

## 차전자(車前子)로부터 멜라닌 생성 억제물질의 분리

오준석 · 이종구 · 정희욱 · 최지영 · 최은향 · 김동춘 · 김정아 · 손종근 · 이승호\*  
영남대학교 약학대학

### Isolation of Melanin Biosynthesis Inhibitory Compounds from the Seeds of *Plantago asiatica* L.

Joon Seok Oh, Jong Gu Lee, Hee Wook Jung, Ji Young Choi, Eun Hyang Choi,  
Dong Chun Kim, Jeong Ah Kim, Jong Keun Son and Seung Ho Lee\*  
College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**Abstract** – Seven compounds were isolated from the MeOH extract of the seeds of *Plantago asiatica* L. and their structures were identified as  $\beta$ -sitosterol (1), (24*R*)-6 $\beta$ -hydroxy-24-ethyl-cholest-4-en-3-one (2), acteoside (3), geniposidic acid (4), 1-octen-3-ol 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (5), plantainoside D (6) and plantamajoside (7) on the spectroscopic analysis. Among them, (24*R*)-6 $\beta$ -hydroxy-24-ethyl-cholest-4-en-3-one (2) and 1-octen-3-ol 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (5) were first isolated from this plant. Among them, geniposidic acid (4) showed the most potent inhibitory effect on melanogenesis, with inhibition rate of 41%.

**Key words** – *Plantago asiatica* L., melanogenesis inhibitory effect, geniposidic acid

차전자(*Plantaginis semen*)는 질경이과에 속하는 다년생 초본인 질경이(*Plantago asiatica* L.), 털질경이(*P. depressa* Willd.), 왕질경이(*P. major* L. var. *japonica*), 개질경이(*P. camtschatica* Cham.)의 종자로, 한방에서는 이뇨작용이 있고 하초(下焦)의 습열을 내리므로 몸이 부었을 때 및 소변의 양이 적고 잘 나오지 않는 증상에 양호한 반응을 나타낸다고 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 또한, 차전초에서 분리된 plantagin은 임상적으로 진해효과가 있어 어린이의 기침에 유효하게 쓸 수 있고, 종피의 점액질은 물리적 완하제로 변비치료에 사용된다.<sup>2)</sup> 차전자의 성분에 대한 연구로는 iridoid glycoside, flavone glycoside, 각종 지방산,<sup>2)</sup> 그리고 caffeoyl glycoside<sup>3)</sup> 등의 다양한 성분에 대한 보고가 있다.

동물의 뇌, 각종 조직 및 피부에 존재하는 갈색 또는 흑색 색소인 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있으며, 표피 세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 key enzyme으로 하여 생합성 된다고 알려져 있다.<sup>4)</sup> 그러나 최근의 연구 보고에 의하면 melanin의 생합성은 tyrosinase 뿐만 아니라, melanocyte stimulating hormone(MSH), 염증반응에 관여하는 각종 cytokine류, gene

expression에 관여하는 인자 등 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 따라서 피부의 melanin 생성을 억제하는 물질의 개발은 종래에 주로 이용되던 tyrosinase 활성 억제물질의 개발 뿐만 아니라 melanocyte에서 종합적으로 melanin 생성을 억제하는 물질의 개발에 초점이 맞추어지고 있다. 이런 추세에서 시험 결과의 현실성을 확보하기 위해서는 사람의 정상 melanocyte가 바람직하나, 특수한 배지를 필요로 하는 증식성, 계대수의 장해 등 비효율적인 측면이 있어 B-16 mouse melanoma cell lines<sup>6)</sup>를 이용한 실험이 널리 사용된다. B-16 mouse melanoma cell lines를 이용해서 생성된 melanin의 양을 비색법으로 정량하는 방법은 기존의 tyrosinase inhibitor screening 방법이 tyrosinase의 저해 정도만으로 미백효과를 평가했던 방법에 비해, melanocyte내에서 melanin 합성과정에 영향을 미칠 수 있는 모든 단계에 대한 영향을 평가할 수 있기 때문에 좀 더 실제적인 실험방법이라 할 수 있다.

#### 재료 및 방법

**실험재료** – 차전자는 대구시내 약재상에서 신선한 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 표본은 영남대학교 약학대학

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

에 보관하고 있다.

**기기 및 시약** - Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. NMR은 Bruker 250 MHz (DMX 250)을 사용하여 측정하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane (TMS) 및 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate sodium salt (DSS)를 사용하였다. 추출 및 column chromatography 용 용매는 시약용 일급을 사용하였고, TLC plate는 Merck silicagel 60 F<sub>254</sub>, RP-18 60 F<sub>254s</sub>를 사용하였다. Column chromatography용 silicagel은 Merck의 silicagel (70~230 mesh)를, reverse phase용은 Merck의 Lichroprep<sup>®</sup> RP-18 (40~63 µm) 및 Mitsubishi의 MCI gel CHP 20P (75~150 µm)을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시약을 사용하였다. HPLC는 LC-10A (Shimadzu)를 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5N hyperchloric acid, cold ethanol ether (3:1), 1N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 mouse melanoma cell lines이다.

**B-16 mouse melanoma cell lines에서의 미백 활성 평가** - B-16 mouse melanoma cell lines을 EMEM(10% fetal FCS) 배지를 사용하여 T-75 culture flask에서 confluence가 될 때까지 배양하여 Culture dish에 cell number가  $1 \times 10^6$ /dish 이상이 되도록 seeding 한 후 1일간 배양하였다. 그 후에 시험물질을 working concentration의 100배 이상으로 제조하여 0.5% DMSO 또는 ethanol 등의 용매에 녹인 후 첨가하여 1일간 배양하였다. 배지를 교환한 후 시험 물질을 첨가하고, IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)를 1 µM이 되도록 첨가하여 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌의 양을 정량하였다. 배지를 버린 후 trypsin-EDTA(0.25/0.02%) 용액 1 ml로 처리한 뒤에 microcentrifuge tube에 옮겨 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 육안으로 control과 비교하였다. 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 후 최종농도가 0.5N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 후 상등액을 버리고 난 후 0.5N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether(3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시켰다. 그 건조물에 1N NaOH 용액 1 ml를 첨가한 후 5분간 끓는 물에서 처리하여 멜라닌을 녹인 다음 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다.

**활성물질의 단리** - 차전자 6 kg을 MeOH로 상온에서 5일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축한 결과 167 g의 extract를 얻었다. MeOH추출물을 증류수에 현탁시키고 동량의 EtOAc를 가하여, 분획갈때기로 EtOAc층과 H<sub>2</sub>O층을 분획하는 조작을 수 회 반복 실시한 후 감압 농축

하여 90 g의 EtOAc분획을 얻었다. 나머지를 감압 농축하여 77 g의 H<sub>2</sub>O분획을 얻었다.

먼저, EtOAc분획을 지름 9 cm인 column에 silica gel을 4 L 채우고, *n*-hexane을 elution시켜 고정상을 포화시켜 균일한 상태로 만들어 loading하였다. *n*-hexane에 대한 EtOAc의 비율이 10%가 될 때까지는 1% 단위로, 10%에서 50%까지는 5%단위로 비율을 올리는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜, 분획 1에서 분획 10을 얻었다. 이 과정에서 분획 3, 분획6의 각각의 소분획인 분획 3.1.2, 분획 6.4을 MeOH로 재결정하여, 각각 compound 1 (428 mg), compound 2 (10 mg)을 분리하였다. 위의 분획 중 분획 10 (7 g)을 silica gel이 약 0.5 L로 충전된 지름 6 cm의 column에 loading하였다. Column을 methylene chloride (MC)로 포화시킨 후 MC에 대한 MeOH의 비율을 5% 단위로 높여가는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜 소분획 10.1~10.4를 얻었다. MCI gel CHP 20P로 충전된 reverse column chromatography에서 증류수 100%로 치환시킨 후 소분획 10.4를 loading하고, 증류수에 대한 MeOH의 비율을 5% 단위로 증가시키는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜 compound 3 (500 mg)을 분리하였다. 지름 10 cm인 column에 silica gel을 5 L 채우고, EtOAc를 유출시켜 고정상을 포화시켜 균일화 한 다음, H<sub>2</sub>O 분획을 loading하였다. EtOAc에 대한 MeOH의 비율이 10%가 될 때까지는 1% 단위로, 10%에서 50%까지는 5%단위로 비율을 올리는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜 분획 1에서 분획 10을 얻었다.

위의 분획 중 분획 3 (3 g)을 지름 5 cm의 column에 RP-18을 충전시킨 후 증류수 100%로 고정상을 균일하게 한 후, 증류수에 대한 MeOH의 비율을 5% 단위로 증가시키는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜 소분획 3.5, 3.6, 그리고 compound 5 (200 mg)을 분리 하였다. 소분획 3.5, 3.6은 이동상을 MeOH와 H<sub>2</sub>O로 사용하여 Prep. HPLC를 실시한 결과 각각 compound 7 (10 mg), 6 (10 mg)을 분리하였다.

H<sub>2</sub>O분획의 소분획 3.1을 MCI-gel CHP 20P로 충전된 reverse column chromatography에서 증류수 100%로 치환시킨 후 증류수에 대한 MeOH의 비율을 5% 단위로 증가시키는 기울기 용리로 이동상을 유출시켜 compound 4 (300 mg)을 분리 정제하였다.

다음은 분리한 활성물질의 spectral data이다.

Compound 1 β-sitosterol (White needle) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.65 (3H, s, H-18), 0.79 (9H, m, H-26, 27, 29), 0.90 (3H, d, *J*=6.3 Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 3.50 (1H, m, H-3) 5.33 (1H, br d, *J*=5.4 Hz, H-6). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 71.7 (C-3), 56.7 (C-14), 56.0 (C-17), 50.0 (C-9), 45.7 (C-24), 42.2 (C-13, C-4), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.4 (C-10), 36.1 (C-20), 33.8 (C-22), 31.8 (C-7, C-8), 31.6 (C-2),

29.0 (C-25), 28.2 (C-16), 25.9 (C-28), 24.2 (C-15), 23.0 (C-23), 21.0 (C-11), 19.8 (C-26), 19.3 (C-27), 18.9 (C-19), 18.7 (C-21), 11.9 (C-18), 11.8 (C-29)

Compound **2** (24*R*)-6β-hydroxy-24-ethylcholest-4-en-3-one (White needle) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.71 (2H, s, H-18), 0.91 (3H, d, *J*=6.3 Hz, H-21), 1.35 (3H, s, H-19), 4.32 (1H, br s, H-6), 5.79 (1H, s, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 11.94 (C-29), 11.98 (C-18), 18.69 (C-21), 18.98 (C-27), 19.80 (C-26), 19.48 (C-19), 20.93 (C-11), 23.01 (C-28), 24.12 (C-15), 25.98 (C-23), 28.16 (C-16), 29.06 (C-25), 29.68 (C-8), 33.83 (C-22), 34.24 (C-2), 36.09 (C-20), 37.04 (C-1), 37.95 (C-10), 38.49 (C-7), 39.54 (C-12), 42.46 (C-13), 45.76 (C-24), 53.56 (C-9), 55.83 (C-17), 55.99 (C-14), 73.25 (C-6), 126.30 (C-4), 168.50 (C-5), 200.50 (C-3)

Compound **3** acteoside (Amorphous powder) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 1.04 (3H, d, *J*=6 Hz, RhaMe), 2.76 (2H, t, *J*=7 Hz, H-7), 4.33 (1H, d, *J*=8 Hz, Glu-H-1), 5.12 (1H, br s, Rha-H-1), 6.25 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8'), 7.55 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 168.32 (C-9'), 149.76 (C-4'), 148.04 (C-7'), 146.78 (C-3'), 146.06 (C-3), 144.61 (C-4), 131.40 (C-1), 127.58 (C-1'), 123.25 (C-6'), 121.26 (C-6), 117.09 (C-5), 116.49 (C-5'), 116.29 (C-2), 115.17 (C-2'), 114.60 (C-8'), 104.11 (Glu-C-1), 103.03 (Rha-C-1), 81.70 (Glu-C-3), 76.14 (Glu-C-2), 75.93 (Glu-C-5), 73.71 (Rha-C-4), 72.27 (Rha-C-2,3), 71.97 (C-8), 70.41 (Glu-C-4, Rha-C-5), 62.28 (Glu-C-6), 36.51 (C-7), 18.44 (Rha-C-6)

Compound **4** geniposidic acid (Colorless amorphous powder) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ 1.88 (1H, dd, *J*=16.1, *J*=7.8 Hz, H-6a), 2.57 (1H, t, *J*=7.6 Hz, H-9), 2.93 (1H, dd, *J*=16.1, *J*=7.8 Hz, H-6b), 3.1~3.3 (4H, m, Glu-H-2, 3, 4, 5), 3.42 (1H, dd, *J*=11.8, *J*=5.4 Hz, Glu-H-6a), 3.62 (1H, dd, *J*=11.5, *J*=1.9 Hz), 3.98 (1H, d, *J*=14.4 Hz, H-10a), 4.07 (1H, d, *J*=14.4 Hz, H-10b), 4.52 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glu-H-1), 5.00 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1), 5.57 (1H, br s, H-7), 7.3 (1H, s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ 172.58 (C-11), 153.46 (C-3), 142.37 (C-8), 129.90 (C-7), 112.93 (C-4), 99.81 (C-1), 98.02 (Glu-C-1), 77.22 (Glu-C-5), 76.66 (Glu-C-3), 73.77 (Glu-C-2), 70.48 (Glu-C-4), 61.58 (C-10), 60.76 (Glu-C-6), 46.70 (C-9), 39.02 (C-6), 35.31 (C-5)

Compound **5** 1-octen-3-ol 3-O-β-D-xylopyranosyl(16)-β-D-glucopyranoside (Amorphous powder) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.84 (1H, m, H-2), 5.22 (1H, m, H-1a), 5.09 (1H, m, H-1b), 4.32 (1H, d, *J*=7.5 Hz, Xyl-H-

1), 4.29 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glu-H-1), 4.11 (1H, m, H-3), 4.01 (1H, d, *J*=12 Hz, Glu-H-6), 3.83 (1H, dd, *J*=11.3, 6.1 Hz, Xyl-H-5), 3.46 (1H, m, Xyl-H-4), 3.19 (1H, m, Xyl-5b), 1.4~1.7 (2H, m, H-4), 0.87 (3H, t, *J*=6.8 Hz, H-8). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 140.84 (C-2), 116.20 (C-1), 105.28 (Xyl-C-1), 103.28 (Glu-C-1), 82.71 (C-3), 77.99 (Glu-C-3), 77.57 (Glu-C-5), 76.96 (Xyl-C-3), 75.21 (Xyl-C-2), 74.84 (Glu-C-2), 71.37 (Glu-C-4), 71.15 (Xyl-C-4), 69.39 (Glu-C-6), 66.84 (Xyl-C-5), 35.71 (C-4), 33.04 (C-6), 25.65 (C-5), 23.66 (C-7), 14.41 (C-8)

Compound **6** Plantainoside D (Amorphous powder) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 7.57 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'), 6.82 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5), 6.24 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8'), 4.52 (1H, d, *J*=8 Hz, terminal Glu-H-1), 4.47 (1H, d, *J*=8 Hz, inner Glu-H-1), 2.78 (2H, t, *J*=7.47 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 169.08 (C-9'), 149.60 (C-4'), 147.24 (C-7'), 146.73 (C-3'), 146.07 (C-3), 144.61 (C-4), 131.25 (C-1), 127.59 (C-1'), 123.19 (C-6'), 121.26 (C-6), 117.06 (C-2), 116.49 (C-5'), 116.32 (C-2), 115.00 (C-2'), 114.75 (C-8'), 105.20 (terminal Glu-C-1), 103.99 (inner Glu-C-1), 87.56 (inner Glu-C-3), 78.10 (terminal Glu-C-5), 77.72 (terminal Glu-C-3), 75.48 (terminal Glu-C-2), 74.99 (inner Glu-C-5), 74.40 (inner Glu-C-2), 72.40 (C-8), 71.50 (terminal Glu-C-4), 70.27 (inner Glu-C-4), 64.56 (inner Glu-C-6), 62.58 (terminal Glu-C-6), 36.63 (C-7)

Compound **7** Plantamajoside (Amorphous powder) : <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 7.54 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'), 6.92 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5'), 6.77 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5), 6.28 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8'), 4.48 (1H, d, *J*=7.5 Hz, terminal Glu-H-1), 4.35 (1H, d, *J*=8 Hz, inner Glu-H-1), 2.74 (2H, t, *J*=7.47 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 168.52 (C-9'), 149.68 (C-4'), 147.40 (C-7'), 146.79 (C-3'), 146.06 (C-3), 144.61 (C-4), 131.33 (C-1), 127.62 (C-1'), 123.13 (C-6'), 121.25 (C-6), 117.09 (C-2), 116.52 (C-5'), 116.26 (C-5), 115.13 (C-2',8'), 105.69 (terminal Glu-C-1), 103.91 (inner Glu-C-1), 84.15 (inner Glu-C-3), 77.86 (terminal Glu-C-5), 77.58 (terminal Glu-C-3), 75.93 (terminal Glu-C-5), 75.75 (inner Glu-C-2), 74.99 (terminal Glu-C-2), 72.22 (C-8), 71.09 (terminal Glu-C-4), 70.78 (inner Glu-C-4), 62.28 (inner and terminal Glu-C-6), 36.50 (C-7)

## 결과 및 고찰

차진자의 MeOH 추출물의 EtOAc분획과 H<sub>2</sub>O분획을 각

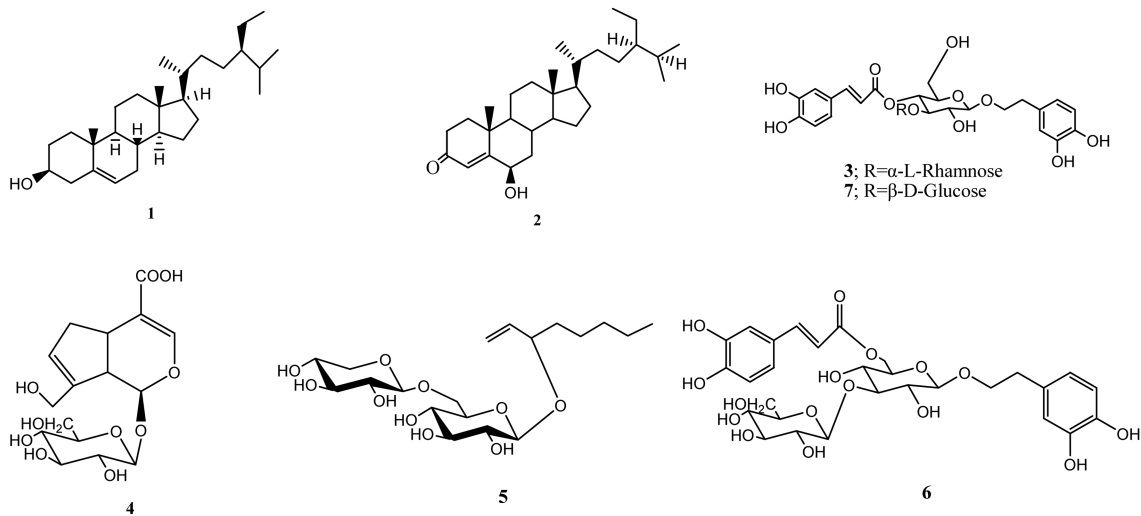


Fig. 1. Structure of isolated compound from the seed of *Plantago asiatica* L.

중 column chromatography를 반복 실시하여 7 종의 화합물을 분리, 구조를 규명하였으며, 분리된 화합물의 melanin 생성 억제효과를 측정하였다(Fig. 1).

Compound 1은 백색의 침상결정으로 vanillin sulfuric acid에서 검은색으로 발색되었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  5.33에서 olefinic proton (1H, br d,  $J=5.4$  Hz, H-6)에서 기인한 signal이 관찰되었으며,  $\delta$  3.50에서 oxymethine에서 기인한 proton signal (1H, m, H-3)이 관찰되었다. 또한,  $\delta$  0.65 (3H, s, H-18), 0.79 (9H, m, H-26, 27, 29), 0.90 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19) 등 6개의 angular methyl signal이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는 d 140.7, 121.7에서 C-5, 6의 이중결합에서 기인한 signal을 관찰할 수 있었고 d 71.7에서 down shift된 tertiary carbon (C-3)이 관찰되었으며 aliphatic region에서 다수의 carbon signal을 포함하여 총 29개의 carbon signal을 관찰하였다. 그리고, DEPT ( $90^\circ$ ,  $135^\circ$ ) NMR spectrum을 통해 각종 탄소종의 수를 확인하였다. 이상의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data 결과를 종합하여 compound 1은 steroid계통의 화합물로 추정하였고 문헌에 소개된 spectral data와 비교하여  $\beta$ -sitosterol로 결정하였다.<sup>7)</sup>

Compound 2는 백색의 침상결정으로 vanillin-sulfuric acid에서 흑색으로 발색되었다. Compound 2의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum은 compound 1과 유사하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  5.79에서 1H분의 olefinic proton signal (1H, s, H-4)이 관찰되었고,  $\delta$  4.32에서 down shift된 broad singlet signal (1H, br s, H-6)이 관찰되었으며,  $\delta$  1.35에서 singlet이,  $\delta$  0.91에서 doublet (1H,  $J=6.3$  Hz, H-21)이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는 compound 2와 전체적으로 비슷하였지만, ketone carbon signal (C-3)이  $\delta$  200.50에서 관찰되었고, C-4, C-5사이의 이중결합에서 기인한 carbon signal이

각각  $\delta$  126.30과  $\delta$  168.50에서 나타났다. 그리고 C-6위치에서 down shift된 carbon signal이 관찰되어, C-6위치에 hydroxy기가 붙어있음을 추정할 수 있었다. 그리고 DEPT ( $90^\circ$ ,  $135^\circ$ ) NMR spectrum을 통해 각종 탄소종의 수를 확인하였다. 이상의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 결과를 통해 compound 2는 compound 1의 구조에서 C-3의 hydroxy기가 ketone기로 C-5, C-6에 있던 이중결합이 C-3, C-4로, 그리고 C-6에 hydroxy기가 치환된 구조로 추정하고 문헌과 비교하여 (24R)-6 $\beta$ -hydroxy-24-ethylcholest-4-en-3-one로 결정하였다.<sup>8)</sup>

Compound 3은 무정형의 분말로 vanillin-sulfuric acid에서 짙은 황색으로 발색되었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  7.55 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-7')와  $\delta$  6.25 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-8')에서 *trans* olefin에 기인한 doublet이 각각 관찰되었고,  $\delta$  7.02 (1H, d,  $J=1.6$  Hz),  $\delta$  6.93 (1H, dd,  $J=8.1$  Hz, 1.6 Hz),  $\delta$  6.75 (1H, d,  $J=8.1$  Hz)에서 전형적인 ABX system의 aromatic ring에 기인한 proton signal이 관찰되었다. 그리고  $\delta$  5.12에서 rhamnose의 anomeric proton (1H, br s)에서 기인한 signal이,  $\delta$  4.33에서 glucose의 anomeric proton (1H, d,  $J=8$  Hz)에서 기인한 signal이 나타나므로, 2 분자의 당이 glycosidic linkage를 형성한 배당체임을 추정할 수 있다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는 C-7, C-8 사이의 이중결합에 의한 olefinic carbon signal이 각각  $\delta$  148.04,  $\delta$  114.60에서 나타났으며, 2쌍의 aromatic ring에 의한 12개의 carbon signal이 관찰되었다. Glucose moiety와 rhamnose moiety에서 기인한 signal을 확인했으며, glucose의 3번 탄소 ( $\delta$  81.70)는 rhamnose의 결합으로 down shift되었다고 추정하였다. 이상의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 종합하여 phenyl ethanoid glycoside의 한 종류임을 확인하고 문헌과 비교하여 acteoside로 구조 확정하였다.<sup>9)</sup>

Compound 4는 무색의 무정형 분말로 vanillin-sulfuric acid에서 보라색으로 발색되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 iridoid의 특징적인 signal인 δ 7.30에서의 singlet (1H, s, H-3)이 관찰되었으며, δ 5.57에서 olefinic proton signal (1H, br s, H-7)이, δ 4.52에서 glucose의 anomeric proton (1H, d, *J*=7.8 Hz)이 각각 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 δ 172.58에서 carboxylic acid에 기인하는 signal (C-11)이 관찰되었고, δ 153.46과 δ 129.90에서 olefinic carbon signal의 짝이 관찰되었는데 (C-3, C-7), C-3은 보통의 olefinic carbon의 chemical shift에 비해 down shift 됨에 따라 iridoid계열에서 나타나는 산소원자가 C-3에 붙어 있음을 추정할 수 있었다. Glucose moiety의 signal은 δ 98.02 (C-1), 77.22 (C-5), 76.66 (C-3), 73.77 (C-2), 70.48 (C-4), 60.76 (C-6)에서 나타났고, aglycone과의 결합부분은 oxymethine carbon임에도 불구하고, 현저히 down shift된 C-1탄소 (δ 99.81)임을 추정할 수 있었다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR spectrum의 결과를 통해 compound 4는 iridoid골격에 한 분자의 glucose가 결합한 배당체임을 확인하고, 문헌과 비교하여 geniposidic acid로 결정하였다.<sup>10)</sup>

Compound 5는 황색의 무정형의 분말로 vanillin-sulfuric acid에서 남색으로 발색되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 4.32 및 δ 4.29에서 2개의 anomeric proton signal이 각각 *J*=7.5 Hz와 7.8 Hz의 doublet으로 나타나므로, 2 분자의 당이 alkyl chain에 glycosidic linkage를 형성한 배당체임을 알 수 있었다. δ 5.84 (1H, m, H-2), δ 5.22 (1H, m, H-1a) 및 δ 5.09 (1H, m, H-1b)에서 *J* 값이 각각 17.4 Hz, 10.5 Hz인 전형적인 terminal vinyl group들의 signal이 나타났고, δ 1.2~1.7에서 나타난 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-에 의한 signal 및 δ 0.87에서 alkyl chain의 말단에 해당하는 methyl signal이 triplet (3H, t, *J*=6.8 Hz, H-8)으로 나타났다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 δ 5.22 및 δ 5.09의 signal과 coupling한 δ 5.84의 proton signal은 δ 4.11 proton signal과 coupling 하며, 이는 다시 δ 0.87~1.7사이에서 나타난 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>과 결합되어 있음을 확인하였다. 따라서 compound 5의 aglycone는 1-octen-3-ol로 추정하였다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 앞에서 추정한 alkyl chain의 3번 methine의 signal이 현저히 down shift되고, HMBC spectrum에서 이 methine의 수소가 당의 anomeric carbon과 coupling하고 있음을 확인하여 compound 5는 1-octen-3-ol의 aglycone와 2 분자의 당이 3번 methine에서 결합한 배당체임을 추정하고 문헌과 비교하여 1-octen-3-ol 3-O-β-D-xylopyranosyl(16)-β-D-glucopyranoside로 결정하였다.<sup>11)</sup>

Compound 6은 vanillin-sulfuric acid에서 짙은 황색으로 발색된다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 전반적으로 compound 3과 유사하여 phenyl ethanoid glycoside의 일종임을 추정할 수 있었다. Compound 3과 차이점으로는 δ 1.04에서 나타

나는 rhamnose의 methyl기에 기인한 signal이 없다는 것으로, compound 6은 rhamnose가 아닌 다른 종류의 당이 결합되어 있는 배당체임을 알 수 있었다. δ 7.57 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7')와 δ 6.24 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8')에서 *trans* 형태로 결합된 이중결합에 기인한 doublet이 각각 관찰되었고, δ 6.95 (1H, d, *J*=1.6 Hz), δ 6.82 (1H, dd, *J*=8.7 Hz, 1.6 Hz), δ 6.70 (1H, d, *J*=8.7 Hz)에서 전형적인 ABX system의 aromatic ring에 기인한 signal이 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서도 compound 3과 거의 유사하였으나, rhamnose의 C-6에 기인한 δ 18.44의 signal이 관찰되지 않았다. 탄소수도 compound 3과 같아서 phenyl ethanoid glycoside의 골격을 가지고 있고, aglycone과 당의 결합 위치만 다른 이성체로 추정하였다. 당과 aglycone의 결합 위치는 compound 6의 inner glucose C-6위치의 chemical shift가 compound 3의 것 보다 2 ppm정도 down shift됨을 확인하여, C-6위치에 aglycone이 결합되어있음을 추정하고, 문헌과 비교하여 plantainoside D로 구조 결정하였다.<sup>3)</sup>

Compound 7은 vanillin-sulfuric acid에서 짙은 황색으로 발색된다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 전반적으로 compound 3과 유사하여 phenyl ethanoid glycoside의 일종임을 추정할 수 있었다. Compound 3과의 차이점은 δ 1.04에서 나타나는 rhamnose의 methyl기에 기인한 signal이 없다는 것으로, compound 7은 rhamnose가 아닌 다른 종류의 당이 결합되어 있는 배당체임을 알 수 있었다. 그리고, δ 4.48 (1H, d, *J*=7.5 Hz, terminal-Glu H-1)과 δ 4.35 (1H, d, *J*=7.5 Hz, inner-Glu-H-1)에서 anomeric proton에서 기인한 signal이 관찰되며 *J* value가 7.5 Hz로 동일하게 나타나 이 배당체는 동일한 두 개의 당이 결합되어 있음을 추정하였다. δ 7.54 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7')와 δ 6.28 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8')에서 *trans* 형태로 결합된 이중결합에서 기인한 doublet이 각각 관찰되었고, δ 7.00 (1H, d, *J*=1.6 Hz), δ 6.92 (1H, dd, *J*=8.1, 1.6 Hz), δ 6.77 (1H, d, *J*=8.1 Hz)에서 전형적인 ABX system의 aromatic ring에 기인한 signal이 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서도 compound 3과 거의 유사하였으나, rhamnose의 C-6번에서 기인한 δ 18.44의 signal이 관찰되지 않았다. 탄소수도 compound 3과 같아서 phenyl ethanoid glycoside의 골격을 가지고 있고, aglycone과 당의 결합 위치만 다른 이성체로 추정하였다. Aglycone과 당의 결합 위치는 compound 3과 같은 chemical shift를 나타내는 inner glucose의 C-6위치로 추정하고 문헌과 비교하여 plantamajoside로 결정하였다.<sup>12)</sup>

본 연구에서 상기 분리된 화합물에 대해 B-16 mouse melanoma cell lines에서 멜라닌 생성 억제 효과를 살펴보았다. 총 7 종의 화합물 중에서 geniposidic acid (4)가 배양된 B-16 mouse melanoma cell lines에 대한 멜라닌 생성 저해 실험에서 41 %의 inhibition으로 분리된 화합물 중 가장 높

**Table I.** Inhibitory effects of components isolated the seeds of *Plantago asiatica* L. on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro*

\*Tested concentration is 10 µg/ml

Compound No.	Inhibition (%)
Compound 1	3
Compound 3	<0
Compound 4	41
Compound 5	2
Compound 6	<0
Compound 7	<0
Arbutin	56

은 활성을 나타내었다.(Table I)

### 결 론

1. 피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자 차전자의 MeOH 추출물의 EtOAc분획과 H<sub>2</sub>O 분획으로부터 melanin 생성 억제물질의 분리를 시도한 결과 7 종의 화합물을 분리하였다.

2. 분리된 7 종의 화합물들은 각종 spectral data의 검토 결과 각각 β-sitosterol (1), (24R)-6β-hydroxy-24-ethyl-cholest-4-en-3-one (2), acteoside (3), geniposidic acid (4), 1-octen-3-ol 3-O-β-D-xylopyranosyl(16)-β-D-glucoopyranoside (5), plantainoside D (6) 그리고 plantamajoside (7) 로 결정하였다.

3. 분리된 화합물 중 (24R)-6β-hydroxy-24-ethyl-cholest-4-en-3-one (2)과 1-octen-3-ol 3-O-β-D-xylopyranosyl(1 → 6)-β-D-glucoopyranoside (5)은 이 식물로부터 처음 분리되었다.

4. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 저해 활성은 분리된 7 종의 화합물 중 geniposidic acid (4)가 41%의 inhibition으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

### 사 사

본 연구에 참여한 정희욱, 최은향, 김동춘은 BK21 연구사업단으로부터 장학금을 수여 받는 학생임.

### 인용문헌

- 안덕균(1998) 원색한국본초 도감, 386. 교학사.
- 생약연구회(2003) 현대 생약학, 224. 학창사.
- Tosho miyase et al. (1991) Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*, *phytochemistry*, **30**: 2015-2018.
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**: 2902-2909.
- Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y., and Gilchrest B. A. (1991) Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *British J. Derma.* **125**: 297-303.
- Lerch K. et al. (1981) Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine monooxygenase. *In metal ions in biological systems*, 143-186.
- Chien-ya hung et. al. (2001) Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsoa, *Lebensm.-Wiss.u.-technol.*, **34**: 306-311.
- Yoko Arai et al. (1998) Chemical constituents of aquatic fern *Azolla nilotica.*, *phytochemistry*, **48**: 471-474.
- Helle Ravn et al. (1990) Phenolic compounds from *Plantago asiatica*, *phytochemistry*, **29**: 3627-3631.
- Zuhal GUVENALP et al. (2006) Chemical constituents of *Galium tortumense*, *Turk J Chem*, **30**: 515-523.
- Jung K.Y et al. (1996) 감국의 새로운 알킬알콜배당체 성분에 관한 연구, *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 15-19.
- Henrik Franzyk et al. (1998) A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuuros*, *phytochemistry*, **47**: 1161-162.

(2007년 11월 20일 접수)