



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 36/03 (2006.01) A61K 31/7028 (2006.01)		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년07월16일 10-0739871 2007년07월09일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2006-0016447 2006년02월20일 2006년02월20일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	

(73) 특허권자	부경대학교 산학협력단 부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자	김세권 부산 부산진구 연지동 353-1번지 세동한신아파트105동 304호
(74) 대리인	이덕록
(56) 선행기술조사문헌	한국식생활문화학회지, 19(2), 200-208,(2004)

심사관 : 강태현

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성플라보노이드 글리코시드 화합물

(57) 요약

본 발명은 식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성 플라보노이드 글리코시드 화합물에 관한 것으로, 식용갈조류 톳의 메탄올 추출물의 성분을 크로마토그래피를 실시하여 분리한 후 이들 성분 중에서 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 성분을 조사한 다음 이를 동정함으로써 강력한 티로시나아제 억제 활성을 가지는 플라보노이드 글리코시드 화합물을 얻을 수 있고 이를 화장품, 의약 및 농업 산업에서 티로시나아제 억제용 조성물로 활용할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있다.

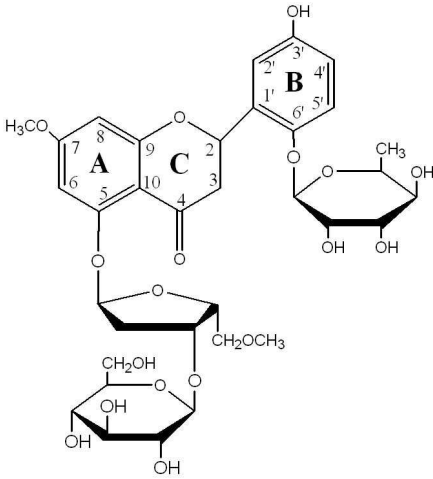
대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성을 가지는 하기 화학식의 플라보노이드 글리코시드 화합물.



청구항 2.

제 1항 기재의 식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성을 가지는 플라보노이드 글리코시드 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식용갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성 플라보노이드 글리코시드 화합물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 식용갈조류 톳의 메탄올 추출물의 성분을 크로마토그래피를 실시하여 분리한 후 이들 성분 중에서 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 성분을 조사한 다음 이를 동정함으로써 얻은 티로시나아제 억제 활성을 가지는 플라보노이드 글리코시드 화합물에 관한 것이다.

다중구리 산소첨가효소(multicopper oxygenase)인 티로시나아제는 세균에서 포유동물에 이르기까지 계통발생학적으로 널리 분포되어 있으며, 현재, 다기능 멜라닌 합성에 중추적인 역할을 하기 때문에 다중구리 산소첨가효소로서 연구되었다. 멜라닌형성 경로에서 주효소로 작용하며, 2개의 주요 단계 즉, 모노페놀라아제 활성에 의한 모노페놀릭 아미노산인 L-티로신을 *o*-디페놀릭 L-DOPA으로의 가수분해 단계 및 이후 디페놀라아제 활성에 의한 산화 단계를 촉매한다. 결과적으로, 최종 *o*-퀴논(*o*-quinones)은 멜라닌을 형성하기 위해 효소적 및 비효소적 반응을 겪는다.

멜라닌 합성의 변경 및 바람직한 수준 이상의 멜라닌의 형성은 다양한 생물계에 대해 탐탁지 않은 효과를 유도할 수 있다. 과착색(Hyperpigmentation) 및 악성 흑색종은 멜라닌의 변경 및 과생산 때문에 사람의 피부에서 생기는 일반적인 고통스러운 문제점들이다. 게다가, 사람의 뇌에서 발견되는 신경멜라닌(neuromelanin)은 파킨슨병과 관련된 신경분해(neurodegradation)에 영향을 미칠 뿐만 아니라 도파민 신경독성에 중추적인 역할을 담당할 것으로 믿었다. 식품산업에서, 일반적으로 갈변(browning)으로 알려져 있는 *o*-퀴논에 해당하는 *o*-디하이드록시기를 포함하는 페놀 화합물의 과다 산화는 식품 특히 채소와 과일의 색, 맛 및 영양적 가치에 대해 탐탁지 않은 효과를 일으키기 때문에 산업의 수익성을 넘어 심각한 결과를 낳는다. 티로시나아제는 멜라닌 합성에 관여하는 주효소이기 때문에, 멜라닌의 탐탁지 않은 효과를 극복하기 위해 티로시나아제의 억제제는 약학, 화장품 및 식품 산업에서 연구되어 왔다. 더욱이, 멜라닌 형성, 상처의 치료, 기생충의 캡슐화 및 곤충에서 경화작용(sclerotization)에 관여하는 티로시나아제는 해충을 방제하기 위한 다른 표적 사이트로서 이용될 수 있다. 현재, 하이드로퀴논, 코지산, 아젤라산(azelaic acid), 레시노이드, 전자가 풍부한 페놀(electron-rich phenols), 알부틴, 비타민C등은 각 산업 분야에서 널리 이용되고 있다. 그러나, 하이드로퀴논 및 코지산과 같은 가장 강력한 티로시나아제 억제제는 결과적으로 장기간 노출로부터 심각한 부작용을 낳을 것이다. 따라서, 생활성 화학물질의 풍부한 자원으로 구성되어 있고, 해로운 역효과가 거의 없기 때문에 자연에 존재하는 강력한 티로시나아제 억제제를 식물에서

찾고자 하는 노력이 있어왔다. 비록 티로시나아제 억제제를 생산하는 많은 식물들이 이미 밝혀져 있다 할지라도, 그들 대부분은 관련 산업에서의 비실용성 또는 식품첨가제에 관한 안전성 규제로 인해 그들의 생체내 이용에는 한계가 있는 것 같다.

천연 자원에서 티로시나아제 억제제에 대한 계속적인 조사 결과 해양 조류에서 티로시나아제 억제제의 분리는 한계가 있음이 기록되어 있다. 그럼에도 불구하고, 해양 조류에서 실시된 연구들은 최근 진일보하였으며, 다양한 생물학적 활성 화합물을 생성하는 것이 밝혀졌다.

이에 본 발명자는 상기와 같은 점을 감안하여 해양 조류로부터 티로시나아제 억제 활성을 가지는 화합물을 조사하던 중 식용 갈조류 톳으로부터 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 플라보노이드 글리코시드 화합물을 분리하고 이를 동정한 다음 다른 티로시나아제 억제성 플라보노이드와 티로시나아제 억제 활성을 비교함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 강력한 티로시나아제의 억제 활성을 가지는 식용 갈조류 톳 유래의 플라보노이드 글리코시드 화합물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 강력한 티로시나아제의 억제 활성을 가지는 식용 갈조류 톳 유래의 플라보노이드 글리코시드 화합물을 유효성분을 포함하는 티로시나아제 억제용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

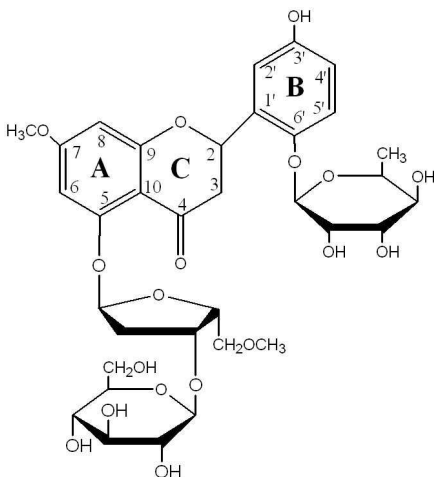
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 본 발명의 목적은 식용 갈조류 톳의 메탄올 추출물의 성분을 크로마토그래피를 실시하여 분리한 후 이들 성분 중에서 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 성분을 조사한 다음 이를 동정하고 이를 화장품, 의약 및 농업 산업에서 티로시나아제 억제용 조성물로 제공함으로써 달성되었다.

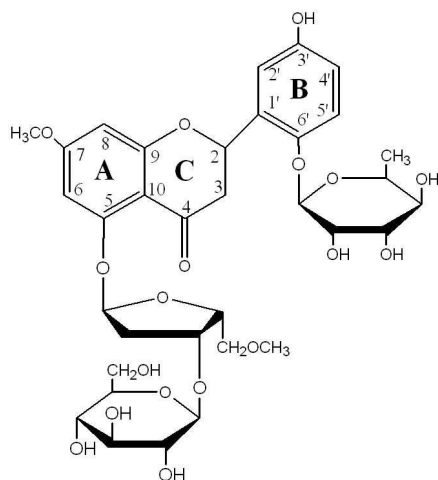
이하, 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

발명의 구성

본 발명은 식용 갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성을 가지는 하기 화학식의 플라보노이드 글리코시드 화합물을 제공한다.



본 발명은 또한 식용 갈조류 톳 유래의 티로시나아제 억제 활성을 가지는 하기 화학식의 플라보노이드 글리코시드 화합물을 유효성분으로 함유하는 티로시나아제 억제용 조성물을 제공한다.



본 발명에서 상기 티로시나아제 억제용 조성물의 예로는 티로시나아제의 활성과 관련 있는 화장료 또는 의약 조성물 등이 있음은 물론이다. 구체적인 예로는 미백용 화장료 조성물을 들 수 있다.

본 발명에서 티로시나아제 억제제의 분리 및 정제 방법은 다음과 같다.

티로시나아제 억제 활성에 따라 가장 강력한 해양 조류 종을 선별한다. 각 정제단계 동안, 티로시나아제 억제 활성에 따라 강력한 분획물을 선별한다. 선별된 조류 추출물(15g)은 실리카겔 컬럼(머크사, 70-230 메쉬, 400 g, Ø 4.5×65 cm) 상에서 크로마토그래피를 실시하고, n-헥산, 에틸 아세테이트 및 메탄올의 순으로 연속적으로 용출한다. 용출된 분획들은 TLC로 분석하고 동일한 R_f값을 갖는 분획물은 혼합한다. 선별된 강력한 분획은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(머크사, 70-230 메쉬, 75 g, Ø 2.5 × 40 cm)를 실시하고 에틸 아세테이트/메탄올 순으로 연속적으로 용출한다. 유사한 R_f값을 갖는 용출 분획은 TLC 분석 후 합친다. 가장 높은 티로시나아제 억제 활성을 갖는 합친 분획은 역상 HPLC 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 추가로 정제한다. 상기 시료는 preparative Capcell Pak C₁₈ UG 120(Ø 2 × 25 cm) 컬럼(일본 시세이도사)에 주입하고 메탄올 내 아세트나이트릴(0-100% v/v, 30분)의 직선구배용매법에 따라 용출한다. 유속은 4 ml/min으로 유지하고, 분획 피크는 254nm에서 공유한다. 마지막으로, 가장 높은 티로시나아제 억제 특징을 갖는 피크는 증류수 내 메탄올(0-100% v/v, 30분)의 직선구배용매법에 따라, 유속은 0.4 ml/min로 하여 Nucleosil 100-5 C₁₈ (Ø 0.46 × 25 cm) 컬럼(독일 Macherey Nagel GmbH & Co.) 상에서 다시 크로마토그래피를 실시한다. 용출된 단일 피크는 정제된 화합물로 하고, 분리된 화합물의 순도는 TLC 분석을 통해 확인한다.

본 발명에서 기계적 분석 방법은 다음과 같다.

¹H, ¹³C, 및 2D NMR 스펙트럼은 표준 기준으로서 DMSO-*d*₆을 이용하여 JEOL JNM-ECP 400 NMR 분광계를 이용하여 얻는다. 이때, EIMS 데이터와 HR-FABMS 데이터는 각각 JEOL JMS-700 분광계 및 JEOL JMS HX 110A/HX110A 탠덤 매스 스펙트로미터로부터 얻는다. 정제된 화합물의 적외선 스펙트럼은(400-4000 cm⁻¹) Fourier transform IR 스펙트로미터(Bruker FT-IR model IFS-88 spectrometer)를 이용하여 포타슘 브로마이드(KBr)에서 기록한다. 정제된 화합물은 메탄올에 녹여 Varian UV-Visible 스펙트로포토미터(호주 Cary 1C)를 이용하여 UV-Vis 흡수를 측정한다. 정제된 화합물의 특이 변환은 Pakerin Elmer model 341 폴라리미터를 이용하여 측정한다.

본 발명에서 분리된 화합물의 억제 패턴의 측정은 다음과 같이 수행한다.

티로시나아제에 대한 분리된 화합물의 억제 메커니즘은 상기에서 기술된 티로시나아제 억제 분석에 따라 분석한다. 카이네틱 분석 동안 억제제의 농도는 0.25 및 0.5 mg/ml로 하고, 티로신의 사용 농도는 0.75, 1.5 및 3.0 mM으로 한다. 티로시나아제의 미하엘리스 상수(K_m)와 최대속도(V_{max})는 Lineweaver-Burk plots에 따라 측정한다.

이하, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명을 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 해양 조류 추출물의 준비 및 티로시나아제 억제 활성을 위한 예비 선별작업

1. 재료

13종의 해양 조류를 2005년 1월~3월 동안 부산의 연안 두 곳에서 수집하였다(표 1 참조). 버섯의 티로시나아제(2034 units/mg) 및 L-티로신은 스위스의 플루카사에서 구입하였고, 코지산은 알드리치 케미칼사에서 구입하였다. 실리카겔 60 (70-230 메쉬, 독일 머크사)은 오픈 컬럼 크로마토그래피에 이용되었으며, TLC를 위해 pre-coated Kieselgel 60 F₂₅₄ (독일 머크사) 알루미늄판을 이용하였다. 다른 화학물질들과 제제들은 상업적으로 이용가능한 분석 등급을 사용하였다.

2. 티로시나아제 효소 억제 분석

버섯의 티로시나아제의 억제는 475nm에서 도파크롬 형성율을 분광광도계에서 측정함으로써 측정하였다. L-티로신은 분석시 기질로 사용하였고, 티로시나아제 억제 활성은 고바야시 등의 방법을 변형하여 측정하였다.

간단히 말해서, 0.5ml의 인산나트륨 완충액(pH6.8), 인산나트륨 완충액에 녹인 0.5ml L-티로신(0.3 mg/ml) 및 0.45ml 시료 용액(10% DMSO/DW에 녹임)을 완전히 혼합하고, 30℃에서 10분 동안 전배양하였다. 그 후, 0.05ml의 버섯 티로시나아제(1000 units/ml)를 첨가하고 10분 동안 배양하였다. 마지막으로, 0.5ml의 1M 소듐 아자이드를 첨가하여 반응을 종결시키고, Varian UV-Visible recording spectrophotometer(호주 Cary 1C)를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 10% DMSO 용액은 대조군으로, 코지산은 양성 대조군으로 사용하였다. 억제 활성은 하기 식과 같이 계산하였다.

수학식 1

$$\text{티로시나아제 억제 활성 (\%)} = \frac{\{C - (S - CC)\}}{C} \times 100 \quad (1)$$

여기서, C는 475nm에서의 대조군의 흡광도, CC는 475nm에서 비색 대조군의 흡광도, S는 같은 파장에서 시료의 흡광도를 나타낸다.

3. 해양 조류 추출물의 준비

수집 후, 조류 시료는 모래, 이끼 및 잔해를 제거하기 위해 담수에서 주의 깊게 세척하고, -70℃에서 냉동하였다. 시료를 동결건조하고, 분말로 마쇄하였다. 분말 시료(20g)는 밤새도록 교반하면서 메탄올(250ml)로 추출하였다. 추출은 3회 반복하고, 각 추출물을 혼합하여 압력을 줄이면서 증발시켜 반고형 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출 후 남은 잔여물은 밤새도록 교반하면서 증류수(500 ml)로 추출하였다. 최종 추출물은 4500 ×g에서 15분 동안 원심분리하고, 상등액을 수집하였다. 열수추출은 2회 반복하였다. 각 상등액을 혼합한 후 진공증발시킨 다음 -20℃에서 저장하였다. 티로시나아제 억제 활성을 예비 선별하기 위해 해양 조류에서 13개의 메탄올 추출물과 13개의 열수 추출물을 준비하였다.

[표 1]

티로시나아제 억제를 위한 선별 분석 시 이용된 해양 조류 종의 목록

문(Phylum)	종(Species)	과(Family)	샘플링 장소 (Sampling site)	샘플링 일자 (Sampling date)
Chlorophyta	A. <i>Ulva pertusa</i>	Ulvophyceae	장산, 부산	2005년 1월
Phaeophyta	B. <i>Colpomenia sinuosa</i> -	Phaeophyceae	송정, 부산	2005년 3월
	C. <i>Costaria costata</i>	Laminaraceae	송정, 부산	2005년 3월
	D. <i>Hizikia fusiformis</i>	Sargassaceae	송정, 부산	2005년 3월
	E. <i>Laminaria japonica</i>	Laminariaceae	장산, 부산	2005년 2월
	F. <i>Myelophycus simplex</i> -	Phaeophyceae	송정, 부산	2005년 3월
	G. <i>Sargassum fulvellum</i>	Sargassaceae	장산, 부산	2005년 1월
	H. <i>Sargassum horneri</i>	Sargassaceae	송정, 부산	2005년 3월
	I. <i>Undaria pinnatifida</i>	Alariaceae	장산, 부산	2005년 2월

Rhodopyta	<i>J. Carpopeltis crispate</i>	Florideophyceae	장산, 부산	2005년 1월
	<i>K. Lomentaria catenata</i>	Lomentariaceae	장산, 부산	2005년 1월
	<i>L. Pachymeniopsis elliptica</i>	Halymeniaceae	장산, 부산	2005년 1월
	<i>M. Symphyocladia latiuscula</i>	Rhodophyceae	장산, 부산	2005년 1월

4. 티로시나아제 억제 활성을 위한 예비 선별작업

수년 동안, 비록 동물의 티로시나아제 및 다른 유용한 티로시나아제와는 다르지만 쉽게 이용할 수 있기 때문에 잠재적 티로시나아제 억제제의 분리 및 특성 규명을 위한 표적 효소로서 버섯의 티로시나아제가 널리 이용되어 왔다. 본 발명에서, 티로신을 기질로 이용하였다. 따라서, 본 발명에서 조사된 활성은 버섯 티로시나아제의 *o*-모노페놀라아제(*o*-monophenolase) 억제 활성과 연관이 있다. 활성 실험 동안, 티로신에 의해 생긴 대부분의 추출물과 도파크롬의 색깔은 둘 다 475nm에서 분광광도계를 통한 측정을 가능케 했으며, 그들은 475nm에서 대조군의 분광광도계 수치를 초과하였다. 따라서, 그들의 색깔로 인한 메탄올과 열수 추출물의 활성에 대한 장애를 예방하기 위해 비색 대조군을 활성 실험 동안 사용하였다.

티로시나아제 억제 활성을 위한 선별 동안, 각 해양 조류의 13개의 메탄올 추출물과 13개의 열수 추출물을 실험하였다(도 1). 단지 4개의 메탄올 추출물과 1개의 열수 추출물만이 1mg/ml의 시료 농도에서 티로시나아제 활성을 상당히 억제하였다(30% 이상 억제). 메탄올 추출물과 열수 추출물을 비교한 결과, 메탄올 추출물의 티로시나아제 억제 활성이 열수 추출물보다 강력하였다.

식물추출물에서 대부분의 생활성들은 페놀화합물 때문이며, 그들의 용해도는 유기 용매에서 주로 높다는 사실은 잘 알려져 있다. 따라서, 유기 식물 추출물은 열수 추출물보다 높은 티로시나아제 활성들을 나타낼 수 있다. 유사한 보고들이 문헌 상에도 기록되어 있다. 톳(*Hizikia fusiformis*), 바위수염(*Myelophycus simplex*) 및 팽생이모자반(*Sargassum horneri*)의 메탄올 추출물은 티로시나아제를 각각 62%, 46% 및 38% 억제하였고, 톳의 열수 추출물에서는 39%의 억제율이 관찰되었다. 대부분의 다른 메탄올 추출물과 열수 추출물은 효소 활성에 거의 또는 영향을 미치지 않지만, 어떤 추출물, 예를 들어 다시마(*Laminaria japonica*)의 메탄올 및 열수 추출물은 효소 활성을 증가시켰다. 이는 어떤 식물 종들은 티로시나아제에 대한 기질로서 작용할 수 있는 티로신과 L-DOPA와 다른 페놀 화합물을 포함하고 있고, 티로시나아제의 활성을 증가시켜 *o*-퀴논, 도파크롬을 생성하는 사실 때문일 수 있다.

티로시나아제 억제 활성에 따라, 추가 정제를 위해 톳을 선택하였다. 주로 중국, 일본 및 한국과 같은 동아시아 국가들에서 오랫동안 식량자원으로서 이용되어왔다 할지라도, 생물학적으로 활성이 있는 화합물을 분리함에 있어 톳의 이용은 문헌상에서 추적하기는 어렵다. 그러나, 그것의 조추출물은 면역조절과 항암과 같은 생물학적 능력을 소유하고 있다고 보고되어 있다. 이는 톳이 생물학적으로 활성이 있는 물질의 잠재적 자원으로 작용할 수 있음을 제시하는 것이다. 또한, 강 등은 톳의 메탄올 추출물의 티로시나아제 억제 활성과 억제활성이 0.8 mg/ml의 IC₅₀ 값과 다소 유사함을 보고하였다(도 2). 강력한 티로시나아제 억제제인 코지산과 비교할 경우, 톳의 조추출물의 활성은 코지산보다 60배 정도 낮았다.

실시예 2: 톳으로부터 티로시나아제 억제 활성 화합물의 분리 및 정제

조메탄올 추출물은 극성 분획과 다른 크로마토그래피 기술을 통해 정제하였다(도 3). 제1차 정제 동안, 실리카겔 오픈 컬럼 크로마토그래피를 이용하였다. 메탄올 추출물은 단계별로 연속적으로 3개의 유기용매로 10개의 다른 비율로 용출하였다(n-헥산:에틸아세테이트: 100, 80, 60, 50, 0% 및 에틸아세테이트:메탄올 80, 60, 50, 40, 0%). 1000ml의 각 용매 비율을 처리하였고, 100ml의 용출 분획을 수집하였다. 97개의 분획 중 9개의 주요 분획을 TLC에 따라 얻었다. 이들 중, A~E 분획은 F~I분획과 비교하여 억제 활성이 낮았다. 비극성 분획물의 티로시나아제 억제 활성의 평가는 효소 배지 내 물에서의 낮은 용해도 때문에 어려운 것으로 보인다. 모든 분획물의 활성들을 분석하여, 1mg/ml의 농도에서 가장 높은 82%의 티로시나아제 억제 활성을 나타냈기 때문에, G 분획을 제2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 추가로 정제하였다.

강력한 G분획을 2차 실리카겔 컬럼에 로딩하고 연속적으로 에틸아세테이트:메탄올(50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0%)의 직선구배용매법에 따라 용출하였다. 용출된 분획물들은 TLC 패턴에 따라 4개의 주요 분획을 얻기 위해 수집하였다. 4개의 주요 분획 중 G3분획이 1mg/ml의 농도에서 93%의 가장 높은 티로시나아제 억제를 나타내었다.

2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로부터 얻은 강력한 G3 분획을 분리하기 위해 역상 C₁₈ HPLC 컬럼을 이용하였다. HPLC로부터 얻은 6개의 분획에 대해 0.5mg/ml 농도에서 티로시나아제 억제 활성을 시험한 결과, G3e 분획이 47%로 가장 높은 억제를 나타냄을 관찰하였다.

가장 유효한 G3d 분획을 분석 C₁₈ HPLC 컬럼 상에서 최종적으로 크로마토그래피를 실시하고, 최종 분획의 순도는 TLC를 이용하여 확인하였다. 이를 화합물-1로 정하였다. 최종 정제는 증류수 내 메탄올(0-100% v/v, 30분)의 직선구배용법에 따라 실시하였고, 최종 분획은 약 75% 농도의 메탄올에서 용출됨을 관찰하였다.

실시에 3: 톱 유래의 티로시나아제 억제 활성 화합물의 동정

상기 실시에 2에서 분리된 화합물은 노르스름한 분말로 관찰되었고, 광학적 회전은 -0.058° 를 나타내었다. 분자식은 m/z 762.4에서 HRFAB MS $[M+Na]^+$ 과 ^{13}C -NMR 분석 결과, C₃₄H₄₄O₁₈였다. 화합물-1의 IR 스펙트럼 결과, 3510-3690 cm⁻¹ 및 1667 cm⁻¹에서 흡수는 각각 유리형 하이드록실기 및 컨쥬게이트 카르보닐기였다.

^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT의 1D NMR과 HMQC, HMBC, COSY 데이터의 2D NMR 조사 및 이들 결과의 문헌상 비교를 통해, 화합물-1은 플라보노이드 글리코시드로 판명되었다(도 5). 더욱이, UV 스펙트럼에서 관찰된 350nm 및 260nm의 2개의 피크는 화합물-1, 플라보노이드의 구조에서 링 A 및 B이 있음을 나타냈다. HMQC 및 HMBC 스펙트럼에서 예측된 것처럼 δ 79.1, 및 130.4 ppm에서 ^{13}C -NMR 시그널과 더불어 δ 5.59 (1H, d, J = 2.72), δ 2.76 (1H, d, J = 2.72)에서 시그널의 ^1H -NMR 스펙트럼 결과, HMQC 및 HMBC 스펙트럼의 존재는 링 C에 -O-CH-CH₂-CO- 시스템이 있음을 가리킨다.

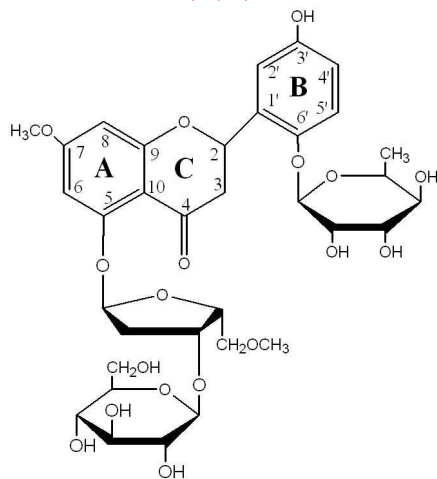
또한, Hammani 등은 플라보논 화합물에서 분자 배열의 유사한 패턴을 관찰하였다. EI 질량 스펙트럼은 Singh이 플라보논, 나린게닌5-메틸 에테르에서 관찰한 것과 같이 m/z 286에서 분자 이온 피크를 나타냈으며, m/z 119에서 특징적인 이온 피크를 가지고 있다. 이들 특징적인 피크는 retro-Diel's-Alder형 단편화 때문이며, 링 A에서 메톡실기의 존재를 가리키는 것이다. ^1H 스펙트럼 결과, δ 3.76 ppm (3H, s)에서 전형적인 메톡실 시그널이 관찰되었으며, HMBC relationship에 따르면 δ 3.76 ppm (3H, s)에서 C-7과 관련되어 있다. 따라서, 링 A에서 메톡실기의 위치가 확인되었다. δ 100.5, 99.3 및 99.2에서 3개의 아노메릭 탄소(anomeric carbon)는 3개의 당 모이에티가 화합물-1에 결합되어 있음을 가리킨다.

또한, HMQC relationship은 아노메릭 양자가 3개의 아노메릭 탄소에 각각 δ 4.51 (1H, s), 4.98 (1H, s), 및 4.96 (1H, s)에 부착되어 있음을 나타낸다(표 2). δ 17.8에서 ^{13}C NMR 및 δ 1.08에서 ^1H NMR(3H,s)을 통해 람노우즈 모이에티가 있음을 확인하였고, 링 C의 C-2과 디옥시리보오스 당 모이에티의 C"-5와 2개의 HMBC 관계가 있기 때문에, 링B의 C-6'에 결합되어 있는 것으로 결론지었다. 디옥시리보오스 모이에티와 링 A와의 결합을 동정하는데 도움이 되는 δ 41.8에서의 메틸렌기는 양자 6.13 (1H, s)이 결합된 아노메릭 탄소(C-1")와 HMBC relationship을 이용하여 확인하였다.

HMBC 및 H-H COSY relationship은 3개의 당 모이에티와 글루코스 모이에티의 구조를 설명하는데 이용된다. 화합물-1의 FAB 질량 스펙트럼은 C₃₄H₄₃O₁₈Na에 대해 m/z 762 ($M+Na$)⁺를 갖는 단편을 나타내며, m/z 617, 441의 질량 스펙트럼 피크는 람노우즈가 없거나 람노우즈와 글루코우즈 둘 다 없음을 가리킨다.

상기 결과를 종합하여 볼 때 본 발명의 톱 유래 티로시나아제 억제 활성 플라보노이드 글리코시드 화합물의 구조는 하기 화학식 1과 같았다.

화학식 1



[표 2]

Position	¹³ C NMR (ppm)	Multiplicity	¹ H NMR δ (ppm), J (Hz)	HMBC
2	79.1	d	5.59 (1H, d, J 2.72)	H-2', H-1''
3	42.2	q	2.80 (1H, d, J 3.08), 2.76 (1H, d, J 2.72)	
4	197.0	s		H-6
5	165.1	s		
6	96.4	d	6.13 (1H, s)	H-8, H-OCH ₃
7	162.9	s		
8	95.4	d	6.13 (1H, s)	
9	159.4	s		
10	103.4	s		H-8
-OCH ₃	55.1	t	3.76 (3H, s)	H-2', H-5'
1'	130.4	s		
2'	128.4	d	7.47 (1H, d, J 8.56)	H-2
3'	159.4	s		H-2', H-5'
4'	128.2	d	7.46 (1H, d, J 8.52)	
5'	113.9	d	6.99 (1H, s)	
6'	162.9	s		
Deoxyribose				
1''	99.3	d	4.98 (1H, s)	H-6
2''	41.8	q	2.80 (2H, s)	
3''	68.2	d	3.39 (1H, s)	
4''	76.2	d	3.26 (1H, s)	
5''	65.9	q	3.76 (1H, s)	H-1''''
6''	48.5	t	3.16 (3H, s)	
Glc				
1'''	99.2	d	4.96 (1H, s)	
2'''	70.6	d	3.42 (1H, s)	
3'''	76.2	d	3.33 (1H, s)	
4'''	72.0	d	3.33 (1H, s)	
5'''	72.0	d	3.14 (1H, s)	
6'''	66.0	q	3.33 (2H, s)	
Ram				
1''''	100.5	d	4.51 (1H, s)	
2''''	75.5	d	3.54 (1H, m)	
3''''	69.5	d	3.11 (1H, s)	H-1''''', H-6'''' (-CH ₃)
4''''	72.9	d	3.21 (1H, m)	H-1''''', H-6'''' (-CH ₃)
5''''	68.2	d	3.39 (1H, s)	
6''''	17.8	t	1.08 (3H, s)	

^a (DMSO-*d*₆)

^b d = doublet; s = singlet; q = quartet; t = triplet

실시예 4: 본 발명 톱 유래의 티로시나아제 억제 활성 화합물의 티로시나아제 억제 활성 조사

정제된 화합물-1의 생분석 결과, 강력한 버섯 억제 활성과 L-티로신의 산화에 대한 농도의존적 효과를 나타냈다.

도 5는 톳의 화합물-1, 조 메탄올 추출물과 강력한 티로시나아제 억제제인 코지산의 티로시나아제 억제 활성에 대한 농도의존적 반응을 나타낸다. 화합물-1의 1, 0.8, 0.6, 0.4 및 0.2 mg/ml 농도에서 효소 억제 활성을 시험하였고, 0.4 mg/ml (0.52 mM)의 IC₅₀에서 티로시나아제를 억제할 수 있음을 관찰하였다. 이러한 결과는 화합물-1이 톳의 조 메탄올 추출물 (0.8 mg/ml의 IC₅₀)과 비교하여 약 50% 정도 티로시나아제 활성을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다. 이는 정제과정 동안 총 억제 활성이 두배로 되었음을 가리킨다. 코지산과 비교한 결과, 화합물-1의 활성은 코지산보다 약 30배 낮았으며, 코지산의 IC₅₀ 값은 첸과 하 등이 L-티로신의 산화에 대한 코지산의 유사한 티로시나아제 억제를 보고한 0.013 mg/ml (0.09 mM)였다. 그러나, 활성 실험이 다른 효소 농도, 다른 기질(L-tyrosine or L-DOPA) 및 다른 분석방법으로 수행하였기 때문에 코지산의 보고된 활성을 비교하기란 어려운 일이다. 게다가, 코지산의 대부분의 억제 활성 실험은 기질로서 L-DOPA를 이용하여 수행하였다.

실시예 5: 화합물의 구조와 활성 관계 조사

플라보노이드는 식물과 도처에 퍼져있는 식물의 2차 대사산물에 의해 합성되는 폴리페놀 화합물의 한 일종이다. 비록 그들이 고등식물에서 가장 특징적인 클래스 중 하나를 구성하고는 있지만, 플라보노이드는 조류 같은 하등 식물에서는 거의 보고된 바 없다. 화합물-1의 기본 구조는 플라보노이드 글리코시드이기 때문에, 이들은 플라보노이드가 존재하는 것으로 알려진 식물의 범위를 연장시킨다. 플라보노이드는 채소와 과일의 구성성분으로서 인간의 식품에 어김없이 포함되어 있다. 이는 플라보노이드가 인간의 식이와 항암, 항염증, 항산화 및 항알레르기 활성을 포함하여 다양한 생물학적 효과를 나타내는 그들의 합성 유사체로 소비됨을 나타낸다.

어떤 플라보노이드는 면역 반응과 염증 과정 동안 관련된 효소계의 기능에 영향을 미친다. 이러한 발견 외에도, 자연에서 풍부하고 구조적 다양성으로 인해 조류를 포함하여 다양한 식물 자원으로부터 식물성 플라보노이드를 분리하고자 하는 노력이 있어왔다. 지금까지, 수백종의 플라보노이드가 분리되었고 다양한 생물학적 활성들이 연구되었다. 이들 페놀 화합물은 살아있는 식물에서 당과 결합되어 있고 당 컨쥬게이트를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 초기에는 페놀 아글리콘의 이들 당 컨쥬게이트가 독성 또는 반응성을 감소시키고 화합물의 용해도를 증가시켜 그들을 생산하는 식물에 해가 되지 않도록 그들이 전달 또는 저장되기 쉽게 하는 것으로 보고되었다. 그러나, 항산화, 염증조절, 효소 억제 및 항균 활성과 같은 당 컨쥬게이트의 생물학적 활성들은 생물계에서 주요 역할을 담당할 수 있는 그들의 능력을 나타내는 것이었다. 따라서, 화합물-1에서 기본 플라보노이드 골격에 결합되어 있는 당 모이에티의 존재는 생물학적 활성들을 포함하는 페놀 화합물의 당 컨쥬게이트의 능력을 나타내는 것이었다.

플라보노이드가 다양한 범위의 화합물로 구성되어 있고 그들의 반응성이 그들의 화학적 구조에 기반을 두고 있다는 사실은 잘 알려져 있다. 몇 년 동안, 플라보노이드의 티로시나아제 억제 활성들이 잘 연구되어 왔고, 특정 구조와 활성간의 관계가 세워져 있다. 대부분의 플라보노이드는 기질, 보조인자 또는 메탈 킬레이터로서 티로시나아제와 반응하는 것으로 밝혀져 있고, 이때 메탈 킬레이터화는 티로시나아제 억제에 주요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀져 있다.

L-티로신과 같은 모노페놀 기질의 L-DOPA로의 산화는 특징적인 지체기를 겪는다. 환원제(수소 공여체) 특히 디페놀은 이러한 지체기를 짧게 하거나 제거할 수 있다. 쿠보 등은 플라보노이드인 퀘르세틴(*o*-diphenol)은 2개의 이웃자리 하이드록실기 때문에 하이드록실라아제(모노페놀라아제) 활성을 유도하고 지체기를 없앨 수 있다고 보고하였다. 더욱이, 플라보노이드에 2개의 이웃자리 하이드록실기가 없을 경우 이러한 지체기를 억제하지 못함을 보여주었다. 이들 2개의 플라보노이드 화합물이 *o*-디페놀라아제 활성을 억제하고 강력한 티로시나아제 억제제로 작용하기 때문에, 퀘르세틴은 보조인자로 간주되지만 기질이 될 수는 없다. 이러한 현상은 화합물-1이 보조인자로 행동하지 않음을 제시하는 것이다. 왜냐하면, 그것의 플라보노이드 골격에 2개의 이웃자리 하이드록실기가 결합되어 있지 않기 때문이다. 비슷하게, 모노페놀 또는 디페놀 둘 다 기질로 작용하지 않음을 예측할 수 있다. 왜냐하면, 그것이 *o*-모노페놀라아제 활성을 두드러지게 억제하기 때문이다.

선행연구에서, 어떤 플라보노이드는 구리를 킬레이터화 하는 것으로 묘사되어 있다. 그들의 티로시나아제 억제 활성과 구조에 대해 다양한 플라보노이드를 비교한 결과, 3-하이드록시-4-케토(3-hydroxy-4-keto) 모이에티가 티로시나아제 억제 활성을 제거하는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다. 코지산에 의한 억제는 효소에서 구리를 킬레이터화 하는 그것의 능력으로부터 잘 수렴되어 있다. 어떤 종류의 플라보노이드(퀘르세틴)에 있는 3-하이드록시-4-케토(3-hydroxy-4-keto) 모이에티는 코지산의 명백한 유사체이다. 따라서, 쿠보와 킨스트-호리는 그들의 티로시나아제 억제는 구리의 킬레이터화 때문이라고 제안하였다.

이는 특정 플라보노이드 화합물의 특징적인 배스크로믹 쉬프트(bathochromic shifts)를 이용하여 입증되었다. 또한, 5-하이드록시-4-케토(5-hydroxy-4-keto) 모이에티는 효소에서 구리를 킬레이트화 하기 위해 존재함이 밝혀졌다. 따라서, 3-하이드록시-4-케토(3-hydroxy-4-keto) 모이에티 또는 5-하이드록시-4-케토(5-hydroxy-4-keto) 모이에티 중 어느 하나가 없을 경우 화합물-1이 효소 내 구리를 킬레이트화 하는데 유리하지 않음은 명백하다.

도 5는 Lineweaver-Burk plot에 의해 분석된 화합물-1의 억제 카이네틱스를 예시하고 있다. 비억제 효소와 화합물-1의 2종류의 농도에서 얻은 3개의 라인(lines)은 수평축을 가로질렀다. 이러한 결과는 화합물-1이 버섯 티로시나아제에 의한 L-티로신의 산화를 위한 비경쟁적 억제제이고, 화합물-1이 메탈 킬레이트화에 의해 티로시나아제를 억제하지 않음을 가리킨다. 이러한 관찰은 이웃자리 하이드록실기가 없고, C-4케토기 근처에 하이드록실기가 없기 때문에, 화합물-1의 구조적 특징과 일치하는 것이다. 쿠보 등은 루테오린의 비경쟁적 억제제가 분자간의 수소결합을 통해 효소의 3차 구조를 부서뜨리고, 기질과 효소간의 친화성을 감소시킨다는 가설을 세웠다. 또한, 어떤 종류의 플라보노이드 글리코시드는 단백질과 반응하여 그들의 구조를 바꿀 수 있음이 밝혀져 있다. 따라서, 우리는 화합물-1이 단백질의 구조를 바꿔 효소를 억제할 수 있을 것으로 가정하였다. 이는 화합물-1이 수용성 배지에서 용해되고, 분자간 수소결합을 형성하기 위해 화합물-1이 효소에 쉽게 도달하여 반응할 가능성이 있기 때문에 추가로 평가될 수 있다. 비록, 티로시나아제 억제 메커니즘이 설명되지는 않았으나, 플라보논의 유도체인 쿠라리논은 비경쟁적 티로시나아제 억제제임이 밝혀져 있다. 또한, 쿠라리논의 화학적 구조는 구조적 기준이 없기 때문에 경쟁적 방식으로 효소를 억제할 수 없음을 나타내며, 이는 경쟁적 방식으로 티로시나아제를 억제하는 것을 지지한다.

플라보노이드 글리코시드에서 하이드록실기로부터 해리되는 수소원자는 7-OH > 4'-OH > 3'-OH > 5-OH로 알려져 있다. 따라서, 화합물-1의 유리형 3'-하이드록실기가 (-) 전하를 띠게 하여 효소의 3차 구조 특히 양전하를 띤 아미노기와 반응성을 증가시킬 수 있게 한다. 그러나, 티로시나아제의 3차 구조가 아직 세워지지 않았기 때문에 어떻게 화합물-1이 효소를 비경쟁적으로 억제하는지 적당한 메커니즘을 세우는 것은 어려울 것 같다.

발명의 효과

이상 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 식용갈조류 톱의 메탄올 추출물의 성분을 크로마토그래피를 실시하여 분리한 후 이들 성분 중에서 티로시나아제 억제 활성이 뛰어난 성분을 조사한 다음 이를 동정함으로써 강력한 티로시나아제 억제 활성을 가지는 플라보노이드 글리코시드 화합물을 얻을 수 있고 이를 화장품, 의약 및 농업 산업에서 티로시나아제 억제용 조성물로 활용할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있으므로 화장품, 의약 및 농업 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 13종의 해양 조류 종의 메탄올 및 열수 추출물의 티로시나아제 억제 활성을 나타낸 그래프이다. 이 때, 각 추출물은 1mg/ml의 농도에서 티로시나아제 억제 활성을 조사하였다. 코지산은 양성 대조군으로 사용하였고, x-축에서는 z로 표시하였고, 표 1의 해양 조류에 해당하도록 X-축에는 A~O로 표시하였다. Y-축은 10% DMSO에서 대조군에 대한 티로시나아제 억제 활성을 나타내지만 식물 추출물은 첨가하지 않았다.

도 2는 톱의 조메탄올 추출물, 화합물-1 및 코지산에 의한 버섯 티로시나아제의 농도의존적 억제를 나타내는 그래프이다. 이 때, 티로시나아제 활성은 기질로서 L-티로신을 이용하여 측정하였다.

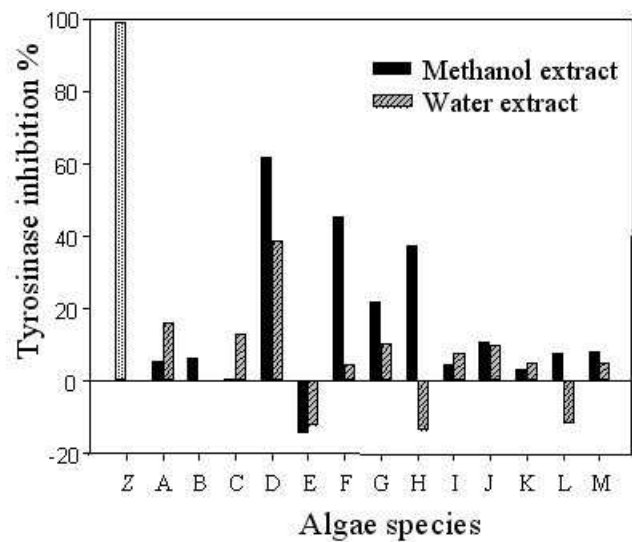
도 3은 톱에서 티로시나아제 억제제의 정제 과정을 간략히 도시한 흐름도이다.

도 4는 HPLC 크로마토그래피를 이용하여 티로시나아제 억제제인 화합물-1의 정제를 나타낸 것이다. (a)는 Capcell Pak C₁₈ UG 120 컬럼 상에서 역상 HPLC이고 제2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로부터 얻은 강력한 분획 G3는 그들의 티로시나아제 억제 활성에 따라 6개의 분획으로 분리하였다. 이중 강력한 분획 G3e를 선별하였다. (a)의 상단 패널은 0.5mg/ml의 농도에서 티로시나아제 억제 분석을 이용하여 측정한 각 분획물의 티로시나아제 억제 활성을 나타낸다. (b)는 Nucleosil 100-5 C₁₈ 컬럼 상에서 역상 HPLC 결과를 나타낸 것이다. 마지막으로, G3e를 크로마토그래피하고 정제된 분획 화합물-1은 증류수 내 메탄올(0-100% v/v in 30 min)의 직선구배용매법에 따라 용출하였다.

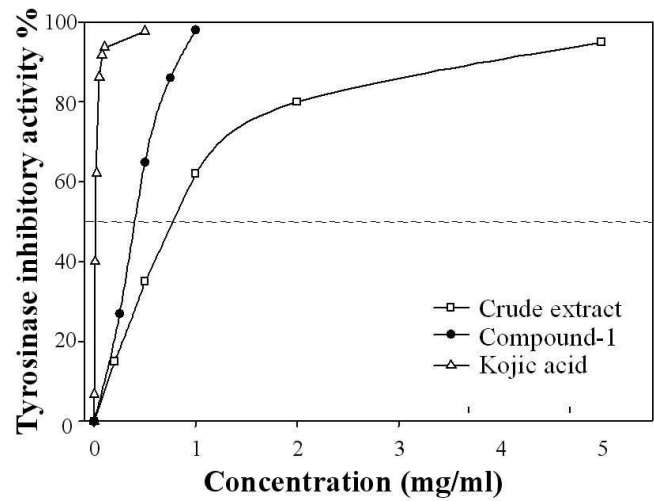
도 5는 화합물-1에 의한 티로시나아제 억제 패턴 측정을 위한 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이다. 티로시나아제 억제 활성은 억제제인 화합물-1을 첨가하거나(0.5 and 0.25 mg/ml) 또는 첨가하지 않고 효소의 기질로서 L-티로신을 이용하여 상기에서 언급된 대로 측정하였다. L-티로신의 농도는 0.75, 1.5 및 3.0 mM로 하였다. 계산된 K_m 및 V_{max} 는 각각 $2.65 \times 10^{-3} M$ 과 $0.07 \Delta OD_{475}/min$ 이었다.

도면

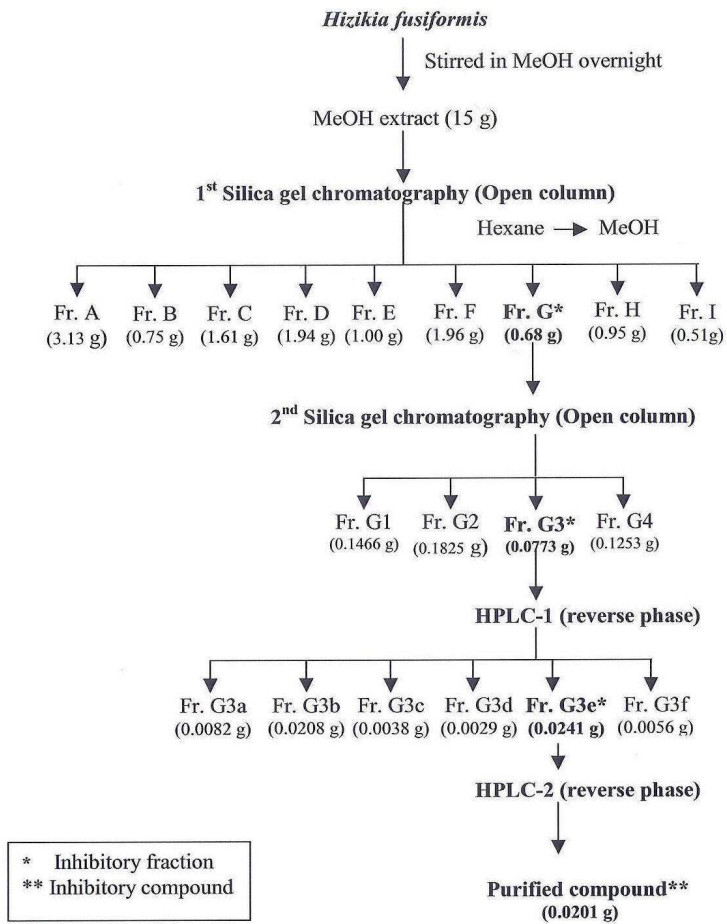
도면1



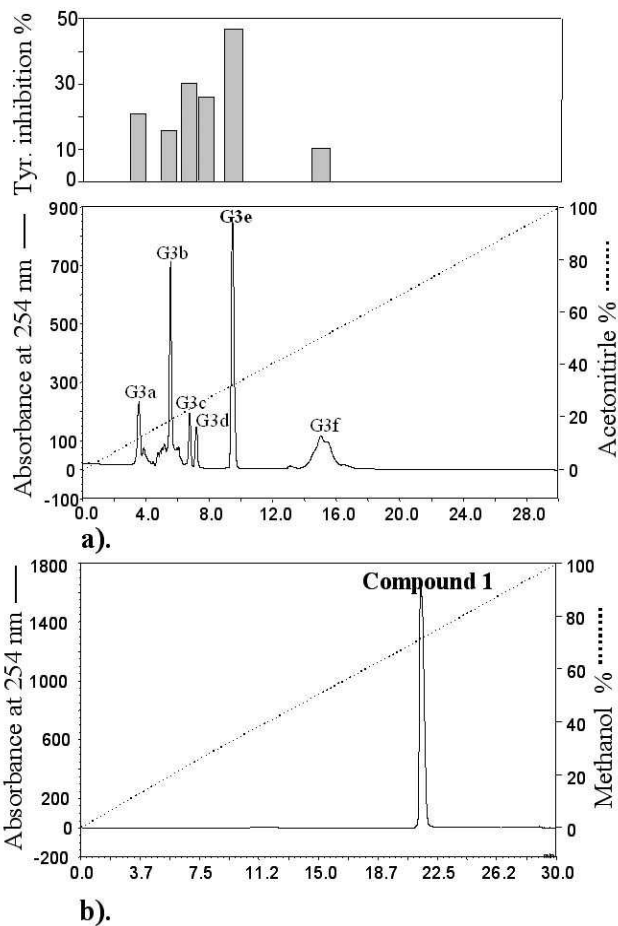
도면2



도면3



도면4



도면5

