

지실의 멜라닌 생성 억제 물질

손애량 · 최지영 · 김정아 · 조세훈 · 허광화 · 박성희 · 정시련 · 정태천 · 장영동 · 손종근 · 이승호*
영남대학교 약학대학

Isolation of Melanogenesis Inhibitors from Ponciri Fructus

Ae Ryang Son, Ji Young Choi, Jeong Ah kim, Se Hoon Cho, Xu Guang Hua, Sung Hee Park,
See Ryun Chung, Tae Chun Chung, Yurng Dong Jahng, Jong Keun Son, and Seung Ho Lee*

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

Abstract – To develop an whitening cosmetics, we isolated the melanogenesis inhibitors from the unripe fruits of *Poncirus trifoliata* (Rutaceae). Isolated compounds were identified as poncirin(1), naringin(2), bis(2-methylheptyl)phthalate(3), avenalumic acid methyl ester(4) by comparison of physical and spectral data with those reported in the literature. Among the isolated compounds, bis(2-methylheptyl)phthalate showed most potent inhibitory effect on the melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines(IC₅₀, 36.8 μM) compared with kojic acid(IC₅₀, 150 μM).

Key words – *Poncirus trifoliata*, Rutaceae, bis(2-methylheptyl)phthalate, whitening cosmetics, melanogenesis inhibitors

사람의 피부색을 결정하는데 가장 중요한 요인인 멜라닌(melanin)은 피부의 광노화나 일광각화증을 억제할 뿐만 아니라,^{1,2)} 기미, 주근깨 등의 부분적인 hyperpigmentation을 일으키는 역할을 하고 있다.^{3,4)} Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 소기관인 melanosome에서 생합성되며, melanocyte의 수지상 돌기를 통하여 주위의 keratinocyte로 전달되고, 피부의 각질층으로 이행된다.⁵⁾ Melanosome 내에서의 melanin 생성과정은 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 dopa, dopaquinone으로 산화되고, 이들은 효소의 작용 및 자동 산화 반응에 의해 dopachrome, indole carboxylic acid, indole quinone류 등으로 대사되어 최종적으로 melanin을 합성한다.⁶⁻⁸⁾ Melanocyte 안에서 melanin 색소 생산에 관여하는 인자로는 tyrosinase⁶⁾ 이외에도 각종 prostaglandin류,⁹⁾ interferon,¹⁰⁾ melanocyte stimulating hormone(MSH),^{11,12)} vitamin D₃,¹³⁾ histamine, gene expression에 관여하는 인자¹⁴⁾ 등이 보고 되었다. Melanin 생성 억제 물질의 탐색법으로는 tyrosinase 활성저해실험, 배양색소세포를 이용한 실험, 실험동물에서의 *in vivo* 실험, 사람피부를 대상으로 한 실험 등이 실시되고 있으며, 그 중 melanin 합성의 key enzyme인 tyrosinase 활성저해실험이 melanin 중합체 억제제 개발의 초기 단계에서

채택되고 있다.^{5,15)} 그러나 최근 melanin 생성이 tyrosinase에 의한 산화반응 뿐만 아니라, 여러 가지 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 밝혀졌고, 또한 *in vitro*에서의 tyrosinase 활성 억제물질이 melanoma cell lines에서는 활성이 전혀 나타나지 않는 등의 문제로 melanin 생성을 종합적으로 억제하는 물질의 개발이 요구되고 있다.¹⁶⁾ 현재까지 천연물에서 분리된 melanin 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabro,^{17,18)} 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*)의 secondary metabolite인 kojic acid,¹⁹⁾ 우마우르시(Uvae Ursi Folium)의 arbutin,²⁰⁾ 상백피의 oxyresveratrol, dihydromorin, artocarbene, 4-prenyloxysveratrol²¹⁻²³⁾ 등이 있다.

본 연구실에서는 B-16 mouse melanoma 세포주에서 melanin 생합성에 대하여 저해활성이 있는 물질을 천연물로부터 개발하고자 약 100여종의 국산 자원식물을 methanol(MeOH)로 추출하고 이를 유기용매와 물로 분획하여 시료를 조제하고, 각각의 시료를 이용하여 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 저해 활성을 측정하였다(Table I). 그 결과 비교적 강한 활성을 나타낸 지실로부터 melanin 생성 저해활성 물질을 분리, 구조를 규명하고 활성을 측정하였다.

지실(枳實, Ponciri Fructus)은 운향과(Rutaceae)의 식물 탕자나무 *Poncirus trifoliata* Rafin.의 채 익지 않은 열매를 그

*교신저자(E-mail) : seungho@yu.ac.kr
(FAX) : 053-810-4654

Table I. Inhibitory effect of some plant extracts on melanogenesis in B-16 mouse melanoma cell lines at the concentration of 150 µg/ml *in vitro*

Scientific name	Family	Part used	Inhibition ratio(%)		
			C	E	W
<i>Carex humilis</i>	Cyperaceae	RT	-	-	-
<i>Evodia officinalis</i>	Rutaceae	FR	-	-	-
<i>Pueraria thunbergiana</i>	Leguminosae	WP	-	-	1
<i>Trifolium pratense</i>	Leguminosae	WP	-	-	-
<i>Acer tegmentosum</i>	Aceraceae	SB	-	-	-
<i>Artemisia scoparia</i>	Compositae	WP	-	-	-
<i>Gentiana scabra</i>	Gentianaceae	WP	-	-	-
<i>Smilax sieboldii</i>	Lilaceae	SB	-	-	-
<i>Filipendula glaberrima</i>	Rosaceae	WP	-	-	-
<i>Morus alba</i>	Moraceae	ST	-	-	-
<i>Aconogonum divaricatum</i>	Polygonaceae	WP	-	-	-
<i>Acer ukurunduense</i>	Aceraceae	SB	-	-	-
<i>Ulmus davidiana</i>	Ulmaceae	SB	-	-	-
<i>Crisium maackii</i>	Compositae	WP	-	-	-
<i>Paederia scandens</i>	Rutaceae	WP	-	-	-
<i>Clinopodium chinense</i>	Labiatae	WP	-	-	-
<i>Sapium japonicum</i>	Euphobiaceae	FR	-	0	23
<i>Clerodendron tichotomum</i>	Verbenaceae	SB	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i>	Umbelliferae	RT	46	39	16
<i>Magnolia kobus</i>	Magnoliaceae	FL	81	-	-
<i>Gaedenia jasminoides</i>	Rutaceae	FR	-	-	-
<i>Astragalus membranaceus</i>	Leguminosae	RT	-	9	25
<i>Atractylodes japonica</i>	Compositae	RT	22	26	61
<i>Plantago asiatica</i>	Plantaginaceae	SD	36	1	16
<i>Liriope platyphylla</i>	Liliaceae	RT	20	-	25
<i>Geranium thubergii</i>	Geraniaceae	WP	-	-	-
<i>Phellodendron amurense</i>	Rutaceae	SB	-	-	-
<i>Corydalis ternata</i>	Papaveraceae	RT	-	-	-
<i>Paeonia suffruticosa</i>	Paeoniaceae	RB	-	-	-
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Scrophulariaceae	RT	-	-	-
<i>Magnolia officinalis</i>	Magnoliaceae	SB	-	-	-
<i>Epimedium koreanum</i>	Berberidaceae	WP	-	-	-
<i>Anemarrhena ashpodeloides</i>	Liliaceae	RT	9	9	12
<i>Gentiana scabra</i>	Gentianaceae	RT	13	14	19
<i>Gastrodia elata</i>	Orchidaceae	RT	43	24	8
<i>Crataegus pinnatifida</i>	Rosaceae	FR	2	-	13
<i>Sophora flavescens</i>	Leguminosae	RT	-	-	-
<i>Akebia quinata</i>	Lardizabalaceae	SB	-	-	20
<i>Cornus officinalis</i>	Cornaceae	FR	-	-	5
<i>Citrus unshiu</i>	Rutaceae	FR	-	-	11
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	Ranunculaceae	RT	23	14	34
<i>Pueraria thunbergiana</i>	Leguminosae	RT	-	-	-
<i>Forsythia viridissima</i>	Oleaceae	FR	33	-	-
<i>Schizandra chinensis</i>	Schizandraceae	FR	28	27	24

Table I. Continued

Scientific name	Family	Part used	Inhibition ratio(%)		
			C	E	W
<i>Agelica gigas</i>	<i>Umbeliferae</i>	RT	-	-	27
<i>Kalopanax pictus</i>	<i>Araliaceae</i>	SB	29	-	15
<i>Acornus gramineus</i>	<i>Araceae</i>	RT	10	-	9
<i>Bupleurum falcatum</i>	<i>Umelliferae</i>	RT	4	29	-
<i>Melia azedarach</i>	<i>Mleiaceae</i>	SB	21	-	-
<i>Platycodon grandiflorum</i>	<i>Campanulaceae</i>	RT	-	-	5
<i>Asiasarum siebolii</i>	<i>Aristolochiaceae</i>	RT	-	-	16
<i>Angelica dahurica</i>	<i>Umbelliferae</i>	RT	17	29	2
<i>Sinomenium acutum</i>	<i>Menispermaceae</i>	ST	29	-	-
<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>Rhamnaceae</i>	SD	4	5	-
<i>Smilax china</i>	<i>Liliaceae</i>	RT	-	9	-
<i>Zanoxylum piperitum</i>	<i>Rutaceae</i>	WP	37	-	-
<i>Achyranthes japonica</i>	<i>Amaranthaceae</i>	WP	0	4	7
<i>Lycicum chinense</i>	<i>Solanaceae</i>	FR	-	11	29
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	<i>Liliaceae</i>	RT	13	18	19
<i>Cyperus rotundus</i>	<i>Cyperaceae</i>	RT	47	21	40
<i>Perilla sikokiana</i>	<i>Labiatae</i>	WP	-	-	13
<i>Dioscorea japonica</i>	<i>Dioscoreaceae</i>	RT	13	8	1
<i>Pharbitis nil</i>	<i>Convolvulaceae</i>	SD	20	-	-
<i>Leonurus sibiricus</i>	<i>Labiatae</i>	WP	-	-	10
<i>Prunella vulgaris</i>	<i>Labiatae</i>	WP	-	-	21
<i>Lonicera japonica</i>	<i>Caprifoliaceae</i>	WP	16	-	5
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Leguminosae</i>	RT	-	-	18
<i>Chelidonium majus</i>	<i>Papaveraceae</i>	WP	-	-	43
<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Compositae</i>	WP	-	-	-
<i>Paeonia obovata</i>	<i>Paeoniaceae</i>	RT	15	-	18
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Rauraceae</i>	SB	31	-	13
<i>Ambrosia arguta</i>	<i>Compositae</i>	WP	-	-	-
<i>Actinidia arguta</i>	<i>Actinidiaceae</i>	SB	-	-	-
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	<i>Curcubitaceae</i>	SD	43	27	9
<i>Artemisia capillaris</i>	<i>Compositae</i>	WP	-	4	-
<i>Morus alba</i>	<i>Moraceae</i>	RB	22	-	20
<i>Galla rhois</i>	<i>Anacardiaceae</i>	LF	18	-	20
<i>Poria cocos</i>	<i>Polyporaceae</i>	SC	34	19	3
<i>Coptis japonica</i>	<i>Ranunculaceae</i>	RT	-	-	-
<i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Rutaceae</i>	FR	56	28	53
<i>Polygonum multiflorum</i>	<i>Rutaceae</i>	RT	39	27	32
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	<i>Vitaceae</i>	WP	-	-	-
<i>Chloranthus japonicus</i>	<i>Chloranthaceae</i>	WP	-	-	25
<i>Styrax obbassia</i>	<i>Styracaceae</i>	ST	-	-	-
<i>Cassia obtusifolia</i>	<i>Leguminosae</i>	SD	-	-	7
<i>Impatiens textori</i>	<i>Balsaminaceae</i>	WP	-	-	1
<i>Sambucus williamsii</i>	<i>Caprifoliaceae</i>	ST	-	-	-
<i>Lycopus ramosissimus</i>	<i>Labiatae</i>	ST	-	-	6
<i>Lindera obtusiloba</i>	<i>Rauraceae</i>	LF	-	-	13

Table I. Continued

Scientific name	Family	Part used	Inhibition ratio(%)		
			C	E	W
<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Rosaceae</i>	LF	22	-	-
<i>Bombysis corpus</i>	<i>Bombycidae</i>	WR	38	6	38
<i>Rhamnus davurica</i>	<i>Rhamnaceae</i>	ST	-	-	19
<i>Pueraria thunbergiana</i>	<i>Leguminosae</i>	RT	-	-	-
<i>Corylus sieboldiana</i>	<i>Betulaceae</i>	ST	-	-	19
<i>Scopolia japonica</i>	<i>Solanaceae</i>	RT	4	4	39
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	<i>Ranunculaceae</i>	RT	-	-	48
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Myrtaceae</i>	LF	7	-	41
<i>Rhus chinensis</i>	<i>Anacardiaceae</i>	LF	-	-	44
<i>Cleimatis manshurica</i>	<i>Ranunculaceae</i>	WP	-	39	36
<i>Callicarpa japonica</i>	<i>Verbenaceae</i>	ST	-	-	-

RT:Root, FR:Fruit, WP:Whole plants, SB:Stem Bark, ST:Stem, FL:Flower, SD:Seed, WR:Worm, LF:Leaf, SC:Sclerotium, C:CH₂Cl₂ fr, E:EtOAc fr, W:H₂O fr

대로 또는 반으로 잘라 말린 것을 사용한다. 성분으로는 정유로 (+)-limonene 외에 linalool, *p*-cymen, α -cymen, α -pinene, caryophyllene, camphene 등을 함유하며, hesperidine, neohesperidine, poncirin, naringin 등의 flavonoids, skimmianine 등의 alkaloid가 있으며, 기타 citric acid, (-)-synephrine, umbelliferone, auraptene, imperatorin이 보고되어 있다.²⁴⁻²⁶ 지실은 교감신경을 흥분시키고, 항알러지 작용이 있으며, 적출 장관운동을 억제하며, 동양의약에서는辛苦의 藥味를 지니고 있어 散熱, 發汗, 理氣의 효과가 있어서 한방에서는 방향성 고미건위약, 理氣藥, 滯藥으로 쓰인다.^{27,28)}

재료 및 방법

실험 재료 - 실험에 사용된 재료들은 서지학적인 정보를 토대로 하여 한방이나 민간에서 미백효과를 목적으로 사용하고 있거나, 혹은 피부에 적용하는 한약이나 민간약을 한약재상을 통하여 구입하거나 채집을 통하여 수집하고 전문가의 확인을 거쳐 사용하였다.

기기 및 시약 - 용점은 Fisher-Johns의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000(digital polarimeter, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250 (250 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. EIMS spectrum은 micromass mass spectrometer (AUTOSPEC, UK)를 사용하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는

시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silicagel (70 - 230 mesh, Merck), Sephadex LH-20 (25 - 100 μ , Sigma), MCI-gel CHP-20P (75 - 150 μ , Mitsubishi Chem. Co.), RP-18 (40 - 63 μ m, Merck), Toyopearl HW-40F (Tosho), Cosmosil (Nacalai tesque) 등을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, 1% FeCl₃/ethanol용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5 N hyperchloric acid, cold ethanol/ethyl ether (3:1), 1 N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 mouse melanoma 세포주이다.

지실로부터 활성물질의 분리 - 지실 6 kg을 MeOH로 상온에서 일주일 씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축하였다. 감압 농축한 MeOH 추출액을 증류수에 현탁시키고, 동량의 CH₂Cl₂를 가하여 CH₂Cl₂ 층과 H₂O 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ 분획을 얻었다. 남은 H₂O 층에 다시 ethyl acetate (EtOAc)를 동량 가해서 H₂O 층과 EtOAc 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획을 얻고, 나머지를 H₂O 분획으로 하였다. 얻어진 CH₂Cl₂ 분획, EtOAc 분획, H₂O 분획 중 B-16 mouse melanoma 세포주에서 melanin 생성 억제효과를 강하게 보이는 H₂O 분획(150 g)을 MCI-gel CHP-20P에 loading하고 MeOH-H₂O (1:9, 1:4, 3:7, 2:3, 1:1, 1:0)를 용출액으로 하여 fr 1부터 fr 5를 얻었다. 그 중 fr 2와 fr 4는 MeOH과 CH₂Cl₂로 재결정하여 각각 compound 2 (4.88 g)와 compound 1

(14.51 g)을 얻었다. Fr 1 (45.20 g)은 silica gel column에 loading한 후 MeOH-CH₂Cl₂ (1:9, 3:17, 1:4, 3:7)를 용매로 유출시켜 fr 1-1부터 fr 1-3을 얻었다. 그 중 fr 1-1과 fr 1-2를 합하여 compound 3 (66 mg)을 분리하였다. Fr 1-3 (0.44 g)은 RP-18 column을 이용하여 compound 4 (24 mg)를 정제하였다.

B-16 mouse melanoma cell lines에서의 미백 활성 평가 - B-16 mouse melanoma cell lines을 이용한 미백 활성의 평가법은 시료가 세포수준에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 정량적으로 평가하는 방법으로, 시료를 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은(control) 배양세포로부터 멜라닌을 추출해서 alkali에 녹여 비색법으로 정량하였다.²⁹⁾ 즉, B-16 mouse melanoma cell lines을 EMEM(10% fetal FCS) 배지를 사용하여 T-75 culture flask에서 confluence가 될 때까지 배양한 후, culture dish에 cell number가 1×10^6 /dish 이상이 되도록 seeding한 후 1일간 더 배양하였다. 시험물질을 working concentration의 100배 이상으로 제조하여 0.5% DMSO 또는 ethanol 등의 용매에 녹인 후 첨가하여 1일간 배양하였다. 배지를 교환한 후 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌의 양을 정량하였다. 정량은 배지를 버린 후 trypsin-EDTA (0.25/0.02%) 용액 1 ml로 처리 한 후 microcentrifuge tube에 옮겼다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상등액을 버리고 육안으로 control과 비교하였다. 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 후 최종농도가 0.5 N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 후 상등액을 버렸다. 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether(3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시켰다. 건조물에 1 N NaOH 용액 1 ml를 첨가한 후 5분간 끓는 물에서 처리하여 멜라닌을 녹인 다음 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다.

Compound 1 (Poncirin) - ¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) : δ 7.31 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', H-6'), 6.85 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', H-5'), 6.07 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.05 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 5.30 (1H, dd, $J=12.7, 2.9$ Hz, H-2), 5.14 (1H, d, $J=1.3$ Hz, H-1'''), 4.98 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.08 (1H, m, H-3a), 2.66 (1H, dd, $J=17.2, 3.1$ Hz, H-3b), 1.18 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'''). ¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) : δ 198.4 (C-4), 166.6 (C-7), 165.0 (C-5), 164.5 (C-9), 161.5 (C-4'), 132.1 (C-1'), 129.0 (C-2',6'), 115.0 (C-3', C-5'), 104.9 (C-10), 102.5 (C-1'''), 99.4 (C-1''), 97.9 (C-6), 96.8 (C-8), 80.5 (C-2), 79.0 (C-2''), 78.9 (C-5'''), 78.1 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 72.2 (C-2''', C-3'''), 71.2 (C-4'''), 70.0 (C-5'''), 62.2 (C-6''), 55.8 (OCH₃), 44.1 (C-3), 18.2 (C-6'').

Compound 2 (Naringin) - ¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) : δ 7.20 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.70 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3', H-5'), 6.05 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.03 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 5.25 (1H, dd, $J=12.9, 2.8$ Hz, H-2), 5.13 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1'''), 4.97 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.07 (1H, m, H-3a), 2.63 (1H, dd, $J=17.2, 2.9$ Hz, H-3b), 1.17 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'''). ¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) : δ 198.5 (C-4), 166.6 (C-7), 165.0 (C-5), 164.6 (C-9), 159.1 (C-4'), 130.8 (C-1'), 129.1 (C-2',6'), 116.3 (C-3',5'), 104.9 (C-10), 102.5 (C-1'''), 99.3 (C-1''), 97.8 (C-6), 96.7 (C-8), 80.7 (C-2), 79.0 (C-2''), 78.9 (C-5'''), 78.1 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 72.2 (C-2''', C-3'''), 71.2 (C-4'''), 70.0 (C-5'''), 62.2 (C-6''), 44.1 (C-3), 18.2 (C-6'').

Compound 3 {Bis(2-methylheptyl)phthalate} - ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 7.69 (2H, dd, $J=5.6, 3.3$ Hz, H-3), 7.51 (2H, dd, $J=5.6, 3.3$ Hz, H-4), 4.26 (2H, dd, $J=1.6, 8.5$ Hz, H-1'a), 4.19 (2H, dd, $J=1.6, 8.5$ Hz, H-1'b), 1.68 (2H, m, H-2'), 1.50 - 1.21 (16H in total, m, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.93 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-7'), 0.88 (6H, d, $J=6.2$ Hz, H-8'). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : 169.7 (C-1), 134.5 (C-2), 132.8 (C-4), 130.8 (C-3), 70.2 (C-1'), 40.7 (C-2'), 32.4 (C-3'), 30.9 (C-4'), 25.8 (C-5'), 25.0 (C-6'), 16.0 (C-8'), 12.9 (C-7').

Compound 4 (Avenalamic acid methyl ester) - ¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) : δ 7.61 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4), 7.60 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-3), 7.44 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2'), 6.80 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3'), 6.75 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 6.31 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-2), 3.75 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) : δ 169.8 (C-1), 161.4 (C-4'), 146.6 (C-3), 133.6 (C-4), 131.2 (C-2', C-6'), 127.0 (C-1'), 116.8 (C-3', C-5'), 115.8 (C-5), 114.8 (C-2), 52.0 (OCH₃).

결과 및 고찰

피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 분리, 구조를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 문헌 등에 소개되어 있거나, 민간에서 피부에 관련하여 사용되고 있는 100종의 고등식물을 MeOH로 추출하고 이를 다시 CH₂Cl₂, EtOAc, H₂O로 분획한 각각의 시료를 대상으로 하여 150 µg/ml의 농도에서 B-16 mouse melanoma cell lines을 이용한 미백 활성을 검토한 결과, 51종의 시료 (17%)가 20% 이상의 melanin 생성 억제효과를 나타냈으며, 신이의 CH₂Cl₂ 분획 (80%), 백출의 H₂O 분획 (61%), 지실의 CH₂Cl₂ 분획 (56%), H₂O 분획 (53%)이 강한 저해 활성을 나타내었다. 본 연구에서는 지실의 분획 중에서 세포독성을 나타내지 않고 melanin 생합성 저해활성만을 나타낸 지실의 H₂O

분획에 대하여 각종 column chromatography를 이용, 활성 지향적 분리를 시도하여 4종의 화합물을 분리하였다.

Compound 1은 백색 분말 (MeOH)로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색하였다. ¹H-NMR spectrum의 aromatic region에서는 δ 7.31과 δ 6.85에서 *o*-coupling하고 있는 각각 2H의 doublet (*J*=8.7 Hz)이 관찰되고, δ 6.07과 δ 6.05에 *m*-coupling하고 있는 각각 1H의 doublet (*J*=2.2 Hz)이 관찰된다. δ 5.30에 있는 1H의 proton과 coupling하는 각각 1H의 proton signal이 δ 3.08, δ 2.66에서 나타난다. δ 5.14와 4.98에 두개의 anomeric proton signal이 관찰되고 δ 3.83 - 3.41에 당의 proton signal이 관찰된다. δ 3.70에 methoxy기에 기인하는 3H의 singlet이 관찰되고, δ 1.18에 rhamnose의 6번 위치의 methyl기에 의한 특징적인 doublet이 관찰된다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 198.4에 carbonyl carbon signal이 관찰되고, δ 166.6 - 161.5에 산소와 결합된 4개의 quaternary carbon signal 관찰된다. δ 120에 1,4-disubstituted benzen ring에 의한 carbon signal, δ 104.9에 quaternary carbon signal, δ 100 근처에 anomeric carbon signal을 포함하여 모두 4개의 methine signal, δ 80 - 60에 당에 의한 carbon signal, δ 55.8에 methoxyl carbon signal, δ 44.1에 methylene signal, δ 18.2에 rhamnose C-6 signal이 나타난다. 따라서 본 화합물은 flavonoid에 rhamnose와 다른 한개의 당이 결합한 배당체로 추정하고 당의 종류를 확인하기 위하여 compound 1을 5% 황산으로 가수분해하여 glucose와 rhamnose를 확인하였다. 당의 결합위치를 확인하기 위하여 HMBC spectrum을 검토한 결과, glucose C-2와 rhamnose H-1, C-7과 glucose H-1, C-4와 methoxyl기의 proton 사이에 cross peak를 확인함으로써, 이 화합물은 neohesperidoside가 isosakuranetin의 7번 위치에 결합된 poncirin으로 결론짓고 문헌³⁰⁾에 소개된 spectral data와 비교하여 동정하였다.

Compound 2는 백색 분말 (MeOH)로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색하였다. Compound 2의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum은 compound 1과 매우 유사한 pattern을 보여 골격 구조가 같은 화합물로 추정되었다. 그러나 compound 1에서 관찰되는 4'-methoxy기의 signal이 관찰되지 않아 이 화합물은 지실에서 분리되어 보고된 naringin으로 결론짓고 문헌³¹⁾에 소개된 spectral data와 비교하여 동정하였다.

Compound 3은 투명한 유상의 화합물로 vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색된다. ¹H-NMR spectrum의 aromatic region에서 *o*-disubstituted benzene ring의 4H proton signal (δ 7.69, 7.51)이 관찰된다. 또한 ¹³C-NMR spectrum에서 δ 169.7, 134.5, 132.8, 130.8에서 관찰되는 signal은 분자내에 phthalyl group의 존재를 뒷받침해 주고 있다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 4.26과 δ 4.19에 나타나는 AB system의 methylene proton은 ester oxygen에 인접한

methylene group의 존재를 확인해 주고 있다. δ 0.93과 0.88에 각각 triplet과 doublet의 12H의 proton signal이 관찰되고, δ 1.68에 H-2'에 해당하는 2H의 proton signal이 관찰된다. ¹³C-NMR에서 aliphatic 영역에 8개만의 carbon signal이 관찰되는 것으로 보아 본 화합물은 대칭구조를 하고 있는 것을 알 수 있으며, δ 16.0과 12.9에 두개의 methyl group에 의한 signal과 δ 70.2에 ester methylene carbon signal이 관찰된다. 이상의 spectral data의 검토 결과 본 화합물은 bis(2-methylheptyl)phthalate으로 결론짓고 문헌³²⁾에 소개된 spectral data와 비교하여 동정하였다.

Compound 4는 담황색 분말로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 보라색으로 발색하였다. ¹H-NMR spectrum은 aromatic region에서 8H의 1,4-disubstituted benzene ring과 allylic proton에 의한 signal이 관찰되고, δ 3.70에는 methoxy기의 proton signal이 나타난다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 170.0에 ester에 의한 carbonyl carbon signal, δ 161.4과 127.0에 quaternary carbon signal, δ 146.6 - 114.8 사이에 1,4-disubstituted benzene ring의 carbon signal을 포함하여 8개의 methine signal, δ 52.0에 methoxyl carbon signal이 관찰된다. 따라서 이 화합물은 탄소수가 12개이고, benzene ring의 1, 4위치가 치환된 구조로 치환기는 이중결합 및 methoxy기를 포함하는 것으로 추정하였다. 1H-1H COSY spectrum을 통하여 각 proton들 간의 인접관계를 확인하였고, HMQC spectrum에서 각 proton과 carbon을 assignment하였으며, HMBC spectrum에서 C-1과 H-5, C-1과 methoxy기의 proton 사이의 cross peak를 확인함으로써, 이 화합물은 avenalunic acid methyl ester로 결론짓고 문헌³³⁾에 소개된 spectral data와 비교하여 동정하였다.

분리된 화합물의 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제 효과를 kojic acid를 비교 물질로 하여 측정한 결과를 Table II에 나타내었다.

분리된 4종의 화합물 전반에 걸쳐 melanin 생성 억제활성이 나타났으며, 그 중 bis(2-methylheptyl)phthalate가 가장 강한 억제활성을 나타내었다(IC₅₀ Value : 36.8 μM) (Fig. 1) (Table I) (Table II).

Table II. Inhibitory effects of compounds isolated from Ponciri Fructus on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro*

Comp. No	Comp. Name	IC ₅₀ value (μM)
Comp. 1	Poncirin	206.7
Comp. 2	Naringin	-
Comp. 3	Bis(2-methylheptyl)phyhalate	36.8
Comp. 4	Avenalunic acid methyl ester	80.1
Control	Kojic acid	300

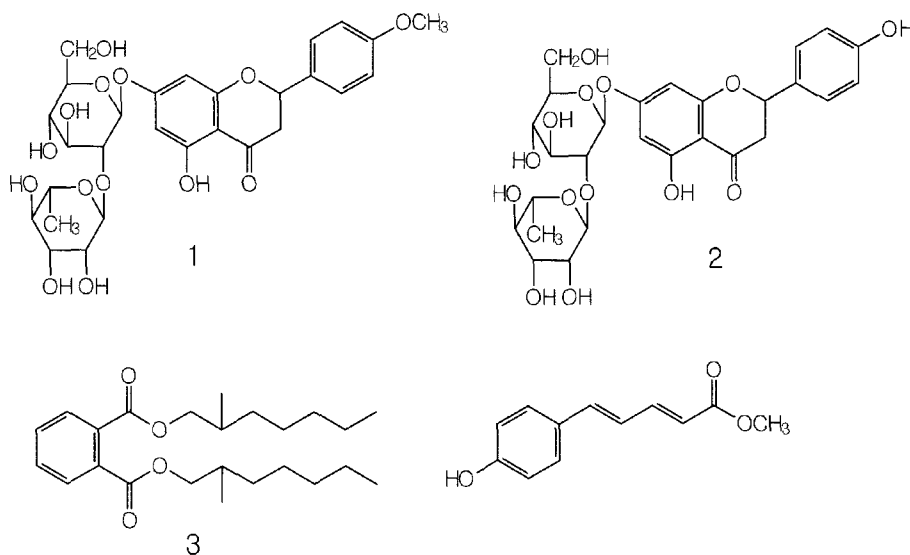


Fig. 1. The structures of compounds isolated from the Ponciri Fructus.

결 론

1. 피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자 약 100여종의 고등식물을 대상으로 B-16 mouse melanoma cell lines을 이용한 미백 활성을 검토한 결과, 지실의 MeOH 추출물의 물분획이 melanin 생합성을 강하게 억제한다는 사실을 알고 활성물질의 분리를 시도하여 4종의 화합물을 분리하였다. 분리된 4종의 화합물들은 물리화학적 특성 및 각종 spectral data의 검토 결과 각각 poncirin (1), naringin (2), bis(2-methylheptyl)phthalate (3), avenalumic acid methyl ester (4)로 결정하였으며, B-16 melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 저해 활성은 kojic acid를 비교 물질로 하여 측정 한 결과, bis(2-methylheptyl)phthalate (3)가 IC₅₀ value 36.8 μM로 가장 강하였다.

감사의 말씀

이 논문은 한국학술진흥재단(KRF-2004-005-E00004)의 지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. Mishima, Y., Hatta, S. and Ohyama, Y. (1988) Induction of melanogenesis suppression : Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**: 367.
2. Matubara, H. (1998) Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells. *Nat. Prod. Sci.* **4**: 3.
3. B. W. Choi *et al.* (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Phar-*

macogn. **29**: 3.

4. Matsusukami, M. (1995) Evaluation of antimelanogenic effects. *香會誌*, **19**: 14.
5. Seiberg, M., Babiarz L. and Lin C. B. (2003) IL-41 The PAR-2 pathway is differentially expressed in skin of color. *Pigment Cell Res.* **16**: 591.
6. Hearing, V. J. and Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.* **19**: 1141.
7. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**: 122.
8. Pavel, S. and Muskiet, F. A. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detec. and Prevent.* **6**: 311.
9. Kreiner, P. W., Gold, C. J., Keirns, J. J., Brock, W. A. and Bitensky, M. W. (1973) Hormonal control of melanocytes : MSH-sensitive adenylyl cyclase in the cloudman melanoma. *Yale J. Biol. Med.* **46**: 583.
10. Giacomini, P. L., Imberti, L., Aguzzi, A., Fisher, P. B., Trinchieri, G. and Ferrone, S. (1985) Immunochemical analysis of the modulation of human melanoma-associated antigens by DNA recombinant immune interferon. *Immunol.* **135**: 288.
11. Sawyer, T. K., Hruby, V. J., Hadley, M. E. and Engel, M. H. (1983) α-Melanocyte stimulating hormone. *Amer. Zool.* **23**: 529.
12. Pilar, A., Urabe K., Kobayashi T., Tsukamoto K. and Vincent J. H. (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **34**: 25650.
13. Fukushima, T. M. and Tagami, H. (1986) Stimulation of melanogenesis by cholecalciferol in cultured human melanocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*: 451.
14. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. (1993)

- Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 150s.
15. Laskin, J. D. and Piccinini L. A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C₃ melanoma. *J. Biol. Chem.* **61**: 16626.
 16. Gordon, P. R., Naeyaert J. M., Eller M., Park H. Y. and Gilchrist B. A. (1991) Pigment content of cultured human melanocyte does not correlate with tyrosinase message level. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 297.
 17. Kusano, G. and Shibano, M. (1994) *Food & Food Ingredients J. Jpn* **161**: 73.
 18. Kawaguchi, Y., Goh, K., Kawa, Y., Kashima, M. and Mizoguchi, M. (1992) *Jpn J. Dermatol.* **102**: 689.
 19. Cabanes, J. and Chazarra, S. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
 20. Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**: 206-212.
 21. Nam-Ho Shin *et al.* (1998) Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 801-803.
 22. Kuniyoshi Shimizu, Ryuichiro Kondo and Kokki Sakai (1997) A stilbene derivative from *Actocarpus incisus*. *Phytochem.* **45**: 1297-1298.
 23. P. Bernad and J. Y. Berthon (2002) Resveratrol : an original mechanism in tyrosinase inhibition. *Int. J. Cosmet. Sci.* **22**: 219-226.
 24. Shoji, N. *et al.* (1984) *Planta Med.* **50**: 186.
 25. Kiuchi, F. and Sankawa, U. (1982) *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 2279.
 26. Shoji, N. *et al.* (1984) *J. Pharm. Sci.* **73**: 843.
 27. 生藥學研究會(1995) “各論 : 利膽生藥”, 現代生藥學, 學窓社.
 28. 윤황금 외(1992) 지실의 생리활성성분. *약학회지* **36**: 548-555.
 29. Lothan, R. and Lothan D. (1980) Stimulation of melanogenesis in human melanoma cell line by retinoids. *Cancer Res.* **40**: 3345.
 30. Vasconcelos, J. M. J. *et al.* (1998) *Phytochemistry* **49**: 1421-1424.
 31. Eun Juhg Cho *et al.* (2000) Chemical constituents of the fruit of *Citrus junos*, *Natural Product Sciences* **6**: 179-182.
 32. Ahmet, Cakir *et al.* (2003) Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology* **87**: 73-83.
 33. Atsushi, Ishihara *et al.* (1999) Biosynthesis of oat avenanthramide phytoalexins, *Phytochem.* **50**: 237-242.

(2005년 1월 5일 접수)