

## 이엽우피소의 성분 및 멜라닌 생성 억제활성

최현규 · 강연복 · 노은미리<sup>1</sup> · 김영수<sup>1</sup> · 허광화 · 나민균 · 이승호\*  
영남대학교 약학대학, <sup>1</sup>충북대학교 약학대학

### Constituents of *Cynanchum auriculatum* and their Inhibitory Effect on Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cell Lines

Hyun Gyu Choi, Yanfu Jiang, Eunmiri Roh, Youngsoo Kim<sup>1</sup>, Guang-Hua Xu,  
MinKyun Na and Seung Ho Lee\*

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

<sup>1</sup>College of Pharmacy & Research Center for Bioresource and Health, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** – Fourteen compounds were isolated from the roots of *Cynanchum auriculatum* and their chemical structures were identified as  $\beta$ -sitosterol (1), acetovanillone (2), p-hydroxyacetophenone (3), 2,4-dihydroxyacetophenone (4), 2,5-dihydroxyacetophenone (5), cynandione A (6), methyleugenol (7), daucosterol (8), Succinic acid (9), cynauriculoside A (10), wilfoside C3N (11), wilfoside C1N (12), wilfoside K1N (13) and wilfoside C1G (14). Among them, compounds 2-5 were isolated from this plant for the first time. And 2, 5-dihydroxyacetophenone (5) showed the most potent inhibitory effect on melanogenesis in B-16 mouse melanoma cell lines with IC<sub>50</sub> value of 20  $\mu$ M.

**Keywords** – *Cynanchum auriculatum*, Melanogenesis, B16 cell lines, 2, 5-dihydroxyacetophenone

이엽우피소 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, Asclepiadaceae)는 다년생 덩굴성 초본으로 전체가 부드러운 털로 덮여있다. 줄기는 원주형으로 상부에 가지가 많고, 잎은 대생이며 엽병이 길다. 엽신은 넓은 계란형이고, 밑부분은 심장형으로 되어 있다. 중국의 장강유역으로부터 남으로 광동성까지 분포하고 있으며, 국내에서는 백수오라는 이름으로 괴근을 약용으로 하고 있다.<sup>1)</sup> Zhang 등에 의하여 이엽우피소의 괴근으로부터 caudatin, metaplexigenin, cynauriculoside A, succinic acid, azelaic acid, wilforibiose, sucrose, 1-O-hexadecanolenin,  $\beta$ -amyrin acetate, cynanchone A, acetylquinol,  $\beta$ -sitosterol, daucosterol 등이 분리 보고되었고,<sup>2)</sup> Song 등에 의하여 caudatin, kidjolanin과 같은 C<sub>21</sub> steroidal aglycones가 분리 보고되었으며,<sup>3)</sup> Wang 등에 의하여 또 다른 C<sub>21</sub> steroidal glycoside인 cynauriculosides I, II가 분리 보고되었고,<sup>4)</sup> Gu 등에 의하여 auriculosides I-IV 등의 새로운 C<sub>21</sub> steroidal glycosides가 분리 보고되었다.<sup>5)</sup> 약리활성에 관한 연구로는 徐 등에 의하여 이엽우피소 뿌리의 알콜 추출물에 의한 면역억제활성, 항산화작용, 항종

양활성, 간보호작용, 현저한 강심작용, 뇌세포 보호작용 등이 보고 되었고,<sup>6)</sup> 최 등에 의하여 Triton WR-1339 유발 고지혈 흰쥐에 대한 total cholesterol 감소효과가 보고되었다.<sup>7)</sup> Min 등에 의하여 이엽우피소의 뿌리로부터 분리된 C<sub>21</sub> steroidal glycoside, phospholipide, acetophenone 등에 의한 항종양작용, 면역억제작용, free radical 제거작용, 항산화작용, 모발성장촉진작용 등이 보고되었다.<sup>8)</sup> 국내에서는 이엽우피소의 지하부가 은조롱 (*Cynanchum vilfordii*)과 혼돈되어 유통되는 경우가 많고, 심지어는 하수오의 대응으로 유통되는 경우가 많은 실정이라서 이엽우피소의 재배방법, 은조롱 또는 백수오와의 구별을 위한 패턴분석, RAPD 분석을 통한 유전자 감별 마커 개발 등이 연구 보고되고 있다.<sup>9-11)</sup>

피부 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 색소세포 (melanocyte) 내의 melanosome에서 생합성된다. 색소세포에서는 자외선에 의해 tyrosinase의 합성이 촉진되고, 세포액 중의 tyrosine이 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)을 거쳐서 dopaquinone으로 산화되어 최종적으로 멜라닌이 생합성 된다. 이 과정에서 dopachrome tautomerase라고 불리는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)는 dopachrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)

\*교신저자 (E-mail): seungho@yu.ac.kr  
(Tel): +82-53-810-2818

로 변환시키는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. TRP-2의 isomer인 TRP-1은 마우스에서 DHICA를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나 인간에서는 DHICA oxidase의 기능을 가지지 않는 것으로 밝혀졌다. TRP-1과 TRP-2는 eumelanin의 생성에만 관여하게 된다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 이엽우피소의 괴경으로부터 성분을 분리하고, 분리한 화합물에 대하여 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 억제효과를 검토하여 결과를 얻었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 이엽우피소 근경은 대구시 약령시장에서 구입하여 동국대학교 한의과대학 이제현 교수에게 확인을 받은 후에 건조하여 사용하였으며, 표품은 영남대학교 약학대학에 보관하고 있다.

**시약 및 기기** - 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F254 (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silica gel (70-230 mesh, Merck), Sephadex LH-20 (25-100  $\mu$ , Sigma Chem. Co.), MCI-gel CHP-20P (75-150  $\mu$ , Mitsubishi Chem. Co.), RP-18 (40-63  $\mu$ , Merck), Toyopearl HW-40F (Tosho) 등을 사용하였다.

HPLC의 고정상으로는 Shim-pack PREP-ODS column 20 mm  $\times$  250 mm (Shimadzu)을 사용하였으며, detector는 자외선 흡광도 254 nm를 사용하였다. 이동상의 조성은 MeOH와 H<sub>2</sub>O, acetonitrile의 이상 또는 삼상 혼합액을 사용하였으며, 시료에 따라서 비율을 정하여 기율기 용리를 하였다.

발색 시약으로는 FeCl<sub>3</sub>/ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액, vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, phosphomolybdic acid, Liberman-Burchard 시액, dragendorff 시액 등을 사용하였다.

멜라닌생성 억제활성 시험에 사용된 시약은 Eagle's minimum essential medium (EMEM), fetal calf serum (FCS), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), kojic acid, arbutin, synthetic melanin과 perchloric acid (Sigma-Aldrich) 등이다.

용점은 Melting Point Apparatus (Fisher-Johns)를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO DIP-1000 automatic digital polarimeter (Tokyo, Japan)를 사용하였다. 자외선 흡광도 측정은 Ultrospec III (Pharmacia)를 사용하였으며, HPLC는 LC-10A (Shimadzu)를 사용하였다. Fraction collector는 SF-160 (Advantec)을 사용하였다. EI-MS spectrum은 Micromass spectrum (AUTOSPEC,

UK)을 사용하였다. NMR spectrum은 Bruker ARX 250 spectrometer (250 MHz)의 Bruker's standard pulse program을 사용하였으며, 시료는 CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, pyridine-*d*<sub>5</sub>, 또는 acetone-*d*<sub>6</sub> (Aldrich Chem. Co.)에 녹여 사용하였고, chemical shift value는 tetramethylsilane (TMS)으로부터 downshift된 part per million (ppm) 단위로 나타내었다.

**멜라닌 생성 억제활성 측정** - 멜라닌 생성 억제효과는 배양된 B-16 mouse melanoma cell lines에서 생성된 water soluble한 melanin을 추출해서 alkali에 녹여 비색법으로 정량하였다. 즉 B-16 mouse melanoma cell lines (ATCC-Manassas, USA)는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere 에서 10% fetal bovine serum, 143 U/mL benzylpenicillin potassium, 10  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양하였다. Cell lines는 96-well culture plates당  $2.5 \times 10^3$  cell/mL의 밀도로 분주하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 cell lines에 시료물질과 100  $\mu$ M IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)를 첨가하여 다시 72 시간 동안 배양하고, 배지를 버린 후 tyrosine-EDTA (0.25%/0.02%) 용액 1 mL로 처리 후 microcentrifuge tube에 옮겨 cell을 counting하였다. 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 control과 육안으로 비교한 후 증류수 1 mL에 현탁시켜 얼리고 녹이는 방법을 2회 반복하였다. Perchloric acid를 최종 농도가 0.5 N이 되도록 첨가하고 얼음물에 5분간 방치한 후 다시 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버렸다. 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출 후 다시 cold ethanol/ether 용매로 2회 반복 추출하여 공기 중에서 건조시킨 후 1 N NaOH 용액을 첨가하고 증탕으로 5분간 끓여 melanin을 녹이고 A<sub>405</sub>으로 생성된 melanin양을 비색 정량하여 control과 비교하였다.

**화합물의 분리 및 구조** - 백수오의 뿌리 10 kg을 MeOH로 상온에서 4일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축하였다. 추출물 (1.8 kg)을 증류수에 현탁 시키고 동량의 EtOAc를 가하여, EtOAc 층과 수층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후 감압 농축하여 370 g의 EtOAc 분획을 얻었다. 다시 수층에 동량의 *n*-BuOH을 가한 후 3회 반복 분획하여 230 g의 *n*-BuOH 분획을 얻고, 나머지를 물 분획으로 하였다. EtOAc 분획을 silica gel column에 로딩하고 *n*-hexane-EtOAc를 용출액으로 하여 Fr.1부터 Fr.14를 얻었다. 그 중 Fr.7과 Fr.14는 재결정하여 각각 compound 1과 8을 얻었다. Fr.8은 silica gel column에 loading한 후 Acetone - Methylene chloride (MC)를 유출용매로서 사용하여 Fr.8-1-4를 얻었다. 그 중 Fr.8-1을 RP-18 column으로 정제하여 compound 2를 얻었다. Fr.8-3은 RP-18로 compound 3을 분리하였고, Fr.3-3의 나머지 부분을 Silica gel C.C에 loading하고 유출용매로 Acetone, MC를 사용하여 compounds 4,

5, 9를 얻었다. Fr.10, Fr.11을 각각 silicagel column에 loading하고, 유출용매로 Acetone, MC를 compounds 6, 7을 얻었다. *n*-BuOH 분획을 Silica gel column에 loading하고 이동상으로 MeOH, MC를 사용하여 Fr.1~17을 얻었다. 이 중 Fr.12와 Fr.17을 각각 RP-18 Column을 사용하고, 유출용매로 H<sub>2</sub>O, MeOH를 사용하여 Fr.12에서 compounds 13, 14를 얻었고, Fr.17에서 compounds 10, 11, 12를 얻었다.

**Compound 1 ( $\beta$ -sitosterol)** : 백색침상정, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  5.35 (1H, d, *J* = 5.3 Hz, H-6), 3.54 (1H, m, H-3), 2.29 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 4-H), 2.00 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, 12-H), 1.00 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.86 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 26-CH<sub>3</sub>), 0.82 (3H, t, *J* = 5.5 Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13, C-4), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7, C-8), 31.6 (C-2), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-28), 24.2 (C-15), 23.0 (C-23), 21.0 (C-11), 19.8 (C-26), 19.3 (C-27), 19.0 (C-19), 18.7 (C-21), 12.0 (C-18), 11.8 (C-29).

**Compound 2 (acetovanillone)** : 담황색분말, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  7.52 (2H, m, H-2,6), 6.91 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 3.90 (3H, s, 3-OMe), 2.53 (3H, s, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  197.0 (C-7), 150.4 (C-3), 146.6 (C-4), 130.0 (C-1), 124.0 (C-6), 114.0 (C-5), 109.7 (C-2), 56.0 (3-OMe), 26.15 (C-8).

**Compound 3 (p-hydroxyacetophenone)** : 회색결정, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  7.91 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2, 6), 6.96 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3, 5), 2.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  198.9 (C-7), 161.5 (C-4), 131.3 (C-2, 6), 129.5 (C-1), 115.6 (C-3, 5), 26.3 (C-8).

**Compound 4 (2,4-dihydroxyacetophenone)** : 백색결정, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  12.59 (1H, s, 2-OH), 10.64 (1H, s, 4-OH), 7.72 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 6.36 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H-5), 6.21 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-3), 2.49 (3H, s, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  203.0 (C-7), 165.1 (C-2), 164.5 (C-4), 134.0 (C-6), 113.1 (C-1), 108.4 (C-5), 102.5 (C-3), 26.6 (C-8).

**Compound 5 (2,5-dihydroxyacetophenone)** : 녹색결정, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  11.21 (1H, s, 2-OH), 9.09 (1H, s, 5-OH), 7.00 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-6), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, H-4), 6.62 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3), 2.39 (3H, s, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,

62.9 MHz) ;  $\delta$  204.4 (C-7), 154.1 (C-2), 149.6 (C-5), 124.8 (C-4), 120.4 (C-1), 118.6 (C-3), 115.7 (C-6), 28.0 (C-8).

**Compound 6 (cynandione A)** : 황색침상정, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 250 MHz) ;  $\delta$  7.78 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-4'), 6.95 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-4), 6.49 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-5'), 2.54 (3H, s, H-8'), 2.18 (3H, s, H-8). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 62.9 MHz) ;  $\delta$  207.3 (C-7), 204.6 (C-7'), 163.7 (C-2'), 163.6 (C-6'8), 152.2 (C-3), 149.0 (C-6), 133.9 (C-4'), 127.7 (C-1), 121.6 (C-5), 120.3 (C-2), 118.1 (C-4), 114.4 (C-1'), 113.0 (C-3'), 108.7 (C-5'), 30.9 (C-8), 26.3 (C-8').

**Compound 7 (methyleugenol)** : 무색오일, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  6.69-6.81 (3H, m, H-2, 5, 6), 5.95 (1H, m, H-2'), 5.08 (2H, m, H-3'), 3.85 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>), 3.33 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1'). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  148.8 (C-3), 147.3 (C-4), 137.7 (C-2'), 132.6 (C-1), 120.3 (C-6), 115.6 (C-3'), 111.7 (C-2), 111.1 (C-5), 56.0 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (4-OMe), 39.8 (C-1').

**Compound 8 (daucosterol)** : 백색분말, <sup>1</sup>H-NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 250 MHz) ;  $\delta$  5.34 (1H, d, *J* = 5.3 Hz, H-6), 5.03 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 4.55 (1H, dd, *J* = 2.5 Hz, 11.8 Hz, H-6'a), 4.40 (1H, dd, *J* = 5.3, 11.8 Hz, H-6'b), 4.27 (2H, m, H-3', 4'), 4.04 (1H, m, H-2'), 3.93 (1H, m, H-5'), 2.72 (1H, br d, *J* = 2.9 Hz, H-4a), 2.48 (1H, br d, *J* = 12.9 Hz, H-4b), 1.00 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.88 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-27), 0.86 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-26), 0.84 (3H, t, *J* = 5.5 Hz, H-29), 0.65 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 62.9 MHz) ;  $\delta$  140.8 (C-5), 121.8 (C-6), 102.5 (C-1'), 78.5 (C-5'), 78.38 (C-3), 78.0 (C-3'), 75.2 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.7 (C-6'), 56.8 (C-14), 56.2 (C-17), 50.3 (C-9), 42.4 (C-13), 39.9 (C-12), 39.2 (C-4), 37.4 (C-1), 36.9 (C-10), 36.3 (C-20), 33.9 (C-22), 32.1 (C-7), 32.0 (C-8), 30.2 (C-2), 29.4 (C-25), 28.5 (C-16), 26.3 (C-23), 24.5 (C-15), 23.3 (C-28) 21.2 (C-11), 19.9 (C-27), 19.4 (C-19), 19.2 (C-26), 19.0 (C-21), 12.1 (C-29), 11.9 (C-18).

**Compound 9 (succinic acid)** : 무색침상정, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 250 MHz) ;  $\delta$  2.40 (2H, s, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 62.9 MHz) ;  $\delta$  173.9 (COOH), 29.06 (CH<sub>2</sub>).

**Compound 10 (cynauriculoside A)** : 백색분말, <sup>1</sup>H-NMR (C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>N, 500 MHz) ;  $\delta$  0.94, 0.96 (3H, d, *J* = 4.55 Hz, 5', 6'-CH<sub>3</sub>), 1.32 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.54 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 2.27 (3H, s, 7'-CH<sub>3</sub>), 2.48 (3H, s, 21-CH<sub>3</sub>), 3.25 (1H, m, 7-CH), 3.45 (3H, s, Cym-3-OCH<sub>3</sub>), 3.55 (2H, dd, *J* = 9.35,

3.04 Hz, Cym-4,5-H), 4.14 (1H, m, 3 $\alpha$ -H), 5.05 (1H, m, 12 $\alpha$ -H), 5.17 (1H, dd,  $J = 9.4$  Hz, Cym-1-H), 5.33 (1H, br, s6-CH), 5.86 (1H, s, 2'-CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) ;  $\delta$  39.2 (C-1), 29.8 (C-2), 77.7 (C-3), 39.0 (C-4), 140.4 (C-5), 118.4 (C-6), 33.9 (C-7), 74.4 (C-8), 44.6 (C-9), 37.4 (C-10), 25.14 (C-11), 72.7 (C-12), 58.0 (C-13), 89.5 (C-14), 34.8 (C-15), 32.9 (C-16), 92.4 (C-17), 10.6 (C-18), 18.3 (C-19), 209.3 (C-20), 27.5 (C-21), 165.9 (C-1'), 119.2 (C-2'), 144.9 (C-3'), 135.8 (C-4'), 128.5 (C-5',9'), 129.3 (C-6',8'), 130.5 (C-7'), 96.2 (C-1''), 35.4 (C-2''), 77.5 (C-3''), 82.4 (C-4''), 69.4 (C-5''), 18.7 (C-6''), 57.3 (-OCH<sub>3</sub>''), 100.8 (C-1'''), 32.4 (C-2'''), 73.9 (C-3'''), 74.6 (C-4'''), 67.6 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.3 (-OCH<sub>3</sub>'''), 99.4 (C-1'''), 36.2 (C-2'''), 77.8 (C-3'''), 82.3 (C-4'''), 69.3 (C-5'''), 18.4 (C-6'''), 58.3 (-OCH<sub>3</sub>'''), 98.9 (C-1'''), 32.2 (C-2'''), 73.5 (C-3'''), 79.2 (C-4'''), 65.2 (C-5'''), 18.2 (C-6'''), 56.9 (-OCH<sub>3</sub>'''), 102.2 (C-1'''), 75.2 (C-2'''), 78.4 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 62.9 (C-6''').

**Compound 11 (wilfoside C3N) :** 무정형분말,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ;  $\delta$  1.06 (6H, d,  $J = 6.7$  Hz, 5', 6'-CH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.23, 1.24, 1.31 (each 3H, d,  $J = 6.1$  Hz, 6-CH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 1.40 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 2.13 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, 7'-CH<sub>3</sub>), 2.17 (3H, s, 21-CH<sub>3</sub>), 2.85 (1H, m, 3-CH), 3.416, 3.425, 3.427 (each 3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 4.56 (1H, dd,  $J = 8.2, 7.6$  Hz, 12-CH), 4.69 (1H, dd,  $J = 10, 2$  Hz, anomeric H), 4.84 (1H, dd,  $J = 9, 2$  Hz, anomeric H), 4.99 (1H, dd,  $J = 3.4, 1$  Hz, anomeric H), 5.37 (1H, br s, 6-CH), 5.52 (1H, br s, 2'-CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ;  $\delta$  39.2 (C-1), 29.8 (C-2), 77.6 (C-3), 38.9 (C-4), 139.3 (C-5), 119.0 (C-6), 33.8 (C-7), 74.2 (C-8), 44.6 (C-9), 37.3 (C-10), 25.0 (C-11), 72.5 (C-12), 57.9 (C-13), 89.4 (C-14), 34.8 (C-15), 32.8 (C-16), 92.3 (C-17), 10.8 (C-18), 18.4 (C-19), 209.1 (C-20), 27.4 (C-21), 165.8 (C-1'), 114.1 (C-2'), 165.2 (C-3'), 38.1 (C-4'), 20.8 (C-5'), 20.8 (C-6'), 16.4 (C-7'), 96.1 (C-1''), 35.2 (C-2''), 77.5 (C-3''), 82.3 (C-4''), 69.2 (C-5''), 18.7 (C-6''), 57.2 (-OCH<sub>3</sub>''), 100.8 (C-1'''), 32.5 (C-2'''), 73.9 (C-3'''), 74.6 (C-4'''), 67.5 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.3 (-OCH<sub>3</sub>'''), 99.4 (C-1'''), 35.3 (C-2'''), 78.8 (C-3'''), 74.1 (C-4'''), 71.0 (C-5'''), 18.1 (C-6'''), 57.9 (-OCH<sub>3</sub>'').

**Compound 12 (wilfoside C1N) :** 무정형분말,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ;  $\delta$  1.06 (6H, d,  $J = 7.0$  Hz, 5', 6'-CH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.22, 1.23, 1.24, 1.26 (each 3H, d,  $J = 6.3$  Hz, 6-CH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 1.40 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 2.12 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, 7'-CH<sub>3</sub>), 2.17 (3H, s, 3-CH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 4.57 (1H, dd,  $J = 9.2, 6.4$  Hz,

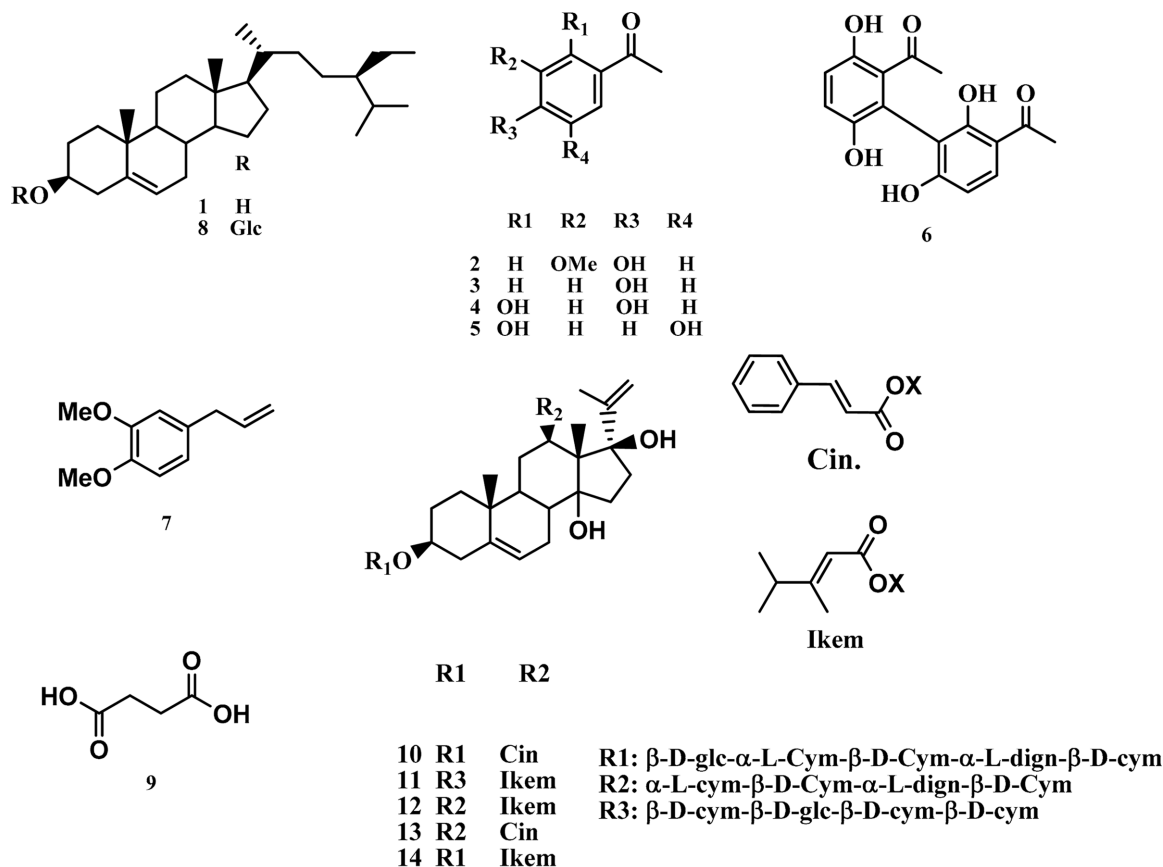
12-CH), 4.77 (1H, dd,  $J = 10.2$  Hz, anomeric H), 4.79 (1H, dd,  $J = 3.1$  Hz, anomeric H), 4.83 (1H, dd,  $J = 9.6, 2$  Hz, anomeric H), 4.98 (1H, dd,  $J = 3.4, 1$  Hz, anomeric H), 5.37 (1H, br s, 6-CH), 5.52 (1H, br, s, 2'-CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ;  $\delta$  39.2 (C-1), 29.8 (C-2), 77.6 (C-3), 38.9 (C-4), 139.3 (C-5), 119.1 (C-6), 33.8 (C-7), 74.2 (C-8), 44.5 (C-9), 37.3 (C-10), 25.0 (C-11), 72.5 (C-12), 57.9 (C-13), 89.4 (C-14), 34.8 (C-15), 32.9 (C-16), 92.3 (C-17), 10.6 (C-18), 18.4 (C-19), 209.2 (C-20), 27.5 (C-21), 165.8 (C-1'), 114.1 (C-2'), 165.3 (C-3'), 38.1 (C-4'), 20.8 (C-5'), 20.9 (C-6'), 16.4 (C-7'), 96.1 (C-1''), 35.2 (C-2''), 77.4 (C-3''), 82.3 (C-4''), 69.2 (C-5''), 18.7 (C-6''), 57.2 (-OCH<sub>3</sub>''), 100.8 (C-1'''), 32.4 (C-2'''), 73.7 (C-3'''), 74.6 (C-4'''), 67.4 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.3 (-OCH<sub>3</sub>'''), 99.3 (C-1'''), 36.3 (C-2'''), 77.7 (C-3'''), 82.3 (C-4'''), 69.3 (C-5'''), 18.6 (C-6'''), 58.2 (-OCH<sub>3</sub>''). 98.9 (C-1'''), 32.1 (C-2'''), 76.3 (C-3'''), 73.2 (C-4'''), 66.3 (C-5'''), 18.1 (C-6'''), 56.5 (-OCH<sub>3</sub>'').

**Compound 13 (wilfoside K1N) :** 무정형분말,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ;  $\delta$  1.14 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.22, 1.23, 1.24, 1.26 (each 3H, d,  $J = 6.4$  Hz, 6-CH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 1.47, 2.20 (each 3H, s, 19, 21-CH<sub>3</sub>), 2.86 (1H, m, 3-CH<sub>3</sub>), 3.24, 3.30 (each 1H, dd,  $J = 9.5, 2.8$  Hz, 4-CH of cymaropyranose), 3.39, 3.41, 3.43, 3.47 (each 3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>, of sugar moiety), 3.70, 3.77 (each 1H, ddd,  $J = 3, 3, 2.8$  Hz, 3-CH of cymaropyranose), 3.83 (1H, dq,  $J = 8.9, 6.4$  Hz, 5-CH of cymaropyranose), 3.85 (1H, br s, 4-CH of  $\alpha$ -L-diginopyranose), 3.86 (1H, dq,  $J = 8.9, 6.4$  Hz, 5-CH of cymaropyranose), 3.96 (1H, dq,  $J = 6.7, 0.5$  Hz, 5-CH of  $\alpha$ -L-diginopyranose), 4.05 (1H, dq,  $J = 8.9, 6.4$  Hz, 5-CH of cymaropyranose), 4.70 (1H, m, 12-CH<sub>3</sub>), 4.77 (1H, dd,  $J = 10, 2$  Hz, anomeric H), 4.79 (1H, dd,  $J = 3.1$  Hz, anomeric H), 4.84 (1H, dd,  $J = 9.8, 2$  Hz, anomeric H), 4.98 (1H, dd,  $J = 3.4, 1$  Hz, anomeric H), 5.38 (1H, br s, 6-CH), 6.31 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, 3'-CH), 7.39 (3H, m, 6', 7', 8'-CH), 7.52 (2H, m, 5', 9'-CH), 7.62 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, 2'-CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 50 MHz) ;  $\delta$  39.3 (C-1), 29.9 (C-2), 77.7 (C-3), 39.0 (C-4), 139.4 (C-5), 119.4 (C-6), 33.9 (C-7), 74.3 (C-8), 44.6 (C-9), 37.4 (C-10), 25.1 (C-11), 73.6 (C-12), 58.1 (C-13), 89.5 (C-14), 34.8 (C-15), 33.1 (C-16), 92.4 (C-17), 10.7 (C-18), 18.5 (C-19), 209.7 (C-20), 27.7 (C-21), 165.8 (C-1'), 119.2 (C-2'), 144.9 (C-3'), 135.8 (C-4'), 128.6 (C-5'), 129.3 (C-6'), 130.6 (C-7'), 129.3 (C-8'), 128.6 (C-9'), 96.2 (C-1''), 35.4 (C-2''), 77.6 (C-3''), 82.3 (C-4''), 69.3 (C-5''), 18.8 (C-6''), 57.3 (-OCH<sub>3</sub>''), 100.9 (C-1'''), 32.5 (C-2'''),

73.9 (C-3'''), 74.7 (C-4'''), 67.5 (C-5'''), 17.9 (C-6'''), 55.3 (-OCH<sub>3</sub>''), 99.4 (C-1'''), 36.4 (C-2'''), 77.8 (C-3'''), 82.3 (C-4'''), 69.5 (C-5'''), 18.6 (C-6'''), 58.3 (-OCH<sub>3</sub>''). 99.0 (C-1'''), 32.2 (C-2'''), 76.4 (C-3'''), 73.2 (C-4'''), 66.5 (C-5'''), 18.2 (C-6'''), 56.6 (-OCH<sub>3</sub>'').

**Compound 14 (wilfoside C1G)** : 무정형분말, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ; δ 1.06 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, 5', 6'-CH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.22, 1.24, 1.25, 1.26 (each 3H, s, *J* = 6.0 Hz, 6-CH<sub>3</sub> of sugar moiety), 140 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 2.12 (3H, d, *J* = 0.9 Hz, 7'-CH<sub>3</sub>), 2.17 (3H, s, 21-CH<sub>3</sub>), 3.38, 3.41, 3.42, 3.45 (each 3H, s, 3-OCH<sub>3</sub> of sugar moiety), 4.39 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, anomeric H of β-D-glucopyranose), 4.56 (1H, br t, *J* = 7.6 Hz, 12-CH), 4.76 (1H, dd, *J* = 9.8, 2 Hz, anomeric H), 4.80 (1H, dd, *J* = 3.1 Hz, anomeric H), 4.84 (1H, dd, *J* = 9.8, 2 Hz, anomeric H), 4.98 (1H, dd, *J* = 3, 1 Hz, anomeric H), 5.36

(1H, br s, 6-CH), 5.52 (1H, br s, 2'-CH). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ; δ 39.3 (C-1), 29.8 (C-2), 77.7 (C-3), 39.0 (C-4), 139.3 (C-5), 119.1 (C-6), 33.8 (C-7), 74.3 (C-8), 44.6 (C-9), 37.4 (C-10), 25.0 (C-11), 72.5 (C-12), 57.9 (C-13), 89.4 (C-14), 34.8 (C-15), 32.9 (C-16), 92.3 (C-17), 10.6 (C-18), 18.5 (C-19), 209.2 (C-20), 27.5 (C-21), 165.9 (C-1'), 114.1 (C-2'), 165.3 (C-3'), 38.1 (C-4'), 20.8 (C-5'), 20.9 (C-6'), 16.5 (C-7'), 96.1 (C-1''), 35.3 (C-2''), 77.5 (C-3''), 82.3 (C-4''), 69.2 (C-5''), 18.7 (C-6''), 57.2 (-OCH<sub>3</sub>''), 100.9 (C-1'''), 32.4 (C-2'''), 73.9 (C-3'''), 74.6 (C-4'''), 67.5 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.3 (-OCH<sub>3</sub>''), 99.4 (C-1'''), 36.2 (C-2'''), 77.7 (C-3'''), 82.4 (C-4'''), 69.3 (C-5'''), 18.5 (C-6'''), 58.3 (-OCH<sub>3</sub>''), 98.9 (C-1'''), 32.2 (C-2'''), 73.3 (C-3'''), 78.8 (C-4'''), 65.2 (C-5'''), 18.2 (C-6'''), 56.7 (-OCH<sub>3</sub>''), 102.2 (C-1'''), 75.2 (C-2'''), 78.5 (C-3'''), 71.7 (C-4'''), 78.5 (C-5'''), 62.9 (C-6''').



**Fig. 1.** Chemical structures of components isolated from *C. auriculatum*.

**Table 1.** Inhibitory effect of compounds isolated from *C. auriculatum* on Melanogenesis in B16 mouse melanoma cell lines.

Compound No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	arbutin
IC <sub>50</sub> value (μM)	nd	nd	nd	nd	20	70	nd	nd	90	70	nd	nd	nd	nd	300

nd: no detection

## 결과 및 고찰

국내에서 시판중인 이엽우피소의 뿌리로부터 함유성분을 분리하고 분리된 화합물에 대하여 B16 mouse melanoma cell line에서의 멜라닌 생성 억제효과를 측정하였다. 분리된 화합물은 각종 spectral data를 검토하여 화합물의 구조를 추정하고 해당하는 화합물의 spectral data를 문헌에 소개된 것과 대조하고 일부는 표준품과의 co-TLC 등을 통하여 각각  $\beta$ -sitosterol (1),<sup>13)</sup> acetovanillone (2),<sup>14)</sup> p-hydroxyacetophenone (3),<sup>15)</sup> 2,4-dihydroxyacetophenone (4),<sup>16)</sup> 2,5-dihydroxyacetophenone (5),<sup>17)</sup> cynandione A (6),<sup>18)</sup> methyleugenol (7),<sup>19)</sup> daucosterol (8),<sup>20)</sup> Succinic acid (9),<sup>21)</sup> cynauriculoside A (10),<sup>2)</sup> wilfoside C3N (11),<sup>22)</sup> wilfoside C1N (12),<sup>22)</sup> wilfoside K1N (13),<sup>22)</sup> wilfoside C1G (14)<sup>22)</sup>으로 확정하였다. 이 중에서 화합물 2-5는 이엽우피소에서는 처음으로 분리되었다. 분리된 물질에 대한 B16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 억제효과를 table 1에 나타내었다. 14종의 분리된 화합물 중에서 화합물 5, 6, 9, 10 등 4종의 화합물에서 대조물질인 arbutin보다 강한 멜라닌 생성 억제효과를 나타냈다. 그 중에서 2,5-dihydroxyacetophenone (5)이 가장 강한 억제효과를 나타내었으며, 같은 탄소 골격을 가지고 있으면서 화합물 3처럼 benzene ring에 hydroxyl group의 수가 적거나, 화합물 4처럼 두 개의 hydroxyl group이 결합위치를 달리하는 경우에는 멜라닌 생성 억제효과를 나타내지 않았다. 향후 2,5-dihydroxyacetophenone에 대한 멜라닌 생성 억제효과에 대한 작용 메커니즘을 규명할 필요가 있으며, acetophenone 골격에 대한 구조-활성 관계에 대하여 검토할 가치가 있다고 사료된다.

## 결 론

이엽우피소의 지하부 MeOH 엑스로부터 14종의 화합물을 분리하여 각각  $\beta$ -sitosterol (1), acetovanillone (2), p-hydroxyacetophenone (3), 2,4-dihydroxyacetophenone (4), 2,5-dihydroxyacetophenone (5), cynandione A (6), methyleugenol (7), daucosterol (8), succinic acid (9), cynauriculoside A (10), wilfoside C3N (11), wilfoside C1N (12), wilfoside K1N (13), wilfoside C1G (14)으로 확정하였다. 그 중에서 화합물 2-5는 이엽우피소에서는 처음으로 분리되었다. 분리된 화합물의 B16 mouse melanoma cell line에서의 멜라닌 생성 억제효과는 2, 5-dihydroxyacetophenone (5)에서 가장 강했으며 IC<sub>50</sub> value는 20  $\mu$ M이었다.

## 사 사

이 연구는 2009년도 영남대학교 학술연구조성비에 의한 것임.

## 인용문헌

- Zhang. (2006) 上海科學技術出版社, 中約大辭典 : 4594
- Zhang, J. F., Li, Y. B., Li, C. L. and Jiang, J. Q. (2006) Studies on chemical constituents in root tuber of *Cynanchum auriculatum*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**(10): 814-816.
- Song, J., Tao, G., Yang, J. and Ding, X. (2002) Isolation and characterization of steroidal aglycones from *Cynanchum auriculatum*, *J. of Wuxi University of Light Industry* **21**(2): 176-178.
- Wang, Y., Yan, X., Gong, S. and Fu, W. (2002) Two New C-21 Steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum*, *Chinese Chemical letters* **13**(6): 543-546.
- Gu, X. J., Yao, N., Qian, S. H., Li, Y. B. and Li, P. (2009) Four New C21 Steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum auriculatum*, *Helv. Chim. Acta*, **92**: 88-92.
- 徐凌川, 张华, 许昌盛 (2003) 白首乌化学成分与药理现代研究述评, *中医药学刊*, **21**(11): 1893-1895.
- 함인혜, 이주영, 윤예진, 양갑식, 태진, 부영민, 김호철, 최호영 (2007) 국산 및 중국산 白首烏의 Triton WR-1339 유발 高脂血症 흰쥐에 대한 효능 연구, *대한분초학회지* **22**(4): 279-286.
- Min, Y., Xu, F. and Dong, Y. (2004) Advances in research of chemistry and pharmacology of Bai-shou-wu, *Chinese Wild Plant Resources* **23**(2): 8-11.
- 김민자, 송범현, 남상영, 김인재, 이철희, 윤태 (2005) 백수오 (이엽우피소)의 무지주 재배방법에 따른 생육 및 수량, *한국약용작물학회지* **13**(6): 268-272.
- Moon, B. C., Choo, B. K., Cheon, M. S., Yoon, T., Ji, Y., Kim, B. B., Lee, A. Y. and Kim, H. K. (2010) Rapid molecular authentication of three medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *C. auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR, *Plant Biotechnol. Rep.* **4**: 1-7.
- 김호경, 김영아, 이아영, 고병섭 (2003) 백수오와 히수오의 패턴분석 연구, *생약학회지* **34**(4): 278-281.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borrón, J. C. and Hearing, V. J. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis, *EMBO J.* **13**, 5818-5825.
- De. Eknankul, W. and Potduang, B. (2003) Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmaterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* **62**: 389-398.
- Junior, P. (1986) Acetophenonglucoside aus *Penstemon pinifolius*. *Planta Med.* **52**: 218-220.
- Hoque, E. (1984) Spruce die-back: Isolation of p-hydroxyacetophenone from diseased shoots of *Picea abies*. *Phytochemistry* **23**: 923-925.
- Lin, C. N., Huang, P. L., Lu, C. M., Yen, M. H. and Wu, R. R. (1997) Revised structure for five acetophenones from

- Cynanchum taiwanianum*. *Phytochemistry* **4**: 1359-1363.
17. Akamanchi, K. G., Padmawar, P. A., Thatte, U. M., Rege, N. N. and Dahanukar, S. A. (1999) Synthesis and in-vitro evaluation of platelet aggregation inhibitory activity of paeonol and its analogues. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **5**: 323-329.
  18. Lin, Y. L. and Lin, T. C. (1997) Two acetophenone glucosides, cyanonesides A and B, from *Cynanchum taiwanianum* and revision of the structure for cynandione A. *J. Nat. Prod.* **60**: 368-370.
  19. Meepagala, K. M., Sturtz, G. and Wedge, D. E. (2002) Anti-fungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. Var. *dracunculus*. *J. Arg. Food Chem.* **50**: 6989-6992.
  20. Faizi, S., Ali, M., Saleem, R. and Irfanullah Bibi, S. (2001) Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments of stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside and its acetyl derivative. *Magn. Reson. Chem.* **39**: 399-405.
  21. Nord, L. I., Vaag, A. and Duus, J. O. (2004) Quantification of organic and amino acids in beer by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **76**: 47901-4798.
  22. Tsukamoto, S., Hayashi, K. and Mitsuhashi, H. (1985) The structures of six glycosides, wilfoside C1N, C2N, C3N, C1G, C2G and C3G, with novel sugar chain containing a pair of optically isomeric sugars. *Tetrahedron* **41**: 927-934.
- (2010. 11. 5 접수; 2010. 11. 16 심사; 2010. 11. 23 게재확정)