

## 백출의 멜라닌 생성 억제 물질

김청택\* · 정민환<sup>1</sup> · 문철순<sup>1</sup> · 임영희<sup>1</sup> · 강상진 · 조완구  
엘지생활건강 기반연구소, <sup>1</sup>엘지화학 CRD연구소

## Inhibitors of Melanogenesis from *Atractylodes* rhizomes

Cheong-Taek Kim\*, Minhwan Jung<sup>1</sup>, Chulsoon Moon<sup>1</sup>, Younghee Lim<sup>1</sup>,  
SangJin Kang, and Wan-Goo Cho

C.I. Center of LG Household & Health Care Ltd. Taejon 305-343, Korea  
<sup>1</sup>Corporate R&D of LG Chem./Research Park(E) Taejon 305-380, Korea

**Abstract** – One sesquiterpenoid was isolated from the methanol extract of *Atractylodes* rhizomes which has been used as traditional medicine for diuresis and the compound was established as selina-4(14),7(11)-dien-8-one by the spectroscopic methods. The compound(IC<sub>50</sub> < 10 ppm) has inhibitory effects on melanogenesis in B16 mouse melanoma.

**Key words** – Sesquiterpenoid, *Atractylodes* rhizomes, selina-4(14),7(11)-dien-8-one, B16 mouse melanoma; melanogenesis

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서의 melanin색소의 이상적 증가에 기인하며, melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성된다. 멜라닌의 주된 생성 과정은 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 dopa, dopaquinone이 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성하는 것으로 되어있다.<sup>1)</sup> 상기의 색소침착을 치유하기 위해 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin 등이 개발되었으나, 효과가 충분치 않거나 피부자극성 또는 안정성에 문제가 있어 제한적으로 사용되고 있다.<sup>2-4)</sup>

본 연구에서는 피부의 과색소침착에 의한 기미, 주근깨 등의 치료제를 개발하고자 멜라노마 세포 시험법(B16 mouse melanoma assay)을 이용하여 50여 종의 생약을 대상으로 멜라닌 생성 억제 효능을 검색한 결과, 백출의 정유 추출물이 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 백출은 삼주 *Atractylodes japonica* Koidzumi(국화과 *Compositae*)의 주피를 제거한 뿌리줄기로, 혈당 강하, 위궤양 예방 및 담즙분비 촉진 등의 효과가 있음이 보고되어 있다.<sup>5)</sup>

백출을 세절하고, methanol로 추출 후 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 실시하여 멜라닌 생성 억제 물질들을 분리하였으며, 각종 spectral data를 바탕으로 구조를 동정하여 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에서 사용된 백출은 중국 절강에서 입수하였다.

**시약 및 기기** – 칼럼크로마토그래피는 silica gel 60 (230 – 400 mesh, Merck)을, 박층크로마토그래피용 precoated plates는 silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck Art.5715)를 사용하였다. HPLC column은 YMC pack-sil column을, mass spectra는 AutoSpec mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK)를, NMR spectra는 Bruker DMX-400을 사용하였다. 세포배양을 위해 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (fetal bovine serum), antibiotics와 Tryptsin (2.5%)을 Gibco에서 구입하였으며, 그의 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

**세포배양** – B16 mouse melanoma을 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.<sup>6)</sup>

**시험물질조제** – 0.2% DMSO를 음성대조군으로, 270 µg/ml arbutin을 양성대조군으로 사용하였으며, selina-4(14),7(11)-

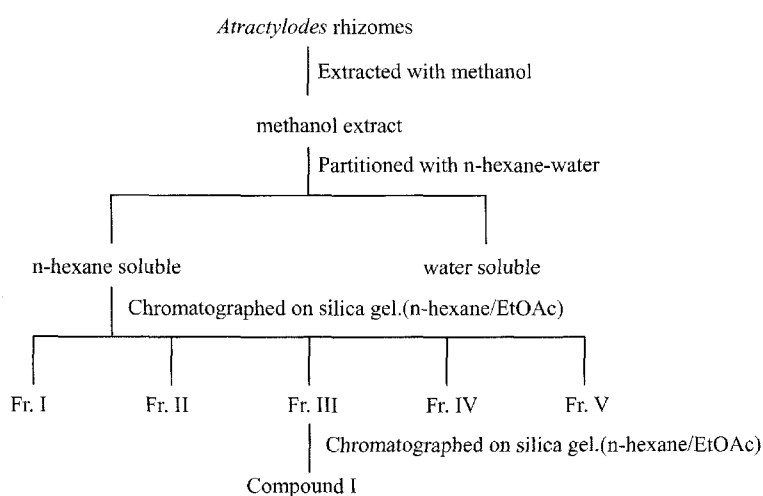
\*교신저자(E-mail): ctkim@lgcare.co.kr  
(FAX): 042-863-2076

dien-8-one의 농도는 270  $\mu\text{g/ml}$  arbutin과 유사한 정도의 멜라닌 생성 억제 효과를 보이는 농도인 5  $\mu\text{g/ml}$ 과 10  $\mu\text{g/ml}$  및 15  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 조제하였다.

**멜라닌 생성 억제 효능 평가(B16 mouse melanoma assay)** - 60 mm petridish에 dish당  $3 \times 10^4$ 개의 세포를 깔아준 후, 각 시험물질을 처리하고, 시료처리 3일 후 0.25% Trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 수확하고, 원심 분리하여 cell pellet을 얻고, cell pellet의 색깔은 육안으로 판정하였다. 또한, cell pellet을 phosphate buffered saline용액에 현탁하여 세포수를 coulter counter(ZM, Coulter Co.)로 측정하여  $2 \times 10^5$  세포수당 1 N NaOH용액 1 ml을 넣고 세포

를 녹인 다음, 490 nm에서 흡광도( $A_{490}/10^6$  cells)를 측정하여, 시험물질을 처리하지 않은 세포의 멜라닌양과 비교하여 각 시험물질이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았다.<sup>7)</sup>

**추출 및 분리** - 백출 2 Kg을 세절하고 methanol로 60°C에서 3시간 2회 추출 후 감압 농축하여 수득한 추출물(350 g)을 정제수 5 L에 현탁한 다음 *n*-hexane, EtOAc 그리고 *n*-butanol으로 순차적으로 분획하여 얻은 각각의 분획들에 대해 멜라닌 생성저해 효과를 실험한 결과 *n*-hexane 분획(35 g)이 멜라닌 생성 저해 효과가 있음을 확인하였다( $IC_{50}=100 \mu\text{g/ml}$ ). 따라서, *n*-hexane분획을 실리카겔 칼럼크로마토그래피



**Scheme 1.** Extraction and isolation of compound I from *Atractylodes* rhizomes.

**Table I.** DEPT,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -NMR, COSY and HMBC data for compound I ( $\text{CDCl}_3$ )

Atom	DEPT	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	COSY	HMBC(H->C, 10 Hz)
1	$\text{CH}_2$	1.51, 1.40	41.24	2	2,3,5,9,10,15
2	$\text{CH}_2$	1.64, 1.53	23.12	1,3	1,3,4,10
3	$\text{CH}_2$	2.37, 2.04	36.76	2,14(w)	1,2,4,5,14
4	Q	-	149.06		2,3,5,6,14
5	CH	2.21	47.06	5	1,3,4,6,10,12,13,14,15
6	$\text{CH}_2$	2.23, 2.72	29.17	6	4,5,7,8,10,11,14,15
7	Q	-	131.57		6,9,12,13
8	Q	-	201.25		6,9,12,13
9	$\text{CH}_2$	2.27	57.61	15(w)	1,5,7,8,10,15
10	Q	-	38.17		1,5,6,9,15
11	Q	-	142.48		5,6,9,12,13
12	$\text{CH}_3$	1.81	22.26	5(w),13(w)	5,7,8,11,13
13	$\text{CH}_3$	1.98	23.19	6(w), 12(w)	5,6,7,8,11,12
14	$\text{CH}_2$	4.85, 4.61	106.91	3(w)	2,3,4,5,6
15	$\text{CH}_3$	0.77	17.30	9(w)	1,5,9,10

(*n*-hexane:EtOAc=80:1--2:1)하여 5개의 분획(Fr.1-5)으로 나누어 멜라닌 생성 억제 효과를 검색한 결과, Fr.3에서 강한 활성을 확인하였다. (IC<sub>50</sub>=20 ug/ml) Fr.3을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(*n*-hexane:EtOAc=40/1--1:1)를 반복하여 활성성분인 compound **I**을 분리하였으며(scheme I), spectral data(<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS)를 바탕으로 구조를 확인하였다 (Table I).

Compound **I** - colorless oil; EI-MS *m/z* 218.34 (M<sup>+</sup>) (calculated for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O); <sup>1</sup>H-NMR data; <sup>13</sup>C-NMR data (Table I).

**결과 및 고찰**

**Compound I의 구조분석** - Compound **I**는 무색의 oil로 EI-mass spectrum에서 분자이온 피크가 *m/z* 218.34이었으며, molecular composition 분석결과 탄소, 수소 및 산소의 비율은 각각 82.52%, 10.16% 및 7.33%였다. 이로 부터 compound **I**의 분자식이 C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O임을 확인하였다. 또한, 각 물질의 구조는 NMR data의 검토에 의하여 결정되었다.

COSY와 HMQC spectrum에서 2종류의 partial structure(-

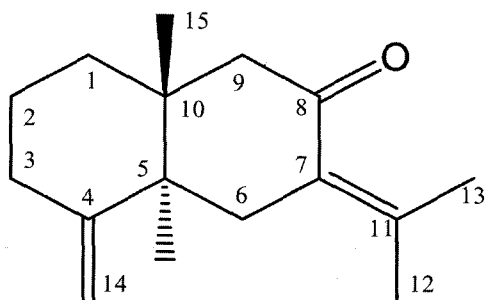


Fig. 1. Structure of compound **I** from *Atractylodes* rhizomes.

CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH-)를 알아 내고 DEPT spectra에서 quaternary 5개(ketone 1개, 이중결합 3개등), tertiary 1개, secondary 6개, primary 3개의 존재를 알아 내었다. 위의 partial structure와 HMBC spectrum의 2J(C,H) 또는 3J(C,H) couplings value를 조합하여 구조를 결정하였는데 다음과 같다. (1) 0.77 ppm의 methyl proton(H-13)은 47.1 ppm(C-4), 38.2 ppm(C-5), 57.6 ppm(C-6), 41.2 ppm(C-10)의 carbon과 correlation이 보이고 (2) H-12(4.85 ppm, 4.61 ppm)는 C-4(47.1 ppm), C-7(149.1 ppm), C-8(36.8 ppm)과 (3) H-14(1.81 ppm) 또는 H-15(1.98 ppm)는 C-2(131.6 ppm), C-11(142.5 ppm)과 HMBC cross peak이 각각 보여졌다.

따라서 상기의 데이터를 기존 문헌 데이터<sup>8,9)</sup>와 비교 검토하여 compound **I**이 selina-4(14),7(11)-dien-8-one임을 동정하였다(Fig. 1).

**멜라닌 생성 억제 효과 평가(B16 mouse melanoma assay)** - Compound **I**의 농도가 5 ug/ml에서 positive control로 사용된 270 ug/ml arbutin과 비슷한 정도로 B16 melanoma의 멜라닌 양을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 육안 판정의 결과를 보다 명확히 하고자 2×10<sup>5</sup> cells 당 멜라닌 양을 측정한 결과, 1 mM arbutin이 52%의 멜라닌생성을 감소시켰으나, compound **I**는 5 ug/ml, 10 ug/ml 및 15 ug/ml의 농도에서 각각 33%, 62%, 73%의 멜라닌 생성을 억제 하였음을 알 수 있었다(Fig. 2).

**결론**

기미, 주근깨 등의 색소침착의 치료제를 개발하고자 한방에서 피부미용에 사용한 것으로 알려진 약재들을 대상으로 B16 melanoma assay를 한 결과, 백출 추출물이 멜라닌생성 억제 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 이로부터 selina-4(14),7(11)-dien-8-one가 멜라닌 생성 억제 효능을 나타냄을 확인하였다.

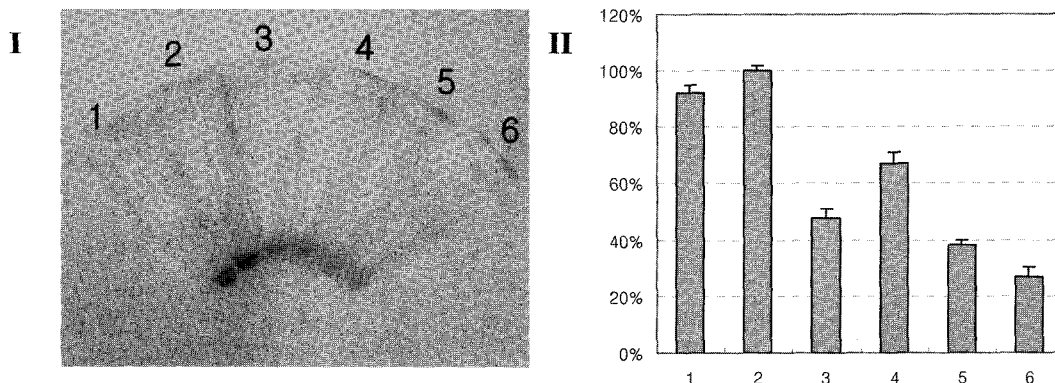


Fig. 2. [I] B16 melanoma cell pellets treated for 3 days with Blank(1), 0.2% DMSO(2), 270 ug/ml arbutin(3), 5 ug/ml compound **I**(4), 10 ug/ml compound **I**(5), 15 ug/ml compound **I**(6), [II] Relative melanin contents in 2×10<sup>5</sup> cells in samples in **I** (n=3).

## 인용문헌

1. Hearing, V. J. and Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* **157**: 549-557.
2. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* **100**: 150-155.
3. Imokawa, G. and Mishima, Y. (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melanoma. *Cancer Res.* **42**: 1994-2002.
4. Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. (1996) Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries* **111**: 65-77.
5. 생약학연구회(1992) 현대생약학, 149-152. 學窓社.
6. Anna, M. M. and Elizabeth, M. (1989) Differential radiosensitivity in cultured B16 melanoma following interrupted melanogenesis induced by glucosamine. *Pigment Cell Res.* **2**: 167-170.
7. Gordon, P. R., Mansur, C. P. and Gilchrist, B. A. (1989) Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* **92**: 566-572.
8. Bohlmann, F. and Suwita, A. (1978) New sesquiterpenes from *Peteravenia schultzi*. *Phytochemistry* **17**: 567-568.
9. Huneck, S., Schreiber, K., Connolly, J. D., Harrison, L. J. and Rycroft, D. S. (1984) Sesquiterpenoids from the liverwort *Lophozia ventricosa*. *Phytochemistry* **23**: 1792.

(2005년 1월 29일 접수)