

# 떡쭉 추출물로부터 분리된 Dicafeoylquinic Acid 유도체들의 항산화 및 타이로시네이즈 저해 활성

임나리 · 김해수 · 하지훈 · 노근영 · 박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학학과 나노바이오화학장품연구실 화장품중합기술연구소  
(2015년 5월 7일 접수, 2015년 6월 10일 심사, 2015년 6월 18일 채택)

## Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Dicafeoylquinic Acid Derivatives Isolated from *Gnaphalium affine* D. DON.

Na Ri Im, Hae Soo Kim, Ji Hoon Ha, Geun Young Noh, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received May 7, 2015; Revised June 10, 2015; Accepted June 18, 2015)

### 초 록

본 연구에서는 떡쭉 추출물로부터 3가지 dicafeoylquinic acid (DCQA)를 분리 정제하여 구조를 결정하고, 항산화 활성, 세포보호효과, 그리고 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다. 떡쭉 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대하여 크로마토그래피, <sup>1</sup>H-NMR 및 MS 분석을 한 결과, 분리된 화합물은 총 3가지 DCQA 유도체 : 3,5-dicafeoylquinic acid (3,5-DCQA, **1**), 4,5-dicafeoylquinic acid (4,5-DCQA, **2**), 1,5-dicafeoylquinic acid (1,5-DCQA, **3**)로 나타났다. 분리된 compound **1-3**의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 각각 3.70, 5.80 및 5.50 μM로 지용성 항산화제로 알려진 (+)-α-tocopherol (FSC<sub>50</sub> = 21.90 μM)과 비교하여 더 큰 free radical 소거활성을 나타내었다. compound 1-3의 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 세포보호효과는 (+)-α-tocopherol과 유사한 세포보호활성을 나타내었다. Compound 1-3의 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 각각 0.15, 0.16, 및 0.13 mM로 미백성분으로 알려진 arbutin (IC<sub>50</sub> = 0.33 mM)과 비교하여 높은 tyrosinase 억제효과를 나타내었다. 이상의 결과들은 세 가지 DCQA가 식품 또는 화장품 산업에서 항산화 및 미백 기능성 소재로서 응용가능성이 있음을 시사한다.

### Abstract

In this study, three dicafeoylquinic acids (DCQAs) isolated from *Gnaphalium affine* D. DON. extracts were structurally identified and evaluated for their antioxidant activities, cellular protective effects, and tyrosinase inhibitory activities. The ethyl acetate fraction of *G. affine* was chromatographed, which yielded 3 DCQA derivatives of **1-3** : 3,5-dicafeoylquinic acid (3,5-DCQA, **1**), 4,5-dicafeoylquinic acid (4,5-DCQA, **2**), 1,5-dicafeoylquinic acid (1,5-DCQA, **3**). The structure of each compounds was determined using <sup>1</sup>H NMR and MS analyses. Compounds of **1-3** showed strong free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC<sub>50</sub> = 3.70, 5.80, and 5.50 μM, respectively) compared to those of a commonly used lipophilic antioxidant, (+)-α-tocopherol (21.90 μM). Cellular protective effects of **1-3** compounds on the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sensitized photohemolysis of human erythrocytes were similar to (+)-α-tocopherol. **1-3** compounds also exhibited higher tyrosinase inhibitory effects (IC<sub>50</sub> = 0.15, 0.16, and 0.13 mM) compared to arbutin (0.33 mM), known as a skin-whitening agent. These results indicate that three DCQA derivatives may be applied as an antioxidant and a skin whitening agent in food or cosmetic industries.

**Keywords:** *gnaphalium affine*, dicafeoylquinic acid, DPPH radical scavenging activity, cellular protective effect, tyrosinase

## 1. 서 론

자외선으로부터 유도되어 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부 및 세포에 광산화적 손상을 일으키는 강한 산화

력을 갖는 산소종으로서 superoxide anion radical (O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>), hydroxyl radical (·OH)과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)과 같은 비라디칼 종 그리고 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxy radical (ROO·), alkoxy radical (RO·) 등이 포함된다[1-3]. 이들 ROS는 생체 내 항산화 방어망을 붕괴시키고 이어서 세포를 구성하는 지질, 단백질 및 DNA의 산화뿐만 아니라 피부 진피 내 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 등 단백질 가수 분해효소의 발현을 증가시킴으로써 피부 탄력 및 장력을 나타내는 콜라겐과 엘라스틴 등의 세포외 매트릭스 구성 성분들을 절단시키

<sup>†</sup> Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea  
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

고 비정상적인 교차결합을 통하여 피부 노화를 가속화시킨다. 또한 ROS는 피부 기저막에 있는 멜라닌세포의 활성화를 통하여 멜라닌세포 증식 및 멜라닌 합성을 증가시킨다고 보고되고 있다[4-8]. 따라서 활성산소를 효율적으로 제거하고 세포 및 조직을 보호하기 위해서는 피부 항산화 방어망 구축 및 항산화 효능이 큰 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다[9,10].

멜라닌은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등의 일련의 효소반응에 의하여 생성되며, 이 중에서 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하는 효소는 tyrosinase이다[11,12]. 이는 melanogenesis의 초기단계를 촉진하는 속도 조절 인자로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosinase활성화 효소 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있기 때문에 tyrosinase 활성을 억제하는 것은 미백 효능에 결정적인 역할을 한다[13]. Tyrosinase 활성 저해제로는 kojic acid, arbutin, hydroquinone, ascorbic acid 등이 있으며 높은 세포독성 및 낮은 제형 안정성 등의 문제로 인해 사용량에 있어서 제한을 받고 있다[14]. 최근에 특히 미백 기능성화장품 소재개발관련 안전성 등의 문제가 대두됨에 따라 보다 안전한 천연물로부터 tyrosinase 활성 저해제 개발이 주목을 받고 있다.

떡썩(*Gnaphalium affine* D. DON.)은 초롱꽃목 국화과의 쌍떡잎식물로 한국, 일본 및 중국 등 동아시아에 널리 분포되어 자생한다. 떡썩은 천식, 기관지염 및 감기 몸살, 항염 등에 효과가 있고, 전립선증, 관절염, 요통 및 혈압을 떨어뜨리는 작용도 한다[15]. 저자들은 최근 연구에서는 떡썩 추출물의 에틸아세테이트 분획으로부터 높은 항산화 활성을 확인하여 보고한 바 있다[16]. 떡썩의 성분으로는 플라보노이드[18-20], 페놀 화합물[21], 폴리 사카라이드[22], 에센셜 오일[23], 다이테르펜류[24,25] 및 다른 화합물[26]이 존재하는 것으로 보고되어 있다[17].

본 연구에서는 떡썩 추출물 중 에틸아세테이트 분획에서 3가지 dicafeoylquinic acid (DCQA) 유도체들을 분리하여 구조동정을 하였으며, 이들 화합물에 대하여 DPPH로 유도된 free radical 소거 활성, 광노화에 있어서 중요한 활성산소인  $^1O_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 작용, 그리고 멜라닌 형성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase의 저해 활성을 평가하였다. 이를 통해 DCQAs가 식품 및 화장품 산업에서 항산화 및 미백 기능성 소재로서 가능성이 있는지를 알아보려 하였다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였고, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다. 비교물질로 사용된 (+)- $\alpha$ -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), arbutin, caffeic acid와 heparin, 광중감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 효소로 사용된 mushroom tyrosinase (7.99 mg solid, 3,130 units/mg solid) 및 L-tyrosine은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl, 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. HPLC 용매는 J. T. Baker 사(USA)와 B&J사(USA)의 HPLC grade 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 떡썩은 2014년 5월 제주도 제주대학교 102 제주대학교 바이오산업센터 근처에서 채집된 것을 70% 에탄올로 추출하여 사용하였다.

### 2.2. 떡썩 추출물로부터 성분 분리

건조된 떡썩 500 g에 70% 에탄올 5 L를 넣고 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이러한 침적 및 여과 과정은 3회 반복하여 실험하였다. 이 여액을 감압농축기(R-3, Buchi-Shibata, Tokyo, Japan)를 이용하여 40 °C에서 농축시킨 후 동결 건조시켜 분말을 얻었고 이 분말을 70% 에탄올 추출물로 실험에 사용하였다. 70% 에탄올 추출물 일부를 물과 n-헥산을 처리하여 비극성 성분을 제거하고 이어서 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻어 실험에 이용하였다. 저자들은 선행연구를 통하여 에틸아세테이트 분획물에서 큰 항산화능이 있음을 확인한 바 있다[16], 따라서 에틸아세테이트 분획으로부터 활성 성분을 찾고자 분리 정제를 수행하였다. 에틸아세테이트 분획의 TLC 분석은 극성 silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC판(0.25 mm thick, Merck, Darmstadt, Germany)을 이용하여 수행되었으며, 전개용매는 ethyl acetate/chloroform/formic acid/distilled water (8 : 1 : 1 : 1, v/v/v/v)를 사용하여 분석하였다. TLC를 통하여 얻은 8개의 띠(B1~8) 중 2개의 주요 띠 (B3, R<sub>f</sub> 0.71)와 (B4, R<sub>f</sub> 0.65)를 분리하기 위해서 Diaion HP-20 (4.5 × 30 cm, 250-850  $\mu$ m; Supelco, Bellefonte, USA) column chromatography를 수행하였다. 용리 용매로는 MeOH : H<sub>2</sub>O (100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100, v/v)를 사용하였다. 분리된 화합물들을 관찰하기 위해 silica gel TLC를 이용하였으며 254 nm 및 365 nm ultra violet (UV) 파장에서 반점을 확인하였다. 활성 분획물을 2차 정제하기 위해 Sephadex LH-20 (3 × 40 cm, 25-100  $\mu$ m; Sigma, St. Louis, USA) column chromatography를 실시하였으며 용리 용매로는 MeOH/H<sub>2</sub>O (7 : 3, v/v)를 사용하여 두 개의 활성 분획물(F1, F2)을 얻었다. 분획물 F1, F2는 각각 B3 (R<sub>f</sub> 0.71), B4 (R<sub>f</sub> 0.65)에 상응되었으며, 이들 분획물에 대해 HPLC 분석을 수행한 결과 F1은 두 개의 피크를, F2는 단일 피크를 나타내었다. 순수한 활성 물질을 얻기 위하여 분획물 F1은 Auto purification System Prep-LC (4.6 × 150 mm, 5  $\mu$ m; Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 다시 column chromatography를 실시하였다. 100% MeOH (A 용매)와 2% acetic acid가 포함된 H<sub>2</sub>O (B 용매)를 이동상으로 사용하고, 이동상의 유속을 17.6 mL/min, UV wavelength는 330 nm로 고정하여 수행하였다.

### 2.3. HPLC 및 LC-ESI/MS 분석 조건

분리된 화합물을 분석하기 위해 auto-sampler (SIL-20A, Shimadzu), photodiode array detector (SPD-20A, Shimadzu), binary pump (LC-20AT, Shimadzu), column oven (CTO-20A, Shimadzu) 그리고 vacuum degasser (DGU-20A, Shimadzu)를 갖춘 reversed-phase HPLC 시스템(Shimadzu model, Kyoto, Japan)을 이용하였다. 분석용 column으로는 Shimpack VP-ODS C<sub>18</sub> column (4.6 × 250 mm, 5  $\mu$ m; Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid가 포함된 H<sub>2</sub>O (A용매)와 100% MeOH (B용매)를 이용해 기울기 용리법으로 분석하였다. HPLC 분리조건으로 유속은 0.8 mL/min, 시료는 20  $\mu$ L를 주입하여 A용매 70-15%, B용매 30-80%로 농도에 변화를 주어 35 min간 수행하였다. column 오븐 온도는 40 °C로 설정하고 UV wavelength는 330 nm로 고정하여 수행하였다. MS/MS 분석은 LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)를 갖춘 LC/MS system을 사용하였으며, negative ion mode로 capillary voltage는 -15 V, capillary temperature는 400 °C, nebulizer pressure는 10 psi 그리고 collision gas (N<sub>2</sub>)에서 행하였다.

#### 2.4. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH법은 시료의 free radical 소거능을 확인할 수 있는 시험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 시료의 환원력을 측정한다. 따라서 DCQAs에 대한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였으며 실험방법은 Hatano 등[27]에 의해 보고된 방법에 따라서 수행되었다. 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 샘플을 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후, spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

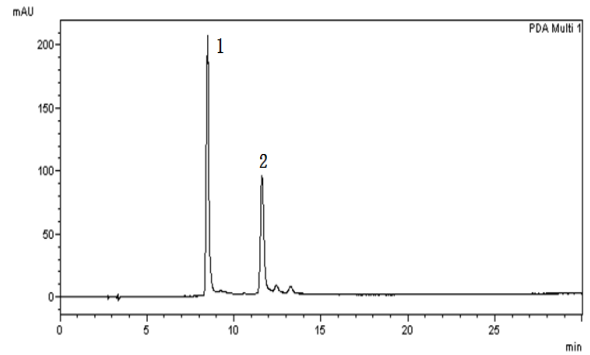
#### 2.5. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

적혈구의 광용혈 실험법은 Park 등이 보고한 방법에 따라서 수행되었다[28]. 적혈구는 건강한 성인 남녀 3명으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다. 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료를 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광조사하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 시료의 세포보호효과는 postincubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구가 50%가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 으로 표기하였다.

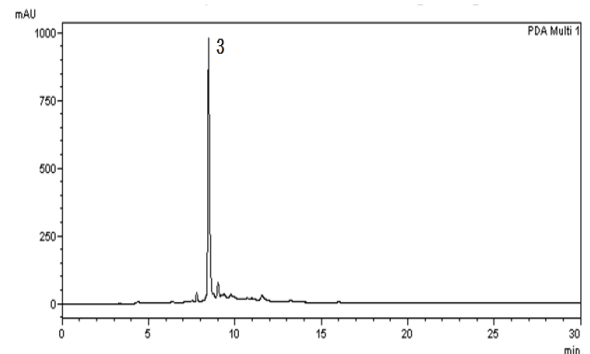
$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

#### 2.6. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해활성은 Vanni 등이 보고한 시험방법에 따라 실험을 진행하였다[29]. 기질로 사용된 L-tyrosine (0.3 mg/mL) 34 µL, mushroom tyrosinase (1,500 units/mL) 3 µL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 60 µL, sample 3 µL를 96 well에서 첨가하여 잘 혼합시켰다. 반응액을 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 얼음 수조에 넣어 반응을 종결시키고, ELISA reader (Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase의 활성을 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>, mM)로 표기하였다.



(a)



(b)

Figure 1. The HPLC chromatogram of isolated compounds (1-3). (a) F1 fraction and (b) F2 fraction of *G. affine* extracts.

#### 2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 분리된 compounds의 정제 및 구조 결정

떡썩의 에틸아세테이트 분획은 Diaion HP-20 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 통해 두 개의 활성 분획물(F1, F2)을 분리하여 3가지 compounds (1-3)을 얻었다. F1에는 compound 1 및 compound 2, F2에는 compound 3가 존재하였다. 활성 분획물 F1, F2에 대해서 HPLC 분석이 수행되었으며, 각각에 해당하는 HPLC 크로마토그램은 Figure 1에 나타내었다. 3가지 compounds (1-3)에 대한 머무름 시간은 각각 8.47 min, 11.60 min (Figure 1a) 그리고 8.82 min (Figure 1b)로 나타났다. 분리된 compounds (1-3)의 MS와 <sup>1</sup>H-NMR 분광학적 데이터는 다음과 같다.

**Compound 1** [*R*<sub>t</sub> 8.47 min]: yellow powder; Negative ESI-MS: *m/z* 515.1 [M-H]<sup>-</sup>, MS/MS fragments: *m/z* 353.0, 191.2, 179.1; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.48 (1H, d, *J* = 16, H-7''); 7.45 (1H, d, *J* = 16, H-7''); 7.06 (1H, d, *J* = 1.5, H-2''); 7.04 (1H, d, *J* = 1.5, H-2''); 7.00 (1H, dd, *J* = 1.5, *J* = 8.1, H-6''); 6.99 (1H, dd, *J* = 1.5, *J* = 8.1, H-6''); 6.78 (1H, d, *J* = 8.1, H-5''); 6.77 (1H, d, *J* = 8.1, H-5''); 6.25 (1H, d, *J* = 16, H-8''); 6.16 (1H, d, *J* = 16, H-8''); 5.20 (1H, ddd, *J* = 3.8, *J* = 9.5, *J* = 10.5, H-5); 5.32 (1H, ddd, *J* = 3.0, *J* = 3.2, *J* = 3.8, H-3); 4.14 (1H, dd, *J* = 3.8, *J* = 9.5, H-4); 2.16 (1H, dd, *J* = 3.0,

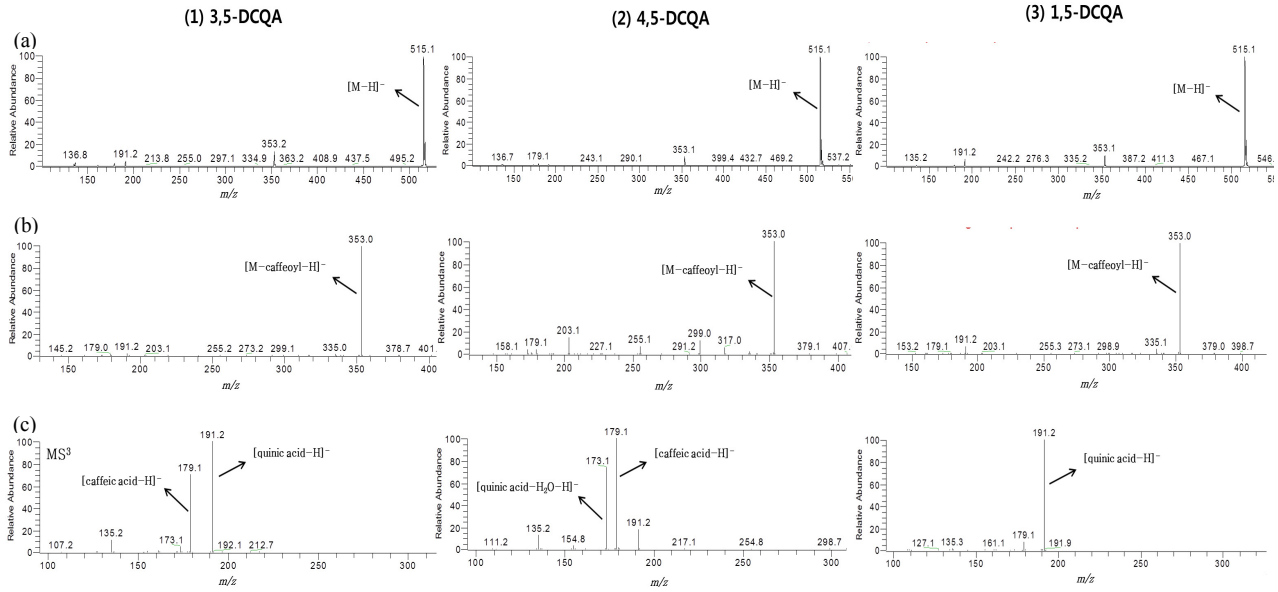


Figure 2. Mass spectra of compounds (1-3) in negative ion mode (LC-ESI/MS) : (a) MS<sup>1</sup> spectra; (b) MS<sup>2</sup> spectra; (c) MS<sup>3</sup> spectra.

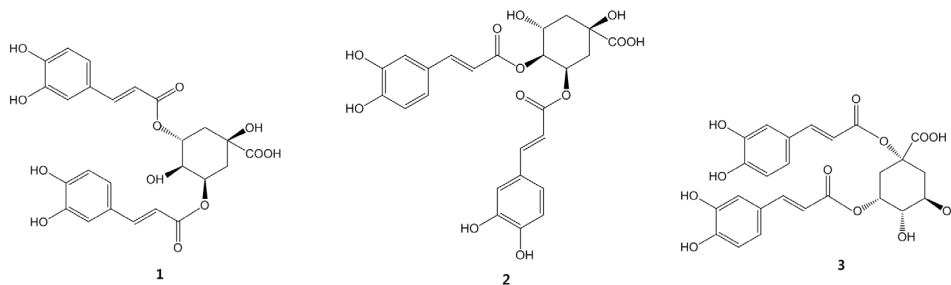


Figure 3. Structure of the compounds (1-3). (1) 3,5-DCQA, (2) 4,5-DCQA, and (3) 1,5-DCQA.

$J = 15$ , H-2  $\alpha$ ); 2.14 (1H, dd,  $J = 3.8$ ,  $J = 13.2$ , H-6  $\alpha$ ); 1.98 (1H, dd,  $J = 3.2$ ,  $J = 15$ , H-2  $\beta$ ); 1.94 (1H, dd,  $J = 10.5$ ,  $J = 13.2$ , H-6  $\beta$ ).

**Compound 2** [ $R_t$  11.60 min] : yellow powder; Negative ESI-MS :  $m/z$  515.1 [M-H]<sup>-</sup>, MS/MS fragments:  $m/z$  353.0, 191.2, 179.1, 173.1; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  : 7.48 (1H, d,  $J = 16$ , H-7''); 7.42 (1H, d,  $J = 16$ , H-7''); 7.02 (1H, d,  $J = 1.5$ , H-2''); 7.00 (1H, d,  $J = 1.5$ , H-2''); 6.98 (1H, dd,  $J = 1.5$ ,  $J = 8.1$ , H-6''); 6.99 (1H, dd,  $J = 1.5$ ,  $J = 8.1$ , H-6''); 6.75 (1H, d,  $J = 8.1$ , H-5''); 6.73 (1H, d,  $J = 8.1$ , H-5''); 6.24 (1H, d,  $J = 16$ , H-8''); 6.14 (1H, d,  $J = 16$ , H-8''); 5.36 (1H, m, H-5); 5.11 (1H, m, H-4); 4.17 (1H, dd,  $J = 3.8$ ,  $J = 9.5$ , H-3); 2.15-2.17 (2H, m, H-2); 2.13 (2H, m, H-6).

**Compound 3** [ $R_t$  8.82 min] : yellow powder; Negative ESI-MS :  $m/z$  515.1 [M-H]<sup>-</sup>, MS/MS fragments:  $m/z$  352.9, 191.1, 179.1; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  : 7.46 (1H, d,  $J = 16$ , H-7''); 7.34 (1H, d,  $J = 16$ , H-7''); 7.06 (1H, d,  $J = 1.9$ , H-2''); 7.00 (1H, d,  $J = 1.9$ , H-2''); 6.94 (1H, dd,  $J = 1.9$ ,  $J = 8.2$ , H-6''); 6.90 (1H, dd,  $J = 1.9$ ,  $J = 8.2$ , H-6''); 6.73 (1H, d,  $J = 8.2$ , H-5''); 6.70 (1H, d,  $J = 8.1$ , H-5''); 6.21 (1H, d,  $J = 16$ , H-8''); 6.12 (1H, d,  $J = 16$ , H-8''); 5.24 (1H, m, H-5); 4.00 (1H, m, H-3); 3.50 (1H, dd, H-4); 2.49 (1H, dd, H-2  $\alpha$ ); 2.33 (1H, dd, H-2  $\beta$ ); 1.78 (1H, dd, H-6  $\beta$ ).

Compounds (1-3)은 Figure 2에 나타난 negative ESI-MS spectrum에서 molecular ion [M-H]<sup>-</sup>이  $m/z$  515.1에서 동일하게 나타났으며, 동일

한 MS/MS fragment ion peak들을 나타내었기 때문에 동일한 분자식 (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>)을 가진 이성질체로서 확인되었다. 이들 이성질체들은 2개의 caffeoyl 작용기 그리고 quinic acid 부분이 연속적으로 소실되면서  $m/z$  353.0에서 [M-caffeoyl-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  191.2에서 [M-2caffeoyl-H]<sup>-</sup> 또는 [quinic acid-H]<sup>-</sup>, 그리고  $m/z$  179.1에서 [caffeic acid-H]<sup>-</sup>의 MS/MS fragment ion peak를 나타내었다. 반면, compound 2의 경우에는 H<sub>2</sub>O의 소실에 의한 결과로  $m/z$  173.1에서 [quinic acid-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>의 특징적인 MS/MS fragment ion peak를 나타내었다.

따라서, 이상의 HPLC 머무름 시간, <sup>1</sup>H NMR, 및 MS 분광학적 데이터를 바탕으로 이전에 보고된 문헌 데이터[30,31]와 비교해봤을 때, compounds (1-3)은 각각 3,5-DCQA, 4,5-DCQA, 및 1,5-DCQA로 확인되었으며 각 화합물의 구조는 Figure 3에 표시하였다. Dicafeoylquinic acid류의 화합물은 펜넬, 쑥, 고구마 잎, 커피 등에서 발견되는 천연 폴리페놀 화합물로서 항산화, 미백, 신경보호, 항바이러스 활성 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다[32].

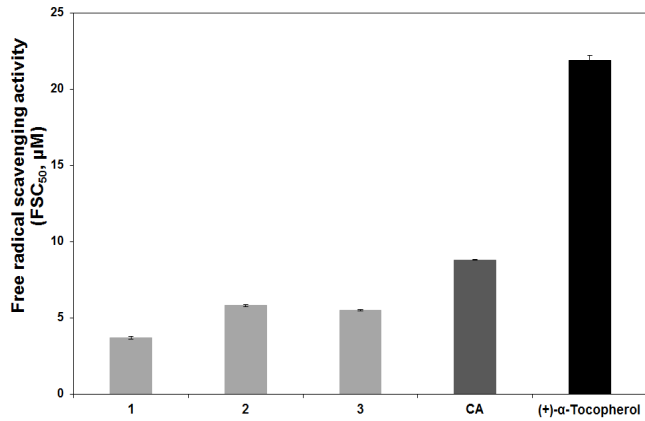
### 3.2. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

Free radical은 반응성이 매우 높은 분자로서 자동산화 과정을 거쳐 건강한 세포에 손상을 야기한다. 항산화제는 수소원자를 free radical에 줌으로써 생체 내의 자동산화 반응을 차단시키고 free radical의 손상으로부터 세포를 보호하는 역할을 한다. 이와 같이 항산화제의 수소원자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력을 통해 시료의 항산화

**Table 1. Cellular Protective Effect of Cellular Membrane of the Compounds (1-3) Isolated from *G. affine* Extracts on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes (Control = 31.8 ± 2.7 min)**

Concentration (μM)	$\tau_{50}$ (Half time of hemolysis) <sup>1)</sup>		
	10	25	50
Compound 1	38.3 ± 2.8	38.8 ± 1.7	40.8 ± 0.3
Compound 2	42.5 ± 0.3	44.3 ± 0.1	49.5 ± 1.1
Compound 3	42.5 ± 0.8	45.5 ± 0.4	47.7 ± 0.5
CA	39.4 ± 0.6	40.8 ± 0.5	42.4 ± 1.0
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	40.6 ± 1.0	43.4 ± 0.1	45.0 ± 0.7

<sup>1)</sup> Control,  $\tau_{50}$  = 31.8 ± 2.7 min



**Figure 4. DPPH radical scavenging activities of the DCQA compounds (1-3) isolated from *G. affine* extracts.**

능을 평가할 수 있다. DPPH는 잉여 전자의 공명이 일어나서 안정화된 radical로서 free radical 소거활성 실험에 많이 이용되고 있다. 따라서 본 논문에서는 분리된 화합물의 free radical 소거활성을 DPPH 시험법을 통해 측정하였다(Figure 4). 본 실험에서, 각 화합물들의 DPPH free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 DPPH 최대흡수 파장인 517 nm에서 감소하는 흡광도를 측정함으로써 결정된다. (+)- $\alpha$ -tocopherol 및 caffeic acid는 비교 대조군으로 사용되었다. 3,5-DCQA (1), 4,5-DCQA (2) 및 1,5-DCQA (3)의 DPPH free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 각각 3.70 ± 0.09, 5.80 ± 0.08 및 5.50 ± 0.05 μM로 나타났다. 반면에 비교 대조군인 caffeic acid와 (+)- $\alpha$ -tocopherol의 FSC<sub>50</sub>은 각각 8.80 ± 0.01, 21.9 ± 0.30 μM로 나타났다. 3가지 DCQA 모두 (+)- $\alpha$ -tocopherol 및 caffeic acid보다 우수한 free radical 소거활성을 나타내었다. Compounds (1-3)의 높은 항산화 활성은 Parejo 등[33]이 보고한 바에 따르면 카테콜 부분의 존재로 인해 높은 활성을 보인 것으로 판단된다. 또한, compounds (1-3)는 caffeoyl 작용기의 결합 위치와 무관하게 free radical 소거 활성이 비슷하게 나타났다고 사료된다. 이는 DCQAs (1-3)가 기능성 라디칼 소거제로 사용될 수 있음을 시사한다.

**3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과**

피부에는 포르피린, 리보플라빈과 같은 광증감제가 존재하며 이들은 자외선 조사 시 광증감 반응에 의해 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>와 여러 활성산소종(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH·)을 발생시킨다. 이들 활성산소종 중에서 특히 광증감반응으로 생성되는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>는 반응성이 매우 큰 ROS로 세포막에 라디칼반응을 개시시킴으로써 세포 손상을 야기하고 피부노화를 가속화한다. 그러므로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로부터 유도된 피부 세포 보호는 피부노화를 억제하는데 있어서 중요하다. 적혈구 광용혈 실험은 광노화 모델로, 활성산소에

의한 세포 파괴에 대해서 시료의 세포보호효과를 측정하는데 적합한 실험법이다. 본 실험에서는 광증감 물질인 로즈베נג알을 사용하여 발생된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 의한 사람 적혈구 세포의 용혈정도를 측정함으로써 DCQAs의 세포보호효과를 확인하고자 하였다. 세포보호효과는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )으로 나타냈으며 세포 보호 활성이 클수록 그 값은 크게 나타난다. 비교 대조군으로는 지용성 항산화제로 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 caffeic acid를 사용하였다. 특히, (+)- $\alpha$ -tocopherol은 활성산소에 의해 발생하는 지질 과산화반응의 연쇄반응을 효율적으로 차단할 뿐만 아니라 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>도 효율적으로 제거하는 것으로 알려져 있다. 3,5-DCQA (1), 4,5-DCQA (2) 및 1,5-DCQA (3)에 대하여 10, 25 및 50 μM의 농도에서 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )을 통해 세포보호효과를 비교하였다(Table 1). 시료를 넣지 않은 대조군의 경우 31.8 ± 2.7 min으로 재현성은 양호하게 나타났다. 10, 25 및 50 μM의 농도에서 3,5-DCQA (1)는 각각  $\tau_{50}$ 이 38.3 ± 2.8, 38.8 ± 1.7 및 40.8 ± 0.3 min, 4,5-DCQA (2)는 42.5 ± 0.3, 44.3 ± 0.1 및 49.5 ± 1.1 min 그리고 1,5-DCQA (3)는 42.5 ± 0.8, 45.5 ± 0.4 및 47.7 ± 0.5 min으로 전반적으로 농도의존적인 세포보호효과를 나타내었다. 특히, 4,5-DCQA (2)와 1,5-DCQA (3)는 모든 농도에서 caffeic acid 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 다소 큰 세포보호활성을 보였지만 3,5-DCQA (1)의 경우 비교물질들에 비해 다소 낮은 활성을 보였다. 즉, DCQAs (1-3)는 비교물질들과 전반적으로 유사한 세포보호효과를 보여주고 있다. 이는 DCQAs가 소수성 성질이 높아 인지질로 이루어진 세포막을 잘 침투함으로써 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 유사한 보호효과를 보인 것으로 사료된다[34].

**3.4. Tyrosinase 저해 활성**

멜라닌은 여러 경로를 통해 합성된다. 멜라닌 합성 과정에서 tyrosinase는 기질인 L-tyrosine을 산화시켜 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 생성하는 단계에서 핵심적인 효소로서 작용한다. 두 단계의 산화반응 이후의 반응은 자동산화적으로 진행되고 tyrosinase의 존재 하에 의해서 가속화된다. 따라서 tyrosinase는 멜라닌 합성의 전체적인 반응을 조절하는 중요한 효소로 미백활성 평가에 있어서 tyrosinase 저해 활성 평가는 매우 중요하다. 본 연구에서는 3,5-DCQA (1), 4,5-DCQA (2), 1,5-DCQA (3)과 비교물질로 caffeic acid 그리고 대표적인 미백제로 알려져 있는 arbutin의 tyrosinase 저해활성을 측정해보았다(Figure 5). 3,5-DCQA (1), 4,5-DCQA (2) 그리고 1,5-DCQA (3)의 IC<sub>50</sub>은 각각 0.15 ± 0.03, 0.16 ± 0.01, 0.13 ± 0.01 mM로 나타났다. 세 가지 DCQAs (1-3) 모두 비교물질인 caffeic acid (IC<sub>50</sub> = 0.35 ± 0.02 mM) 및 arbutin (IC<sub>50</sub> = 0.33 ± 0.01 mM)에 비해 2배 이상 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 따라서 DCQAs (1-3)는 미백기능성 소재로서 화장품에 응용가능성이 있는 것으로 보인다.



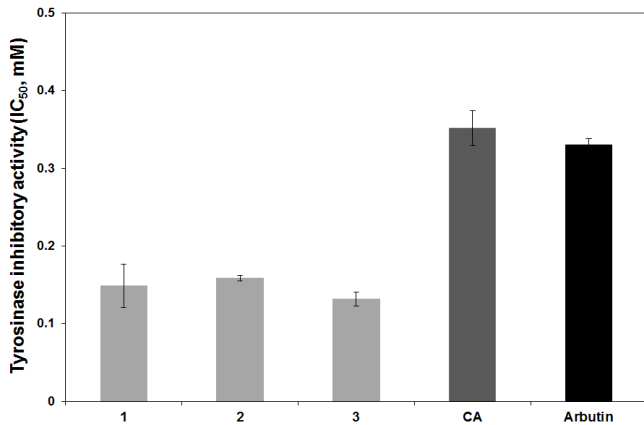


Figure 5. Tyrosinase inhibitory activity of the DCQA compounds (1-3) extracts from isolated from *G. affine* extracts.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 자외선 및 활성산소로부터 피부를 보호하기 위한 천연 기능성 소재를 개발하고자, 떡쭈 추출물로부터 세 가지 화합물을 분리하고 항산화 활성, 세포보호효과, 그리고 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다.

1. 떡쭈 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 분리된 세 가지 화합물은 <sup>1</sup>H-NMR 및 MS 분석을 통해 구조 동정한 결과, 각각 3,5-dicafeoylquinic acid (3,5-DCQA), 4,5-dicafeoylquinic acid (4,5-DCQA), 1,5-dicafeoylquinic acid (1,5-DCQA)로 동정하였고, 이 성분들은 본 연구를 통하여 최초로 떡쭈에 존재함을 확인하였다.

2. DPPH 라디칼 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 3,5-DCQA는 3.70 ± 0.09 μM, 4,5-DCQA는 5.80 ± 0.08 μM, 1,5-DCQA는 5.50 ± 0.05 μM을 나타내었다. 이는 비교물질인 (+)-α-tocopherol보다 우수한 항산화효능을 보여주었다.

3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 유도된 사람 적혈구의 파괴에 있어서 세 가지 DCQA의 세포보호효과는 10, 25 및 50 μM의 농도에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 비교물질인 caffeic acid 및 (+)-α-tocopherol과 전반적으로 유사한 세포보호효과를 나타내었다.

4. 세 가지 DCQA의 tyrosinase 저해 활성(IC<sub>50</sub>)은 1,5-DCQA (0.132 ± 0.009 mM) > 3,5-DCQA (0.149 ± 0.028 mM) > 4,5-DCQA (0.159 ± 0.004 mM) 순서로 확인되었다. 특히 세 가지 DCQA 모두 비교물질인 caffeic acid (0.352 ± 0.023 mM) 및 arbutin (0.33 ± 0.009 mM)에 비해 2배 이상 높은 저해활성을 나타내었다.

이상의 연구 결과, 떡쭈 추출물로부터 분리된 세 가지 DCQA는 우수한 항산화 활성 및 미백활성을 보였으며, 기능성 향노화소재 및 미백 화장품의 원료로서 식품 및 화장품 분야에서 이용 가능성이 있음을 시사하였다.

#### 감 사

본 과제(결과물)는 산업통상자원부의 재원으로 지원을 받아 수행된 제주권 광역경제권 선도산업 육성사업(과제번호 : R0002229)의 연구 결과입니다.

#### References

1. S. B. Han, H. A. Gu, S. J. Kim, H. J. Kim, S. S. Kwon, and H. S. Kim, Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**, 1-8 (2013).
2. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radication and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review, *Int. J. Cosmet. Science*, **27**, 17-34 (2005).
3. G. E. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, and K. H. Kim, Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1212-1217 (2011).
4. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases Role in joint diseases, *Joint Bone Spine.*, **74**, 324-329 (2007).
5. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Amer. Heart J.*, **23**, 2382-2383 (1998).
6. D. Bagchi D, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129-140 (1995).
7. S. B. Berman and T. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**, 1185-1195 (1997).
8. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, and M. Kikuchi, Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pig. Cell Res.*, **16**, 629-638 (2003).
9. S. M. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 680-683 (2012).
10. N. R. Jo, H. A. Gu, S. A. Park, S. B. Han, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of isoquercitrin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**, 103-118 (2012).
11. M. Iwata M, T. Corn, S. Iwata, M. A. Everett, and B. B. Fuller, The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins, *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 9-15 (1990).
12. K. Kameyama, T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, and S. Nishi-yama, Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 126-132 (1993).
13. J. C. Cho, H. S. Rho, Y. H. Joo, S. M. Ahn, D. H. Won, S. S. Shin, Y. H. Park, K. D. Suh, and S. N. Park, The depigmenting activities of hydroxyl carboxamide derivatives containing hydrophobic moiety, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **33**, 1333-1336 (2012).
14. Y. J. Kima and H. Uyama, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1707-11723 (2005).
15. Z. Xi, W. Chen, Z. Wu, Y. Wang, P. Zeng, G. Zhao, X. Li, and L. Sun, Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don, *Food Chem.*, **130**, 165-170 (2012).

16. H. S. Kim, N. R. Im, J. H. Park, M. O. Kim, and S. N. Park, Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Gnaphalium affine* D. DON. Extraxts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**, 11-20 (2014).
17. J. Li, D. Huang, W. Chen, Z. Xi, C. Chen, G. Huang, and L. Sun, Two New Phenolic Glycosides from *Gnaphalium affine* D. Don and Their Anti-Complementary Activity, *Molecules*, **18**, 7751-7760 (2013).
18. M. Aritomi and T. Kawasaki, Dehydro-para-asebotin, a new chalconeglucoside in the flowers of *Gnaphalium affine* D. Don., *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1800-1805 (1974).
19. M. Aritomi, M. Shimojoe, and T. Mazaki Aritomi, Chemical Constituents in Flowers of *Gnaphalium affine* D. Don., *Yakugaku Zasshi.*, **84**, 895-896 (1964).
20. M. Morimoto, S. Kumeda, and K. Komai, Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1888-1891 (2000).
21. A. N. Shikova, M. Kundracikovac, T. L. Palama, O. N. Pozharitskaya, V. M. Kosman, V. G. Makarov, B. Galambosi, H. J. Kim, Y. P. Jang, Y. H. Choi, and R. Verpoorte, phenolic constituents of *Gnaphalium uliginosum* L., *Phytochemistry*, **3**, 45-47 (2010).
22. Y. Aoshima, Y. Hasegawa, S. Hasegawa, A. Nagasaka, T. Kimura, S. Hashimoto, Y. Torii, and N. Tsukagoshi, Isolation of GnafC, a polysaccharide constituent of *Gnaphalium affine*, and synergistic effects of GnafC and ascorbate on the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Bios. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2068-2074 (2003).
23. W. C. Zeng, R. X. Zhu, L. R. Jia, H. Gao, and Y. Zheng, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*, *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 1322-1328 (2011).
24. T. L. Meragelman, G. L. Silva, E. Mongelli, and R. R. Gil, ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Phytochemistry*, **62**, 569-572 (2003).
25. A. Urza, R. Torres, C. Bueno, and L. Mend, Flavonoids and diterpenoids in the trichome resinous exudate from *Pseudognaphalium cheiranthifolium*, *P. heterotrichium* and *P. vira vira*, *Biochem. Syst. Ecol.*, **23**, 459 (1995).
26. Z. Xi, W. Chen, Z. Wu, Y. Wang, P. Zeng, G. Zhao, X. Li, and L. Sun, Chemical constituents of petroleum ether fractions of *Gnaphalium affine* D. Don. *Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.*, **32**, 311-313 (2011).
27. T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, and T. Okuda, Two New Flavonoids and Other Constituents in Licorice Root: Their Relative Astringency and Radical Scavenging Effects. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2090-2097 (1988).
28. S. N. Park, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. B. Han, Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L. and the mechanisms underlying these effects, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 3046-3052 (2014).
29. A. Vanni, D. Gastaldi, and G. Giunta, Kinetic investigations on the double enzymic activity of the tyrosinase mushroom, *Annali di Chimica.*, **80**, 1-2 (1990).
30. A. Tolonen, T. Joutsamo, S. Mattila, T. Kämäräinen, and Jalonen J, Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC ESI/TOF/MS and <sup>1</sup>H NMR methods, *Phytochem. Anal.*, **13**, 316-328 (2002).
31. M. N. Clifford, S. Knight, and N. Kuhnert, Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3821-3832 (2005).
32. R. Gu, G. Dou, J. Wang, J. Dong, and Z. Meng, Simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and its active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B.*, **852**, 85-91 (2007).
33. I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, G. Schmeda-Hirschmann, J. Burillo, and Codina C, Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1890-1897 (2004).
34. N. R. Jo, S. A. Park, S. H. Jeon, J. H. Ha, and S. N. Park, Cellular Protective Effects and Antioxidative Activity of Resveratrol, *Appl. Chem. Eng.*, **24**, 483-488 (2013).