

사상자 미백성분 Torilin의 추출조건 최적화

조양희 · 안종훈 · 송다혜 · 황방연 · 이미경*
충북대학교 약학대학

Optimization of Extraction Conditions of Torilin, a Melanogenesis Inhibitor from *Torilis japonica* Fruits

Yang Hee Jo, Jong Hoon Ahn, Da Hye Song, Bang Yeon Hwang, and Mi Kyeong Lee*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 28160, Korea

Abstract – Torilin is a major sesquiterpene of *Torilis japonica* (Umbelliferae) fruits and known to be a melanogenesis inhibitor. Extraction conditions are important factor for the efficient preparation to save cost and time in economic aspects. For this reason, this study was conducted to optimize the extraction condition for maximal yield of torilin. For optimization, extraction factors such as extraction solvent, extraction temperature and sample/solvent ratio were tested and optimized for maximum yield of torilin using response surface methodology with Box-Behnken design (BBD). The optimal condition was obtained as a EtOAc concentration in MeOH of 31.8%, an extraction temperature at 30.3°C and a sample/solvent ratio, 1000 mg/2 ml. The torilin yield under optimal conditions was found to be 9.9 mg/g dried samples, which were well-matched with the predicted value of 10.4 mg/g dried samples. These results will provide useful information about optimized extraction conditions for the development of torilin as cosmetic therapeutics to reduce skin hyperpigmentation.

Keywords – Torilin, *Torilis japonica*, Optimization, Response surface methodology, Melanogenesis inhibitor

사상자(*Torilis japonica* Decandolle)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 두해살이풀로 우리나라 전역에 자생한다. 전체에 짧은 복모가 있고 높이 30~70 cm 줄기는 곧게 선다. 잎은 호생하며 3출엽이고 2회 호상으로 갈라지며 길이 5~10 cm로서 끝이 뾰족하고 녹색이며 소엽은 난상 피침형이고 뾰족한 톱니가 있으며 엽병 밑 부분이 넓어져서 원줄기를 얼싸안는다. 꽃은 6~8월에 피고 백색이며 가지 끝과 원줄기 끝의 복산형화서에 달리고 소산경은 5~9개이며, 길이 1~3 cm로서 6~20개의 꽃이 달린다. 열매는 4~10개씩 달리며 난형이고 길이 2.5~3 mm로서 짧은 가지같은 털이 있어 다른 물체에 잘 붙는다. 어린 순을 나물로 하고 열매는 약용으로 한다. 이 식물 아래 뱀이 웅크리고 있는 경우가 많아 ‘뱀도랏’이라고도 한다. 유사종인 갯사상자·별사상자·개사상자의 씨도 사상자로 함께 약용한다.¹⁾

한의약에서 열매를 말려 만든 생약을 ‘사상자’라고 부르며 맵고 쓰며 따뜻한 성질이 있고 독은 없다고 알려져 있다. 약리효과로는 항원충작용, 성호르몬유사작용, 항암작용, 간

세포보호작용 등이 보고되어 있으며, 수렴성 소염약으로 가려움증 등 피부질환에도 사용되고 있다.²⁻⁵⁾ 사상자는 정유나 지방유 성분이 주로 이루어져 있으며 주성분으로 다양한 골격의 sesquiterpene계의 화합물이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다.⁶⁻¹⁰⁾

멜라닌은 여러 동물들의 피부나 눈 등의 조직에 존재하는 갈색 내지는 흑색 고분자 색소로서 인간의 피부색을 결정하고 외부의 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 갖는 긍정적 기능에 반해, 과도한 멜라닌 생성과 비정상적인 분포는 기미와 주근깨를 형성하거나 노화로 인한 반점 같은 색소 침착 등 부정적인 기능도 가지고 있다.^{11,12)} 최근 피부 착색에 대한 관심이 높아지면서 멜라닌 생성 억제제를 시키기 위한 미백 소재 물질을 찾기 위해 다양한 연구가 계속하여 진행되고 있다. 사상자의 주성분은 torilin으로 guaiane 골격의 sesquiterpene 화합물이다(Fig. 1). Torilin은 B16 세포에서 tyrosinase의 α -MSH(α -Melanocyte Stimulating Hormone) 유발 단백질 조절하여 멜라닌 형성을 억제한다는 보고가 되어있으며 미백활성 이외에도 항염, 항암, 항미생물 효능 등 다양한 효능이 보고되어 새로운 소재로서의 가능성이 제시

*교신저자(E-mail): mklee@chungbuk.ac.kr
(Tel): +82-43-261-2818

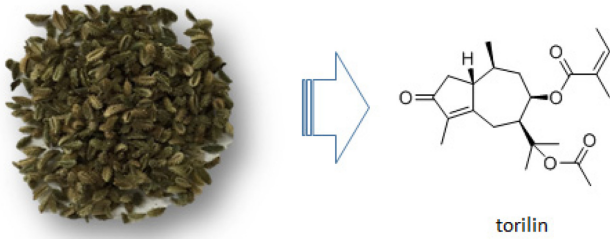


Fig. 1. Chemical structure of torilin.

되고 있다.^{13,14)}

본 연구에서는 사상자로부터 torilin을 확보하기 위한 추출조건에 대한 연구를 수행하였다. 반응표면분석(Response surface methodology)을 이용하여 추출조건에 torilin의 수율에 미치는 영향을 확인하고 최적의 추출조건을 도출하고자 하였다. 반응표면분석은 통계 분석 프로그램으로 변수가 여러 가지인 경우 유용하다. 이는 여러 변수를 동시에 분석하고 여러 변수들의 영향을 상호 비교 분석함으로써 빠르고 합리적으로 최적의 조건을 도출할 수 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 이에 본 연구에서는 본 연구에서는 반응표면분석을 이용하여 여러 추출조건이 torilin의 추출수율에 미치는 영향을 연구하고 이를 통계적으로 분석하여 최적의 추출조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 사상자 열매(Fruits of *T. japonica*)는 2014년 5월 경북 풍기읍에서 재배된 것으로 제천약초에서 구입하여 충북대학교 약초원에서 검증하여 사용하였으며, 시료의 표본(CBNU201405-TJ)은 충북대학교 약학대학 약학표본실에 보관되어 있다. Torilin은 사상자의 열매로부터 분리한 후 분광학적 분석방법을 이용하여 구조를 확인한 후 실험에 이용하였다.¹⁸⁾

반응표면분석 실험 계획 - 사상자로부터 torilin의 추출조건을 최적화하기 위하여 Box-Behnken design(BBD)의 반응표면분석을 이용하였다. 실험 추출 조건으로는 추출용매, 추출시간 및 시료-용매 비율을 설정하여 비교하였으며 이들을 각각 독립변수로 사용하였다. 추출변수는 각각 -1, 0, 1로 코드화하였으며 각 조건이 0이 되는 중심점을 3개를 포함하는 총 15개의 추출조건을 프로그램을 이용하여 설정하였다. 추출조건에 다른 종속변수로는 torilin의 함량으로 선정하고 ANOVA를 이용한 통계분석을 통하여 각 변수간의 관계를 분석하였다.

HPLC를 이용한 Torilin의 정량 - Torilin의 정량은 Waters HPLC [Waters 515 pumps, a Waters 717 autosampler, a 996 photodiode array detector, and Waters Empower

software using Phenomenex Gemini-NX 5u C18 110A (150×10.0 mm)]를 이용하여 수행하였다. 크로마토그래피 이동상의 조건은 다양한 예비실험을 통하여 acetonitrile-water (65:35)로 확립하였으며 유속은 2.0 ml/min의 조건으로 230 nm에서 측정하였다.

Torilin의 정량은 표준품 torilin을 메탄올에 각각 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 및 1 mg/ml로 희석하여 표준품 용액을 제조한 후 검량선을 작성한 후 사용하였으며 R²=0.9911의 직선성을 나타내었다.

사상자 시료의 추출 - 건조한 사상자 열매를 분쇄한 후 각각 2 ml의 용매로 추출하였다. 추출용매, 추출온도 및 시료의 양은 실험조건에 맞추어 진행하였으며 추출물은 여과 후 HPLC 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

사상자의 Sesquiterpene은 다양한 효능이 보고되어 있으며 특히 주성분인 torilin은 미백활성 등 다양한 효능이 보고되어 화장품 산업 등에서 새로운 소재로 제시되고 있다.^{13,18)} Torilin을 화장품 소재로 개발되기 위하여서는 효율적인 방법을 통하여 이를 확보하는 것이 필요하다.

본 연구에서는 사상자로부터 torilin을 효율적으로 추출하기 위한 추출조건을 비교하고 최적화된 추출방법을 도출하고자 하였다. 예비실험을 통하여 추출용매, 추출온도, 시료-용매 비율, 추출시간 등 여러 조건을 비교하였으며 이 중 torilin의 수율에 영향을 주는 것으로 나타난 추출용매, 추출온도, 시료-용매 비율 등에 대하여 반응표면 분석을 수행하였다. 추출조건에 따른 torilin의 함량은 HPLC를 이용하여 수행하였으며 표준품을 이용하여 사상자 추출물 당 torilin의 함량을 정량하였다(Fig. 2).

각 추출조건 범위의 일차변수 예비실험을 통하여 추출용매는 EtOAc와 MeOH의 혼합용매로 선정하였으며 EtOAc의 용매 조성을 30, 50, 70%로 선정하였다. 추출온도는 30, 40, 50°C, 시료당 추출용매의 비율은 추출용매 2 ml 당 600, 800, 1000 mg으로 선정하였다. 이러한 추출조건을 바탕으로 각 조건이 코드화된 변수 0이 되는 중심점(50% EtOAc, 40°C, 800 mg 시료/2 ml 용매)을 3개를 포함하는 총 15개의 추출조건을 프로그램을 이용하여 설정하였다. 이와 같이 선정된 추출조건으로 사상자를 추출한 후 각 시료의 torilin의 함량을 측정하였다. Table 1에 보이듯이 추출수율의 차이를 나타내어 1 g의 사상자 시료당 torilin의 수율은 3.57 mg에서 9.61 mg으로 상당한 차이를 나타내었다. 이는 추출조건이 torilin의 수율에 큰 영향을 나타내며 최적의 수율을 위한 추출조건의 최적화가 필요함을 시사하며 이에 최적화에 대한 연구를 수행하였다.

각 추출조건이 추출수율에 미치는 영향은 통계분석을 통

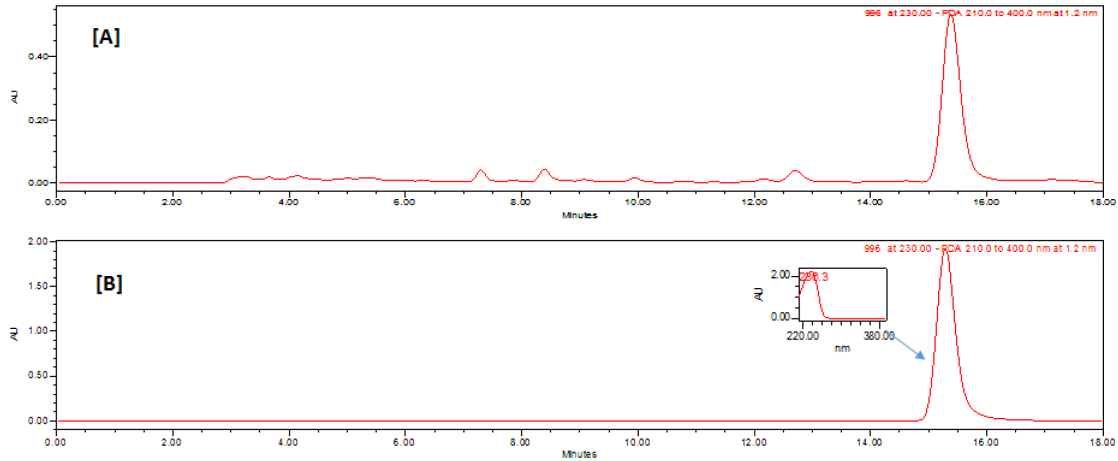


Fig. 2. (A) HPLC chromatogram of torilin and (B) HPLC chromatogram of *T. japonica* fruits extract prepared from extraction condition of center point (X_1, X_2 and $X_3=0$).

Table I. A Box-Behnken design for independent variables and their responses

Run order	Actual variables			Observed values
	Extraction solvent (EtOAc in MeOH, %) (X1)	Extraction temperature (°C) (X2)	Sample/solvent ratio (mg/2 ml) (X3)	Torilin (mg/g dried sample)
1	50 (0)	30 (-1)	600 (-1)	5.58
2	50 (0)	40 (0)	800 (0)	5.46
3	50 (0)	30 (-1)	1000 (1)	9.61
4	50 (0)	50 (1)	1000 (1)	7.44
5	30 (-1)	30 (-1)	800 (0)	5.81
6	30 (-1)	50 (1)	800 (0)	5.59
7	70 (1)	30 (-1)	800 (0)	6.05
8	70 (1)	50 (1)	800 (0)	5.49
9	30 (-1)	40 (0)	600 (-1)	3.57
10	30 (-1)	40 (0)	1000 (1)	6.48
11	70 (1)	40 (0)	600 (-1)	3.75
12	70 (1)	40 (0)	1000 (1)	6.93
13	50 (0)	40 (0)	800 (0)	5.31
14	50 (0)	50 (1)	600 (-1)	6.24
15	50 (0)	40 (0)	800 (0)	6.45

하여 살펴보았다. 각 추출조건의 계수의 유의성은 *t*-tests and *p*-values를 통하여 판단하였으며 ANOVA 분석을 통하여 torilin 수율에 대한 회귀식의 유의성을 판단하였다(Table II). Torilin 수율에 대한 추출조건이 미치는 영향은 이차다항식으로 다음과 같이 유도되었다.

$$\text{Torilin yield (mg/g dried sample)} = 5.740 + 1.440X_3 - 1.045X_1^2 + 1.040X_2^2 - 0.758X_2X_3$$

본 연구에서 비교한 세가지 추출조건 중 추출용매 당 시료의 양(X_3)과 추출용매(X_1^2) 및 추출온도(X_2^2)의 이차계수

가 유의성있는 영향을 나타내었으며 추출온도와 시료의 양의 상호계수(X_2X_3)도 유의성있는 영향을 나타내었다.

이러한 회귀식의 신뢰도는 16.99의 F value와 0.003의 낮은 *p* value를 통하여 적정한 것으로 판단하였으며 0.910의 lack of fit과 0.968의 R^2 값도 결과의 신뢰성을 뒷받침하였다(Table III).

Torilin의 수율에 미치는 각 추출변수의 영향은 반응표면곡선으로 나타낼 수 있다. 세가지 추출 인자 중 추출용매는 MeOH의 양이 증가할수록 torilin의 수율이 증가하다가 다시 감소하는 것을 확인할 수 있으며 시료의 비율이 증가할수록 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 3).

Table II. Regression coefficients and their significances in the second-order polynomial regression equation for torilin yield (mg/g dried sample)

	Coefficient	Standard error	<i>t</i> value	<i>p</i> value
Torilin (mg/g dried sample)				
Intercept	5.740	0.253	22.69	<0.001
X_1	0.096	0.155	0.621	0.562
X_2	-0.311	0.155	-2.009	0.101
X_3	1.440	0.155	9.295	<0.001
X_1^2	-1.045	0.228	-4.583	0.006
X_2^2	1.040	0.228	4.561	0.006
X_3^2	0.488	0.228	2.138	0.086
X_1X_2	-0.085	0.219	-0.388	0.714
X_1X_3	0.068	0.219	0.308	0.770
X_2X_3	-0.758	0.219	-3.458	0.018

이와 같이 추출조건은 사상자로부터 torilin의 추출수율에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였으며 이에 최적을 추출 조건을 도출하고자 하였다. 반응표면분석을 이용하여 최적의 추출조건으로는 1000 mg의 사상자 시료를 31.8% EtOAc 혼합 MeOH 2 ml로 30.0°C에서 추출하는 경우 10.4 mg의 torilin을 얻을 수 있는 것으로 예측되었다. 이러한 예상치를 확인하기 위하여 제시된 조건으로 사상자를 추출하여 torilin의 함량을 측정된 결과 9.9 mg의 torilin을 얻을 수 있었다. 이상의 결과는 최적화된 추출조건에서 예측값과 유사한 값으로 이러한 조건으로 추출한 경우 효율적으로 torilin의 확보가 가능함을 제시할 수 있다.

결론

본 연구에서는 미백기능 성분 등 천연물소재로의 발굴을 위한 torilin의 추출조건 최적화에 대한 연구를 수행하였다.

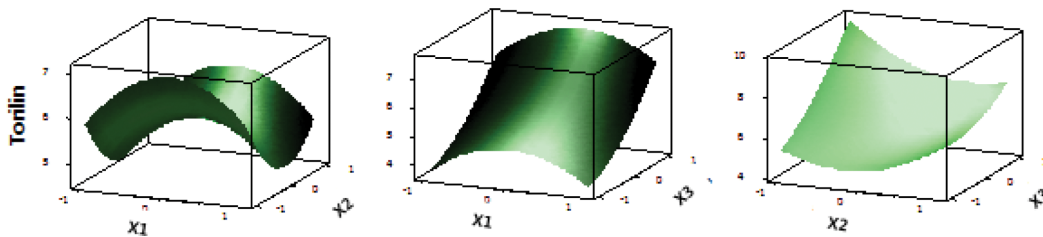


Fig. 3. Response surface plot analysis of extraction solvent (X_1), extraction temperature (X_2), and sample/solvent ratio (X_3) of torilin yield.

Table III. ANOVA for response surface regression equation

	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	<i>F</i> value	<i>p</i> value
Torilin (mg/g dried sample)					
Regression	9	29.363	3.263	16.99	0.003
Linear	3	17.438	5.813	30.27	0.001
Square	3	9.583	3.194	16.64	0.005
Interaction	3	2.342	0.781	4.07	0.083
Residual error	5	0.960	0.192		
Lack-of-fit	3	0.193	0.064	0.17	0.910
Pure error	2	0.767	0.384		
Total	14	30.323			

$R^2=0.968$, adjusted $R^2=0.911$

Table IV. Predicted and observed values of torilin yield under optimized conditions

Extraction conditions			torilin (mg/g dried sample)	
Extraction solvent (EtOAc in MeOH, %)	Extraction temperature (°C)	Sample/solvent ratio (mg/2 ml)	Predicted	Observed
31.8	30.0	1000.0	10.4	9.9

추출용매, 추출온도 및 시료-용매 비율이 torilin의 추출수율에 미치는 영향을 판단하고 반응표면분석을 이용하여 최적의 추출조건을 도출하였다. 본 연구를 통하여 최적의 추출조건으로 1000 mg의 사상자 시료를 31.8% EtOAc 혼합 MeOH 2 ml로 30.0°C에서 추출하는 경우 9.9 mg의 torilin을 얻을 수 있었다. 이러한 추출조건을 이용하여 사상자로부터 torilin을 효율적으로 추출 가능함을 제시하였으며 이는 추후 torilin의 개발에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 2015년도 충북대학교 학술연구지원사업의 교내연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 배기환 (2000) 한국의 약용식물, 교학사, 서울, p 213.
2. Endale, M., Lee, W. M., Kwak, Y. S., Kim, N. M., Kim, B. K., Kim, S. H., Cho, J., Kim, S., Park, S. C., Yun, B. S., Ko, D. and Rhee, M. (2013) Torilin ameliorates type II collagen-induced arthritis in mouse model of rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **16**: 232-242.
3. Park, H. W., Choi, S. U., Baek, N. I., Kim, S. H., Eun, J. S., Yang, J. H. and Kim, D. K. (2006) Guaiane sesquiterpenoids from *Torilis japonica* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.* **29**: 131-134.
4. Choi, Y., Lee, M. K., Lim, S. Y., Sung, S. H. and Kim, Y. C. (2009) Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1 β by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells. *Br. J. Pharmacol.* **156**: 933-940.
5. Youn, H. J., Lakritz, J., Rottinghaus, G. E., Seo, H. S., Kim, D. Y., Cho, M. H. and Marsh, A. E. (2004) Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* **25**: 409-414.
6. Park, W. S., Son, E. D., Nam, G. W., Kim, S. H., Noh, N. S., Lee, B. G., Jang, I. S., Kim, S. E., Lee, J. J. and Lee, C. H. (2003) Torilin from *Torilis japonica*, as a new inhibitor of testosterone 5 alpha-reductase. *Planta Med.* **69**: 459-461.
7. Ryu, J. H. and Jeong, Y. S. (2001) A new guaiane type sesquiterpene from *Torilis japonica*. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 532-535.
8. Kitajima, J., Suzuki, N., Satoh, M., Watanabe, M. (2002) Sesquiterpenoids of *Torilis japonica* fruit. *Phytochemistry* **59**: 811-815.
9. Lee, I. K., Lee, J. H., Hwang, E. I. and Yun, B. S. (2008) New guaiane sesquiterpenes from the fruits of *Torilis japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 1483-1485.
10. Rigopoulos, D., Gregoriou, S., Katsambas, A. (2007) Hyperpigmentation and melisma. *J. Cosmet. Dermatol.* **6**: 195-202.
11. Nieuweboer-Krobotova, L. (2013) Hyperpigmentation: types, diagnostics and targeted treatment options. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **S1**: 2-4.
12. Prota, G. (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **8**: 525-556.
13. Yun, C. Y., Kim, D., Lee, W. H., Park, Y. M., Lee, S. H., Na, M., Jahng, Y., Hwang, B. Y., Lee, M. K., Han, S. B. and Kim, Y. (2009) Torilin from *Torilis japonica* inhibits melanin production in alpha-melanocyte stimulating hormone-activated B16 melanoma cells. *Planta Med.* **75**: 1505-1508.
14. Cho, W. I., Choi, J. B., Lee, K., Chung, M. S. and Pyun, Y. R. (2008) Antimicrobial activity of torilin isolated from *Torilis japonica* fruit against *Bacillus subtilis*. *J. Food Sci.* **73**: 37-46.
15. Lee, J. W., Mo, E. J., Choi, J. E., Jo, Y. H., Jang, H., Jeong, J. Y., Jin, Q., Chung, H. N., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. (2016) Effect of extraction conditions of Red Ginseng on antioxidant activity, extraction yield and the contents of ginsenoside Rg1 and phenolics: Optimization using response surface methodology. *J. Ginseng Res.* **40**: 229-236.
16. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**: 965-977.
17. Kim, S. B., Jo, Y. H., Liu, Q., Ahn, J. H., Hong, I. P., Han, S. M., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. (2015) Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: Correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity and phenolic content. *Molecules* **20**: 19764-19774.
18. Song, D. H., Jo, Y. H., Ahn, J. H., Kim, S. B., Yun, C. Y., Kim, Y., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. (2018) Sesquiterpenes from fruits of *Torilis japonica* with inhibitory activity on melanin synthesis in B16 cells. *J. Nat. Med.* **72**: 155-160.

(2018. 1. 17 접수; 2018. 2. 23 심사; 2018. 2. 27 게재확정)