

황백(黃柏)으로부터 멜라닌 생합성 억제 물질의 분리

이종구 · 최지영 · 오준석 · 정희욱 · 최은향 · 이희상 · 김정아 · 장태수¹ · 손종근 · 이승호*
영남대학교 약학대학, ¹서라벌대학

Isolation of Melanin Biosynthesis Inhibitory Compounds from the Phellodendri Cortex

Jong Gu Lee, Ji Young Choi, Joon Seok Oh, Hee Wook Jung, Eun Hyang Choi,
Hee Sang Lee, Jeong Ah Kim, Tae Soo Chang¹, Jong Keun Son and Seung Ho Lee*

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

¹Department of Occupational Therapy, Sorabol College, Kyongju, 780-250, Korea

Abstract – By screening inhibitory activities on the melanin polymer biosynthesis in B-16 mouse melanoma cell lines, MeOH extract of Phellodendri Cortex was found to have inhibitory effect on melanin polymer biosynthesis. Twelve compounds were isolated from the MeOH extract of P. Cortex. They were identified as obacunone (1), limonin (2), β -sitosterol (3), bis(2-methylheptyl)phthalate (4), cycloeucaenol (5), berberine (6), palmatine (7), jatrorrhizine (8), syringin (9), umbelliferone (10), rutacarpine (11) and scopoletin (12) by comparison of their physical and spectral data with those of authentic samples. Among the isolated compounds, berberine (6) and palmatine (7) showed potent inhibitory effect on the melanin polymer biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines, with Inhibition rate of 96% and 90%, respectively. As a positive control, arbutin exhibited an inhibition rate of 56%.

Key words – Phellodendri Cortex, melanin, berberine, palmatine, limonin

동물의 조직 및 피부에 존재하는 갈색 또는 흑색색소인 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원 인물질로 알려져 있으며, 표피세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 key enzyme으로 하여 생합성된다.^{1,2)} 그러나 최근의 연구 보고에 의하면 melanin의 생합성은 tyrosinase 뿐만 아니라, melanocyte stimulating hormone (MSH), 염증반 응에 관여하는 각종 cytokine류, gene expression에 관여하 는 인자 등 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 밝혀졌 다. 따라서 피부의 melanin 생성을 억제하는 물질의 개발은 종래에 주로 이용되던 tyrosinase 활성 억제 뿐 만 아니라 melanocyte에서 종합적으로 melanin 생성을 억제하는 물질 의 개발에 초점이 맞추어지고 있다. 이러한 연구 추세에 맞 추어 본 연구실에서는 배양된 B-16 mouse melanoma cell lines에서 melanin 생합성을 효과적으로 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자, 100여 종의 국산 자원식물을 MeOH 로 추출하고 이를 유기용매와 물로 분획하여 시료를 조제 하고, 각각의 시료에 대하여 배양된 B-16 mouse melanoma

cell lines에서의 melanin 생성 저해 활성을 측정하였다.³⁾ 그 결과 비교적 강한 활성을 나타낸 황백(黃柏)으로부터 활성 지향적 분리방법에 의거하여 melanin 생성 저해물질을 분 리, 구조를 규명하였다.

황백(黃柏)은 운향과에 속하는 황백나무 (*Phellodendron amurense*, 황경피나무, 황벽나무, Rutaceae) 또는 그 밖의 동 속식물의 주피를 벗겨낸 줄기껍질을 말린 것으로 결막염, 당남염, 만성대장염, 세균성적리에 사용되고 있으며, 한방에 서는 염증, 폐염, 골결핵, 감기, 살균약, 소염약으로 쓰이며, 기타 전염성 질병에 해열약으로도 쓰이는 등 유용한 생약 으로 이용되고 있다. 주요 화학 성분에는 berberine, palmatine, jatrorrhizine 등의 alkaloids와 limonin, obacunone 등의 고미성 물질과 steroids 등이 있다. 이 중에서 triterpenoid lactone인 limonin은 hypoglycemic activity가 있 어서 주목되고 있다.⁴⁻⁶⁾

재료 및 방법

실험재료 – 황백은 대구시내 약전 골목에서 구입하여 전

*교신저자 (E-mail): seungho@yu.ac.kr
(FAX): 053-810-3963

문가의 확인을 거쳐 사용하였다. 표본은 영남대학교 약학대학 천연물 화학 연구실에 보관 중이다.

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. NMR은 Bruker 250 MHz (DMX 250)을 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS) 및 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate sodium salt (DSS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 사용하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 일급을 사용하였고, TLC plate는 Merck silicagel 60 F254, RP-18 60 F254s를 사용하였다. Column chromatography용 silicagel은 Merck의 silicagel (70-230 mesh)를, reverse phase용은 Merck의 Lichroprep® RP-18 (40-63 µm) 및 Mitsubishi의 MCI gel CHP20P (75-150 µm)을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid시액을 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5 N hyperchloric acid, cold ethanol ether (3:1), 1 N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 melanoma cell lines이다. HPLC는 LC-10A (Shimadzu)를 사용하였다.

황백으로부터 활성물질의 단리 - 황백 6kg을 MeOH과 methylene chloride (MC)를 1:1 비율로 섞어서 5일간씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축한 결과 898 g의 extract를 얻었다. 추출물을 증류수에 현탁시키고 동량의 MC를 가하여, 분획할때기로 MC층과 H₂O층을 분획하는 조작을 수 회 반복 실시한 후 감압 농축하여 519 g의 MC분획을 얻었으며, 동일한 방법으로 169 g의 *n*-BuOH분획을 얻었다. 먼저 B-16 mouse melanoma cell lines에서 melanin 생성 억제효과를 강하게 보인 MC분획 519 g 중 136 g을 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 다음과 같이 분획하였다. *n*-Hexane에 대한 EtOAc의 비율을 증가시키면서 elution하여 16개 분획 (Fr. 1~Fr. 16)을 얻었다. Fr. 13 (11.91 g)을 MC에 대한 acetone의 비율을 높여가면서 elution하여 6개의 분획 (Fr. 13-1~Fr. 13-6)을 얻어, Fr. 13-1 (4.1 g)을 MeOH로 재결정하여 compound 1 (2,100 mg)을 얻었다. Fr. 15 (16.06 g)를 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 MC에 대한 acetone의 비율을 높여가면서 elution하여 분획 Fr. 15-1~Fr. 15-3을 얻어 그 중 Fr. 15-1 (6.2 g)을 MeOH로 재결정하여 compound 2 (4,100 mg)를 얻었다. Fr. 5 (2.78 g)를 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 *n*-hexane에 대한 EtOAc의 비율을 높여가면서 elution하여 Fr. 5-1~Fr. 5-6을

얻어 이 중 Fr. 5-5 (0.6 g)를 박층 크로마토그래피를 이용하여 compound 5 (30 mg)를 분리 정제하였다. Fr. 6 (1.4 g)은 이동상을 MC에 대한 acetone의 비율을 0~50%까지 gradient로 유출시켜서 Fr. 6-1~Fr. 6-3을 얻고, Fr. 6-2를 *n*-hexane에 대한 acetone의 비율을 높여가면서 elution하여 compound 3 (30 mg)을 분리 정제하였다. Fr. 1 (12.9 g)은 *n*-hexane에 대한 acetone의 비율을 높여가면서 elution하여 Fr. 1-1~Fr. 1-4를 얻었다. 이 중 Fr. 1-2 (5.1 g)를 *n*-hexane에 대한 MC의 비율을 높여가면서 elution하여 분획 Fr. 1-2-1~Fr. 1-2-3을 얻었다. 이 중에서 Fr. 1-2-2를 박층 크로마토그래피를 이용하여 compound 4 (40 mg)를 분리 정제하였다. Fr. 13-3 (3.1 g)과 Fr. 13-6 (2.7 g)는 reverse phase인 RP-18를 이용하여 이동상을 H₂O:MeOH=5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, MeOH 순으로 유출시켜 compound 10 (200 mg), compound 12 (350 mg)를 분리 정제하였다. *n*-BuOH 분획 169 g을 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 MC에 대한 MeOH의 비율을 증가시켜서 Fr. 1에서 Fr. 12를 얻었다. 위 분획 중 Fr. 1 (7 g)을 RP-18를 사용하여 이동상을 H₂O에 대한 MeOH의 비율을 높여가는 gradient로 유출시켜서 compound 11 (150 mg)을 분리 정제하였다. Fr. 4 (9.1 g)를 MeOH로 재결정하여 compound 6 (5,200 mg)를 얻었다. Fr. 5 (10.1 g)는 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 MC에 대한 MeOH의 비율을 높여가면서 elution하여 Fr. 5-1~Fr. 5-5을 얻었다. 그 중 Fr. 5-4 (3.2 g)을 MeOH로 재결정하여 compound 7 (710 mg)를 얻었다. Fr. 5-5 (1.9 g)을 MCI를 이용하여 이동상을 H₂O:MeOH=8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, MeOH 순으로 유출시켜 Fr. 5-5-4, Fr. 5-5-5를 얻었다. 그 중 Fr. 5-5-4에서 compound 9 (200 mg)를 얻었다. Fr. 8 (4.9 g)을 silica gel 크로마토그래피를 실시하여 MC에 대한 MeOH의 비율을 증가시켜서 Fr. 8-1~Fr. 8-9를 얻었다. 그 중 Fr. 8-8 (650 mg)을 MeOH로 재결정하여 compound 8 (160 mg)을 얻었다.

B-16 mouse melanoma cell lines에서의 미백 활성 평가²³⁾ - 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. 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 시험 물질을 첨가하고, IBMX를 100 µM이 되도록 첨가하여 2일간 더 배양한 뒤

배지를 버리고 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. 침전물에 0.5 N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 얼음물에 5분간 방치시킨다. 다시 동일하게 원심분리 시킨 후 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 후 최종농도가 0.5 N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 다시 동일하게 원심분리 시킨 후 상등액을 버리고 난 후 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether (3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시킴으로서 정량을 하였으며, 그 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. Obacunone – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 7.43 (1H, s, H-21), 7.40 (1H, s, H-23), 6.53 (1H, d, $J=11.7$ Hz, H-1), 6.37 (1H, s, H-22), 5.97 (1H, d, $J=11.0$ Hz, H-2), 5.46 (1H, s, H-17), 3.66 (1H, s, H-15), 2.99 (1H, t, $J=11.0$ Hz, H-6b), 2.61 (1H, dd, $J=11.0$ Hz, $J=4.0$ Hz, H-5), 2.30 (1H, dd, $J=11.0$ Hz, $J=4.0$ Hz, H-6a), 2.15 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=3.5$ Hz, H-9), 1.50 (6H, s, H-29, H-30), 1.46 (3H, s, H-28), 1.24 (3H, s, H-19), 1.12 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 207.4 (C-7), 166.9 (C-3), 166.7 (C-16), 156.8 (C-1), 143.3 (C-23), 140.9 (C-21), 122.8 (C-2), 120.0 (C-20), 109.7 (C-22), 84.0 (C-4), 78.0 (C-17), 65.0 (C-14), 57.2 (C-5), 53.4 (C-15), 53.1 (C-8), 49.1 (C-9), 43.0 (C-10), 39.8 (C-6), 37.3 (C-13), 32.6 (C-12), 31.9 (C-30), 26.7 (C-19), 21.0 (C-29), 19.4 (C-28), 16.9 (C-11), 16.4 (C-18).

Compound 2. Limonin – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 7.38 (2H, m, H-21, 23), 6.30 (1H, s, H-22), 5.43 (1H, s, H-17), 4.74 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-19b), 4.43 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-19a), 4.01 (2H, br s, H-1, H-15), 2.98 (1H, dd, $J=17.0$ Hz, $J=4.0$ Hz, H-2b), 2.86 (1H, dd, $J=15.0$ Hz, $J=14.0$ Hz, H-6b), 2.68 (1H, dd, $J=17.0$ Hz, $J=2.0$ Hz, H-2a), 2.55 (1H, dd, $J=12.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-9), 2.47 (1H, dd, $J=14.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-6a), 2.23 (1H, dd, $J=15.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-5), 1.30 (3H, s, H-28), 1.18 (3H, s, H-29), 1.17 (3H, s, H-18), 1.07 (3H, s, H-30). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 206.1 (C-7), 169.1 (C-3), 166.6 (C-16), 143.2 (C-23), 141.1 (C-21), 120.0 (C-20), 109.7 (C-22), 80.3 (C-4), 79.1 (C-1), 77.8 (C-17), 65.7 (C-14), 65.3 (C-19), 60.5 (C-5), 53.8 (C-15), 51.3 (C-8), 48.1 (C-9), 45.9 (C-10), 37.9 (C-13), 36.4 (C-6), 35.6 (C-2), 30.8 (C-12), 30.1 (C-30), 21.4 (C-29), 20.6 (C-28),

18.9 (C-11), 17.6 (C-18).

Compound 3. β -Sitosterol – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 5.31 (1H, d, $J=5.3$ Hz, H-6), 3.51 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.87 (6H, d, $J=6.4$ Hz, H-28, 29), 0.82 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.68 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 141.2 (C-5), 122.1 (C-6), 72.2 (C-3), 57.2 (C-14), 56.4 (C-17), 50.5 (C-9), 46.2 (C-26), 42.7 (C-13), 42.3 (C-4), 39.8 (C-12), 32.1 (C-8), 32.0 (C-7), 31.8 (C-2), 28.0 (C-16), 27.9 (C-25), 24.2 (C-15), 24.0 (C-23), 22.7 (C-29), 22.6 (C-28), 21.2 (C-11), 19.4 (C-19), 19.2 (C-21), 12.3 (C-18).

Compound 4. Bis(2-methylheptyl)phthalate – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 7.69 (2H, dd, $J=5.6$ Hz, $J=3.3$ Hz, H-3), 7.51 (2H, dd, $J=5.6$ Hz, $J=3.3$ Hz, H-4), 4.21 (2H, d, $J=2.5$ Hz, H-1'a), 4.18 (2H, d, $J=2.8$ Hz, H-1'b), 1.66 (2H, m, H-2'), 1.42-1.23 (16H, m, H-5', H-3', H-6', H-4'), 0.93 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-7'), 0.88 (6H, d, $J=6.5$ Hz, H-8'). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 167.8 (C-1), 132.4 (C-2), 130.9 (C-4), 128.8 (C-3), 68.2 (C-1'), 38.7 (C-2'), 30.4 (C-3'), 28.9 (C-4'), 23.7 (C-5'), 23.0 (C-6'), 14.1 (C-8'), 11.0 (C-7').

Compound 5. Cycloecalenol – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 4.67 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-28), 3.16 (1H, m, H-3), 2.16 (1H, m), 0.99 (6H, d, $J=6.8$ Hz), 0.94 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.93 (3H, s), 0.86 (3H, d, $J=6.0$ Hz) 0.56 (1H, m), 0.34 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-19b), 0.10 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-19a). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 156.9 (C-24), 105.9 (C-30), 76.6 (C-3), 52.2 (C-17), 48.9 (C-14), 46.9 (C-8), 45.3 (C-13), 44.6 (C-4), 43.3 (C-5), 36.1 (C-20), 35.3 (C-12), 34.9 (C-2), 34.8 (C-22), 33.8 (C-25), 32.8 (C-15), 31.3 (C-23), 30.8 (C-1), 29.5 (C-10), 28.1 (C-7), 27.3 (C-9), 26.9 (C-16, C-19), 25.2 (C-11), 24.7 (C-6), 22.0 (C-27), 21.9 (C-26), 19.1 (C-28), 18.3 (C-21), 17.8 (C-18), 14.4 (C-29).

Compound 6. Berberine – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : δ 9.64 (1H, s, H-8), 8.55 (1H, s, H-13), 7.98 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-11), 7.86 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-12), 7.51 (1H, s, H-1), 6.82 (1H, s, H-4), 5.97 (2H, s, OCH_2O), 4.77 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-6), 4.07 (3H, s, C-9- OCH_3), 3.97 (3H, s, C-10- OCH_3), 3.18 (2H, m, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) : δ 151.2 (C-10), 150.7 (C-3), 148.5 (C-2), 146.3 (C-8), 144.5 (C-9), 138.3 (C-13a), 133.8 (C-12a), 131.5 (C-4a), 127.6 (C-11), 124.3 (C-12), 122.2 (C-1a), 121.3 (C-8a), 121.0 (C-13), 109.3 (C-4), 106.3 (C-1), 102.9 (OCH_2O), 62.8 (C-9- OCH_3), 57.9 (C-10- OCH_3), 56.0 (C-6), 27.2 (C-5).

Compound 7. Palmatine – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : 9.63 (1H, s, H-8), 8.66 (1H, s, H-13), 8.00 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-11), 7.92 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-12), 7.51 (1H, s, H-1), 6.91 (1H, s, H-4), 4.92 (2H, br s, H-6), 4.07 (3H, s, C-9- OCH_3), 3.96 (3H, s, C-10- OCH_3), 3.86 (3H, s, C-2- OCH_3), 3.80 (3H, s, C-3- OCH_3), 3.20 (2H, m, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) : δ 152.4 (C-9), 151.1 (C-3), 149.6 (C-2), 146.3 (C-8), 144.5 (C-10), 138.5 (C-13a), 133.9 (C-12a), 129.5 (C-4a), 127.7 (C-12), 124.2 (C-11), 122.2 (C-1a), 120.7 (C-13), 119.8 (C-8a), 112.1 (C-4), 109.6 (C-1), 62.7 (C-9- OCH_3), 57.9 (C-10- OCH_3), 57.0 (C-2- OCH_3), 56.7 (C-3- OCH_3), 56.2 (C-6), 26.8 (C-5).

Compound 8. Jatrorrhizine – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : δ 9.68 (1H, s, H-8), 8.71 (1H, s, H-13), 8.03 (1H, d, $J=9.3$ Hz, H-11), 7.95 (1H, d, $J=9.3$ Hz, H-12), 7.58 (1H, s, H-1), 6.79 (1H, s, H-4), 4.95 (2H, br s, H-6), 4.15 (3H, s, C-9- OCH_3), 4.04 (3H, s, C-10- OCH_3), 3.97 (3H, s, C-2- OCH_3), 3.26 (2H, m, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) : δ 152.3 (C-9), 150.9 (C-3), 148.7 (C-2), 146.1 (C-8), 144.4 (C-10), 138.4 (C-13a), 134.1 (C-12a), 129.3 (C-4a), 127.6 (C-12), 124.2 (C-11), 122.2 (C-1a), 120.3 (C-13), 119.8 (C-8a), 115.8 (C-4), 109.6 (C-1), 62.7 (C-9- OCH_3), 57.9 (C-10- OCH_3), 57.1 (C-2- OCH_3), 56.3 (C-6), 26.6 (C-5).

Compound 9. Syringin – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : δ 6.71 (2H, s, H-2, H-6), 6.56 (1H, dt, $J=1.5$ Hz, $J=16.1$ Hz, H-7), 6.32 (1H, dt, $J=16.1$ Hz, $J=5.2$ Hz, H-8), 4.82 (1H, d, $J=7.8$ Hz, Glucose-H-1), 4.18 (2H, dd, $J=5.2$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-9), 3.86 (6H, s, H-3, 5- OCH_3), 3.79 (1H, dd, $J=10.5$ Hz, $J=2.1$ Hz, Glucose-H-6a), 3.67 (1H, dd, $J=10.5$ Hz, $J=6.7$ Hz, Glucose-H-6b), 3.17-3.46 (4H, m, Glucose-H-2, 5, 4, 3). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) : δ 154.3 (C-3, C-5), 135.8 (C-4), 131.3 (C-7), 130.5 (C-1), 130.0 (C-8), 105.4 (C-2, C-6), 105.3 (Glucose-C-1), 78.4 (Glucose-C-3), 77.8 (Glucose-C-5), 75.7 (Glucose-C-2), 71.3 (Glucose-C-4), 63.6 (C-9), 62.5 (Glucose-C-6), 57.0 (C-3, 5- OCH_3).

Compound 10. Umbelliferone – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) : δ 7.91 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.52 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.78 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=2.2$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) : δ 161.6 (C-2), 161.1 (C-7), 155.9 (C-9), 145.0 (C-4), 130.2 (C-5), 113.6 (C-6), 111.8 (C-3), 111.7 (C-10), 102.5 (C-8).

Compound 11. Rutaecarpine – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : δ 9.80 (1H, brs, N-H), 8.33 (1H, d, $J=10.0$ Hz),

7.58-7.66(m, 3H), 7.39(1H, t, $J=10.0$ Hz), 7.24-7.28 (m, 2H), 7.13 (1H, t, $J=10.0$ Hz), 4.60(2H, t, $J=10.0$ Hz), 3.22 (2H, t, $J=10.0$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) : δ 161.5 (C-5), 147.2 (C-1a), 145.3 (C-14a), 138.5 (C-12a), 134.4 (C-2), 127.2 (C-4), 126.9 (C-1), 126.2 (C-9a), 125.6 (C-3), 125.4 (C-11), 121.2 (C-4a), 120.5 (C-9), 120.0 (C-10), 118.7 (C-8a), 112.2 (C-12), 41.2 (C-7), 19.6 (C-8).

Compound 12. Scopoletin – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Acetone- d_6) : δ 7.83 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.18 (1H, s, H-8), 6.78 (1H, s, H-5), 6.16 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 3.89 (3H, s, 6- OCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, Acetone- d_6) : δ 161.5 (C-2), 152.0 (C-7), 151.4 (C-9), 146.2 (C-6), 144.9 (C-4), 113.6 (C-3), 112.4 (C-10), 110.2 (C-5), 103.9 (C-8), 56.95 (C-6- OCH_3).

결과 및 고찰

예비실험의 결과 melanin 생합성을 저해하는 활성을 가지는 황백의 추출물로부터 활성 성분을 분리하고, 구조를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 그 결과, 12종의 화합물을 분리하여 구조를 결정하였고, B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생합성억제효과를 측정하였다. 황백에서 분리된 화합물은 alkaloid류 4종, limonoid류 2종을 포함하여 모두 12종이었으며, 저해율을 %로 표시하였다 (Table I).

Compound 1 – 미황색 무정형의 결정으로 vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 1.12, 1.24, 1.46, 1.89에서 나타나는 singlet으로 H-18, 19, 28, 29, 30에서 기인되는 다섯 개의 methyl group을 확인할 수 있었고, δ 6.37, 7.40, 7.43에서의 singlet으로 furan ring에서 기인하는 proton임을 확인할 수 있었다. δ 6.51, 5.97에서 cycloheptene에 기인하는 signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 26개의 signal이 관찰되었으며, δ 207.4, 166.9, 166.7에서 C-7, 3, 16의 ketone group임을 확인할 수 있었다. δ 109.8, 120.0, 140.9, 143.1에서 furan ring에 기인하는 4개의 carbon signal을 관찰할 수 있었으며, δ 156.8과 δ 122.8에서 cycloheptene의 double bond에 기인되는 signal을 관찰할 수 있었다. 그 밖에 다른 signal들도 문헌^{7,8)}과 비교하여 일치됨을 확인 후 obacunone으로 구조를 동정하였다.

Compound 2 – 백색 분말로서 vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 1.07, 1.17, 1.18, 1.30에서 나타나는 singlet은 적분치에 따라 12H분의 H-30, 18, 29, 28에 의한 네 개의 methyl group임을 나타내는 proton signal을 확인할 수 있었고, δ 6.30, 7.30, 7.38에서의 singlet은 furan ring에 기인하는 proton을

확인할 수 있었다. δ 4.46과 d 4.77에서 H-19의 hydroxy methylene signal임을 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 26개의 signal 중 세 개의 ketone group을 δ 206.2, δ 169.1, δ 166.9에서 관찰할 수 있었으며, 이들은 C- 7, 3, 16의 ketone group임을 추정할 수 있었다. δ 109.7, 120.0, 141.1, 143.2에서 furan ring에 기인하는 네 개의 carbon signal을 관찰할 수 있었으며 그 밖에 다른 signal들도 문헌^{7,8)}과 비교하여 일치됨을 확인 후 limonin으로 구조를 동정하였다.

Compound 5 – 백색 무정형의 분말로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 4.67에서 olefinic proton에 기인되는 doublet과 δ 0.10에서 cyclopropyl proton에 기인되는 doublet이 관찰되었으며, δ 1.12-1.34에서 aromatic proton에서 기인되는 methylene signal이 관찰되었으며, δ 0.91-1.60에서 methyl group에 해당되는 proton이 나타남을 확인할 수 있었다. δ 3.20-3.28에서 multiplet으로 hydroxyl group에 인접한 methine proton signal을 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 30개의 signal이 관찰되었고, C-24와 C-30에 의한 signal이 δ 156.9과 d 105.9에서 double bond로 관찰되었으며, δ 26.9에서 C-19에 해당되는 cyclopropyl의 methylene carbon signal이 관찰되었다. δ 76.6에서는 C-3에 해당되는 hydroxyl group에 인접한 methylene proton signal을 확인함으로써 triterpenoid에 해당되는 cycloecalenol로 결론짓고, 문헌¹¹⁻¹³⁾에 소개된 spectral data와 비교하여 구조 결정하였으며, 문헌 조사 결과 이 식물에서는 처음으로 분리된 화합물로 확인되었다.

Compound 6 – 황색 분말로 얻어졌으며, dragendorff 시약에 의하여 황적색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 9.64, 8.55에서 각각 H- 8, 13에 기인하는 singlet이 관찰되었으며, δ 7.83, 7.96 (d, $J=9.0$ Hz)에서 H-11, 12에 기인하는 doublet이 관찰되었다. δ 7.51, 6.82에서 H-1, 4에 기인되는 두 개의 aromatic methine signal이 관찰되었고, δ 3.18, 4.77 (d, $J=6.4$ Hz)에서 H-5, 6에 기인하는 두 개의 aromatic methylene doublet이 관찰되는 점으로 전형적인 protoberberine 계의 물질로 추정할 수 있다.²⁶⁾ 그리고, δ 4.07, 3.97에서 C-9, 10의 aromatic methoxyl groups에 기인하는 signal이 관찰됨으로서 berberine임을 추정하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 18개의 signal이 관찰되었으며 δ 109.8에서 methylenedioxy carbon에 기인하는 signal이 관찰되었으며, δ 28.2, 57.2에서 C-5, 6에 기인하는 methylene signal이 관찰되며, δ 57.6, 62.5에서 C-10, 9에 기인하는 methoxy signal이, δ 103.6-152.0에서 benzene ring에서 유래된 methine 및 quaternary carbon signal이 확인되었다. 그 밖에 다른 signal들도 문헌^{14,15)}과 비교하여 일치됨을 확인 후 berberine으로 구조를 동정하였다.

Compound 7 – 황색 분말로 얻어졌으며, dragendorff 시약에 의하여 황적색으로 발색되었다. Comp. 6과 유사한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 양상을 보였으며, δ 3.87, 3.92, 4.02, 4.14에서 네 개의 singlet이 관찰되었으며, 적분치로서 aromatic methoxyl groups이 네 개 있음을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 21개의 signal이 관찰되었으며, δ 27.8, 56.6에서 C-5, 6에 기인하는 methylene signal이, δ 57.0, 57.3, 57.6, 62.5에서 C-3, 2, 10, 9에 기인하는 methoxy signal이 관찰되었다. 그 밖에 다른 signal들도 문헌¹⁴⁾과 비교하여 일치됨을 확인 후 이상의 결과를 종합하여 protoberberine의 골격에 methoxyl group가 4개 치환된 palmatine으로 구조를 동정하였다.

Compound 8 – 주황색 분말로 얻어졌으며, dragendorff 시약에 의하여 적갈색으로 발색되었다. Comp. 6, 7과 유사한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 양상을 보였으며 δ 9.61, 8.68에서 H-8, 13에 기인하는 singlet signal이 관찰되었다. δ 7.91 (dd, $J=10.3$ Hz, $J=9.0$ Hz)에서 H-11, 12에 기인하는 signal이 관측됨으로서 Comp. 6, 7과 동일한 protoberberine의 골격을 가지고 있음을 알 수 있었다.²⁶⁾ 그리고 δ 3.91, 3.98, 4.09에서 각각 methoxy group에 해당하는 singlet이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 57.0, 57.7, 62.6에서 각각 methoxy carbon에 기인하는 signal이 관찰되었고, palmatine과 chemical shifts를 비교해 보았을 때 C-4만 3.7 ppm정도 downfield shift되어 있으며 다른 signal들은 유사함을 알 수 있었다. 이것은 palmatine의 C-3에 결합되어 있는 methoxy group 대신에 hydroxy group이 치환되어 있음을 알 수 있게 해준다. 이상의 결과로부터 protoberberine의 골격에 methoxyl group 세 개와 hydroxy group 한 개가 치환되어 있고, 그 밖에 다른 signal들도 문헌^{14,15)}과 비교하여 일치됨을 확인 후 jatrorrhizine으로 구조를 동정하였다.

Compound 9 – 백색 무정형의 분말로 얻어졌으며, vanillin-sulfuric acid 시약에 의하여 흑색으로 발색된다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 6.77에서 singlet으로서 benzene ring의 H-2, 6에 해당하는 singlet이 관찰되었고, δ 4.24에 hydroxy group이 인접하여 downfield shift된 H-9의 double doublet이 관찰되었다. 그리고 δ 3.86에서 singlet이 관찰되었으며, 적분치를 비교하여 두 개의 methoxy group이 있음을 알 수 있었다. δ 3.23-3.46에서는 glucose moiety에 의한 proton signal이 overlapping되어 나타나있음을 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 glucose에 의한 6개의 carbon signal이 δ 62.7-105.6에서 관찰되었고, C-1에 인접한 double bond에 위치한 C-8, 7에 기인하는 signal이 각각 δ 130.2, 131.5에서 관찰되었다. 그리고, C-3, 5에 기인하는 methoxy group이 δ 57.4에서 singlet로 나타남을 알 수 있었다. 그 밖에 다른 signal들도 문헌¹⁶⁻¹⁸⁾과 비교하여 일치됨을 확인 후 syringin으로 구조를 동정하였다.

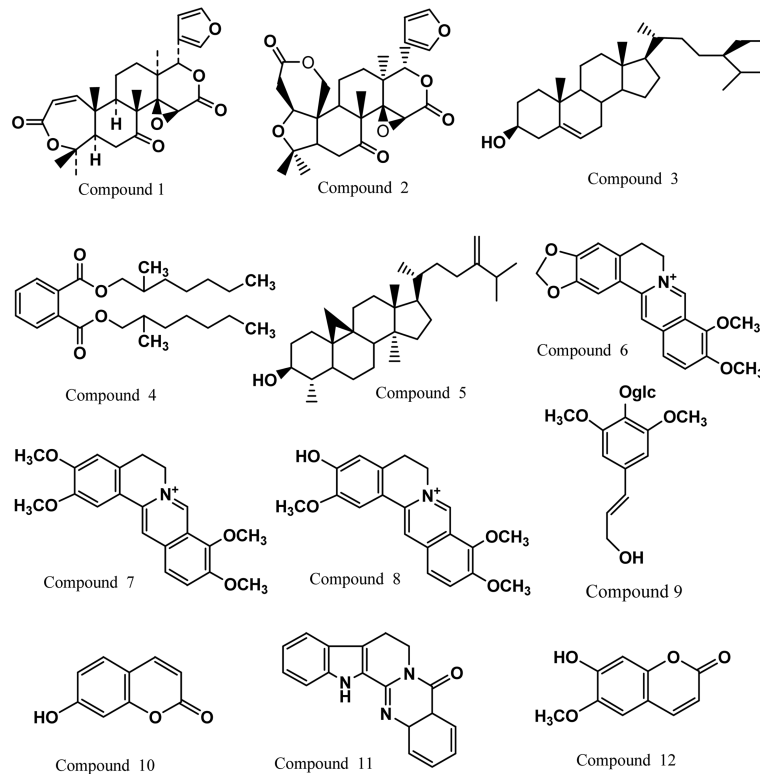


Fig. 1. The structures of compounds isolated from the P. Cortex.

Compounds **3**⁹⁾, **4**¹⁰⁾, **10**^{19,20)}, **11**²¹⁾, **12**²²⁾ – 문헌을 참고하여 spectral data와 비교 후 각각 β -sitosterol, bis(2-methylheptyl)phthalate, umbelliferone, rutaecarpine와 scopoletin으로 구조 결정을 하였다.(Fig. 1)

Table I. Inhibitory effect of compounds isolated from P. Cortex on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro* at the concentration of ratio 10 μ g/ml

Comp. No	Comp. Name	Inhibition (%)
Comp. 1	Obacunone	5
Comp. 2	Limonin	47
Comp. 3	β -Sitosterol	<0
Comp. 4	Bis(2-methylheptyl)phthalate	<0
Comp. 5	Cycloeucalenol	<0
Comp. 6	Berberine	96
Comp. 7	Palmatine	90
Comp. 8	Jatrorrhizine	36
Comp. 9	Syringin	5
Comp. 10	Umbelliferone	<0
Comp. 11	Rutaecarpine	<0
Comp. 12	Scopoletin	<0
Positive Control	Arbutin	56

분리된 각 화합물을 배양된 B-16 melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 저해 활성을 측정된 결과 berberine (6)과 palmatine (7)이 10 μ g/ml 농도에서 각각 96 %, 90 %의 저해율로 높은 억제 활성을 나타내었으며, limonin은 대조 물질인 arbutin보다 약한 활성을 나타내었다. Alkaloid가 일반적으로 세포독성을 나타낸다는 보고^{24,25)}가 있는 것을 생각할 때, 이 결과는 melanin 생성 억제 활성을 보인 berberine과 palmatine의 melanoma cell lines에 대한 세포 독성에 대한 결과일 수도 있다고 판단되며, 향 후 이에 대한 검토가 이루어져야 한다고 생각된다.(Table I.)

결론

1. 피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자 황백 MeOH과 MC추출물의 MC분획과 *n*-BuOH 분획으로부터 melanin 생성 억제물질의 분리를 시도한 결과 12종의 화합물을 분리하였다.

2. 분리된 12종의 화합물들은 각종 spectral data의 검토 결과 각각 obacunone (1), limonin (2), β -sitosterol (3), bis(2-methylheptyl)phthalate (4), cycloeucalenol (5), berberine (6), palmatine (7), jatrorrhizine (8), syringin (9), umbelliferone (10), rutaecarpine (11) 그리고 scopoletin (12)으로 결정하였다.

3. 분리된 화합물 중 cycloeucaleanol (5)은 이 식물로부터는 처음 분리되었다.

4. 분리된 각 화합물의 B-16 melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 저해 활성은 berberine (6)과 palmatine (7)이 10 µg/ml의 농도에서 각각 96%, 90%의 저해율로 높은 활성을 나타내었으며, limonin은 47%의 저해율을 나타내었다.

사 사

본 연구에 참여한 오준석, 정희욱, 최은향은 BK21 연구 사업단으로 장학금을 수혜받은 학생임.

인용문헌

- Mishima Y., Hatta S. and Ohyama Y. (1988) Induction of melanogenesis suppression : Cellular Pharmacology and mode of differential action, *Pigment cell Res.* **1**: 367.
- Matubara H. (1998) Inhibitory Effect of Lichen Metabolites and their Synthetic Analogues on Melanin Biosynthesis in Cultured B-16 Mouse Melanoma Cells, *Natural Product Sciences*, **4**: 3.
- Choi B.W. (1998) Screening of the Tyrosinase Inhibitors from Marine Algae and Medicinal Plants, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**: 3.
- 생약학교재편찬위원회 (2006) 生藥學, 388-389, 551-553. 東明社.
- 박중세 (1998) 약용식물도감, 58. 식품의약품안전청.
- 金一赫 외 17명 (1991) 新藥植物學, 293-299, 340. 學窓社.
- Tohru Sugimoto, Toshio Miyase, Masanori Kuroyanagi, and Akira Ueno. (1988) Limonoids and Quinolone Alkaloids from *Evodia rutaecarpa* BENTHAM, *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 4453-4461.
- Yong Deuk, Min Cheol Kwon et al., (2007) Isolation of Limonoids and Alkaloids from *Phellodendron amurense* and Their Multidrug Resistance (MDR) Reversal Activity, *Arch Pharm Res*, **30**: 58-63.
- Zolotar R.M., Bykhovets A.I., Sokolov S.N., and Kovganko N.V. (2002) Structure- activity relationship of insecticidal steroids. IV. 3β-Chlorosubstituted derivatives of cholesterol and β-sitosterol, *Chem. Natural compounds*, 38.
- 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.
- Ching-Kuo Lee and Ming-Huey Chang, (2000) The Chemical Constituents from the Heartwood of *Eucalyptus citriodora*, *Journal of Chinese Chemical Society*, **47**: 555-560.
- Jose R. de Paula, Ivo J. C. Vieira et al., (1997) Sesquiterpenes triterpenoids, limonoids and flavonoid of *cedrela odorata* grart and speculations on the induced resistance against *hypsipyla grandella*, *Phytochemistry*, **44**: 1449-1454.
- Ngampong Kongkathip, Prasan Dhumma-upakorn et al., (2002) Study on cardiac contractility of cycloeucaleanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*, *Journal of Ethnopharmacology*, **83**: 95-99.
- Niwat Keawpradub, Sukanya Dej-adisai et al., (2005) Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeianum* and *Fibraurea tinctoria*, *Songklanakarinn, J. Sci. Technol.*, **27**: 455-467
- Virinder S. Parmar et al., (1997) Anti-invasive Activity of Alkaloids and Polyphenolics *in Vitro*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **5**: 1609-1619
- Marina Della et al, (1998) Antialgal Compounds from *Zantedeschia Aethiopica*, *Phytochemistry*, **49**: 1299-1304.
- Masataka Sugiyama, Eiko Nagayama et al., (1993) Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus asiaticus*, *Phytochemistry*, **33**: 1215-1219.
- Khaled M. Mohamed, (2001) Phenylpropanoid glucosides from *Chrozophora obliqua*, *Phytochemistry*, **58**: 615-618.
- Jalifah Latip, Thomas G Hartley and Peter G Waterman, (1999) Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii*, *Phytochemistry*, **41**: 107-110.
- Wei Zhang, YunHeng Sheng Shen et al., (2007) Coumarins from the bark of *Daphne marginata*, *Chemistry of Natural Compounds*, **43**: 317.
- Santosh B. Mhaske and Narshinha P. Argade, (2004) Facile zeolite induced Fischer-indole synthesis: a new approach to bioactive natural product rutaecarpine, *Tetrahedron*, **60**: 3417-3420.
- Walter Maier, Jürgen Schmidt, Manfred Nimtz, Victor Wray and Dieter Strack, (2000) Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato, *Phytochemistry*, **54**: 473-479.
- Walter Siegrist and Alex N. Eberle, (1986) In Situ Melanin Assay for MSH Using Mouse B16 Melanoma Cells in Culture, *Analytical biochemistry*, **159**: 191-197.
- Pratibha V. Nerurkar, Klaus Dragull et al, (2004) *In Vitro* Toxicity of Kava Alkaloid, Pipermethystine, in HepG2 Cells Compared to Kavalactones, *Toxicological Sciences*, **79**: 106-111.
- F. Traore, M. Gasquet et al. (2000) Toxicity and Genotoxicity of Antimalarial Alkaloid Rich Extracts Derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*, *Phytotherapy Research*, **14**: 608-611.
- Chia-Ying Li, Hsin-Jung Lu, Chung-Hua Lin, Tian-Shung Wu, (2006) A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in cortex *phellodendri* by ¹H NMR and its application for quality control of commercial traditional Chinese medicine prescriptions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40**: 173-178.

(2007년 11월 20일 접수)