

연자육의 페놀성 성분 및 Tyrosinase 저해 활성

정지연 · 모은진 · 황방연 · 이미경*

충북대학교 약학대학

Phenolic constituents of Nelumbinis Semen and Their Tyrosinase Inhibitory Activity

Ji Yeon Jeong, Eun Jin Mo, Bang Yeon Hwang, and Mi Kyeong Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 362-763, Korea

Abstract – In the course of screening tyrosinase inhibitory activity, EtOAc-soluble fraction of Nelumbinis Semen (Seeds of *Nelumbo nucifera*) showed significant inhibition. Further fractionation of the EtOAc-soluble fraction resulted in 12 compounds, which were identified as 4-(hydroxymethyl)phenol (**1**), tyrosol (**2**), 4-(hydroxymethyl)benzaldehyde (**3**), 4-hydroxybenzoic acid (**4**), 4-(2-methoxyvinyl)benzene-1,2-diol (**5**), 2,6-dihydroxybenzoic acid (**6**), (2*R*-trans)-2,3-dihydro-3,5,7,8-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one (**7**), (+)-catechin (**8**), elephantorrhizol (**9**), (+)-dehydrovomifoliol (**10**), (-)-boscialin (**11**) and uridine (**12**). Compounds **5** and **7** were first reported from this plant. Among the isolated compounds, compound **7** showed strong inhibition on tyrosinase activity with mixed mechanism of competitive and noncompetitive inhibition.

Key words – Nelumbinis Semen, Tyrosinase, Phenolic compounds

Melanin은 melanogenesis를 통하여 생성되는 색소 성분으로 사람의 피부, 머리카락 등의 색을 결정하는 중요한 요소이다. 뿐만 아니라 자외선과 같은 다양한 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다.¹⁾ 그러나 과도한 melanin의 생성은 색소침착과 관련된 다양한 피부질환의 원인이 되며 미용적인 문제로 주근깨, 기미 등이 주목을 받고 있다.^{2,3)} 멜라닌은 동물의 피부 외에도 식물에도 존재한다. 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 멜라닌과 같은 색소물질을 생성하는 과정을 총칭하며 여러 단계의 효소적, 화학적인 연속적인 반응을 통하여 이루어진다. 주요한 효소로는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1) 및 TRP-2 등이 알려져 있다. 특히 멜라닌 생성의 첫 단계를 진행하는 tyrosinase는 rate-limiting 효소로서 melanin 생성에서 가장 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Tyrosinase는 polyphenol

oxidase라고도 불리며 melanin이 생성되는 미생물, 동물 및 식물에 다양하게 분포하고 있다.^{6,7)} 최근 여러 분야에서 과도한 melanin의 생성을 억제하려는 목적으로 다양한 tyrosinase 저해제의 개발이 활발히 진행되고 있다. Tyrosinase 저해제는 사과 등 농작물이나 농작물을 이용한 제품의 갈변을 억제하는데 이용되고 있으며 hyperpigmentation disease의 치료제나 화장품의 미백제로 폭넓게 응용될 수 있는 중요한 전략이 되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾

연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertner)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 여러해살이풀로 연못이나 늪에서 자란다. 물 속 땅에서 옆으로 길게 뻗어 자라는 원통모양의 뿌리줄기는 연근이라고 하여 식용으로 사용되며 연잎은 차라 연잎밥 등으로 이용되고 있다. 한방에서는 성숙과실을 연자육(Nelumbinis Semen)이라고 하며 진정, 자양강장약으로 다몽(多夢), 심계실면(心悸失眠), 만성설사, 자궁출혈 등의 치료에 사용한다.¹¹⁾ 연자육의 성분으로는 alkaloid 및 flavonoid 물질이 보고되었으며 항산화 활성 등이 보고되었다.^{12,13)} 최근 연자육의 미백 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 멜라닌의 생성에 관여하는 여러 효소들인 tyrosinase, TRP-1 및 2 등을 억제하여 멜라닌의 생성을 감소시키는 것으로 보고되었다.¹⁴⁾ 그러나 미백의 유효 성분은 대하여서는

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

보고되지 않았다. 천연물로부터 tyrosinase 저해제를 찾는 연구의 일환으로 천연물의 tyrosinase 저해 활성 검색 결과 연자육의 EtOAc 분획물이 유의성있는 tyrosinase 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. 이에 연자육으로부터 활성물질의 분리를 수행하였다. 또한 분리한 성분에 대하여서는 tyrosinase 저해 효능을 측정하고 그 저해기전을 규명하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 연자육은 2013년 3월 충북 제천의 약초상에서 구입하여 충북대학교 약초원에서 감정을 받은 후 사용하였으며 표본(CBNU-201303-NS)은 충북대학교 약초원에 보관하고 있다.

성분 분리 - 연자육(5 kg)을 80% MeOH로 추출하여 총 MeOH 추출물(103.5 g)을 얻었다. 이를 증류수 현탁한 후 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH로 용매분획을 반복 실시하였으며, 각각 *n*-hexane 분획, CH₂Cl₂ 분획, EtOAc 분획 및 *n*-BuOH 분획을 얻었다. 분획에 대하여 tyrosinase 저해 활성 검색한 결과 CH₂Cl₂ 분획과 EtOAc 분획이 저해활성을 나타내었다. 이에 두 분획으로부터 성분분리를 시도하였다. CH₂Cl₂ 분획(8.2 g)을 *n*-hexane-EtOAc 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 17개의 소분획(NSM1-NSM17)을 얻었다. 그 중 소분획 NSM11에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 6개의 소분획(NSM11A-NSM11F)을 얻었다. 소분획 NSM11B와 소분획 NSM11D에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 10 및 11을 얻었다. EtOAc분획(3.2 g)을 CH₂Cl₂-MeOH 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 7개의 소분획(NSE1-NSE7)을 얻었다. 그 중, 소분획 NSE2에 대하여 MeOH을 용매로 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 시행하여 5개의 소분획(NSE2A-NSE2E)을 얻었다. 소분획 NSE2C, 소분획 NSE2D와 소분획 NSE2E에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 1, 2, 3 및 7을 얻었다. 또한 소분획 NSE4에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH 혼합용매로 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 시행하여 6개의 분획(NSE4A-NSE4F)으로 나누었다. 소분획 NSE4B, 소분획 NSE4C과 소분획 NSE4F에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 4, 5 및 9를 얻었다. 또한 NSE5에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH을 용매로 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 시행하여 7개의 분획(SCE5A-SCE5G)으로 나누었으며 NSE5F에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 8을 분리 정제 하였다. 소분획 NSE6에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마

토 그래피를 수행하여 3개의 소분획(NSE6A-NSE6C)을 얻었다. 그 중 소분획 NSE6B에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 6을 얻었다. 또한 NSE7에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH을 용매로 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 시행하여 7개의 분획(SCE7A-SCE7G)으로 나누었으며 NSE7F에 대하여 semi-preparative HPLC를 반복 수행하여 화합물 12를 분리 정제 하였다. 분리 정제한 화합물은 DRX 400, AMX 500(BRUKER, Germany) NMR과 LCQ Fleet(Thermo Scientific, USA) ESI-MS를 이용하여 구조를 동정하였다.

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 전처리하였다. 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.

Lineweaver-Burk 분석 - 저해활성을 나타낸 화합물에 대하여 화합물의 농도를 0, 30, 100 μM로 농도를 증가시키면서 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. Lineweaver-Burk식을 이용하여 농도변화에 따른 저해활성을 비교하여 경쟁적, 비경쟁적 저해활성을 판단하였다.

통계분석 - 실험결과와 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 연자육의 EtOAc 분획물이 유의성있는 저해 활성을 나타내었으며 이에 활성성분의 분리를 시도하였다. 연자육의 총 메탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 분획하여 *n*-hexane, CH₂Cl₂, 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 NMR 및 MS 등의 기기분석을 통하여 그 구조를 규명하였다. 구조 규명 결과 화합물 1-6은 simple phenol성 화합물, 화합물 7-9는 flavonoid 계열 화합물, 화합물 10, 11은 megastamine 계열 화합물이다. 이들의 구조는 문헌¹⁵⁻²¹⁾과 비교하여 4-(hydroxymethyl)phenol(1), tyrosol(2), 4-(hydroxy-

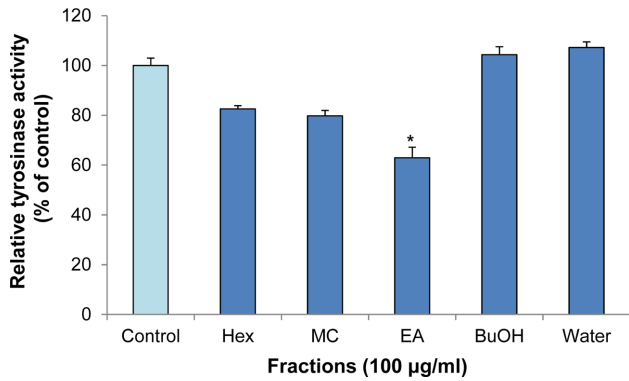


Fig. 1. Effect of total methanolic extract, each fraction of *Nelumbinis Semen* on tyrosinase activity. Tyrosinase activity was measured using tyrosine as a substrate. Relative activity (%) was calculated as (activity of compound with substrate - negative control of compound without substrate)/(activity 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. Hex, *n*-hexane fraction; MC, CH₂Cl₂ fraction; EA, EtOAc fraction; BuOH, *n*-BuOH fraction; Water, H₂O fraction. **p*<0.05 compared with control.

methyl)benzaldehyde(3), 4-hydroxybenzoic acid(4), 4-(2-methoxyvinyl)benzene-1,2-diol(5), 2,6-dihydroxybenzoic acid (6), (2*R*-trans)-2,3-dihydro-3,5,7,8-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one(7), (+)-catechin(8), elephantorrhizol(9), (+)-dehydrovomifoliol(10), (-)-boscialin(11)과

uridine(12)으로 동정하였다(Fig. 2). 분리한 화합물 중 화합물 9-11은 연잎에서 보고되었으며²²⁾ 화합물 5, 7은 이 식물에서 처음으로 분리 보고되는 화합물이다.

연자육으로부터 분리한 화합물 12종에 대하여 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 연자육에서 분리한 화합물 중 flavanone 계열의 화합물인 화합물 7이 100 µM에서 유의성있는 저해효능을 나타내었으며 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 69.2%의 저해효능을 나타내었다. 화합물 7, 8 및 9는 모두 flavonoid 계열의 화합물이며 세분하면 화합물은 7은 flavanone, 화합물 8 및 9는 flavanol 계열의 화합물로 C ring의 carbonyl기의 유무에 차이를 나타낸다. 본 연구의 tyrosinase 저해 실험에서 화합물 7은 저해효능을 나타내었으나 catechin 계열의 화합물 8, 9는 미약한 저해 활성을 나타내었다. Flavanone 계열의 물질의 경우 B ring의 hydroxyl group의 개수가 tyrosinase 저해 활성에 영향을 준다는 연구 결과가 보고되어 있다²³⁾. 또한 flavanone의 3-hydroxy-4-keto 모핵은 tyrosinase와 copper chelate 복합체를 형성하여 저해 활성을 증가시킨다는 연구 결과도 보고되어 있다²⁴⁾. 따라서 flavonoid B ring의 carbonyl기가 tyrosinase의 저해 효능에 영향을 주는 것으로 추측되며 이에 대해서는 더 연구가 필요하리라 생각된다.

화합물 7의 tyrosinase 저해활성의 기전을 알아보기 위하여 Lineweaver-Burk 분석을 수행하였다. 화합물 7의 농도를 0, 30, 100 µM로 농도를 증가시키면서 처리하였을 때, x 절편의 값과 y 절편의 값 모두 증가함을 확인하였다. 따라서

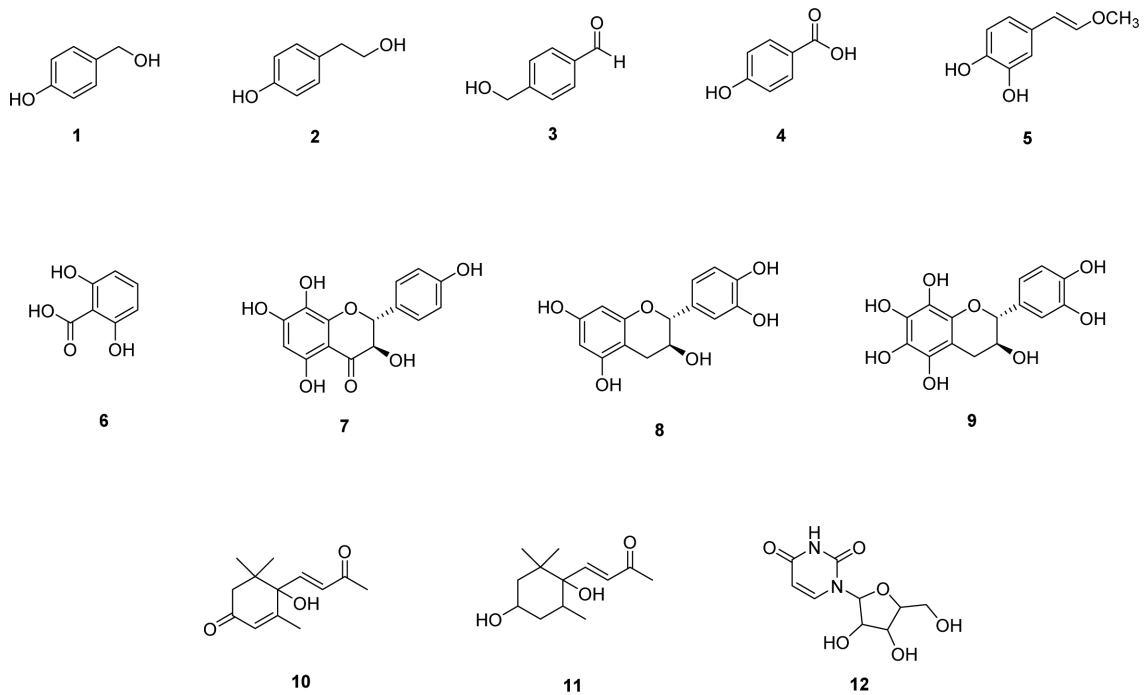


Fig. 2. Structures of compounds 1-12 isolated from *Nelumbinis Semen*.

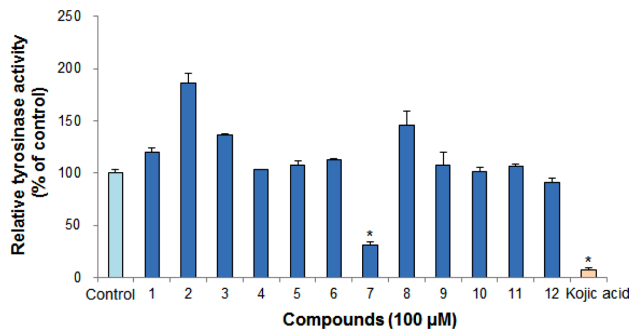


Fig. 3. Effect of compounds 1-12 from Nelumbinis Semen on tyrosinase activity. Tyrosinase activity was measured using tyrosine as a substrate. Kojic acid was used as the positive control. * $p < 0.05$ compared with control.

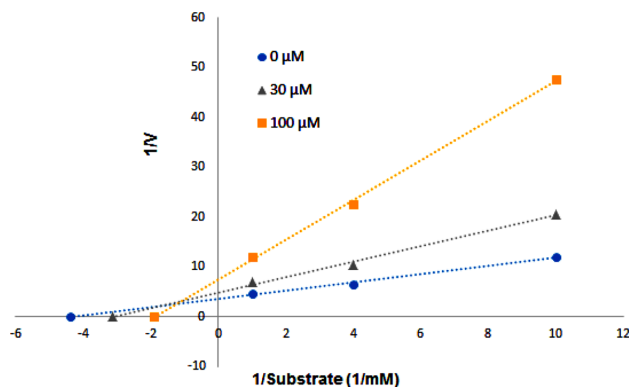


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of inhibitory activity of compound 7. Tyrosinase activity was measured using tyrosine as a substrate. The concentration of substrate and compound 7 was added as indicated.

화합물 7은 경쟁적, 비경쟁적 저해 기전이 모두 관여하는 복합기전에 의하여 tyrosinase의 활성을 저해하는 것으로 추측할 수 있었다.

이상의 결과로 연자육으로부터 총 12개의 화합물을 분리하여 그 구조를 동정하였고 tyrosinase의 저해활성을 나타내었다. 또한 연자육의 분획은 melanoma 세포에서 멜라닌 생성에 관여하는 효소의 발현을 억제함으로써 멜라닌의 양을 감소시키는 것으로 보고되었다.¹⁴⁾ 따라서 이러한 멜라닌 생성 저해 및 tyrosinase 저해 효능을 바탕으로 미백 소재로서 연자육의 다양한 응용에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

본 연구에서는 tyrosinase 저해 활성을 나타낸 연자육으로부터 성분분리를 수행하여 12종의 화합물을 분리 정제하였으며, 분리한 화합물의 구조는 4-(hydroxymethyl)phenol(1), tyrosol(2), 4-(hydroxymethyl)benzaldehyde(3), 4-hydroxybenzoic acid(4), 4-(2-methoxyvinyl)benzene-1,2-diol(5), 2,6-

dihydroxybenzoic acid(6), (2*R*-trans)-2,3-dihydro-3,5,7,8-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one (7), (+)-catechin(8), elephantorrhizol(9), (+)-dehydrovomifoliol (10), (-)-boscianin(11)과 uridine(12)으로 동정하였다. 분리한 화합물 중 화합물 5 및 7은 이 식물에서 처음으로 분리 보고되는 화합물이며 화합물 7이 유의성있는 tyrosinase 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. Lineweaver-Burk 분석을 수행하여 화합물 7의 tyrosinase 저해활성의 기전을 알아보고 그 결과 경쟁적, 비경쟁적 저해 기전이 모두 관여하는 복합 기전에 의해 활성을 저해하는 것으로 추측할 수 있었다.

사사

본 연구는 교육부의 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 지원으로 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
12. Wattanapiromsakul, C., Forsterc, P. I. and Waterman, P. G. (2003) Alkaloids and limonoids from *Bouchardatia neuro-*

- cocca*: systematic significance. *Phytochemistry* **64**: 609-615.
13. Husam, M. K., Dihui, H., Bijun, X., Hui, H., Erming, Y., Bin-qiang, T. and Di, X. (2010) Flavonols of lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) seed epicarp and their antioxidant potential. *Eur. Food Res. Technol.* **23**: 387-394.
 14. Lee, J. Y., Im, K. R., Jung, T. K. and Yoon, K. S. (2013) The inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertner extract on melanogenesis. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **28**: 137-145
 15. Thomas, H. F., Ping, C., Cindy, G. U. and Anthony, J. D. (1995) One-and two-dimensional NMR study of resol phenol-formaldehyde prepolymer resins. *Magn. Reson. Chem.* **33**: 717-723.
 16. Yoshiaki, T., Tadashi, F., Shunsuke, M., Takashi, A., Yoshihiro, H., Naohisa, I. and Masatake, N. (2007) Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori spirits. *J. Agric. Food. Chem.* **55**: 75-79.
 17. Fox, M. E., Jackson, M., Meek, G. and Willets, M. (2011) Large-scale synthesis of a substituted D-phenylalanine using asymmetric hydrogenation. *Org. Process Res. Dev.* **15**: 1163-1171.
 18. Rukachaisirikul, V., Khamthong, N., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Graidist, P., Sakayaroj, J. and Kirtikara, K. (2010) Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol derivatives from the sea fan-derived fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. *Arch. Pharm. Res.* **33**: 375-380.
 19. Mayo, F., Gashe, B. A. and Majinda, R. R. T. (1999) A new flavan from *Elephantorrhiza goetzei*. *Fitoterapia* **70**: 412-416.
 20. Wattanapiromsakul, C., Forsterc, P. I. and Waterman, P. G. (2003) Alkaloids and limonoids from *Boucharatia neurococca*: systematic significance. *Phytochemistry* **64**: 609-615
 21. Yalcin, F. N., Ersoz, T., Akbay, P. and Calis, I. (2003) Phenolic, megastigmane, nucleotide, acetophenon and monoterpene glycosides from *Phlomis samia* and *P. carica*. *Turk. J. Chem.* **27**: 703-711.
 23. Zheng, Z., Tan, H., Chen, J. and Wang, M. (2013) Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study. *Fitoterapia* **84**: 242-247.
 24. Hasnah, M. S., Mohd, F. R. and Zanariah, U. (2010) Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. *J. Agric. Food. Chem.* **58**: 10404-10409.
- (2014. 12. 31 접수; 2015. 2. 12 심사; 2015. 3. 2 게재확정)