

청미래덩굴 잎의 페놀성 성분 및 Tyrosinase 저해 활성

김상현 · 안종훈 · 정지연 · 김선범 · 조양희 · 황방연 · 이미경*

충북대학교 약학대학

Tyrosinase Inhibitory Phenolic Constituents of *Smilax china* Leaves

Sang Hyun Kim, Jong Hoon Ahn, Ji Yeon Jeong, Seon Beom Kim, Yang Hee Jo,
Bang Yeon Hwang and Mi Kyeong Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – In the course of screening tyrosinase inhibitory activity, total methanolic extract and EtOAc-soluble fraction of *Smilax china* leaves showed significant inhibitory activity. Further fractionation and isolation of the EtOAc-soluble fraction resulted in 12 phenolic compounds, which were identified as 4-hydroxybenzoic acid (1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (2), 3,4-dihydroxybenzoic acid (3), 3,4-dihydroxyacetophenone (4), 3-hydroxy-4-methoxy benzoic acid (5), *trans-p*-hydroxycinnamic acid (6), *cis-p*-hydroxycinnamic acid (7), *trans*-resveratrol (8), *cis*-resveratrol (9), dihydroresveratrol (10), moracin M (11) and kaempferol (12). Compounds 1-11 were first reported from this plant. Among the isolated compounds, compounds 2, 8, 9 and 12 showed strong inhibition on tyrosinase activity.

Key words – *Smilax china*, Tyrosinase, Phenolic compounds, Kaempferol, Structure activity relationship

Melanogenesis는 melanin과 같은 색소물질을 생성하는 과정을 총칭한다. Melanin 색소는 일반적으로 사람의 피부색 등을 결정하며 UV와 같은 다양한 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다.¹⁾ 그러나 과도한 melanin의 생성은 피부질환의 원인이 되고 주근깨, 기미 등과 같이 다양한 미용적인 문제가 되기도 한다.^{2,3)} 또한 과일과 야채 등에 생성되는 melanin은 갈변 등을 유발하여 과일과 야채의 신선도 및 상품성을 저하시키는 원인이 되기도 한다.⁴⁾ Melanin은 곤충에서도 생성되어 발달단계에도 관여하여 곤충의 검은 큐티클 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

Melanogenesis는 여러 단계의 연속적인 반응을 통하여 melanin을 생성하며 특히 첫 단계를 진행하는 tyrosinase가 가장 중요한 역할을 하는 rate-limiting 효소로 알려져 있다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase라고도 불리며 melanin이 생성되는 미생물, 동물 및 식물에 다양하게 분포하고 있다.^{6,7)} 최근 과도한 melanin의 생성을 억제하려는 목적으로 다양한 tyrosinase 저해제의 개발이 활발히 진행되고 있다. Tyrosinase 저해제는 농작물의 갈변이나 곤충체거제로 응용될 수 있으며 hyperpigmentation disease의 치료제나 화장품

의 미백제로 폭넓게 응용될 수 있는 중요한 전략이 되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾

청미래덩굴(*Smilax china* L.)은 백합과(Liliaceae)의 덩굴성 갈잎떨기나무로 명감나무, 망개나무라고도 불리운다. 5월에 황록색의 꽃이 피며 열매는 둥근 장과로 9-10월에 적색으로 익는다.¹¹⁾ 뿌리줄기는 토복령(土茯苓)이라고 하며 거풍습(祛風濕), 이소변(利小便), 소종(消腫) 등의 효능이 있어 관절통, 근육마비, 설사, 이질, 수종 등의 치료에 사용되어 왔다.¹¹⁾ 잎은 두툼하고 윤기가 있는 넓은 타원형으로 5-7맥이 나오고 다시 그물맥으로 이어져 있다. 청미래덩굴 잎은 항균작용이 있어 민간에서는 망개떡 등에 사용되고 있다. 이들의 성분으로는 flavonoid 계열 물질이 보고되었으며 항산화 활성 등이 보고되어 있으나^{12,13)} 그 외 성분 및 tyrosinase 저해 활성에 대하여서는 거의 알려지지 않았다.

본 연구에서는 천연물로부터 tyrosinase 저해제 후보물질을 찾고자 천연물의 tyrosinase 저해 활성을 검색하였으며 검색 결과 청미래덩굴 잎의 총 메탄올 추출물이 유의성있는 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. 이에 청미래덩굴의 잎으로부터 활성물질을 분리하고자 연구를 수행하였다.

*교신저자(E-mail): mkleee@chungbuk.ac.kr
(Tel): +82-43-261-2818

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 청미래덩굴 잎은 2011년 11월 충북 제천의 약초상에서 구입하여 충북대학교 약초원에서 감정을 받은 후 사용하였으며 표본(CBNU-201211-SC)은 충북대학교 약초원에 보관하고 있다.

성분 분리 - 건조한 청미래덩굴 잎(3 kg)을 80% MeOH로 추출하여 총 MeOH 추출물(430.3 g)을 얻었다. 이를 증류수 현탁한 후 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH로 용매 분획을 반복 실시하였으며, 각각 *n*-hexane 분획, CH₂Cl₂ 분획, EtOAc 분획 및 *n*-BuOH 분획을 얻었다. 분획에 대하여 tyrosinase 저해활성 검색한 결과 EtOAc 분획 및 BuOH 분획이 가장 뛰어난 저해활성을 나타내었다. 이에 EtOAc 분획으로부터 성분분리를 시도하였다. EtOAc분획(21.3 g)을 CH₂Cl₂-MeOH 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 12개의 소분획(SC-E1-SC-E12)을 얻었다. 그 중, 소분획 SC-E7에 대하여 *n*-hexane-EtOAc 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4개의 소분획(SC-E7-A-SC-E7-D)을 얻었다. 소분획 SC-E7-B에 대하여 MeOH을 용매로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 9개의 분획(SC-E7-B-1-SC-E7-B-9)으로 나누었다. 소분획 SC-E7-B-2에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 1, 2, 3, 4 및 5를 얻었다. 또한 SC-E7-B-4 및 SC-E7-B-5 분획으로부터 각각 화합물 10 및 12를 얻었다. 소분획 SC-E7-C에 대하여 MeOH을 용매로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 7개의 분획 (SC-E7-C-1-SC-E7-C-7)으로 나누었으며 SC-E7-C-4에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 6, 7, 8, 9 및 11을 분리 정제 하였다.

화합물 11 - ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 6.25 (1H, t, *J*=2.4 Hz, J-4'), 6.75 (1H, dd, *J*=2.4, 8.4 Hz, H-5), 6.77 (2H, d, *J*=2.4 Hz, H-2', 6'), 6.91 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-7), 6.93 (1H, s, H-3), 7.36 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 158.6 (C-3', 5'), 155.9 (C-8), 155.5 (C-2), 154.8 (C-6), 132.4 (C-1'), 121.6 (C-9), 120.6 (C-4), 111.8 (C-5), 102.5 (C-2', 6'), 102.1 (C-4'), 100.8 (C-3), 97.1 (C-7).

Tyrosinase 저해 활성 측정 - Tyrosinase 저해 활성은 tyrosine을 기질로 하여 mushroom tyrosinase를 이용하여 측정하였다. Mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 후 시료와 혼합하여 37°C에서 15분간 전처리 하였다. 다음 기질인 tyrosine을 가한 후 37°C에서 15분간 반응을 유도하였다. Tyrosinase의 활성은 Eliza reader 측정기를 이용하여 495 nm에서 tyrosine이 dopachrome으로 변환되는 것을 측정함으로써 판단하였다. Kojic acid를 대조군으로 사용하였으며

tyrosinase 저해 활성은 시료를 넣지 않은 대조군과 비교하여 상대적인 활성으로 나타내었다.

통계분석 - 실험결과의 통계적인 유의성은 Student's t-test로 분석하였으며 p value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

천연물의 tyrosinase 저해 활성을 검색한 결과 청미래덩굴 잎의 총 메탄올 추출물이 유의성있는 저해 활성을 나타내었으며 이에 활성성분의 분리를 시도하였다. 청미래덩굴 잎의 총 메탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 분획하여 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH 및 물 분획을 얻었으며 각각의 분획에 대하여 tyrosinase 저해활성을 검색한 결과 EtOAc 분획이 가장 뛰어난 활성을 나타내었다(Fig. 1). 이에 EtOAc 분획에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 성분분리를 시도하였으며 총 12종의 화합물을 분리, 정제하였다. 분리한 화합물은 1D- 2D NMR 및 MS 등의 기기분석을 통하여 그 구조를 규명하였다.

화합물 1-10 및 12는 문헌¹³⁻¹⁶⁾과 비교하여 4-hydroxybenzoic acid(1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2), 3,4-dihydroxybenzoic acid(3), 3,4-dihydroxyacetophenone(4), 3-hydroxy-4-methoxy benzoic acid(5), *trans-p*-hydroxycinnamic acid(6), *cis-p*-hydroxycinnamic acid(7), *trans-resveratrol*(8), *cis-resveratrol*(9), dihydroresveratrol(10) 및 kaempferol(12)로

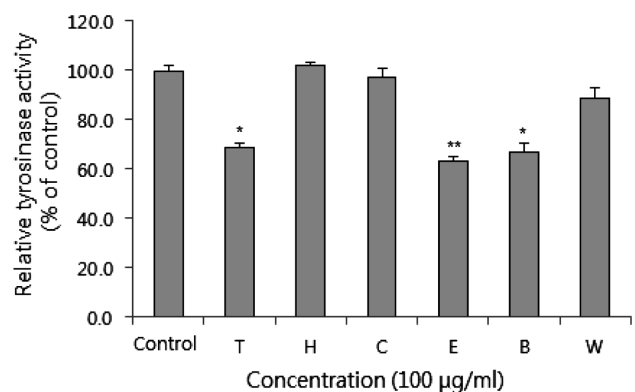


Fig. 1. Effect of total methanolic extract, each fraction of *S. china* on tyrosinase activity. Tyrosinase activity was measured using tyrosine as a substrate. Relative activity (%) was calculated as (activity of compound with substrate - negative control of compound without substrate)/(activity without compound and with substrate - negative control without compound and substrate) × 100. Results are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments, each performed using triplicate wells. T, total extract; H, *n*-hexane fraction; C, CH₂Cl₂ fraction; E, EtOAc fraction; B, *n*-BuOH fraction; W, H₂O fraction. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with control.

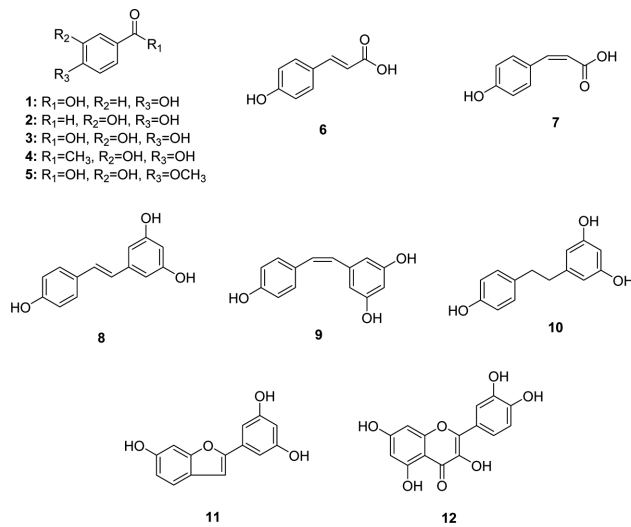


Fig. 2. Structures of compounds 1-12 isolated from *S. china*.

동정하였다(Fig. 2). 분리한 화합물 중 kaempferol(12)은 이 식물에서 보고되었으나¹²⁾ 화합물 1-11은 이 식물에서 처음으로 분리 보고되는 화합물이다.

화합물 11은 ¹H-NMR에서 δ 6.25 (1H, t, *J* = 2.4 Hz, H-4'), 6.77 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2', 6') 피크와 δ 6.75 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5), 6.91 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-7), 7.36 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4) 피크로부터 각각 1,3,5- 및 1,4- 치환된 aromatic ring의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 추가적인 δ 6.93 (1H, s, H-3)로부터 flavonoid와 유사한 계열의 물질임을 추정하였다. ¹³C-NMR에서 총 14개의 피크로부터 탄소수가 14개임을 추정하였다. ¹H-NMR에서 예상한 2개의 aromatic ring에 해당하는 12개의 탄소 외에 추가적으로 155.5 (C-2), 100.8 (C-3)의 존재를 확인하였으며 이를 바탕으로 화합물 11은 stilbenoid 계열의 유도체임을 추정하였다. ¹H-NMR와 ¹³C-NMR의 결과를 바탕으로 화합물 11은 stilbene 화합물이 환을 형성하고 있음을 예상할 수 있었으며 이상의 spectrum data의 결과를 종합하여 문헌¹⁷⁾과 비교 검토하여 moracin M으로 동정하였다. 이 화합물은 이 식물에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

청미래덩굴 잎으로부터 분리한 화합물 12종은 모두 페놀성 계열의 화합물로 좀 더 구조적으로 구분하면 화합물 1-5는 simple phenol성 화합물, 화합물 6-7은 phenylpropanoid 계열 화합물, 화합물 8-11은 stilbenoid 계열 화합물 그리고 화합물 12는 flavonoid 계열의 화합물이다. 분리한 물질에 대하여 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 계열별로 활성의 차이를 나타내기 보다는 동일한 계열 중에서도 특정 구조만이 활성을 나타내었다(Fig. 3). Simple phenol성 계열의 물질인 화합물 1-5의 경우 화합물 2가 가장 강한 활성을 나타내었고 화합물 4도 유의성있는 활성을 나타낸 반면 화합물 1, 3, 5는 활성이 미약하였다. 화합물 2와 3은 동일한 구

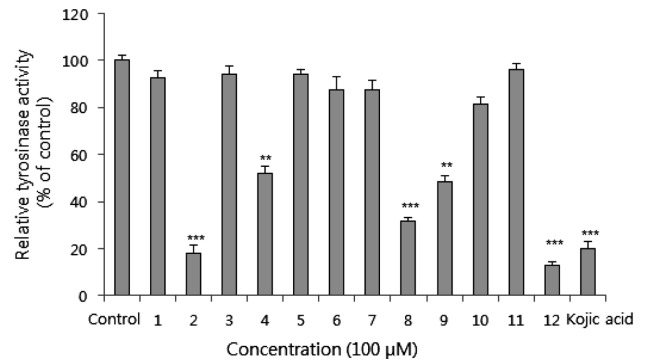


Fig. 3. Effect of compounds 1-12 from *S. china* on tyrosinase activity. Tyrosinase activity was measured using tyrosine as a substrate. Relative activity (%) was calculated as (activity of compound with substrate - negative control of compound without substrate)/(activity without compound and with substrate - negative control without compound and substrate) × 100. Results are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments, each performed using triplicate wells. Kojic acid was used as the positive control. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with control.

조에 R1 위치의 OH 존재 유무 차이만을 나타내어 화합물 2는 aldehyde기를, 화합물 3은 carboxyl기를 가지고 있다. 이 두 화합물의 활성을 비교해보면 화합물 2는 뛰어난 저해활성을 나타낸 반면 화합물 3의 활성은 미약하여 simple phenolic의 경우 aldehyde기가 tyrosinase의 활성에 중요함을 추측할 수 있다. 한편 화합물 4의 경우 화합물 2의 aldehyde기에 methyl기가 첨가된 구조로 aldehyde가 acetyl기로 치환된 구조이다. 화합물 4의 경우 tyrosinase 저해 활성은 화합물 2보다 감소하였으나 화합물 3보다는 뛰어난 활성을 나타내었다. 따라서 simple phenol성 화합물의 경우 치환기에 따른 tyrosinase의 저해활성은 aldehyde > acetyl > carboxyl기의 순서임을 알 수 있다. Tyrosinase의 활성에 aldehyde기의 존재는 활성의 증가를, methylation은 활성의 감소를 나타낸다는 연구결과가 보고되어 있으며⁸⁾ 본 연구결과 simple phenol성 화합물의 결과에서도 동일한 구조-활성 상관관계를 나타냄을 확인하였다. 화합물 6, 7은 phenylpropanoid 계열의 화합물이며 두 화합물 모두 미약한 활성을 나타내었다. 화합물 6, 7은 carboxyl기를 가지고 있으며 활성이 미약하여 simple phenol성 화합물의 구조-활성 상관관계에서 유추한 결과와 일치함을 다시 확인할 수 있었다. 화합물 8-11은 stilbenoid 계열의 화합물로 화합물 8은 trans의 이중결합을, 화합물 9는 cis의 이중결합을, 화합물 10은 이중결합이 단일결합으로 치환된 동일한 구조의 화합물이다. 이들의 활성을 살펴보면 이중결합을 포함하는 화합물 8, 9의 경우 유의성있는 저해활성을 나타내었지만 화합물 10의 경우 활성이 미약하였다. 또한 화합물 11의 경우 화합물 9의 구조에 환을 형성한 구조인데 활성이 현저히 감소하여 stilbenoid

계열 화합물의 경우 이중결합의 존재가 저해활성에 필요함을 유추할 수 있다. Flavonoid 계열의 화합물인 화합물 12는 청미래 덩굴 잎으로부터 분리된 12개의 화합물 중 가장 뛰어난 활성을 나타내었다. 화합물 12인 kaempferol은 tyrosinase의 저해제로 잘 알려진 물질이며¹⁷⁾ 본 연구에서도 뛰어난 활성을 나타냄을 다시 확인하였다.

이상의 결과로 청미래덩굴 잎으로부터 총 12개의 화합물을 분리하여 그 구조를 동정하였고 tyrosinase의 저해활성을 나타내었다. 청미래덩굴 잎은 민간에서 항균작용으로 망개떡 등에 사용되어 왔으며 tyrosinase 저해 활성은 곤충의 증식 억제에 기여하는 것으로 추정된다. 또한 tyrosinase 저해활성으로 음식에 사용될 경우 떡이나 과일의 갈변을 억제하는 효과도 기대할 수 있다. 청미래덩굴의 경우 뿌리줄기가 토복령으로 사용되고 있으며 잎의 경우 그 효능 및 응용이 많이 개발되어 있지 않은 실정이다. 본 연구를 통하여 청미래덩굴 잎은 tyrosinase 저해활성을 나타냄을 확인하였으며 따라서 청미래덩굴 잎은 농업, 의약품, 화장품 등 다양한 분야에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 tyrosinase 저해 활성을 나타낸 청미래덩굴 잎의 EtOAc 분획으로부터 성분분리를 수행하여 12종의 화합물을 분리 정제하였으며, 분리한 화합물의 구조는 다양한 분광학적 방법을 이용하여 4-hydroxybenzoic acid(1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2), 3,4-dihydroxybenzoic acid(3), 3,4-dihydroxyacetophenone(4), 3-hydroxy-4-methoxy benzoic acid(5), *trans-p*-hydroxycinnamic acid(6), *cis-p*-hydroxycinnamic acid(7), *trans*-resveratrol(8), *cis*-resveratrol(9), dihydroresveratrol(10), moracin M(11) 및 kaempferol(12)로 동정하였다. 분리한 화합물 중 화합물 1-11는 이 식물에서 처음으로 분리보고되는 화합물이며 화합물 2, 4, 8, 9 및 12가 유의성있는 tyrosinase 저해활성을 나타냄을 확인하였다.

사 사

본 연구는 지식경제부의 출연금으로 수행한 산학융합지구조성사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Prota, G. (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **8**: 525-556.
2. Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M. and Shapiro, S. S. (2000) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 162-167.
3. Yamaguchi, Y., Brenner, M. and Hearing, V. J. (2007) The regulation of skin pigmentation. *J. Biol. Chem.* **282**: 27557-27561.
4. Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 631-653.
5. Sugumaran, M. (1991) Molecular mechanisms mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.* **293**: 4-10.
6. Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plant: recent progress. *Phytochemistry* **26**: 11-20.
7. Seo, S. Y., Sharma, V. K. and Sharma, N. (2003) Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2837-2853.
8. Chang, T. S. (2009) An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 2440-2475.
9. Kim, Y.-J. and Uyana, H. (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1707-1723.
10. Parvez, S., Kang, M., Chung, H. W. and Bae, H. (2007) Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* **21**: 805-816.
11. 배기환 (2000) 한국의 약용식물, 교학사, 서울, p 213.
12. Cha, B. C. and Lee, E. H. (2007) Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Kor. J. Pharmacog.* **38**: 31-36.
13. Xiao, Z. P., Shi, D. H., Li, H. Q., Zhang, L. N., Xu, C. and Zhu, H. L. (2007) Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3703-3710.
14. Xie, C. F., Yuan, H. Q., Qu, J. B., Xing, J., Lu, B. B., Wang, X. N., Ji, M. and Lou, H. X. (2009) Biocatalytic production of acyclic bis[bibenzyls] from dihydroresveratrol by crude *Momordica charantia* peroxidase. *Chem. Biodiver.* **6**: 1193-1201.
15. Wang, L. Q., Zhao, Y. X., Hu, J. M., Jia, A. Q. and Zhou, J. (2008) Stilbene derivatives from *Gnetum montanum* Markgr. *Helv. Chim. Acta* **91**: 159-164.
16. Salum, M. L., Robles, C. J. and Erra-Balsells, R. (2010) Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: One-pot synthesis-isolation of *Z*-cinnamic acids. *Org. Lett.* **12**: 4808-4811.
17. Lee, D., Bhat, K. P., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (2001) Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1286-1293.
18. Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y. and Ogura, T. (2000) Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* **8**: 1749-1755.

(2013. 8. 14 접수; 2013. 8. 30 심사; 2013. 9. 10 게재확정)