

## 신이(辛夷)로부터 멜라닌 생성 억제물질의 분리

허광화 · 김정아 · 박성희 · 손애량 · 장태수<sup>1</sup> · 장현욱 · 정시련 · 이승호\*

영남대학교 약학대학, <sup>1</sup>서라벌대학교 피부미용과

### Isolation of Melanin Biosynthesis Inhibitory Compounds from the Flowers of *Magnolia denudata*

Xu Guang Hua, Kim Jeong Ah, Park Sung Hee, Son Ae Ryang, Chang Tae Soo<sup>1</sup>,  
Chang Hyun Wook, Chung See Ryun, and Lee Seung Ho\*

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

<sup>1</sup>Department of Cosmetics, Sorabol College, Kyongju 780-250, Korea

**Abstract** – The bioassay-guided fractionation of the MeOH extract of the flowers of *Magnolia denudata* led us to the isolation of six compounds identified as fargesin(1), kobusin(2), aschantin(3), magnolin(4), rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetra- methoxy-9,7'-dihydroxy-8,8',7,0,9'-lignan(5) and oplodiol(6), respectively. Among the isolated compounds, fargesin(1) showed most potent inhibitory effect on the melanin polymer biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines(IC<sub>50</sub>, 45.7 μM).

**Key words** – *Magnolia denudata*, melanogenesis inhibitor, lignan, fargesin

동물의 조직 및 피부에 존재하는 갈색 또는 흑색색소인 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원 인물질로 알려져 있으며, 표피세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 key enzyme으로 하여 생합성된다.<sup>1)</sup>

그러나 최근의 연구 보고에 의하면 melanin의 생합성은 tyrosinase 뿐만 아니라, melanocyte stimulating hormone (MSH), 염증반응에 관여하는 각종 cytokine류, gene expression에 관여하는 인자 등 복잡한 요인들에 의해 진행된다 는 것이 밝혀졌다.<sup>2)</sup> 따라서 피부의 melanin 생성을 억제하 는 물질의 개발은 종래에 주로 이용되던 tyrosinase 활성 억 제물질의 개발 뿐만 아니라 melanocyte에서 종합적으로 melanin 생성을 억제하는 물질의 개발에 초점이 맞추어지고 있다. 이러한 연구 추세에 맞추어 본 연구실에서는 배양된 B-16 mouse melanoma cell lines에서 melanin 생합성을 효 과적으로 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자, 100여 종의 국산 자원식물을 MeOH로 추출하고 이를 유기용매와 물로 분획하여 시료를 조제하고, 각각의 시료에 대하여 배 양된 B-16 mouse melanoma cell lines에서의 melanin 생성 저해 활성을 측정하였다.<sup>3)</sup> 그 결과 비교적 강한 활성을 나

타낸 辛夷(Magnoliae Flos, Magnoliaceae)로부터 활성지향 적 분리방법에 의거하여 melanin 생성 저해물질을 분리, 구 조를 규명하였다.

辛夷는 목련과(Magnoliaceae)의 백목련(*Magnolia denudata*) 및 그 밖의 동속 근연 식물의 꽃봉오리를 말린 것 으로, 맛은 맵고 약성은 따뜻하며, 한방에서는 두통, 비염 (축농증), 치통 등에 사용한다. 성분으로는 cineol, α-pinene, methylchavicol, citral, engenol, capric acid 등이 알려져 있다.<sup>4)</sup>

### 재료 및 방법

**실험 재료** – 실험에 사용된 辛夷는 2001년 4월 대구시의 약전골목에서 구입하여 전문가의 감정을 거쳐 사용하였으며, 표본(SH00097)은 영남대학교 약학대학에 보관하고 있다.

**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 III를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker

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

ARX 250 (250 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. EIMS spectrum은 Micromass mass spectrometer (AUTOSPEC, UK)를 사용하였다. 추출 및 분리용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) 및 RP-18(Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silicagel(70 – 230 mesh, Merck), SephadexLH-20(25 – 100  $\mu$ , Sigma), MCI-gel CHP-20P(75 – 150  $\mu$ , Mitsubishi Chem. Co.), RP-18(40 – 63  $\mu$ m, Merck), Toyopearl HW-40F(Tosho), Cosmosil (Nacalai tesque) 등을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, 1% FeCl<sub>3</sub>/Ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성을 평가하는 실험에 사용된 시약 및 기기는 0.5 N hyperchloric acid, cold ethanol/ethyl ether(3:1), 1 N NaOH solution, hemacytometer, microcentrifuge, UV/VIS spectrophotometer, B-16 mouse melanoma cell lines이다.

**B-16 mouse melanoma cell lines에서의 미백 활성 평가** – B-16 mouse melanoma cell lines을 이용한 미백 활성의 평가법은 시료가 세포수준에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 정량적으로 평가하는 방법으로, 시료를 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은(control) 배양세포로부터 멜라닌을 추출해서 alkali에 녹여 비색법으로 정량하였다. 즉, B-16 mouse melanoma cell lines을 EMEM(10% fetal FCS) 배지를 사용하여 T-75 culture flask에서 confluence가 될 때까지 배양한 후, culture dish에 cell number가  $1 \times 10^6$ /dish 이상이 되도록 seeding한 후 1일간 더 배양하였다. 시험물질을 working concentration의 100배 이상으로 제조하여 0.5% DMSO 또는 ethanol 등의 용매에 녹인 후 첨가하여 1일간 배양하였다. 배지를 교환한 후 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌의 양을 정량하였다. 정량은 배지를 버린 후 Trypsin-EDTA (0.25/0.02%) 용액 1 ml로 처리 한 후 microcentrifuge tube에 옮겼다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상등액을 버리고 육안으로 control과 비교하였다. 침전물을 1 ml의 증류수에 suspension시킨 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 버렸다. 0.5 N perchloric acid로 2회 반복 추출하고 cold ethanol/ether(3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출하여 건조시켰다. 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 단리** – 신이 6 kg을 MeOH로 상온에서 일주일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축하였다. 감압 농축한 MeOH 추출액을 증류수에 현탁시키고, 동량의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 가하여 분획깔때기로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층과 H<sub>2</sub>O 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층을 감압 농축하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 얻었다. 남은 H<sub>2</sub>O 층에 다시 EtOAc를 동량 가해서 H<sub>2</sub>O 층과 EtOAc 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획을 얻고, 나머지를 H<sub>2</sub>O 분획으로 하였다. B-16 mouse melanoma cell lines에서 melanin 생성 억제효과를 강하게 보인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획(150 g)을 지름 10 cm인 silica gel column에 loading시켜 EtOAc/n-hex.(1,5,10,20,40,70,100%)를 용출액으로 하여 유출시켜 분획 MF1~8을 얻었다.

활성분획인 MF4를 silica gel column에 loading시켜 EtOAc/n-hexane gradient(0 – 100%)용매로 용출시켜 분획 MF41~49를 얻었다. 그 중 분획 MF47을 MeOH에서 재결정하여 compound **1**(105 mg)을 얻었다. 여액은 silica gel column에 loading하여 acetone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gradient(1 – 20%) 용매로 용출하여 분획 MF471~474를 얻었다. 분획 MF474를 RP-18 column에 loading한 후 60% MeOH로 용출시켜 compound **6**(12 mg)을 얻었다.

분획 MF5를 silica gel column에 loading시켜 EtOAc/n-hexane gradient(0 – 100%)용매로 용출시켜 분획 MF51~55를 얻었다. 그 중 분획 MF52를 RP-18 column에 loading한 후 MeOH-H<sub>2</sub>O를 gradient(60 – 80%)로 용출시켜 분획 MF521~525를 얻었다. 분획 MF523은 silica gel column에 loading하여 acetone-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용매를 gradient(1 – 10%)로 용출시켜 compound **2**(64 mg)와 compound **3**(35 mg)을 얻었다. 분획 MF53은 지름 RP-18 column에 loading한 후 MeOH-H<sub>2</sub>O를 gradient(50 – 70%)로 용출시켜 분획 MF531~533을 얻었다. 분획 MF532는 silica gel column(acetone-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-n-hexane, 1:25:25)으로 정제하여 compound **4**(50 mg)를 얻었다.

분획 MF7은 RP-18 column에 loading시킨 후 60% MeOH로 정제하여 compound **5**(65 mg)를 얻었다.

Compound **1** [(+)-fargesin]: White powder.  $[\alpha]_D^{20} + 112.7$  (CHCl<sub>3</sub>; c 1.1). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.91 – 6.77 (6H, m, Ar-H), 5.93 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 4.85 (1H, d,  $J=5.3$  Hz, H-2), 4.40 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, H-6), 4.10 (1H, brd,  $J=10.0$  Hz, H-4eq), 3.89 (3H, s, -OMe), 3.86 (3H, s, -OMe), 3.85 – 3.72 (2H, m, H-4ax, H-8eq), 3.35-3.24 (2H, m, H-1, H-8ax), 2.85 (1H, m, H-5). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  148.8 (C-3''), 147.9 (C-3', C-4''), 147.2 (C-4').

135.1 (C-1'), 130.9 (C-1''), 119.5 (C-6'), 117.6 (C-6''), 110.9 (C-5''), 108.9 (C-2''), 108.1 (C-5'), 106.5 (C-2'), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-), 87.6 (C-6), 82.0 (C-2), 71.0 (C-4), 69.7 (C-8), 55.9 (-OMe), 55.9 (-OMe), 54.6 (C-5), 50.1 (C-1).

Compound 2 [(+)-kobusin]: Colorless oil.  $[\alpha]_D^{20}$  58.1 (CHCl<sub>3</sub>; c 1.1). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.88–6.78 (6H, m, Ar-H), 5.93 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 4.73–4.70 (2H, m, H-2, H-6), 4.26–4.20 (2H, m, H-4eq, H-8eq), 3.88 (3H, s, -OMe), 3.86 (3H, s, -OMe), 3.88–3.83 (2H, m, H-4ax, H-8ax), 3.11–3.01 (2H, m, H-1, H-5). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.1 (C-3''), 148.5 (C-4''), 147.9 (C-3'), 147.0 (C-4'), 134.9 (C-1'), 133.4 (C-1''), 119.3 (C-6'), 118.2 (C-6''), 110.8 (C-5''), 109.0 (C-2''), 108.1 (C-5'), 106.4 (C-2'), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-), 85.8 (C-2), 85.7 (C-6), 71.7 (C-4), 71.6 (C-8), 55.9 (-OMe), 55.8 (-OMe), 54.3 (C-5), 54.1 (C-1).

Compound 3 [(+)-aschantin]: Viscous oil.  $[\alpha]_D^{20}$  45.4 (CHCl<sub>3</sub>; c 0.3). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.83–6.77 (3H, m, Ar-H), 6.54 (2H, s, Ar-H), 5.93 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 4.71–4.70 (2H, m, H-2, H-6), 4.29–4.20 (2H, m, H-4eq, H-8eq), 3.90–3.78 (2H, m, H-4ax, H-8ax), 3.85 (6H, s, 2 -OMe), 3.81 (3H, s, -OMe), 3.12–2.99 (2H, m, H-1, H-5). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.3 (C-3'', 5''), 147.9 (C-3'), 147.1 (C-4'), 137.2 (C-4''), 136.7 (C-1''), 134.9 (C-1'), 119.3 (C-6'), 108.1 (C-5'), 106.4 (C-2'), 102.6 (C-2'', C-6''), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-), 86.0 (C-2), 85.7 (C-6), 71.9 (C-8), 71.6 (C-4), 60.8 (-OMe), 56.1 (2×OMe), 54.3 (C-1), 54.2 (C-5).

Compound 4 [(+)-magnolol]: Viscous oil.  $[\alpha]_D^{20}$  60.6 (CHCl<sub>3</sub>; c 1.4). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.88–6.83 (3H, m, Ar-H), 6.55 (2H, s, Ar-H), 4.74–4.71 (2H, m, H-2, H-6), 4.31–4.22 (2H, m, H-4eq, H-8eq), 3.93–3.85 (2H, m, H-4ax, H-8ax), 3.87 (3H, s, -OMe), 3.85 (9H, s, 3 -OMe), 3.81 (3H, s, -OMe), 3.15–3.02 (2H, m, H-1, H-5). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.4 (C-3'', C-5''), 149.1 (C-4'), 148.6 (C-3'), 137.3 (C-4''), 136.8 (C-1''), 133.4 (C-1'), 118.2 (C-6'), 110.9 (C-5'), 109.1 (C-2'), 102.7 (C-2'', 6''), 86.0 (C-2), 85.7 (C-6), 71.9 (C-4), 71.7 (C-8), 60.8, 56.1, 55.9, 55.8 (4×OMe), 54.4 (C-1), 54.0 (C-5).

Compound 5 (rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7'-dihydroxy-8,8',7,0,9'-lignan): Brown oil.  $[\alpha]_D^{20}$  8.28 (CHCl<sub>3</sub>; c 0.7). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.85–6.76 (6H, m, Ar-H), 4.62 (1H, d, *J*=7.4 Hz, H-7'), 4.46 (1H, d, *J*=7.9

Hz, H-7), 4.17 (1H, dd, *J*=9.1, 5.0 Hz, H-9'b), 3.98 (1H, dd, *J*=9.1, 7.8 Hz, H-9'a), 3.83 (3H, s, -OMe), 3.82 (3H, s, -OMe), 3.81 (3H, s, -OMe), 3.80 (3H, s, -OMe), 3.37 (1H, d, *J*=5.8 Hz, H-9), 2.57 (1H, ddd, *J*=7.8, 7.4, 5.0 Hz, H-8'), 2.00 (1H, dt, *J*=7.9, 5.8 Hz, H-8). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.0, 148.9, 148.6, 148.5 (C-3,4,3',4'), 134.7 (C-1'), 133.9 (C-1), 119.2 (C-6'), 118.6 (C-6), 110.8 (C-5'), 110.7 (C-5), 109.6 (C-2'), 109.2 (C-2), 83.7 (C-7), 75.3 (C-7'), 70.2 (C-9'), 62.7 (C-9), 55.9, 55.9, 55.8, 55.8 (4×OMe), 51.6 (C-8), 50.2 (C-8').

Compound 6 (oplodiol): White needle crystal.  $[\alpha]_D^{16}$  61.0 (CHCl<sub>3</sub>; c 0.3). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.32 (1H, br d, *J*=5.4 Hz, H-8), 3.28 (1H, dd, *J*=11.0, 3.7 Hz, H-1), 2.20 (1H, sept, *J*=6.8 Hz, H-11), 2.05–1.82 (4H, m, H-6, H-9), 1.88–1.61 (2H, m, H-2 or H-3), 1.68–1.58 (2H, m, H-3 or H-2), 1.28 (1H, dd, *J*=11.1, 6.2 Hz, H-5), 1.16 (3H, s, H-15), 1.01 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-13 or 12), 0.99 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-12 or 13), 0.93 (3H, s, H-14). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 141.9 (C-8), 116.1 (C-8), 79.9 (C-1), 71.0 (C-4), 46.2 (C-5), 40.7 (C-2 or C-3), 39.4 (C-3 or C-2), 37.6 (C-10), 35.0 (C-11), 29.9 (C-15), 23.0, 26.7 (C-6, 9), 21.8, 21.2 (C-12 or 13), 11.7 (C-14).

## 결과 및 고찰

피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 분리, 구조를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 예비실험의 결과, 신이의 MeOH 추출물의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획이 배양된 B-16 mouse melanoma에서 melanin 생합성을 강하게 억제하여, 활성 지향적 분리를 실시한 결과 6종의 화합물을 분리, 구조를 규명하였다.

Compound 1은 백색 분말로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 갈색으로 발색된다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ 3.86, 3.89에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 3H분의 singlet이 관찰되며 δ 5.93에서 methylenedioxy group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰되었다. 그리고 δ 4.85, 4.40에서 각각 benzylic hydrogen에 기인하는 1H분의 doublet (*J*=5.3, 7.0Hz), δ 2.85, 3.24~3.35에서 각각 methine proton에 기인하는 1H분의 signal이 관찰되므로 phenyl group의 configuration은 axial-equatorial로 추정하였다.<sup>5)</sup> <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 δ 101.0에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되고 δ 131.0에서 axial aryl group, δ 135.0에서 equatorial aryl group에 기인하는 signal이 관찰됨으로,<sup>6)</sup> 이 화합물은 (+)-fargesin로 결론짓고 문헌<sup>7,8)</sup>에 소개된 spectral data와 비

교하여 확정하였다.

Compound **2**는 viscous oil상으로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 갈색으로 발색된다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은  $\delta$  3.86, 3.88에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 3H분의 singlet이 관찰되며  $\delta$  5.93에서 methylenedioxy group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰되었다. 그리고  $\delta$  4.70~4.73에서 benzylic hydrogen에 기인하는 2H분의 doublet ( $J=4.0$  Hz),  $\delta$  3.83~4.26에서 methylene proton에 기인하는 4H분의 signal이 관찰되므로 phenyl group의 configuration은 diequatorial로 추정하였다.<sup>5)</sup>  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은  $\delta$  101에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되고 135에서 equatorial aryl group에 기인하는 2개의 signal이 관찰됨으로,<sup>6)</sup> 이 화합물은 (+)-kobusin로 결론짓고 문헌<sup>9)</sup>에 소개된 spectral data와 비교하여 확정하였다.

Compound **3**은 viscous oil상으로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 흑색으로 발색된다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은  $\delta$  3.81, 3.85에서 모두 3개의 methoxy group에 기인하는 singlet이 관찰되며  $\delta$  5.93에서 methylenedioxy group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰되었다. 그리고  $\delta$  4.70~4.71에서 benzylic hydrogen에 기인하는 2H분의 doublet ( $J=4.0$  Hz),  $\delta$  3.78~4.29에서 methylene hydrogen에 기인하는 4H분의 signal이 관찰되므로 phenyl group의 configuration은 compound **2**와 같은 diequatorial로 추정하였다.<sup>5)</sup>  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은  $\delta$  101에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되고  $\delta$  135에서 equatorial aryl group에 기인하는 2개의 signal이 관찰되므로써,<sup>6)</sup> 이 화합물은 (+)-aschantin로 결론짓고 문헌<sup>10)</sup>에 소개된 spectral data와 비교하여 확정하였다.

Compound **4**는 viscous oil상으로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 흑색으로 발색된다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은 약  $\delta$  3.85에서 5개의 methoxy group에 기인하는 singlet이 관찰되며  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은  $\delta$  101에서의 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되지 않아서 이 화합물은 compound **3**과 유사한 골격을 가진 (+)-magnolol로 결론짓고, 문헌<sup>11)</sup>에 소개된 spectral data와 비교하여 확정하였다.

Compound **5**는 viscous oil상으로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 갈색으로 발색된다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은  $\delta$  3.80, 3.81, 3.82에서 각각 1개의 methoxy group에 기인하는 3H분의 singlet이 관찰되며  $\delta$  6.76~6.85에서 trisubstituted benzene ring에 기인하는 singlet이 관찰되었다.  $\delta$  3.98 (H-9'a), 4.17 (H-9'b)과 3.37 (H-9)에서 2개의 methylene group에 기인하는 signal이 관찰되며 4.62, 4.46, 2.57, 2.00에서 4개의 methine proton에 기인하는 signal이 관찰되었다. 4.46에서 H-7에 기인하는 signal이 관찰되어 C-7/C-8의 trans-

orientation configuration을 추정하고 H-8과 H-8'의 cis-orientation configuration은  $J_{8,8'}=5.8$  Hz에 의하여 추정함으로써,<sup>12)</sup> 이 화합물은 rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7'-dihydroxy-8,8',7,0,9'-lignan로 결론짓고 문헌<sup>13)</sup>에 소개된 spectral data와 비교하여 확정하였다.

Compound **6**은 백색 부정형 결정으로 얻어졌으며, vanillin 황산시액에 의하여 청색으로 발색된다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은  $\delta$  5.32에서 vinyl proton,  $\delta$  3.28에서 hydroxyl group이 붙은 methine proton,  $\delta$  2.20에서 isopropyl group,  $\delta$  0.99와 1.01에서 두개의 secondary methyl group, 그리고  $\delta$  0.93과 1.16에서 2개의 quaternary methyl group에 기인하는 signal이 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은  $\delta$  116.1과 141.9에서 2개의 olefinic carbon,  $\delta$  71.0과 79.9에서 2개의 oxygenated carbon에 기인하는 signal들이 관찰됨으로서 compound **6**은 eudesmane 골격을 가진 화합물로 추정하고 H-1의 coupling constant (dd,  $J=11.0, 3.7$  Hz)에 의하여 hydroxyl group의 axial position( $\beta$ )을 결정하고 C-14의 angular methyl signal이 저자장으로( $\delta$  11.7) shift함으로서<sup>14)</sup> 이 화합물은 oplodiol로 결론짓고 문헌<sup>15)</sup>에 소개된 spectral data와 비교하여 확정하였다(Fig. 1).

신이의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  분획으로부터 분리된 화합물은 각각 (+)-fargesin(**1**), (+)-kobusin(**2**), (+)-aschantin(**3**), (+)-magnolol(**4**), rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetra-methoxy-9,7'-dihydroxy-8,8',7,0,9'-lignan(**5**) 등 5종의 lignan과 eudesmane 골격의 sesquiterpene인 oplodiol(**6**)이었다. Lignan 계열의 화합물인 machilin A, nectandrin A and B 등이 피부 melanin 생성에 억제효과가 있다는 것은 Li 등에 의하여 보고된 바 있으며,<sup>16)</sup> 본 연구에서 분리된 화합물 중에서는 (+)-fargesin(**1**)이 대조물질인 kojic acid와 같은 수준인  $\text{IC}_{50}$  value 45.7  $\mu\text{M}$ 을 나타냈다(Table I).

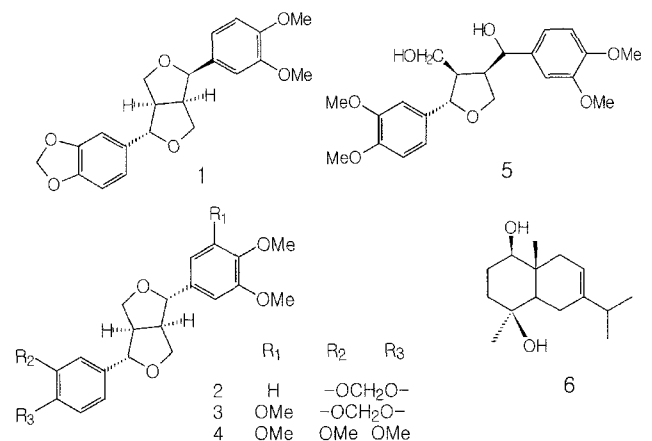


Fig. 1. Structures of isolated compounds from the flowers of *Magnolia denudata*.

**Table I.** Inhibitory effects of compounds isolated from flowers of *Magnolia denudata* on melanogenesis in cultured B-16 mouse melanoma cell lines *in vitro*

Compound No.	Compound name	IC <sub>50</sub> value (μM)
1	(+)-fargesin	45.7
2	(+)-kobusin	-
3	(+)-aschantin	-
4	(+)-magnolin	-
5	rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetramethoxy-9,7'-dihydroxy-8.8',7.O.9'-lignan	105.6
6	oplodiol	353.1
Control	kojic acid	54.3

## 결 론

1. 피부 melanin 생합성을 저해하는 물질을 천연물로부터 개발하고자 신이의 MeOH 추출물의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로부터 melanin 생성 억제물질의 분리를 시도한 결과 6종의 화합물을 분리하였다.

2. 분리된 6종의 화합물들은 물리화학적 특성 및 각종 spectral data의 검토 결과 각각 (+)-fargesin(1), (+)-kobusin(2), (+)-aschantin(3), (+)-magnolin(4), rel-[7s,8s,8's]-3,4,3',4'-tetra-methoxy-9,7'-dihydroxy-8.8',7.O.9'-lignan(5)과 oplodiol(6)로 결정하였다.

3. 각 화합물의 B-16 melanoma cell lines에서의 멜라닌 생성 저해 활성은 kojic acid를 비교 물질로 하여 측정한 결과, (+)-fargesin(1)이 IC<sub>50</sub> value 45.7 μM로 가장 강하였다.

## 감사의 글

이 논문은 보건복지부 신약개발지원사업(02-PJ2-PG3-21604-0006) 연구비로 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**: 2902-2909.
- Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y., and Gilchrist B. A. (1991) Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *British J. Derma.* **125**: 297-303.
- Choi, J. Y., Kim, J. A., Cho, S. H., Xu, G. H., Park, S. H., Chung, S. R., and Lee, S. H. (2004) Isolation of melanogenesis inhibitors from Poncirus Fructus. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**: (투고중)
- Pharmacognosy Research Group. *Modern Pharmacognosy*. (Edited in 1992).
- Kamikado, T., Chang, C. F., Murakoshi, S., Sakurai, A., and Tamura, S. (1975) Isolation and structure elucidation of growth inhibitors on silkworm larvae from *Magnolia kobus* DC. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 833-836.
- Pelter, A., Ward, R. S., and Nishino, C. (1977) Revised structures for epiaschantin and epimagnolin. *Tetrahedron* **47**: 4137-4140.
- Pelter, A., Ward, R. S., Venkata Rao, E., and Sastry, K. V. (1976) Revised structures for pluviatilol, methylpluviatilol and xanthoxylol. *Tetrahedron* **32**: 2783-2788.
- Yoshida, S. I., Yamanaka, T., Miyake, T., Moritani, Y., Ohmizu, H., and Iwasaki, T. (1997) Asymmetric syntheses of lignans utilizing novel diastereoselective michael addition of cyanohydrin: Syntheses of (+)-fargesin and (-)-picropodophyllone. *Tetrahedron* **53**: 9585-9598.
- Latip, J., Hartley, T. G., and Waterman, P. G. (1999) Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii*. *Phytochemistry* **51**: 107-110.
- Ahmed, A. A., Mahmoud, A. A., Ali, E. T., Tzakou, O., Couladis, M., Mabry, T. J., Gati, T., and Toth, G. (2002) Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*. *Phytochemistry* **59**: 851-856.
- Miyazawa, M., Kasahara, H., and Kameoka, H. (1992) Phenolic lignans from flower buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* **31**: 3666-3668.
- Tanaka, H., Nakamura, T., Ichino, K., and Ito, K. (1989) A lignan from *Actinodaphne longifolia*. *Phytochemistry* **28**: 952-954.
- Ma, Y. L., Huang, Q. L., and Han, G. Q. (1996) A neolignan and lignans from *Magnolia biondii*. *Phytochemistry* **41**: 287-288.
- Nyasse, B., Tih, R. G., Sondengam, B. L., Martin, M. T., and Bodo, B. (1988) Isolation of α-corymbolol, an eudesmane sesquiterpene diol from *Cyperus articulatus*. *Phytochemistry* **27**: 179-181.
- Tchuendem, M. H., Mbah, J. A., Tsopmo, A., Ayafor, J. F., Sterner, O., Okunjic, C. C., Iwu, M. M., and Schuster, B. M. (1999) Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reneilmia cincinnata*. *Phytochemistry* **52**: 1095-1099.
- Li, G., Ju, H. K., Chang, H. W., Jahng, Y. D., Lee, S. H., and Son, J. K. (2003) Melanin biosynthesis inhibitors from the bark of *Machilus thunbergii*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1039-1041.

(2004년 4월 7일 접수)