

수박 덩굴 추출물 유래 미백 및 항염 활성 성분

전 아 립 · 김 정 은 · 이 남 호[†]

제주대학교 화학 · 코스메틱스학과
(2017년 1월 24일 접수, 2017년 3월 9일 수정, 2017년 3월 21일 채택)

Whitening and Anti-inflammatory Constituents from the Extract of *Citrullus lanatus* Vines

Ah Lim Jeon, Jung Eun Kim, and Nam Ho Lee

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea
(Received January 24, 2017; Revised March 9, 2017; Accepted March 21, 2017)

요약: 본 연구에서는 수박 덩굴(잎 및 줄기) 추출물 및 용매 분획물의 미백 및 항염 활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 규명하였다. 수박 덩굴 에탄올 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제활성을 측정하고, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 멜라닌 생성 억제 효과가 있음을 확인하였다. 또한 항염 활성 측정 결과, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 활성이 나타남을 확인하였다. 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분을 찾고자 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 3개의 화합물을 분리하였으며 ¹H 및 ¹³C NMR 데이터 분석 및 문헌치 비교를 통하여 화학구조를 동정하였다; α -linolenic acid (1), sigmast-7-en-O- β -D-glucopyranoside (2), 1-feruloyl- β -D-glucopyranoside (3). 분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험 결과, 화합물 1과 3에서 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 효소의 활성을 감소시키고 있음을 확인하였다. 또한 항염 활성 실험 결과 화합물 1과 3이 nitric oxide (NO) 및 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 생성을 억제시킴을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 수박 덩굴 추출물을 이용한 천연 미백 및 항염 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, we investigated whitening and anti-inflammatory constituents from a watermelon (*Citrullus lanatus*, *C. lanatus*) vines (leaves and stems). As anti-melanogenesis and anti-inflammatory activities were screened for the ethanol extract and solvent fractions, *n*-hexane (*n*-Hex) and ethyl acetate (EtOAc) fractions showed the most potent activities. Three constituents were isolated from the *n*-Hex and EtOAc fractions of *C. lanatus*; α -linolenic acid (1), sigmast-7-en-O- β -D-glucopyranoside (2), 1-feruloyl- β -D-glucopyranoside (3). The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including ¹H and ¹³C NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values. Whitening and anti-inflammatory effects were studied for the isolated compounds. Upon the anti-melanogenesis tests using α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells, the compounds 1 and 3 inhibited the cellular melanogenesis and intracellular tyrosinase activities effectively. For the anti-inflammation tests using lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells, the isolates 1 and 3 were determined to decrease the production of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6). Based on these results, *C. lanatus* vines extract could be potentially applicable as whitening and anti-inflammatory ingredients in cosmetic formulations.

Keywords: *Citrullus lanatus*, whitening, anti-inflammation, constituents

[†] 주 저자 (e-mail: namho@jeju.ac.kr)
call: 064)754-3548

1. 서 론

멜라닌은 신체의 눈동자, 머리카락 또는 피부색 등을 결정짓는 색소로서 자외선과 같은 외부자극으로부터 인체 조직을 보호하는 과정에서 합성된다. 자외선에 의해 피부가 자극을 받으면 표피의 멜라노사이트에 존재하는 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 뇌하수체에서 분비되는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/ protein kinase A (PKA) 경로에 의해 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현이 증가된다. 그로 인해 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 티로시나제, tyrosinase related protein-1, -2 (TPR-1, -2) 활성이 증가되고 멜라닌 합성이 촉진된다. 이러한 과정을 통하여 피부는 자외선에 의하여 유발될 수 있는 피부암 등 각종 질환으로부터 보호되고 있다. 하지만 멜라닌 합성이 과도하게 진행될 경우 색소 침착에 의한 기미, 주근깨를 유발하는 등 부작용이 야기된다. 또한 멜라닌은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화반응에 의해서도 합성된다고 알려져 있다. 대표적인 항산화제로 알려진 vitamin C는 미백에도 탁월한 효과가 있는 물질로서 티로시나제의 활성부위에 결합하여 활성을 억제한다. 티로시나제 활성 저해제인 알부틴(arbutin)도 미백제로서 잘 알려진 물질이다. 하지만 이런 물질들은 안정성의 문제로 인해 현재 사용에 제한을 두고 있다. 따라서 멜라닌 생합성을 억제하여 미백효과를 가져올 수 있는 독성이 없는 천연소재 물질에 대한 개발이 요구되고 있다[1,2].

체내의 염증반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극에 의해 유발된 손상 부위를 복구시키는 신체 방어 기전 중 하나이며, 자극이 가해지면 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다[3]. 하지만 지속적인 염증반응은 오히려 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등 기능 장애를 유발하며, 관절염 및 암 등의 발병과 깊은 연관을 갖고 있다[4]. 대식세포(macrophage)는 염증 반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분비하는 사이토카인(cytokine) 등에 의해 활성화되며, 감염초기에 nitric oxide (NO)를 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다[5]. 염증반응 인자인 NO는 외부에서 침입

한 박테리아, 바이러스 및 암세포를 죽이는 역할을 하거나 스스로 iNOS의 발현을 저해하여 면역반응의 과도화를 억제하는 등 체내 방어와 면역반응을 조절하는 인자로서 작용한다[6]. 하지만 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[7]. 종양괴사인자인 TNF- α 는 그람 음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성 염증반응의 주된 매개 인자이다. LPS에 의해 자극된 대식세포는 TNF- α 의 합성을 증가시킨다. 활성화된 TNF- α 는 natural killer (NK)세포 등의 면역관련 세포나 비만(mast)관련 세포들에서 유리되어 염증반응에 중요한 역할을 하고 많은 중증 감염 시 전신적 합병증의 원인이 된다[8]. 항염증제는 피부 진정과 여드름, 아토피에 관련하여 피부 자극 완화를 목적으로 하는 화장품류에 많이 사용되고 있다[9]. 항염증제로 이용되고 있는 물질로 비스테로이드 계통의 benzydamine, indomethacin 등이 있으며 스테로이드 계통의 dexamethasone, hydrocortisone 등이 사용되고 있다[10,11]. 그러나 이러한 물질들은 화장품 원료로 사용할 수 없거나 사용량이 제한되어 있는 경우가 대부분이며, 특히 스테로이드 계통의 경우 피부위축, 불면, 불안 등의 부작용을 동반하고 있다. 따라서 피부에 안전성이 우수하고 부작용이 없는 천연 식물에서의 항염 효능을 갖는 물질에 대한 연구가 요구되고 있다[12].

수박(*C. lanatus*)은 박목과의 쌍떡잎 식물로 체내에 흡수가 잘되는 대표적인 여름과일이다. 수박에는 시트룰린(citrulline)이 함유되어 있어 이뇨작용이 있고, 칼륨의 함량이 높아 나트륨 배설에 효과적이라고 알려져 있다. 또한 여러 연구를 통해 수박 과육에서는 항균, 미백, 항염 활성이 보고되어 있으며, 수박 외피에서는 미백, 항산화 활성 및 수박 씨에서는 항균, 미백, 항염 활성이 보고되어 있다[13-15]. 그러나 수박의 덩굴(잎과 줄기)에 대해서는 항균 활성[16] 외에는 알려진 활성 및 성분 연구가 거의 보고되어 있지 않다. 수박의 덩굴은 식용이나 산업적 측면에서 활용되지 않는 농업 부산물로서, 미이용 농산물 자원의 활용 차원에서 관심을 갖게 된다. 본 연구에서는 수박의 덩굴 에탄올 추출물 및 극성별 용매 분획물의 미백 및 항염 효과를 확인하였다. 또한 활성을 갖는 물질을 규명하고자 단일 물질 분리과정을 진행하였으며, 분리된 화합물의 미백

및 항염 활성을 확인하여 천연 미백제 및 항염제로써의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

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), silica gel column chromatography (CC)에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck, USA), 겔 여과 CC에는 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 CD₃OD, CDCl₃, pyridine-*d*₅를 사용하였다.

2.2. 수박 잎, 줄기의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 수박 덩굴(시료번호: 414)은 제주시 조천읍 소재 한울영농조합 농가에서 2013년 7월에 채집하였다. 채집한 시료는 실온 및 음지에서 자연 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였으며 시료 430 g을 70% 에탄올 5 L에 침적하여 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 69.7 g을 얻었으며 얻어진 추출물 67.4 g을 증류수 4 L에 현탁시키고 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

헥산 분획물 5.0 g을 극성에 따라 분획하기 위하여 VLC를 수행하였으며 헥산-에틸아세테이트(0-100%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 21개의 분획물을 얻었다(Fr. HV1-21). VLC 분획물 중 Fr. HV8 (132.6 mg)을 silica gel 컬럼(헥산 : 에틸아세테이트 = 2 : 1)을 하여 화합물 1 (15.5 mg)을 얻

었다.

에틸아세테이트 분획물 3.4 g 또한 VLC를 하였으며 헥산-에틸아세테이트(0-100%), 에틸아세테이트-메탄올(0-100%)의 용매를 극성을 2-10%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 43개의 분획물을 얻었다(Fr. EV1-3). VLC 분획물 중 Fr. EV21 (44.9 mg)은 메탄올을 사용하여 재결정하여 화합물 2 (6.5 mg)를 분리하였다. Fr. EV24 (150.4 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl₃ : 메탄올 = 10 : 1)을 하여 화합물 3 (7.2 mg)을 분리하였다. 화합물 1-3의 NMR 데이터는 아래와 같다.

α -linolenic acid (1) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 5.34-5.41 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 2.79-2.82 (4H, m, H-11, 14), 2.35 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 2.03-2.10 (4H, m, H-8, 17), 1.61-1.65 (2H, m, H-3, 4), 1.26-1.37 (8H, m, H-5, 6, 7), .98 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ _C: 179.5 (C-1), 127.3-132.1 (C-9, 10, 12, 13, 15, 16), 34.1 (C-2), 29.2-29.9 (C-3-7), 27.4 (C-8), 24.9-25.8 (C-11, 14), 20.7 (C-17), 14.4 (C-18)

Sigmast-7-en-O- β -D-glucopyranoside (2) ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ _H: 5.19 (1H, s, H-7), 5.07 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.64-3.97 (7H, m, H-2' ~ 6'), 4.09 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.88 (9H, s, H-26, 27, 29), 0.73 (3H, s, H-19), 0.58 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ _C: 140.0 (C-8), 118.2 (C-7), 102.7 (C-1'), 79.9 (C-5'), 79.1 (C-3'), 77.5 (C-3), 75.8 (C-2'), 72.2 (C-4'), 63.3 (C-6'), 56.7 (C-17), 55.6 (C-14), 50.0 (C-9), 46.5 (C-24), 44.4 (C-13), 40.6 (C-5), 40.2 (C-12), 37.7 (C-1), 37.3 (C-20), 35.1 (C-4), 34.9 (C-10), 34.6 (C-22), 30.4 (C-6), 30.4 (C-2), 29.9 (C-25), 28.7 (C-16), 26.9 (C-23), 23.8 (C-15), 23.7 (C-28), 22.2 (C-11), 20.4 (C-27), 19.6 (C-26), 19.6 (C-21), 13.5 (C-19), 12.6 (C-29), 12.5 (C-18)

1-feruloyl- β -D-glucopyranoside (3) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ _H: 7.73 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 7.20 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.10 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz, H-6), 6.82 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H -5), 6.40 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8), 5.58 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ _C: 167.8 (C-9), 151.1 (C-4), 149.5 (C-3), 148.3 (C-7), 127.7 (C-1), 124.5 (C-6), 116.6 (C-8), 114.8 (C-5), 111.9 (C-2), 95.9

(C-1'), 78.9 (C-5'), 78.1 (C-3'), 74.2 (C-2'), 71.2 (C-4'), 62.4 (C-6'), 56.5 (3-OCH₃)

2.4. 세포배양

Murine B16F10 melanoma cell 및 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양받아 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% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 이틀에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

2.5. 미백 활성-멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해 활성

6-well plate에 1×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 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. 회수한 pellet을 원심분리시켜 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. 상층액은 세포 내 티로시나제 저해 활성을 pellet은 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 96-well plate에 상층액을 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. 항염 활성-NO 및 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성 억제 활성

24-well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이

후 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96-well plate에서 10 min 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 사용하여 정량하였다. 또한 세포배양 상등액의 cytokine 생성 함량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

2.7. 세포독성 평가(MTT Assay)

MTT assay는 B16F10 melanoma cell 및 RAW 264.7 cell을 well plate에 실험 조건에 맞게 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 전 배양 후, α -MSH 또는 LPS와 sample을 농도별로 동시에 처리하여 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 첨가하여 37 °C에서 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.

2.8. 통계 분석

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

3. 결과 및 고찰

수박 덩굴 추출물의 미백 및 항염 효과를 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해 활성을 측정하였으며 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 NO 및 전염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 측정하였다.

우선 수박 덩굴은 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며 얻어진 추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물에 대한 미백 활성 실험 결

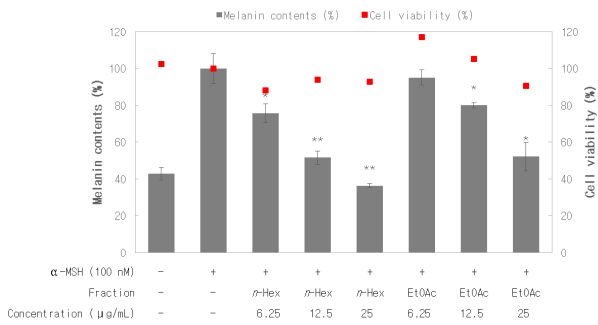


Figure 1. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from *C. lanatus* on melanin contents in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *C. lanatus* for 72 h. Melanin contents were determined by the absorbance at 405 nm. Cell viability was determined after 72 h culture of cells stimulated with α -MSH (100 nM) in the presence of *C. lanatus*. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. Values are the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments (* p < 0.05; ** p < 0.01).

과 핵산 및 에틸아세테이트 분획물에서 농도의존적으로 멜라닌 생성 저해 효과가 있음을 확인하였다(Figure 1). 또한 항염 활성 실험 결과도 마찬가지로 핵산 및 에틸아세테이트 분획물이 농도의존적으로 NO의 생성을 억제 시키는 효과가 있음을 확인하였다(Figure 2).

미백 및 항염 활성이 우수한 핵산 및 에틸아세테이트 분획물에 대해 VLC, silica gel CC, Sephadex LH-20 CC를 수행하여 총 3개의 화합물을 분리하였으며, ^1H 및 ^{13}C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 동정하였다. 화합물 1은 δ_{H} 5.34-5.41 (6 H, m) 및 δ_{C} 127.3-132.1의 피크로 보아 3개의 이중결합이 분자 내에 존재함을 확인할 수 있으며, δ_{C} 179.5의 피크를 통해 carbonyl기가 있음을 예상할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌 [17]을 통해 화합물 1은 α -linolenic acid로 확인되었다. 화합물 2는 δ_{H} 5.19 (1 H, s) 및 δ_{C} 140.0, 118.2의 피크를 통해 이중결합이 있음을 확인할 수 있으며, δ_{H} 5.07-3.97 및 δ_{C} 102.7-63.3의 6개의 피크로 보아 β -glucopyranoside가 결합되어 있는 배당체임을 예상하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 35개의 carbon 피크가 관찰되며, 이들 데이터를 바탕으로 문헌[18]과 비교하여 화합물 2는 sigmast-7-en-O- β -D-glucopyranoside로 확인되었다. 화합물 3 또한 δ_{H} 5.58-3.30 및 δ_{C} 95.9-62.4의 6개의 피크로 보아 β -glucopyranoside가 결

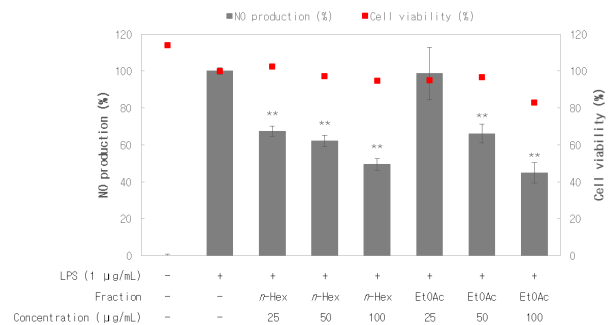


Figure 2. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from *C. lanatus* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only, or with LPS plus *C. lanatus* for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. lanatus*. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. Values are the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments (* p < 0.05; ** p < 0.01).

합되어 있는 배당체임을 알 수 있으며, δ_{H} 7.73 (1 H, d, J = 15.6 Hz) 및 δ_{H} 6.40 (1 H, d, J = 15.6 Hz) 피크의 coupling constant 값으로 보아 *trans* 형태의 이중결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 7.21 (1 H, d, J = 1.8 Hz), δ_{H} 7.10 (1 H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz) 및 δ_{H} 6.82 (1 H, d, J = 8.2 Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해서 *ortho* 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 존재함을 예상할 수 있고, δ_{C} 167.8의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl기가 있음을 확인할 수 있다. 이들 데이터를 종합하여 문헌[19]을 통해 화합물 3은 1-feruloyl- β -D-glucopyranoside로 확인되었다(Figure 3).

분리된 화합물에 대한 미백 효과를 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 이용한 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제 저해 활성을 측정하였다. α -MSH에 의해 자극을 받은 melanoma cell은 MITF의 발현이 증가되고 그로 인해 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 효소들의 활성이 증가되어 멜라닌 합성이 유발된다. 특히 티로시나제는 구리를 포함한 효소로서 멜라닌 합성 메커니즘에서 초기속도를 결정하는 단계에 관여하는 촉매효소로 티로신(tyrosine)이 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)로 전환되고 DOPA가 DOPA quinone으로 전환하는 과정에 작용하여 멜라닌 합성에 중요한 역할을 한다. 따라서 티로시나제의 활성을 저해시키면 결과적으로 멜라닌의 생성이 억제되는 효과를 기대할 수 있

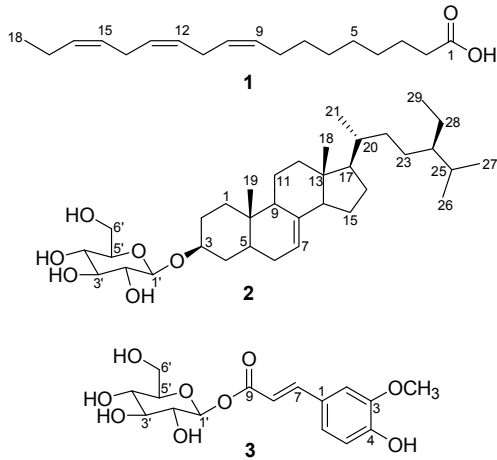


Figure 3. Isolated compounds 1-3 from *C. lanatus* vines.

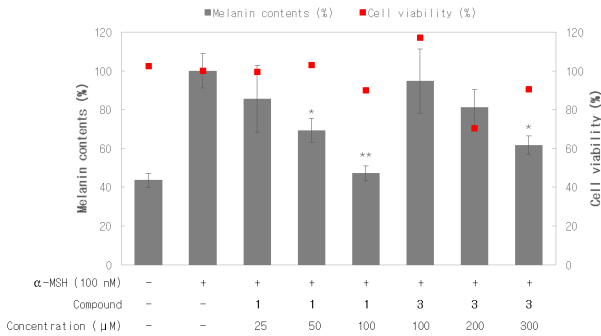


Figure 4. Effects of isolated compounds 1 and 3 from *C. lanatus* on melanin contents in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus compounds 1 and 3 for 72 h. Melanin contents were determined by the absorbance at 405 nm. Cell viability was determined after 72 h culture of cells stimulated with α -MSH (100 nM) in the presence of compounds 1 and 3. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. Values are the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

다. 분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험 결과 화합물 1과 3에서 농도의존적으로 멜라닌 생성 및 세포 내 티로시나제를 저해 시키는 효과가 있음을 확인하였다 (Figure 4, 5).

또한 분리된 화합물에 대한 항염 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 및 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성 억제 활성을 측정하였다. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는

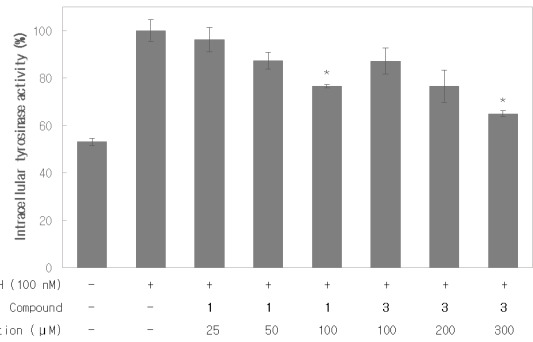


Figure 5. Effects of isolated compounds 1 and 3 from *C. lanatus* on intracellular tyrosinase activities in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus compounds 1 and 3 for 72 h. Absorbance was measured at 475 nm with a ELISA. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. Values are the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

내독소로 잘 알려진 LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증 매개성 사이토카인들의 분비를 촉진하며 NO의 대량 생성에 관여하게 되어 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다. 따라서 시료에 대한 항염증 효과를 확인하기 위해 대식세포에 LPS 자극을 가하여 NO 및 전염증성 사이토카인 생성 억제 효과를 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다. 우선 분리된 화합물에 대한 NO 생성 억제 활성 실험 결과, 화합물 1과 3이 농도의존적으로 NO의 생성을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다 (Figure 6). 항염 활성 기전을 확인하기 위해 전염증성 사이토카인의 생성량을 측정하였으며 그 결과 화합물 1 및 3이 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 생성 억제에도 효과가 있음을 확인하였다(Figure 7).

4. 결 론

수박의 덩굴(잎, 줄기)에 대해서는 항균 외에는 알려진 활성이 없으며, 유효 성분에 대한 연구 결과 또한 알려진 바 없다. 본 연구에서는 수박 덩굴 추출물 및 극성별 용매 분획물의 미백 및 항염 활성을 검색하고 활성 성분을 확인하기 위해 추가적인 단일물질 분리 과정을 진행하여 유효성분의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 활성을 확인하여 천연 미백 및 항염

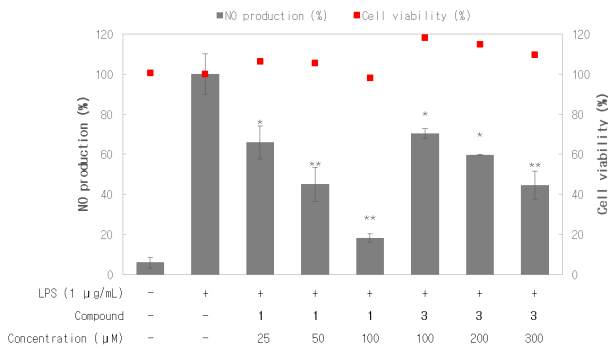


Figure 6. Effects of isolated compounds 1 and 3 from *C. lanatus* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compounds 1 and 3 for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of compounds 1 and 3. The data represent the mean ± S.D. of triplicate experiments. Values are the mean ± S.E.M. of triplicate experiments (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

소재로서의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

수박 덩굴 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었으며 활성 실험 결과 핵산과 에틸아세테이트 분획물이 미백 및 항염 활성이 우수함을 확인하였다. 이를 바탕으로 핵산 및 에틸아세테이트 분획물의 활성 성분을 찾고자 다양한 크로마토그래피(VLC, silica gel CC, Sephadex LH-20 CC) 연구를 수행하여 단일물질을 분리하고 핵자기공명분광기(¹H, ¹³C NMR) 데이터를 이용해 화합물의 화학구조를 확인하였다. 분리된 화합물은 α-linolenic acid (1), sigmast-7-en-O-β-D-glucopyranoside (2), 1-feruloyl-β-D-glucopyranoside (3)로 확인되었다.

또한 분리된 화합물에 대한 미백 활성 실험 결과 화합물 1과 3이 우수한 멜라닌 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다. 또한, 멜라닌 생성 억제 효과는 세포내 (intracellular) 티로시나제 효소의 발현이 억제되어 나타나는 현상임을 확인하였다. 항염 활성실험에서도 화합물 1과 3이 효과적으로 NO 및 전염증성 사이토카인 (TNF-α, IL-6)의 생성을 저해하고 있음을 확인하였다.

이상의 연구결과를 바탕으로 미이용 자원인 수박 덩굴의 추출물은 미백 및 항염제로써 향후 화장품 소재

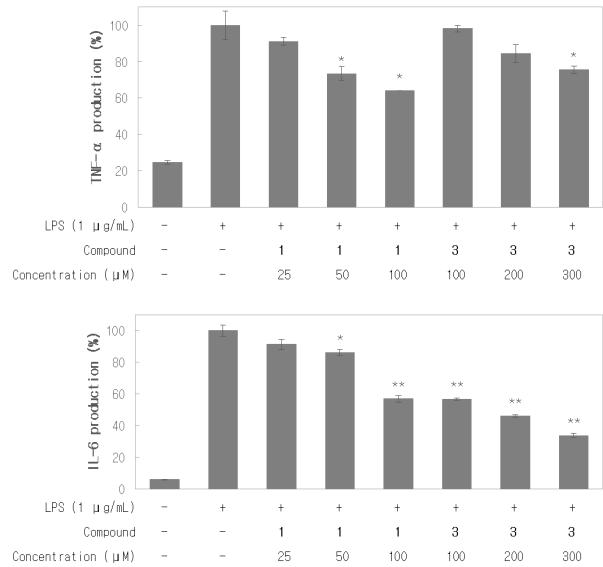


Figure 7. Effects of isolated compounds 1 and 3 from *C. lanatus* on production of TNF-α and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compounds 1 and 3 for 24 h. TNF-α and IL-6 produced and released into the culture medium was assayed using the ELISA method. The data represent the mean ± S.D. of triplicate experiments. Values are the mean ± S.E.M. of triplicate experiments (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2015년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0351596)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

Reference

1. E. J. Kwon, H. J. Park, M. M. Kim, K. R. Lee, I. Hong, D. G. Lee, and Y. H. Oh, Effect of *Ulmus macrocapa* ethanolic extracts on anti-oxidant activity and melanin synthesis in B16F1 cells, *J. Life. Sci.*, **24**(9), 946 (2014).
2. 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).
3. S. T. Lee, Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun, and S. K. Jo, Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**(2), 342 (2000).
 4. T. Ljung, S. Lundberg, M. Varsanyi, C. Ohansson, P. T. Schmidt, and M. Herulf, Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders, *World Gastroenterol.*, **12**(21), 3386 (2006).
 5. J. B. Jeong, S. C. Hong, H. J. Jeong, and J. S. Koo, Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells, *Korean J. Plant Res.*, **25**(3), 299 (2012).
 6. T. J. Guzik, R. Korbut, and T. Adamek-guzik, Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, *J. Physiol. Pharmacol.*, **54**(4), 469 (2003).
 7. R. G. Kim, K. M. Shin, S. K. Chun, S. Y. Ji, S. H. Seo, H. J. Park, J. W. Choi, and K. T. Lee, *In vitro* antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells, *Yakhak Hoeji*, **46**(5), 343 (2002).
 8. M. S. Nanes, Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology, *Gene*, **321**, 1 (2003).
 9. A. S. Chauhan, P. S. Negi, and R. S. Ramteke, Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds, *Fitoterapia*, **78**(7), 590 (2007).
 10. Y. F. Leung, P. O. Tam, W. S. Lee, D. S. Lam, H. F. Yam, B. J. Fan, C. C. Tham, J. K. Chua, and C. P. Pang, The dual role of dexamethasone on anti-inflammation and outflow resistance demonstrated in cultured human trabecular meshwork cells, *Mol. Vis.*, **9**, 425 (2003).
 11. D. Rocksén, B. Lilliehook, R. Larsson, T. Johansson, and A. Bucht, Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and *N*-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation, *Clin. Exp. Immunol.*, **122**(2), 249 (2000).
 12. N. K. Kim, M. H. Kim, C. S. Yoon, and S. W. Choi, Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* Uyeki leaf extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(4), 241 (2006).
 13. T. Kikuchi, A. Ikedaya, A. Toda, K. Ikushima, T. Yamakawa, R. Okada, T. Yamada, and R. Tanaka, Pyrazole alkaloids from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds, *Phytochem. Lett.*, **12**, 94 (2015).
 14. P. Madhavi, R. Maruthi, V. Kamala, R. Habibur, and M. C. Eswaraiash, Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrullus lanatus* seed oil by *in vivo* and *in vitro* models, *Int. Res J Pharm. App Sci.*, **2**(4), 104 (2012).
 15. S. I. Abdelwahab, L. E. A. Hassan, H. M. Sirat, S. M. A. Yagi, W. S. Koko, S. Mohan, M. M. E. Taha, S. Ahmad, C. S. Chuen, P. Narrima, M. M. Rais, and A. H. A. Hadi, Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition, *Fitoterapia*, **82**(8), 1190 (2011).
 16. L. E. A. Hassan, H. M. Sirat, S. M. A. Yagi, W. S. Koko, and S. I. Abdelwahab, *In vitro* antimicrobial activities of chloroformic, hexane and ethanolic extracts of *Citrullus lanatus* var. *citroides* (wild melon), *J. Med. Pant. Res.*, **5**(8), 1338 (2011).
 17. M. A. Alamsjah, S. Hirao, F. Ishibashi, and Y. M. Fujita, Isolation and structure determination of algicidal compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(11), 2186 (2005).
 18. J. Tang, M. H. Qiu, X. M. Zhang, and L. G. Zhou, Chemical constituents from stem of *Cucumis sativus* L., *Nat. Prod. Res. Dev.*, **21**(1), 66 (2009).
 19. J. S. Kim, Y. S. Kwon, Y. J. Sa, and M. J. Kim, Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(1), 138 (2011).