

## 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과

김은철 · 안소영 · 홍은숙 · 이광화 · 김은기 · 노경호<sup>†</sup>

조정밀생물분리기술연구센터, 인하대학교 생명화학공학과  
(2004년 10월 19일 접수, 2005년 2월 22일 채택)

## Extraction of Whitening Agents from Natural Plants and Whitening Effect

Yinze Jin, So Young Ahn, Eun Suk Hong, Guang Hua Li, Eun-Ki Kim, and Kyung Ho Row<sup>†</sup>

Center for Advanced Bioseparation Technology

Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received October 19, 2004; accepted February 22, 2005)

천연물 중에서 사자발쑤과 인진쑤, 홍경천, 청국장, 된장 추출물로 미백효과를 측정하였다. 쑤 10 g에 300 mL의 에탄올로 상온에서 3 h의 초음파 추출을 진행하였다. 추출물을 차례로 같은 양의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테트로 분배과정을 거쳤다. 홍경천 5 g에 150 mL의 메탄올을 첨가하고 상온에서 12 h을 냉침하여 얻은 추출물을 액체 크로마토그래피를 통과하였다. 제조용 컬럼(3.9×250 mm, C<sub>18</sub>, 15 μm)을 통하여 두개 부분의 분획물을 획득할 수 있었다. 청국장과 된장은 60% 에탄올을 사용하여 추출하였다. 티로시나아제 억제활성과 멜라닌 억제효과로 미백효과를 측정하였다. 쑤의 경우 항산화효과에서는 인진쑤의 물층, 멜라닌 억제 효과에서는 사자발쑤의 헥산층, 인진쑤의 클로로포름층이 우수하였다. 홍경천 추출물은 *in-vivo* melanin production ratio assay에서 melanin-a 세포를 사용한 결과 미백효과는 알부틴보다 우수하였다. 청국장과 된장의 60% 에탄올 추출물은 미백효과를 나타내지 않았다.

The extracts from natural and fermented products such as *Artemisia* plants, *Rhodiola Salientness*, fermented soybeans and soybean paste were used to investigate the whitening effect. 10 g of *Artemisia* plant were added to 300 mL of ethanol and extracted by sonification at room temperature for 3 h. The extract was further partitioned by the equal volume percent in the order of the n-hexane, chloroform and ethyl acetate. 5 g of *Rhodiola salientness* was also added to 150 mL of methanol and extracted at the room temperature for 12 h. The effluents from a chromatographic column (3.9×250 mm, C<sub>18</sub>, 15 μm) were collected and concentrated in two parts. The extraction of fermented soybeans and soybean paste were done by 60% ethanol. In this work, tyrosinase inhibitory activity and melanin inhibitory effect were measured to confirm the whitening effect. The water layer of *Artemisia princeps* Pampan showed the good inhibitory of antioxidant, while the hexane layer of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and the chloroform layer of *Artemisia princeps* Pampan had the excellent melanin inhibitory effect. The *Rhodiola salientness* had the superior whitening effect to the arbutin in *in-vivo* melanin production ratio assay. However, the fermented soybeans and soybean paste did not show any whitening effect.

**Keywords:** crude plants, whitening effect, melanin production ratio, tyrosinase inhibitory activity

### 1. 서 론

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대항하는 기능을 수행하고 아민, 유리기, 금속이온 등과 같은 세포 독성물질에 대한 제거제로 작용하여 세포를 보호하는 작용을 한다. 반면에 체내, 외적인 여러 요인에 의해 멜라닌 생성이 증가되어 다량의 멜라닌이 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소침착 현상이 나타나며 이런 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암의 유발에 관여하는 것

으로 알려졌다[1,2]. 피부에서의 색소침착 방지는 주로 다음의 세 가지 관점에서 연구되어 왔다. 첫째로, 멜라닌 합성의 주효소인 티로시나아제 활성을 조절하기 위하여 티로시나아제 합성 저해물질이나 티로시나아제의 기질에 대한 길항물질(antagonist)을 개발한다. 둘째로, 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째로, 도파(dopa)의 산화방지를 위해 도파 환원 물질을 개발한다. 마지막으로, 멜라닌 생성기구인 제1효소 티로시나아제와 도파 크롬(DOPA chrome)에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 제2효소인 DOPA chrome tautomerase, DHICA에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로의 변환을 촉매하는 제3의 효소의 활성을 동시에 감소시킨다[2].

<sup>†</sup> 주 저자(e-mail: rowkho@inha.ac.kr)

멜라닌의 생합성은 주로 티로시나아제 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고 되었지만, 1980년대 이후 생체 내에서 dopachrome이 DHICA로 전환되는 경로 외에 dopachrome tautomerase 작용에 의해 DHICA (5,6-di-hydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로를 밝혀졌다. Dopachrome에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 독성이 있는 생성 중간 대사물질로부터 자신을 보호하기 위한 파생 경로로 추정되고 있다[3,4]. 이처럼 멜라닌의 색소침착은 인체의 병리적 문제의 원인이 되기도 하지만 미용적인 측면의 문제로 인식되고 있다. 따라서 멜라닌 형성 억제에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 멜라닌 생합성 저해제는 의약품, 화장품, 식품 등에서 피부질환 치료제, 식품갈변방지제, 피부미백제 등에 적용되고 있다. 기존에는 멜라닌의 생성과정을 억제하는 미백원료로 아스כול빈산(ascorbic acid), 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone) 등이 사용되고 있다. 그러나 이상의 미백원료가 강한 미백효과에도 불구하고 제품 안정성이 낮다는 문제가 있다[5].

쑥은 국화과(compositae)에 속하는 다년생 초본 식물로서 약 400여종의 *Artemisia*속 식물 중 300여종이 우리나라에서 추정되고 있지만 실제 보고 된 것은 40종 내외이다[6,7]. 사자발쑥의 약리적 효과로는 항균작용, 기관지 확장작용, 모세혈관작용, 혈액응고 억제작용, 혈액강화작용, 항위염 및 항위궤양 효과 등 약리적 효과가 보고되어 있다[8-11]. 간염예방 항염증, 담석증 초기치료, 해열 및 이뇨 목적으로 민간요법에서 주로 쓰여 온 인진쑥의 약리적 효과로는 발암물질 억제효과, 암세포 사멸효과, 클라스테롤 억제효과, 혈청지질의 감소효과, 간기능 개선효과, 돌연변이 억제효과가 있다[12-15]. 여러 해 풀인 홍경천은 피자식물문(Angiospermae), 돌나물과(Crassulaceae), 돌꽃(*Rhodiola*)에 속한다[16]. 홍경천은 인삼, 가시오가피 이후에 발견한 약용 식물의 일종으로 백혈구의 증감, 혈당 등 생리적 기능 회복에 도움을 주고, 피로 회복 작용, 집중력 및 기억력증강, 신경 쇠약, 혈액결핍성 산소결핍에 대한 보조적과 심근의 저항력을 강화한다. 항산화 작용으로 고혈압, 암 등을 방지하며 각종 질병을 예방한다. 기타작용으로 강심, 항염증 및 조절작용을 촉진하고 진정 작용을 한다[17]. 청국장에는 트립신, 아밀라아제 등 여러 효소가 포함되어 있고, 청국균(고초균)에 의해 합성되는 비타민 B2도 많이 포함되어 있다. 된장에는 콩 단백질이 분해되어 형성된 콩 펩티드라는 것이 존재하고 혈압 조절에 관여하는 성분이 들어 있어, 혈압 상승을 억제한다.

천연식물의 추출물을 이용한 미백원료는 효과와 제품의 안정성으로 인해서 날로 각광 받고 있다. 본 연구에서는 천연물로서 사자발쑥(*Artemisia princeps* Pampan)과 인진쑥(*Artemisia hwayomogi* Kitamura)의 추출물, 홍경천(*Rhodiola sachalinensis*) 추출물 그리고 청국장(fermented soybeans)과 된장(soybean paste) 추출물에 대한 티로시나아제 억제효과와 멜라닌 억제효과 등 미백효과를 비교하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료 및 기기

#### 2.1.1. 시약

본 실험에서 사용한 건조된 사자발쑥과 인진쑥은 경동시장에서 구입하였으며 이동상에 쓰인 TFA는 Sigma에서 구입하였다. 에탄올, 핵산, 클로로포름과 에틸아세테이트는 HPLC-grade용으로 덕산화학에서 구입하였고 물은 2차 증류한 증류수를 감압 펌프(division of millipore, Waters)와 필터(FH-0.45  $\mu$ m)를 이용하여 감압여과한 후 사용하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PTFE 0.2  $\mu$ m, Advantec

MFS Inc.)를 이용해 전 처리를 하였다. 본 실험에서 사용한 건조된 홍경천은 중국에서 수입하였고 청국장과 된장은 (주)메주와 첼리스트로부터 제공받았다. 이동상으로 이용한 에탄올은 덕산화학(Duksan pure chemical Co., Ltd.)에서 구입하였고, 물은 감압 펌프(Division of Millipore, Waters, Milford, MA 01757, U.S.A.)와 필터(HA-0.5  $\mu$ m, Division of Millipore, Waters Co.)를 이용하여 여과한 증류수를 사용하였다.

#### 2.1.2. HPLC System

실험에서 사용한 분석용 HPLC 장치는 영린기기의 M930D solvent delivery module, UV 730D detector, Rheodyne 7725i loop injector (20  $\mu$ L sample loop)와 영린기기 M930 solvent delivery pump, UV 720 absorbance detector, 영린기기 Autochro data module을 사용하였다.

#### 2.1.3. 추출방법

추출한 시료를 농축하기 위하여 회전식 감압 증발기(Buchi Rotavapor R-200, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)를 사용하였고 시료의 분석에 사용된 HPLC장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (20  $\mu$ L and 100  $\mu$ L sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하였다. HPLC에서 얻은 chromatography는 데이터 수집 장치인(Chromate Ver. 3.0 Interface Eng., Korea)를 통해서 얻었다. 분석용 컬럼의 크기는 3.9  $\times$  250 mm이고 충전물은 LiChrospher 100RP-18 (15  $\mu$ m, Merck Co.)이다.

#### 2.1.4. 미백 성분 측정

Tyrosinase 저해활성 측정으로, dopa oxidase의 활성은 L-dopa를 기질로 하여 생성된 dopachrome의 흡광도 microplate reader (VERSA max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 세포는 C57BL/6J mouse를 기원으로 하는 Murine melan-a melanocyte로서 태평양에서 분양받아 사용하였다. 배양 배지로는 RPMI 1640 배지에 10% (vol/vol) FBS (fetal bovine serum), 1%의 항생제(Penicillin 및 streptomycin)를 첨가하여 만들고, 이에 200 nM의 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가하여 완전한 멜라닌 세포 배양액을 사용하였다. 광학밀도 측정에 사용된 spectrophotometer (UV-160A, SHIMADZU)는 475 nm에서 사용하였다.

## 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. 미백성분의 추출

#### 2.2.1.1. 사자발쑥과 인진쑥

사자발쑥과 인진쑥을 각각 10 g씩 서로 다른 플라스크에 담고 거기에 에탄올을 각각 300 mL씩 가하고 초음파로 3 h 추출한다. 추출액을 여과지를 사용하여 여과하고 회전식 감압 농축기를 이용하여 35  $^{\circ}$ C 이하에서 60 mL까지 농축하고 거기에 동량의 물을 넣고 다시 회전식 감압 농축기를 이용하여 50  $^{\circ}$ C 이하에서 60 mL까지 농축한다. 농축액에 동량의 핵산(50/50, vol. %)을 넣으면 분층현상이 생기어 핵산층과 물층을 얻게 된다. 위에서 얻은 물층에 동량의 클로로포름(50/50, vol.%)을 넣어 분획하여 클로로포름층과 물층을 얻는다. 같은 방법으로 위의 물층에 동량의 에틸아세테이트(50/50, vol. %)를 넣고 분배하여 에틸아세테이트층과 물층을 얻게 된다. 회전식 감압 농축기를 사용(35  $^{\circ}$ C 이하)하여 농축시킨 다음 미백효과를 측정하였다.

2.2.1.2. 홍경천

건조된 홍경천 5 g을 메탄올 50 mL로 상온에서 12 h 추출하는 공정을 3번 반복하여 150 mL 추출액을 준비하였다. 홍경천 추출물을 0.2 μm 필터로 여과한 후 분석용 컬럼(3.9×250 mm, C<sub>18</sub>, 15 μm, 300 Å)에 20 μL를 주입하였다. 이동상 조성은 단계구배용매조성법을 이용하였고 물/메탄올; 90/10~30/70 (vol. %, 5 min), 30/70~10/90 (vol. %, 15 min)이고 wave length는 365 nm로 하여 실험을 수행하였다.

2.2.1.3. 청국장과 된장

청국장(20 g)과 된장(20 g)은 각각 60% 에탄올 150 mL로 90 min 동안의 초음파 추출을 진행하여 추출물을 획득하였다. 감압농축기를 이용하여 50 mL로 농축한 후 여과지를 사용하여 여과하고 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하였다. 그리고 4일 동안의 동결건조를 진행하여 파우더를 만들어서 미백효과를 측정하였다.

2.2.2. 미백 성분 측정

2.2.2.1. 티로시나아제 활성 저해실험

티로시나아제 저해활성 측정은 dopa oxidase의 방법을 변형하여 이용하였으며, dopa oxidase의 활성은 L-dopa를 기질로 하여 티로시나아제에 의하여 생성되는 방응산물인 dopachrome을 흡광도 492 nm에서 측정하였다. 반응구는 40 μL의 25 mM L-dopa와 80 μL의 67 mM phosphate buffer (pH 6.8), 40 μL의 mushroom tyrosinase (125U)와 40 μL의 시료를 첨가하여 37 °C에서 20 min 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 저해율을 구하였다[18].

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 } O.D.}{\text{대조구의 } O.D.} \times 100 \quad (1)$$

2.2.2.2. DPPH 소거활성 측정

각 물질의 항산화 효과는 Blois의 방법에 따라 일정 농도의 각 시료에 0.1 mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액을 첨가하여 강하게 vortex한 후 37 °C에서 30 min간 반응시킨다. Proton-radical scavenger에 의하여 DPPH가 탈색되므로 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 DPPH의 광흡수 정도로 항산화 효과를 알 수 있다. 따라서 대조구와 실험구의 흡광도 차를 대조구 흡광도로 나눈 값을 백분율로 하여 소거율을 계산하고 이를 다시 농도와와의 상관관계로 50%의 소거율을 나타내는 RC<sub>50</sub> 값을 산출하였다[19].

2.2.2.3. 멜라닌 세포 배양

분양 받은 멜라닌 세포는 상기의 완전 배지를 이용하여 37 °C의 10% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 3~6일 마다 계대한 후 세포 배양용 24 well plate에 각 well 당 2×10<sup>5</sup>이 되도록 분주하고 같은 조건하에서 24 h 배양하였다. 멜라닌 세포의 수는 배양세포의 일정량을 취하여 trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. 24 h 배양 후 각 세포가 담긴 well로부터 새로운 배지로 교환해주고 시험에 사용될 시료(홍경천의 분획)를 최종농도 10 ppm, 100 ppm으로 처리한 후 37 °C 배양기에 10% 이산화탄소의 조건으로 2~3일간 배양하였다. 대조구로서는 시료를 첨가하지 않은 배지를 이용하였으며 표준물질로는 알부틴(Sigma Co.)을 사용하였다[20].

2.2.2.4. 멜라닌 함량 측정

배양된 멜라닌 세포로부터 멜라닌을 얻어내기 위하여 3일간 배양한

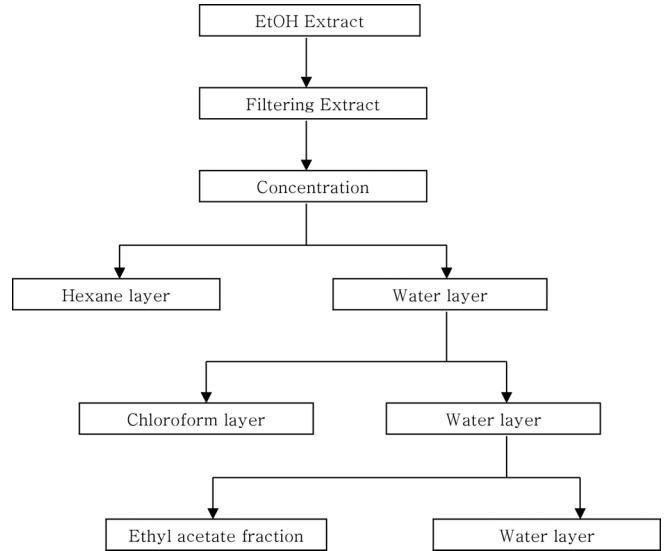


Figure 1. Scheme of the extraction processing from *Artemisia* plants.

세포를 PBS로 세척하여 오래된 배지 및 세포의 부산물 등을 제거하고, Trypsin/EDTA를 이용하여 부착된 세포를 모아 RPMI 1640 배지로 세척한 후 1500 rpm으로 원심분리하여 세포를 수거하였다. 이 세포들은 다시 PBS로 세척하여 10%의 DMSO가 담긴 1 N NaOH를 첨가하여 90 °C 항온수조에서 10 min 멜라닌을 용해시킨 후 반응을 정지시키고, spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 광학밀도를 측정하였다.

멜라닌 생성 저해율(%)

$$= \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (2)$$

반응구의 각 well 당 전체 멜라닌의 양을 절대 멜라닌으로 표기하고, 다시 세포수당 멜라닌 함량은 상관된 멜라닌으로 표기하였다.

2.2.2.5. 세포의 Viability Determination

멜라닌 세포의 수는 일정 양을 취하여 trypan-blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. 멜라닌 세포를 seeding하고 시료를 첨가한 후 배양 3일 후 대조구의 세포수와 시료를 첨가한 처리구의 세포수를 비교 검토하여, 대조구의 세포수를 기준으로 하여 % control로 데이터화하였다.

3. 결과 및 고찰

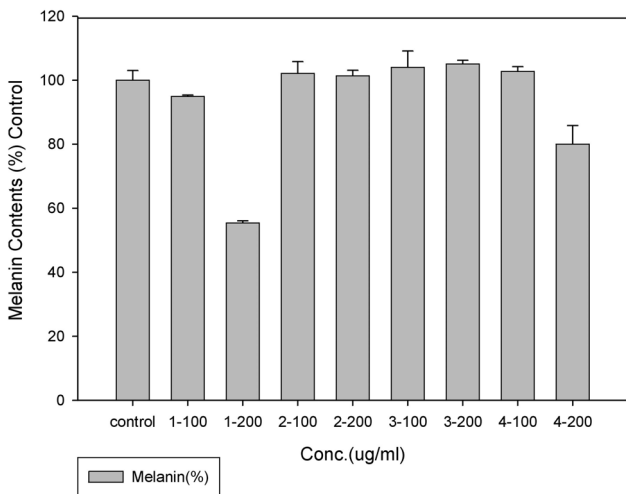
천연물 중에서 사자발쑉, 인진쑉과 홍경천, 청국장, 된장을 각각 에탄올, 메탄올, 60% 에탄올을 사용하여 추출하고 미백효과를 확인하기 위해서 항산화효과와 멜라닌 억제효과를 측정하였다.

3.1. 쑉 추출물의 미백효과

사자발쑉과 인진쑉을 100% 에탄올로 3 h 초음파 추출하고 추출액을 여과지를 사용하여 여과하고 회전식 감압 농축기를 이용하여 60 mL까지 농축하고 거기에 동량의 물을 넣고 다시 회전식 감압 농축기를 이용하여 60 mL까지 농축한다. 농축액에 동량의 헥산(50/50, vol. %)을 넣으면 분층현상이 생기어 헥산층과 물층을 얻게 된다. 위에서

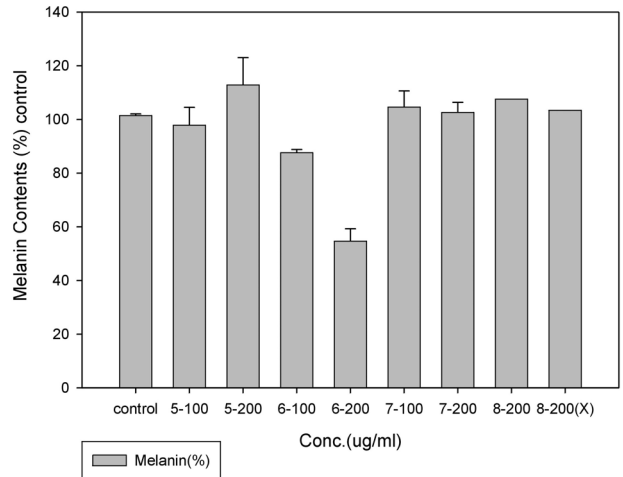
**Table 1. Tyrosinase Inhibitory Activity of the *Artemisia* Plants**

Sample	Concentration	Inhibition (%)
<i>Artemisia Princeps</i> Pampan (Hexane layer)	10 ppm	34.38
	100 ppm	6.67
<i>Artemisia Princeps</i> Pampan (Chloroform layer)	10 ppm	40.68
	100 ppm	56.28
<i>Artemisia Princeps</i> Pampan (Ethly acetate layer)	10 ppm	32
	100 ppm	45
<i>Artemisia Princeps</i> Pampan (Water layer)	10 ppm	35.03
	100 ppm	39.44
<i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura (Hexane layer)	10 ppm	38.13
	100 ppm	31.08
<i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura (Chloroform layer)	10 ppm	46.66
	100 ppm	44.62
<i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura (Ethly acetate layer)	10 ppm	48.87
	100 ppm	50.02
<i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura (Water layer)	10 ppm	39.59
	100 ppm	62.77

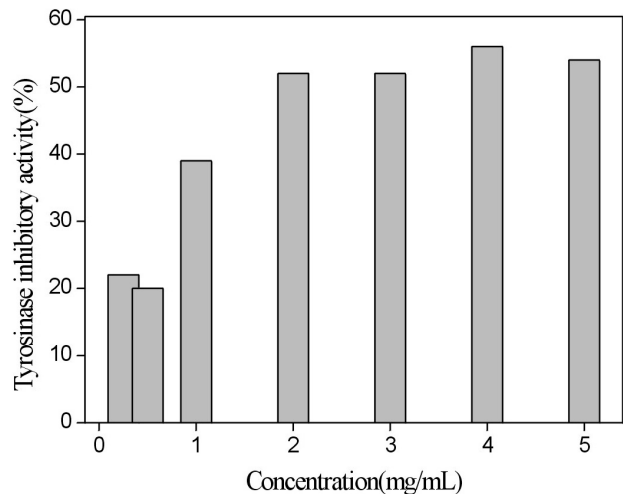


**Figure 2. Effect of several layer of *Artemisia princeps* Pampan on melanogenesis.**

얻은 물층에 동량의 클로로포름(50/50, vol. %)을 넣어 분배하여 클로로포름층과 물층을 얻는다. 같은 방법으로 위에서 얻은 물층에 동량의 에틸아세테이트(50/50, vol. %)를 넣고 분배하여 에틸아세테이트층과 물층을 얻었다. Figure 1에서처럼 부동한 극성을 가진 층으로 나눔으로써 부동한 극성에 용해되는 쪽에 포함된 성분의 미백효과를 측정할 수 있었다. 사자발쑤과 인진쑤를 이러한 층으로 추출하여 측정된 티로시나아제의 억제효과를 Table 1로 표시하였다. 사자발쑤의 클로로포름층은 농도가 100 ppm일 때 티로시나아제 억제효과가 56.28%로 제일 높았으며 인진쑤의 물층은 농도가 100 ppm일 때 티로시나아제 억제효과가 62.77%로 제일 높았다. 사자발쑤의 헥산층은 농도가 10 ppm일 때 억제효과가 34.38%인 반면에 100 ppm일 때 6.67%인데 이것은 실험상의 오차라고 볼 수 있다. 다른 층에서의 억제효과는 농도가 증가함에 따라 증가하였으므로 믿을 수 있는 결과라고 볼 수 있다.



**Figure 3. Effect of several layer of *Artemisia iwayomogi* Kitamura on melanogenesis.**



**Figure 4. Effect of extractions of *Rhodiola sachalinensis* on the tyrosinase inhibitory activity at several concentration, *in vitro*.**

사자발쑤의 멜라닌 억제효과를 Figure 2로 나타냈으며 황촉에서의 1, 2, 3, 4는 각각 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 물층을 나타낸다. 그 뒤의 100과 200은 각개 층에서의 농도를 나타낸다. 100은 100  $\mu\text{g/mL}$ 를, 200은 200  $\mu\text{g/mL}$ 를 각각 나타내었다. Figure 2에서 보듯이 사자발쑤의 헥산층과 물층의 농도가 200  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 멜라닌 저해효과를 나타냈다. 그 중에서도 헥산층의 억제효과가 제일 뚜렷하였다. 총적으로, 사자발쑤의 물층은 티로시나아제와 멜라닌 억제에서 모두 효과를 나타냈다. 인진쑤의 멜라닌 억제효과를 Figure 3으로 나타냈다. 사자발쑤와 마찬가지로 5, 6, 7, 8은 각기 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 물층을 나타낸다. 인진쑤의 클로로포름층이 제일 뚜렷한 멜라닌 억제효과를 나타냈으며 농도가 증가함에 따라 더 강한 억제효과를 나타냈다. 티로시나아제 억제효과에서도 클로로포름층은 각각 10 ppm일 때 46.66%, 100 ppm일 때 44.62%의 억제효과를 나타냈다. 인진쑤에서의 제일 좋은 미백효과는 클로로포름층에서 나타났다.

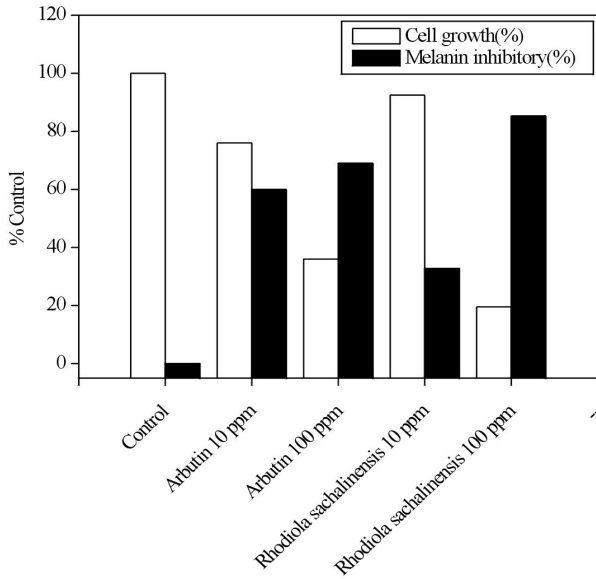


Figure 5. Effect of total extract of *Rhodiola sachalinensis* on melanogenesis (Control(not addition), 10 ppm, 100 ppm of Arbutin and *Rhodiola sachalinensis* repectively).

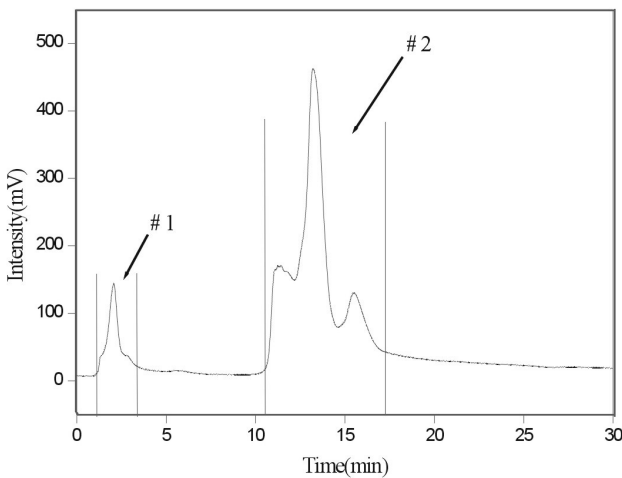


Figure 6. Separation of extraction of *Rhodiola sachalinensis* by RP-HPLC (Mobile phase: Water/MeOH=90/10~30/70 (5 min), 30/70 ~10/90 (15 min), packing size: 15  $\mu$ m, pore size: 300  $\text{\AA}$ , inject. vol.: 20  $\mu$ L, wavelength: 365 nm).

3.2. 홍경천 추출물의 미백효과

건조된 홍경천 5 g을 메탄올 50 mL로 상온에서 12 h 추출하는 공정을 3번 반복하여 150 mL 추출액을 준비하였다. 티로시나아제 효소의 저해활성을 확인한 Figure 4의 결과, 2 mg/mL(400 ppm) 이상의 고농도에서 효소저해활성이 50% 이상으로 나타났다. 홍경천 추출물을 멜라닌 세포에 적용하였다. 멜라닌 세포의 배양액에 최종농도가 10 ppm 및 100 ppm이 되도록 처리하여 3일 후 측정한 결과 Figure 5에서 보는 것처럼 10 ppm의 농도에서 세포의 성장이 92.48%이고 멜라닌 합성이 32.75% 저해 받아 미백 효과가 있음을 알 수 있었다. 반면 100 ppm 농도의 처리구에서 멜라닌이 85.3%로 매우 크게 저해되었으나, 세포의 성장 역시 80.45%로 저해를 받아 세포 당 멜라닌의 합성율이 효과적이지 못하였으며 또한 세포의 독성이 있는 것으로 생각된

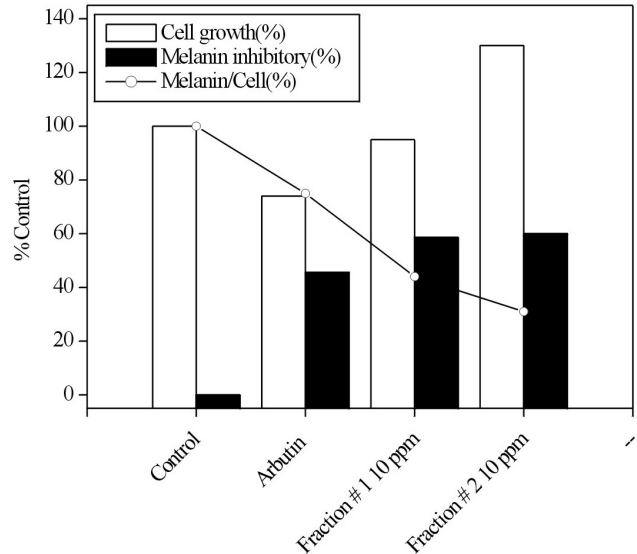


Figure 7. Effect of #1 and #2 of *Rhodiola sachalinensis* on melanogenesis.

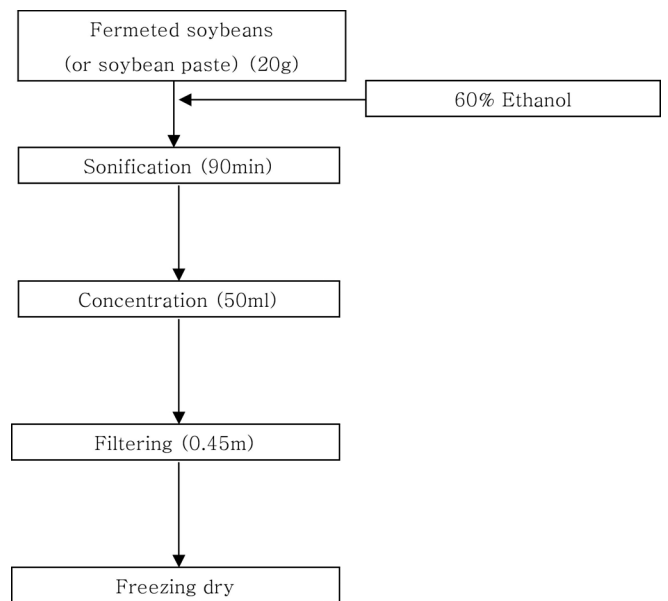


Figure 8. Scheme of the extraction processing from fermented soybeans and soybean paste.

다. 저농도인 10 ppm일 때, 멜라닌 저해효과를 가졌지만 세포의 성장율도 100%에 도달하지 못하였고 농도를 100 ppm으로 증가함에 따라 세포의 성장을 저해하였으며 이에 따라 독성이 있는 것이 판단된다. 고농도로 됨에 따라, 멜라닌 저해효과는 증가하였지만 독성이 있기 때문에 미백성분으로의 적용이 불가능하다.

홍경천 추출물을 0.2  $\mu$ m 마이크로 필터로 여과한 후 분석용 컬럼 (3.9 $\times$ 250 mm, C<sub>18</sub>, 15  $\mu$ m, 300  $\text{\AA}$ )에 20  $\mu$ L를 주입하였다. 이동상 조성은 단계구배용매조성법을 이용하였고 물/메탄올; 90/10~30/70 (vol. %, 5 min), 30/70~10/90 (vol.%, 15 min)이었고 파장은 365 nm로 고정하였다. 체류시간에 따라 피크를 두 부분(#1, #2)으로 나누게 되었다(Figure 6). 주입량을 20에서 150  $\mu$ L까지 늘려서 분취하고 수집된 #1, #2를 각각 회전식 증발기로 농축하였다. 각 부분에 대해서는

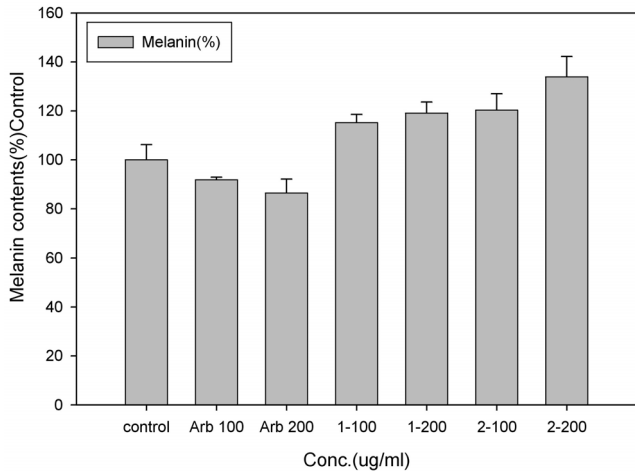


Figure 9. Effect of extraction of fermented soybeans and soybean paste on melanogenesis.

*in-vitro* (cell-free)에서 수행한 티로시나아제 효소의 저해활성 결과는 나타나지 않았다. 그러나 멜라닌 합성을 비교실험에서는 Figure 7과 같이 알부틴이 45.6%의 멜라닌 합성 저해를 한 반면 10 ppm의 같은 농도에서 #1과 #2는 각각 58.6%와 60%로 비슷한 수준에서 멜라닌 합성 저해를 보였다. 특히 알부틴의 경우 독성으로 인해 세포성장을 저해하는데 비해 #2는 세포 성장을 저해하지 않는 것으로 판단되었고, 세포 당 멜라닌의 양도 31%로 굉장히 작은 것을 알 수 있었다.

홍경천의 추출물을 미백 성분이 함유된 기능성 화장품의 원료로 사용하고자 할 때 실험의 결과에 따르면, 이동상 조성을 물/메탄올; 90/10~30/70 (vol. %, 5 min), 30/70~10/90 (vol. %, 15 min)으로 하여 #1, #2로 분리하여 #2를 분취, 농축하여 사용하는 것이 가장 효율적인 것을 알 수 있었다.

### 3.3. 청국장, 된장 추출물의 미백효과

청국장(20 g)과 된장(20 g)은 각각 60% 에탄올 150 mL로 90 min 동안의 초음파 추출을 진행하여 추출물을 획득하였다. 감압농축기를 이용하여 50 mL로 농축한 후 여과지를 사용하여 여과하고 0.45  $\mu$ m 필터를 사용하여 여과하였다. 그리고 4일 동안의 동결건도를 진행하여 파우더를 만들어서 미백효과를 측정하였다. 청국장과 된장의 추출 과정을 Figure 8로 나타냈다. Figure 9는 청국장과 된장 추출물의 멜라닌 억제효과를 나타낸 그림이다. 알부틴의 농도가 증가함에 따라 멜라닌 억제효과가 증가하는 것으로 보아 이 결과는 믿을 수 있는 결과이며 기준물질인 알부틴보다 청국장과 된장 추출물은 멜라닌 억제 효과를 나타내지 않았다. Figure 9에서 1과 2는 각각 청국장과 된장을 표시하고 100과 200은 각각 농도( $\mu$ g/mL)를 나타내었다. 청국장과 된장의 추출물이 멜라닌 억제 효과를 나타내지 못하였기에 티로시나아제 억제 효과는 측정하지 않았다.

## 4. 결 론

천연물 중에서 사자발쑥과 인진쑥 및 홍경천, 발효식품에서 청국장과 된장 추출물에 대하여 미백테스트를 수행하였다. 사자발쑥의 클로로포름층과 인진쑥의 물층이 각각 56.28% (100 ppm)와 62.77% (100 ppm)로 높은 티로시나아제 억제효과를 나타냈으며 사자발쑥의 핵산층과 인진쑥의 클로로포름층이 뚜렷한 멜라닌 억제효과를 나타냈다. 홍경천 추출물을 이용한 미백성능 측정에서는 알부틴에 비해 효율적인 결과를 얻지 못했지만, 체류 시간에 따라 2부분으로 분리하여 각 부분에 대한 미백성능 검사 결과, melanin-a를 이용하여 *in-vivo*에서 수행한 멜라닌 합성율을 비교한 실험에서 10 ppm의 농도에서, 알부틴 (45.6%)보다 #1(58.6%)과 #2(60%)가 우수하게 멜라닌 합성을 저해하는 것을 알 수 있었다. 청국장과 된장의 추출물은 멜라닌 억제효과를 나타내지 않았으므로 티로시나아제 억제효과는 측정하지 않았다.

## 감 사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터(인하대학교) 연구비 지원에 의하여 수행하였으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. G. C. Romero, *et al.*, *J. Clin. Invest.* **99**, 635 (1997).
2. A. L. Soon and S. J. Lee, *Korea Beauty Magazine*, **6**, 239 (2000).
3. K. Maeda and M. Fukuda, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
4. Y. Mishima, S. Hatae, and H. Kondon, *Fragrance J.*, **1**, 13 (1996).
5. K. H. Jung and M. S. Thesis, Konkuk University, Seoul, Korea (2002).
6. S. J. Lee, *Kor. J. Raw Med.* **6**, 75 (1975).
7. 농촌진흥청, 표준 영농교본, *산채류재배*. **88** (1990).
8. D. L. Morris, *Science* **107**, 254 (1948).
9. L. N. Han, H. O. Yang, and B. H. Han, *Medicinemagazine*, **28**, 69 (1984).
10. Y. H. Kim, Master Thesis, Hanyang Univ., Seoul, Korea (1981).
11. S. A. Moon, Master Thesis, Dongduk Univ., Seoul, Korea (1993).
12. K. S. Kim, *Korea Veterinary medicine*, **35**, 489 (1995).
13. S. Jung and D. Y. Kang, *Chungnam Medicalmagazine*, **12**, 27 (1985).
14. U. K. Han, *Ewha Medicalmagazine*, **22**, 57 (1983).
15. 한규석, *강원도보건환경연구원보*, **6**, 51 (1995).
16. Y. K. Han, Master Thesis, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1999).
17. <http://my.netian.com/~asia-co/a01.html>
18. J. D. Laskin and L. A. Piccinini, *J. Biol. Chem.* **261**, 16226 (1986).
19. M. S. Blois, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
20. S. H. Lee, S. Y. Chol, H. C. Kim, J. S. Hwang, B. G. Lee, J. J. Gao, and S. Y. Kim, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1045 (2002).