

## 연잎, 연꽃 및 연꽃 수술 추출물의 Tyrosinase 활성억제 및 Melanin 생성억제에 의한 미백 효과

장문석, 김향미, 양응모, 김도림, 박은화, 고은빛, 최문정, 김휴영, 오지훈, 심경준, 윤지원,  
박성규<sup>##</sup>

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

### Inhibitory Effects of *Nelumbo nucifera* on Tyrosinase Activity and Melanogenesis in Clone M-3 Melanocyte Cells

Mun Seog Chang, Hyang Mi Kim, Woong Mo Yang, Do rim Kim, Eun Hwa Park, Eun  
Bit Ko, Moon Jung Choi, Hyu Young Kim, Ji Hoon Oh, Kyung Jun Shim, Jiwon Yoon,  
and Seong Kyu Park<sup>##</sup>

Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives :** We examined three parts of *Nelumbo nucifera* that might be useful for skin-whitening effect. Each parts of leaves, flowers and stamen were extracted with water or 70% ethanol.

**Methods :** This study investigated inhibitory effects of each extracts on tyrosinase activity. Extracts were tested for cytotoxicity on clone M-3 melanocyte cells, melanin inhibitory activities were further assessed.

**Results :** The water extract of *Nelumbo nucifera* stamen, ethanol and water extracts of flowers exhibited inhibitory effects on tyrosinase (IC50 values 726.16, 1063, and 1732.36 ug/mL, respectively). The water extract of *Nelumbo nucifera* stamen, ethanol extract of flowers, both ethanol and water extracts of leaves showed relatively lower cytotoxicity, with cell viability above 80% with a concentration of 20  $\mu$ g/mL. In addition, The water extract of *Nelumbo nucifera* stamen inhibited the melanin production in clone M-3 melanocyte cells.

**Conclusions :** Among each parts of *Nelumbo nucifera*, the water extract of stamen was the strongest candidates for skin-whitening cosmetic application.

**Key words :** *Nelumbo nucifera*, tyrosinase, Clone M-3 melanocyte cells, melanin inhibitory activities

## 서 론

현재 한의학과와 화장품업계에서는 안전성을 고려하여 천연물로부터 피부 미백제에 개발을 위하여 많은 연구가 이루어지고 있으며, 그 중 일부는 제품으로 상용화 되어있다<sup>1)</sup>. 미백제는 melanocyte의 성장을 억제하거나 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌의 합성을 억제하는 효과를 가지고 있다. 멜라닌은 피부, 머리카락 및 눈동자의 색에 관여하는 색소 중의 하나이다<sup>2)</sup>. 멜라닌은 자연의 동식물계에 널리 분포되어 있는 유효화합물로서 시스테인과 글루타치온 및 Fe 함유에 따라 갈색에서 흑색의 다양한 색의 농도를 갖는 중화합체이다. 일반적으로 알카리에 난용성인 흑색 멜라닌과 가용성 적색 및 황색 멜라닌으로 구분된다<sup>3)</sup>.

연꽃 (Nelumbo nucifera Gaertner)은 수련과의 여러해살이 수생 식물로서 연꽃의 잎을 하엽(荷葉), 연꽃의 꽃봉우리를 연화(蓮花), 연꽃의 수술을 연수(蓮鬚)라고 한다.

연잎의 화학성분은 roemerine, nuciferine, normuciferine, arnepavine, pronuciferine, N-nornuciferine, anonaine, liriodenone, asimilobine, N-methylasimilobine, N-norarnepavine, lirinidine, quercetin, isoquercitrin, leucocyanidin, leucodelphinidin, nelunboside, gluconicacid, 10-nonacosanol,  $\beta$ -sitosterol, dehydroroemerine, dehydronuciferine, dehydroanonaine, N-methylisococlaurine, N-methylcoclaurine 등이 알려져 있다. 연잎은 서열번갈(暑熱煩渴)을 치료하며, 토혈(吐血)과 하혈(下血)에 대하여 지혈(止血) 효과가 있다. 연꽃의 화학성분은 quercetin, luteolin, isoquercitrin, luteolinglucoside, kaempferol, kaempferol-3-galactoglucoside, kaempferol-3-diglucoside 등이 함유되어 있다. 연꽃은 지혈(止血) 작용이 있어 소변출혈, 부인 하혈을 치료한다. 연꽃의 수술은 화학성분으로 luteolin, quercetin, isoquercitrin, luteolinglucoside 등이 함유되어 있다. 연꽃 수술은 유정(遺精), 소변 빈삭(小便頻數), 유뇨(遺尿) 등을 치료한다<sup>4)</sup>.

본 연구에서는 연꽃의 부위에 따라 미백제로의 사용 가능성을 확인하기 위하여, 연잎, 연꽃, 연꽃 수술의 에탄올 및 물 추출물에 대하여 시험관내 실험과 세포 실험을 통하여 멜라닌 생성 여러 단계 중 첫 단계인 tyrosinase 활성을 측정하였고, Clone M-3 melanoma cell에 대한 세포독성 및 미백 효과의 마지막 검증 단계라 할 수 있는 멜라닌 함량을 측정

함으로써 미백효과를 확인하였다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 약재 및 시약

본 실험에 사용한 연잎, 연꽃, 연꽃 수술은 전라남도 무안군에서 채취하여 (주)다연에서 가공한 것을 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 일급시약을 사용하였다.

#### 2) 검액의 조제

##### (1) 에탄올 추출물의 조제

연잎, 연꽃 각각 300 g을 70% 에탄올 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 각각 63.5 g, 10.20 g (수율 21.2%, 3.40%)을 얻었다.

##### (2) 물 추출물의 조제

연잎, 연꽃 및 연꽃 수술 각각 300 g을 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑스 각각 72.12 g, 10.50 g 및 63.75 g (수율 24.04%, 3.50% 및 21.25%)을 얻었다.

## 2. 방법

### 1) Tyrosinase 활성 억제 효과 측정

Tyrosinase activity의 측정은 Busca (1996)의 방법을 응용하여 실험하였다<sup>5)</sup>. 96 well plate의 각 well에 phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 시료를 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 따라 조제하여 각각 70 ul를 넣고 mushroom tyrosinase (2000 unit/mg) 20 ul와 10 mM L-DOPA 10 ul를 첨가한 후 37°C에서 30 min 동안 incubation한 다음 ice에서 5분 냉각 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

### 2) Cell line 및 culture

#### (1) 세포주

실험에 사용된 세포주는 Clone M-3 (Cloudman

S91 melanoma)로서 Korean Cell Line Bank (KCLB)로 부터 구입하였다.

#### (2) 세포 배양

Clone M-3 cell은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Co), 100 ug/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin 이 첨가된 RPMI1640이 사용되었다. Clone M-3 cell은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식시킨 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffer saline (PBS)용액으로 씻어 준후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 incubator에서 1분간 처리한 다음 trypsin-EDTA 용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착시켰다. 탈착된 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI1640 15 ml을 새로운 배양용기에 옮겨 1:20의 split ratio로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.

#### (3) Cell viability 측정

시료의 세포 독성 정도를 알아보기 위하여 Mosmann (1983), Kotnik (1990) 등의 방법을 응용하여 MTT test로 실험하였다(6,7). Clone M-3 cell을 3 X 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 96 well에 100 ul의 배지와 함께 분주한 뒤, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 PBS로 씻어준 다음 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 0.5 ug/ml에서 150 ug/ml까지 다양한 농도에 따라 각 well에 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 ul씩 각 well에 첨가하고 알루미늄 호일로 차광시킨 후 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 DMSO용액 200 ul를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

#### (4) Melanin 생성 억제 효과 측정

Melanin 성분의 측정은 Hosoi (1985), Tsuboi (1998)의 방법을 응용하여 실험하였다(8,9). Clone M-3 cell을 6 well plate에 1 X 10<sup>6</sup> cells/well의 밀도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 PBS로 씻어준 다음 배양액을 모두 제거하고, 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 0.5ug/ml에서 50 ug/ml까지 다양한 농도에 따라 각 well에 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 1 X PBS로 2회 세척한 다음 1N NaOH 500 ul를 가하고 incubator에 넣어서 2시간 동안 반응시켜 melanin이

완전히 녹게 한 다음 96 well로 옮겨서 400nm 파장의 흡광도를 측정 비교하였다.

## 실험 결과

### 1. Tyrosinase 활성 억제 효과

대조 약물로 사용된 kojic acid는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하였다. Kojic acid의 농도는 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM으로 증가함에 따라 tyrosinase 활성을 각각 34.62%, 16.72%, 8.01%, 5.33%, 3.96%, 2.58%로 유의하게 억제하였다.

연잎 에탄올 추출물은 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 대하여 tyrosinase 활성이 102.10%, 95.93%, 91.07%, 91.21%, 84.03%, 80.23%로 나타나 tyrosinase 활성을 50%이상 억제하지 못하였다. 연잎 물 추출물은 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 대하여 tyrosinase 활성이 95.55%, 91.38%, 88.71%, 83.22%, 74.73%, 69.71%로 나타나 tyrosinase 활성을 50% 이상 억제하지 못하였다.

연꽃 에탄올 추출물은 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 대하여 tyrosinase 활성을 87.06%, 80.21%, 82.71%, 48.09%, 27.31%, 17.97%로 유의하게 억제하였다 ( $p < 0.05$ ). 연꽃 물 추출물은 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 대하여 tyrosinase 활성을 92.38%, 88.11%, 85.11%, 72.75%, 47.70%, 47.25%로 유의하게 억제하였다 ( $p < 0.01$ ).

연꽃 수술 물추출물은 300 ug/ml, 400 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml, 1,500 ug/ml, 2,000 ug/ml의 농도에 대하여 tyrosinase 활성을 73.15%, 63.72%, 54.60%, 38.89%, 32.22%, 40.40%로 유의하게 억제하였다 ( $p < 0.01$ ).

Tyrosinase 활성도 50% 억제를 IC<sub>50</sub>은 연꽃 수술 물 추출물이 726.16 ug/ml, 연꽃 에탄올 추출물이 1063 ug/ml, 연꽃 물 추출물이 1732.36 ug/ml의 순서로 효과가 나타났다.

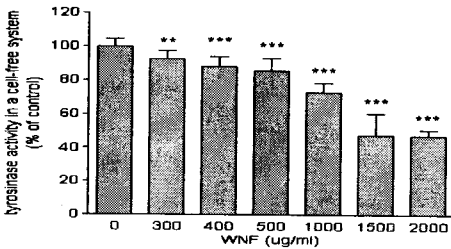
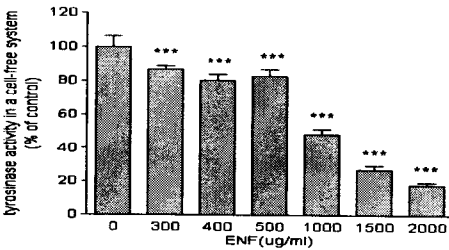
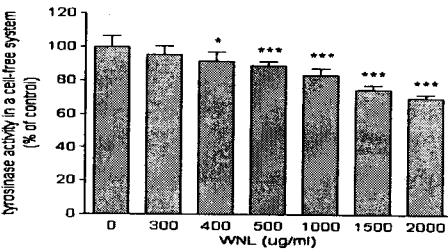
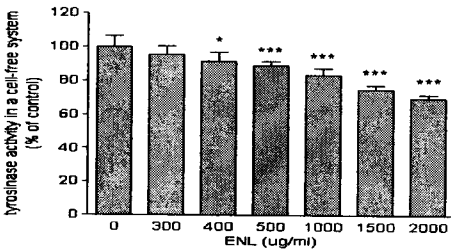
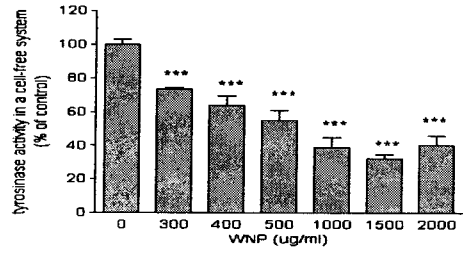
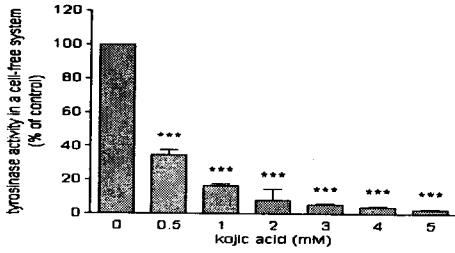


Fig. 1. Effect of ENL, WNL, ENF, WNF, WNP on the tyrosinase activity in a cell free system. To test their direct effect on tyrosinase, human tyrosinase activity was measured in a cell free system. 300 - 2,000 ug/ml of samples were added to each well. Results are the averages of triplicate experiments  $\pm$  S.D. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  compared to control.

ENL: ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* leaves

WNL: water extract of *Nelumbo nucifera* leaves

ENF: ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* flowers

WNF: water extract of *Nelumbo nucifera* flowers

WNP: water extract of *Nelumbo nucifera* stamen

## 2. 세포 생존율에 미치는 영향

연잎이 Clone M-3 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 다양한 농도로 처리하고, 72시간 배양한 후에 MTT방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다.

연잎 에탄올 추출물은 5 ug/ml부터 100 ug/ml 까지 90% 이상의 Clone M-3 세포의 생존율을 유지하였으며, 25 ug/ml의 농도에서 최대 103.37%의 생존율을 나타내었다. 연잎 물 추출물에 의한 생존율은 5 ug/ml부터 50 ug/ml의 농도 까지 70% 이상의 Clone M-3 세포의 생존율을 유지하였으며, 5 ug/ml의 농도에서 최대 95.46%의 생존율을 나타내었다.

연꽃 에탄올 추출물은 5 ug/ml부터 25 ug/ml까지 저농도에서 80% 이상의 Clone M-3 세포의 생존율을 유지하였으나, 100 ug/ml 및 150 ug/ml의 고농도에서는 각각 55.1% 및 22.49%의 생존율을 나타내었다. 연꽃 물 추출물에 의한 생존율은 0.5 ug/ml부터 5 ug/ml의 농도까지 80% 이상의 Clone M-3 세포의 생존율을 유지하였으며, 0.5 ug/ml의 농도에서 최대 87.74%의 생존율을 나타내었다.

연꽃 수술 물 추출물에 의한 생존율은 10 ug/ml부터 20 ug/ml의 저농도까지 80% 이상의 Clone M-3 세포의 생존율을 유지하였으나, 30 ug/ml, 40 ug/ml, 50 ug/ml 및 100 ug/ml의 고농도에서는 각각 76.12%, 49.86%, 26.18% 및 4.07%의 생존율을 나

타내었다.

이상의 결과, 연잎 에탄올 추출물은 5 ug/ml, 10 ug/ml, 25 ug/ml, 50 ug/ml 및 100 ug/ml의 농도에서 80%이상의 생존율을 나타내었으며, 연잎 물 추출물은 5 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml 및 30 ug/ml의 농도에서 80%이상의 생존율을 나타내었다.

연꽃 에탄올 추출물은 5 ug/ml, 10 ug/ml 및 25 ug/ml의 농도에서 80%이상의 생존율을 나타내었으며, 연꽃 물 추출물은 0.5 ug/ml, 1 ug/ml, 2 ug/ml, 3 ug/ml, 4 ug/ml 및 5 ug/ml의 농도에서 80%이상의 생존율을 나타내었다.

연꽃 수술 물 추출물은 10 ug/ml 및 20ug/ml의 농도에서 80%이상의 생존율은 나타내었다.

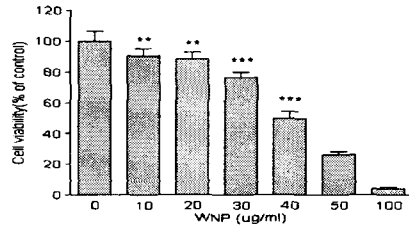
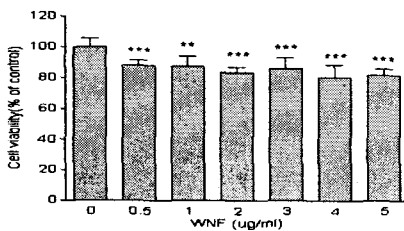
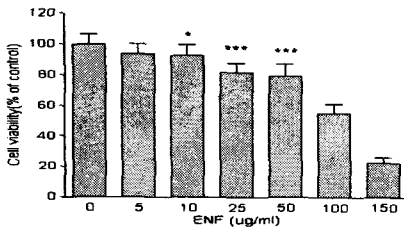
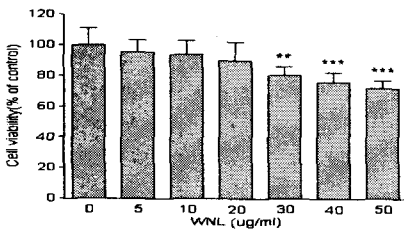
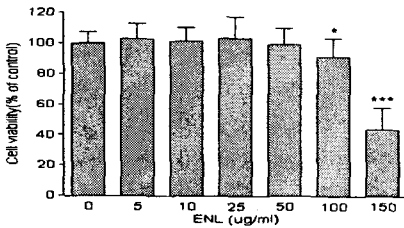


Fig. 2. Effect of ENL, WNL, ENF, WNF, WNP on the viability of Clone M-3 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of samples for 72h. Results were expressed as % control and data were mean ± S.D of at least three determinations.

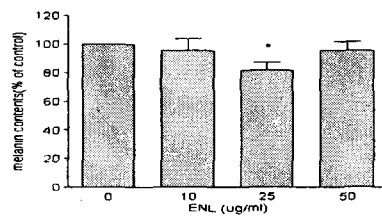
### 3. Melanin 생성 억제 효과

연잎 에탄올 추출물의 농도가 10 ug/ml, 25 ug/ml 및 50 ug/ml로 증가함에 따라 멜라닌 생성율은 대조군에 비하여 95.6%, 81.2% 및 95.2%로 나타나 멜라닌 생성을 저해하지 못하였다. 연잎 물 추출물의 농도가 5 ug/ml, 10 ug/ml 및 20 ug/ml로 증가함에 따라 멜라닌 생성율은 대조군에 비하여 98.3%, 80.4% 및 78.8%로 나타나 멜라닌 생성 억제 효과가 뚜렷하지 않았다.

연꽃 에탄올 추출물의 농도가 5 ug/ml, 10 ug/ml 및 25 ug/ml로 증가함에 따라 멜라닌 생성율은 대조군에 비하여 88.6%, 88.6% 및 69.1%로 감소하였다. 연꽃 물 추출물은 농도가 0.5 ug/ml, 1 ug/ml 및 2 ug/ml로 증가함에 따라 멜라닌 생성율은 대조군에 비하여 91.4%, 88.7% 및 81.1%로 나타나 멜라닌 생성 억제 효과가 뚜렷하지 않았다.

연꽃 수술 물 추출물의 농도가 5 ug/ml, 10 ug/ml 및 20 ug/ml로 증가함에 따라 멜라닌 생성율은 대조군에 비하여 83.7%, 55.1% 및 40.1%로 나타나 뚜렷한 멜라닌 생성 억제 효과가 확인되었다.

이상의 결과, 멜라닌 생성 억제 효과는 연꽃 수술 물 추출물의 작용이 가장 우수하였다.



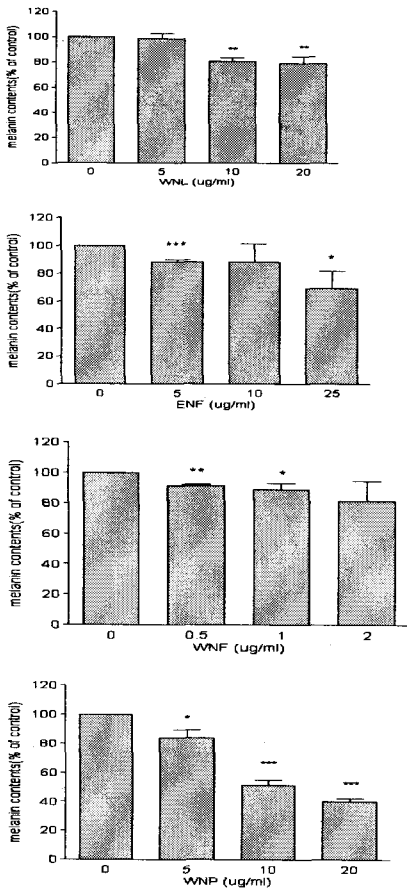


Fig. 3. Effect of ENL, WNL, ENF, WNF, WNP on melanin contents in Clone M-3 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of samples for 72h. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.D. of at least three determinations.

### 고찰

한방 화장품에서 미백작용이 있는 원료 물질의 개발은 매우 중요한 기능적 요소이다. 피부의 흑화 억제 작용을 미백작용이라 하고 미백작용을 유도하는 물질을 미백제라고 한다(10,11). 멜라닌세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전은 멜라닌세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase 활성도의 증가 등에 의해 이루어진다<sup>12)</sup>. 이에 연꽃의 부위 및 추출 방법에 따른 미백효과를 확인하기 위하여 멜라닌 생성의 첫 단계인 tyrosinase 활성을 측정하였고, Clone M-3 melanoma cell에 대한 세포독성 및 미백 효과의 마지막 검증 단계라 할 수 있는 멜라닌 함량을 측정하였다.

Tyrosinase는 멜라닌 형성의 주 역할을 하는 효소로서 최종적으로는 멜라닌 고분자를 합성하는데 촉매 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>10,11)</sup>. 멜라닌 생성 억제는 멜라닌 생성경로에서 중요한 tyrosinase의 Cu chelating, 멜라닌 단량체의 dihydroxy indole과 간섭을 일으켜서 중간대사물 형성으로 멜라닌 중합체 형성 장애 또는 tyrosinase 활성 산소 제어에 의한다<sup>13)</sup>.

연꽃의 부위에 따른 tyrosinase 활성도를 측정된 결과 연꽃 수술 및 연꽃 추출물은 모두 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타내었으나, 연잎 추출물은 tyrosinase 활성을 50% 이상 억제하지 못하였으므로 연잎 추출물은 미백 후보 물질에서 제외할 수 있다.

연꽃의 부위에서 연꽃 수술 물 추출물이 가장 우수한 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타냈으며, 연꽃 에탄올 및 물 추출물에서도 모두 유의한 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타내어 멜라닌 발생을 억제하는 미백 효과를 기대할 수 있다. Tyrosinase의 작용이 억제되는 경우 기대할 수 있는 효과는 melanization으로 인한 흑화 작용을 억제하는 것이다<sup>13)</sup>. 연꽃 및 수술의 백색 성분이 미백과 연관이 있으며, 녹색 성분을 주성분으로 하는 연잎에서는 미백 효과가 미약한 것으로 판단되었다.

세포내 rough endoplasmic reticulum에서 생산된 tyrosinase는 coated vesicle을 거쳐 premelanosome으로 이동되어 세포내에서 melanosome을 형성하며, 멜라닌을 만드는 중간체들은 세포에 독성을 나타내므로 과도한 멜라닌의 생성은 세포의 사멸을 일으키기도 한다<sup>14)</sup>.

Clone M-3 세포의 생존율에 대하여 연꽃의 부위에 따른 세포 독성을 비교한 결과 연꽃 수술 20 ug/ml의 농도와, 연꽃 에탄올 추출물은 25 ug/ml의 농도까지 80% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성이 나타나지 않았으나, 연꽃 물 추출물은 5 ug/ml 이상의 농도에서는 세포 독성이 나타나 미백제의 원료로 부적합할 것으로 나타났다.

멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 tyrosinase의 효소반응으로 합성되는 페놀류의 생물 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다<sup>15)</sup>. 연꽃의 부위에 따른 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종 산물인 멜라닌 양을 측정하였다. Clone M-3 세포에 대한 생존율이 80% 이상이 되는 농도에서 측정된 멜라닌 생성율을 비교한 결과 연잎 에탄올과 물 추출물은 각각 50 ug/ml, 20 ug/ml의 농도에서 95.2%, 78.8%로 멜라닌

생성을 억제하지 못하였다. 연꽃 물 추출물은 80% 이상의 Clone M-3 세포 생존율을 나타낸 2 ug/ml의 농도에서 81.1%로 멜라닌 생성율을 저해하는 효과가 나타나지 않았다. Clone M-3 세포의 생존율 80%를 유지하는 연꽃 에탄올 추출물과 연꽃 수술 물 추출물에 대하여 멜라닌 생성율을 비교하였다. 측정 결과 연꽃 에탄올 추출물과 연꽃 수술 물 추출물은 5 ug/ml의 농도에서 각각 88.6%와 88.7%로 멜라닌 생성율이 억제되지 않았으나, 10 ug/ml의 농도에서 각각 88.6%와 55.1%로 멜라닌 생성율의 변화가 나타났으며, 20 ug/ml의 농도에서는 각각 69.1%와 40.1%로 현저한 멜라닌 생성 억제 효과가 비교 확인되어, Clone M-3 세포에 대하여 연꽃 수술 물 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다.

이상 연꽃의 부위에 따른 추출물을 비교한 결과 연꽃 수술 물 추출물이 tyrosinase 활성 억제, Clone M-3 세포의 생존율 및 멜라닌 생성을 억제 효과를 나타내어 미백 효과가 우수한 미백제 원료로 선정되었다.

## 결 론

연꽃의 부위에 따른 미백제 개발을 위하여 연잎, 연꽃, 연꽃 수술의 에탄올 추출물과 물 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 미치는 영향을 비교하였다. 각각의 시료를 처리한 후 tyrosinase 활성도, Clone M-3 cell에 대한 세포의 생존율 및 멜라닌 생성율의 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tyrosinase 활성도는 연꽃 수술 물 추출물, 연꽃 에탄올 추출물, 연꽃 물 추출물의 순서로 유의한 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타났으나, 연잎 에탄올 추출물과 연잎 물 추출물은 활성을 50% 이상 억제하지 못하였다.

2. Clone M-3 세포의 생존율에 대하여 20 ug/ml의 농도 범위에 대하여 연꽃 수술 물 추출물, 연꽃 에탄올 추출물, 연잎 에탄올 추출물, 연잎 물 추출물은 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다.

3. Clone M-3 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 효과는 연꽃 수술 물 추출물의 작용이 가장 우수하였다.

이상의 결과, 연꽃 수술 물 추출물이 tyrosinase 활성 억제, Clone M-3 세포의 생존율 및 멜라닌 생성 억제에 대한 우수한 효과를 나타내어 미백 원료

로 적합한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 박성규, 김수남, 이종찬, 김한성, 김연준, 이병곤, 장이섭. 자음단이 피부의 노화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004;19(1):67-76
2. Li W, Hill HZ, Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. Photochem Photobiol. 1997;65(3):480-485
3. Hill HZ, Li W, Xin P, Mitchell DL, Melanin-a two edged sword? Pigment Cell Res, 1997;10(3):158-161
4. 安德均. 韓國本草圖鑑. 서울:교학사. 1998:863-865
5. Busca R, Bertolotto C, Ortonne J. P. Ballotti R., Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/p70S6-Kinase Pathway Induces B16 Melanoma Cell Differentiation. J. Biol. Chem., 1996;271(50):31824-31830
6. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods., 1983;65(1-2):55-63
7. Kotnik V, Fleischmann WR Jr., A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity, Immunol Methods., 1990;129(1):23-30
8. Tsuboi T, Kondoh H, Hiratsuka J, Mishima Y. Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma. Pigment Cell Res. 1998;11(5):275-282
9. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res., 1985;45(4):1474-1478
10. Mayer AM, Polyphenoloxidases in plants. Recent progress. Phytochem, 1987;26:11-20
11. Mathew AG, Paepia HA, Adv. Food Res, 1971;19:75-145
12. Yaar M, Gilchrist BA, Human melanocyte growth and differentiation: a decade of new data.

J Invest Dermatol. 1991;97(4):611-617

13. Maeda K, Fukuda M, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. J Pharmacol Exp Ther. 1996;276(2):765-769

14. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ, Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol. 1993;100(2):126-131

15. Diane B, Kathleen D, Medrano D, Douglas S, Sungbin I, David M, George B, Zalfa A, Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. Cancer research, 1995;55:4041-4046