

천궁으로부터 멜라닌 생성억제 물질 분리

이 윤 경
영남대학교 대학원

Isolation of Melanogenesis Inhibitors from Cnidii Rhizoma

Yun-Kyoung Lee

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

ABSTRACT Gingival hyperpigmentation may cause esthetic problems and embarrassment. Especially in patients with a gummy smile. Melanin pigmentation is related to esthiologic factor such as hormon, systemic factor, drug, smoking and gingival inflammation. During our search for new inhibitory components on melanogenesis from natural resources, MeOH extracts of more than 100 higher plants were tested for the inhibitory effect on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines, and methylene chloride soluble part extract of Cnidii Rhizoma MeoH extraction was found to have potent activity. Cnidii Rhizoma, the root of *Cnidium officinale* Makino (Umbelliferae), is used for the treatment of abdominal pain, arthralgia, headache, hypertension, intestinal colic and for menstrual disorders and uterine cramps for its anti-blood stagnation effect. Two compounds were isolated and their chemical structures were determined as linoleic acid methyl ester(1), 1,3-dilinoeoyl-2-stearoyl glycerol(2), on the basis of physical and spectral data.

Key words Gingival hyperpigmentation, Depigmentation

서 론

치은의 색소 침착은 멜라닌 생성 증가에 따른 색소 침착, 카로틴이나 헤모글로빈의 침착, 약물복용, 흡연, 직업병으로 인한 금속성 착색 등의 내·외인성 요인들에 기인한다.

치은 착색을 유발하는 멜라닌 생성이 증가하면 검붉은 잇몸과 같은 치은착색 뿐만 아니라 증가하는 멜라닌 양에 의해 피부색을 결정하며 기미, 주근깨 같은 피부색소 침착에도 관여한다^{1,2)}.

멜라닌 생성 증가는 tyrosinase의 활성화, melanocyte stimulating hormone(MSH), dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon(INF), 또는 vitamin D₃, histamine 등의 내·외부적 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 보고되고 있다. 따라서 melanin 생성을 저해 할 수 있는 방법으로는 tyrosinase 활성 저해제로 tyrosine을 dopa, 또는 dopaquinone으로의 산화를 촉매하는 tyrosinase 불활성화, 염증의 결과로 발생하는 염증성 화학전달 물질의 조절, 관련 gene expression의 조절, 멜라노솜의 성숙 및 각화세포로의 이행조절, 이미 생성된 멜라닌의 bleaching 등이 있다³⁻⁶⁾.

이처럼, 내·외적 요인에 의해 증가하는 멜라닌 생성을 효과

적으로 억제 할 수 있는 물질을 개발한다면 멜라닌 생성 증가에 의한 치은 착색을 예방 및 치료 할 수 있으리라 생각하고 본 연구를 하게 되었다.

천궁(川芎)은 뿌리나 지하부를 이용하는 약용자원식물로 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 여러해살이 숙근초(宿根草)로 독특한 방향성을 지니고 있으며 맛은 맵고 쓰다. 천궁에는 정유가 1~2% 함유되어 있으며 그 성분으로는 senkyunolide A~M, ligustilide, butylenephthalide, cnidilide, neocnidilide, tetramethylpyrazine, sedanolide, β -sitosterol, ferulic acid, fatty oil 등이다⁷⁾.

천궁의 뿌리는 간질과 치통 증상을 가볍게 하고 피를 맑게 하여 혈압을 낮추고 혈류량을 증가시키는 작용을 하여 두통, 어지럼증, 고혈압, 협심증 근육 마비, 신경통, 수족냉증 등에 좋은 약으로 이용되고 있으며 입에서 나는 구취증상을 없애주기도 한다. 또한 진경작용, 진정작용, 항진균작용, 그리고 비타민 E 결핍증 등을 치료하는 약리 작용이 있으며 통증과 경련을 가라앉히는 작용을 하고 구어혈 효과, 월경불순, 부인병 질환에도 효능이 있다^{8,9)}.

본 연구에서는 기존의 보고된 물질들보다 효과적으로 멜라닌 색소의 생합성을 억제하는 효과를 지닌 천연물질을 분리하기 위해 배양된 B-16 mouse melanoma cell line내에서의 멜라닌 생성 억제 활성이 있는 물질을 찾고자 하였다. 따라서 천연에서 수집한 약 100여종의 고등식물로부터 MeOH extraction을 얻고, 이를 유기용매층과 수층으로 분획하여 각각에 대하여 B-

Corresponding author
Tel: 016-539-3729
E-mail: ddaegi@hanmail.net

16 mouse melanoma cell line에서의 멜라닌 색소 생성 억제 효과를 측정하였다. 그 중 천궁의 유기용매층에서 강한 활성을 나타내어 활성물질을 분리하고 구조를 규명하였다.

Table 1. Inhibitory effects of solvent fractions of Cnidii Rhizoma in the B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro*

Fraction	Inhibition ratio (%) at the concentration of 250 μ l/ml
CH ₂ Cl ₂ Fr	45.9
EtOAc Fr	38.9
H ₂ O Fr	16.3
Kojic acid (25 μ l/ml)	8.38

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구실에서 예비 실험을 통하여 구축해 놓은 data를 통하여 활성이 확인된 천궁을 대구 시내 약령시에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 추출방법

천궁 10 Kg을 MeOH로 상온에서 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축하였다. 여기에 단계별로 동량의 MC, EtOAc, H₂O로 추출 후 감압 농축하였다. 얻어진 MC, EtOAc, H₂O 분획 중 B-16 mouse melanoma cell line에서 강한 melanogenesis 억제 효과를 나타낸 MC 분획을 normal phase column chromatography를 실시하여 물질을 분리하였다.

2) 기기 및 시약

자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였으며, EIMS spectra는 Micromass mass spectrometer (AUTOSPEC, UK)을 사용하였다. ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250(250 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million(ppm) 단위로 나타내었다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck) 및 RP-18(Watman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silica-gel(70-230 mesh, Merck), Sephadex LH-20(25-100 μ , Sigma), RP-18(40-63 μ m, Merck) 등을 사용하였다. 발색시약으로는 FeCl₃/ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시약을 사용하였고 melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5N hyperchloric acid, cold ethanol/ethyl ether (3:1), 1N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 mouse melanoma cell line이다.

결과 및 고찰

예비실험에서 강한 활성을 보인 건조한 천궁을 MeOH로 추출하고, 추출물을 다시 methylene chloride(MC), EtOAc, H₂O로 분획하여 각각에 대한 활성을 검토하였다. 그 중 강한 활성을 보인 methylene chloride층으로부터 활성물질 분리를 시

도하여 물질을 분리하였다.

지름 7.8 cm인 column에 silica gel을 41 cm 채우고 MC를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 이동상으로는 MC에 대한 MeOH의 %를 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 80, 100%로 하여 순차적으로 유출시켜, 분획(CnR I~CnR IV)을 얻어 각각에 대한 B-16 melanoma cell line에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였다. 이 중에서 활성이 강한 IV 분획에서 지름 4.2 cm의 column에 silica gel을 36.5 cm를 채우고, loading 후 n-hexane에 대한 acetone의 농도를 순차적으로 유출시켜 분획 IV-2에서 compound 1을 얻었다. 이 화합물은 문헌에 소개된 data와 Aldrich library NMR spectrum과 비교했을 때 linoleic acid methyl ester와 일치하였고, 또한 EI mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 294에서 나타났다. 따라서 불포화지방산인 C₁₉H₃₄O₂인 linoleic acid methyl ester로 확인, 결정하였다.

다음으로 활성이 강한 I 분획에서 지름이 4 cm인 column에 silica gel을 40 cm를 채우고, n-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 그 후 이동상을 n-hexane에 대한 EtOAc의 농도를 순차적으로 유출시켜 분획 I-1~분획 I-9을 얻었다. 그 중 분획 I-3에서 compound 2을 얻었으며 문헌에 소개된 data와 EI mass spectrum에서 총 분자량을 확인하여 compound 2는 C₅₅H₁₀₂O₆인 1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol로 확인, 결정하였다.

1. 천궁으로부터 분리된 화합물의 spectral data

1) Compound 1. linoleic acid methyl ester

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 0.85 (3H, J=6.7 Hz, H-18), 1.25 (14H, J=13.3 Hz, H-4, 5, 6, 7, 15, 16, 17), 1.59 (2H, J=6.8 Hz, H-3), 2.01 (4H, J=6.2 Hz, H-8,14), 2.24 (2H, J=7.4 Hz, H-2), 2.74 (2H, J=5.4 Hz, H-11), 3.46 (-OCH₃), 5.25~5.40 (4H, H-9, 10, 12, 13)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 174.3 (C-1), 130.1 (C-13), 130.0 (C-9), 128.0 (C-10), 127.8 (C-12), 51.4 (-OCH₃), 34.0 (C-2), 31.9 (C-16), 29.5 (C-7), 29.4 (C-15), 29.3~29.1 (C-4,5,6), 27.1 (C-8), 27.1 (C-14), 25.9 (C-11), 24.9 (C-3), 22.6 (C-17), 14.0 (C-18)

2) Compound 2. 1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 0.85 (7H, J=2.25 Hz, H-18', 18'', 18'''), 1.25 (H-40H, J=12.5 Hz), 1.59 (8H, J=6.9 Hz, H-3', 3'', 3''', 17'''), 2.01 (8H, J=6.25 Hz, H-8', 8'', 8''', 14', 14'''), 2.28 (6H, J=7.32 Hz, H-2', 2'', 2'''), 2.74 (4H, J=5.45 Hz, H-11', 11'''), 4.08~4.30 (4H, glyceryl group OCH₂-1,3), 5.24~5.27 (1H, OCH-2), 5.29~5.38 (4H, CH-9', 9'', 10', 10'''), 12', 12'', 13', 13''')

¹³C-NMR (63MHz, CDCl₃) : δ 173.2 (C-1', 1'''), 172.8 (C-1''), 130.1 (C-13', 13'''), 129.9 (C-9', 9'''), 128.0 (C-10', 10'''), 127.8 (C-12', 12'''), 68.8 (C-2), 62.0 (C-1,3), 34.1 (C-2', 2'''), 33.9 (C-2''), 31.9 (C-16', 16'''), 31.5 (C-16''), 29.6 (C-8', 9', 10', 11', 12', 13'), 29.5~29.4 (C-7', 7'', 7''', 15', 15'', 15'''), 29.3~29.1 (C-4', 4'', 4''', 5', 5'', 5''', 6', 6'', 6'''), 27.1 (C-8', 8'''), 27.1 (C-14', 14'''), 25.5 (C-11', 11'''), 24.8 (C-3', 3'', 3'''), 22.6 (C-17', 17'''), 22.5 (C-17''), 14.0 (C-18', 18'', 18''')

2. 천궁으로부터 활성물질의 분리 및 구조규명

1) Compound 1

Oil상으로 anisaldehyde-H₂SO₄로 가열하였을 때 갈색으로 발색되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δ5.25~5.40에 olefinic proton signal (multiplet), δ3.64에서 methyl ester기가 관측되었다. Methylene (CH₂)에 의한 δ1.23~1.28은 긴 사슬로 나타나는 것으로 보아 불포화지방산임을 알 수 있다. δ0.85에서는 terminal methane (CH₃)의 signal이 관측되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 δ174.3에서 carbonyl carbon 중 ester carboxylic acid ester가 관측되고, δ130.1, 130.0, 128.0, 127.8에서 carbon carbon double bond의 olefinic carbon signal이 관찰되었다. δ51.4에서 oxygenated methyl기가 관측되었고, ¹H-NMR에서 δ3.64에서 singlet methyl ester기가 관측된 점으로 보아 이 화합물은 carboxyl기에 methyl기가 ester로 결합되어 있음을 알 수 있었다. δ14.0에서는 C-18으로 terminal methyl기가 관찰되었다. aliphatic region에서는 δ22.5~34.1의 multiple signal들은 긴 methylene carbon의 signal들이 있음을 알 수 있었고, carbon은 dept 90°, 135° NMR spectrum을 통해 확인하였다.

이 data들은 문헌에 소개된 data와 Aldrich library NMR spectrum과 비교했을 때 linoleic acid methyl ester와 일치하였고¹⁰⁾, 또한 EI mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 294에서 나타났다. 따라서 compound 1은 문헌에 소개된 spectral data와 비교하여 불포화지방산인 linoleic acid에 methyl기가 ester로 결합되어 있는 C₁₉H₃₄O₂인 linoleic acid methyl ester로 확인, 결정하였다¹¹⁻¹⁷⁾.

2) Compound 2

Oil상으로 anisaldehyde-H₂SO₄로 가열하였을 때 흑색으로 발색되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δ5.27~5.4에 4H의 olefinic proton signal(multiplet) δ5.24~5.26에서는 1H의 glyceryl group에 의한 proton signal이 관측되었고, δ4.08~4.14에는 4H의 triglycerides의 특징적인 glyceryl group에 의한 proton signal (multiplet)이 관측되었다. δ1.23~1.28의 aliphatic region에서는 다수의(CH₂) methylene proton signal이 긴 사슬로 확인되었고, δ0.85에서는 terminal methyl기(CH₃)의 signal이 관측되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 δ173.2 (C-1"), 172.8 (C-1', 1"')에서 carboxyl기가 관측되고 δ130.1, 129.9, 128.0, 127.8에서 carbon carbon double bond의 olefinic carbon signal이 관찰되었다. δ68.8 (C-2), 62.0 (C-1,3)에서는 triglycerides의 glyceryl carbon signal이 관측되었고, δ22.5~34.1 aliphatic region의 multiple signal들은 methylene carbon signal들임을 알 수 있었다. δ14.0에서는 terminal methyl기를 관측하였으며, carbon은 dept90°, 135° NMR spectrum을 통해 확인하였다. 이 data들은 문헌에 소개된 data와 EI mass spectrum에서 총 분자량을 확인하여 compound 2는 C₃₅H₁₀₂O₆인 1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol로 확인, 결정하였다¹⁸⁻²¹⁾.

요 약

천원물로부터 치은에 생성되는 멜라닌의 양을 효과적으로 조

절하여 치은 미백을 목표로 하는 물질을 분리하고자 문헌에 소개되고 있는 미백 효과를 가진 전통한약을 비롯하여, 민간에서 사용되고 있는 약 100여 종의 고등식물을 대상으로 B-16 mouse melanoma cell lines에서 melanin 생성 억제 효과를 screening하였다. 그 결과 천궁의 methylene chloride 분획에서 활성을 나타내어 실험재료로 선택하여 2개의 화합물을 분리하였으며 각종 spectral data를 검토하여 linoleic acid methyl ester(1), 1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol(2)로 구조를 규명하였다.

이들 화합물은 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성억제 활성을 Kojic acid를 비교 물질로하여 측정하였다. 2종의 화합물 중 1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol은 높은 활성을 보이지 않았으나 linoleic acid methyl ester는 Kojic acid에 비하여 강한 활성을 나타내었다.

Table 2. Inhibitory effects of isolated compounds from *Cnidii Rhizoma* on melanogenesis in B-16 mouse melanoma cell lines

Comp. NO.	Comp. name	IC ₅₀ value (mM)
1	linoleic acid methyl ester	76.5
2	1,3-dilinoleoyl-2-stearoyl glycerol	140.2
Control	Kojic acid	300

참고 문헌

- 이지영, 김재덕, 손경준, 백종성, 김병옥: 치은착색제거술에 관한 임상적 연구. 구강생물학연구 26(21): 201-209, 2002.
- Sook Ah Rhee: Scanning electron microscopic study of the gingival surface characteristic of several types of periodontal disease. 대한치주과학회지 18(2): 366-367, 1988.
- Gilcherst BA, Zhai S, Eller MS, Yarosh DB, Yaa RM: Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. J Invest. Dermatol 101: 666, 1993.
- Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y: Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. J Invest Dermatol 100: 150S-155S, 1993.
- Iwata M, Corn T, Iwata S, Evertte M, Fuller BB: The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. J Invest Dermatol 195: 9, 1990.
- Jackson IJ, et al: A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPochrome tautomerase. EMBO J 11: 519, 1992.
- 육창수, 인문교: 중국산 당귀 및 천궁의 정유성분(I). 생약학회지 22(1): 1991.
- 李智惠: 천궁(*Cnidium officinale Makino*)의 향신료 및 기능성 식품으로서의 이용 연구. 德成女子大學校 一般大學院. 2001.
- 조승길, 권오익, 김창중: 천궁엑스 및 분획의 소염, 진통작용. 생약학회지 27(3): 282-287, 1996.
- 김정숙, 김진숙, 김연태: 황기(*Astragalus membranaceus Bunge*) 뿌리의 성분연구(I). 생약학회지 27(4): 1996.
- Charles J. Pouchert, Jacquelyn Behnke: The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR Spectra. Aldrich Chemical Company Co 2: 785, 1993.
- Kim JS: A Study on the Constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* (Bunge) (III). Korean Journal of Pharmacognosy 31(1): 2000.

13. 김홍재, 조수동, 권기락, 안철진, 주우홍, 강진호, 신동수: 황정(黃精) 추출물의 화학구조결정에 관한 연구(II). *Gene and Protein* 2(1): 1998.
14. 광병만: 국내산 매자나무(*berberis koreana pabilin*)의 추출성분 연구. 강원대학교 대학원 1998.
15. Loreau O, Maret A, Poullain DJM, Chardigny JL, Sebedio B, Beaufriere JP: Noel, Large-scale preparation of (9Z,12E)-[1-13C]-octadeca-9,12-dienoic acid, (9Z,12Z,15E)-[1-13C]-octadeca-9,12,15-trienoic acid and their [1-13C] all-cis isomers. *Chemistry and Physics of Lipids* 106(1): 65-78, 2000.
16. Young Ho Kim, Bo Sup Chung, Young Su Ko, Hee Ja Han: Studies on the Chemical Constituents of *Acanthopanax koreanum* (II). *Archives of Pharmacal Research* 11(2): 159-162, 1988.
17. 장태오: 상추(*Lactuca sativa L.*)로부터 이차대사산물의 분리 동정. 경희대학교 대학원 석사학위논문 2002.
18. Mannina L, Luchinat C, Emanuele MC, Segre A: Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils. a ¹³C NMR study. *Chemistry and Physics of Lipids*: 47-55, 1999.
19. Chen J, Soucek MD, Simonsick WJ, Celikay RW: Synthesis and photopolymerization of norbornyl epoxidized linseed oil. *Polymer* 43(20): 5379-5389, 2002.
20. Marcel SF, CC L: ¹³C-Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of triacylglycerols of type AAA containing (Z)- and (E)-monoethylenic acyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids* 78(1): 15-27, 1995.
21. Harry-O'kuru RE, Holser RA, Abbott TP, Weisleder D: Synthesis and characteristics of polyhydroxy triglycerides from milkweed oil. *Industrial Crops and Products* 15(1): 51-58, 2002.
(Received September 15, 2004; Accepted September 24, 2004)

