

## 대극과 식물로부터 분리한 천연폴리페놀의 멜라닌 생성 억제효과

김정아 · 최지영 · 손애량 · 박성희 · 허광화 · 이종구 · 오인석  
김진준 · 장현욱 · 정시련 · 장태수<sup>1</sup> · 이승호\*  
영남대학교 약학대학, <sup>1</sup>서라벌대학교 피부미용과

### Inhibitory Effect of Some Natural Polyphenols Isolated from Euphorbiaceae Plants on Melanogenesis

Jeong Ah Kim, Ji Young Choi, Ae Ryang Son, Sung Hee Park, Guang Hua Xu,  
Jong Gu Lee, In Suk Oh, Jin Joon Kim, Hyun Wook Chang,  
See Ryun Chung, Tae Soo Jang<sup>1</sup>, and Seung Ho Lee\*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea  
<sup>1</sup>Department of Cosmetics, Sorabol College, Kyongju 780-250, Korea

**Abstract** – Twenty two polyphenols containing ten gallotannins, seven ellagitannins, two phenylpropanoids and three stilbenes isolated from the higher plants were tested inhibitory effects on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines. Among the tested samples, 1-desgalloyleugenin exhibited the most potent inhibitory effect on melanogenesis in cultured cell lines.

**Key words** – Polyphenols, tannins, stilbenes, phenylpropanoids, melanogenesis, 1-desgalloyleugenin

대극과(Euphorbiaceae) 식물은 열대, 아열대에 넓게 분포하고 있고 그 종류는 300속, 7500종에 이르며, 그 중에는 약용식물로서 중요한 것이 많고 또 탄닌의 자원으로써도 중요한 식물군이다.<sup>1)</sup> *Euphorbia*속 식물은 아열대를 중심으로 2000종이 분포하고 있고 줄기와 잎에 상처를 내면 흰색의 유액을 내는 것이 특징이다. 옛날부터 하제, 이노제, 통경약, 진통약, 해독약, 수렴약 등으로 이용되고 있지만 독성 때문에 사용에 주의를 요하는 것이 많다.<sup>2)</sup> 성분연구는 저분자의 phenol류, terpenoid, polyphenol에 관한 것이 주로 분리, 보고되어 있고, 특히 유액에 함유되어 있는 phorbol ester류가 다수 보고되어 있다.

피부에 존재하는 흑색색소인 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있으며, 표피세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 key enzyme으로 하여 tyrosine으로부터 생합성 되어 피부의 국소에 melanin이 과다하게 침착되어 발생하는 주근깨, 검버섯 등의 원인이 된다.<sup>3)</sup> Melanocyte 안에서 melanin 색소 생산에 관여하

는 인자로는 tyrosinase<sup>4)</sup> 이외에도 각종 prostaglandin류,<sup>5)</sup> interferon,<sup>6)</sup> melanocyte stimulating hormone(MSH),<sup>7,8)</sup> vitamin D<sub>3</sub>,<sup>9)</sup> histamine, gene expression에 관여하는 인자<sup>10)</sup> 등이 보고 되었다. Melanin 생성 억제 물질의 탐색법으로는 tyrosinase 활성저해실험, 배양색소세포를 이용한 실험, 실험 동물에서의 *in vivo* 실험, 사람피부를 대상으로 한 실험 등이 실시되고 있으며, 그 중 melanin 합성의 key enzyme인 tyrosinase 활성저해실험이 melanin 중합체 억제제 개발의 초기 단계에서 채택되고 있다.<sup>11)</sup> 그러나 최근 melanin 생성이 tyrosinase에 의한 산화반응 뿐만 아니라, 여러 가지 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 밝혀졌고, 또한 *in vitro*에서의 tyrosinase 활성 억제물질이 melanoma cell lines에서는 활성이 전혀 나타나지 않는 등의 문제로 melanin 생성을 종합적으로 억제하는 물질의 개발이 요구되고 있다.<sup>12)</sup> 현재 까지 천연물에서 분리된 melanin 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol,<sup>13)</sup> 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*)의 secondary metabolite인 kojic acid,<sup>14)</sup> 우마우르시엽(Uvae Ursi Folium)의 arbutin,<sup>15)</sup> 상백피의 oxyresveratrol, dihydromorin, artocarbene, 4-

\*교신처자(E-mail) : seungho@yu.ac.kr  
(FAX) : 053-810-4654

prenyloxyresveratrol<sup>16)</sup> 등이 있다.

그러나 최근의 연구 보고에 의하면 melanin의 생합성은 tyrosinase뿐만 아니라, melanocyte stimulating hormone (MSH), 염증반응에 관여하는 각종 cytokine류, gene expression에 관여하는 인자 등 복잡한 요인들에 의해 진행 된다는 것이 밝혀졌다. 따라서 피부의 melanin 생성을 억제 하는 물질의 개발은 종래에 주로 이용되던 tyrosinase 활성 억제물질의 개발 뿐만 아니라 melanocyte에서 종합적으로 melanin 생성을 억제하는 물질의 개발에 초점이 맞추어지고 있다.

본 연구자들은 천연물로부터 미백화장품의 첨가제로 이 용할 수 있는 물질을 개발하기 위하여 대극과 식물로부터 분리한 천연 폴리페놀 물질들에 대한 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제실험을 수행하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

**실험 재료** - 실험에 사용된 천연 polyphenol은 본 연구실에서 다년간에 걸쳐 고등식물로부터 분리한 것을 사용하였으며, 각각의 시료는 각종 spectral data를 문헌에 소개되어 있는 문헌치와 비교하여 구조를 확정하였고 표품은 본 연구실에 보관중이다.

**기기 및 시약** - 용점은 Fisher-Johns의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000(digital polarimeter, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250 (250 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. EIMS spectrum은 Micromass mass spectrometer(AUTOSPEC, UK)를 사용하였다. 추출 및 분리용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 Sephadex LH-20 (25 - 100 μ, Sigma), MCI-gel CHP-20P(75 - 150 μ, Mitsubishi Chem. Co.), RP-18(40 - 63 μm, Merck), Toyopearl HW-40F(Tosho), Cosmosil (Nacalai tesque) 등을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, 1% FeCl<sub>3</sub>/ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5 N perchloric acid,

cold ethanol/ethyl ether(3:1), 1 N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer이다.

**시료물질의 분리** - 실험에 사용된 시료물질은 대극과의 등대초(*Euphorbia helioscopia*), 암대극(*E. jolkinii*), 사초과의 산거울(*Carex humilis*), 마디풀과의 대황(*Rheum palmatum*), 녹나무과의 계피(*Cinnamomum cassia*) 등 5종의 고등식물로부터 분리한 것을 사용하였다. 건조한 시료식물(5 kg)을 80% 수성아세톤으로 상온에서 1주일간 3회 반복 추출하였다. 추출물은 감압 하에서 아세톤을 농축 증발시켰다. 여액은 재차 농축하여 실온에서 방치하고 생성되는 침전물은 감압 여과하여 제거하고 여액을 Sephadex LH-20 column에 loading하였다. Column은 처음에 물로 충분히 씻은 후에 MeOH-H<sub>2</sub>O 용액(0, 20, 40, 60, 80, 100%)으로 용출시켜 분획하였다. 분획물은 1% FeCl<sub>3</sub> ethanol 시액으로 확인하여 양성 반응을 나타내는 분획에 대하여 MCI-gel CHP 20P, Fujigel ODS3, RP-18, Cosmosil, Toyopearl HW40F 등의 reverse phase column을 사용하여 polyphenol 만을 분리하였다. 분리된 화합물은 NMR, UV, IR 등 각종 spectral data의 검토를 통하여 구조를 추정한 후 문헌치와 비교하여 구조를 확정하였다.

**Melanin 생성 억제활성 평가** - B-16 mouse melanoma cell lines을 이용한 melanin 생성 억제 활성의 평가법은 시료가 세포수준에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 정량적으로 평가하는 방법으로, 시료를 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은(control) 배양세포로부터 멜라닌을 추출해서 alkali에 녹여 비색법으로 정량하였다. 즉, B-16 mouse melanoma cell lines을 EMEM(10% fetal FCS) 배지를 사용하여 T-75 culture flask에서 confluence가 될 때까지 배양한 후, culture dish에 cell number가 1 × 10<sup>6</sup>/dish 이상이 되도록 seeding 한 후 1일간 더 배양하였다. 시험물질을 working concentration의 100배 이상으로 제조하여 0.5% DMSO 또는 ethanol 등의 용매에 녹인 후 10 μg/ml과 30 μg/ml의 농도로 첨가하여 1일간 배양하였다. 배지를 교환한 후 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌의 양을 정량하였다. 정량은 배지를 버린 후 Trypsin-EDTA (0.25/0.02%) 용액 1 ml로 처리 한 후 microcentrifuge tube에 옮겼다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 육안으로 control과 비교하였다. 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 후 최종농도가 0.5 N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 후 상등액을 버렸다. 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether(3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시켰다. 건조물에 1 N NaOH 용액 1 ml를 첨가한 후 5분간 끓는 물에서 처리

하여 멜라닌을 녹인 다음 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다.

**Compound 1** – Gallic acid(**1**)<sup>17</sup>: 무색침상정(H<sub>2</sub>O), mp 270–272°C, IR<sub>v</sub><sub>max</sub><sup>KBr</sup> cm<sup>-1</sup>: 1650 (COO).

**Compound 2** – 1-O-galloyl-β-D-glucose(**2**)<sup>18</sup>: 무색침상정(H<sub>2</sub>O), mp 205°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-21.5° (c 0.6, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 5.68 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.16 (2H, s, galloyl H).

**Compound 3** – 1,6-Di-O-galloyl-β-D-glucose(**3**)<sup>18</sup>: 무색침상정(H<sub>2</sub>O), mp 203–205°C, [α]<sub>D</sub><sup>27</sup>-23.0° (c 0.6, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 4.36 (1H, dd, *J*=4, 12 Hz, glc-6), 4.60 (1H, dd, *J*=2, 12 Hz, glc-6), 5.72 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.12, 7.16 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 4** – 1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose(**4**)<sup>18</sup>: 담황색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>+32.0° (c 0.6, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 5.44 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.64 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.10 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.02, 7.10, 7.12 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 5** – 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose(**5**)<sup>18</sup>: 무색침상정(H<sub>2</sub>O), mp 229–232°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-85.0° (c 0.6, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 5.28 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.98 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.08, 7.12, 7.16 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 6** – 3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose(**6**)<sup>19</sup>: 백색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>24</sup>-77.4° (c 1.0, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.65 (d, *J*=8 Hz, -glc-2), 3.87 (dd, *J*=4, 10 Hz, -glc-2), 4.00–4.65 (3H in total, m, glc-5, 6), 4.90 (d, *J*=8 Hz, -glc-1), 5.30 (d, *J*=4 Hz, -glc-1), 5.74 (t, *J*=10 Hz, -glc-3), 7.02, 7.04, 7.05, 7.16, 7.17 (6H in total, each s, galloyl H).

**Compound 7** – 1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-D-glucose(**7**)<sup>18</sup>: 무색침상점, mp. 198–200°C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>+32.8 (c=0.9, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): 4.61 (1H, brs, glc-6), 5.49 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.68 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.18 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.00, 7.07, 7.08, 7.18 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 8** – 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose(**8**)<sup>18</sup>: 담황색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>+18.0° (c 0.8, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): 5.66 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.69 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-4), 6.05 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.32 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.00, 7.03, 7.08, 7.10, 7.16 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 9** – 2-O-galloyl-D-galactose(**9**)<sup>20</sup>: 담황색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>27</sup>+68.2° (c 0.9, acetone). <sup>1</sup>H-NMR (270

MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 3.60–4.20 (4H in total, m, gal-3, 4, 5, 6), 4.74 (d, *J*=8 Hz, -gal-1), 5.14 (dd, *J*=4, 10 Hz, -gal-2), 5.16 (dd, *J*=7, 8 Hz, -gal-2), 5.40 (d, *J*=4 Hz, -gal-1), 7.15, 7.19 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 10** – 3-O-galloyl quinic acid(**10**)<sup>20</sup>: 담황색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-39.2° (c 0.2, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 1.80–2.40 (4H in total, m, H-2, 6), 3.85 (1H, dd, *J*=3, 9 Hz, H-4), 4.20 (1H, m, H-5), 5.43 (1H, m, H-3), 7.15 (2H, s, galloyl H).

**Compound 11** – Acetonylgeraniin(**11**)<sup>21</sup>: 무색분말(H<sub>2</sub>O), mp 220–222°C (dec.), [α]<sub>D</sub><sup>24</sup>-133.0° (c 1.0, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.97, 3.60 (each 1H, d, *J*=16 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.39 (1H, dd, *J*=10, 12 Hz, glc-6), 4.70–4.90 (2H in total, m, glc-5, 6), 4.94 (1H, s, DHHDP-1), 5.46–6.00 (3H in total, m, glc-2, 3, 4), 6.32 (1H, s, DHHDP-3), 6.58 (1H, br s, glc-1), 6.67, 7.08 (each 1H, s, HHDP-H), 7.18 (2H, s, galloyl H), 7.22 (1H, s, DHHDP-3').

**Compound 12** – Jolkinin(**12**)<sup>22</sup>: 담갈색무정형분말, [α]<sub>D</sub><sup>28</sup>-55.4° (c 0.7, acetone + H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ: 2.59 (1H, s, H-3), 3.74 (2H, d, *J*=5 Hz, H-6'), 4.37 (1H, t, *J*=5 Hz, H-5'), 4.45 (1H, dd, *J*=9, 11 Hz, glc-6), 4.76 (1H, t, *J*=11 Hz, glc-6), 4.85 (1H, s, H-1), 5.05 (1H, t, *J*=9 Hz, glc-5), 5.17 (1H, d, *J*=4 Hz, glc-4), 5.25 (1H, d, *J*=1 Hz, glc-2), 6.23 (1H, br s, glc-3), 6.37 (1H, s, glc-1), 6.69, 7.02 (each 1H, s, HHDP-H), 6.95 (1H, s, H-3''), 7.15 (2H, s, galloyl H).

**Compound 13** – Carpinusin(**13**)<sup>23</sup>: 담황색분말(H<sub>2</sub>O), mp 238–239°C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>+34.4° (c 1.0, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.06, 4.12 (1H in total, each d, *J*=12 Hz, glc-6), 4.50–4.80 (1H, m, glc-5), [5.01(d, *J*=2 Hz), 5.24(s), DHHDP-1], 5.30–5.60 (2H in total, m, glc-2, 4), 6.08 (1H, m, glc-3), 6.26 (1H, br s, glc-1), [6.27(d, *J*=2 Hz), 6.57(s), DHHDP-3], 6.89, 6.91 (each 1H, s, HHDP-H), 7.18 (2H, s, galloyl H), 7.29 (1H, s, DHHDP-3').

**Compound 14** – Tercatain(**14**)<sup>20</sup>: 무색분말(H<sub>2</sub>O), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-71.0° (c 1.0, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.20–4.40 (2H, m, glc-2, 5), 4.57 (1H, dd, *J*=4, 13 Hz, glc-6), 4.68 (1H, dd, *J*=6, 13 Hz, glc-6), 5.00 (1H, br s, glc-3), 5.80 (1H, d, *J*=3 Hz, glc-4), 6.31 (1H, d, *J*=4 Hz, glc-1), 6.78, 6.88 (each 1H, s, HHDP-H), 7.18, 7.21 (each 2H, s, galloyl H).

**Compound 15** – 1-Desgalloyleugenin(**15**)<sup>24</sup>: 담황색무정

형분말,  $[\alpha]_D^{24} + 100.8^\circ$  (c 1.3, acetone).  $^1\text{H-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 3.38, 3.87 (each d,  $J=13$  Hz, glc-6), 5.14 (d,  $J=8$  Hz, -glc-1), 5.57 (d,  $J=4$  Hz, -glc-1), 5.60 (t,  $J=9$  Hz, -glc-3), 5.89 (d,  $J=10$  Hz, -glc-3), 6.51, 6.52, 6.67 (2H in total, each s, HHDP-H), 6.97, 7.02, 7.08, 7.09 (4H in total, each s, galloyl H).

**Compound 16** – Helioscopin B(16)<sup>20</sup>: 백색분말( $\text{H}_2\text{O}$ ), mp 259–261°C,  $[\alpha]_D^{25} + 45.7^\circ$  (c 0.4, acetone).  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz, acetone- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 2.26 (1H, d,  $J=19$  Hz, ela-3), 3.14 (1H, dd,  $J=2, 19$  Hz, ela-3), 4.00 (1H, dd,  $J=5, 10$  Hz, glc-6), 4.35–4.37 (4H in total m, ela-4", 5", 6"), 5.04 (1H, br d,  $J=3$  Hz, glc-3), 5.39 (1H, d,  $J=5$  Hz, glc-2), 5.72 (1H, d,  $J=2$  Hz, ela-1), 6.35 (1H, br d,  $J=3$  Hz, glc-4), 6.68 (1H, d,  $J=5$  Hz, glc-1), 7.10, 7.23, 7.25 (each 2H, s, galloyl H), 7.32 (1H, s, ela-3').

**Compound 17** – Excoecarianin(17)<sup>23</sup>: 황색무정형분말,  $[\alpha]_D^{24} + 12.2^\circ$  (c 0.9, acetone).  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz, acetone- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : [4.16, 4.34 (each 1H, dd,  $J=7, 10$  Hz), 4.53, 4.60 (3H in total, m), 4.72 (1H, dd,  $J=9, 10$  Hz), glc-5, 5', 6, 6'], 4.92 (d,  $J=2$  Hz, DHHDP-1), 5.12 (1H, br s, glc-3'), 5.15 (s, DHHDP-1), 5.28 (1H, d,  $J=3$  Hz, glc-2'), [5.35 (d,  $J=4$  Hz), 5.45 (s), 5.54–5.57 (m), 3H in total, glc-2, 3, 4], 5.75 (1H, d,  $J=3$  Hz, glc-4'), 6.24 (d,  $J=2$  Hz, DHHDP-3), 6.40 (1H, d,  $J=4$  Hz, glc-1'), 6.53 (s, DHHDP-3), 6.54 (1H, d,  $J=6$  Hz, glc-1), 6.40, 6.79, 7.00, 7.07, 7.12 (each 1H, s, HHDP and val H), 7.02, 7.15, 7.16 (each 2H, s, galloyl H), 7.20, 7.26 (each s, DHHDP-3').

**Compound 18** – Coniferaldehyde(18)<sup>25</sup>:  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9.70 (1H, s, aldehyde-H), 7.55 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7), 7.30 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2), 7.15 (1H, dd,  $J=1.5, 8.0$  Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.75 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8), 3.85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

**Compound 19** – Methyl 3,4-dihydroxycinnamate(19)<sup>26</sup>:  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.55 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7), 7.30 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2), 7.15 (1H, dd,  $J=1.5, 8.0$  Hz, H-6), 6.85 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.70 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8), 3.90 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ).

**Compound 20** – Rhapontigenin(20)<sup>27</sup>: 백색 침상결정 ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ )  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.00 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2'), 6.96 (1H, dd,  $J=1.5, 9.0$  Hz, H-6'), 6.92 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 9.91, 6.62 (each 1H, d,  $J=16$  Hz, olefinic H), 6.38 (2H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2,6), 6.12 (1H, m, H-4), 3.78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

**Compound 21** – Rhaponticin(21)<sup>27</sup>: 담황색 침상결정

( $\text{MeOH}$ ),  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.02 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2'), 6.97 (1H, dd,  $J=1.5, 9.0$  Hz, H-H-6'), 6.72 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 7.04, 6.84 (each 1H, d,  $J=16$  Hz, olefinic H), 6.72, 6.57 (each 1H, br s, H-2,6), 6.34 (1H, m, H-4), 4.30 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, aromatic H), 3.78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.2–3.9 (5H in total, m, glc-H).

**Compound 22** – Viniferin(22)<sup>28</sup>: 담황색 무정형 분말,  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : Unit I  $\delta$  3.97 (1H, br s, H-3), 5.99 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-5), 6.08 (1H, br s, H-2), 6.22 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-7), 6.72 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3',5'), 7.03 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-2',6'), Unit II  $\delta$  4.71 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-3), 5.95 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-2), 6.26 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-7), 6.72 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-5), 6.77 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3',5'), 7.22 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-2',6'), Unit III  $\delta$  4.62 (1H, d,  $J=6.5$  Hz, H-3), 4.90 (1H, d,  $J=6.5$  Hz, H-2), 6.22 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-7), 6.60 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-5), 6.79 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3',5'), 7.05 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-2',6').

## 결과 및 고찰

등대폴등 4종의 식물로부터 분리한 phenolic compounds에 대하여 B-16 mouse에서의 melanin 생성 억제 활성을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 kojic acid를 비교물질로 하여 검토하였다(Table I).

실험에 사용된 물질은 polyphenol류로 가수분해형 탄닌 및 관련화합물 17종(1-17), phenylpropanoid류 2종(18,19), stilbene류 3종(20,22)이었다(Fig. 1).

가수분해형탄닌 중에서 gallic acid(1) 단독으로는 melanin 생성 억제활성을 나타내지 않았으며, gallotannin(2-10)에서는 sugar moiety가 glucose인 경우(2-8)가 그렇지 않은 경우(9,10)에 비하여 비교적 강한 melanin 생성 억제활성을 보였고, 당 부분이 glucose인 경우에는 anomer 탄소가 free인 3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose(6)가 그렇지 않은 경우보다 강한 활성을 나타내었다. 또한 sugar에 결합한 galloyl group의 수가 증가할수록 강한 활성을 보였다. Ellagitannin(11-17)은 1-desgalloyl eugenin(15)을 제외하고는 전반적으로 gallotannin에 비하여 낮은 활성을 나타냈다. Sugar 부분에 있어서 anomeric center가 free인 경우(15)가 그렇지 않은 경우에 비하여 강한 활성을 나타낸 것은 gallotannin의 경우와 같았으며, (S)-hexahydroxydiphenoyl group(HHDP)이 glucose의 1,6위치(13,16)나 3,6위치(11,12,14)에 결합한 경우에 양자에 있어서의 활성의 차이는 별로 없었다. Glucose의 1,6이나 3,6위치의 결합양식에 상관없이 2,4위치에 bulky group을 가

**Table I.** Inhibitory effects of some natural products on the melanogenesis in B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro*

Compound name	Inhibition rate (%)		Source
	10 µg/ml	30 µg/ml	
Gallic acid(1)	–	–	EH, EJ
1-O-Galloyl-β-D-glucose(2)	–	10	EH, EJ
1,6-Di-O-galloyl-β-D-glucose(3)	–	–	EH
1,2,3-Tri-O-galloyl-β-D-glucose(4)	–	20	EH
1,2,6-Tri-O-galloyl-β-D-glucose(5)	–	20	EH, EJ
3,4,6-Tri-O-galloyl-D-glucose(6)	10	40	EH
1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-β-D-glucose(7)	–	30	EH, EJ
1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose(8)	20	30	EH, EJ
2-O-Galloyl-D-galactose(9)	–	–	EH
3-O-Galloylquinic acid(10)	–	–	EH
Acetylgeraniin(11)	–	–	EH, EJ
Jolkinin(12)	10	Death	EJ
Carpinusin(13)	–	–	EJ
Tercatain(14)	–	–	EH
1-Desgalloyleugeniin(15)	20	60	EH
Helioscopin B(16)	–	–	EH
Excoecarianin(17)	–	10	EJ
Coniferaldehyde(18)	–	20	CC
Methyl 3,4-dihydroxycinnamate(19)	40	Death	CC
Rhapontigenin(20)	–	–	RP
Rhaponticin(21)	–	–	RP
α-Viniferin(22)	–	20	CH
Kojic acid	10	40	

EH: *Euphorbia helioscopia*, EJ: *Euphorbia jolkinii*, CC: *Cinnamomum cassia*, RP: *Rheum palmatum*, CH: *Carex humilis*

지고 있는 화합물(11,12,17)의 경우에 비교적 강한 억제 활성을 나타내었고, glucose의 moiety가 4번과 6번 탄소 사이에서 환을 형성하고 있는 경우(15)가 3번과 6번 탄소 사이에서 환을 형성하고 있는 경우(11-14,16,17)보다 강한 활성을 나타내었다. Phenylpropanoids(18,19)는 비교적 강한 melanin 생성 억제활성을 보였으며 methyl 3,4-dihydroxycinnamate(19)는 10 µg/ml의 농도에서 비교물질인 kojic acid보다 4배의 강한 활성을 나타냈으나 30 µg/ml의 농도에서는 cell lines에 독성이 나타나는 것이 관찰되었다. Stilbene 류는 일반적으로 tyrosinase에 대하여 억제활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으나 cell lines를 이용한 실험에서는 stilbene trimer인 α-viniferin(22)만이 30 µg/ml의 농도에서 20%의 melanin 생성 억제활성을 나타내었다.

## 결 론

등대초 등 5종의 고등식물로부터 분리한 polyphenol의 배양된 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제활성을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Gallotannin에서는 당 부분이 glucose이고 anomer center가 free인 경우에 비교적 강한 melanin 생성 억제활성을 보였으며 galloyl group의 숫자도 활성에 영향을 주었다.
2. Ellagitannin은 glucose의 2,4위치에 bulky group을 가지고 있는 화합물의 경우에 비교적 강한 억제활성을 나타내었고, glucose가 <sup>1</sup>C-conformation을 하고 있는 경우가 C<sub>1</sub>-conformation을 하고 있는 경우보다 강한 활성을 나타내었다.
3. Phenylpropanoids는 비교적 강한 melanin 생성 억제활성을 보였으며 methyl 3,4-dihydroxycinnamate는 10 µg/ml

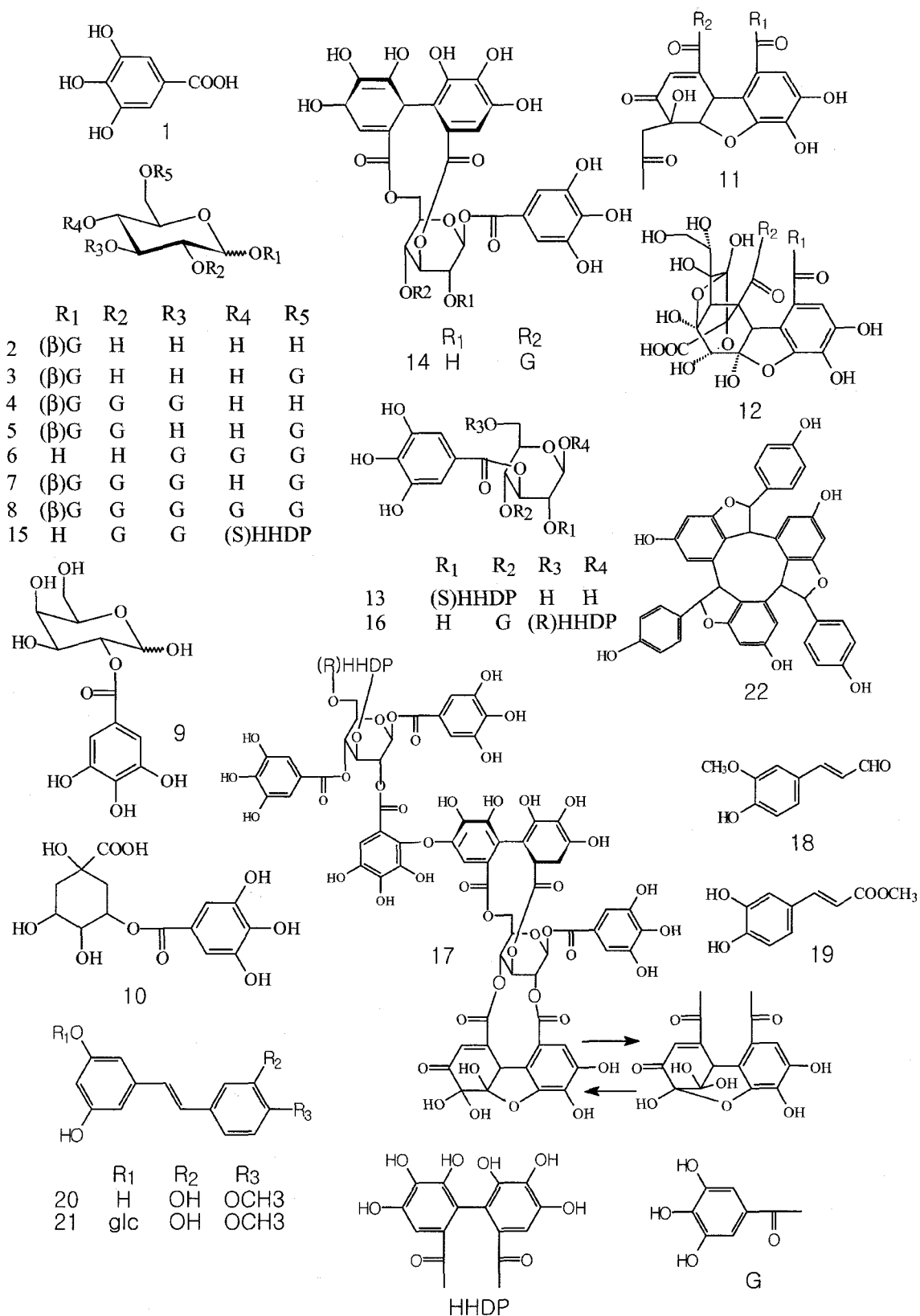


Fig. 1. Structures of tested compounds isolated from the natural resources.

의 농도에서 비교물질인 kojic acid보다 4배의 강한 활성을 나타냈다.

4. 실험에 사용된 시료 중에서 1-desgalloylgeniinin이 가장 강한 활성을 나타내었다.

## 사 사

“이 논문은 2002학년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임”.

## 인용문헌

- J. C. Willis (1966) “A dictionary of the flowering plants (7th ed.),” cambridge Univ. Press. p. 651.
- 甘偉松 (1985) 臺灣藥用植物誌 上, 國立中醫藥研究所, 臺北 p. 417.
- Mishima, Y., Hatta, S. and Ohyama, Y. (1988) Induction of melanogenesis suppression : Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment cell Res.* **1**: 367.
- Hearing, V. J. and Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.* **19**(12): 1141.
- Kreiner, P. W., Gold, C. J., Keirns, J. J., Brock, W. A., and Bitensky, M. W. (1973) Hormonal control of melanocytes : MSH-sensitive adenylyl cyclase in the Cloudman melanoma. *Yale J. Biol. Med.* **46**: 583.
- Giacomini, P. L., Imberti, L., Aguzzi, A., Fisher, P. B., Trinchieri, G., and Ferrone, S. (1985) Immunochemical analysis of the modulation of human melanoma-associated antigens by DNA recombinant immune interferon. *Immunol.* **135** : 288.
- Sawyer, T. K., Hruby, V. J., Hadley, M. E., and Engel, M. H. (1983) Melanocyte stimulating hormone. *Amer. Zool.* **23**: 529.
- Pilar, A., Urabe K., Kobayashi T., Tsukamoto K., and Vincent J. H. (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **34**: 25650.
- Fukushima, T. M. and Tagami, H. (1986) Stimulation of melanogenesis by cholecalciferol in cultured human melanocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*: 451.
- Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y., and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 150s.
- Laskin, J. D. and Piccinini L. A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C<sub>3</sub> melanoma. *J. Biol. Chem.* **61**(35): 16626.
- Gordon, P. R., Naeyaert J. M., Eller M., Park H. Y., and Gilchrist B. A. (1991) Pigment content of cultured human melanocyte does not correlate with tyrosinase message level. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 297.
- Kusano, G. and Shibano, M. (1994) *Food & Food Ingredients J. Jpn* **161**: 73.
- Kawaguchi, Y., Goh, K., Kawa, Y., Kashima, M., and Mizoguchi, M. (1992) *Jpn J. Dermatol.* **102**: 689.
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M., and Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**: 206-212.
- Nam-Ho Shin *et al.* (1998) Oxyresveratrol as the Potent Inhibitor on Dopa Oxidase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 801-803.
- Lee S.H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I. (1990) Tannins, and related compound. XCV. Isolation and characterization of helioscopinins and helioscopins, four new hydrolysable tannins from *Euphorbia helioscopia*, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**: 1518.
- Lee S.H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I. (1991) Tannins, and related compounds. CV. Monomeric and dimeric hydrolysable tannins having a dehydrohexahydroxydiphenoyl group, supinanin, euphorscopin, euphorhelin and jolkianin, from *Euphorbia* species, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(3): 630.
- Lee S.H., Tanaka T., Nonaka G., and Nishioka I. (1990) Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*, *Phytochemistry*, **29**(11): 3621.
- 林大楨(1991) シクンシ科植物のタンニン及び關聯化合物に關する化學的研究, 博士學位論文, 福岡, 日本.
- 李承浩(1991) 7種のEuphorbia屬植物のタンニン及び關聯化合物に關する化學的研究, 博士學位論文, 福岡, 日本.
- 李承浩(1990) 田中 隆, 野中 源一郎, 西岡 五夫, 日本藥學會第110年回講演要旨 集II, 166.
- Lin J. H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Chen I. S. (1990) Tannins, and related compound. XCVIII. Structures of three new dimeric ellagitannins A and B. Isolated from the leaves of *Excoecaria kawakami*, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**: 2162
- Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Zhang B. (1991) Allose gallate from *Euphorbia fisheriana*, *Phytochemistry*, **30**(4): 1251.
- Sashida Y. (1998) New phenylpropanoid glycerol glycosides from the bulbs of *Lilium* species, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**: 12.
- Fomum T. (1990) A new prenylated isoflavon and long chain esters from two *Erythrina* species, *J. Nat. Prods*, **53**: 6.
- Khanna R. N., Singh K. P., Yadav S. K., Srinivas S. (1989) Iodine catalyzed alkoxylation of naphthoquinones, *Syn. Commun.*, **19**: 3151.
- Kang B. S., Shin N. H., Lee S. H., Min K. R., Kim Y. (1998) Inhibitory effects of  $\alpha$ -viniferin and resveratrol on the L-dopa oxidase activity of tyrosinase, *Medical Science Research*, **26**: 235.

(2004년 4월 10일 접수)