

전호의 멜라닌 생성 억제 물질

김청택* · 김원찬 · 진무현 · 김호정 · 강상진 · 강세훈 · 정민환¹ · 임영희¹

엘지생활건강 화장품 연구소, ¹엘지화학 분석센터

Inhibitors of Melanogenesis from the Roots of *Peucedanum praeruptorum*

Cheong-Taek Kim*, WonChan Kim, Mu Hyun Jin, Ho-Jeong Kim, SangJin Kang,
Seh-Hoon Kang, Min-Hwan Jung¹, and Younghee Lim¹

Cosmetics R&D Center, LG Household & Health Care, Daejeon 305-343, Korea

¹Analytical R&D Center, LG Chem., Daejeon 305-380, Korea

Abstract – A chemical investigation of *Peucedanum praeruptorum* has resulted in the isolation of 3 khellactone derivatives, which have inhibitory effects on melanogenesis in B16 mouse melanoma cell lines. The khellactone derivatives were isolated from the crude extract of the roots of *Peucedanum praeruptorum* by a combination of adsorption chromatography and HPLC. The structures of isolated compounds were identified as 3',4'-diangeloyl-cis-khellactone, 3'-angeloyl-4'-seneciroyl-cis-khellactone and, 3',4'-diseneciroyl-cis-khellactone by ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectral studies and by comparisons of spectral data with reported literatures.

Keywords – *Peucedanum praeruptorum* Dunn; 3',4'-diangeloyl-cis-khellactone; 3'-angeloyl-4'-seneciroyl-cis-khellactone; 3',4'-diseneciroyl-cis-khellactone; B16 mouse melanoma cell lines; melanogenesis; melanin

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피내에서의 melanin 색소의 이상적 증가에 기인하며, melanin은 표피기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성된다. Melanin의 주된 생성과정은 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 DOPA, dopaquinone이 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성하는 것으로 되어 있다.^{1,2)} 상기의 색소침착을 치유하기 위해 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, glucosamin, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다.^{3,5)}

본 실험에서는 피부의 과색소침착에 의한 기미, 주근깨 등의 치료제를 개발하고자 멜라노마 세포 시험법(B16 mouse melanoma assay)⁶⁾을 이용하여 200여 종의 생약을 대상으로 멜라닌 생성 억제 효능을 검색한 결과, 전호 추출물이 매우

우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 전호는 *Peucedanum praeruptorum* Dunn의 뿌리로, 예로부터 기침, 천식 및 후두염의 치료제로 사용되어 왔으며,⁷⁾ 전호의 주요한 성분으로는 praeruptorins로 명명된 pyranocoumarin과 이들의 glucoside derivative이 보고되어 있다.^{8,9)}

전호를 100% 메탄올로 추출하여 얻은 추출물을 정제수에 현탁한 다음, 극성이 다른 2개의 용매(ethylacetate and n-butanol)로 순차적으로 분획하여 얻은 용매 분획들에 대해 멜라닌 생성 억제 시험을 한 결과, ethylacetate분획에서 강한 활성을 관찰하였다. 따라서 ethylacetate분획을 각종 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 멜라닌 생성 억제 물질들을 분리하였으며, 각종 spectral data를 바탕으로 각각의 구조를 동정하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용된 전호는 *Peucedanum praeruptorum* Dunn의 뿌리로 중국 연변에서 구입하여 사용하였다. 감정은 중국 연변의학원 약학부 박 호일교수가 했으며, 표본은 LG생활건강 화장품연구소에 보관하였다.

*교신저자(E-mail) : ctkim@lgcare.co.kr

시약 및 기기 - 칼럼크로마토그래피는 silica gel 60(230-400 mesh, Merck)과 Sephadex LH-20(20-100 μ , Pharmacia)을, 박층크로마토그래피용 precoated plate는 silica gel 60F₂₅₄(Merck Art.5715)를 사용하였다. HPLC column은 YMC pack-sil column을, mass spectra는 AutoSpec mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)를, NMR spectra는 Bruker DRX-400 를 사용하여 측정하였다. 세포배양을 위해 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (fetal bovine serum), antibiotics와 Trypsin(2.5%)을 Gibco에서 구입하였으며, 그외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

추출 및 분리 - 전호 2 Kg을 메탄올로 추출하여 수득한 추출물(180 g)을 정제수 5 L에 현탁한 다음 ethylacetate 그리고 *n*-butanol로 순차적으로 분획하여 얻은 각각의 분획들에 대해 멜라닌 생성저해 효과를 실험한 결과 ethylacetate 분획(95 g)이 멜라닌 생성 저해 효과가 있음을 확인하였다 (IC₅₀<10 ug/ml). 따라서, ethylacetate분획을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(1000 g, 70-230 mesh, Merck, *n*-hexane:EtOAc=10:1--1:3)하여 5개의 분획(Fr.1-5, each of 2,000 ml)으로 나누어 멜라닌생성 억제 효과를 검색한 결과, Fr.4(30 g)에서 강한 활성을 확인하였다(IC₅₀=5 ug/ml). Fr.4를 실리카겔 칼럼크로마토그래피(300 g, 230-400 mesh, Merck *n*-hexane:EtOAc=5/1)를 실시하여 3개의 성분을 분리하였으며, 이를 EtOAc/*n*-hexane으로 재결정하여 compound I(200 mg), compound II(250 mg), compound III(400 mg)를 순수하게 얻었으며, spectral(¹H and ¹³C NMR, MS) data(Table I, II)를 바탕으로 구조를 확인하였다.

Table I. ¹H NMR spectral data of 3 pyranocoumarins (ppm from TMS in CDCl₃, coupling constants (J, Hz))

H position	Compound I	Compound II	Compound III
H-3	6.21 (9.5)	6.21 (9.5)	6.20 (9.5)
H-4	7.59 (9.5)	7.58 (9.5)	7.58 (9.5)
H-5	7.35 (8.6)	7.35 (8.6)	7.34 (8.6)
H-6	6.81 (8.6)	6.80 (8.6)	6.80 (8.6)
H-3'	5.45 (4.9)	5.40 (4.9)	5.36 (4.9)
H-4'	6.70 (4.9)	6.65 (4.9)	6.62 (4.9)
Me-2'	1.49 1.46	1.49 1.46	1.46 1.42
H-2" senecioidyl		5.62	5.67
H-3" angeloyl	6.12 6.02	6.10	
Me-2"(Se)	1.86 1.83	1.86	
Me-3"(An) Me-3"(Se)	1.98/1.96	1.96 2.19/1.87	2.19/2.15, 1.89/1.88

Table II. ¹³C NMR spectral data of 3 pyranocoumarins (ppm from TMS in CDCl₃)

C position	Compound I	Compound II	Compound III
C-2	159.7	159.8	159.9
C-3	113.3	113.3	113.2
C-4	143.2	143.1	143.2
C-5	129.2	129.1	129.0
C-6	114.4	114.3	114.3
C-7	156.7	156.7	156.8
C-8	107.6	107.7	107.6
C-9	154.1	154.0	154.1
C-10	112.5	112.5	112.5
C-2'	77.5	77.5	77.7
C-3'	70.2	70.3	69.4
C-4'	60.2	59.5	59.8
Me-2'	25.4 22.5	25.5 22.5	25.1 22.7
C-1"(An) C-1"(Se)	166.5/166.3	166.3 165.0	165.2/165.1
C-2"(An) C-2"(Se)	127.4/127.0	127.2 115.1	115.3(*2)
C-3"(An) C-3"(Se)	139.8/138.4	139.4 157.9	158.2/157.5
Me-2" Angeloyl	20.4 20.3	20.4 ^a	
Me-3"(An) Me-3"(Se)	15.8/15.6	15.7 27.4/20.3 ^a	27.5/20.4, 27.4/20.3

^a interchangeable

Compound I - White powders from *n*-hexane-EtOAc; EI-MS *m/z* 426.47 (M⁺) calculated for C₂₄H₂₆O₇; ¹H-NMR data (Table I); ¹³C-NMR data (Table II).

Compound II - White powders from *n*-hexane-EtOAc; EI-MS *m/z* 426.47 (M⁺) calculated for C₂₄H₂₆O₇; ¹H-NMR data (Table I); ¹³C-NMR data (Table II).

Compound III - White powders from *n*-hexane-EtOAc; EI-MS *m/z* 426.47 (M⁺) calculated for C₂₄H₂₆O₇; ¹H-NMR data (Table I); ¹³C-NMR data (Table II).

세포배양 - B16 mouse melanoma을 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.¹⁰⁾

시험물질조제 - 0.3% DMSO를 음성대조군으로, 1 mmol (273 μ g/ml) arbutin을 양성대조군으로 사용하였으며, compound I, compound II, compound III의 농도는 모두 0.01 mmol로 조제하였다.

멜라닌 생성 억제 효능 평가(B16 mouse melanoma

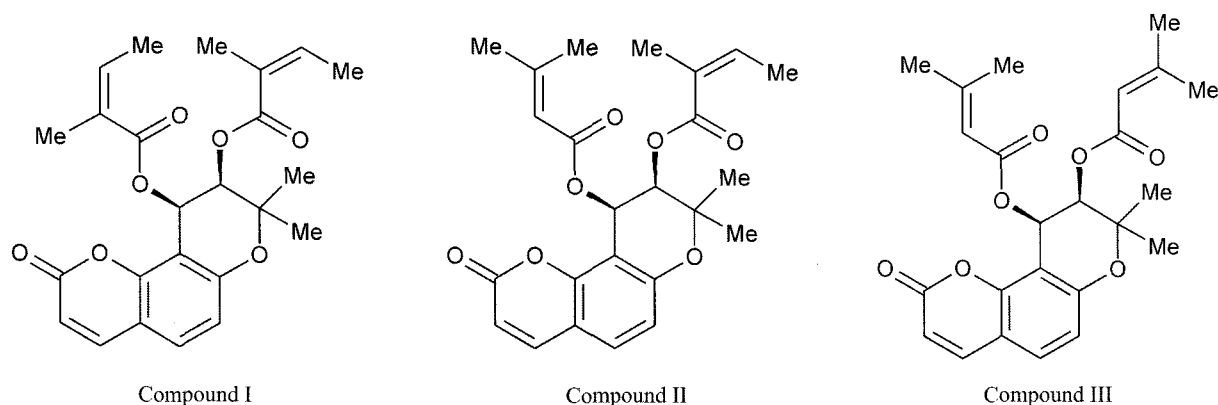


Fig. 1. Structures of compound I, II and III from *Peucedanum praeruptorum*.

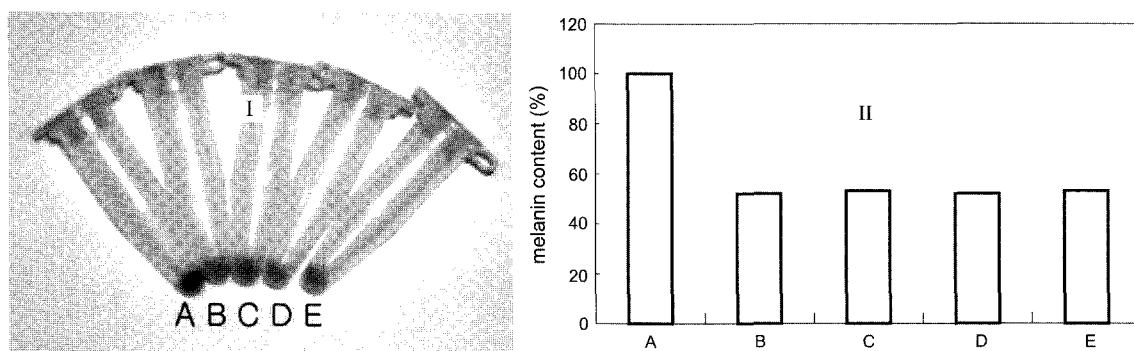


Fig. 2. I. B16 melanoma cell pellets treated for 3 days with 0.3% DMSO (A:control), 1mmol Arbutin (B:positive control), 0.01 mmol compound I (C), II (D) and III (E). II. Melanin contents in 10^6 cells in samples in I (n=3).

assay) – 60 mm petridish에 dish당 3×10^4 개의 세포를 깔아주고 4시간 경과 후, 각 시험물질을 처리한다. 시료처리 3일 후 0.25% Trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 수확한 다음, 이를 원심 분리하여 cell pellet을 얻었으며, cell pellet의 색깔을 육안으로 판정하였다. 또한, 각 시료들의 멜라닌 생성 저해효과를 정량화하기 위해 아래와 같은 실험을 수행하였다. 상기에서 얻은 cell pellet들을 각각 phosphate buffered saline용액에 현탁하여 세포수를 coulter counter (ZM, Coulter Co.)로 측정하여 1×10^6 세포수당 1 N NaOH 용액 1 ml을 넣고 세포를 녹인 다음, 490 nm에서 흡광도 ($A_{490}/10^6$ cells)를 측정하여, 각각의 cell pellet에 존재하는 멜라닌 양을 합성멜라닌을 사용하여 미리 작성한 표준직선으로부터 계산하였으며, 시험물질을 처리하지 않은 cell pellet의 멜라닌 양과 비교하여 각 시험물질이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

결과 및 고찰

Compound I, II, III의 구조분석 – Compound I, II, III

는 모두 흰색의 분말로, EI-mass spectrum에서 분자이온 피크가 세 물질 모두 m/z 426.47이었으며, molecular composition분석결과 탄소, 수소 및 산소의 비율은 각각 67.59%, 6.15% 및 26.26%였다. 이로부터 compound I, II, III의 분자식이 $C_{24}H_{26}O_7$ 임을 확인하였다. 또한, 각 물질의 구조는 NMR data의 검토에 의하여 결정되었다(Table I & II, Fig. 1).

NMR spectra(Table I & II)에서 H-3과 H-4 peak는 AB quartets($J_{AB}=9.5$ Hz)로 나타났다. 이 중, H-4는 δ 7.59와 7.58 사이에서 doublet, H-3는 δ 6.22와 6.20 사이에서 doublet의 peak를 보였다. H-5 peak는 δ 7.36과 7.34 사이에서, H-6 peak는 δ 6.82와 6.80 사이에 나타났다. 위와 같이 coumarin과 benzene proton에 해당되는 peak value는 khellactone derivative와 C-7과 C-8에 각각 alkyloxy chain과 alkyl chain이 결합된 simple coumarin의 peak value에 적합한 것이다.¹¹⁾ 각 화합물의 C-3'과 C-4'의 배열은 $J_{34}=4.9$ Hz로부터 cis configuration임을 확인하였다.¹²⁾ Ester 결합 위치는 HMBC를 이용하여, oxymethine proton(H-3' and H-4')과 ester 결합의 carbonyl carbon 사이의 3J (C,H) couplings value로 확인하였다.

Khellactone 모핵에 결합된 angeloyl기와 seneciroyl기는 기존 문헌의 NMR spectra value와 비교하여 확인하였다.¹¹⁻¹³⁾

멜라닌 생성 억제 효과 평가(B16 mouse melanoma assay) - 각각의 시료를 처리하여 얻은 cell pellets의 색깔을 육안으로 판정한 결과, compound **I**, **II**, **III**이 0.01 mmol의 농도로 처리하여 얻은 각각의 cell pellet이 positive control로 사용된 1 mmol arbutin의 농도로 처리하여 얻은 cell pellet과 비슷한 색깔을 보였다. 즉, compound **I**, **II**, **III**는 arbutin보다 훨씬 낮은 농도에서도 arbutin과 비슷한 정도로 멜라닌 생성 저해 효과를 보임을 알 수 있었다(Fig. 2-I). 또한, 육안 판정의 결과를 보다 명확히 하고자 각각의 시료를 처리하여 얻은 cell pellets에서 10⁶ cells을 취하여 각각의 멜라닌양을 측정된 결과, 1 mmol arbutin이 48%의 멜라닌생성을 감소시켰으며, compound **I**, **II**, **III**는 모두 0.01 mmol의 농도에서 각각 47%, 48%, 47%의 멜라닌 생성을 억제하여, 육안 판정의 결과와 유의한 결과를 확인하였다(Fig. 2-II).

결 론

기미, 주근깨 등의 색소침착의 치료제를 개발하고자 한방에서 사용되는 200종의 약재들을 대상으로 B16 melanoma assay를 한 결과, 전호 추출물이 멜라닌 생성 억제 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 이로부터 3종의 khellactone 유도체(3',4'-diangeloyl-cis-khellactone, 3'-angeloyl-4'-seneciroyl-cis-khellactone, 3',4'-diseneciroyl-cis-khellactone)를 분리하였다. 이들 3종의 물질은 B16 melanoma assay를 한 결과, 0.01 mmol의 농도에서 1 mmol arbutin과 유사한 정도의 멜라닌 생성 저해효과를 보임을 확인하였다.

인용문헌

- Hearing, V. J. and Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* **157**: 549-557.
- Prota, G. (1992) Melanin and melanogenesis. Academic Press, New York.
- Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* **100**: 150-155.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma. *Cancer Res.* **42**: 1994-2002.
- Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. (1996) Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries* **111**: 65-77.
- Gordon, P. R., Mansur, C. P. and Gilchrist, B. A. (1989) Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* **92**: 566-572.
- Tang, W. and Einsenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin. Springer, New York.
- Chen, Z.X., Huang, B.S., She, Q.L., Zeng, G.F. (1979) Study on the chemical constituents of the Chinese medicinal plant, *Peucedanum praeruptorum* Dunn. Structures of four new coumarins. *Acta Pharn. Sin.* **14**: 486-496.
- Okujana, T. and Shibata, S. (1981) Studies on coumarins of a Chinese drug Qian-Hu. *Planta Med.* **42**: 89-96.
- Anna, M. M. and Elizabeth, M. (1989) Differential radiosensitivity in cultured B16 melanoma following interrupted melanogenesis induced by glucosamine. *Pigment Cell Res.* **2**: 167-170.
- Steck, W. and Mazurek, M. (1972) Identification of Natural Coumarins by Nmr Spectroscopy. *Lloydia* **35**: 418-439.
- Lemmich, J., Lemmich, E. and Nielsen, B. E. (1966) Constituents of Umbelliferous Plants VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins *Acta Chem. Scand.* **20**: 2497-2507.
- Nielsen, B. E., Larsen, P. K. and Lemmich, J. (1971) Constituents of Umbelliferous Plants XVII. Coumarins from *Seseli gummiferum* Pall. The Structure of Two New Coumarins *Acta Chem. Scand.* **25**: 529-533.

(2002년 10월 28일 접수)