

마황추출물의 미백효과에 관한 연구

유영근[†] · 정민석 · 최종완 · 김중희

한국화장품(주) 기술개발연구소
(2005년 5월 12일 접수, 2005년 6월 13일 채택)

The Study on the Whitening Effect of *Ephedra sinica* Extract

Yung-Geun Yoo[†], Min-Seok Joung, Jong-Wan Choi, and Joong-Hoi Kim

R&D Center, Hankook Cosmetics Co. Ltd., 36-1, Samjeong-dong, Ojong-gu Bucheon-si, Gyeonggi-do 421-808, Korea
(Received May 12, 2005; Accepted June 13, 2005)

요약: 본 연구는 한방제제의 구성 약재인 마황이라는 천연한방소재로부터 미백효과가 있는 화장품 원료를 개발하고자 하였다. 본 실험에서 마황추출물의 tyrosinase 억제 효과를 확인하고 마황추출 과정을 세분화하여 methylene chloride 및 물분획물을 얻었으며 이들을 가지고 다시 tyrosinase 억제 실험을 실시하였다. 그 결과 수층부분에서만 0.2% 농도에서 60.6%의 tyrosinase 억제 효과를 보여주었으며 이후 수층부분만을 농축하여 L-DOPA 산화억제 실험 및 B-16 melanoma를 이용한 미백 실험을 실시하였다. 그 결과 마황추출물 0.5% 농도에서 87%의 L-DOPA 산화억제 효과를 보여주었으며, 0.75%에서는 98.8%의 억제효과를 보여주었다. 또한 B-16 melanoma에서는 0.05%에서 70.2%, 0.075%에서는 79.9%의 억제효과를 보여주었다. 그리고 수층부분만을 농축한 마황추출물의 *in vivo*상에서의 미백 효과를 검증하기 위하여 마황추출물 0.5%를 함유한 제형으로 미백 임상실험을 실시하였다. 그 결과 마황추출물을 함유한 제형에서 10주 경과 후에 육안 및 기기평가 모두에서 미백효과를 보여주었으며 통계적으로도 유의한 차이($p < 0.05$)를 보여주었다.

Abstract: In this study, we investigated the application of an extract from *Ephedra sinica* which has been composed of traditional Korean medicine as a whitening ingredient. The extract of *Ephedra sinica* which was obtained from the mixture of methanol and water (1:1) the inhibitory effect of tyrosinase. Then, *Ephedra sinica* was extracted by two different solvents. One was water and the other was methylene chloride. Only, the water extract of *Ephedra sinica* showed the inhibitory effect of tyrosinase; the anti-tyrosinase activity with 0.2% of the water extract was 60.6%. But the extract of *Ephedra sinica* in methylene chloride fraction showed little inhibitory effect on tyrosinase. The inhibitory effect of the concentrated water extract of *Ephedra sinica* was tested on L-DOPA auto-oxidation and melanin synthesis in B-16 melanoma. In L-DOPA auto-oxidation, 0.5% of the concentrated water extract showed 87% of inhibition of L-DOPA auto-oxidation and the 0.75% concentrated *Ephedra sinica* extract in water fraction inhibited 98.8% of that. In melanin synthesis of B-16 melanoma, the concentrated water extract of *Ephedra sinica* inhibited 70.2% or 79.9% of inhibitory effect on that at the concentration of 0.05% or 0.075%, respectively. For verifying the skin whitening effect of the concentrated water extract of *Ephedra sinica* *in vivo*, we performed the clinical test of that. The research showed the significant skin whitening effect of a cream containing 0.5% *Ephedra sinica* extract and the statistical analysis showed a significant difference ($p < 0.05$) between sample (containing 0.5% *Ephedra sinica* extract) and placebo after 10 weeks.

Keywords: *Ephedra sinica*, skin whitening effect, L-DOPA auto-oxidation, traditional Korean medicine, water extract

1. 서 론

최근 오존층의 파괴로 인한 자외선 조사량의 증가는 기미, 주근깨와 같은 피부 스트레스를 유발함에 따라 미

백효과가 강화된 기능성 화장품에 대한 요구가 높아지고 있다. 피부내의 melanocyte는 외부 신호전달 물질 및 호르몬 수용체를 가지고 있어 자외선 등의 외부조건이나 α -MSH 등의 호르몬, endothelin과 같은 cytokine 등에 의해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 효소들이 활성화되어 melanin을 형성한다[1,2]. 이렇게 형성된 melanin이 기

[†] 주 저자 (e-mail: hancos@chol.com)

미와 주근깨를 만들게 된다[3,4]. 특히 인공합성물로 제조된 화학합성 화장품의 부작용과 과민반응이 과다 보고됨에 따라 화장품의 원료를 다시 천연소재로부터 얻으려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

천연물을 원료로 한 화장품 중에는 절대 다수가 식물성 소재가 가장 많다. 한의학의 역대 문헌 중 미용과 관련된 처방은 1000여 종이 넘고 프랑스나 일본 등과 비교할 때 천연물을 이용한 역사가 더욱 오래되었다. 화장품으로 사용되는 한약의 유효성분은 주로 황갈반을 방지하는 작용이 있다. 주근깨, 검은반, 검버섯 등과 같은 황갈반의 주요 원인은 얼굴의 자외선에 대한 방어 활동이 증가함으로써 검은 색소가 침착되기 때문이다. 따라서 화장품에 tyrosinase의 활동을 억제하고, 면부의 혈관을 확장하여 혈액순환을 촉진하는 한약재를 첨가하면 황갈반의 생성을 방지하는 미용효과를 얻을 수 있다[5,6]. 현재 이러한 종류의 화합물은 천연물에서 얻어진 arbutin 및 ascorbic acid와 이들 유도체들이 있는데, 이들은 tyrosinase의 활성을 억제하고, 햇볕에 의한 검버섯, 주근깨 방지와 같은 목적으로 의약부외품 및 기능성화장품의 미백기능성 원료로 사용되고 있다[7,8]. 또한 천연물로서 tyrosinase에 활성억제 효과를 나타내고, 항염증 및 해독 작용이 있어 화장품 원료로 광범위하게 이용되고 있으며 감초추출물(licorice extract)과 이의 활성성분인 formononetin, glabridin, glabrol, 상백피로부터 분리된 oxysteratol 등이 알려져 있다[9].

기미 등의 색소침착은 다음과 같이 정의되고 있다. 피부 세포내에 있는 melanin 색소 생성세포(melanocyte)에서 특정 요인에 의해 melanin 생성 활동이 증가되고 이로 말미암아 생성된 다량의 melanin이 각질형성세포(keratinocyte)로 전달됨으로써 피부 표피층(epidermis)에 melanin이 축적된 결과이다[10-12]. 초기의 미백제는 melanin 생합성 과정의 첫 단계에 관여하는 효소인 tyrosinase에 의한 tyrosine 산화억제기능에 초점이 맞추어져 있었기 때문에, *in vitro*에서 tyrosinase 활성 억제제를 선별하는 것이 중요한 미백제의 개발수단이었다[13,14]. 따라서 화장품에 tyrosinase의 활동을 억제하는 약재를 찾기 위하여 mushroom tyrosinase를 이용한 검색법이 일반적으로 사용되고 있다[15]. 이러한 효소는 인체에 존재하는 tyrosinase와 차별성이 있으나 상기의 방법을 통하여 kojic acid, arbutin, ascorbic acid 등의 미백제를 찾아내었으며 현재까지도 폭넓게 사용되고 있다[16]. 이와 같은 미백제는 실제 인체에 적용할 경우 피부투과, 세포독성 및 제형 내에서의 안전성 등과 같은 문제점들이 있어 동물실험을 거친 후 임상실험을 실시하고 있으나, 보다 경제적이고 효율적인 미백제 개발을 위하여 이미 안전성에 대한 검증이 많이 이루어진 천연한방성분에 대한 관심이

높아지고 있다[7,17]. 따라서 본 연구도 여러 천연한방성분들 중에서 mushroom tyrosinase를 이용한 검색법을 이용하여 마황에 대한 미백활성의 가능성을 찾아내었으며 이를 바탕으로 마황추출물에 대한 미백화장품 원료로서의 적용여부를 살펴보았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 마황 추출

첫 단계로 마황을 2 mg/mL의 농도로 메탄올:물(1:1)로 녹여 실험하였으며 두 번째에는 메칠렌클로라이드(Methylene chloride) 및 물분획물을 이용하였다. 그리고 최종적으로 다음과 같은 방법으로 시료를 조제하였다. 마황추출물 1 kg에 정제수 9 kg을 넣고 60°C에서 2 h 추출한 후 여과하며 이 추출물에 10% HCl을 넣고 pH를 4.0으로 맞추고, 60°C에서 2 h 동안 가열하고, 실온까지 냉각한 후 여과하였다. 다시 이 액에 10% 암모니아수를 넣고 pH를 9.0으로 맞추고 후 여과한 다음 이 액을 메칠렌클로라이드로 3회 분액하여 메칠렌클로라이드층은 버리고 수층을 10% HCl을 넣고 pH를 5.5로 조절한 후 감압농축하여 마황추출물을 취하였다.

2.2. 미백효과

2.2.1. 타이로시네이즈(Tyrosinase) 억제 활성

Test tube에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 2.2 mL와 1.5 mM tyrosine solution 400 μ L 첨가한 후 농도별로 희석한 마황추출물을 200 μ L 넣는다. 여기에 2,000 U/ μ L mushroom tyrosinase 200 μ L를 첨가한다. ELISA reader를 이용하여 25°C에서 enzyme kinetic과 흡광도를 490 nm에서 측정하였다[18](kinetic의 run time은 20 min, 간격은 40 s).

$$\text{Inhibition(\%)} = \{(A-B)/A\} \times 100$$

A : Absorbance at 490 nm without test samples after incubation

B : Absorbance at 490 nm with test samples after incubation

2.2.2. 도파(L-DOPA)산화 억제 활성

0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 마황추출물을 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.75% (w/w %) 농도로 희석한다. 시험관에 마황추출물을 900 μ L씩 첨가하고 여기에 2000 U/mL mushroom tyrosinase (0.1 M phosphate buffer pH 6.5로 용해) 50 μ L를 넣고 반응액의 온도가 균

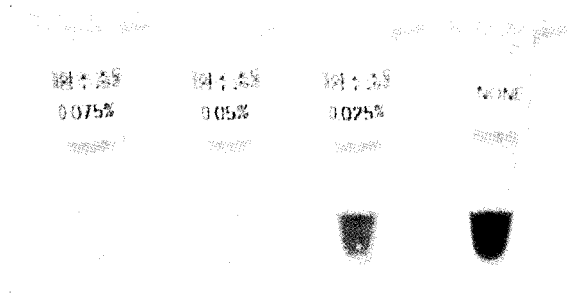


Figure 1. The melanin contents assay.

일하도록 37℃에서 약 5 min 간 방치한다. 여기에 10 mM L-3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine: L-DOPA, pH 7.0)액 50 μL를 넣고 상온에서 1 min간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다[19].

$$\text{Inhibition(\%)} = \left\{ \frac{(A-B)}{A} \right\} \times 100$$

A : Absorbance at 490 nm without test samples after incubation

B : Absorbance at 490 nm with test samples after incubation

2.2.3. B-16 Melanoma내의 멜라닌(Melanin) 생성 억제 실험

마황추출물에 대하여 B-16 melanoma를 이용하여 미백 효과를 측정하였다. Black mouse에서 유래된 B-16 melanoma를 10% FBS (Gibco)가 함유된 DMEM (Gibco)으로 6 well에 세포 수 2×10^4 cells/well의 농도로 각 well에 2 mL씩 첨가하고 5% CO₂, 37℃ 조건하에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10% FBS, 0.2 mM α-MSH (Sigma)와 2 mM theophylline (Sigma)이 함유된 DMEM으로 교체한 후 마황추출물을 동일 배지로 적당량 희석한 후 각각 첨가하고 나서, 5% CO₂, 37℃ 조건하에서 세포가 약 80% 이상 될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 PBS로 세척하고 trypsin으로 처리하여 세포 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet을 1.5 mL eppendorf tube로 옮겨 5,000 rpm으로 10 min간 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet을 60℃ 항온기에서 24 h 건조시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 세포내의 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 PBS로 적당량 희석하여 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanin 저해율을 측정하였다. 그리고 video microscope를 이용하여 사진촬영 후 미백 활성을 육안으로 확인하였다(Figure 1)[20,21].

Table 1. Grade of Visual Assessment

Bright & Clear		←			→	Dark & Dull	
0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	

2.3. 미백의 임상평가

2.3.1. 시료도포방법 및 최소홍반량측정

피시험자 20~40대 여성 25명을 대상으로 placebo와 sample (0.5% 마황추출물 함유)를 10주 동안 1일 2회 도포하도록 하였다. 피시험자의 등 부위에 UVB를 조사하고 16~24 h 후에 최소홍반량(Minimal erythema dose: MED)을 구하였다[22,23].

2.3.2. 연구자에 의한 육안평가(Visual Assessment)

2명의 시험자가 주관적으로 모든 피시험자들을 4주, 10주 후의 피부의 흑화도를 관찰하였으며 시료도포 전과 비교하여 7개 등급으로 나누어 점수를 기록하였다.

2.3.3 Mexameter를 이용한 기기 평가

시험자가 Mexameter (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Germany)를 이용하여 시료도포 전과 도포 후의 흑화도 변화정도를 측정하였다. 시료도포 부위에 3회 반복 측정하여 그 평균값을 구하고 비교하였다[24,25].

2.3.4. 통계분석 방법

각 시료간의 미백효과의 차이를 확인하기 위하여 SAS system으로 mixed procedure를 시행하였고 시간을 고려한 미백효과의 전체적인 차이에 대한 유의성을 확인하기 위해 repeated measure ANOVA를 시행하였다. 그리고 각 측정시기마다 대조군과 처리군 사이의 미백효과 차이를 확인하기 위하여 unpaired t-test를 시행하였다.

3. 결 과

3.1. 미백효과

3.1.1. 타이로시네이즈(Tyrosinase) 활성 억제

Table 2에서 보는 바와 같이 메탄올과 물을 1:1로 혼합한 용매를 이용한 마황추출물에서 tyrosinase 활성억제 효과가 나타났다. 또한 마황추출물의 tyrosinase 활성억제 효과가 극성물질에 의한 것인지 비극성물질에 의한 것인지를 알아보기 위하여 마황을 극성용매(물)와 비극성용매(Methylene chloride)로 분획한 결과 극성 용매인 수층 추출물 0.2%의 농도에서 60.6% tyrosinase 억제효과를 보여주었다. 반면에 비극성 용매 추출물에서 거의 억제효과가 관찰되지 않았다.

Table 2. Inhibition of Tyrosinase for Three Types of *Ephedra sinica* Extract

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition of tyrosinase (%)
<i>Ephedra sinica</i> Extract (Methanol : Water)	0.1	49.7
	0.2	49.7
<i>Ephedra sinica</i> Extract (Water layer)	0.1	46.1
	0.2	60.6
<i>Ephedra sinica</i> Extract (Methylene chloride layer)	0.1	1.2
	0.2	1.7
Kojic acid	0.1	89.3
	0.2	89.9

Table 3. Inhibition of L-DOPA Auto-oxidation for *Ephedra sinica* Extract

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition of tyrosinase (%)
Concentrated <i>Ephedra sinica</i> Extract (Water layer)	0.1	38.5
	0.2	56.7
	0.4	70.9
	0.5	87.0
	0.75	98.8

3.1.2. 도파(L-DOPA)자동산화 활성 억제

수층의 마황추출물에 대한 또다른 미백활성 기작이 있는지 알아보기 위하여 L-DOPA 자동산화억제 실험을 실시하였다. 수층에서 추출한 마황 농축액을 0.1%에서 0.75%까지 처리하였으며 0.5%에서 87%의 억제 효과를 0.75%에서는 98.8%의 L-DOPA 자동산화억제 효과를 보여주었다(Table 3).

3.1.3. B-16 Melanoma내의 멜라닌(Melanin) 생성 억제

세포독성이 없는 농도 범위에서 수층에서 농축한 마황 추출물의 B-16 melanoma내의 melanin 생성 억제율을 측정 한 결과는 마황추출물 0.05% 농도에서 70%의 melanin

Table 4. Inhibitory Activity of Melanin Synthesis in B-16 melanoma for *Ephedra sinica* Extract

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition of melanin synthesis (%)
Concentrated <i>Ephedra sinica</i> Extract (Water layer)	0.025	26.3
	0.05	70.2
	0.075	79.9
Arbutin	0.5	78.1

Conc.: Concentration

생성 억제율을 나타냈으며 이는 arbutin의 0.5% 농도에서와 유사한 억제효과 수치이다. 또한 0.075%에서는 79.9%로 0.5% arbutin보다 약간 더 높은 억제효과를 보여주었다(Table 4).

3.2. 미백의 임상평가

3.2.1. 육안 평가

총 25명의 피시험자가 시험 전 과정에 참여하였으며 탈락자는 없었다. 2명의 시험자가 육안으로 모든 피시험자의 피부 흑화정도를 7개의 등급으로 나누어 점수를 기록하였다. 4주, 10주 후의 피부 흑화도 관찰 값은 placebo 및 sample (0.5% 마황추출물 함유) 모두 사용 전에 비하여 통계학적으로 유의있는 차이를 보이고 있으나 4주 경과시 두 group 간에서는 뚜렷한 차이를 보여주지 못하였으며 통계학적으로도 유의차를 보여주지 못하였다. 그러나 10주 후에는 sample이 placebo에 비하여 미백효과가 더 좋은 것으로 나타났으며 또한 통계학적으로도 유의 있는 차이를 보여주었다(Table 5).

3.2.2. Mexameter를 이용한 기기 평가

Placebo 및 sample 모두 각각 도포 전과 비교하여 4주 후에는 미백효과가 뚜렷하게 나타나지 않았으며 통계학적으로도 유의있는 차이를 보여주지 못하였다. 또한 두 group간에도 미백효과 차이가 뚜렷하지 못하였으며 통계적으로 유의차를 보여주지 않았다. 그러나 10주 후 결과에서는 sample과 placebo에 모두 각각 통계적으로 유의있

Table 5. Evaluation of Pigmentation by Visual Assessment for Placebo and Sample (Containing 0.5% *Ephedra sinica* Extract)

Period	Treatment	Visual assessment	p-value	Comparison between groups	Reference
After 4 weeks	Placebo	2.3 (Δ -0.6)	< 0.0001	p = 0.7266	0 week : 2.9 (n = 25)
	Sample	2.2 (Δ -0.7)	< 0.0001		
After 10 weeks	Placebo	1.7 (Δ -1.2)	< 0.0001	p < 0.0001	
	Sample	1.0 (Δ -1.9)	< 0.0001		

Table 6. Evaluation of Pigmentation by Mexameter for Placebo and Sample

Period	Treatment	Mexameter's assessment	p-value	Comparison between groups	Reference
After 4 weeks	Placebo	479.84 (Δ-13.57)	0.8847	p = 0.0993	Initial value Placebo : 493.41 Sample : 491.29 (n = 25)
	Sample	481.94 (Δ-14.91)	0.8822		
After 10 weeks	Placebo	474.55 (Δ-18.87)	0.0572	p = 0.0178	
	Sample	470.17 (Δ-21.12)	< 0.0001		

는 차의 미백효과를 보여주었으며 두 group간에서도 sample이 placebo보다 더 미백효과가 있는 것으로 나타났으며 통계학적으로도 유의있는 차이를 보여주었다 (Table 6).

4. 고 찰

물과 메탄올을 1:1 혼합한 용매로 추출한 마황추출물에서 tyrosinase 억제활성을 보여주었으며 마황내에 미백활성성분의 특성을 알아보기 위하여 극성용매인 물과 비극성용매인 methylene chloride로 분획하여 두 종류의 추출물을 얻었다. 그리고 각각의 추출물로 동일하게 tyrosinase 억제효과를 측정하였다. 그 결과 물분획물에서만 tyrosinase 억제효과를 보여주었으며 0.2%에서 60%의 억제효과를 보여주었다(Table 2). 이것은 마황내의 미백활성 성분이 극성물질이며 또한 물과 메탄올을 1:1 혼합용매 추출물보다 더 높은 억제활성을 보임으로써 물의 극성치와 유사한 극성치를 가지고 있음을 암시해 주고 있다[7,9].

마황추출물의 또 다른 미백효과 기작을 알아보기 위하여 수층에서 추출한 마황추출물을 농축하여 L-DOPA 자동산화억제 실험을 실시하였다. 0.5% 농축된 마황추출물에서 87%의 억제효과를 보여주었으며 0.75%에서는 98.8%의 억제효과를 보여주었다(Table 3). 따라서 마황의 수층 추출물에는 melanin을 생성하는 첫단계인 tyrosinase 억제하는 활성성분 뿐만아니라 그 다음 단계인 L-DOPA 자동산화과정도 억제하는 활성성분도 있음을 보여주고 있다[14,18].

실질적으로 세포단계에서의 미백효과를 확인해 보기 위하여 B-16 melanoma를 이용한 세포내 melanin 생성 억제를 실험을 실시하였다. 그 결과 세포독성이 없는 농도 범위인 0.05% 농도에서는 70.2% 억제효과를 보여주었으며 0.075%에서는 79.9%의 억제효과를 보여주었다. 이는 0.5% arbutin에서의 억제효과인 78.1%와 유사한 활성을 보여주는 것이다(Table 4). 따라서 수층의 마황추출물은 세포내에서 melanin 생합성 첫번째 단계인 tyrosine을 DOPA로 변환시키는데 관여하는 tyrosinase의 활성을 억제하며 그 두 번째 단계인 DOPA의 자동산화작용도 억제

시킴으로써 melanin 생합성을 억제하여 세포내에서 미백효과 활성을 보이는 것으로 추측된다[26].

0.5% 마황추출물을 함유한 sample과 마황추출물을 함유하지 않은 placebo를 이용한 임상실험에서 육안평가시 각각의 제품사용 전과 사용 후 4주 및 10주 경과 후 결과치는 각각 통계적으로 유의한 차이를 보여주었으나 두 group간의 차이의 경우에는 4주 경과 후에는 통계적인 유의차를 보여주지 못하였다. 그러나 10주 경과 후에는 두 group간의 향상도 차이는 41.1%로 나왔으며 신뢰도 99.9% 수준에서 통계적 유의차(p < 0.0001)를 보여주었다 (Table 5). 기기평가에서는 4주 경과 후 sample과 placebo 각각의 결과치가 통계적인 유의차를 보이지 못하였으며 두 group간의 향상도 차이도 통계적 유의차를 보여주지 못하였다. 그러나 10주 경과 후에는 sample과 placebo 각각의 결과치가 통계적인 유의차를 보여주었다. Placebo의 경우 신뢰도 94% 수준에서 통계적 유의차(p = 0.057)를 보여주었으며 sample의 경우에는 신뢰도 99% 수준에서 통계적 유의차(p < 0.0001)를 보여주었다. 그리고 두 group간의 향상도 차이에서도 신뢰도 98% 수준에서 통계적 유의차(p = 0.018)를 보여주었다(Table 7). 결론적으로 0.5%의 마황추출물 함유 제형의 경우 10주 경과 후에 임상에서도 뚜렷한 미백효과가 있음을 보여주고 있다.

수층에서 분리한 마황추출물은 대표적인 melanin 생합성 과정 중 주요 두 단계에서 억제활성을 보여주고 있으며 임상실험에서도 뚜렷한 미백효과를 확인해 볼 수 있었다. 마황은 오래전부터 천연한방성분으로 복용되어 왔으며 특히 수층으로 분리한 마황추출물은 대부분의 알칼로이드가 제거된 상태이기 때문에 더욱 안전한 천연물질의 추출물이다. 따라서 화장품 원료로서 피부에 대한 자극이 없으면서 미백 효과가 뚜렷한 천연 원료로 그 동안 문제가 되어왔던 인공합성 미백원료를 대체할 수 있는 경제적이고 뛰어난 미백 원료임을 보여주고 있다.

5. 결 론

1) 마황은 수층으로 분획한 추출물에서만 미백효과를 보여주었다.

Tyrosinase 억제활성 실험에서 methylene chloride 분

획추출물은 억제효과를 보여주지 못하였으나 물 분획추출물의 경우에는 60%의 억제효과를 보여주었다.

2) 농축한 수층의 마황추출물은 L-DOPA 자동산화 억제효과 및 B-16 melanoma에서 melanin 생성 억제효과를 보여주었다.

이것은 마황추출물이 tyrosine hydroxylation과 DOPA oxidation 두 과정을 억제하는 활성이 있음을 보여주고 있다.

3) 0.5% 마황추출물 함유 제형과 미함유 제형의 임상 실험 결과에서도 10주 경과 후 육안평가에서 두 group간 향상도 차이가 신뢰도 99.9% 수준에서 통계적 유의차($p < 0.0001$)를 보여주었다. 또한 기기평가에서도 10주 경과 후 두 group간의 향상도 차이가 신뢰도 98% 수준에서 통계적 유의차($p < 0.05$)를 보여주었다.

참고 문헌

1. Urbach and Frederick, The biologic effects of ultraviolet radiation emphasis on skin, 1st international conference on skin & cancer, hospital temple university health science, Pergamon, N.Y. (1969).
2. A. Libert, Use of alpha-melanocyte-stimulating-hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating-hormone receptor binding assay in human melanoma, *Pigment cell Res.*, **2**, 510 (1989).
3. G. Prota, Melanins, and Melanogenesis, Academic Press, N.Y. (1992).
4. V. J. Hearing and M. Jimenez, Analysis of pigmentation at the molecular level, *Pigment cell Res.*, **2**, 95 (1989).
5. H. Matsuda, M. Higashino, Y. Nakai, M. Inuma, M. Kubo, and F. A. Lang, Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. inhibitory effects of some *Arctostaphylos* plants on melanin biosynthesis, *Bio. Pharm. Bull.*, **19**(1), 153 (1996).
6. T. Tsuruga, Y. T. Chun, Y. Ebizuka, and U. Sankawa, Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(12), 3276 (1991).
7. F. Qiu, K. I. Komatsu, K. I. Saito, K. Kawasaki, X. Yao, and Y. Kano, Pharmacological properties of traditional medicine. XIII. pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**(11), 1463 (1996).
8. T. Ikeda and T. Tsutsumi, Function and skin depigmental activity of crude drugs, *Fragrance J.*, **6**, 59 (1990).
9. T. Yokota, H. Nishio, Y. Kubota, and M. Mizoguchi, The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Research*, **11**, 355 (1998).
10. A. J. Ramsay, F. Lynn, N. A. Iscoe, and H. J. Kahn, MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(1), 22 (1995).
11. Y. Yada, K. Higuchi, and G. Imokawa, Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes, *J. Biol. Chem.*, **266**(27), 18352 (1991).
12. J. R. Gruber, S. Ohno, and R. M. Niles, Increased expression of protein kinase C alpha plays a key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation, *J. Biol. Chem.*, **267**(19), 13356 (1992).
13. K. Maeda and M. Fkuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
14. S. Pavel, Dynamics of melanogenesis intermediates, *J. Invest. Dermatol.*, **100**(2), 1523 (1993).
15. K. Maeda and M. Fkuda, Arbutin: mechanism of its depigmentation in human melanocyte culture, *American Soc. Pharm. Exp. Therapeutics*, **276**(2), 765 (1996).
16. K. Maeda and M. Fkuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
17. Y. Masamoto, S. Iida, and M. Kubo, Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase, *Planta Med.*, **40**(4), 361 (1980).
18. Y. Ishihara, M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, Koni, and T. Oki, Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, *J. Antibiotics*, **44**, 25 (1991).
19. H. S. Mason and E. W. Peterson, Melanoproteins reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.*, **111**, 134 (1965).
20. P. R. Gorden, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, **92**, 565 (1989).

21. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
22. A. Garcia and J. E. Fulton, The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melanoma and related conditions, *Dermatol. Surg.*, **22**(5), 443 (1996).
23. C. Cotellessa, K. Peris, M. T. Onorati, M. C. Fargnoli, and S. Chimenti, The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentations, *Dermatol. Surg.*, **25**(6), 450 (1999).
24. 김상태, 서기석, 채영수, 엄상철. Arbutin, glycolic acid, kojic acid 및 pentadecenoic acid가 *in vitro* 및 *in vivo*에서 UVB 조사에 의한 색소형성에 미치는 영향. *대한 피부과학회지*, **32**(6), 29 (1994).
25. J. Serup and T. Agner, Colorimetric quantification of erythema: a comparison of two colorimeters with a clinical scoring scheme and laser-dopper flowmetry, *Clin. Exp. Dermatol.*, **15**, 267 (1990).
26. V. J. Hearing and K. Jsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).