



## Phytochemical constituents of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots and their tyrosinase inhibitory activity

Yun-Hyeok Choi<sup>1</sup> · Chun Whan Choi<sup>1</sup> · Jae Yeon Lee<sup>1</sup> · Eun-Kyung Ahn<sup>1</sup> ·  
Joa Sub Oh<sup>2</sup> · Seong Su Hong<sup>1</sup>

### 율무근의 식물화학적 성분 연구 및 Tyrosinase 저해 활성

최윤혁<sup>1</sup> · 최춘환<sup>1</sup> · 이재연<sup>1</sup> · 안은경<sup>1</sup> · 오좌섭<sup>2</sup> · 홍성수<sup>1</sup>

Received: 22 August 2016 / Accepted: 17 November 2016 / Published Online: 31 March 2017  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

**Abstract** In the course of screening tyrosinase inhibitory activity, EtOAc-soluble fraction of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf. (Gramineae) roots showed significant inhibition. Further fractionation of the EtOAc-soluble fraction resulted in six compounds, which were identified as (+)-icariol A<sub>2</sub> (**1**), zhepiresionol (**2**), 4-hydroxybenzaldehyde (**3**), *trans*- $\rho$ -coumaric acid (**4**), *N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide (**5**), and coixol (**6**). The chemical structures of these compounds were identified on the basis of spectroscopic methods (MS, 1D and 2D NMR) and comparison with literature values. Compound **1** was first reported from this plant. Also, this is the first time that the isolation of compound **5** has been reported from nature source. Among the isolated compounds, compounds **4** and **6** showed enzyme inhibitory activity, with IC<sub>50</sub> values of 6.5 and 62.4  $\mu$ M, respectively, in comparison with these of positive control, arbutin.

**Keywords** Acetamide · Benzoxazolinone · *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* · Phenolic compounds · Tyrosinase

Seong Su Hong (✉)  
E-mail: bestgene@hotmail.com

<sup>1</sup>Bio-Center, Gyeonggi Business & Science Accelerator, Suwon, Gyeonggi 16229, Republic of Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan, Chungnam 31116, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

Melanin은 자외선의 빛 에너지를 흡수하여 자외선에 의한 손상으로부터 진피 이하의 피부 기관을 보호하는 역할을 하며, 피부 생체 내에 생겨난 유해산소 및 free radical 등을 잡아주는 등 외부 유해인자로부터 피부를 보호하는 유용한 역할을 수행한다(Prota 1988; Hwang 등, 2013). 그러나 과도한 자외선 노출로 인한 비정상적인 melanin의 생성은 과색소 피부침착과 관련된 다양한 기미, 주근깨, 검은 반점 등의 피부질환의 원인이 되며, 더 나아가서는 피부노화 등을 야기시켜 피부 건강을 위협하고 있다(Hill 등, 1997). Melanin 생성은 여러 단계의 효소적, 화학적인 연속적인 반응으로 이루어지며, tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2와 같은 주요한 효소에 의해 조절되며 tyrosinase는 구리를 포함한 rate-limiting 효소로서 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하고 있다(Kobayashi 등, 1994; Chang 2009; Chen 등, 2015). Tyrosinase는 멜라노솜(melanosome) 내에서 melanogenesis의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로 tyrosine을 산화시켜 3,4-dihydrophenylalanine (DOPA)을 생성하는 tyrosine hydroxylase 활성화와 DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는 핵심 효소로 작용한다(Kobayashi 등, 1994). 기존의 미백물질로 알려진 vitamin-c, kojic acid, arbutin은 물질의 불안정성, 알레르기 유발, 피부의 영구 탈색화, 발암성 물질, 피부효소에 의한 분해 등 기준에 알려진 미백제들의 문제점을 해결하고자 멜라닌 생합성을 억제하여 미백효과를 가져올 수 있는 무독성 천연소재 개발이 요구되고 있으며(Ando 등, 1993; Chang 2009; Chen 등, 2015), 속수자 종자추출물, 백출유, 감국 추출물, 천궁추출물, 상지추출물 등의 천연물유래 소재가 개별적 기능성을 인정받아 사용 중에 있다. 그러나, 고가 소재의 확대에 의한 제한적인 고객층만을 타겟으로하는 제품들이 개발되

는 실정으로 울무 부산물과 같이 농작물의 부산물 소재화로 저렴한 비용의 소재를 이용한 저가 기능성화장품 시장 확대가 필요하다.

울무(*Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf)는 벼과(Gramineae)의 한해살이 초본으로 염주(*Coix lachryma-jobi* L.)의 변종이며, 원산지는 인도 또는 동남아시아로 야생형과 재배형으로 전세계의 열대 및 온대 지역에 널리 분포한다(Kuo 등, 2012). 국내에서는 경기도 연천군의 대표적인 특산물로 국내 전체 재배면적의 약 80 % 이상을 차지하고 있다. 울무의 종자는 식품과 한약재, 줄기와 잎은 가축의 사료로 활용되는데, 한방에서는 울무의 종피를 제거한 씨를 의이인(薏苡仁)이라 하여 부종, 신경통, 류머티즘, 방광결석 등의 약재로 쓰며, 뿌리는 황달과 신경통의 치료에 사용한다(Kim 2012; Song 등, 2016). 울무 종자의 생리활성에 관한 연구로는 항비만, 항산화, 항염증, 인간 유방암 세포주(human breast cancer cell lines)에 대한 anti-proliferative 활성, 위장보호 효과 등이 보고되어 있으며(Lee 등, 2008; Chung 등, 2010; Chung 등, 2011a; Chung 등, 2011b; Song 등, 2016; Wang 등, 2016), Chen 등(2011)은 울무 종자 껍질의 acetone 추출물의 강력한 항돌연변이 활성을, Otsuka 등(1988)은 울무 뿌리로부터 분리한 benzoxazinod 계열 화합물의 항염증 활성을 보고 한 바 있다(Otsuka 등, 1988; Chen 등, 2011). 울무의 주요성분으로는 fatty acid, phenolic acids, lactams, polysaccharide, benzoxazinoid, lignan 등이 보고되어 있다(Nagao 등, 1985; Takahashi 등, 1986; Otsuka 등, 1988; 1989; Lee 등, 2008; Han 등, 2013; 2015; Hong 등, 2016; Kim 등, 2016). 기존 울무의 생리활성 및 성분에 대한 연구는 종자를 이용한 보고가 대부분으로, 울무 종자 채취 후 버려지는 부산물(잎, 줄기, 뿌리, 미강 등)에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 울무 부산물의 소재화를 위해 현대인들의 관심이 높은 미백 효과와 관련된 tyrosinase 활성을 검토하였으며, 활성이 우수한 울무 뿌리로부터 미백 물질을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 사용한 울무 (*C. lachrymal-jobi* var. *ma-yuen*) 뿌리를 비롯한 각종 부위의 시료는 연천군 농업기술센터로부터 제공받아 실험에 사용하였으며, 표본(G54)은 (재) 경기도경제과학진흥원 천연물연구팀에 보관하고 있다.

### 시약 및 기기

비선광도는 P-2000 digital polarimeter (JASCO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. NMR은 Bruker Ascend III 700 (700 MHz Cryo Probe) spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 측정하였으며, ESI-MS는 Finnigan TSQ Quantum mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였고, HRESI-MS는 AB SCIEX TripleTOF 5600+ mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. MPLC와 preparative HPLC는 Combi Flash Rf (Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA)과

Shimadzu system (LC-8A pump, SPD-20A UV/VIS detector, Kyoto, Japan)을 각각 사용하였다. 분석용 HPLC는 Waters (Waters Co., Milford, MA, USA)의 alliance 시스템(Waters 2998 PDA, Waters e2695 separation modules)을 사용하였다. TLC plate는 Merck의 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm, Darmstadt, Germany) 또는 RP-18<sub>254S</sub> (0.25 mm)를 사용하였다. 발색시약으로는 10 % vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm에서 확인하였다. 추출, 분획 및 MPLC에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 사용하였고, preparative HPLC에 사용된 acetonitrile (Honeywell B&J, Muskegon, MI, USA)은 HPLC급 용매(99.9 %)로 사용하였다. 물은 초순수제조장치 (Cascada™ RO water, Pall Corporation, Washington, NY, USA)를 이용하여 3차 증류수를 사용하였다. 또한, Tyrosinase inhibitions assay는 L-tyrosine, mushroom tyrosinase와 arbutin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, potassium phosphate buffer 제조를 위해 monobasic potassium phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)와 dibasic potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma)를 사용하였으며, ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 추출 및 분리

건조 울무(*C. lachrymal-jobi* var. *ma-yuen*) 뿌리, 줄기, 잎, 껍질, 미강에 대하여 각각 20 g의 시료에 70 % 에탄올로 추출하여 여과, 농축, 동결건조 후 tyrosinase 억제 활성을 측정하였으며, 활성이 우수한 울무 뿌리(1.9 kg)을 70 % 에탄올로 추출하여 에탄올 추출물(333 g)을 얻었다. 이를 증류수 현탁 후 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, 수포화 BuOH로 용매분획을 반복 실시하였으며, 각각 *n*-hexane 분획(14.3 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획(5.1 g), EtOAc 분획(5.5 g), 수포화 BuOH 분획(28.9 g) 그리고 물 분획(280 g)을 얻었다. 각 분획물을 100 mg/mL의 농도로 stock solution을 제조하여 tyrosinase 저해 활성을 검색한 결과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획과 EtOAc 분획이 저해활성을 나타내었으며, 이에 활성이 우수한 EtOAc 가용분획으로부터 성분분리를 시도하였다. EtOAc 가용분획(5 g)에 대하여 증류수-MeOH혼합용매를 이동상으로 Diaion HP-20 레진을 이용한 컬럼크로마토그래피를 수행하여 7개의 소분획(G54-5-1~7)을 얻었다. 소분획 G54-5-3에 대하여 acetonitrile과 증류수를 이동상으로 역상 컬럼을 이용한 MPLC (RediSep® Rf 130g C18 Reverse Phase, 75 mL/min, 5에서 50 % acetonitrile, 100 min)를 수행하여 8개의 분획(G54-8-1~8)으로 나누었다. 반복된 preparative HPLC (column: YMC-Pack ODS-A, 5 µm, 250×10 mm I.D., 12 mL/min, 증류수-acetonitrile, 95:5에서 7:3, 50 min)를 수행하여 소분획 G5481로부터 화합물 3 (2.4 mg)과 5 (1.5 mg)를 얻었으며, G54-82로부터 화합물 1 (4.6 mg), 2 (3.5 mg) 및 5 (4.3 mg)를 각각 분리 정제하였다. 화합물 6 (7.5 mg)은 G54-85에 대하여 preparative HPLC (column: YMC-Pack ODS-A, 5 µm, 250×10 mm I.D., 12 mL/min, 증류수-acetonitrile, 90:10에서 50:50, 30 min)를 수행하여 분리하였다.

화합물 1 [(+)-icariol A<sub>2</sub>]: Colorless amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +23.9° (c 0.2, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6.65 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'), 4.83 (2H, d, *J*=7.7 Hz,

H-7, 7), 3.76 (12H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.52 (2H, dd,  $J=11.2$ , 4.2 Hz, H<sub>a</sub>-9, 9), 3.47 (2H, dd,  $J=11.9$ , 3.5 Hz, H<sub>b</sub>-9, 9), 2.13 (2H, dd,  $J=7.7$ , 4.2 Hz, H-8, 8'); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 148.3 (C-3, 3', 5, 5'), 135.1 (C-4, 4'), 133.7 (C-1, 1'), 104.1 (C-2, 2', 6, 6'), 82.5 (C-7, 7'), 60.8 (C-9, 9'), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 54.0 (C-8, 8'); ESI-MS  $m/z$  459 [M+Na]<sup>+</sup>, 895 [2M+Na]<sup>+</sup>, 435 [M-H]<sup>-</sup>, 481 [M+COOH]<sup>-</sup>.

화합물 2 (zhepiresionol): Colorless amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.67 (2H, s, H-2, H-6), 4.67 (1H, dd,  $J=7.0$ , H-7), 4.54 (1H, dd,  $J=9.8$ , 7.0, H<sub>a</sub>-9), 4.39 (1H, dd,  $J=9.8$ , 7.0, H<sub>b</sub>-9), 4.31 (1H, t,  $J=9.1$ , H<sub>a</sub>-9'), 4.09 (1H, dd,  $J=9.1$ , 3.5, H<sub>b</sub>-9'), 3.85 (6H, s, OCH<sub>3</sub>×2), 3.55 (1H, dt,  $J=9.1$ , 3.5, H-8'), 3.20 (1H, m, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 181.1 (C-7'), 149.4 (C-3, 5), 136.6 (C-4), 131.6 (C-1), 104.6 (C-2, 6), 87.9 (C-7), 71.9 (C-9), 71.1 (C-9'), 49.5 (C-8), 47.5 (C-8'); ESI-MS  $m/z$  281 [M+H]<sup>+</sup>, 303 [M+Na]<sup>+</sup>, 279 [M-H]<sup>-</sup>.

화합물 3 (4-hydroxybenzaldehyde): White amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 9.76 (1H, s, CHO), 7.77 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 192.8 (C-7), 165.2 (C-4), 133.4 (C-2, 6), 130.3 (C-1), 116.9 (C-3, 5); ESI-MS  $m/z$  123 [M+H]<sup>+</sup>, 121 [M-H]<sup>-</sup>.

화합물 4 (*trans*-*p*-coumaric acid): White amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.60 (1H, d,  $J=16.1$  Hz, H-7), 7.45 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2, 6), 6.81 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3, H-5), 6.28 (1H, d,  $J=16.1$  Hz, H-8), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 171.0 (C-9), 161.2 (C-4), 146.7 (C-7), 131.1 (C-2, 6), 127.2 (C-1), 116.8 (C-3, 5), 115.6 (C-8); ESI-MS  $m/z$  165 [M+H]<sup>+</sup>, 163 [M-H]<sup>-</sup>.

화합물 5 [*N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide]: White amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 9.01 (1H, s, HN), 7.98 (1H, d,  $J=9.1$  Hz, H-6), 6.46 (1H, d,  $J=2.8$  Hz, H-3), 6.36 (1H, dd,  $J=9.1$ , 2.8 Hz, H-5), 3.95 (2H, s, H-9), 3.67 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 120.1 (C-1), 148.3 (C-2), 101.9 (C-3), 156.3 (C-4), 103.9 (C-5), 120.7 (C-6), 170.1 (C-8), 62.1 (C-9); HRESI-MS (positive ion mode)  $m/z$  198.07608 [M+H]<sup>+</sup> (calc. for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>, 198.07592); ESI-MS  $m/z$  198 [M+H]<sup>+</sup>, 220 [M+Na]<sup>+</sup>, 196 [M-H]<sup>-</sup>.

화합물 6 (coixol): White amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.97 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-4), 6.89 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-7), 6.75 (1H, dd,  $J=8.4$ , 2.1 Hz, H-5), 3.79 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 157.8 (C-2), 157.7 (C-6), 146.2 (C-8), 125.1 (C-9), 111.1 (C-5), 110.8 (C-4), 98.2 (C-7), 56.6 (6-OCH<sub>3</sub>); ESIMS  $m/z$  166 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Tyrosinase inhibition assay

0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μL에 농도별로 희석한 시료 20 μL를 첨가 한 후 1250 unit/mL 농도의 tyrosinase 20 μL를 첨가하였다. 여기에 1.5 mM의 L-tyrosine 기

질을 40 μL씩 첨가하여 잘 섞은 후 37 °C에서 10분 반응시킨 다음 490 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 효소대신 시료액과 완충으로 대체하여 측정한 실험군의 흡광도와 비교하여 아래의 계산식에 따라 tyrosinase 저해활성을 계산하여 IC<sub>50</sub> 값을 산출하였으며, 양성대조군으로 arbutin을 사용하였다(Jin 등, 2012).

$$*Inhibition \% = 100 - \{(A-B)/(C-D) \times 100\}$$

- A: 시료액의 반응 후의 흡광도
- B: tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정한 시료액의 흡광도
- C: 공시료액의 반응 후의 흡광도
- D: tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정한 공시료액의 흡광도

#### 통계분석

실험결과와 통계적인 유의성은 Student's t-test 로 분석하였으며 *p* value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

#### HPLC 분석조건

HPLC는 Waters사의 alliance 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 컬럼은 YMC-Pack ODS-A (250×4.6 mm, S-5 μm, 12 nm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) 컬럼을 사용하였고, 컬럼온도는 30 °C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 μL였다. 이동상은 0.05 % trifluoroacetic acid가 함유된 증류수 (A)와 acetonitrile (B)을 사용하여 기울기 용매조건 (0-5분, 5 % B, 5-50분, 5-50 % B)이며, 검출과장은 210 nm에서 검출하였다

#### 결과 및 고찰

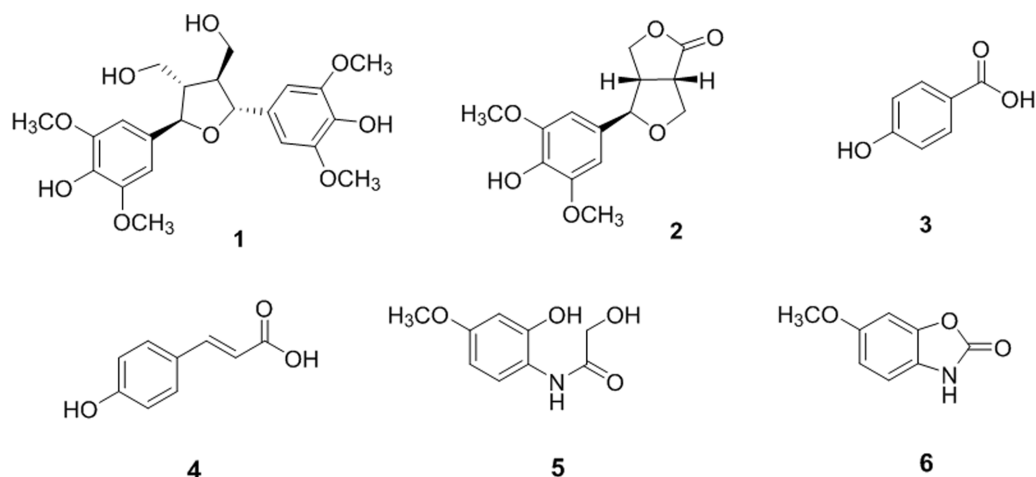
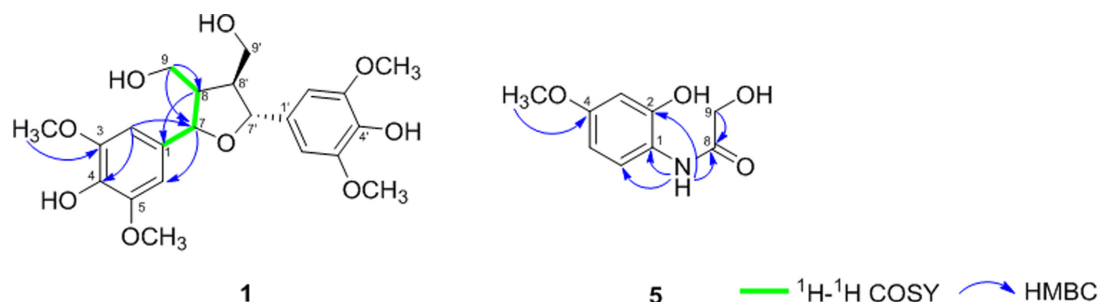
울무 열매 수확 후 남겨진 부산물(뿌리, 줄기, 잎, 껍질, 미강)의 에탄올 추출물에 대하여 기질인 L-tyrosine과 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 mushroom tyrosinase에 의해 산화되어 생성되는 멜라닌의 양을 흡광도로 측정하여 tyrosinase 억제 활성을 측정하는 미백 효능 평가를 3반복하여 진행하였다. Positive control로 기존에 알려진 미백제인 arbutin을 양성대조군으로 이용하여 각각의 조건별로 준비된 분획물을 평가한 결과 울무근의 활성 억제 농도 IC<sub>50</sub> 결과가 159.3 μg/mL로 양성대조군인 arbutin (IC<sub>50</sub>=165.3 μg/mL)과 비교시 가장 좋은 활성을 나타내었다(Table 1). Tyrosinase 억제 활성이 우수한 건조 울무근에 대하여 70 % 에탄올 용매로 추출 농축한 추출물의 용매 분획물(*n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 그리고 물 가용부)의 tyrosinase 저해 활성을 검색한 결과 EtOAc 가용부 활성이 가장 우수함을 확인하였다(IC<sub>50</sub>=86.9 μg/mL, Table 1). 이에 EtOAc 가용 분획물에 대하여 컬럼 크로마토그래피와 preparative HPLC 등을 반복 실시하여 2종의 neolignan (1과 2), 2종의 단순 phenolic (3과 4), 1종의 acetamide (5) 그리고 benzoxazolinone (6) 계열 화합물을 분리, 정제하였다. 분리한 화합물은 1D, 2D NMR 및 MS 등의 기기분석 및 문헌과의 비

**Table 1** Inhibitory effect of solvent fractions (roots) and by-product of *C. lachrymal-jobi* var. *ma-yuen* on mushroom tyrosinase activity

Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>a</sup> ± SD <sup>b</sup>
뿌리	159.3±3.52***
줄기	>1000
잎	796.2±62.5**
껍질	>1000
미강	>1000
뿌리 ethanol extracts	159.3±3.52***
뿌리 <i>n</i> -hexanesoluble layer	>1000
뿌리 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> soluble layer	886±25.8***
뿌리 EtOAc-soluble layer	86.9±2.8**
뿌리 <i>n</i> -BuOHsoluble layer	>1000
뿌리 H <sub>2</sub> Osoluble layer	>1000
Arbutin <sup>c</sup>	165.3±2.1*

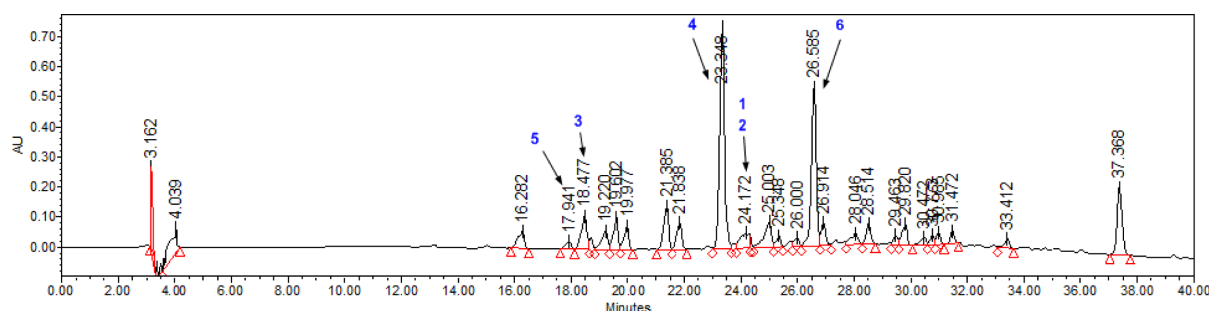
<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values represent the concentration requires for 50 % inhibition of tyrosinase inhibition activity. <sup>b</sup>Values represent the mean ± SD of the three experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 compared with the control group. <sup>c</sup>Arbutin was used as a positive control

교를 통하여 각각 (+)-icariol A<sub>2</sub> (**1**) (Kim 등, 2011), zhepiresionol (**2**) (Chung 등, 2011b)], 4-hydroxybenzaldehyde (**3**) (Lee 등, 2010), *trans*-*p*-coumaric acid (**4**) (Yi 등, 2011), *N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide (**5**), 그리고 coixol (**6**) (Kamperdick 등, 1997)로 구조 규명하였으며(Figs. 1, 3),

**Fig. 1** Structures of compounds 1–6**Fig. 2** Selected <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlation of compounds **1** and **5**

tyrosinase 저해 활성을 통해 화합물 각각의 미백활성을 측정하였다. 이 중에서 화합물 **1**은 이 식물에서 처음으로 분리되었으며, 화합물 **5**는 자연계로부터 처음으로 분리된 화합물로 확인되었고, 이에 대해 고찰하고자 한다.

화합물 **1**은 흰색 분말로 얻어졌으며, UV spectrum에서는 207과 354 nm에서 강한 흡수대를 나타내었다. 분자량은 positive mode ESI-MS에서 *m/z* 459 [M+Na]<sup>+</sup>와 negative mode ESI-MS에서 *m/z* 435 [M-H]<sup>-</sup>에서 관측되어 436으로 결정하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 δ<sub>H</sub> 6.65 (4H, s)에서 2 set의 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene proton peak로 추정되는 signal이 확인되었고, 2개의 methines [δ<sub>H</sub> 2.13 (2H, dd, *J*=7.7, 4.2 Hz, H-8, 8')], 2개의 oxymethylenes [δ<sub>H</sub> 3.52 (2H, dd, *J*=11.2, 4.2 Hz, H<sub>a</sub>-9, 9'), 3.47 (2H, dd, *J*=11.9, 3.5 Hz, H<sub>b</sub>-9, 9')], 2개의 oxymethines [δ<sub>H</sub> 4.83 (2H, d, *J*=7.7 Hz, H-7, 7')]과 4개의 methoxy groups [δ<sub>H</sub> 3.76 (12H, s, OCH<sub>3</sub>)]이 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 methoxy group에 기인하는 peak (δ<sub>C</sub> 56.4)를 포함하여 8개의 signal을 확인하였다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY로 spectrum으로부터 OCHCHCH<sub>2</sub>OH에 기인하는 부분 구조를 결정하였다(Fig. 2). 분자량 *m/z* 436과 1D 및 2D NMR로부터 화합물 **1**은 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzenepropanol 2 분자가 7-*O*-7' 및 8-8'이 결합하고 있는 2,5-diaryltetrahydrofuran 골격의 lignan 화합물로 추정되었으며, 비선광도 (측정치 [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +23.9°, 문헌치 [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +23.5°) 결과 및 문헌상의 data와 비교하여 (+)-icariol A<sub>2</sub>로 확인동정하였다(Kim 등, 2011). (+)-Icariol A<sub>2</sub>



**Fig. 3** HPLC-DAD chromatogram (210 nm) of *C. lachrymal-jobi* var. *ma-yuen* root (EtOAc-soluble layer). Compounds are identified in the figure by number: **1**-(+)-icariol A<sub>2</sub>, **2**-zhepiresinol, **3**-4-hydroxybenzaldehyde, **4**-*trans*- $\rho$ -coumaric acid, **5**-*N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide, **6**-coixol

(**1**)는 이 식물로부터 처음으로 분리된 것으로 확인하였다.

화합물 **5**는 흰색 분말로 얻어졌으며, UV spectrum에서는 242와 282 nm에서 강한 흡수대를 나타내었다. 분자식은 positive ion mode HRESI-MS data로부터 C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>로 결정하였다 ( $m/z$  198.07608 [M+H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>, 198.07592). 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 및 DEPT)와 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR spectra로부터 1,2,4-trisubstituted benzene ring [ $\delta_H$  7.98 (1H, d,  $J$ =9.1 Hz, H-6), 6.46 (1H, d,  $J$ =2.8 Hz, H-3)과 6.36 (1H, dd,  $J$ =9.1, 2.8 Hz, H-5)]에 기인하는 signal을 확인하였고, acetamide moiety [ $\delta_H$  9.01 (1H, s, NH), 3.95 (2H, s, H-9),  $\delta_C$  170.1 (C-8)과 62.1 (C-9)]에 기인하는 시그널을 확인하였다. HMBC spectrum으로부터  $\delta_H$  3.67 (3H, s)과  $\delta_C$  156.3과의 correlation으로 methoxy group은 C-4 위치에 결합하고 있음을 확인하였고, acetamide의 amine proton [ $\delta_H$  9.01 (1H, s, NH)]과  $\delta_C$  120.1 (C-1), 148.3 (C-2), 120.7 (C-6), 170.1 (C-8)과의 correlation으로 acetamide group은 C-1 위치에 결합하고 있음을 결정하였다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 화합물 **5**는 *N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide (HMPHAA) 로 확인하였다. 화합물 **5**는 곡류 이중감응물질(cereal allelochemical)인 6-methoxybenzoxazolin-2-one 이 토양내 미생물의 biotransformation에 의해 생성된다는 보고가 있지만(Etzerodt 등, 2006), 자연계로부터 처음으로 분리된 것으로 확인하였다. 울무근으로부터 분리한 6종의 화합물에 대하여 tyrosinase 저해 활성을 측정하였으며, 이들 화합물 중 단순 phenolic 계열의 화합물인 4-

hydroxybenzaldehyde (**3**), *trans*- $\rho$ -coumaric acid (**4**)와 benzoxazolinone 계열의 coixol (**6**)은 각각 707.4, 6.5, 62.4  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 대조군으로 사용한 arbutin (IC<sub>50</sub>=618.7  $\mu$ M)과 유사하거나 우수한 활성을 확인하였다(Table 2). Tyrosinase 억제 활성을 나타낸 *trans*- $\rho$ -coumaric acid (**4**)는  $\alpha$ -MSH에 의해 멜라닌 생성이 촉진된 B16/F10 흑색종 세포에서 미백효과가 있다고 보고되어 있다(An 등, 2008).

### 초 록

본 연구는 천연 미백소재 탐색을 위하여 울무(*C. lachryma-jobi* var. *ma-yuen*) 부산물 추출물의 tyrosinase 저해활성을 검증하였으며, 그 중에서 뿌리 추출물은 159.3  $\mu$ g/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 울무 뿌리 추출물의 순차적 용매 분획에 대한 활성 검증 후 가장 활성이 우수한 EtOAc 분획물에 대하여 Diaion HP-20 column chromatography, MPLC 및 preparative HPLC를 수행해 울무근으로부터 여섯 개의 화합물을 정제하였고, 이 물질들의 구조 분석은 LC-MS와 NMR 데이터 해석을 바탕으로 진행하여 각각 (+)-icariol A<sub>2</sub> (**1**), zhepiresinol (**2**), 4-hydroxybenzaldehyde (**3**), *trans*- $\rho$ -coumaric acid (**4**), *N*-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyacetamide (**5**), coixol (**6**)로 구조를 규명하였다. 화합물 **1**은 이 식물에서 처음으로 분리되었으며, 화합물 **5**는 자연계로부터 처음으로 분리된 화합물로 확인하였다. 이들 화합물 중 4-hydroxybenzaldehyde (**3**), *trans*- $\rho$ -coumaric acid (**4**)와 coixol (**6**)은 순서대로 707.4, 6.5, 62.4  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 대조군으로 사용한 arbutin (IC<sub>50</sub>=618.7  $\mu$ M)과 비교시 유사하거나 우수한 활성을 확인하였다. 이로 미루어 보아, 울무근 추출물과 활성물질의 tyrosinase 저해활성을 확인할 수 있었으며, 울무근 추출물의 미백소재로서의 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

**Keywords** 울무 · Acetamide · Benzoxazolinone · Phenolic compounds · Tyrosinase

**Table 2** Tyrosinase inhibitory effects of compounds **1-6**

Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup> mean $\pm$ SD <sup>b</sup>
<b>1</b>	>1000
<b>2</b>	>1000
<b>3</b>	707.4 $\pm$ 20.51**
<b>4</b>	6.5 $\pm$ 0.81*
<b>5</b>	>1000
<b>6</b>	62.4 $\pm$ 3.36*
Arbutin <sup>c</sup>	618.7 $\pm$ 0.11*

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values represent the concentration requires for 50 % inhibition of tyrosinase inhibition activity. <sup>b</sup>Values represent the mean  $\pm$  SD of the three experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 compared with the control group. <sup>c</sup>Arbutin was used as a positive control

**감사의 글** 본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며(114144-3), 이에 감사드립니다.

## References

- An SM, Lee SI, Choi SW, Moon SW, Boo YC (2008) *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quelpaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Br J Dermatol* 159: 292–299
- Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J Invest Dermatol* 100: 150–155
- Chang TS (2009) An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10: 2440–2475
- Chen HH, Chiang W, Chang JY, Chien YL, Lee CK, Liu KJ, Cheng YT, Chen TF, Kuo YH, Kuo CC (2011) Antimutagenic constituents of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) with potential cancer chemopreventive activity. *J Agric Food Chem* 59: 6444–6452
- Chen WC, Tseng TS, Hsiao NW, Lin YL, Wen ZH, Tsai CC, Lee YC, Lin HH, Tsai KC (2015) Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. *Sci Rep* 5: 7995
- Chung CP, Hsia SM, Lee MY, Chen HJ, Cheng F, Chan LC, Kuo YH, Lin YL, Chiang W (2011a) Gastroprotective activities of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *J Agric Food Chem* 59: 6025–6033
- Chung CP, Hsu CY, Lin JH, Kuo YH, Chiang W, Lin YL (2011b) Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines. *J Agric Food Chem* 59: 1185–1194
- Chung CP, Hsu HY, Huang DW, Hsu HH, Lin JT, Shih CK, Chiang W (2010) Ethyl acetate fraction of adlay bran ethanolic extract inhibits oncogene expression and suppresses DMH-induced preneoplastic lesions of the colon in F344 rats through an anti-inflammatory pathway. *J Agric Food Chem* 58: 7616–7623
- Etzerodt T, Nielsen ST, Mortensen AG, Christophersen C, Fomsgaard IS (2006) Elucidating the transformation pattern of the cereal allelochemical 6-methoxy-2-benzoxazinone (MBOA) and the trideuteriomethoxy analogue [D<sub>3</sub>]-MBOA in soil. *J Agric Food Chem* 54: 1075–1085
- Han AR, Kang U, Kil YS, Lee J, Seo EK (2015) Identification of Two New Lactams from the Hulled Seeds of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Bull Korean Chem Soc* 36: 2401–2403
- Han AR, Kil YS, Kang U, Youn IS, Choi G, Lee YJ, Nam JW, Lee JH, Hong J, Lee SK, Seo EK (2013) Identification of a New Fatty Acid from the Seeds of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Bull Korean Chem Soc* 34: 1269–1271
- Hill HZ, Li W, Xin P, Mitchell DL (1997) Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res* 10: 158–161
- Hong SS, Choi CW, Choi YH, Oh JS (2016) Coixlachryside A: A new lignan glycoside from the roots of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf. *Phytochemistry Lett* 17: 152–157
- Hwang JY, Park TS, Son JH (2013) Whitening effect of extracts and fractions from *Diospyros kaki* calyx. *J Life Sci* 23: 377–382
- Jin KS, Oh YN, Park JA, Lee JY, Jin S, Hyun SK, Hwang HJ, Kwon HJ, Kim BW (2012) Anti-oxidant, anti-melanogenic, and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract and its Solvent Fractions. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40: 371–379
- Kamperdick C, Lien TP, Sung TV, Adam G (1997) 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one from *Scoparia dulcis*. *Pharmazie* 52: 965–966
- Kim JD (2012) Literature on the Quality and Effect of Job's Tears. *Korean Journal of Agricultural History* 11: 89–122
- Kim KH, Kim HK, Choi SU, Moon E, Kim SY, Lee KR (2011) Bioactive lignans from the rhizomes of *Acorus gramineus*. *J Nat Prod* 74: 2187–2192
- Kim SY, Choi CW, Hong SS, Shin H, Oh JS (2016) A new neolignan from *Coix lachryma-jobi* var. *mayuen*. *Nat Prod Commun* 11: 229–231
- Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borrón JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) function as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* 3: 5818–5825
- Kuo CC, Chen HH, Chiang W (2012) Adlay (薏苡 yì yǐ; “soft-shelled job’s tears”; the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) is a potential cancer chemopreventive agent toward multistage carcinogenesis processes. *J Tradit Complement Med* 2: 267–275
- Lee MY, Lin HY, Cheng F, Chiang W, Kuo YH (2008) Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) bran. *Food Chem Toxicol* 46: 1933–1939
- Lee SY, Choi SU, Lee JH, Lee DU, Lee KR (2010) A new phenylpropane glycoside from the rhizome of *Sparganium stoloniferum*. *Arch Pharm Res* 33: 515–521
- Nagao T, Otsuka H, Kohda H, Sato T, Yamasaki K (1985) Benzoxazinones from *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry* 26: 2959–2962
- Otsuka H, Hirai Y, Nagao T, Yamasaki K (1988) Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *J Nat Prod* 51: 74–79
- Otsuka H, Takeuchi M, Inoshiri S, Sato T, Yamasaki K (1989) Phenolic compounds from *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry* 28: 883–886
- Prota G (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev* 8: 525–556
- Song MY, Jung HW, Park YK (2016) Antiobesity effect of water extract of *Coix lachryma-jobi* var. *mayuen* in high fat fed C5BL/6 Mice. *J Korean Med Obes Res* 16: 27–35
- Takahashi M, Konno C, Hikino H (1986) Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C, glycans of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* seeds. *Planta Med* 52: 64–65
- Wang L, Chen C, Su A, Zhang Y, Yuan J, Ju X (2016) Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed meal. *Food Chem* 196: 509–517
- Yi B, Hu L, Mei W, Zhou K, Wang H, Luo Y, Wei X, Dai H (2011) Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules* 16: 10157–10167