

세신으로부터 멜라닌 생성 억제 성분의 분리

최은향 · 최지영 · 이종구 · 오준석 · 김동춘 · 이희상 · 손종근 · 손애량¹ · 김정아 · 이승호*
영남대학교 약학대학, ¹거창도립전문대학

Isolation of Melanin Biosynthesis Inhibitory Compounds from the Roots of *Asarum sieboldii*

Eun Hyang Choi, Ji Young Choi, Jong Gu Lee, Joon Seok Oh, Dong Chun Kim,
Hee Sang Lee, Jong Keun Son, Son Ae Ryang¹, Jeong Ah Kim and Seung Ho Lee*

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

¹Department of Beauty Design, Geochang Provincial College, Geochang, 670-804, Korea

Abstract – Eight compounds were isolated from the roots of *Asarum sieboldii* and their structures were identified as (\pm)-car-3-ene-2,5-dione (**1**), (-)-asarinin (**2**), (-)-sesamin (**3**), eucarvone (**4**), methyleugenol (**5**), γ -asarone (**6**), pellitorine (**7**) and asarinol A (**8**) by analysis of spectral data. Among them, (-)-asarinin (**2**) showed the most potent inhibitory effect on melanogenesis, with inhibition rate of 66%.

Key word – *Asarum sieboldii*, melanogenesis inhibitor, (-)-asarinin, methyleugenol

세신은 쥐방울과(Aristolochiaceae)의 식물로 민족두리풀 *Asarum heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa 또는 족두리풀 *Asarum sieboldii* F. Maekawa의 뿌리를 약용한다. 세신의 성분으로는 정유로 methyleugenol, asarylketone, cineol, safrole, limonene, eucarvone (azulene), elemicin, kakuol, 1,8-cineol, γ -asarone 등을 함유하며, *N*-isobutyl-2,4,8,10-dodecatetraenamamide, pellitorine 등의 acidamide, (-)-asarinin, xanthoxylol, sesamin 등의 lignan 계열, aristolochic acid, aristolactam, higenamine 등의 alkaloid가 있으며, 기타 3,4,5-trimethoxytoluene, 2,3,5-trimethoxytoluene이 보고되어 있다.¹⁾ 세신의 추출물은 해열, 진정, 진통, 국소마취, 항염증, 면역억제 작용, 항알러지작용, 항균작용을 나타낸다고 보고되고 있다.²⁻³⁾

인간의 피부 색깔은 carotene, melanin, hemoglobin 등의 색소에 의해 결정되며 이 중 melanin이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Melanin은 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지^{4,5)}하는데 큰 역할을 하는 반면 멜라닌 색소의 침착은 흑색증, 주근깨, 노인성 검버섯 등의 원인이 된다.⁶⁾ Melanin은 tyrosine을 출발물질로 표피 기저층

에 존재하는 melanocyte 내의 소기관인 melanosome에서 생합성된다. Tyrosine은 멜라닌 세포내에서 tyrosinase에 의해 DOPA가 되고, 다시 이 효소에 의해 DOPAquinone으로 산화된다. 그 후 cysteine 또는 glutathione의 관여 여부에 따라 DOPAquinone이 DOPochrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone 단계를 거쳐 흑색 또는 갈색을 나타내는 알칼리 난용성의 eumelanin이 되거나, cysteinylDOPA, alanylhydroxy-benzothiazine을 거쳐 황색 또는 적색을 나타내는 알칼리 가용성의 pheomelanin 등의 melanin으로 합성된다. 일반적으로 melanin이라 함은 eumelanin을 가리킨다.⁷⁻⁹⁾

현재까지 천연물에서 분리된 melanin 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol,¹⁰⁾ 누룩곰팡이 *Aspergillus oryzae*의 secondary metabolite인 kojic acid,¹¹⁾ 우바우르시 *Uvae Ursi Folium*의 arbutin,¹²⁾ 상백피의 oxyresveratrol, dihydromoriin, artocarbene, 4-prenyloxyresveratrol¹³⁾ 등이 있다.

최근 melanocyte 내에서의 melanin 색소 생산에 관여하는 인자로 tyrosinase⁷⁾뿐만 아니라 dopachrome conversion factor,¹⁴⁾ blocking factor of tyrosinase 등의 melanin 생성을 촉진 내지는 억제하는 인자, prostaglandin (PG),¹⁵⁾ Interferon (INF),¹⁶⁾ 또는 melanocyte stimulating hormone (MSH),¹⁷⁻¹⁸⁾

*교신저자 (E-mail): seungho@yu.ac.kr
(FAX): 053-810-4654

MSH receptor activity나 vitamin D₃,¹⁹⁾ histamine, gene expression에 관여하는 인자²⁰⁾ 등 여러 가지 복잡한 요인들에 의해 진행된다는 것이 밝혀짐에 따라 melanocyte에서 melanin 생성을 종합적으로 억제하는 물질의 개발이 요구되고 있다.

연구자는 천연물로부터 미백화장품의 첨가제로 이용할 수 있는 물질을 개발하게 위하여 세신으로부터 분리한 천연물질들에 대한 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제 효과를 검토하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료 - 시료로 사용한 세신의 뿌리는 2006년 2월에 대구시내 약전골목에서 구입하여, 전문가의 감정을 받아 사용하였고, 표품은 본 연구실에서 보관 중이다.

기기 및 시약 - 용점은 Fisher-Johns의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000 (digital polarimeter, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec 를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. NMR은 Burker 250 MHz (DMX 250)을 사용하여 측정하였으며, 표준내부물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 사용하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였고, TLC plate는 Merck silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 60 F₂₅₄를 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Merck의 silica gel (70~230 mesh)를 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시약을 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5 N hyperchloric acid, cold ethanol ether (3:1), 1 N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 melanoma cell lines이다.

B-16 melanoma cell lines에서의 미백 활성 평가 - B-16 mouse melanoma cell lines을 EMEM (10% fetal FCS) 배지를 사용하여 T-75 culture flask에서 confluence가 될 때까지 배양하여 Culture dish에 cell number가 1×10^6 /dish 이상이 되도록 seeding 한 후 1일간 배양하였다. 그 후에 시험물질을 working concentration의 100배 이상으로 제조하여 0.5% DMSO 또는 ethanol 등의 용매에 녹인 후 첨가하여 1일간 배양하였다. 배지를 교환한 후 시험 물질을 첨가하고, IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)를 1 μ M이 되도록 첨가하여 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌의 양을 정량하였다. 배지를 버린 후 trypsin-EDTA (0.25/0.02%) 용액 1 ml로 처리한 뒤에 microcentrifuge tube에 옮겨 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상등액을 버리고 육안으로 control과 비교하였다. 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension

시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 후 최종농도가 0.5 N이 되도록 70% perchloric acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 후 상등액을 버리고 난 후 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether (3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시켰다. 그 건조물에 1 N NaOH 용액 1 ml를 첨가한 후 5분간 끓는 물에서 처리하여 멜라닌을 녹인 다음 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다.

활성물질의 분리 - 세신 6 kg을 methanol (MeOH)로 상온에서 5일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축한 결과 564 g의 extract를 얻었다. MeOH 추출액을 증류수에 현탁시키고 동량의 CH₂Cl₂ (MC)를 가하여, MC층과 수층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후 감압 농축하여 298 g의 MC 분획을 얻었다. 수층에 동량의 ethylacetate (EtOAc)를 가한 후 수층과 EtOAc층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후 감압 농축하여 15 g의 EtOAc분획을 얻었고, 나머지를 물 분획 (251 g)으로 하였다.

먼저 MC 분획 (298 g)을 지름 9 cm인 column에 silica gel을 65 cm 채우고, *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 loading하였다. 이동상으로는 *n*-hexane에 대한 EtOAc의 비율을 5% 단위로 증가시키는 기울기용리로 이동상을 유출시켜, 분획 1에서 분획 20을 얻었다. 이 과정에서 분획 8, 분획 10, 분획 13을 MeOH로 재결정하여 comp. 1 (3.95 g), comp. 2 (8.52 g), comp. 3 (2.17 g)을 분리 정제하였다.

위의 분획 중 분획 4 (7.82 g)를 silica gel 40 cm 채운 지름 6 cm의 column에 loading하였다. 이동상은 먼저 *n*-hexane으로 column을 포화시킨 후 *n*-hexane에 대한 MC를 0, 30, 50%순으로 유출시켜, 분획 4-1~4-7을 얻었다. 이 중 분획 4-6 (900 mg)를 MC/*n*-hexane 60%를 이동상으로 한 Prep. TLC를 실시하여 comp. 4 (36.2 mg)를 분리 정제하였다.

분획 6 (19.0 g)에 대해서는 silica gel에 sample을 흡착시켜 silica gel로 35 cm 채워져 있는 지름 8 cm의 column에 loading하였다. 먼저 *n*-hexane으로 column을 포화시킨 후 *n*-hexane에 대한 MC를 0, 20, 50, 60, 100%순으로 유출시켜 분획 6-1~6-5를 얻었다. 그 중 6-2에서 comp. 5 (4.40 g)를 분리 정제하였다.

분획 7 (8.21 g)은 지름 7 cm인 column에 silica gel을 40 cm 채우고 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 silica gel에 흡착시킨 sample을 loading하였다. 그 후 *n*-hexane에 대한 chloroform을 0, 20, 30, 50, 70, 100%순으로 유출시켜 분획 7-1~7-7을 얻었다. 이 중 분획 7-4 (4.23 g)을 지름 5 cm인 column에 silica gel로 40 cm 채우고 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일하게 만들어 시료를 loading하였다. 그 후 EtOAc:*n*-hexane=15:85 이동상을

유출시켜 분획 7-4-1~7-4-4를 얻었고, 그 중 분획 7-4-2 (2.11 g)를 지름 5 cm인 column에 silica gel로 36 cm 채우고 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일하게 만든 후 silica gel에 흡착시킨 시료를 loading하였다. 그 후 MC:*n*-hexane=15:85 이동상을 유출시켜 분획 7-4-2-1~7-4-2-3을 얻었으며, 그 중 분획 7-4-2-2를 분리 정제하여 comp. 6 (397 mg)을 얻었다.

분획 15 (6.65 g)을 silica gel에 sample을 흡착시켜 지름 5 cm에 silica gel로 45 cm 채워진 column에 loading하였다. 먼저 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 EtOAc:*n*-hexane=15:85 이동상을 유출시켜 분획 15-1~15-7을 얻었다. 이 중 분획 15-4를 chloroform 존재 하에서 재결정하여 comp. 7 (675 mg)을 얻었다.

분획 19 (6.12 g)를 지름 7 cm인 column에 silica gel로 40 cm 채우고 *n*-hexane을 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 silica gel에 흡착시켜 loading하였다. 이동상을 *n*-hexane 100%에서 EtOAc의 비율을 5%씩 높여가는 기울기용리를 사용하여 유출시켜 분획 19-1~19-4를 얻었다. 그 중 19-2에서 comp. 8 (145 mg)을 분리 정제하였다.

Compound 1. (±)-Car-3-ene-2,5-dione : Pale yellow needle; mp 93-94°C; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 1.32 (3H, s, 8^{*}-CH₃), 1.33 (3H, s, 9^{*}-CH₃), 1.98 (3H, 10-CH₃), 2.33 (2H, m, H-6, H-1), 6.50 (1H, m, H-4); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 15.8 (C-8^{*}), 16.6 (C-9^{*}), 29.5 (C-10), 34.0 (C-7), 39.4 (C-6), 40.2 (C-1), 138.0 (C-4), 150.4 (C-3), 194.8 (C-2^{*}), 195.4 (C-5^{**}), ^{*}, ^{**} : may be interchanged.

Compound 2. (-)-Asarinin : White needle, mp 118°C; [α]_D²⁸ -116.2 (c=0.30, CHCl₃); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 2.87 (1H, m, H-1), 3.30 (2H, m, H-5, H-4β), 3.83 (2H, m, H-8a, H-4a), 4.07 (1H, d, J=9.5 Hz, H-8β), 4.37 (1H, d, J=7.2 Hz, H-2), 4.81 (1H, d, J=5.3 Hz, H-6), 5.94 (2H, s, -OCH₂O-), 5.95 (2H, s, -OCH₂O-), 6.75-6.87 (6H, m, H-2', H-2, H-5', H-5, H-6', H-6); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 50.1 (C-1), 54.6 (C-5), 69.6 (C-8), 70.8 (C-4), 81.9 (C-2), 87.6 (C-6), 100.9 (-OCH₂O-), 101.0 (-OCH₂O-), 106.3 (C-2'), 106.5 (C-2), 108.1 (C-5', C-5), 118.6 (C-6'), 119.6 (C-6), 132.1 (C-1'), 135.0 (C-1), 146.5 (C-3'), 147.1 (C-4), 147.5 (C-4'), 147.9 (C-3)

Compound 3. (-)-Sesamin : Light green needles; mp 118°C; [α]_D²⁸ -59.2 (c=0.05, CHCl₃); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 3.05 (2H, m, H-1α, H-5α), 3.88 (2H, dd, J=9.2, 3.3 Hz, H-4β, H-8β), 4.24 (2H, m, H-4α, H-8α), 4.72 (2H, d, J=4.0 Hz, H-2β, H-6β), 5.95 (4H, s, 2× -OCH₂O-), 6.76-6.85 (H-5', H-5, H-6', H-6, H-2', H-2); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 54.3 (C-1, C-5), 71.6 (C-4, C-8), 85.7 (C-2, C-6), 101.0 (2× -OCH₂O-), 106.4 (C-2', C-2), 108.1 (C-5', C-5), 119.3 (C-6', C-6), 135.0 (C-

1', C-1), 147.0 (C-4', C-4), 148.0 (C-3', C-3)

Compound 4. Eucarvone : Yellow oil with odour resembling menthone; bp : 82.5~84°C; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 1.02 (6H, s, 6-CH₃), 1.87 (3H, s, 2-CH₃), 2.61 (2H, s, H-7), 5.70 (1H, dd, J=11.5, 8.0 Hz, H-4), 5.91 (1H, d, J=11.5 Hz, H-5), 6.42 (1H, d, J=8.0 Hz, H-3); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 20.4 (2-CH₃), 27.2 (6-CH₃), 27.4 (6-CH₃), 32.3 (C-6), 54.4 (C-7), 122.5 (C-4), 134.4 (C-3), 138.6 (C-2), 149.2 (C-5), 200.8 (C-1)

Compound 5. Methyleugenol : Clear oil; ¹H-NMR (250 MHz, acetone-*d*₆) : δ 3.31 (2H, d, J=6.6 Hz, H-1'), 3.75 (3H, s, 4-OCH₃), 3.76 (3H, s, 3-OCH₃), 5.08 (2H, m, H-3'), 5.93 (1H, m, H-2'), 6.68-6.86 (3H, m, aromatic protons); ¹³C-NMR (63 MHz, acetone-*d*₆) : δ 39.9 (C-1'), 55.5 (4-OCH₃), 55.7 (3-OCH₃), 112.4 (C-5), 112.9 (C-2), 115.1 (C-3'), 120.7 (C-6), 133.0 (C-1), 138.5 (C-2'), 148.3 (C-4), 149.9 (C-3)

Compound 6. γ-Asarone : Oil. mp 25 ; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 3.31 (2H, d, J=36.4 Hz, H-1'), 3.78 (3H, s, 5-OCH₃), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃), 3.86 (3H, s, 2-OCH₃), 5.04 (2H, m, H-3'), 5.95 (1H, m, H-2'), 6.51 (1H, s, H-3), 6.67 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 33.6 (C-1'), 56.2 (2-OCH₃), 56.5 (4-OCH₃), 56.6 (5-OCH₃), 97.8 (C-3), 113.8 (C-6), 115.2 (C-3'), 119.9 (C-1), 137.3 (C-2'), 142.9 (C-5), 147.8 (C-4), 151.2 (C-2)

Compound 7. Pellitorine : Needles, mp 69 ; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 0.91 (3H, s, H-10), 0.93 (3H, s, H-3'), 0.96 (3H, s, H-4'), 1.32 (4H, m, H-8, H-9), 1.44 (2H, m, H-7), 1.82 (1H, m, H-2'), 2.18 (2H, dd, J=12.5, 6.2 Hz, H-6), 3.18 (2H, t, J=12.9, 6.57 Hz, H-1'), 5.58 (NH, br s), 5.18 (1H, d, J=15.0 Hz, H-2), 6.17 (1H, m, H-4), 7.20 (1H, m, H-3); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) : δ 14.4 (C-10), 20.5 (C-3', C-4'), 22.9 (C-9), 28.9 (C-7), 29.0 (C-2'), 31.8 (C-8), 33.3 (C-6), 47.3 (C-1'), 122.0 (C-2), 128.6 (C-4), 141.8 (C-3), 143.8 (C-5), 166.9 (C-1)

Compound 8. (±)-Asarinol A : Needles. mp 80~82°C; [α]_D²⁴ 0 (c=0.56, CHCl₃); ¹H-NMR (250 MHz, acetone-*d*₆) : δ 1.02 (3H, s, 9-CH₃), 1.18 (3H, s, 8-CH₃), 1.65 (2H, H-1, H-6), 1.70 (3H, 10-CH₃), 4.28 (1H, H-5), 6.50 (1H, H-4); ¹³C-NMR (63 MHz, acetone-*d*₆) : δ 14.2 (C-9), 15.5 (C-10), 24.3 (C-7), 28.4 (C-8), 34.1 (C-1), 36.7 (C-6), 61.4 (C-5), 136.0 (C-3), 142.9 (C-4), 195.1 (C-2)

결과 및 고찰

세신의 화학성분을 규명하고 분리된 물질의 미백활성을

측정하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 각종 크로마토그래피를 실시하여 물질을 분리한 결과 총 8종의 화합물을 분리, 구조를 규명하였으며, 각 화합물의 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제 효과를 측정하였다.

Compound 1은 연한 노란색의 침상결정 (MeOH)으로 vanillin sulfuric acid 시약에 의하여 보라색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.32, 1.33에서 2개의 singlet methyl signal이 관찰되었고, δ 1.98에서 한 개의 vinyl methyl group에 해당하는 signal이 관찰되었다. δ 2.33에서 2개의 methine proton signal이 관찰되었고, δ 6.50에서 vinyl proton을 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 15.8, 16.6에서 methyl기를 확인하였으며, δ 194.8, 195.4에서 down shift 된 2개의 ketone signal이 관찰되었다. 이를 바탕으로 (\pm)-car-3-ene-2,5-dione으로 추정하고, 문헌²¹⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 2는 백색의 침상결정 (MeOH)으로 vanillin sulfuric acid 시약에 의하여 갈색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 2.87, 3.30에서 methine proton에 기인하는 1H분의 signal이 관찰되었고, δ 4.37, 4.81에서 각각 benzylic hydrogen에 기인하는 1H분의 doublet ($J=7.17, 5.29$ Hz)이 관찰되었다. 그리고 δ 5.94, 5.95에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되었고, δ 6.75, 6.87사이에서 aromatic ring에 기인하는 signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 101.1에서 methylenedioxy group에 기인하는 carbon signal이 관찰되었고, δ 132.1에서 axial aryl group, δ 135.0에서 equatorial aryl group에 기인하는 signal이 관찰됨으로,²²⁾ 이 화합물을 (-)-asarinin으로 추정하고, 문헌²³⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 3은 녹색의 침상결정 (MeOH)으로 vanillin sulfuric acid 시약에 의하여 갈색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 compound 2의 spectrum과 매우 유사한 양상을 보였다. Compound 2의 $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 관찰되었던 signal이 compound 3에서 유사한 위치에 peak의 수가 반으로 줄어서 나타나는 것으로 보아 compound 3은 대칭 구조를 지니고 있는 것으로 추정하였고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 135.0에서 equatorial aryl group에 기인하는 signal이 관찰됨으로, 이를 토대로 이 화합물을 (-)-sesamin으로 추정하고 문헌²³⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 4는 menthone과 비슷한 향을 띠는 yellow oil로, vanillin sulfuric acid 시약에 의하여 붉은색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.02에서 gem-dimethyl group의 signal로 추정되는 2개의 methyl group에 해당하는 signal과 δ 1.87에서 1개의 methyl group에 해당하는 signal이 관찰되었고, δ 5.70에 나타난 peak는 doublet of doublets

로 갈라졌고, 그 J value가 11.5 Hz, 8.0 Hz로, J value가 11.5 Hz인 δ 5.91의 doublet peak와 J value가 8.0 Hz인 δ 6.42의 doublet peak와 coupling하고 있다고 추정된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 20.4, 27.2, 27.4에서 3개의 methyl signal이 관찰되었고, δ 200.8에서 down shift된 ketone carbon signal이 관찰되었다. 이를 바탕으로 eucarvone로 추정하고 문헌²⁴⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 5는 oil로, vanillin sulfuric acid 시약에 의해 노란색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 3.75, 3.76에서 methoxy group의 proton signal이 나타나고, δ 6.68- δ 6.86의 aromatic ring에 기인하는 3H분의 signal을 보고 ABX type의 3개의 치환기를 가지고 있다고 추정할 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 39.9, 115.1, 138.5의 signal로 allyl group의 존재를 추정할 수 있고, δ 55.5, 55.7에 methoxy group의 signal을 확인할 수 있다. 이를 토대로 methyleugenol로 추정하고 문헌²⁵⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 6은 oil로 얻어졌으며, vanillin sulfuric acid 시약에 의해 갈색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 compound 5에서와 같이 δ 3.31에 2H분에 해당하는 proton signal이 나타나고, δ 5.04에 2H분, δ 5.95에는 1H분의 proton signal이 나타난다. 다른 점은 compound 5는 2개의 methoxy group이 나타난 반면, compound 6에서는 δ 3.78, 3.81, 3.86에 각각 3H분의 proton signal이 나타나 총 3개의 methoxy group이 존재하고, aromatic ring에 기인하는 2H분의 proton signal이 나타나는 것으로 보아 compound 5의 aromatic ring의 proton이 methoxy group으로 치환된 것으로 추정하였다. 또한 aromatic ring의 2H의 signal이 singlet으로 나타나 서로 coupling하지 않는다고 추정된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 56.2, 56.5, 56.6에서 methoxy group에 해당하는 3개의 signal이 나타나고, δ 33.6의 methylene signal과 δ 115.2의 methylene signal, δ 137.3의 methine signal을 보고 allyl group의 존재를 확인하고 γ -asarone으로 추정하고 문헌²⁶⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

Compound 7은 침상결정 (chloroform)으로, vanillin sulfuric acid 시약에 열은 남색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 0.91, 0.93, 0.96에서 3개의 terminal methyl group에 해당하는 signal이 보이고, δ 1.82에서 2개의 methyl기와 인접한 methine proton signal이 관찰되어 isopropyl group이 존재하는 것으로 추정된다. δ 5.58에서 NH에 기인하는 것으로 추정되는 broad한 proton signal이 나타난다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 22.9- δ 33.3에 olefinic proton signal이 나타나는 것으로 보아 chain이 존재하는 것으로 추정하고 문헌²⁷⁻²⁸⁾상의 spectral data와 비교하여 pellitorine으

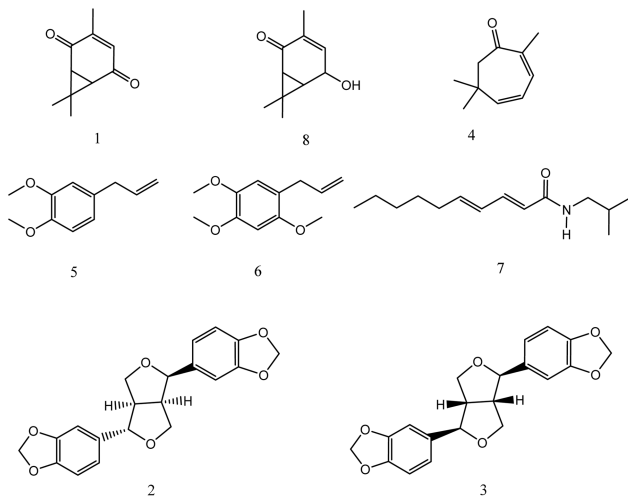


Fig. 1. The structures of compounds isolated from the Roots of *Asarum sieboldii*.

로 구조를 결정하였다.

Compound **8**은 침상결정으로 vanillin sulfuric acid 시약에 의해 보라색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.02, 1.18에서 2개의 singlet methyl group의 signal이 관찰되고, δ 1.65에서 2개의 methine proton이 관찰된다. δ 1.70에서 한 개의 vinyl methyl proton의 signal이 보이고, δ 6.50에서 한 개의 vinyl proton의 signal이 관찰된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 61.4에서 hydroxyl group에 인접한 methine carbon의 signal이 관찰되고, δ 136.0과 δ 142.9에 peak가 나타나는 것으로 보아, double bond가 존재하는 것으로 추정되고, δ 195.1에 carbonyl carbon signal이 나타난다. 이를 바탕으로 (\pm)-asarinol A로 추정하고 문헌²¹⁾상의 spectral data와 비교하여 구조를 결정하였다.

분리된 화합물의 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 억제 효과는 arbutin을 비교 물질로 하여 측정하였으며 분리된 화합물 중 (-)-asarinin (**2**)이 $10\ \mu\text{g}/\text{m}$ 에서 inhibition(%)이 66으로 melanin 생성 저해 활성이 가장 우수한 것으로 나타났으나, 분리된 화합물 모두 arbutin보다는 약한 활성을 나타내었다.

결 론

1. 피부의 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자 세신의 MeOH 추출물의 CH_2Cl_2 분획으로부터 8종의 화합물을 분리하였다.

2. 분리된 8종의 화합물들은 물리화학적 특성 및 각종 spectral data의 검토 결과 각각 (\pm)-car-3-ene-2,5-dione (**1**), (-)-asarinin (**2**), (-)-sesamin (**3**), eucarvone (**4**), methyleugenol (**5**), γ -asarone (**6**), pellitorine (**7**), (\pm)-

Table I. Inhibitory effect of compounds isolated from the Root of *Asarum sieboldii* in cultured B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro* ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$)

Comp. No	Comp. Name	Inhibition(%)
Comp. 1	(\pm)-car-3-ene-2,5-dione	-
Comp. 2	(-)-asarinin	66
Comp. 3	(-)-sesamin	-
Comp. 4	eucarvone	-
Comp. 5	methyleugenol	36
Comp. 6	γ -asarone	-
Comp. 7	pellitorine	-
Comp. 8	(\pm)-asarinol A	-
Positive control	arbutin	56

asarinol A (**8**)로 구조를 규명하였다.

3. 각 화합물의 B-16 melanoma cell lines에서의 melanin 생성 저해 활성을 arbutin을 비교 물질로 하여 측정한 결과, (-)-asarinin (**2**)이 $10\ \mu\text{g}/\text{m}$ 에서 66% 저해율로 가장 높게 나타났다.

사 사

본 연구에 참여한 오준석, 김동춘은 BK21 연구 사업단으로부터 장학금을 수여 받는 학생임.

인용 문헌

1. 생약학교재편찬위원회 (2006) 생약학, 151-153 동명사
2. Lee, J. Y., Moon, S. S., Hwang, B. K. (2005) Isolation and antifungal activity of kakuol, a propiophenone derivative from *Asarum sieboldii* rhizome, *Pest management science*, **61**: 821-825.
3. Hashimoto Kazunori *et al.* (2004) Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldii*, *Planta Med.*, **60**: 124-127.
4. Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y. (1988) Induction of melanogenesis suppression cellular pharmacology and mode of differential action, *Pigment Cell Res.*, **1**: 367.
5. Matubara, H. (1998) Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells, *Natural Product Sciences.*, **4**: 3.
6. Ortonne, J. P., Nordlund, J. J. (1998) Mechanism that cause abnormal skin color, *In Physiology and Pathophysiology*, New York, Oxford University Press, 489-502.
7. Hearin, V. J., Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment, *Int. J. Biochem.*, **19**: 1141.

8. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.*, **75**: 122.
9. Pavel, S., Muskiet, F. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report, *Cancer Detection and Prevention*, **6**: 311.
10. Kusano, G., Shibano, M. (1994) *Food & Food Ingredients J. Jnp* **161**: 73.
11. Cabanes, J., Chazarra, S. (1994) Kojic acid, a cosmetin skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
12. Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M., Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**: 206-212.
13. Shin N. H. *et al* (1998) Oxysresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **243**: 801-803.
14. Korner, A. M., Pawelek, J. (1980) Dopachrome conversion : a possible control point in melanin biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.*, **75**: 192.
15. Kreiner, P. W., Gold, C. J., Keirns, J. J., Brock, W. A., Bitensky, M. W. (1973) Hormonal control of melanocytes : MSH-sensitive adenylyl cyclase in the Cloudman melanoma. *Yale J. Biol. Med.*, **46**: 583.
16. Giacomini, P. L. *et al* (1985) Immunochemical analysis of the modulation of human melanoma-associated antigens by DNA recombinant immune interferon. *Immunol.*, **135**: 288.
17. Sawyer, T. K. *et al* (1983) α -Melanocyte stimulating hormone. *Amer. Zool.*, **23**: 529.
18. Pilar, A., Urabe K., Kobayashi T., Tsukamoto K., and Vincent J. H., (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.*, **34**: 25650.
19. Fukushima, T. M., Tagami, H. (1986) Stimulation of melanogenesis by cholecalciferol in cultured human melanocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*, 451.
20. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y., Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.*, **100**: 150s.
21. Hashimoto, K., Katsuhara, T., Itoh, H., Ikeya, Y., Okada, M. (1990) Mitsuhashi, H., Monoterpenes from *Asiasari radix* from *Asiasarum* sp., *Phytochemistry*, **29**: 3571-3574.
22. Pelter, A., Ward, R. S., Nishino, C. (1977) Revised structures for epiaschantin and epimagnolin, *Tetrahedron letters: the international organ for the rapid publication of preliminary communications in organic chemistry*, **18**: 4137-4140.
23. Zhang, F. *et al* (2005) A new amide from *Asarum forbesii* Maxim., *Journal of Asian natural products research*, **7**: 1-5.
24. Ronald F., Childs, Yee-chee Hor (1977) Comparison of the charge distributions and barriers to ring inversion of protonated eucarvone and its boron trihalide adducts., *Canadian Journal of Chemistry*, **55**: 3495-3500.
25. Meepagala, K. M., Sturtz, G., Wedge, D. E. (2002) Antifungal Constituents of the Essential Oil Fraction of *Artemisia dracunculula* L. Var. *dracunculula*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 6989-6992.
26. Ruchi Acharya *et al* (2002) A mild and convenient procedure for the conversion of toxic β -asarone into rare phenylpropanoids : 2,4,5-trimethoxycinnamaldehyde and γ -asarone, *J. Nat. Prod.*, **65**: 764-765.
27. Park, I. K., Lee, S. G., Shin, S. C., Park, J. D., Ahn, Y. J., (2002) Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* Fruits against three mosquito species, *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1866-1870.
28. Ley, Jakob P. *et al* (2004) Stereoselective Enzymatic Synthesis of cis-Pellitorine, a Taste Active Alkamide Naturally Occurring in Tarragon, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**: 5135-5140.

(2007년 11월 20일 접수)