

## Cosmetic Activities of Nyasol from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloide*

Yhun Jung Park · Chang-Sub Ku · Min-Jin Kim · Mi Kyeong Lee · Ki Ohk Kim · Hyung Won Ryu · Hyuk-Hwan Song · Doo Young Kim · Sei-Ryang Oh\*

### 지모의 뿌리줄기로부터 분리된 nyasol의 미용효과

박윤정 · 구창섭 · 김민진 · 이미경 · 김기욱 · 류형원 · 송혁환 · 김두영 · 오세량\*

Received: 11 August 2014 / Accepted: 2 October 2014 / Published Online: 31 March 2015

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

**Abstract** The rhizomes of *Anemarrhena asphodeloide* was extracted with 100% ethanol and concentrated subfractions were separated with medium pressure liquid chromatography-based activity profiling. One compound was isolated from the subfraction 10 through the repeated preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC). According to physico-chemical and spectroscopic data including NMR and MS, the chemical structures of the compound was determined as nyasol (**1**). Nyasol was exhibited potent inhibitory activity for NO (IC<sub>50</sub>: 12.5 µg/mL), tyrosinase (IC<sub>50</sub>: 12.5 µg/mL), melanin contents (IC<sub>50</sub>: 12.5 µg/mL), thymus and activation-regulated chemokine (TARC) production (IC<sub>50</sub>: 6.25 µg/mL). As a result, nyasol has an excellent inflammation-dependent anti-whitening and TARC production activity. It could be used to a large range of functional cosmetics.

**Keywords** *Anemarrhena asphodeloide* · anti-atopy · anti-whitening · nitric oxide · nyasol

### 서 론

지모(*Anemarrhena asphodeloide*)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 초본으로써 근경을 약재로 사용하며 한방에서는 해열, 당뇨, 소염, 진해, 거담 등의 목적으로 사용되고 있다. 보고된 약리학적 작용으로는 해열작용, 강심작용, 이뇨작용, 항균작용, 거담작용, 진정작용, 혈당강하작용, 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 1999; Son 등, 1999). 지모의 주요 성분으로는 steroid saponin계열인 timosaponin A-I, A-III, B-II, anemarsaponin B, F-gitonin, smilageninoside, degalactotigonin 등(Kawasaki 등, 1963; Kawasaki와 Yamauchi, 1963; Niwa 등, 1988; Nahumo 등, 1991)과 xanthone 계열의 polyphenol 화합물들인 mangiferin, isomangiferin, neomangiferin 등이 보고되어 있다(Morita 등, 1965; Sun 등, 1992). 특히 timosaponin A-III는 혈당강하작용과 항암 활성(Nakashima 등, 1993; Kimura 등 1996), anemarsaponin B는 in vitro에서 PAF-induced rabbit platelet aggregation을 억제하는 효과가 있다고 보고 되어있다(Dong과 Han, 1991).

의학기술이 발전되고 현대 사회의 생활 수준이 향상됨에 따라 평균 수명이 증가하는 고령화 사회로 접어들면서 다양한 질병과 질환들에 대해 천연물 소재들을 활용한 연구가 증가하고 있다(Azuma 등, 1999; Park 등, 2003a; Cho, 2007). 천연물 성분들의 약리적 기능이 과학적으로 입증되고, 기능성 화장품의 수요 증가 및 시장 규모가 확대됨에 따라 천연 기능성 화장품의 개발은 활발히 진행되어가고 있다(Cho, 2011; Cho 등, 2011).

Y. J. Park · K. O. Kim · H. W. Ryu · H.-H. Song · D. Y. Kim · S.-R. Oh  
Natural Medicine Research Center, KRIBB, Cheongju 363-883, Republic of Korea

C.-S. Ku · M.-J. Kim  
Organic and Natural Product Research Center, Cotde Inc., Jeju Technopark, 4-8 Ara-1 dong, Jeju-City, Republic of Korea

Y. J. Park · M. K. Lee  
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

\*Corresponding author (S.-R. Oh: seiryang@kribb.re.kr)

Y. J. Park and C.-S. Ku contributed equally.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

화장품의 기능성 연구는 주로 미백효과에 집중되어 있다. 피부에 활성산소가 과량 존재하면 체내의 항산화 물질이 고갈되면서 멜라닌 생성 반응이 증가되고 이는 각질형성세포를 활성화하여 cytokine 분비를 촉진하게 되어 멜라닌 세포의 증식과 합성을 증가시켜 피부의 색소침착, 기미 형성이 증가된다(Yamakoshi 등, 2003). 멜라닌 생성은 기저층에 존재하는 색소 세포(melanocyte) 내의 melanosome에 의해 생합성 된다. 멜라닌의 주요 기작은 주요 효소인 tyrosinase에 의해 산화되어 dihydroxyphenyl-alanine (DOPA), DOPA quinone이 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone로 자동산화되어 최종 반응으로 멜라닌 중합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase활성 억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다(Prota, 1980; Pavel과 Muskite, 1983; Hearing과 Jimenez, 1987; Ko, 2000).

최근 아토피 피부염 동물 모형에서 thymus and activation-regulated chemokine (TARC)와 macrophage-derived chemokine (MDC)의 피부 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Vestergaard 등, 2000). Chemokine은 다양한 종류의 백혈구의 이동과 활성화를 조절하는 cytokine으로 조직으로의 염증세포의 침윤을 조절한다(Yoshie 등, 2001). Th2 세포는 chemokine receptor-4 (CCR4)를 발현하며, CCR4는 TARC, MDC의 수용체이며 Th2 세포의 migration을 선택적으로 조절한다(Rha, 2005).

본 연구에서는 지모 추출물에서 medium pressure liquid chromatography (MPLC)와 연계한 활성유도 분획법(bioactivity-guided fractionation)을 이용하여 항염 효과를 가지는 물질이 있음을 확인하였고 해당 활성 단일화합물을 분리하고 항염증, 피부 미백, 항아토피 효과 등의 약리적 미용 활성을 탐색하여 천연 기능성화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**실험 재료.** 본 실험에 사용한 지모(*A. asphodeloide*)의 뿌리줄기는 2013년 제주도에서 구매한 것으로, (주) 콧데(<http://www.cotde.co.kr/>)에서 제공받아 사용하였다.

**시약 및 기기.** 실험에 사용한 세포주인 RAW264.7 cell, B16F10 cell, HaCaT cell은 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였으며 세포배양을 위해 1% antibiotic, 10% fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Gibco (USA)에서 구입하였다. 세포 독성과 활성 평가를 위해 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, USA)를 사용하였고, Lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), tyrosinase, arbutin, kojic acid, xanthine, xanthine oxidase는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. TARC, MDC의 양은 human ELISA kit와 recombinant human IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (R&D Systems, USA)를 사용하여 SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)로 측정하였다. MPLC Puriflash 450(Interchim, France)과 high performance liquid chromatography (HPLC)급 methanol (MeOH) 용매(Honeywell, USA)를 사용하여 활성물질을 분리하였고, 분리한 활성물질의 분석과 구

조분석은 Ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS, Waters, USA), Bruker AM400 ( $^1\text{H-NMR}$  at 400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  at 100MHz, Billerica, USA), acetonitrile (ACN) 용매(Honeywell, USA), methanol- $d_4$  (Cambridge Isotope Laboratories, USA)를 사용하였다.

**지모 추출물 조제 및 활성물질 분리.** 음건한 지모 뿌리줄기 15 g을 잘게 분쇄하여 100% ethanol (EtOH, 1 L $\times$ 3)을 가하여 실온에서 24시간 3회 반복 추출한 후 여과하였다. 얻어진 여액을 감압 농축하여 EtOH 추출물(6.8 g, 추출 수율 45.3%)을 얻었다. 얻은 추출물 6.8 g을 MPLC 기기에 5 $\times$ 25 cm에 Zeoprep C<sub>18</sub>, 45–60 mm를 충전한 칼럼관과 UV 검출기(254, 275 nm)를 사용하여 총 12개의 분획물(Fr. 1-12)을 얻었다. 각 분획물에 대하여 MPLC와 연계하여 활성유도 분획법(bioactivity-guided fractionation)을 통하여 생리활성물질을 분리하고자 하였다. 활성 분획물을 농축하여 Forte (YMC, Japan)에 C<sub>18</sub> column (YMC ODS AQ, 250 $\times$ 20 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Japan)를 사용하여 증류수(A), MeOH (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0–5 min 50% (B), 5–35 min 100% (B), 35–40 min 100% (B) 조건으로 column chromatography를 실시 하여 유효화합물 1종을 분리하였다. 분리한 nyasol은 UPLC 분석에서 추출물 중 nyasol의 area는 약 9.3%, retention time은 6.87분, UV 257 nm, high resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS) 값은 251.1088 [M-H]<sup>-</sup>를 가졌다.

**화합물 1 ((-)-Nyasol)** 황색 오일,  $[\alpha]_{20}^D = -130^\circ$  (c 0.50, MeOH), HRESIMS  $m/z = 251.1088$  [M-H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>, 251.1072),  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 257 nm.  $^1\text{H-NMR}$  (methanol- $d_4$ )  $\delta$  4.42 (1H, dd,  $J = 6.0, 9.2$  Hz, 3-CH), 5.08 (1H, m, 5-CH), 5.63 (1H, dd,  $J = 10.4, 11.6$  Hz, 2-CH), 5.97 (1H, ddd,  $J = 6.4, 10.4, 16.8$  Hz, 4-CH), 6.42 (1H, d,  $J = 11.6$  Hz, 1-CH), 6.70 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 3''-CH<sub>2</sub>), 6.70 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 5''-CH<sub>2</sub>), 6.74 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 3'-CH<sub>2</sub>), 6.74 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 5'-CH<sub>2</sub>), 7.00 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 2''-CH<sub>2</sub>), 7.00 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 6''-CH<sub>2</sub>), 7.10 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 2'-CH<sub>2</sub>), 7.10 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, 6'-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C-NMR}$  (methanol- $d_4$ )  $\delta$  127.5 (C-1), 130.6 (C-2), 46.5 (C-3), 141.3 (C-4), 114.3 (C-5), 128.2 (C-1'), 129.7 (C-2'), 115.2 (C-3'), 156.5 (C-4'), 115.2 (C-5'), 129.7 (C-6'), 133.2 (C-1''), 128.3 (C-2''), 115.4 (C-3''), 155.8 (C-4''), 115.4 (C-5''), 128.3 (C-6'') (Fig. 4A).

**지모 에탄올 추출물의 UPLC-QTOF MS 분석.** 지모 100% 에탄올 추출물의 활성 지표물질의 정성분석을 위해 UPLC-QTOF-MS 분석은 BEH C<sub>18</sub> (2.1 $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 칼럼관과 PDA 검출기를 장착한 UPLC에 유속 0.4 mL/min, 용매는 0.1% formic acid가 포함된 증류수(A)와 ACN (B)을 사용하여 수행하였다. UPLC 이동상의 용매조성은 0–1 min 10% B, 1–12 min 98% B, 12–13.4 min 98% B, 13.4–13.5 min 10% B, 13.5–15 min 10% B 조건을 이용하였다.

**DPPH radical 소거능 측정.** 지모 추출물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 사용하여 radical 소거능을 측정하였다(Blois, 1958). DPPH radical에 대한 각 샘플의 환원력을 측정하기 위해 MeOH에 각 샘플을 녹여 농도별로 희석한 희석액 800  $\mu\text{L}$ 와 MeOH에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 200  $\mu\text{L}$ 를 가하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광

도를 측정하였다. 이때 활성을 비교하기 위하여 positive control로 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \{1 - (\text{샘플첨가군의 흡광도} / \text{샘플무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

**Xanthine oxidase 저해 활성 측정.** Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte (1969)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 샘플용액 0.1 mL과 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL에 2 mM xanthine을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하고 마지막으로 동일한 buffer에 녹인 xanthine oxidase (0.2 U/mL) 0.1 mL를 가하여 37°C 에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 측정하였다. 저해 활성은 샘플용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도의 감소율로 다음 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \{1 - (\text{샘플첨가군의 흡광도} / \text{샘플무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

**세포 배양.** 마우스 대식세포인 RAW264.7 cell, 마우스 멜라노마 세포인 B16F10 cell, 사람 각질형 세포인 HaCaT cell을 각각 1% antibiotic과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

**세포 독성 측정.** RAW264.7 cell을 1.8×10<sup>5</sup> cell/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 18시간 배양 후 샘플과 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 세포 독성을 평가하고자, lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay kit를 이용하여 microplate reader 장비를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Jeong 등, 2010). 각 샘플 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 측정하였다.

**Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정.** RAW264.7 cell로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였다 (Green 등, 1982). RAW264.7 cell을 1.8×10<sup>5</sup> cell/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 18시간 배양 후 샘플과 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 동량의 Griess 시약을 첨가하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**세포 독성 측정.** B16F10 cell을 2.0×10<sup>4</sup> cells/mL로 96 well plate에 분주하고 18시간 배양 후 샘플을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액 50 µL를 첨가하여 4시간 동안 반응 시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 DMSO 200 µL를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후, microplate reader를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 각 샘플 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포생장률을 측정하였다.

**Melanin 생합성 저해 활성 측정.** B16F10 cell을 DMEM 배지를 이용하여 2.0×10<sup>4</sup> cells/mL로 24 well plate에 분주하고 α-MSH (100 nM)로 활성화 시킨 후 24시간 배양 후 샘플을 농도별로 조절하여 첨가한 후 48시간 후에 0.1 M potassium

phosphate buffer (pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 melanin에 1N NaOH를 가하여 80°C에서 1시간 반응시킨 후 분광광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Jeon 등, 2012). Melanin 생합성 저해는 샘플 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었으며, positive control로 arbutin (30.0 µg/mL)과 kojic acid (10.0 µg/mL)를 사용하였다.

**Tyrosinase 저해 활성 측정.** Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등 (1986)의 방법에 따라 측정하였다. B16F10 cells를 배양하여 24 well plate에 각 well 당 세포를 2.0×10<sup>4</sup> cell/well가 되도록 분주하고 시료를 농도별로 조절한 후 처리하여 48시간 배양하였다. 이후 각 well을 PBS로 2회 세척한 다음 1% triton-x100 용액을 넣어 용해하고 eppendorf tube (1.5 mL, Sigma-Aldrich, USA)와 얼음을 사용해 3회 정도 냉동 해동을 반복하여 4°C, 15,000 rpm/15분 원심 분리한 상등액을 tyrosinase 저해 활성 측정용액으로 사용하였다. 96 well plate에 이 효소액을 40 µL 넣고 기질인 L-DOPA (10 mM) 100 µL, PBS 60 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응 시킨 뒤 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 arbutin (30.0 µg/mL)과 kojic acid (10.0 µg/mL)를 사용하였다. Tyrosinase 저해 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

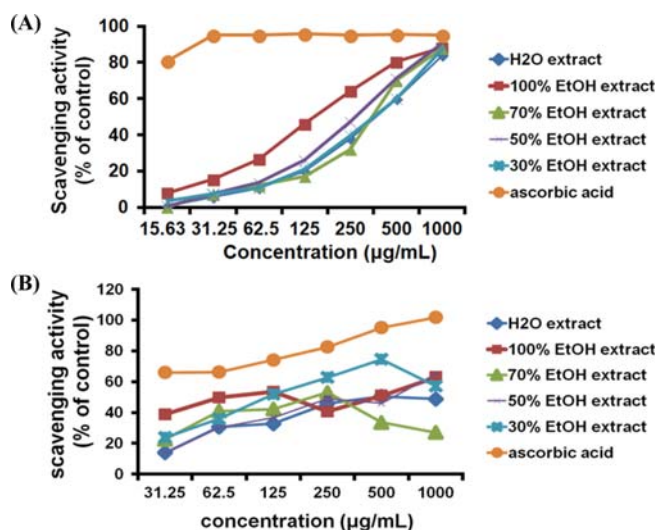
**세포 독성 측정.** 항 아토피 효능 평가를 위해 HaCaT cell을 각각 3.0×10<sup>5</sup>, 2.0×10<sup>5</sup> cells/mL로 96 well plate에 분주하고 18시간 배양 후 샘플을 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액 50 µL를 첨가하여 4시간 동안 반응 시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 DMSO 200 µL를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후, microplate reader를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 각 샘플 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군에 흡광도 값과 비교하여 세포생장률을 평가하였다.

**염증성 chemokines 억제 활성 측정.** HaCaT cell을 3.0×10<sup>5</sup> cells/mL로 24 well plate에 분주하고 18시간 배양 후, IFN-γ (10 ng/mL), TNF-α (10 ng/mL)과 분리된 화합물을 농도별로 넣은 후 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양 배지를 원심 분리하여 얻어진 상층액의 chemokines 합성량을 측정하였다. 모든 샘플은 정량 전까지 냉동보관 하였다. 염증성 chemokines는 human ELISA kit를 이용하여 측정하였다 (Kang 등, 2013).

**결과 및 고찰**

**DPPH radical 소거능 측정.** 지모 뿌리줄기의 에탄올 농도별 추출물(30, 50, 70, 100%)과 물 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1A와 같다. 각 추출물을 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL의 농도로 처리했을 때 모두 농도 의존적으로 DPPH radical이 소거 되었으며, 100% 에탄올 추출물이 가장 높은 소거능을 나타내며, IC<sub>50</sub> 150.0 µg/mL를 가졌다. 기존 보고된 식물 추출물들 중 삼백초 (*Saururus chinensis* Bail)와 돌콩 (*Glycine soya*)의 항산화 활성 (Lee 등, 2006)과 비교에서 삼백초와 돌콩의 100% 에탄올 추출물은 IC<sub>50</sub> 값이 각각 446.74, 952.05 µg/mL의 수준으로 지모 에탄올 추출물은 항산화력이 매우 우수하였다.

**Xanthine oxidase 저해 활성 측정.** 지모 에탄올 농도별 추출물과 물 추출물의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1B와 같다. 각 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 DPPH radical 소거능에



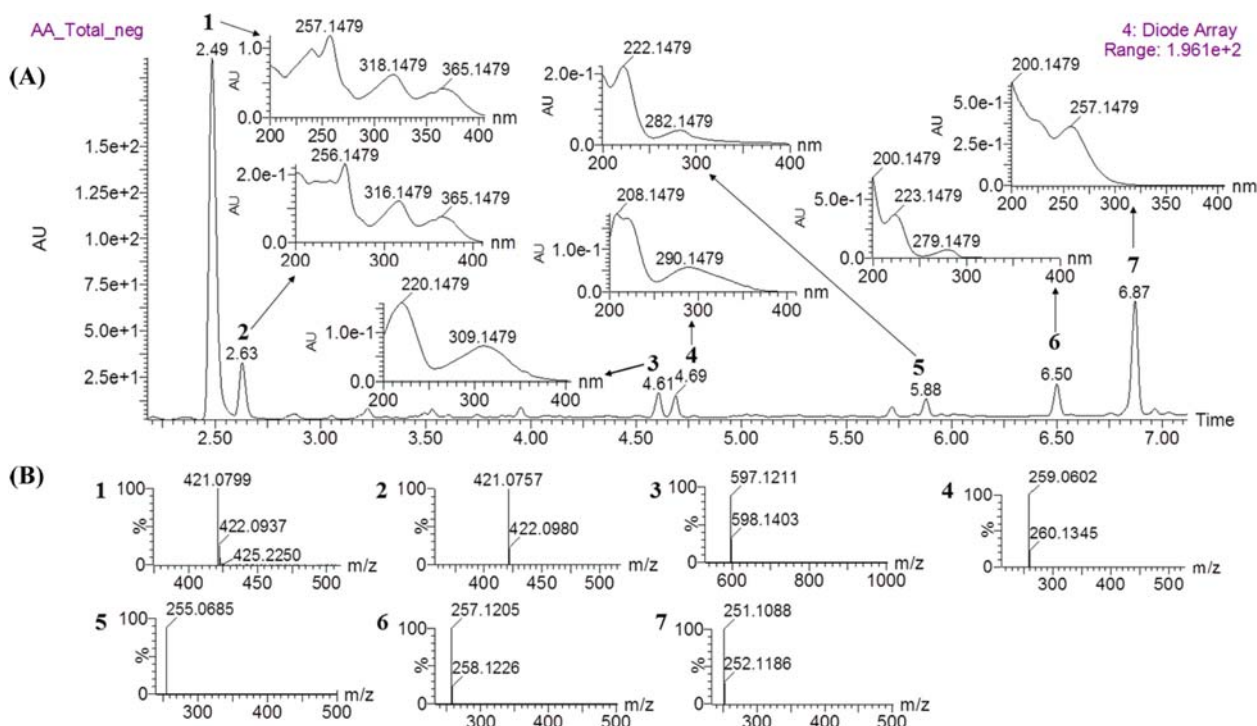
**Fig. 1** Antioxidant activity change of 0–100% ethanol extracts from *Anemarrhena asphodeloide* evaluated by using two in vitro antioxidant models. (A) 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. (B) Xanthine oxidase inhibition activity. Ascorbic acid was used as positive control.

비해 농도 의존적이지 않고 뚜렷한 활성 차이가 나타나진 않지만 최저 농도인 31.25 µg/mL에서도 40% 수준의 저해활성을 나타내었다. 이는 기능성 화장품의 원료로 사용 가능하다고 알려진 상백피(*Morus alba* L.)의 에탄올 추출물이 500 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 반면(Jee, 2009), 지모 에탄올 추출물은 약 3

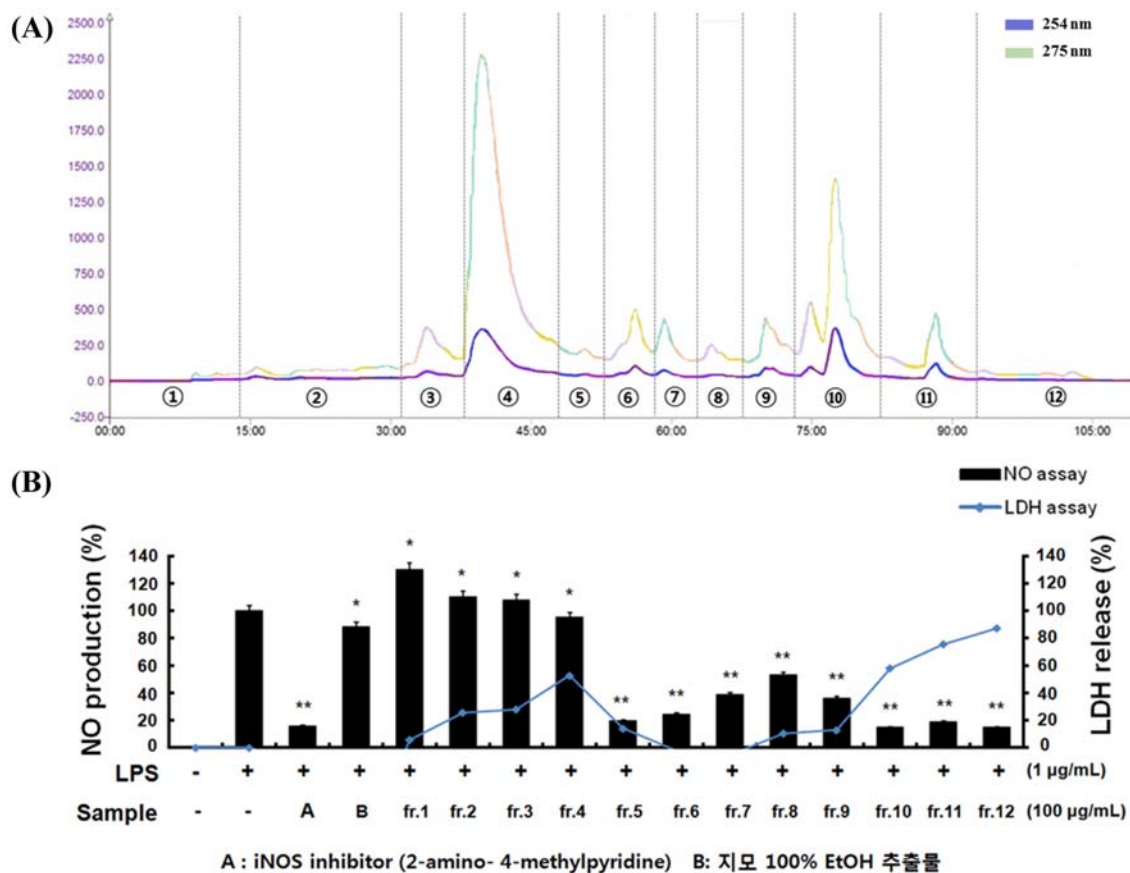
배의 125-250 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 가지므로 지모 에탄올 추출물이 상백피 에탄올 추출물에 비해 다소 높은 xanthine oxidase 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

**지모 에탄올 추출물의 UPLC-QTOF-MS 분석.** 지모 100% 에탄올 추출물의 활성 지표물질의 정성분석을 위한 UPLC-QTOF-MS 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 추출물의 chromatogram에서 각각의 피크들의 HRESIMS 값을 확인한 결과 피크 1과 2는 각각 421.0799 [M-H]<sup>-</sup>, 421.0757 [M-H]<sup>-</sup>로 확인되었으며 피크 3, 4, 5, 6, 7의 [M-H]<sup>-</sup>는 각각 597.1211, 259.0602, 255.0685, 257.1205, 251.1088로 확인하였다. 기존의 지모로부터 분리 보고된 물질들과 mass값과 chromatogram에서 retention time을 비교하여 피크 1과 2는 이성질체인 mangiferin (1)과 isomangiferin (2)로 확인하였으며(Kang 등, 2010; Joubert 등, 2003), 나머지 피크들도 기존의 지모로부터 분리된 화합물의 분자량과 비교한 결과 norathyriol glycoside glucuronide (3), 2,4,6-trihydroxy-4-methoxybenzophenone (4), isoliquiritigenin (5), broussonin A (6), niasol (7)로 추정할 수 있었다(Bae, 2008; Youn 등, 2009; Liu 등, 2012).

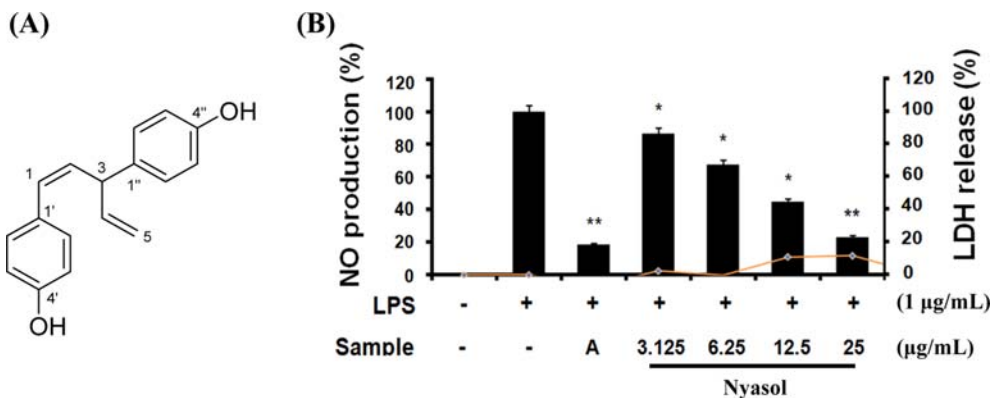
**MPLC 기반 NO 분획물 활성 검증.** 지모 100% 에탄올 추출물의 세포 독성 측정 결과 세포독성이 나타나지 않아 이를 바탕으로 이전에 HPLC를 기반으로 하는 분획물의 활성이 검증되었던 프로토콜을 참고(Rueda 등, 2014) 하여, RAW264.7 cell을 LPS로 활성화시킨 후 지모 분획물이 NO의 생성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 1–12번 분획물(100 µg/mL)에 LPS (1 µg/mL)를 처리한 다음 24시간 배양 후 NO 생성량을 측정하였다. 지모 분획물(1–12번)의 NO 활성 검증 결과 1–4번 분획물은 NO의 양을 억제하지 못하는 반면, 5–12번 분획물은 NO



**Fig. 2** UPLC-PDA chromatogram (A) and mass spectra (B) of 100% EtOH extracts of *Anemarrhena asphodeloide*. Peaks: mangiferin (1), isomangiferin (2), norathyriol glycoside glucuronide (3), 2,4,6-trihydroxy-4-methoxybenzophenone (4), isoliquiritigenin (5), broussonin A (6), niasol (7).



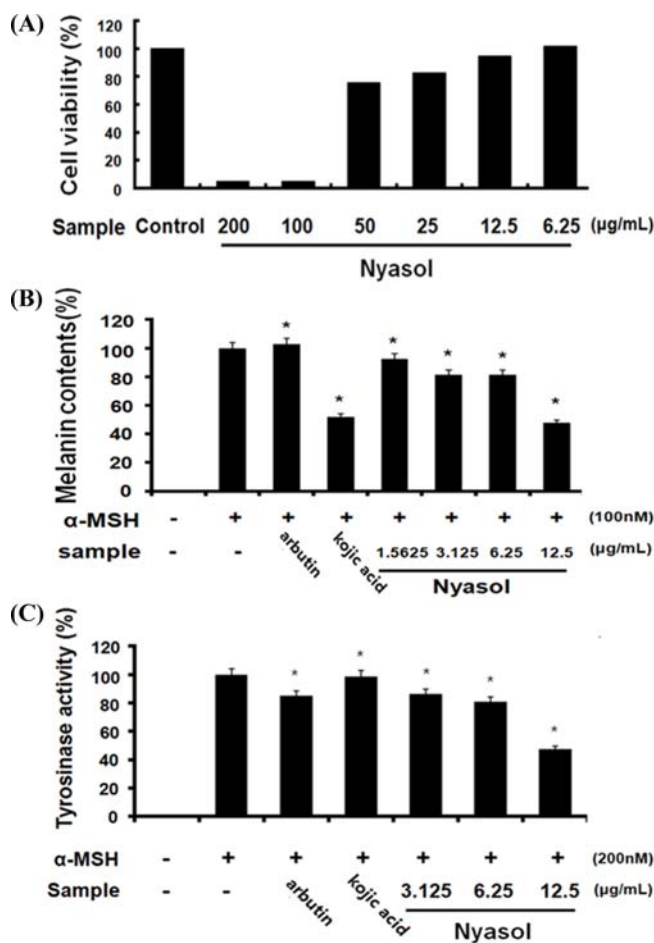
**Fig. 3** MPLC-based inhibitory activity profiling of a fractions 1–12 from *Anemarrhena asphodeloide* (A), for LDH release assay and NO production (B) in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. (A) MPLC chromatogram (275 nm) of a semipreparative separation of 6.8 g of extract. The 12 time-based fractions of main peak each are indicated with dashed lines. (B) RAW264.7 cells were treated with various concentrations of fractions 1–12 (100 µg/mL) for 24 h, and the relative cell viability was assessed by LDH assay. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of fractions 1–12 (100 µg/mL) for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The culture supernatant was subjected to a nitrite assay. Results expressed as the mean ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$  compared with treatment with LPS.



**Fig. 4** (A) The structure of nyasol from *A. asphodeloides*. (B) Effect of nyasol on cell viability and NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of nyasol (3.125, 6.25, 12.5, and 25 µg/mL) for 24 h, and the relative cell viability was assessed by LDH release assay. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of nyasol (3.125, 6.25, 12.5, and 25 µg/mL) for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The culture supernatant was subjected to a nitrite assay. Results expressed as the mean ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$  compared with treatment with LPS.

생성량을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3). 특히 10번 분획물은 가장 강한 활성을 나타냈지만 cell viability 측정 결과 세포독성

이 나타났다. 그러나 MPLC 크로마토그램 결과 10번 분획물에 포함된 메인 화합물 농도가 매우 높아 독성이 나타난 것으로

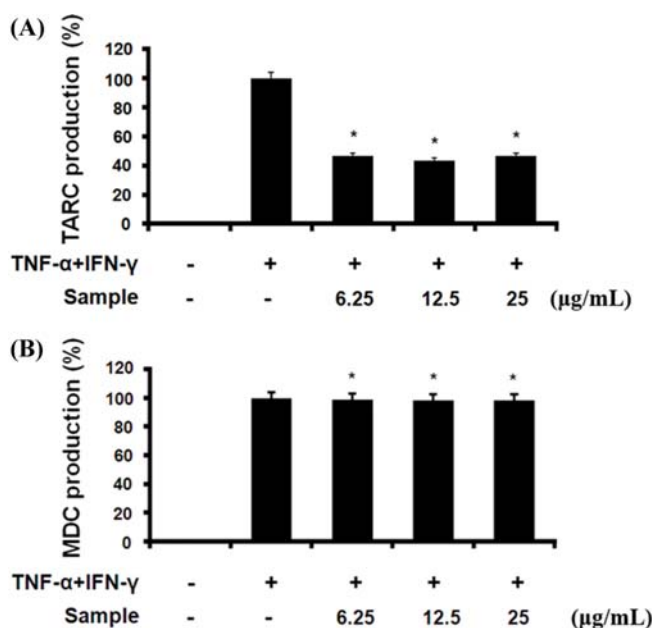


**Fig. 5** (A) Effect of nyasol on the growth of B16F10 melanoma cells. Cytotoxicity was measured by MTT assay of nyasol and control (DMSO) treated B16F10 melanoma cells after 24 h at the indicated concentrations. (B) Effect of nyasol on melanogenesis in B16F10 cells cultured with 3.125, 6.25, 12.5 µg/mL nyasol for 2 days. Changes of melanin contents that were pretreated with  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and then cultured with nyasol (3.125, 6.25, 12.5 µg/mL) for 48 h (\* $p$ <0.01 when compared to an untreated control). Arbutin (30.0 µg/mL), kojic acid (10.0 µg/mL) were used as positive control. (C) Cellular tyrosinase activity was determined using B16F10 cell lysates and nyasol (3.125, 6.25, 12.5 µg/mL). B16F10 cells were treated with nyasol (3.125, 6.25, 12.5 µg/mL) or arbutin and kojic acid (positive control) for 72 h. Results expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$ <0.005 compared to the control (no treatment). Arbutin (30.0 µg/mL), kojic acid (10.0 µg/mL) were used as positive control.

생각되어 메인 화합물을 순수 분리한 후 독성이 없는 농도를 확인 후 NO 생성량을 측정하여 활성 화합물에 대한 활성실험을 하였다.

**Niyasol 분리 및 구조 분석.** 10번 분획물을 농축하여 Forte로  $C_{18}$  column (YMC ODS AQ)에 로딩 후 증류수와 MeOH의 혼합 용매를 이동상으로 하여 MeOH 농도를 점차적으로 증가시키면서(50→100%, 40 min) column chromatography를 실시하였다. 1회 주입량을 200 µL로 하여 6회 반복 실험을 통해 1종의 활성 단일물질 23.6 mg을 분리하였다.

분리된 물질은 황색 오일로 광학회전은  $[\alpha]_{20}^D = -130^\circ$  (c 0.50,



**Fig. 6** Effect of nyasol on TARC (A) MDC expression levels (B) in TNF-alpha plus IFN-gamma induced HaCaT cells. Cells were pretreated with nyasol (6.25, 12.5, 25 µg/mL) for 1 h prior to TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)+IFN- $\gamma$  (10 ng/mL). Results expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$ <0.005 compared with co-treatment with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ .

MeOH)을 가지고 HRESIMS에서 분자이온 [M-H]<sup>-</sup>의 피크가  $m/z = 251.1088$ , 분자식은  $C_{17}H_{16}O_2$ ,  $\lambda_{max}$  (MeOH) 257 nm의 흡광도를 나타내어 각각의 분광학적인 자료를 종합하면 이 화합물은 norlignan계열 화합물로 예상할 수 있었다. 정확한 구조 확인을 위하여 NMR를 이용하여 구조분석을 실시하여 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서는 17개의 carbon peak가 관찰되었으며, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 전형적인 AABB 시스템[7.10 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.00 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.74 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.70 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz)]을 가지는 para 위치에 두 개의 hydroxyl기가 치환된 benzene링을 나타내었다. 상기 데이터를 종합한 결과 분리된 화합물은 (-)-nyasol임을 확인하였다(Bae, 2008).

**Niyasol의 NO 활성 평가.** RAW264.7 cell을 LPS로 활성화시킨 후 nyasol이 NO의 생성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 nyasol을 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도로 처리한 다음 24시간 배양 후 NO 생성량을 측정하였다. 측정 결과 nyasol은 LPS로 유도된 NO의 양을 유의성 있게 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 4B). Niyasol이 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이 nyasol의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여, nyasol을 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도로 처리하고 LDH assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다(Fig. 4B). 측정 결과 nyasol은 12.5 µg/mL의 농도에서 낮은 세포 독성을 나타냈지만 IC<sub>50</sub>이 12.5 µg/mL (=40 µM) 수준으로 우수한 활성을 나타내었고, 이는 기존 연구에서 독성이 낮고 활성이 높은 결과와도 일치하였다(Lee 등, 2014).

**세포 독성 측정.** 샘플이 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT 분석을 수행 하였다. 대사가 왕성한 살아있는 세포는, 세포 내 mitochondria의 탈 수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색인 MTT tetrazoliumdm을 환원시켜 자주색을 띠

는 비수용성 formazan을 형성 한다. 실험 결과 nyasol은 100  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서는 독성을 나타내지만 25  $\mu\text{g/mL}$  이하에서는 독성이 낮게 관찰되었다. 특히 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 control 수준으로 독성이 없는 것을 알 수 있다(Fig. 5A).

**Melanin 생합성 저해 활성 측정.** B16F10 cells을  $\alpha$ -MSH로 활성화 시킨 후 melanocyte에 nyasol을 처리함으로써 melanin 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. B16F10 cells에 nyasol을 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 후 세포 내 melanin 양을 측정한 결과 농도 의존적으로 유의하게 melanin 생합성 저해하는 효과를 나타내었다(Fig. 5B). 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$  값을 나타낸 nyasol은 미백소재로 알려진 kojic acid와 동등한 저해 활성을 나타내었다(Park 등, 2003b).

**Tyrosinase 저해 활성 측정.** Nyasol의 B16F10 cells 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 5C와 같다. Nyasol을 3.125, 6.25, 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 했을 때 농도 의존적으로 유의하게 세포내 주요 효소인 tyrosinase 활성을 저해하는 것을 확인 할 수 있었다. Positive control로 Arbutin (30.0  $\mu\text{g/mL}$ )과 kojic acid (10.0  $\mu\text{g/mL}$ )를 사용하였다. Nyasol은  $\text{IC}_{50}$  값이 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 미백소재로 알려진 arbutin 보다 우수한 저해 활성을 나타내었다(Jeong, 2012).

**염증성 chemokines 억제 활성 측정.** Nyasol의 HaCaT cell 내의 TARC와 MDC 억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 처리 하지 않은 대조군에 비해,  $\text{IFN-}\gamma$ 와  $\text{TNF-}\alpha$ 를 처리한 처리군에서 TARC와 MDC의 양이 유의적으로 증가한 것으로 보아  $\text{IFN-}\gamma$  및  $\text{TNF-}\alpha$  처리가 HaCaT cell의 염증을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. Nyasol을 6.25, 12.5, 25  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각 처리 한 후 TARC, MDC 를 측정한 결과, 비록 농도 의존적인 결과는 아니지만 대조군에 비해 TARC 생성은 50% 억제되었다. 하지만 MDC 생성은 억제되지 않았다. 이를 통해 nyasol이 염증 관련 chemokine인 TARC 생성을 억제시킴으로써 기능성식품 혹은 화장품으로서의 응용이 가능하리라 사료된다.

## 초 록

지모 뿌리를 100% EtOH로 추출, 농축하여 medium pressure liquid chromatography 기반의 NO 분획물 활성 검정법을 이용하여 활성을 검정하였다. preparative high performance liquid chromatography를 반복적인 칼럼크로마토그래피를 수행하여 1개의 단일성분을 분리하였다. NMR, MS 등을 포함한 이화학 및 분광학적 자료에 근거하여 분리된 물질을 구조 분석한 결과 (-)-nyasol로 구조동정 하였다. 분리된 활성물질 nyasol은 NO 생성 억제, melanin과 tyrosinase를 억제하는 미백효과, thymus and activation-regulated chemokine 생성을 억제하는 활성에서 6.25–12.5  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$  값을 가지는 강한 저해 활성을 나타냈다. 특히 nyasol은 염증에 의한 항아토피 및 항미백활성에 있어 뛰어난 효능을 나타내었다. 이 결과로 보아 nyasol은 천연 기능성 화장품으로써 이용 가능성을 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

**Keywords** 미백 · 지모 · 항산화 · 항아토피 · 항염증 · nyasol

**감사의 글** 본 논문은 산업통상자원부의 2012년 제주권 광역경제권 선도산업의 지원을 받아 수행된 것임(과제번호 R0001465).

## References

- Azuma K, Nakayama M, Koshika M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K et al. (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* **47**, 3963–6.
- Bae GR (2008) Identification of phenolic constituents as the active principles from *Anemarrhena asphodeloides* against Respiratory Syncytial Virus (RSV). MS Thesis, Ewha Womans University, Korea.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **25**, 1199–200.
- Cho YJ (2011) Characteristics of cosmetic with whitening compounds from *Phellodendron amurense*. *J Appl Biol Chem* **54**, 108–13.
- Cho YJ, An BJ, and Kim JH (2011) Application of isolated tyrosinase inhibitory compounds from Persimmon leaves. *Korean J Life Sci* **21**, 976–84.
- Cho WG (2007) Comparison of drug delivery using hairless and pig skin. *J Korean Oil Chem Soc* **24**, 410–5.
- Dong JX and Han GY (1991) A new active steroidal saponin from *Anemarrhena asphodeloides*. *Planta Med* **57**, 460–2.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, and Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* **126**, 131–8.
- Hearing VJ and Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* **19**, 1141–6.
- Lee SO (2009) Antioxidant activities and whitening effect of the Mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J Plant Res* **22**, 145–51.
- Jeon MJ, Kim MY, Jang HJ, Lee SW, Kim JH, Kim HS et al. (2012) Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. *Journal of Life Science* **22**, 889–96.
- Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, and Heo HJ (2010) Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a culinary herb) *Korean J Food Preserv* **17**, 720–6.
- Jeong YJ (2012) Kinetic analysis on tyrosinase inhibition activity of whitening agents, MS Thesis, Soongsil University, Korea.
- Joubert E, Otto F, Gruener S, and Weinreich B (2003) Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in *Cyclopia* and the effect of harvesting date on the phenolic composition of *C. genistoides*. *Eur Food Res Technol* **216**, 270–3.
- Kang MK, Jung IH, Hur JH, Kim SH, Lee JH, Kang JY et al. (2010) The analgesic and anti-inflammatory effect of WIN-34B, a new herbal formula for osteoarthritis composed of *Lonicera japonica* Thunb and *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE in vivo. *J Ethnopharmacol* **131**, 485–96.
- Kang NJ, Kang GJ, Han SC, Hyun EA, Koo DH, Koh YS et al. (2013) *Ceramium boydenii*, a red alga, inhibits MDC/CCL22 production via suppression of STAT1 activation in HaCaT keratinocyte. *Kor J Pharmacogn* **44**, 154–60.
- Kawasaki T and Yamauchi (1963) Saponins of timo (*Anemarrhena rizoma*). II. Structure of timosaponin A-III. *Chem Pharm Bull* **11**, 1221–4.
- Kawasaki T, Yamauchi T, and Itakura N (1963) Saponins of timo (*Anemarrhena rizoma*). I. *Yakugaku Zasshi* **83**, 892–69.
- Kim GS, Park CK, Seong JD, Kim HT, Han SI, and Kwack YH (1999) Isolation and HPLC analysis of timosaponin A from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J Medicinal Crop Sci* **7**, 45–50.
- Kimura M, Kimura F, and Chen J (1996) Combined potentiating effects of Byakko-ka-ninjin-to, its constituents, rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*, timosaponin A III, and calcium on pilocarpine-induced saliva secretion in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* **19**, 926–31.
- Ko JS (2000) In *Dermatology*; Soomoonsa Press, Korea.
- Lee EJ, Chung HJ, Pyee YN, Hong JY, Youn UJ, Seo EK et al. (2014) Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Nyasol and Broussonin A, Two Phenolic Compounds from *Anemarrhena asphodeloides*, through NF- $\kappa$ B Transcriptional Regulation *in vitro* and *in vivo*. *Chem Biodivers* **11**, 749–59.

- Lee JH, Chong MS, and Lee KN (2006) Antioxidative activity of medicinal plants from Korean. *Kor J Oriental Preventive Medical Society* **10**, 1–9.
- Liu H, Wu B, Pan G, He L, Li Z, Fan M et al. (2012) Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional Rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic Rats. *Drug Metab Dispos* **40**, 2109–18.
- Morita N, Shimizu M, and Fukuta M (1965) Studies on the medical resources. XXIV. Chimomin in *Anemarrhena rizoma*. *Yakugaku Zasshi* **85**, 374–5.
- Nahumo S, Kishi SI, Inoue T, and Nagai M (1991) Saponins of *Anemarrhena rizoma*. *Yakugaku Zasshi* **111**, 306–10.
- Nakashima N, Kimura I, and Kimura M (1993) Isolation of pseudoprotimosaponin A III from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Nat Prod* **56**, 345–50.
- Niwa A, Takeda O, Ishimaru M, Nakamoto Y, Yamasaki K, Kohda H et al. (1988) Screening test for platelet aggregation inhibitor in natural products. The active principle of *Anemarrhena rizoma*. *Yakugaku Zasshi* **108**, 555–61.
- Park SJ, Lee HY, and Oh DH (2003a) Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from campbell early grape (*Vitis labruscana* B.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 115–8.
- Park YM, Lee JS, Park JH, and Park DH (2003b) Effects of kojic acid, arbutin and vitamin C on cell viability and melanin synthesis in B16BL6 cell. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **29**, 151–67.
- Pavel S and Muskiet FA (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev* **6**, 311–8.
- Prota G (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* **75**, 122–7.
- Rha YH (2005) Role of chemokines in the pathogenesis of atopic. *Pediatr Allergy Respir Dis* **15**, 238–41.
- Rueda DC, De MM, Hering S, and Hamburger M (2014) HPLC-Based Activity Profiling for GABAA Receptor Modulators in *Adenocarpus Cincinnatus*. *J Nat Prod* **77**, 640–9.
- Son KH, Lee JM, Lee SH, Park JH, Kang SJ, Chang SY et al. (1999) Isolation and quantitative determination of anemarsaponin B from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Kor J Pharmacogn* **30**, 163–7.
- Stirpe F and Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biochem* **244**, 3855–61.
- Sun XH, Kizu H, and Tommory T (1992) Quantitative analysis of timosaponin B-II, timosaponin A-III and mangiferin in *Anemarrhena rizoma* and Kampo prescriptions containing this crude drug. *Shoyakugaku Zasshi* **46**, 19–24.
- Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, and Larsen CC (2000) A Th2 chemokine, TARC produced by keratinocytes may recruit CLA+ CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* **115**, 640–6.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **39**, 5179.
- Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M et al. (2003) Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig Cell Res* **16**, 629–38.
- Yoshie O, Imai T, and Nomiya H (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol* **78**, 57–110.
- Youn UJ, Lee YS, Jeong HN, Lee J, Nam JW, Lee YJ et al. (2009) Identification of Antiadipogenic Constituents of the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *J Nat Prod* **72**, 1895–8.