

## 비파 씨로부터 Tyrosinase 저해 활성물질의 분리

김태훈 · 신승렬<sup>1</sup> · 김태완<sup>2</sup> · 이인철<sup>3</sup> · 박문영<sup>4</sup> · 조철훈<sup>5,†</sup>

대구한의대학교 한약재약리학과, <sup>1</sup>대구한의대학교 한방식품조리영양학부, <sup>2</sup>안동대학교 생명자원과학부, <sup>3</sup>영동대학교 고령친화산업 기업지원센터, <sup>4</sup>전남농업기술원 난지과수시험장, <sup>5</sup>충남대학교 동물자원생명과학과

### A Tyrosinase Inhibitor Isolated from the Seeds of *Eriobotrya japonica*

Tae-Hoon Kim, Seung-Ryeul Shin<sup>1</sup>, Tae-Wan Kim<sup>2</sup>, In-Chul Lee<sup>3</sup>,  
Moon-Young Park<sup>4</sup> and Cheorun Jo<sup>5†</sup>

Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

<sup>1</sup>Faculty of Herbal Food & Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

<sup>1</sup>Faculty of Food Science & Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>3</sup>Senior Industry Cluster Agency, Youngdong University, Youngdong 370-701, Korea

<sup>4</sup>Subtropical Fruit Crops Experiment Station, Jeonnam Agricultural Research & Extension Services, Wando 520-715, Korea

<sup>5</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

#### Abstract

Activity-guided isolation from the ethylacetate (EtOAc)-soluble portion of a methanolic extract of the seeds of *Eriobotrya japonica*, using several bioassays, led to the isolation and identification of six phenolic compounds of previously known structure: benzaldehyde (1), chlorogenic acid (2), caffeic acid (3), benzoic acid (4), ferulic acid (5), and amygdalin (6). Of these, benzaldehyde (1) exhibited tyrosinase inhibitory activity in a bioassay. In addition, chlorogenic acid (2) and caffeic acid (3) were found to have strong antioxidative effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and superoxide dismutase (SOD)-like activity.

**Key words** : *Eriobotrya japonica*, tyrosinase inhibition, antioxidant, phenolic compounds

#### 서 론

피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성된다. 멜라닌을 합성하는 데 있어서의 출발물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosine은 멜라닌 세포내에서 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPAquinone으로 산화되며 DOPAchome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 그후 indole-5,6-quinone으로 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다(1,2). 종래 이반응의 율속단계는 tyrosinase가 촉매하는 단계로서, 그 후의 반응은 자동산화에 의해 진행된다고 생각되고 있다. Tyrosinase

는 상기한 바와 같이 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosinase hydroxylase로, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다(3). 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부내에서의 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해 할수 있으므로, 피부 미백제개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제시험은 유용한 평가법으로 인정되고 있으며 광범위하게 응용되고 있다. Tyrosinase 활성실험은 tyrosinase hydroxylase 억제실험과 DOPA oxidase 억제 실험, 멜라닌 합성 억제실험으로 구별되나, tyrosinase hydroxylase 실험법과 멜라닌 합성 억제실험은 방사성 동위원소를 이용하기 때문에 실험에 여러 가지 제약이 있으므로 실제로는 DOPA를 기질로 하여 생성되는 DOPAchome의 양을 측정하는 DOPA oxidase 저해실험을

†Corresponding author. E-mail : cheorun@cnu.ac.kr,  
Phone : 82-42-821-5774, Fax : 82-42-825-9754

이용하고 있다(4). 현재까지 천연물 유래의 tyrosinase 활성 억제물질로서는 누룩곰팡이의 2차대사산물인 kojic acid와 우바우르시 잎으로부터 분리된 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 stilbene계 화합물 및 flavonoid계 화합물 등이 알려져 있다(5,6). 이들 중 kojic acid 및 arbutin은 미백효능을 나타내는 첨가제로 상용화되어 있으나 독성 및 부작용이 대두되어 지고 있으며 천연소재로의 대체가 요구되어 지고 있다. 본 연구팀은 천연미백제 개발을 목표로 피부 melanin polymer 생합성에 핵심 enzyme으로 작용하는 tyrosinase 활성 억제 천연물질을 탐색하기 위하여 문헌 및 구전에 의해 알려져 있는 전통 약용식물을 확보하여 이들의 추출물에 대하여 in vitro tyrosinase 활성 억제효과를 평가하였으며 그중 tyrosinase에 대한 억제활성이 인정된 비파 씨로부터 activity-guided isolation을 통하여 활성물질의 분리를 시도하였다.

비파(*Eriobotrya japonica* L.)는 장미과(Roseaceae)의 상록 교목으로 우리나라에서는 제주도, 경남 및 전남지방 등 온화한 기후 조건에서 주로 자생하고, 예부터 민간요법으로 청폐, 진해, 거담, 건위, 이뇨, 패혈해소, 기관지염, 구역질, 딸꾹질 및 부종 등에 효능이 있다고 알려져 있다(7). 또한 중국 및 일본에서도 만성천식에 대해 민간약으로 사용되어져 왔다(8). 비파 잎에는 다양한 terpenoid(9-15)와 flavonoid (16-18), tannin(16,19), megastigmane glycoside(20,21) 등의 유용한 화합물을 다량 함유하고 있어 항염증(9), 항바이러스(9,15), 항산화(16) 및 항암효과(14,17,21)가 알려져 있으며, 최근 연구에서는 비파 씨의 강한 항산화(22), 항당뇨(23) 및 위보호작용(24)이 보고되었다. 본 연구팀은 이와 같이, 과학적 검증을 통하여 여러 가지 생리활성이 밝혀지고 있으며 민간에서도 널리 이용되고 있는 비파 씨 추출물로부터 6종의 페놀성 화합물을 분리, 동정하였으며 이들 화합물의 tyrosinase 저해 및 라디칼소거 활성을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 시료로 사용한 비파 씨(*Eriobotrya japonica*)는 2005년도 경남 거제에서 재배된 것을 구입하여 사용하였으며, 표본시료는 본대학교의 한약재약리학과 천연물화학실험실에 보관하고 있다.

### 시약 및 기기

HPLC는 Shimadzu LC-10A를 사용하였으며, Fraction collector는 Advantec SF-160을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 500 MHz FT-NMR spectrometer(Jeol ECA 500, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, 추출 및 Column chromatography용

용매는 특급시약을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F254(Merck) 및 RP-18(Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silica gel 60(63-200 mesh)을 사용하였고, octadecyl silica gel(ODS)은 Merck사에서 생산한 Lichroprep RP-18(40-63 mesh)을 사용하였다. Semi-prep용 column으로서는 YMC gel ODS A-302, 4.6 mm x 150 mm)을 이용하여 순수물질분리를 하였다. 발색시약으로는 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액을 사용하였고, TLC spot검출에는 UV lamp의 파장은 254 및 360nm를 사용하였다.

### 추출 및 분리

음건한 비파 씨 1.0 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 80% methyl alcohol(MeOH) 4 L로 3일간 3회 반복 추출한 후 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 실시하였다. 즉, 80% 메탄올 추출물을 감압 농축하여 메탄올을 제거하고 물에 현탁된 추출시료를 저극성용매인 n-hexane으로 먼저 추출한 후 물층을 다시 ethyl acetate(EtOAc), n-butyl alcohol (n-BuOH)을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획하여 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조 시킨 후 n-Hexane 가용분획(4.0 g), EtOAc 가용분획(2.42 g), n-BuOH 가용분획(30.1 g), H<sub>2</sub>O 가용분획(64.1 g)을 각각 얻었다. 각 가용분획에 대하여 정량적으로 tyrosinase, superoxide dismutase(SOD) 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 활성을 측정하여 activity-directed isolation을 수행하였다. 각 분획 중 강한 활성을 나타낸 EtOAc 가용부에 대해서 활성물질의 분리 정제를 실시하였다.

EtOAc가용분획 2.0 g을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-(Me)<sub>2</sub>CO 혼합용매를 용출용매로 사용하여 silica gel(63-200 mesh, 3.0 i.d. x 41 cm)를 사용한 column chromatography를 실시하여 총 12개의 분획(EJC-1-EJC-12)으로 나누었으며, 각 분획물에 대하여 활성을 테스트 한 결과 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(1:1; EJC-6)과 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(1:5; EJC-7)에서 비교적 강한 항산화 및 tyrosinase 저해 활성을 확인하였다. 얻어진 소분획 EJC-6 (1533.6 mg)과 EJC-7(152.2 mg)중 각 120 mg에 대해 ODS column(YMC gel ODS A-302, 4.6 mm x 150 mm)을 이용한 semi-preparative HPLC를 수행하여 EJC-6로부터 caffeic acid(3) (5.3 mg, t<sub>R</sub> 14.5 min), ferulic acid(5) (2.1 mg, t<sub>R</sub> 15.9 min), EJC-7로부터는 benzaldehyde(1) (1.7 mg, t<sub>R</sub> 17.7 min), chlorogenic acid(2) (10.7 mg, t<sub>R</sub> 13.9 min), benzoic acid(4) (3.5 mg, t<sub>R</sub> 16.7 min)를 분리 하였고, EJC-10로부터 amygdalin(6) (7.3 mg, t<sub>R</sub> 23.3 min)을 순수 분리하였다. 이동상 용매로는 H<sub>2</sub>O(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)를 사용하여 gradient elution을 다음과 같이 수행하였다. 0-5 min, 100% A; 5-15 min, 50% A, 50% B; 15-30 min, 100% B로 물질 분석 및 분리를 하였으며 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등의 방법(26)에 따라 실시하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPACHrome을 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

전자공여능은 Blois 방법(25)에 따라 측정하였다. 각 시료용액에 2 mL에 0.2 mM의 희석한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 1 mL을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

### SOD 유사활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성은 pyrogallol 자동산화의 저해를 관찰하는 Marklund의 방법(27)을 사용하였다. 각 시료용액에 0.2 mL에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후, 1.0 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험군과 대조군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

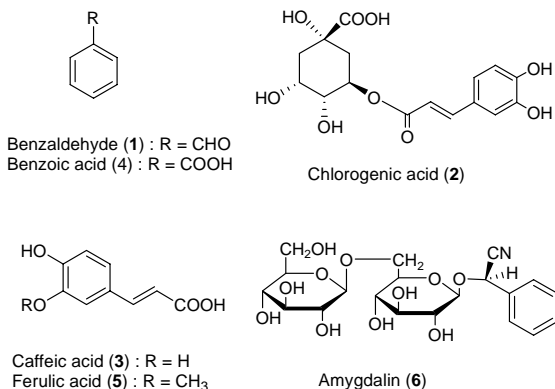


Fig. 1. Chemical structures of isolated compounds from the *Eriobotrya japonica* seeds.

Compound 1 (benzaldehyde) Yellowish oil. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> 9.96(1H, s, -CHO), 7.88(2H, m, H-6, 2), 7.64(1H, m, H-4), 7.54(2H, m, H-5, 3).

Compound 2 (chlorogenic acid) White amorphous powder.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ<sub>H</sub> 7.52(1H, d, J=16.0 Hz, H-7''), 7.15(1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.99(1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.82(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.27(1H, d, J=16.0 Hz, H-8'), 5.31(1H, m, H-5), 3.99(1H, m, H-3), 3.58(1H, dd, J=9.5, 2.5 Hz, H-4), 1.70-2.20(4H, m, H-6, 2).

Compound 3 (caffeic acid) White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ<sub>H</sub> 7.39(1H, d, J=15.5 Hz, H-8), 7.08(1H, d, J=2.0 Hz, H-2), 6.91(1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz, H-5), 6.79(1H, d, J=8.5 Hz, H-6), 6.21(1H, d, J=15.5 Hz, H-7).

Compound 4 (benzoic acid) White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> 8.00(2H, m, H-6, 2), 7.57(1H, m, H-4), 7.44(2H, m, H-5, 3).

Compound 5 (ferulic acid) Colorless needles, mp:176°C <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> 7.56(1H, d, J=16.0 Hz, H-7), 7.23(1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 7.05(1H, d, J=8.0, 2.0 Hz, H-2), 6.81(1H, d, J=8.0 Hz, H-3), 6.31(1H, d, J=16.0 Hz, H-8), 3.92(3H, s, OCH<sub>3</sub>).

Compound 6 (amygdalin) White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> 7.60(2H, m, H-8, 4), 7.45(3H, m, H-7, 6, 5), 5.89(1H, s, H-2), 4.54(1H, d, J=8.0 Hz, H-1'), 4.34(1H, d, J=8.0 Hz, H-1''), 4.20(1H, dd, J=12.0, 2.0 Hz, H-6'), 3.88(1H, dd, J=12.0, 5.5 Hz, H-6''), 3.82(1H, dd, J=12.0, 4.0 Hz, H-6'), 3.67(1H, dd, J=12.0, 5.5 Hz, H-6''), 3.46(4H, m, H-5'', 5', 4', 3''), 3.30(2H, m, H-3', 2'').

### 결과 및 고찰

천연물로부터 tyrosinase 저해 및 항산화 활성물질을 분리하기 위해 본 연구를 수행하여, 비파 씨의 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 n-hexane, EtOAc, n-BuOH로 순차 분획하여 얻어진 각 분획에 대하여 tyrosinase, SOD 및 DPPH를 이용한 실험을 통해 생리활성을 평가하였다. 높은 활성을 보인 EtOAc 분획으로부터 silica 및 ODS gel을 이용한 column chromatography를 수행하여 6종의 화합물을 분리하여 활성을 검토하였다.

화합물 1은 노란색 유상 물질로 얻어졌으며 FeCl<sub>3</sub> 시약에 의하여 phenolic 화합물에 대한 정색반응을 확인하였으며 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의 δ<sub>H</sub> 9.96에서 CHO 유래의 전형적인 proton 시그널인 <sup>1</sup>H singlet이 확인되었다. 또한 δ<sub>H</sub> 7.88(2H, m, H-6, 2), 7.54(2H, m, H-5, 3)에서 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 시그널을 확인하였으며, δ<sub>H</sub> 7.64(1H, m, H-4)에서 1H 분의 aromatic 시그널을 확인하였다. 이상의 결과는 문헌치(21)와 잘 일치하였고 표준과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 1을 benzaldehyde로 동정하였다.

화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의 aromatic proton 영역에

**Table 1. Tyrosinase inhibitory, DPPH radical scavenging and superoxide dismutase (SOD)-like activities of the seeds of *Eriobotrya japonica*<sup>a)</sup>**

Extract and fraction	Activity (%)		
	Tyrosinase Inhibition <sup>b)</sup>	DPPH Radical <sup>b)</sup>	SOD-like Activity <sup>b)</sup>
MeOH extract	11.2±0.36	67.6±0.36	7.0±0.36
n-Hexane-soluble fraction	11.8±0.23	63.1±0.36	6.8±0.36
EtOAc-soluble fraction	39.4±0.87	93.5±1.20	21.0±1.65
n-BuOH-soluble fraction	21.4±0.58	43.9±2.01	29.0±1.23
H <sub>2</sub> O-soluble fraction	15.6±0.65	14.0±0.47	6.1±0.36
Positive controls			
Kojic acid	61.4±0.25	- <sup>c)</sup>	-
L-Ascorbic acid	-	75.6±0.69	99.7±0.85

<sup>a)</sup>Data represent the mean±SD three replications.

<sup>b)</sup>Concentration of each extracts were 200 mg/mL.

<sup>c)</sup>Not tested.

서, 한 쌍의 ABX계 시그널  $\delta_H$  7.15(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.99(1H, dd,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 6.82(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5')이 관찰되었고,  $J=16.0$  Hz로 coupling하고 있는 doublet의 olefin proton 시그널이 2개 관찰된 것과 TLC상에서 FeCl<sub>3</sub> 시약에 의해 담녹색으로 정색된 것으로 부터 본 화합물은 분자 내에 caffeoyl기가 1개 존재하고 있음이 시사되었다. 또한 aliphatic proton 영역에서 각 시그널 [ $\delta_H$  5.31(1H, m, H-5), 3.99(1H, m, H-3), 3.58(1H, dd,  $J=9.5, 2.5$  Hz, H-4), 1.70-2.20(4H, m, H-6, 2)]은 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY의 결과로부터 연속적인 coupling한 7 spin계를 구성하고 있으며, 이들은 quinic acid의 특징적인 시그널 패턴임이 명확하게 되었다. 이상의 결과는 문헌치(28)와 잘 일치하였고 표품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 2를 chlorogenic acid로 동정하였다.

화합물 3은 TLC상에서 FeCl<sub>3</sub> 시약에 의해 담녹색으로 나타나 phenol성 화합물임을 알 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의  $\delta_H$  7.39(1H, d,  $J=15.5$  Hz, H-8)과 6.21(1H, d,  $J=15.5$  Hz, H-7)에서 *trans* coupling하는 olefin proton signal이 관찰되었으며,  $\delta_H$  7.08(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2), 6.91(1H, dd,  $J=8.5, 2.0$  Hz, H-5)의 6.79(1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-6)의 signal이 전형적인 ABX type의 coupling pattern으로 나타났다. 이상의 결과는 문헌치(29)와 잘 일치하였고 표품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 3을 caffeic acid로 동정하였다.

화합물 4는 흰색의 분말상 물질로 얻어졌으며 FeCl<sub>3</sub> 시약에 의하여 phenol성 화합물에 대한 정색반응을 확인하였으며 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의  $\delta_H$  8.00(2H, m, H-6, 2), 7.44(2H, m, H-5, 3)에서 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 시그널을 확인하였으며,  $\delta_H$  7.57(1H, m, H-4)에서 1H의 aromatic 시그널을 확인하였다. 이상의 결과는 문헌치(22)와 잘 일치하였고 표품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 4를 benzoic acid로 동정하였다.

화합물 5는 무색의 침상결정으로 얻어졌으며, UV spectrum에서 232, 295, 321 nm에서 흡수 극대가 있는 것으로 보아 본 화합물은 phenylpropanoid계인 p-hydroxycinnamic acid 유도체임을 시사하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서는  $\delta_H$  7.56와 6.31에서  $J=16.0$  Hz의 doublet은 p-hydroxycinnamic acid유도체의 H-7과 H-8로 인정되며, 이들의 coupling constant로 보아 본 화합물은 H-7과 H-8이 *trans*로 결합하고 있음을 알 수 있었다. dH 7.23(d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 7.05(d,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-2)와 6.81(d,  $J=8.0$  Hz, H-3)에서 각각 1H에 해당하는 시그널 등이 나타난 것으로 보아 1, 3, 4번 위치가 치환된 benzene환을 가진 cinnamic acid유도체임을 알 수 있었다. dH 3.92(3H, s)에서의 시그널에 의해 methoxy기의 존재가 시사되었으며, 이상의 결과는 문헌치(30)와 잘 일치하였고 표품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 5를 ferulic acid로 동정하였다.

화합물 6은 흰색의 분말상 물질로 얻어졌으며 의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼으로부터 5H분의 aromatic proton [ $\delta_H$  7.60(2H, m, H-8, 4), 7.45(3H, m, H-7, 6, 5)], oxymethine proton유래의 singlet [ $\delta_H$  5.89(1H, s, H-2)], 2개분의 glucose 1번 위치의 전형적인 시그널 [ $\delta_H$  4.54(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-1'), 4.34(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-1'')과 [ $\delta_H$  4.20(1H, dd,  $J=12.0, 2.0$  Hz, H-6'), 3.88(1H, dd,  $J=12.0, 5.5$  Hz, H-6''), 3.82(1H, dd,  $J=12.0, 4.0$  Hz, H-6''), 3.67(1H, dd,  $J=12.0, 5.5$  Hz, H-6''), 3.46(4H, m, H-5'', 5', 4', 3''), 3.30(2H, m, H-3', 2'')]의 시그널이 확인되었다. 이상의 결과는 문헌치(31)와 잘 일치하였고 표품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 6을 amygdalin으로 동정하였다.

#### Mushroom Tyrosinase 저해 활성 측정

비파쇄 MeOH 추출물의 유기용매 분획을 통하여 얻어진 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O layer에 대하여 mushroom tyrosinase를 사용하여 각 추출물의 농도별 tyrosinase 저해

**Table 2. Inhibitory effects of isolated compounds 1-6 on mushroom tyrosinase activity<sup>a)</sup>**

Sample No.	Inhibitory activity (%)		
	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
Benzaldehyde (1)	82.8±0.25	77.4±0.16	70.8±0.40
Chlorogenic acid (2)	3.4±0.32	-	-
Caffeic acid (3)	- <sup>b)</sup>	-	-
Benzoic acid (4)	16.5±1.11	10.2±0.55	8.7±0.35
Ferulic acid (5)	4.6±0.51	-	-
Amygdalin (6)	5.3±0.33	1.8±0.35	-
kojic acid <sup>c)</sup>	94.9±2.42	70.6±1.75	56.3±1.03

<sup>a)</sup>Data represent the mean±SD three replications.

<sup>b)</sup>The inhibitory activity was not determined.

<sup>c)</sup>Positive control.

활성을 측정된 결과, EtOAc층에서 활성을 확인하였다 (Table 1). 활성물질 분리를 위하여 activity-guided isolation 방법을 통하여 분리된 화합물 중, benzaldehyde (1)는 125 mg/mL 농도에서 대조군인 kojic acid 보다 강한 활성을 확인하였으며 비파 씨의 tyrosinase 저해 활성성분은 저분자의 페놀성 화합물임을 확인하였다.

**DPPH 라디칼 소거 및 superoxide dismutase (SOD) 유사활성**

한편, DPPH 및 SOD를 이용한 항산화 활성 테스트에서 Table 1에서 나타낸바와 같이 EtOAc층에서 양쪽 모두에 대하여 비교적 강한 활성을 나타내어 분리한 화합물에 대하여 12.5 mg/mL 농도에서 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 활성을 비교하였다. DPPH radical 소거능은 chlorogenic acid(2), caffeic acid(3)에서 50% 이상의 소거활성을 나타내었으며, 그중에서도 caffeic acid(3)는 실험농도에서 positive control보다 강한 활성을 나타내었다. 또한 SOD 유사활성에서는 chlorogenic acid(2)가 positive control인 L-ascorbic acid보다 약하지만 비파 씨에서 분리한 화합물 중에서 가장 강한 활성을 나타내었다.

**Table 3. DPPH radical scavenging activity of isolates 1-6<sup>a</sup>**

Sample No.	Radical scavenging activity (%)			
	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12.5 mg/mL
Benzaldehyde (1)	- <sup>b</sup>	-	-	-
Chlorogenic acid (2)	95.8±0.51	93.9±0.65	67.4±0.35	43.7±0.31
Caffeic acid (3)	95.1±0.71	94.3±0.63	93.4±0.87	81.5±0.63
Benzoic acid (4)	-	-	-	-
Ferulic acid (5)	-	-	-	-
Amygdalin (6)	-	-	-	-
L-Ascorbic acid <sup>c</sup>	97.2±2.11	96.8±1.03	93.2±1.25	76.2±1.10

<sup>a</sup>)Data represent the mean±SD three replications.

<sup>b</sup>)The inhibitory activity was not determined.

<sup>c</sup>)Positive control.

**Table 4. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of isolates 1-6<sup>a</sup>**

Sample No.	SOD-like activity (%)		
	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
Benzaldehyde (1)	18.4±1.54	6.3±1.24	- <sup>b</sup>
Chlorogenic acid (2)	35.5±0.84	60.1±0.85	35.6±1.85
Caffeic acid (3)	61.4±0.56	6.35±0.32	2.0±0.87
Benzoic acid (4)	20.8±0.68	-	-
Ferulic acid (5)	8.23±0.25	-	-
Amygdalin (6)	29.4±0.32	15.2±0.65	6.1±0.38
L-Ascorbic acid <sup>c</sup>	99.8±1.02	99.2±1.00	99.0±0.86

<sup>a</sup>)Data represent the mean±SD three replications.

<sup>b</sup>)The inhibitory activity was not determined.

<sup>c</sup>)Positive control.

**요 약**

비파 씨를 MeOH로 침지 추출하여 얻어진 추출물을 n-hexane, EtOAc, n-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 용매 분획하였다. 이중 tyrosinase, DPPH 및 SOD 활성이 상대적으로 높은 EtOAc 분획에 대해 column chromatography를 이용하여 6개의 페놀성 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터 해석 및 표준과의 HPLC 직접 비교를 통하여 benzaldehyde (1), chlorogenic acid (2), caffeic acid (3), benzoic acid (4), ferulic acid (5) 및 amygdalin (6)으로 동정하였다. 이들 화합물중 benzaldehyde (1)는 125 mg/mL농도에서 tyrosinase저해활성이 70.8%로 나타나 positive control인 kojic acid의 56.3%보다 높게 나타났다. 또한 분리한 화합물 중 DPPH 라디칼 소거능은 12.5 mg/mL 실험농도에서 chlorogenic acid (2)와 caffeic acid (3)가 각각 43.7, 81.5%의 저해활성을 나타내었으며, 비파 씨의 SOD 활성물질은 chlorogenic acid (2)임을 확인하였다. 향후 이들 활성물질의 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구결과는 보다 안전하고 우수한 tyrosinase 및 라디칼소거능을 가지는 새로운 선도화합물 발굴을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 비파 씨의 식물 화학적 성분에 대한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**감사의 글**

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R01-2007-000-10753-0).

**참고문헌**

1. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.*, 75, 122-127
2. Pave, I S, Muskiet, F.A. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma: a preliminary report. *Cancer Detect Prev.*, 6, 311-316
3. Hearing, V.J., Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, 19, 1141-1147
4. Baek, Y.S., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ha, T.J., Rengasamy, R., Yang, M.S., Park, K.H. (2009) Tyrosinase inhibitory effects of 1,3-diphenylpropanes from *broussonetia kazinoki*. *Bioorg. Med. Chem.*, 17,

- 35-41
5. Maeda, K., Naitou, T., Umishio, K., Fukuhara, T., Motoyama, A. (2007) A novel melanin inhibitor: hydroperoxy traxastane-type triterpene from flowers of *Arnica montana*. Biol. Pharm. Bull. 30, 873-87
  6. Badria, F.A., elGayyar, M.A. (2001) A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. Boll. Chim. Farm., 140, 267-71
  7. Kim, H.J., Jo, C.H., Kim, T.H., Kim, D.S., Park, M.Y., Byun, M.W. (2006) Biological evaluation of the methanolic extract of *Eriobotrya japonica* and its irradiation effect. Korean J. Food. Sci. Technol., 38, 684-690
  8. Namba, T. (1994) The encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sinojapanese Medicines) with color pictures. Hoikusa, Osaka. Vol II., 80-82
  9. Shimizu, M., Fukumura, H., Tsuji, H., Tanaami, S., Hayashi, T., Morita, N. (1986) Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* LINDL. Chem. Pharm. Bull., 34, 2614-2617
  10. Liang, Z.Z., Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C. (1990) Polyhydroxylated Triterpenes from *Eriobotrya japonica*. Planta Medica, 56, 330-332
  11. De Tommasi N., De Simone F., Cirino, G., Cicala, C., Pizza, C. (1991) Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. Planta Medica, 57, 414-416
  12. De Tommasi N., De Simone F., Pizza, C., Nahmood, N., Moore, P.S., Conti, C., Orsi, N., Stein, M.L. (1992) Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties. J. Nat. Prod., 55, 1067-1073
  13. Young, H.S., Chung, H.Y., Lee, C.K., Park, K.Y., Yokozawa, T., Oura, H. (1994) Ursolic acid inhibits aflatoxin B1-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. Biol. Pharm. Bull., 17, 990-992
  14. Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, H., Sugita, D., Shimura, S., Yoshida, T. (2002) Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. Phytochem., 59, 315-23
  15. De Tommasi N., De Simone F., Pizza, C., Mahmood, N., Moore, P.S., Conti, C., Orsi, N., Stein, M.L. (1992) Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties. J. Nat. Prod., 55, 1067-1073
  16. Jung, H.A., Park, J.C., Chung, H.Y., Kim, J., Choi, J.S. (1999) Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*. Arch. Pharm. Res., 22, 213-218
  17. Ito, H., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Li, S.H., Hatano, T., Sakagami, H., Kusama, K., Satoh, K., Sugita, D., Shimura, S., Itoh, Y., Yoshida, T. (2000) Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. Chem. Pharm. Bull., 48, 687-693
  18. Kawahara, N., Satake, M., Goda, Y. (2002) A new acylated flavonol glycoside from the leaves of *Eriobotrya japonica*. Chem. Pharm. Bull., 50, 1619-1620
  19. Kwon, H.J., Kang, M.J., Kim, H.J., Choi, J.S., Paik, K.J., Chung, H.Y. (2000) Inhibition of NF kappaB by methyl chlorogenate from *Eriobotrya japonica*. Mol. Cells, 10, 241-246
  20. Ito, H., Kobayashi, E., Li, S.H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Yoshida, T. (2001) Megastigmane glycosides and an acylated triterpenoid from *Eriobotrya japonica*. J. Nat. Prod., 64, 737-740
  21. Ito, H., Kobayashi, E., Li, S.H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. (2002) Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. J. Agric. Food. Chem., 50, 2400-2403
  22. Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. (2006) Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. Biol. Pharm. Bull., 29, 467-471
  23. Tanaka, K., Nishizono, S., Makino, N., Tamaru, S., Terai, O., Ikeda, I. (2008) Hypoglycemic activity of *Eriobotrya japonica* seeds in type 2 diabetic rats and mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 686-693
  24. Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. (2008) Gastroprotective activity of *Eriobotrya japonica* seed extract on experimentally induced gastric lesions in rats. Nat. Med., 62, 96-100
  25. Blois, M.S. (1958) Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
  26. Yagi, A., Kanbara, T., Morinobu, N. (1987) Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. Planta Med., 53, 515-517
  27. Stefan, M., Gudrun, M. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47, 469-474

28. Morishita, H., Iwahashi, H., Osaka, N., Kido, R. (1984) Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 19, 253-60
29. Kwon, Y.S., Won, H.M., Kim, C.M. (2000) Flavonoids from *Indigofera pseudo-tinctoria* stem. *Korean J. Pharmacogn.*, 31, 280-283
30. Andray, C., Wingemitz, F. (1982) Structures of Vervacoside and Orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche Rapum-Genistate*. *Phytochem.* 21, 1123-1127
31. Seeram, N.P., Cichewicz, R.H., Chandra, A., Nair, M.G. (2003) Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from crabapple fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1948-1951

---

(접수 2009년 2월 5일, 채택 2009년 5월 15일)