

## 섬오갈피나무 줄기 유래 테르펜 화합물의 멜라닌 생성 저해 활성

문승리·현주미·조연정·정은영\*·이남호<sup>†</sup>

제주대학교 화학·코스메틱스학과

\*제주한라대학교 뷰티아트과

(2017년 10월 3일 접수, 2017년 10월 23일 수정, 2017년 10월 31일 채택)

### Anti-melanogenesis Activities for the Terpenes from the *Acantophanax koreanum* Stems

Seung Ri Mun, Ju Mi Hyun, Yeon Jeong Jo, Eun Yeong Jung\*, and Nam Ho Lee<sup>†</sup>

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

\*Department of Beauty Arts, Cheju Halla University, Jeju 63092, Korea

(Received October 3, 2017; Revised October 23, 2017; Accepted October 31, 2017)

**요약:** 본 연구에서는 섬오갈피 줄기 추출물 및 용매 분획물의 미백 활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 규명하였다. 섬오갈피 줄기 에탄올 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제활성을 측정된 결과, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 멜라닌 생성 억제 효과가 있음을 확인하였다. 비교적 세포독성이 적은 헥산 분획물에서 유효성분을 찾고자 크로마토그래피를 실시하여 3개의 화합물을 분리하였으며 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 데이터 분석 및 문헌 비교를 통하여 화학구조를 동정하였다; kaurenoic acid (1), 16 $\alpha$ -hydro-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (2), 16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (3). 분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험 결과, 화합물 1-3 모두 농도의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 또한 세포 내 티로시나제 효소의 활성을 감소시킴을 확인하였으며 이러한 연구 결과를 바탕으로 섬오갈피 줄기 추출물은 기능성 미백 화장품 소재로서 활용 가능할 것이라 사료된다.

**Abstract:** *A. koreanum* was investigated to identify the constituents possessing whitening effects. As anti-melanogenesis activities were screened for the ethanol extract and solvent fractions, *n*-hexane (Hex) and ethyl acetate (EtOAc) fractions showed the most potent activities. Three constituents were isolated from the *n*-Hex fraction of *A. koreanum*; kaurenoic acid (1), 16 $\alpha$ -hydro-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (2), 16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (3). The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values. Whitening effects were studied for the isolated compounds. Upon the anti-melanogenesis test using  $\alpha$ -MSH stimulated B16F10 melanoma cells, the compounds 1, 2 and 3 inhibited the cellular melanogenesis and intracellular tyrosinase activities effectively. Based on these results, *A. koreanum* stems extract could be potentially applicable as whitening ingredients in cosmetic formulations.

**Keywords:** *A. koreanum*, whitening, anti-melanogenesis, constituents

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)  
call: 064)754-3548

## 1. 서 론

피부의 색은 멜라닌, 헤모글로빈, 카로틴의 3가지에 의해 결정되는데 이 중 가장 중요한 역할을 하는 것이 멜라닌이다. 멜라닌세포는 표피의 기저층에서 흑갈색의 멜라닌을 생성하는 나뭇잎모양의 수지상세포이다. 멜라닌의 주요한 역할은 피부에서 발생하는 활성산소나 자유라디칼(free-radical)을 제거하고, 또 자외선의 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다. 멜라닌을 만드는 출발물질은 인체에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 티로신이다. 티로신은 멜라닌 세포 내에서 티로시나제라는 효소에 의해 산화되어 DOPA로 변하고, DOPA는 더욱 산화하여 DOPA quinone으로 바뀐다. DOPA quinone은 이후 자동 산화반응을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 유멜라닌을 만들어낸다. 한편 DOPA quinone이 시스테인을 만나게 되면 cysteinyl DOPA가 만들어지고 그 결과 적갈색의 페오멜라닌(pheo-melanin)이 만들어진다. 이후 생성된 멜라닌은 멜라노솜(melanosome)에 실려 각질형성세포로 전달된다 [1]. 멜라닌이 과잉 생산이 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며 피부암 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다 [2]. 최근의 미백효과에 대한 연구는 피부 미백효과와 항산화작용, 피부노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있다. 현재 알려져 있는 미백에 대한 연구는 자외선 차단 소재 연구, 멜라닌 세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 유전자 발현억제, 티로시나제 작용억제, 활성산소 제거 소재, 색소 환원, 각질층 제거 촉진 소재 연구 등의 여러 방법으로 진행되고 있다. 이 중에서도 티로시나제의 활성을 억제하여 멜라닌의 초기 생성을 감소시키는 기전이 가장 많이 연구되고 있다[3]. 대표적인 항산화제로 알려진 비타민 C는 미백에도 탁월한 효과가 있는 물질로써 티로시나제의 활성부위에 결합하여 활성을 억제한다. 티로시나제 활성 저해제인 알부틴(arbutin)도 미백제로 잘 알려진 물질이다. 하지만 이런 물질들은 안정성의 문제로 현재 사용에 제한을 두고 있어 멜라닌 생합성을 억제하여 미백효과를 나타내는 동시에 독성이 없는 천연소재에 대한 개발이 요구되고 있다[4].

섬(탐라)오갈피나무(*Acanthopanax koreanum* Nakai)는 두릅나무과의 가지가 많은 낙엽성 관목으로 우리나라

라의 제주도, 중국의 푸젠 등지의 해변 산기슭에 주로 분포한다. 특히 제주도가 원자생지로 해안에서 해발 1,400 m에 이르기까지 제주도 전역에서 분포하며, 예로부터 민간요법으로 신경통, 관절염 등의 치료를 위한 약용식물로서 사용되어 왔다. 또한 재배 적지 폭이 넓고 속성수로서 경제적 수확연수가 짧아 기능성 식품 및 의약품으로 개발할 가능성이 높은 제주도의 특산 자원 식물이다[5]. 섬오갈피나무 줄기에 대해서는 현재까지 추출물 단위에서 항산화[6], 미백[7] 및 항염[8] 활성 등이 보고 되었으나, 아직 이들 활성과 관련된 유효 성분 연구가 미비한 실정이다. 본 연구에서는 제주도에서 자생하고 있는 섬오갈피나무 줄기 추출물의 미백활성을 확인하고 유효 활성물질을 분리·동정하였고, 분리된 화합물의 미백 효과에 관한 연구를 진행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma, USA), 겔 여과 크로마토그래피(CC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, Fluka, USA)이 사용되었다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL사의 NMR 전용 용매인 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>를 사용하였다.

### 2.2. 섬오갈피나무 줄기의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 섬오갈피나무 줄기(시료번호: 351)는 제주도 애월읍 소재 한라산오가피 직영농장에서 2013년 12월에 채집하였다. 채집한 시료는 실온 및 음지에서 자연 건조 시킨 후 분쇄하여 사용하였으며 시료 1 kg에 70% 에탄올 10 L를 첨가하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 100.6 g을 얻었으며 얻어진 추출물 100.0 g을 증류수 3 L에 현탁시키고 용매 극성 순서에

따라 순차적으로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다.

### 2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

헥산 분획물 4.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 순상(normal phased) silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 수행하였다. 기울기 용리법을 이용해 헥산-에틸아세테이트(0-100%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 15개의 분획물을 얻었다(Fr. 1-15). VLC 분획물 중 Fr. 2로부터 화합물 **1** (222.2 mg)을 얻었고, Fr. 3 (50.0 mg)을 CHCl<sub>3</sub> 100% 용매 조건으로 Sephadex LH-20 컬럼을 수행하여 화합물 **2** (17.0 mg)을 얻었다. 또한 Fr. 6 (180.0 mg)을 CHCl<sub>3</sub> 100% 용매 조건으로 Sephadex LH-20 컬럼을 수행하여 화합물 **3** (31.4 mg)을 얻었다. 화합물 **1-3**의 NMR 데이터는 아래와 같다.

Kaurenoic acid (**1**) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 4.79 (1H, brs, H-17), 4.73 (1H, brs, H-17), 2.62 (1H, m, H-13), 1.19 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 181.6 (C-19), 156.4 (C-16), 104.2 (C-17), 58.3 (C-5), 56.5 (C-9), 50.2 (C-15), 45.4 (C-8), 45.2 (C-13), 44.6 (C-4), 42.1 (C-1), 42.1 (C-7), 40.9 (C-14), 40.8 (C-10), 39.3 (C-3), 34.3 (C-12), 29.8 (C-18), 23.1 (C-6), 20.4 (C-2), 19.6 (C-11), 16.5 (C-20)

16 α-hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (**2**) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 3.87 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-17), 2.19 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-2'), 2.09 (1H, m, H-13), 1.24 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-4'), 0.96 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-5'), 0.94 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 183.6 (C-19), 173.7 (C-1'), 68.6 (C-17), 57.2 (C-5), 55.5 (C-9), 45.3 (C-15), 45.1 (C-8), 43.9 (C-4), 43.8 (C-2'), 41.8 (C-7), 41.0 (C-1), 39.8 (C-10), 39.8 (C-16), 38.8 (C-13), 38.1 (C-3), 37.4 (C-14), 31.4 (C-12), 29.2 (C-18), 26.0 (C-3'), 22.6 (C-6), 22.6 (C-4'), 22.6 (C-5'), 19.3 (C-2), 19.0 (C-11), 15.8 (C-20)

16 α-hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (**3**) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 4.24 (1H, s, H-17), 4.23 (1H, s, H-17), 2.25 (2H, d, J = 6.9, H-2'), 2.09 (1H, m, H-13), 1.23 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, d, J = 6.4), 0.96 (3H, d, J = 6.4, H-5'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>:

184.1 (C-19), 173.5 (C-1'), 80.4 (C-16), 68.3 (C-17), 56.9 (C-5), 55.8 (C-9), 52.9 (C-15), 46.1 (C-13), 45.0 (C-8'), 43.9 (C-4), 43.6 (C-2'), 41.9 (C-7), 40.7 (C-1), 39.8 (C-10), 37.9 (C-3), 37.2 (C-14), 29.1 (C-18), 26.4 (C-12), 26.0 (C-3'), 22.6 (C-4'), 22.6 (C-5'), 22.2 (C-6), 19.2 (C-2), 18.6 (C-11), 15.7 (C-20)

### 2.4. 세포배양

Murine B16F10 melanoma cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB; Seoul, Korea)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한번 씩 계대 배양을 시행하였다.

### 2.5. 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해 활성

6-Well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM α-MSH를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 이를 원심분리 시켜 상등액을 제거하고, pellet에 sonication buffer (6.7 mM sodium phosphate buffer containing 1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF)를 500 μL씩 넣어 hand sonicator로 cell을 깨준 뒤, 원심분리하였다. 상등액은 세포 내 티로시나제 저해 활성을 pellet은 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 96-well plate에 상등액을 80 μL씩 넣고 25 mM L-DOPA와 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 1 : 3의 비율로 만든 용액 160 μL씩 넣어 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며 단백질 정량을 통해 흡광도 값을 보정하여 저해율(%)을 계산하였다. 또한 pellet에는 1 N NaOH 200 μL를 첨가하고 55 °C에서 2 h 방치하여 멜라닌을 녹여내어 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생성량(%)을 계산하였다.

### 2.6. 세포독성 평가(MTT Assay)

6-Well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24 h 전 배양 후 α-MSH와

sample을 농도별로 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 이후 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 첨가하여 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 3-4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96-well plate에 옮긴 후 ELISA reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

## 2.7. 통계 분석

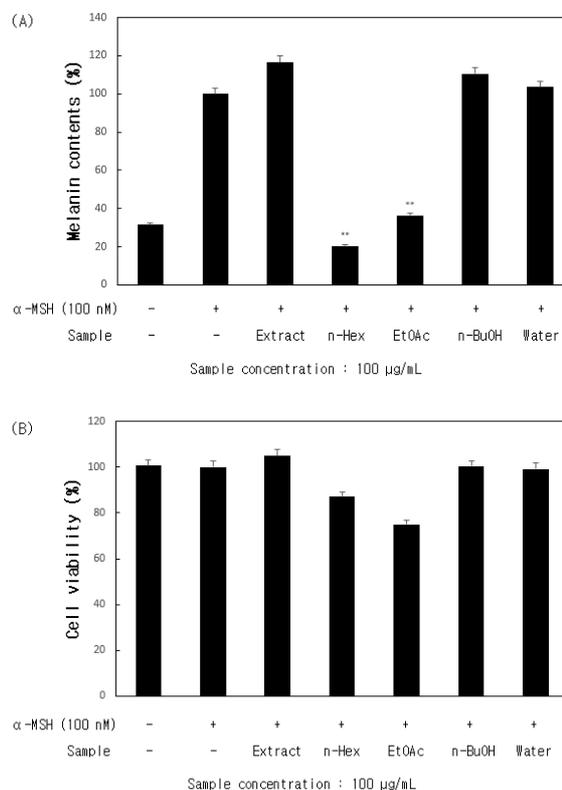
모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 또한 Student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

섬오갈피 줄기 추출물의 미백 효과를 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해 활성을 측정하였다.

섬오갈피 줄기는 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며 얻어진 추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물에 대한 미백 활성 실험 결과 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성 저해 효과가 있음을 확인하였다 (Figure 1A). MTT assay를 이용한 세포 독성 평가 결과를 보면 에틸아세테이트 분획물에서는 약한 독성이 관찰되었다. 반면 다른 분획물에서는 뚜렷한 독성이 관찰되지 않았다(Figure 1B).

멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해활성이 좋은 헥산 및 에틸아세테이트 분획물 중 비교적 세포독성이 적은 헥산 분획물에 대하여 VLC, Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하였다.  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 3개의 화합물을 동정하였다. 화합물 1은  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, s), 0.98 (3H, s)의 피크로 보아 분자 내에 2개의 methyl기가 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  181.6의 피크를 통해 carbonyl기가 있음을 예상할 수 있다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  4.79 (1H, brs), 4.73(1H, brs) 및  $\delta_{\text{C}}$  156.4, 104.2의 피크로 한 쪽 방향이 열린 exo-olefin 구조가 있음을 예상하였으며, 문헌



**Figure 1.** Melanin contents (A) and cell viability (B) of extract and solvent fraction from *A. koreanum* in  $\alpha$ -MSH stimulated B16F10 melanoma cell line.  $\alpha$ -MSH (-); saline without  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH(+);  $\alpha$ -MSH without extract. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

[9]과 비교하여 kaurenoic acid로 동정하였다. 화합물 2 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.24 (3H, s), 0.96 (6H, d), 0.94 (3H, s)의 피크로 분자 내에 4개의 methyl기가 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  183.6, 173.7의 피크를 통해 carbonyl기가 있음을 예상할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌[10]과 비교하여 화합물 2는 16  $\alpha$ -hydro-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid로 동정하였다. 화합물 3은  $\text{C}_{16}$ 에 해당하는 피크를 제외하고 화합물 2의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터와 전체적으로 유사한 경향을 나타내었으며,  $\delta_{\text{C}}$  80.4의 피크를 통해  $\text{sp}^3$  혼성 탄소에 hydroxyl기가 결합되어 있음을 예상할 수 있다. 이들 데이터를 종합하여 문헌[11]을 통해 화합물 3은 16  $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid로 확인되었다(Figure 2). 화합물 1-3은 섬오갈피나무 줄기에서는 처음으로 분리된 물질이다.

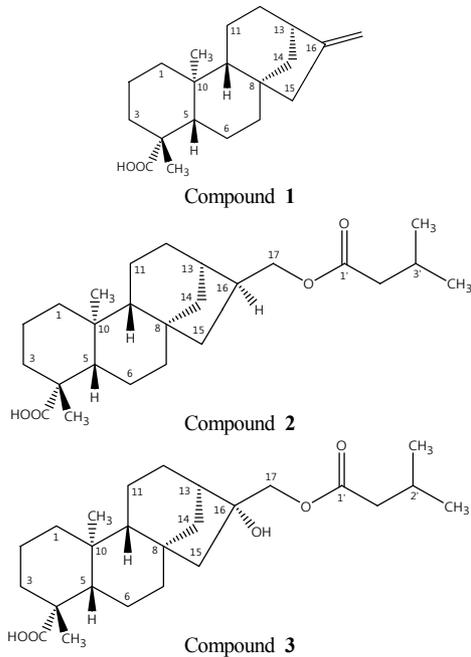


Figure 2. Isolated compounds 1-3 from *A. koreanum* stems.

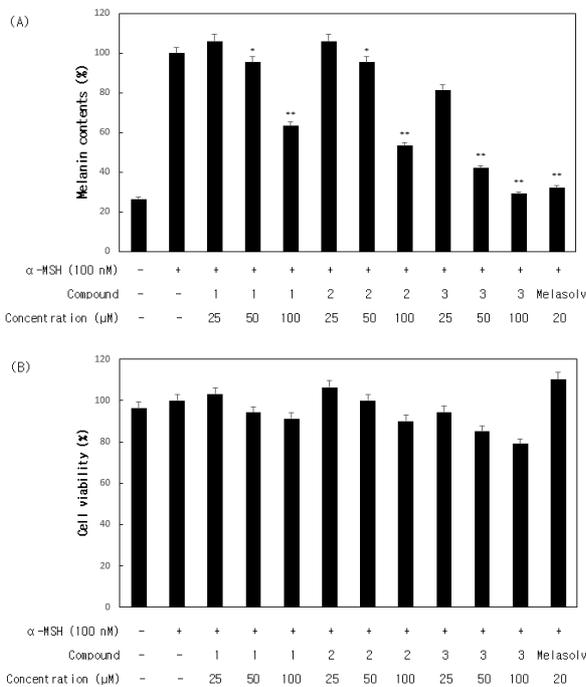


Figure 3. Melanin contents (A) and cell viability (B) of isolated compound from *A. koreanum* in  $\alpha$ -MSH stimulated B16F10 melanoma cell line.  $\alpha$ -MSH (-); saline without  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH(+);  $\alpha$ -MSH without extract. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

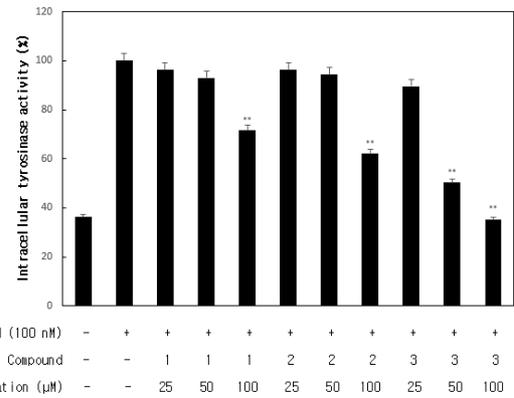


Figure 4. Intracellular tyrosinase activities of isolated compound from *A. koreanum* in  $\alpha$ -MSH stimulated B16F10 melanoma cell line.  $\alpha$ -MSH (-); saline without  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH(+);  $\alpha$ -MSH without extract. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

분리된 화합물에 대한 미백 효과를 확인하기 위하여 농도별 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해활성을 확인하였다.  $\alpha$ -MSH에 의해 자극을 받은 melanoma cell은 MITF의 발현이 증가되고 멜라닌 합성이 유발된다. 특히 티로시나제는 멜라닌 합성 메커니즘에서 초기속도를 결정하는 단계에 관여하는 촉매효소로 멜라닌 합성에 중요한 역할을 한다. 따라서 티로시나제의 활성을 저해시키면 결과적으로 멜라닌 생성이 억제되는 효과를 기대할 수 있다. 분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험 결과 Figure 3에 나타난 바와 같이 화합물 1-3은 농도의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 또한 분리된 화합물 1-3은 세포 내 티로시나제를 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다(Figure 3A). 세포 독성 평가에서는 화합물 1-3에서 100  $\mu$ M 농도까지 뚜렷한 세포독성은 관찰되지 않았다(Figure 3B).

분리된 화합물 1-3은 kaurane 골격의 다이테펜(diterpene) 화합물이다. Kaurenoic acid 유도체는 항염[12], 항암[13] 및 항균[14] 활성이 보고되어 있다. 최근 연구에 따르면 이러한 kaurenoic acid 유도체 화합물은 멜라닌세포 내에서 멜라닌소체의 운반체 역할을 하는 멜라노필린(melanophilin)의 발현을 감소시켜 미백 효능을 효과적으로 나타낸다. 또한 kaurenoic acid 유도체는 기능기의 종류와 관계없이 동등한 피부 미백효과를 나타낸다고 보고되어 있다[15]. 이러한 연구 결과는 섬

오갈피 줄기 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과가 테르펜 화합물에 연유되어 있음을 확인해주고 있다.

#### 4. 결 론

현재 섬오갈피(*A. koreanum* Nakai) 줄기에 대한 항산화[6], 미백[7] 및 항염[8] 활성 등의 연구 결과가 추출물 수준에서 보고되어 있다. 그러나 유효 성분 연구 결과는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 섬오갈피 줄기 추출물 및 매 분획물의 미백활성을 검색하고, 활성 성분을 확인하기 위해 단일물질 분리 과정을 진행하여 유효성분의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 활성을 확인하여 천연 미백 소재로서의 활용가능성을 검토하였다.

섬오갈피 70% 에탄올 추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 제조하였다. 미백활성을 측정한 결과 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에 대하여 우수한 활성을 확인하였다. 세포독성이 적은 헥산 분획물을 대상으로 유효 성분을 찾고자 다양한 크로마토그래피(VLC, Sephadex LH-20 CC) 연구를 수행하여 단일물질을 분리하였다. 분리된 단일물질은 핵자기공명분광기(<sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR) 분석 결과를 통해 화학구조를 확인하였다. 분리된 화합물은 다이테르펜(diterpene)인 kaurenoic acid (1), 16  $\alpha$ -hydro-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (2), 16  $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (3)로 확인되었다.

분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험을 진행한 결과 모든 화합물에서 농도의존적으로 미백 활성을 나타냈으며, 특히 화합물 3이 우수한 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었다. 또한 멜라닌 생성 억제 효과는 세포내(intracellular) 티로시나제 효소 발현 현상과 유의적인 결과를 나타내었다. 화합물 1-3은 kaurane 골격의 다이테르펜 화합물로서 이러한 kaurenoic acid 유도체는 항염, 항암, 및 항균 활성이 보고되어 있다[12-14]. 또한 kaurenoic acid 유도체의 미백활성[15]이 최근 연구에 의해 보고되었고 본 연구에서도 유사한 미백 활성을 확인하였다. 이상의 연구를 바탕으로 섬오갈피 줄기 추출물은 천연 미백 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgement

이 논문은 2017학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

#### Reference

1. B. J. Ha, Cosmeceuticals, *Shinkwangpub*, 67 (2001).
2. Y. Jin, S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Raw, Extraction of whitenin agents from natural plants and whitening effect, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **16**, 348 (2005).
3. T. H. Lee, H. J. Kim, and Y. B. Kim, Depigmentation activity of barley, unpolished rice, Job's-tear, *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **16**, 57 (2003).
4. J. J. Ahn, T. Y. Hwang, and H. S. Kim, Study on the physiological activities of *Cleyera japonica* extract, *Korean J. Plant Res.*, **28**(2), 153 (2015).
5. J. S. Ko, Y. T. Yang, J. K. Park, and Y. J. Lee, Tamraogapi-Cultivation, use and health, *Jejuculturepub*, 15 (2008).
6. S. E. Lee, D. W. Son, Y. P. Yoon, S. Y. Lee, B. J. Lee, and S. H. Lee, Protective effect of the methanol extracts of *Acanthopanax koreanum* against oxidative stress, *Kor. J. Pharmacogn.*, **37**(1), 16 (2006).
7. Korea Patent 10-2013-0043889 (2013).
8. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages, *Phytother. Res.*, **17**, 485 (2003).
9. Z. Li, J. H. Kim, X. Q. Liu, K. T. Lee, and C. S. Yook, Anticancer effects *in vitro* and chemical compositions of extracts of *Acanthopanax henryi*, *J. Acupuncture and Herbs*, **1**, 49 (2014).
10. X. F. Cai, G. Shen, N. T. Dat, O. H. Kang, Y. M. Lee, J. J. Lee, and Y. H. Kim, Inhibitory effect of kaurane type diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF- $\alpha$  secretion from trypsin-stimulated HMC-1 cells, *Arch. Pharm. Res.*, **26**(9), 731 (2013).
11. H. A. Jung, E. J. Lee, J. S. Kim, S. S. Kang, J. H.

- Lee, B. S. Min, and J. S. Choi, Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*, *Arch. Pharm. Res.*, **32**(10), 1399 (2009).
12. L. A. Paiva, L. A. Gurgel, R. M. Silva, A. R. Tome, N. V. Gramosa, E. R. Silveria, F. A. Santos, and V. S. Rao, Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats, *Vascul Pharmacol.*, **39**(6), 303 (2002).
13. F. M. Peria, D. G. Tiezzi, D. P. Tirapelli, F. S. Neto, C. R. Tirapelli, S. Ambrosio, H. F. Oliveira, and L. Tirapelli, Kaurenoic acid antitumor activity in breast cancer cells, *J. Clinical Oncology*, **28**(15), e13641 (2010).
14. T. C. Okoye, P. A. Akah, C. O. Okoli, A. C. Ezike, E. O. Omeje, and U. E. Odoh, Antimicrobial effect of a lipophilic fraction and kaurenoic acid isolated from the root bark extracts of *Annona senegalensis*, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, **2012**, 10 (2012).
15. Korea Patent 10-1765577 (2017).