성을 나타내었다.

결 론

피부의 멜라닌 생성에 주효소로 작용하는 tyrosinase 활성을 억제하는 물질을 천연물로부터 탐색하기 위하여 본 연구를 수행하여 8종의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 각각 각종 spectral data의 검토결과 liquiritigenin (1), isoliquiritigenin (2), isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether (3), liquiritin (4), isoliquiritin (5), ononin (6), glycycomarin (7), glycyrol (8)로 동정하였다. 이들 중 tyrosinase 활성억제효과는 isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether가 가장 강했으며 IC_{50} value는 47 M이었다.

사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(00-PJ1-PG3-21600-0010)에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

1. 고재숙, 하병조, 피부과학, **73**: 수문사.
2. G. Prota (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.*, **75**: 122.
3. S. Pavel, F. A. Muskiet (1983). Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report, *Cancer Detection and Prevention*, **6**: 311.
4. V. J. Hearing, M. Jimenez (1987). Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**(12): 1141.
5. M. Matsukami (1995). Evaluation of antimelanogenic Effects, **19**(1): 14.
6. Y. S. Kim (1997). Inhibitory effect of Herbal Extracts on DOPA Oxidase Activity of Tyrosinase. *Natural Product Sciences*, **3**(2): 111.
7. 배기환, 韓國의 藥用植物, 敎學社, 252.
8. 生藥學研究會 著, 現代生藥學, 學窓社, 186.
9. J. D. Laskin, L. A. Piccinini (1986). Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**(35): 16626.
10. D. M. X. Donnelly and J. C. Thompson (1973). *Dalbergia* Species. Part IX. Phytochemical Examination of *Dalbergia stevensonii* Standl, *Journal of chemical society Perkin Transaction I*, **1**: 1737.
11. K. R. Markham (1976). $^{13}\text{C-NMR}$ of Flavonoids-II (flavonoids other than flavone and flavonol aglycones), *Tetrahedron*, **32**: 2607.
12. H. Achenbach, M. Stocker, and M. A. Constenla (1988). Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*, *Phytochemistry*, **27**(6): 1835.
13. T. Nakanishi, A. Inada, K. Kambayashi, and K. Yoneda (1985). Flavonoid Glycosides of the Roots of *Glycyrrhiza uralensis*, *Phytochemistry*, **24**(2): 339.
14. E. Wong (1968). *Phytochemistry*, **5**: 463 (1966); **7**: 2123, 2131, 2139.
15. A. F. Barrero, J. F. Sanchez (1989). Resorcinol Derivatives And Other Components of *Ononis speciosa*, *Phytochemistry*, **28**(1): 161.
16. S. Demizu, K. Kajiyama, K. Takahashi (1988). Antioxidant and Antimicrobial Constituents of Licorice : Isolation and Structure Elucidation of a New Benzofuran Derivative, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(9): 3474.
17. T. Shiozawa, S. Urata, T. Kinoshita, and T. Saitoh (1989). Revised structures of Glycyrol and Isoglycyrol, Constituents of the Root of *Glycyrrhiza uralensis*, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**: 2239.

(2003년 1월 27일 접수)