

죽황(竹黃)으로부터 분리한 미백활성 성분의 멜라닌생성 억제효과

이 기 무[†] · 이 은 창* · 조 순 장* · 문 석 식*

애경산업(주) 중앙연구소, *공주대학교 자연과학대학 화학과
(2008년 10월 19일 접수, 2008년 11월 3일 채택)

The Antimelanogenic Effects of Compounds Extracted from Bamboo Inner Film

Ki-Moo Lee[†], Eun-Chang Lee*, Soon-Chang Cho*, and Surk-Sik Moon*

Aekyung Central Research Laboratory, 217-2 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-345, Korea

*Department of Chemistry, Kongju National University

(Received October 19, 2008; Accepted November 3, 2008)

요약: 천연물로부터 미백활성 성분의 개발을 위하여 국내 자생식물 60종으로부터 추출물을 얻어, 이들의 멜라닌 생성 과정의 주된 효소인 tyrosinase 활성 억제력을 평가하였다. 평가결과 노랑하늘타리(열매), 죽황, 누리장나무(잎), 우산고로쇠(잎) 추출물이 비교적 높은 tyrosinase 활성억제효과를 보였고, 이들의 IC₅₀ 값은 50 ~ 100 µg/mL 이었다. 이들의 멜라닌생성 억제효과를 B16F10 흑색중세포주를 이용하여 실험한 결과, 죽황추출물이 가장 높은 52 %의 멜라닌생성 저해활성을 보였으며, 이는 기존 미백제인 arbutin (42 %)에 비해 10 % 높은 것이다. 죽황추출물로부터 용매추출 및 크로마토그래피 등의 분리과정을 거쳐 10가지 미백활성 성분을 분리하였다. 이들은 모두 페놀유도체 화합물로서, SM701과 SM702, SM703, BPR211은 hydroquinone계 화합물이며, SM707은 gallic acid계, SM704와 SM705, SM706, SM708, SM709는 ferulic acid계로 확인되었다. 이들의 유리기 소거효과를 hydroquinone과 비타민 C와 비교하여 측정하였을 때, SC₅₀ 값이 SM702와 SM709의 경우 60 ~ 70 µM로 hydroquinone과 유사하였고, SM701과 SM708은 30 ~ 40 µM로 비타민 C (45 µM)보다 낮은 값을 보여 죽황추출물은 항산화활성이 높은 성분들을 함유하고 있음을 확인하였다. 이들 중 1,2-O-diferulylglycerol로 확인된 SM709 성분은 tyrosine hydroxylase 및 DOPA oxidase 활성을 각각 18, 60 % 억제하였고, B16F10 흑색중세포주를 이용한 멜라닌생성량 억제시험에서 62 %의 저해효과를 나타내 가장 높은 미백활성을 보였다. 따라서 죽황추출물의 미백활성은 주로 멜라닌 생성과정의 DOPA oxidase 저해효과와 항산화효과에 의해 나타나는 것으로 생각된다.

Abstract: In order to develop a new depigmenting agent, extracts were obtained from 60 native plants and their antimelanogenic activities were screened by evaluating the inhibitory effect on tyrosinase which is a major enzyme responsible for the melanin synthesis. The extracts of *Trichosanthes kirilowii* fruits, *Phyllostachys bambusoides* inner films (BIF), *Clerodendrum trichotomum* leaves, and *Acer okamotoanum* leaves showed relatively high inhibitory effect on tyrosinase and their IC₅₀ values were 50 ~ 100 µg/mL. The extract of BIF inhibited melanin synthesis of B16F10 melanoma cells by 52 %, which was the highest among those of various extracts. Furthermore, the effect of BIF extract is 10 % higher than that of arbutin (42 %), a popular depigmenting agent in Korea. Ten compounds having antimelanogenic activity were isolated from the BIF extract by solvent extraction and chromatography. These compounds were identified as phenolic derivatives: SM701, SM702, SM703, and BPR211 were hydroquinone derivatives; SM707 a gallic acid derivative; SM704, SM705, SM706, SM708 and SM709 ferulic acid derivatives. The free radical scavenging activities of these compounds were measured and compared to those of hydroquinone and vitamin C. The SC₅₀ values scavenging 50 % DPPH of SM702 and SM709 were 60 ~ 70 µM similar to that of hydroquinone and those of SM701 and SM708 were 30 ~ 40 µM slightly lower than that of vitamin C. These results suggest the presence of components having high antioxidant activity in the BIF extract. The SM709, identified as

† 주 저자 (e-mail: kmlee6163@hanmail.net)

1,2-*O*-diferulylglycerol, inhibited the activities of tyrosine hydroxylase and dopa oxidase by 18 and 60 %, respectively. The SM709 also inhibited the melanin synthesis of B16F10 melanoma cells by 62 % and this was the highest antimelanogenic activity among those obtained from the various purified compounds. Therefore, antimelanogenic activity of the BIF extract was concluded to be due to both inhibition of DOPA oxidase and antioxidant activity.

Keywords: bamboo, plant, 1,2-*O*-diferulylglycerol, phenolic, depigmenting

1. 서 론

멜라닌(melanin)은 적갈색(pheomelanin) 또는 흑갈색(eumelanin)의 고분자화합물로서 멜라닌세포(melanocyte) 내 멜라닌소체(melanosome)라는 소기관에서 합성된다[1]. 합성된 멜라닌색소는 멜라닌세포의 수지상돌기(dendrite)를 통하여 인접세포인 각질세포(keratinocyte)로 전달되며, 전달된 멜라닌색소는 각질세포를 통하여 피부 내 여러 부위에 분포하게 된다[2].

멜라닌 색소의 연구는 다양하게 이루어지고 있으나 백인들은 주로 악성흑색종(malignant melanoma)을 연구하고 있으며[3], 우리나라를 포함한 동아시아에서는 피부가 검게 변하는 과색소침착(hyperpigmentation)이나, 피부가 노화됨에 따라 생성되는 기미 및 주근깨 등이 주된 연구분야이다[4,5]. 과색소침착은 피부에 멜라닌량이 증가된 상태를 말하며, 표피에만 국한되어 있는지 또는 진피까지 분포되어 있는지에 따라 색의 정도가 다르다. 어떤 원인이든 색소의 증가는 멜라닌량의 증가 또는 멜라닌세포(melanocyte)의 증가에 기인한 것이다. 과색소침착치료제로 사용되는 성분으로는 retinoic acid, azelaic acid, hydroquinone 등이 알려졌으며 이들은 주로 병용에 의해 치료효과가 상승된다. 그러나 이들 성분은 일반적으로 세포독성이 크거나, 피부에 부작용이 보고되어 있어 화장품의 미백성분으로는 사용이 금지되어 있으며, 주로 의사 처방에 따라 국소적인 치료제로 사용된다[6].

기미치료에 흔히 사용되어지는 대표적 성분으로 hydroquinone이 알려져 있다. Parfitt의 Martinale에서는 hydroquinone이 멜라닌생성을 방지하며, 잡티(freckle), 간반(chloasma), 노인성흑점(senile lentigo)등의 치료제임을 기술하고 있다. Hydroquinone의 미백 작용기전에 대해서는 많은 보고가 없으나, *in vitro* 시험에서 hydroquinone이 직접 tyrosinase의 활성을 억제함이 보고되었다[7].

국소적으로 의사처방에 의해 사용되고 있는 retinoic acid, hydroquinone, steroids 등과는 달리 부작용이 적은

화장품의 미백제로는 kojic acid, arbutin, 비타민 C 등이 이용된다. Kojic acid의 미백작용은 멜라닌합성 주 효소인 tyrosinase 내 Cu^{2+} 와 착염을 형성함으로써 멜라닌생성을 저해하거나[8], DOPA chrome tautomerase와 DHICA oxidase에 간섭하여 멜라닌 형성을 억제한다고 알려졌다. Perez-Bernal 등[9]은 kojic acid 1 %와 α -hydroxy acid를 혼합 처방한 제품에서 기미환자의 과색소침착이 개선됨을 보고하였다. Arbutin은 멜라닌생성 과정에서 tyrosinase의 기질인 tyrosine과 경쟁적으로 작용하여 tyrosinase 활성을 저해하며, tyrosinase 효소의 합성제나 유전자 발현억제와는 관련 없음이 밝혀졌다[10]. Arbutin의 임상보고 예로 Paik 등[11]은 기미환자 6명에 대해 3 % arbutin 함유 크림을 8주 동안 사용 시 2명에서만 경미한 호전효과를 보고한 바 있어 임상효과가 미약한 단점이 있다. 그러나, arbutin은 피부 안전성의 장점에 의해 현재 미백화장품을 위한 미백성분으로 가장 널리 사용되고 있으며, 현재 정부에서는 arbutin 2 % 처방제품에 대해 미백에 도움을 주는 기능성화장품으로 미백효과를 인정하고 있다. 비타민 C는 멜라닌 생성과정에서 tyrosinase 활성저해와, DOPA chrome 생성 후 자동산화 과정에 관여하여 미백효과를 갖는 것으로 알려졌다[12]. 비타민 C의 임상보고 예로 Kameyama 등은 비타민 C 10 % 함유 크림을 3개월 사용 후 34명 중 19명에서 색소침착의 개선효과를 보고하였다. 그러나 잘 알려진 바와 같이 비타민 C는 대기 중에 산화안정성이 문제가 되기 때문에 인산염 또는 지방산 유도체가 주로 제품에 사용되거나 분말제품 등 일부 한정된 제형에 사용되고 있다. 현재 일본에서는 비타민 C 3 %를 함유한 제품에 대해 미백 약용화장품으로 미백효과가 인정되고 있다.

상기성분 외에 천연물로부터 분리 보고된 미백성분으로는 닥나무뿌리에서 분리한 kazinol F(5-(3-(2,4-dihydroxy-phenyl)propyl)-3,4-bis(3-methyl-2-butenyl)-1,2-benzenediol)[13], 속수자에서 분리한 sucrose 3,4,6,2',6'-pentaiso-valerate[14] 알로에에서 분리한 aloesin, 상지에서 분리한 subtilisin, 속수자에서 분리한 5,15-diacetyl-

3-benzoyltyrosol, 백출에서 분리한, selina-4(14), 7(11)-dien-8-one, 천궁에서 분리한 senkyunolide A[15] 등이 있다. Kazinol F는 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀이 0.396 µg/mL로 매우 높은 미백활성을 갖는 성분이며, sucrose 3,4,6,2',6'-pentaideoxalate는 50 µg/mL에서 멜라닌생성 저해율이 85 %로 보고되었다. 그러나 이들은 단일성분으로 순수분리가 매우 어렵고, 성분의 합성이 어렵기 때문에 단일성분으로 이용된 예는 없으며, 주로 활성이 높은 추출분획을 정제하여 제품에 이용하고 있다.

본 연구에서는 기존에 알려진 성분보다 피부에 안전하고, 효과가 뛰어난 신규 미백제를 개발하고자 하였다. 먼저 수종의 국내 자생식물을 대상으로 *in vitro* 미백활성을 평가하여 미백활성이 높은 천연식물을 선발하였다. 선발된 식물추출물로부터 미백 선도물질의 확보를 위하여 수종의 미백활성 성분을 분리하고, 이들의 화학구조를 밝혔으며, 분리된 성분에 대하여 다양한 미백활성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

본 시험에 사용한 시료 중 전통생약은 경동시장에서 구입하였다. 죽엽 및 대나무속의 미황색 막(膜)인 죽황(竹黃)은 전남 담양지역의 것을 이용하였고, 국내자생식물은 전국 여러 곳에서 채집하여 총 60종을 확보하였다. Lee 등[16]의 방법에 따라 확보된 시료식물 약 300 g을 음건하고 추출은 70 % 에탄올용액으로 추출하여 진공건조 후 사용하였다.

2.2. 시약

시험에 사용된 arbutin, kojic acid, melanin, 비타민 C, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide), L-tyrosine, mushroom tyrosinase, L-DOPA (L-di-hydroxyphenylalanine) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였고, hydroquinone은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA), 배지로 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Bio-Whittaker Co. (Walkersville, USA), melanocyte growth media (MGM)은 Clonetics Co. (San Diego, USA) 제품을 사용하였다. 배지에 추가되는 fetal bovine serum (FBS), antibiotics 등은 Gibco BRL

(Grand Island, USA)를 사용하였으며, B16F10 melanoma cell은 한국세포주은행에서 분양하여 사용하였다. 분리 및 정제에 사용하는 HPLC 용매는 (주)덕산 제품(Korea)을, hydroquinone 및 일반시약은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA) 제품을 사용하였다. 성분 분리시 사용한 HPLC는 Waters (USA)사 Model 996 (photodiode array detector)을 이용하였고, 구조확인을 위한 NMR spectrometer는 Varian Mercury 400 MHz (USA)를, Mass spectro-photometer는 한국기초과학연구소 JEOL HX110A Tandem HR (Japan)를 이용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 자유라디칼 소거효과

자유라디칼 소거효과는 DPPH를 이용한 Nanjo 등[17]의 방법을 변형하여 이용하였다. DPPH 메탄올 용액(150 µM) 150 µL 을 각 well에 넣은 후, 시험용액은 시험농도에 맞추어 50 µL씩 넣었다. 이 때 대조군에는 시료를 녹인 용액만 넣었으며, 10 s 동안 흔들어진 뒤 상온에서 방치하였다. 20 min 후 반응액의 흡광도를 ELISA microplate reader로 517 nm에서 측정하였으며, 자유라디칼 소거효과(%)는 측정된 흡광도에 대하여 아래의 식을 이용 계산하였다. SC₅₀ 값은 최대 자유라디칼 소거효과의 50 %에 해당하는 값으로 나타내었다.

$$\text{자유라디칼 소거효과}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.3.2. Mushroom Tyrosinase 활성억제 측정

머섯 tyrosinase 활성저해효과는 Jang 등[13]의 방법을 변형하여 사용하였다. DMSO에 녹인 적당 농도의 시험물질 용액을 각 well에 50 µL씩 넣고, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 머섯 tyrosinase (2500 units/mL, Sigma, USA) 30 µL와 10 mM의 L-tyrosine 100 µL를 넣었다. 37 °C에서 10 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA microplate reader로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성을 50 % 억제하는 값인 IC₅₀ 값을 구하기 위해서는 50, 100, 200, 500 µg/mL의 농도로 시료를 준비 후 시험하였으며, tyrosinase 활성억제율(%)은 아래식을 이용하여 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성억제율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.3.3. 세포배양

인체 멜라닌세포는 포경수술을 통해서 얻어지는 신생아의 포피를 본 실험에 사용하였다. 채취된 포피 조직을 phosphate buffer saline (PBS)로 3회 세척하고 5 s 정도 에탄올에 담근 후 다시 PBS로 1회 세척하였다. 조직의 진피 부분을 충분히 제거하고 작은 조직으로 잘랐다. 0.25 % trypsin 용액에 자른 조직을 넣은 후 4 °C 냉장고에 밤새 보관한 후 트립신 억제제로 처리한 후 표피를 진피로부터 벗겨내었다. 충분하게 단일세포로 만든 후에 제품화되어 있는 MGM (Clonetics, USA) 배지를 사용해서 37 °C에서 5 % CO₂를 가하여 배양하였다. 일주일에 2회 배지를 교환하고, 멜라닌세포의 숫자가 점차 늘어나 배양면이 채워지면 계대 배양하였다. 배양된 멜라닌세포의 생존 능력을 확인하기 위해서는 trypan blue 용액을 첨가한 후 현미경 하에서 살아있는 세포의 숫자를 세어 죽은 세포와의 비율을 결정하여 90 % 이상의 수준으로 생존되는 상태를 유지하였다. 흑색종세포주는 B16F10을 한국세포주은행에서 분양 받아 DMEM에 10 % FBS와 1 % streptomycin을 추가하여 준비된 배지를 사용하였으며, 배양은 37 °C에서 5 % CO₂를 가하여 배양하였다.

2.3.4. 세포독성 시험(MTT Assay)

실험에 이용한 colorimetric assay는 MTT를 이용한 Mosmann[18]의 방법을 변형하여 이용하였다. B16F10 흑색종세포주를 각 well에 5 × 10⁴개의 농도로 넣어준 다음 1일 후 각 약물들을 일정농도로 넣어준 배지로 교환하였다. 각 약물들을 처리한 후 3일째에 PBS로 세척하여 주고, 2 mg/mL 농도의 MTT를 40 μL 첨가, 4 h 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 반응시켰다. 배양 중 불용성의 blue formazane이 생성되는데 이는 각 세포주에 따라 일정하게 살아 있는 세포수에 비례하여 형성된다. 반응 후 각 well을 1,000 rpm으로 원심분리하고 각 well에 들어 있는 여분의 배지를 제거하였으며, DMSO를 well 당 150 μL를 넣고 20 ~ 30 min 동안 교반 용해시켰다. 반응 후 ELISA microplate reader를 이용 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.5. 멜라닌생성량 측정

DMEM으로 계대배양된 B16F10 흑색종세포주를 100 mm culture dish에 2 × 10⁵개의 농도로 넣어준 후 1일 뒤에 각 약물들을 일정농도로 처리하였다. 3일째에 세포를 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하고 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 바닥에서 떼어준 후, DMEM으로

로 trypsin-EDTA의 작용을 중화시켰다. 10 min 동안 2,500 rpm, 0 °C 조건에서 원심분리하여 세포를 수확하였다. Hemacytometer로 B16F10 세포를 세어서 1 × 10⁶ 세포수 당 1 mL의 5 % TCA로 처리 교반하였다. 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 멜라닌을 인산완충액으로 세척하였다. 에테르와 에탄올을 1 : 3 비율로 하여 2회 원심분리한 후 에테르 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 멜라닌에 1 N NaOH를 가하여 1 h 동안 56 °C 항온조에서 반응시킨 후 분광광도계로 470 nm에서 흡광도를 측정하고 멜라닌 양은 합성 멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하였다.

2.3.6. 추출과 분액, 분리

추출과 분액은 Lee 등[16]의 방법을 변형하여 이용하였다. 건조된 죽황 2.8 kg에 70 % 에탄올을 가하고 실온에서 1주일 동안 방치 후 여과하여 여과액을 얻었다. 여과하고 남은 내피 찌꺼기에 다시 동일한 양의 물과 에탄올을 가하고 여과하는 과정을 3회 더 반복했다. 얻어진 죽황추출 여과액을 합하여 감압 농축하였다. 농축한 죽황추출물에 70 % 에탄올과 hexane을 가한 다음 잘 흔들고 방치하여 수용액층과 hexane층을 얻었다. 수용액층은 다시 소량의 hexane을 두 번 더 가하여 수용액층과 hexane층으로 다시 나눈 뒤 hexane층을 앞의 것과 합쳐 이용하였다. 얻은 수용액층과 hexane층을 감압 농축하여 수용액층에서는 72.8 g, hexane층에서는 32.6 g의 농축물을 얻었다. 수용액층에서 얻은 농축물에 부탄올과 물을 가하고 녹인 후 방치하여 생긴 부탄올층과 물층을 농축하여 부탄올층에서 48.0 g, 물층에서 35.5 g의 농축물을 얻었다. 각 성분의 분리과정은 Figure 1과 같다.

2.3.7. 분리성분의 물리화학적 성질

SM701 : white needles; C₁₃H₁₈O₈; [α]_D²⁰ -56.0° (c 0.5, MeOH); mp 197 ~ 198 °C; UV (MeOH) λ_{max} 200, 218 and 282 nm; TLC (methylene chloride / MeOH / H₂O) R_f 0.28; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 6.79 (s, 1 H), 4.93 (s, 3 H), 6.68 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 6.57 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 4.72 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 3.89 (dd, J = 12.0, 1.6 Hz, 1 H), 3.67 (dd, J = 12.0, 5.6 Hz, 1 H), 3.33 ~ 3.46 (m, 4H) ppm; ¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 103.6, 56.3, 149.1, 142.8, 115.9, 109.9, 103.7, 78.0, 71.5, 78.2, 62.6, 75.0 ppm; HRFABMS (C₁₃H₁₈O₈ + Na) found, 325.0897 (calcd, 325.0899) amu.

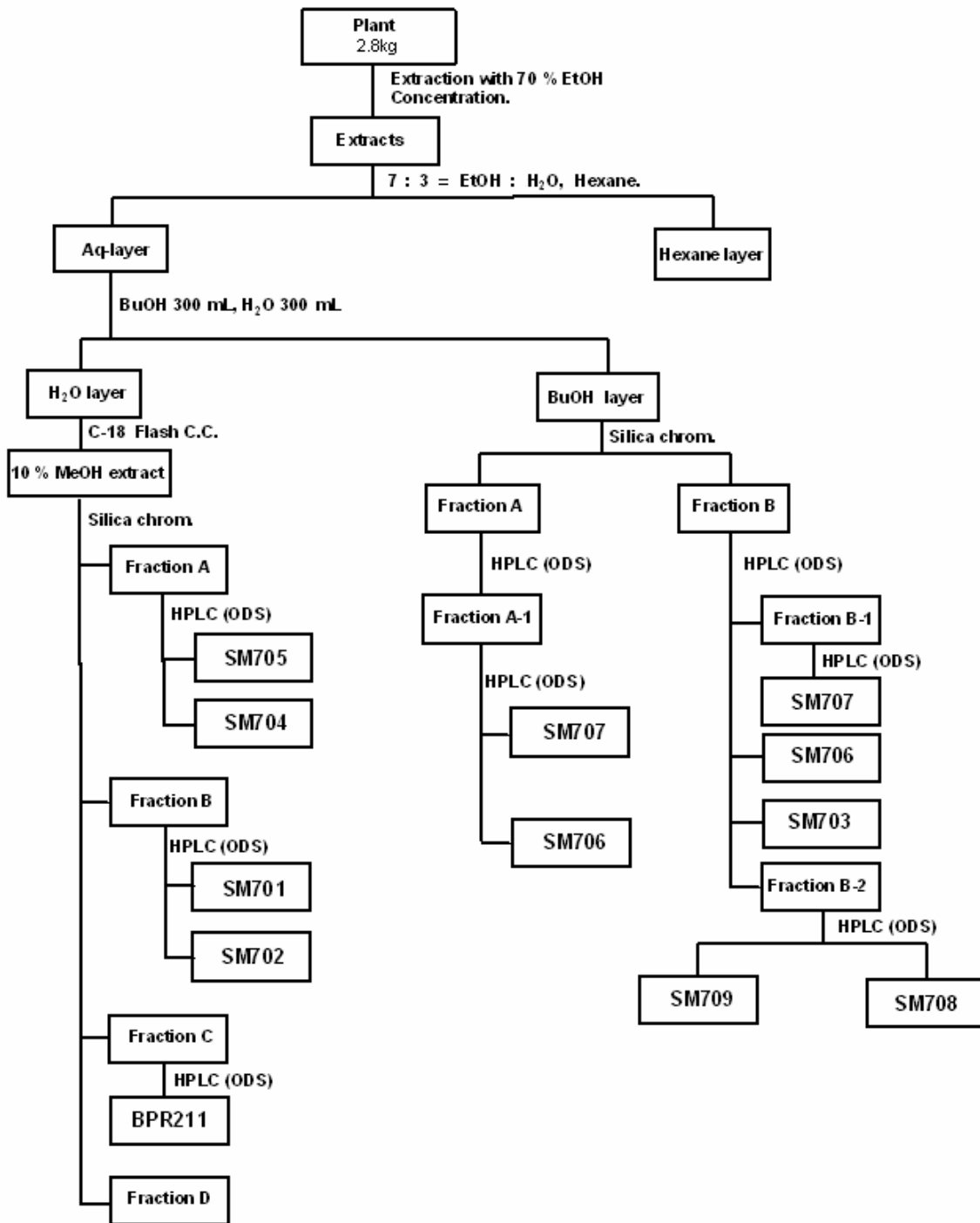


Figure 1. Purification procedure of BIF extract.

SM702 : white needles; $C_{13}H_{18}O_8$; $[\alpha]_D^{20} -54.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); mp 193 ~ 195 °C; UV (MeOH) λ_{max} 201, 218 and 282.0 nm; TLC (silica gel, 79 : 20 : 1 CH_2Cl_2 / MeOH / H_2O) R_f 0.28; 1H NMR (CD_3OD , 400

MHz) δ 6.45 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H), 6.28 (dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz, 1 H), 7.01 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 4.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 3.86 (dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 3.67 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1 H), 3.33 ~ 3.46 (m,

4H) ppm: ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 56.5, 151.9, 101.7, 154.8, 107.5, 120.4, 140.9, 104.2, 62.5, 78.1, 77.8, 75.0, 71.3 ppm: HRFABMS ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_8 + \text{Na}$) found, 325.0897 (calcd, 325.0899) amu.

SM703 : white powder; $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9$; mp 250 ~ 252 °C; UV (MeOH) λ_{max} 207.8 and 278.7 nm; ^1H NMR (Pyridine- d_5) δ 3.41(s), 5.37 (d, $J = 7.6$ Hz) 6.92(s, H-2, H-6) ppm. ^{13}C NMR (Pyridine- d_5) δ 56.2, 62.6, 71.6, 75.1, 78.7, 79.0, 96.6, 103.8, 132.8, 149.3 ppm. (+) FABMS m/z : 333.0 (M + H), 185.0.

BPR211 : white powder; $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$; mp 199 ~ 200 °C; UV (MeOH) λ_{max} 281.0 nm; TLC (silica gel, 79 : 20 : 1 CH_2Cl_2 / MeOH / H_2O) R_f 0.23; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 6.96 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H) 6.68 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 4.72 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 3.88 (dd, $J = 12.0, 1.2$ Hz, 1 H), 3.68 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1 H), 3.33 ~ 3.46 (4 H, m) ppm. ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 119.3, 116.5, 153.7, 152.3, 103.6, 62.5, 78.0, 77.9, 75.0, 71.4 ppm.

SM704 : amorphous powder (syrup); $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$; UV (MeOH) λ_{max} 224.2 and 276.3 nm; TLC (silica gel, 79 : 20 : 1 CH_2Cl_2 / MeOH / H_2O) R_f 0.35; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 400 MHz) δ 3.61 (ddd, $J = 6.4, 6.0, 4.0 \sim 3.6$ Hz, 1 H), 3.38 (dd, $J = 11.6 \sim 10.8, 6.4$ Hz, 1 H), 3.47 (dd, $J = 11.6 \sim 10.8, 4.0 \sim 3.6$ Hz, 1 H), 4.55 (d, $J = 6.0$ Hz, 1 H), 7.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H), 6.82 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1 H), 6.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 3.82 (s, 3 H) ppm. : ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 400 MHz) δ 51.08, 58.82, 72.19, 69.68, 129.76, 105.98, 142.76, 141.48, 110.07, 115.16 ppm. HRFABMS ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5 + \text{Na}$) found, 237.0742 (calcd, 237.0739) amu.

SM705 : amorphous powder; $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6$; mp 116 ~ 117.5 °C; TLC (Silica gel, 79 : 20 : 1 CH_2Cl_2 / MeOH / H_2O) R_f 0.31; UV (MeOH) λ_{max} 204.2 and 268.0 nm; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 4.52 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H), 3.36 (dd, $J = 11.6, 6.4$ Hz, 1 H), 3.49 (dd, $J = 11.6, 4.0$ Hz, 1 H), 3.66 (td, $J = 6.4, 4.0$ Hz, 1 H), 6.68 (s, 2 H), 3.84 (s, 6 H) ppm. : ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 75.6, 77.5, 64.2, 134.0 135.8, 149.0, 105.0 ppm. HRFABMS ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6 + \text{Na}$) found, 267.0846 (calcd, 267.0844) amu.

SM706 : orange oil; $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$; UV (MeOH) λ_{max} 344.3, 244.3 nm; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 9.58 (d, $J = 8$ Hz, 1 H), 7.58 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 7.0

(s, 2 H), 6.69 (dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, 1 H), 3.90 (s, 6 H) ppm. : ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 196.1, 149.6, 140.7, 127.1, 126.6, 196.1, 107.6, 57.0 ppm. HREIMS m/z : 208.0725 (calcd, 208.0735) amu.

SM707 : amorphous powder; $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$; mp 96 ~ 98 °C; UV (MeOH) λ_{max} 214.8, 308.4 nm; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 9.81 (s, 1 H), 7.22(s, 2 H) 3.92 (s, 6 H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 191.0, 149.0, 142.9, 129.0, 107.8, 56.7 ppm. HREIMS m/z : 182.0579 (calcd, 182.0579) amu.

SM708 : white powder; mp 96 ~ 98 °C; UV (MeOH) λ_{max} 217.2, 236.0, 325.1 nm; ^1H NMR (Acetone $d_6 + \text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz) δ 7.63 (d, $J = 16.0$ Hz, 2 H), 7.3 (s, $J = 2.4$ Hz, 2 H), 7.12 (dd, $J = 8.0, 2.0, 2$ H), 6.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H), 6.41 (d, $J = 16.0, 2$ H), 4.26 (m, 2 H), 4.16 (m, 1 H), 3.91 (s, 6 H) ppm; HREIMS m/z 444.1416 (calcd, 444.1420) amu.

SM709 : colorless oil; UV (MeOH) λ_{max} 217.2, 236.0, 325.1 nm; ^1H NMR (Acetone $d_6 + \text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz) δ 7.63 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 7.61 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 7.35 (d, 2.0 Hz, 1 H), 7.34 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H), 7.14 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 2 H), 6.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.41 (d, $J = 16.0$ Hz, 2 H), 5.24 (m, 1 H), 4.49 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1 H), 4.37 (dd, $J = 12.0, 6.8$ Hz, 1 H), 3.92 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.80 (d, $J = 5.2$ Hz, 2 H) ppm; ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 167.26, 167.00, 150.14 (2 C), 148.74, 148.72, 146.22, 146.15, 127.33, 127.30, 124.14 (2 C), 116.02 (2 C), 115.63, 115.27, 111.24, 111.18, 73.26, 63.45, 61.43, 56.37(2 C) ppm; HREIMS m/z 444.1416 (calcd, 444.1420) amu.

2.3.8. Tyrosine Hydroxylase Assay

DMEM으로 배양된 B16F10 흑색종세포주를 3 ~ 4 회 계대배양하여 실험에 이용하였다. 각 12-well plate에 1×10^5 개의 세포를 seeding하였다. 1일 배양 후 시료가 포함된 배지로 교환하였으며, 3일 후 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. 세척한 세포를 50 μL DMSO에 녹였다. 이 액에 0.3 mg/mL L-tyrosine 100 μL 씩을 넣어준 후 37 °C에서 60 min 동안 반응시켰다. 반응에서 생성된 멜라닌은 분광광도계로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.9. DOPA Oxidase 활성 평가

DMEM으로 배양된 B16F10 흑색종세포주를 3 ~ 4회

Table 1. Inhibitory Activities of Native Plant Extracts on Mushroom Tyrosinase

Korean name	Scientific name	Part used	IC ₅₀ * (μg/mL)
감탕나무	<i>Ilex integra</i>	Leaf	100 ~ 200
개가시나무	<i>Quercus gilva</i>	Leaf	200 <
굴거리	<i>Daphniphyllum macropodum</i>	Leaf	200 <
독활	<i>Aralia continentalis</i>	Leaf	200 <
노랑하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Fruit	50 ~ 100
해국	<i>Aster spathulifolis</i>	Leaf	200 <
헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	Leaf	100 ~ 200
후박나무	<i>Machilus thunbergii</i>	Leaf	100 ~ 200
강활	<i>Ostericum koreanum</i>	Whole	200 <
냉이	<i>Capsella bursapastoris</i>	Whole	100 ~ 200
곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	Whole	200 <
노간주나무	<i>Juniperus rigida</i>	Leaf	200 <
등대풀	<i>Euphorbia helioscopi</i>	Whole	100 ~ 200
민들레	<i>Taraxacum mongolicum</i>	Whole	200 <
바위취	<i>Saxifraga stolonifera</i>	Whole	100 ~ 200
섬개벗나무	<i>Prunus buergerian</i>	Leaf	100 ~ 200
섬단풍나무	<i>Acer takesimense</i>	Leaf	200 <
괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	Leaf	100 ~ 200
굴피나무	<i>Platycarya strobila</i>	Leaf	100 ~ 200
느릅나무	<i>Ulmus davidiana</i>	Leaf	100 ~ 200
산국	<i>Chrysanthemum boreale</i>	Whole	100 ~ 200
애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i>	Whole	200 <
영경취	<i>Cirsium japonicum</i>	Root	100 ~ 200
조팝나무	<i>Spiraea prunifolia</i>	Leaf	200 <
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	Leaf	200 <
참당귀	<i>Angelica gigas</i>	Whole	100 ~ 200
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>	Fruit	100 ~ 200
큰천남성	<i>Arisaema latiovalifolium</i>	Whole	200 <
개머루	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i>	Stem	200 <
죽엽	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	Leaf	100 ~ 200
죽황	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	Inner film	50 ~ 100
개모시풀	<i>Boehmeria platanifolia</i>	Whole	100 ~ 200
누리장나무	<i>Clerodendrum trichotomum</i>	Leaf	50 ~ 100
두릅나무	<i>Aralia elata, Araliaceae</i>	Leaf	100 ~ 200
방기	<i>Sinomenium acutum</i>	Stem	200 <
딱총나무	<i>Sambucus williamsii</i>	Stem	100 ~ 200
보리수나무	<i>Elaeagnus umbellata</i>	Leaf	200 <
복분자딸기	<i>Rubus coreana</i>	Leaf	200 <
부처손	<i>Selaginella tamariscin</i>	Whole	200 <
사상자	<i>Torilis japonica</i>	Whole	100 ~ 200

Table 1. (Continued)

Korean name	Scientific name	Part used	IC ₅₀ * (μg/mL)
산돌배	<i>Pyrus ussuriensis</i>	Leaf	200 <
삿갓나물	<i>Paris verticillata</i>	Whole	100 ~ 200
소사나무	<i>Carpinus coreana</i>	Leaf	200 <
아기단풍	<i>Acer microsieboldian</i>	Leaf	100 ~ 200
우산고로쇠	<i>Acer okamotoanum</i>	Leaf	50 ~ 100
이대	<i>Pseudosasa japonica</i>	Leaf	200 <
약난초	<i>Cremastra appendiculata</i>	Whole	100 ~ 200
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i>	Stem	200 <
자리궁	<i>Phytolacca esculenta</i>	Leaf	200 <
조팝나무	<i>Spiraea microgyna</i>	Leaf	100 ~ 200
질경이	<i>Plantago asiatica</i>	Whole	200 <
털다래	<i>Actinidia arguta</i>	Leaf	100 ~ 200
흰썸바귀	<i>Ixeris dentata</i>	Stem	100 ~ 200
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Root	100 ~ 200
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	Root	100 ~ 200
승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	Root	200 <
세신	<i>Asiasarum sieboldii</i>	Root	200 <
백지	<i>Angelica dahurica</i>	Root	200 <
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	Root	200 <
지실	<i>Poncirus trifoliata</i>	Fruit	200 <

* IC₅₀ values indicate the concentration that inhibits 50 % of tyrosinase activity.

계대배양하여 실험에 이용하였다. 각 well에 1×10^5 개의 세포를 seeding하였다. 1일 배양 후 시료가 포함된 배지로 교환하였으며, 3일 후 배지를 제거하였다. Triton X-100 1 % 액을 well당 900 μL을 넣어준 후 30 min 동안 -80 °C에서 동결하고, L-DOPA (10 mM)을 100 μL 씩 넣어주었다. 반응은 37 °C에서 60 min 동안 하였으며, 반응액에서 생성된 DOPA chrome의 흡광도를 분광광도계로 492 nm에서 측정하였다.

2.3.10. PAGE Tyrosinase 활성 염색

Ando 등[19]의 방법을 변형하여 이용하였다. DMEM으로 계대배양된 B16F10 흑색종세포주를 사용하여 100 mm culture dish에 5×10^5 개의 농도로 넣어준 후 1일 뒤에 각 약물들을 농도별로 처리하였다. 3일 간 배양한 후 준비된 lysis buffer (DOPA staining 용)로 세포막을 파괴하고, 단백질을 정량하였으며, 이 중 20 μg을 비환원 조건에서 SDS-PAGE하였다. Polyacryl-amide gel은 7 ~ 8 %의 것을 사용하였으며, 세척 완충액으로 30 min

정도 세척하였다. 염색은 5 mM의 L-DOPA 용액으로 3 h, 37 °C의 따뜻하고 어두운 곳에 방치하여 이루어졌다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 식물추출물의 Mushroom Tyrosinase 활성억제 효과

미백성분의 선별을 위한 미백활성의 평가는 멜라닌 생성 과정의 저해를 위한 tyrosinase 활성 억제도와, 멜라닌 생성량 저해효과 등을 측정하여 이루어진다. 본 실험에서도 미백활성이 있는 천연물을 선별하기 위하여 먼저 tyrosinase 활성에 미치는 천연물의 영향을 시험하고자 하였다. 시험결과 Table 1에서 보는 바와 같이 노랑하늘타리 열매, 죽황, 누리장나무잎, 우산고로쇠잎 추출물의 IC₅₀ 값이 50 ~ 100 μg/mL로 다른 추출물에 비해 상대적으로 높은 저해효과를 보였으며, 감탕나무, 헛개나무, 후박나무, 냉이 등에서는 100 ~ 200 μg/mL의 IC₅₀ 결과로 중간정도의 tyrosinase 활성억제의 결과를 보였다. 본 결과는 Park 등[20]이 생약 14종 메탄올추출물에 대해

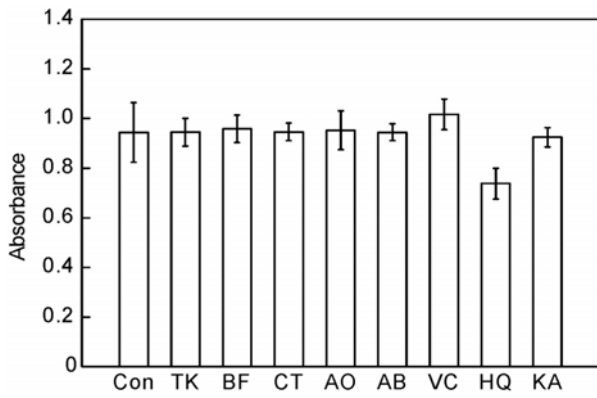


Figure 2. Effects of plant extracts on cell viability of B16F10 melanoma cells. Cells (2×10^4 cells/well) were incubated with plant extracts for three days. Concentrations of plant extracts and control agents were $50 \mu\text{g/mL}$. However, hydroquinone was used with $5 \mu\text{g/mL}$. The data shown represent mean \pm S.D. ($n = 3$) and the absorbance was measured at 540 nm. Abbreviations are TK : *Trichosanthes kirilowii* fruits extract ($50 \mu\text{g/mL}$), BIF : *Phyllostachys bambusoides* inner films extract ($50 \mu\text{g/mL}$), CT : *Clerodendrum trichotomum* leaves extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AO : *Acer okamotoanum* leaves extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AB : arbutin ($50 \mu\text{g/mL}$), VC : vitamin C ($50 \mu\text{g/mL}$), HQ : hydroquinone ($5 \mu\text{g/mL}$), and KA : kojic acid ($50 \mu\text{g/mL}$).

tyrosinase 억제력을 측정된 IC_{50} 값 마황 : $990 \mu\text{g/mL}$, 천궁 : $1,160 \mu\text{g/mL}$, 빈랑자 : $200 \mu\text{g/mL}$, 및 정향추출물 : $690 \mu\text{g/mL}$ 의 결과와 비교하여 우수한 tyrosinase 억제력을 보이고 있다. 한편 Lee 등[16]이 130 종의 고등식물의 에탄올추출물을 이용하여 tyrosinase 억제력을 IC_{50} 값으로 나타낸 결과인 칼잎용담추출물 : $20 \sim 50 \mu\text{g/mL}$, 뽕나무 : $< 10 \mu\text{g/mL}$, 목단피 : $< 10 \mu\text{g/mL}$, 고삼 : $20 \sim 50 \mu\text{g/mL}$, 감초 : $20 \sim 50 \mu\text{g/mL}$, 상백피 : $< 10 \mu\text{g/mL}$ 의 결과에 비해서는 낮은 tyrosinase 억제력을 보인다. 그러나 본 실험에서 선별된 4가지 추출물의 IC_{50} 값은 기존의 미백성분으로 알려진 arbutin의 IC_{50} 값 $100 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 에 비해서 높은 tyrosinase 저해활성을 보이는 것이다. Table 1의 결과에 따라 IC_{50} 값이 $50 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 인 4가지 추출물을 1차로 미백활성이 우수한 추출물로 선별하였으며, 이후 멜라닌 생성량 억제실험은 본 4가지 추출물에 한하여 시험하였다.

3.2. 선별 식물추출물이 흑색종세포주의 성장에 미치는 영향

미백활성 성분의 멜라닌생성 억제력 시험은 기본적인

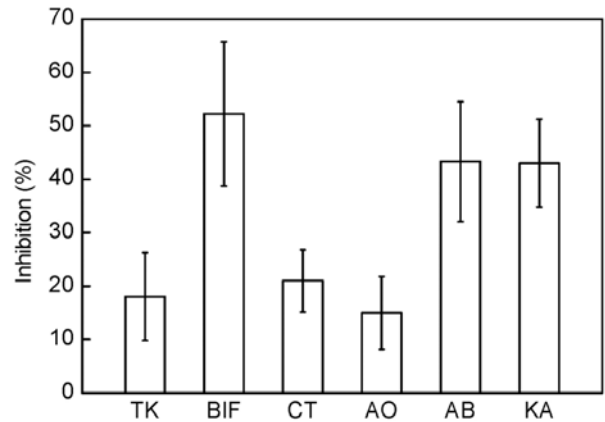


Figure 3. Effects of plant extracts on melanin synthesis of B16F10 melanoma cells. Cells (5×10^5 cells/well) were incubated with plant extracts for three days. Concentrations of plant extracts and control agents were $50 \mu\text{g/mL}$. The data shown represent mean \pm S.D. ($n = 3$) and the inhibitions were expressed as percentage. Abbreviations are TK : *Trichosanthes kirilowii* fruits extract ($50 \mu\text{g/mL}$), BIF : *Phyllostachys bambusoides* inner films extract ($50 \mu\text{g/mL}$), CT : *Clerodendrum trichotomum* leaves extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AO : *Acer okamotoanum* leaves extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AB : arbutin ($50 \mu\text{g/mL}$), and KA : kojic acid ($50 \mu\text{g/mL}$).

로 대상성분이 세포에 독성을 나타내거나 성장을 억제하지 않아야 한다는 것을 전제로 한다. 이유는 세포독성에 의한 멜라닌 생성량 감소는 멜라닌생성 과정에 대한 저해가 아니기 때문이다. 따라서 본 실험에서도 시험농도인 $50 \mu\text{g/mL}$ 에서 세포독성 여부를 확인하고자 하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 시험농도인 $50 \mu\text{g/mL}$ 에서 선별된 4종의 추출물은 기존의 알려진 미백성분인 arbutin, kojic acid, 비타민 C와 마찬가지로 세포의 성장에 영향을 미치지 않아 세포독성이 없는 것을 확인하였다. 이에 비하여 hydroquinone은 $5 \mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 세포성장에는 영향을 주는 세포독성이 있는 결과를 보였다. 상기 결과에 따라 이후 4종 식물 추출물의 멜라닌세포 시험농도는 세포독성을 보이지 않는 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 시험을 수행하였다.

3.3. 선별 식물추출물이 흑색종세포주의 멜라닌생성에 미치는 영향

흑색종세포주에 독성을 보이지 않는 농도에서 추출물들의 멜라닌생성 억제 효과를 시험하였다. 본 실험은 tyrosinase 활성억제 효과가 있는 성분이 멜라닌 생성과정의 최종 산물인 멜라닌생성의 억제정도를 확인하기 위한

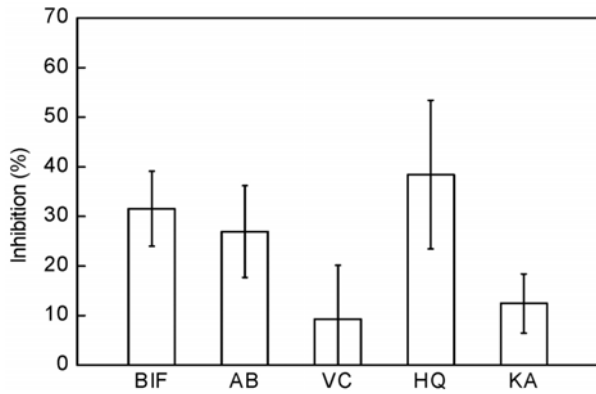


Figure 4. Effect of BIF extract on melanin synthesis of human melanocytes. Cells (5×10^5 cells/flask) were incubated with BIF extract for seven days. Concentrations of BIF extracts were $50 \mu\text{g/mL}$. Inhibitions were expressed as percentage (mean \pm S.D., $n = 3$). Abbreviations are BIF : *Phyllostachys bambusoides* inner films extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AB : arbutin ($50 \mu\text{g/mL}$), VC : vitamin C ($50 \mu\text{g/mL}$), HQ : hydroquinone ($5 \mu\text{g/mL}$), and KA : kojic acid ($50 \mu\text{g/mL}$).

실험이며, 본 결과는 tyrosinase 억제효과에 비해 미백제로 더 중요한 평가 기준이 된다. 선발된 4가지 추출물에 대하여 B16F10 흑색종세포주에 멜라닌 생성량 억제효과를 시험하였다. 시험결과 Figure 3에서 보는 바와 같이 죽황추출물이 약 50 %의 억제효과를 보여 4가지 추출물 중 가장 높은 억제율을 보였으며, 또한 기존의 미백제로 사용되고 있는 arbutin 및 kojic acid보다 약 10 % 높은 멜라닌생성량 억제에의 결과를 보였다. 혼합성분을 함유하는 죽황추출물이 단일성분인 arbutin이나 kojic acid에 비해 높은 멜라닌 저해활성을 보인 결과로 판단할 때 죽황추출물에는 높은 미백활성을 가진 성분이 함유되어 있을 가능성을 확인하였다.

3.4. 죽황추출물이 인체 멜라닌세포의 멜라닌생성에 미치는 영향

일반적으로 멜라닌생성량 억제효과는 세포가 다루기 쉽고 성장이 쉬운 흑색종세포주를 주로 이용한다. 그러나 이는 인체세포가 아니기 때문에 좀 더 명확한 해석을 위하여 인체 멜라닌세포를 이용하는 방법이 이용된다. 따라서 본 실험에서는 인체 멜라닌세포에서 죽황추출물이 기존의 미백성분인 arbutin 및 kojic acid보다 높은 멜라닌생성 억제효과를 보이는지 확인하고자 하였다. 시험결과(Figure 4) 죽황추출물은 39 %의 hydroquinone보다는 낮은 31 %의 결과를 보였으나, 기존의 미백제인 27

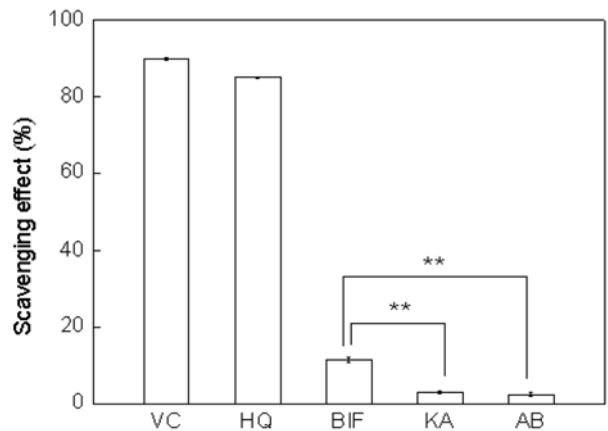


Figure 5. Effect of BIF extract on free radical scavenging activity. The BIF extract and control agents ($10 \mu\text{g/mL}$) were reacted with DPPH for 30 minutes. The data shown represent the percentage of scavenging effects (mean \pm S.D., $n = 3$). Abbreviations are BIF : *Phyllostachys bambusoides* inner films extract ($50 \mu\text{g/mL}$), AB : arbutin ($50 \mu\text{g/mL}$), VC : vitamin C ($50 \mu\text{g/mL}$), HQ : hydroquinone ($50 \mu\text{g/mL}$), and KA : kojic acid ($50 \mu\text{g/mL}$) (** $p < 0.01$).

%의 arbutin, 12 %의 kojic acid 및 9 %의 비타민 C보다 높은 멜라닌생성 억제효과를 보였다. 이 결과는 흑색종세포주에서와 유사하게 기존 미백성분보다 높은 미백활성을 보여주는 결과로 두 세포의 결과에서 약간의 차이는 있었으나, 어느 한 세포에 의한 결과로 멜라닌생성량 억제효과에의 해석이 가능함을 확인하였다.

3.5. 죽황추출물의 자유라디칼 소거효과

멜라닌 생성과정은 전체적으로 tyrosine이 산화되어 멜라닌 고분자를 합성하는 과정이기 때문에 비타민 C에서와 같이 항산화효과가 있는 성분이 멜라닌생성을 저해할 가능성이 높다. 따라서 본 실험에서도 항산화효과를 나타내주는 자유라디칼 소거효과를 실험하였다. Figure 5에서 보는 바와 같이 죽황추출물은 기존의 항산화효과가 높은 성분으로 알려진 hydroquinone이나 비타민 C에 비해서는 낮은 소거율을 보였으나 arbutin 및 kojic acid 보다는 약 10 % 높은 소거율을 보여 추출물 내에 항산화효과가 높은 성분이 함유되어 있음을 확인하였다.

3.6. 미백활성 성분의 분리 및 구조 확인

Figure 1에서와 같이 죽황에탄올 농축물을 물, 부탄올 및 hexane으로 분액하고 항산화 활성검정 및 tyrosinase 활성 억제력 검정과정을 통하여 분획을 선정하고 선정된

Table 2. Structures of the Isolated Compounds from BIF Extract

Code	Structure
SM701	
SM702	
SM703	
SM704	
SM709	
BPR211 (Arbutin*)	
Kojic acid*	
SM705	
SM706	
SM707	
SM708	

* The structures of arbutin and kojic acid are included as references.

Table 3. Free Radical Scavenging Effects of the Isolated Compounds from BIF Extract

Sample	IC ₅₀ (μM)
SM701	45
SM702	74
SM703	> 200
SM704	160
SM705	> 200
SM706	> 200
SM707	> 200
SM708	34
SM709	65
Hydroquinone	60
BPR211 (Arbutin)	720
Vitamin C	45

분획에 대하여 silica gel chromatography, C-18 HPLC로 10가지 물질을 순수하게 분리 정제하였다. 분리된 성분의 수율은 다음과 같다. 죽황 2.8 kg에서 에탄올추출물 130 g을 얻었다. 이 추출물에 hexane과 물을 가하여 미백활성이 높은 수용성 에탄올층으로부터 추출물 72.8 g을 얻었다. 여기에 부탄올과 물을 가하여 물층으로부터 35.5 g의 추출물을 얻었고, 이로부터 백색 바늘상 고체 61.2 mg (SM701), 백색 바늘상 고체 25.3 mg (SM702), 백색고체 52 mg (BPR211), 백색고체 16.3 mg (SM704), 백색 고체 11.5 mg (SM705)을 각각 얻었다. 또한 부탄올층으로부터 48 g의 추출물을 얻었고, 여기로부터 오렌지색 oil 4.0 mg (SM706), 무정형 고체 23.5 mg (SM707), 백색 고체 17.5 mg (SM703) 백색 고체 413.3 mg (SM708), 무색 oil 52.3 mg (SM709)을 얻었다. 이들 물질들의 화학구조는 NMR을 주로 사용하여 규명하였으며, 구조식을 Table 2에 나타내었다. 이들 물질들은 화학구조 측면에서 모두 phenolic 유도체였으며, 세분하면 arbutin과 같은 hydroquinone계로 SM701, 702, 703, BPR211 등이, gallic acid계로 SM707이, ferulic acid계로 SM704, 705, 706, 708, 709 등으로 크게 분류할 수 있다. Table 3에서 보는 바와 같이 자유라디칼 소거율은 SM701, 702, 708, 709 등이 arbutin보다 우수한 결과를 보였다. 특히 SM701, 708은 hydroquinone보다 우수한 결과를 비타민 C와는 유사의 결과를 보여 추출물 내에는 자유라디칼 소거효과가 우수한 성분이 함유되어 있음을 확인하였다. 대나무에서 알려진 바는 없으나, SM701은 tachioside로 다른 식물에서 분리되어 이미 알려진 물질

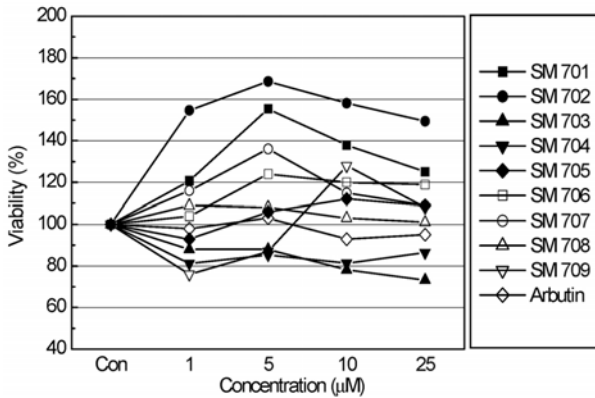


Figure 6. Effects of the isolated compounds on cell viability of B16F10 melanoma cells. Cells were incubated with the isolated compounds for 48 h at the concentration of 1, 5, 10, and 25 μ M. Cell viability was expressed as percentage of control. The data represent the mean value of three experiments.

이며, SM702은 *Isatachis japonica*라는 식물로부터 알려진 isotachioside이다. SM706은 대나무에서 알려진 koaburaside라는 물질이다. SM708은 1988년 Shimomura 등 [21]에 의해서 *Lilium paradarinum*로부터 분리되어 화학구조가 알려졌으며, 국소 미백제 용도로 일본에서 1992년에 특허화된 물질[22]이다. 그러나 SM709은 *Lilium auratum*[23]으로부터 1989년에 알려진 구조이긴 하지만, 대나무로부터는 처음으로 분리된 물질이며, 미백 효과는 아직 보고된 바가 없다. 본 실험에서 분리한 물질들 중에서 SM708이 양적인 측면에서 가장 많이 검출되었다(354.4 mg/2.8 kg).

3.7. 분리성분의 미백활성

3.7.1. 자유라디칼 소거효과

자유라디칼 소거효과(free radical scavenging effect)는 항산화효과를 나타내주며, 멜라닌생성 제어와 관련된 인자의 하나이다. 따라서 순수분리한 성분들에 대해 자유라디칼 소거효과를 확인하였다. 앞의 Table 3에서 죽향추출물은 자유라디칼 소거율이 기존의 미백성분인 arbutin이나 kojic acid보다 높은 결과를 보였고, 이것으로 보아 자유라디칼 소거능력이 높은 성분이 함유되어 있을 것으로 예측되었다. 실험결과 Table 3에서와 같이 SM703, 705, 706, 707은 50 %의 DPPH를 소거하는 농도인 SC₅₀이 200 μ M 이상의 높은 값을 보여 라디칼 소거능력이 낮았으나, SM701, 709는 비타민 C와 유사한 낮은 SC₅₀ 값으로 높은 자유라디칼 소거율을 보였다. 또한

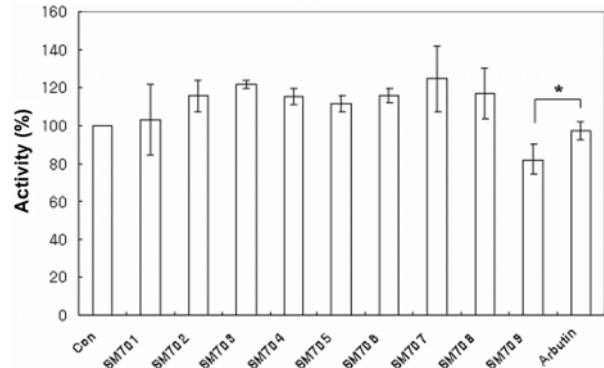


Figure 7. Effects of the isolated compounds on tyrosine hydroxylase activity of B16F10 melanoma cells. Cells were incubated for 72 h with 10 μ M of the isolated compounds. Activity was expressed as percent activity of control. The data represent mean \pm S.D. (n = 3) (*p < 0.05).

SM702와 SM709는 hydroquinone과 유사한 60 ~ 70 μ M의 결과를 보여 라디칼 소거활성이 높은 성분이 함유되어 있음을 확인하였다.

3.7.2. 세포독성(MTT Assay)

순수분리한 성분들의 세포독성을 파악하고, 이들 성분의 사용상 적정농도를 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. SM701부터 SM709까지의 성분들에 대한 세포독성은 B16F10 흑색종세포주를 배양중에 첨가하여 이루어졌다. 각 성분을 1, 5, 10, 25 μ M의 농도로 만든 후 B16F10 세포에 첨가하여 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. Glucopyranoside 성분인 SM701 및 702는 5 μ M 농도까지 세포 증식을 촉진하여, 세포증식을 촉진하는 성분으로 생각되었다. 이에 비하여 또 다른 glucopyranoside인 SM703과 propanetriol 성분인 SM704는 25 μ M에서 B16F10 세포의 성장을 대조군에 비해서 15 ~ 25 % 정도 억제하였다. 이외 다른 성분은 25 μ M까지 세포독성을 보이지 않아 비교적 안전한 성분들로 판단되었다(Figure 6). 따라서, 이후의 멜라닌세포에 대한 멜라닌 생성억제 실험은 대부분의 분리성분에서 세포독성이 관찰되지 않은 5 ~ 10 μ M 농도에서 수행되었다.

3.7.3. Tyrosine Hydroxylase 활성에 미치는 영향

순수 분리한 죽향 추출성분의 tyrosine hydroxylase 활성저해 효과를 측정하기 위하여 SM701에서 SM709까지 순수분리한 성분들을 세포 독성이 없는 농도인 10 μ M의 농도로 처리하였다. 처리결과 SM701에서 SM708까지의 성분은 tyrosine hydroxylase 활성을 대조군에 비하여 오

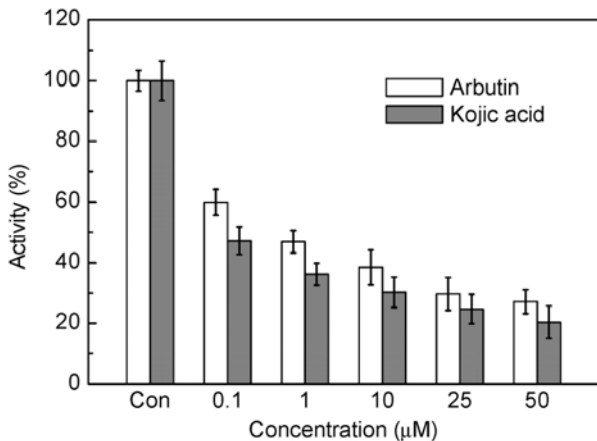


Figure 8. Effects of arbutin and kojic acid on DOPA oxidase activity of B16F10 melanoma cells. Cells (10^5 cells/well) were incubated with 0.1, 1, 10, 25, and 50 μM of arbutin and kojic acid for 3 days. Cells were lysed by the addition of cell-lysis buffer and DOPA oxidase activity was measured by absorbance at 475 nm. Activity was expressed as percentage of control. The data represent mean \pm S.D. (n = 3).

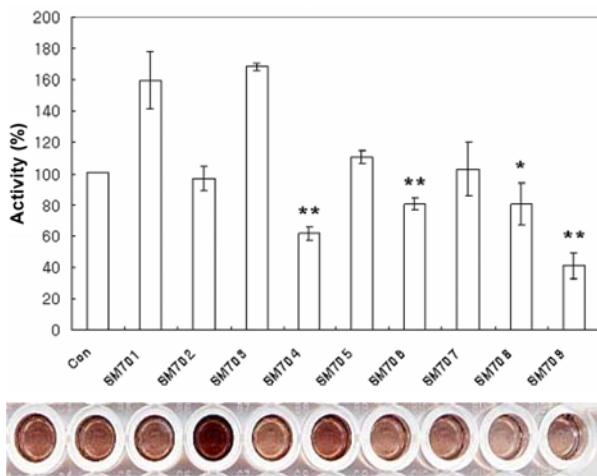


Figure 9. Effects of the isolated compounds on the DOPA oxidase activity of B16F10 melanoma cells. A : Cells (10^5 cells/well) were incubated with 10 μM of the isolated compounds for 3 days. Cells were lysed by the addition of the cell-lysis buffer and the DOPA oxidase activity was measured by absorbance at 475 nm. The data represent mean \pm S.D. (n = 3). B : Photographs of L-DOPA reactions. The intensity of orange color represents the amount of DOPA chrome (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

히려 최고 25 %까지 상승시켰다. 이에 비하여 SM709는 대조군 대비 tyrosine hydroxylase 활성을 약 18 % 억제

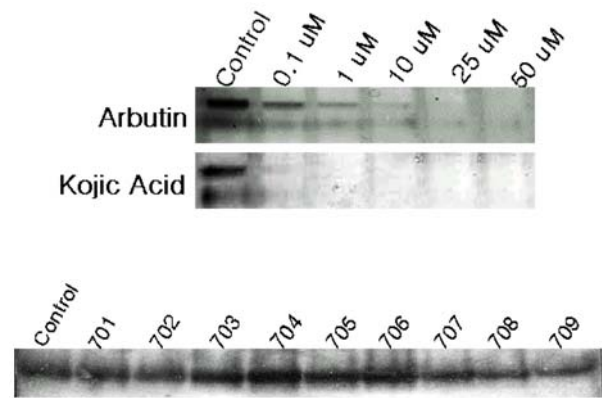


Figure 10. Staining of electrophoresis gel of tyrosinase. B16F10 melanoma cells (105 cells/well) were incubated with 10 μM of the isolated compounds for 3 days. Protein mixtures of cell extracts were subjected to an SDS-PAGE. Tyrosinase activities of protein in the gel were visualized as dark bands containing DOPA-melanin.

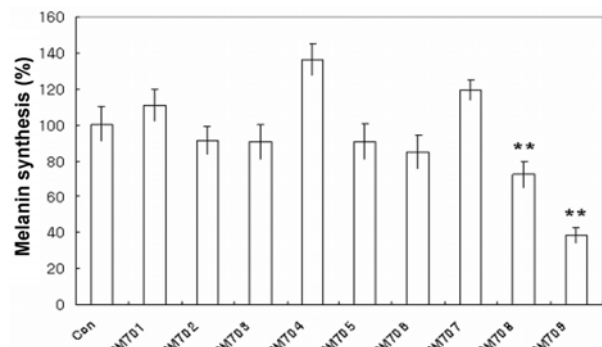


Figure 11. Effects of isolated compounds from BIF extract on melanin synthesis of B16F10 melanoma cells. Each of the isolated compounds was added to the cell culture at the concentration of 10 μM . Cells were incubated for 3 days. Synthesis of melanin was measured by absorbance at 475 nm. The data represent mean \pm S.D. (n = 3) (** $p < 0.01$).

하였다(Figure 7). 이 결과는 시험농도가 낮기 때문으로 생각되며, tyrosine hydroxylase의 활성을 촉진하여 낮은 농도에서 SM709를 제외한 죽황 성분들이 미백에는 역효과를 나타낼 수 있을 가능성을 보인다. 기존의 미백성분으로 알려진 arbutin 역시 tyrosine hydroxylase 억제효과를 보이지 않았다. 이는 Ashok 등이 tyrosine 저해활성을 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 20 %로, Park 등[20]이 IC_{50} 값을 880 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 보고한 결과에 비추어 저해효과가 없음은 예상할 수 있는 결과이다. 그러나, SM709는 10 μM 의 낮은 농도에서도 약 18 %의 tyrosine hydrox-

ylase의 저해를 보여 미백활성이 높음을 알 수 있다. 따라서, 이후 실험에서는 SM709에 대한 효과가 증점적으로 검토되었다.

3.7.4. DOPA Oxidase 활성에 미치는 영향

미백성분으로 알려진 arbutin과 kojic acid을 비교물질로 순수분리한 물질들의 DOPA oxidase 활성에 미치는 영향을 B16F10 흑색종세포주를 이용하여 측정하였다. Arbutin과 kojic acid은 0.1 μM 에서 50 μM 사이의 농도에서 농도의존적으로 DOPA oxidase 활성을 저해하였으며, 10 μM 에서 kojic acid은 약 70 %, arbutin은 약 60 %의 저해효과를 나타내었다(Figure 8). 그러나, SM701과 703, 705 및 707은 대조군 대비 각각 160, 168, 110, 102 %로 DOPA oxidase 활성을 오히려 증가시켰다. 이에 비하여 SM702와 704, 706, 708, 709는 대조군과 비교하여 각각 97, 62, 80, 80, 40 %의 결과를 보여 각각 3, 38, 20, 20, 60 %씩 DOPA oxidase 활성을 감소시켰다. 이러한 결과는 tyrosine hydroxylase 저해효과와 비교되는 것으로, arbutin, kojic acid 및 SM709는 멜라닌 생성과정에서 DOPA oxidase 활성을 저해함을 확인할 수 있었다(Figure 9).

3.7.5. PAGE Tyrosinase 활성염색 결과

순수분리한 성분이 DOPA oxidase에 미치는 영향을 SDS-PAGE를 이용 staining 후 확인하였다. Figure 10에서 보는 바와 같이 SM709는 같은 농도인 10 μM 에서 arbutin 및 kojic acid에 비해서는 색이 진하였으나, 분리된 성분 중에서는 가장 색이 얼어 DOPA의 생산량이 가장 적음을 눈으로 확인할 수 있었다. 그러나 이 결과는 분광학적인 방법을 이용한 전향의 결과와 비교하여 arbutin 및 kojic acid에 비하여 밴드가 진하여 활성이 적은 결과로 생각된다.

3.7.6. 멜라닌 생성량 저해효과

멜라닌 생성량의 저해는 멜라닌 생성경로에 관여하는 효소의 억제활성보다 더 중요한 의미를 갖는다. 이는 최종 생성물에 대한 저해활성이기 때문이며 아무리 효소 활성억제력이 우수하다고 하여도 최종 생성물인 멜라닌 생성량을 저해하지 못하면 미백활성의 의미를 갖지 못하기 때문이다. 죽황 분리성분들을 10 μM 농도로 B16F10 흑색종세포주에 처리하였을 때, SM701, 704, 707은 비교군 대비 각각 111, 136, 119 %로 멜라닌생성을 증가시켰으나, SM702, 703, 705, 706, 708, 709는 각각 비교군 대비 92, 90, 90, 84, 72, 38 %의 결과로 멜라닌 생성을 각각

8, 10, 10, 16, 28, 62 %씩 억제하였다(Figure 11).

4. 결 론

천연물로부터 미백활성 성분의 개발을 위하여 국내 자생식물 60종으로부터 추출물을 얻어, 이들의 멜라닌 생성과정의 주된 효소인 tyrosinase 활성 억제력을 평가하였다. 평가결과 노랑하늘타리(열매), 죽황, 누리장나무(잎), 우산고로쇠(잎) 추출물이 비교적 높은 tyrosinase 활성억제효과를 보였고, 이들의 IC₅₀ 값은 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이들의 멜라닌생성 억제효과를 B16F10 흑색종세포주를 이용하여 실험한 결과, 죽황추출물이 가장 높은 52 %의 멜라닌생성 저해활성을 보였으며, 이는 기존 미백제인 arbutin (42 %)에 비해 10 % 높은 것이다. 죽황추출물로부터 용매추출 및 크로마토그래피 등의 분리과정을 거쳐 10가지 미백활성 성분을 분리하였다. 이들은 모두 페놀유도체 화합물로서, SM701과 SM702, SM703, BPR211은 hydroquinone계 화합물이며, SM707은 gallic acid계, SM704와 SM705, SM706, SM708, SM709는 ferulic acid계로 확인되었다. 이들의 자유라디칼 소거효과를 hydroquinone과 비타민 C와 비교하여 측정하였을 때, SC₅₀ 값이 SM702와 SM709의 경우 60 ~ 70 μM 로 hydroquinone과 유사하였고, SM701과 SM708은 30 ~ 40 μM 로 비타민 C와 유사한 값을 보여 죽황추출물은 항산화활성이 높은 성분들을 함유하고 있음을 확인하였다. 이들 중 1,2-O-diferulylglycerol로 확인된 SM709 성분은 tyrosine hydroxylase 및 DOPA oxidase 활성을 각각 18, 60 % 억제하였고, B16F10 흑색종세포주를 이용한 멜라닌생성량 억제시험에서 62 %의 저해효과를 나타내 가장 높은 미백활성을 보였다. 따라서 죽황추출물의 미백활성은 주로 멜라닌 생성과정의 DOPA oxidase 저해효과와 항산화효과에 의해 나타나는 것을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. V. J. Hearing, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**(1), 24 (1999).
2. A. G. Lowell, Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin, 2nd Ed., Oxford University Press Inc., New York, 891 (1991).
3. S. Tuomaala, S. Eskelin, A. Tarkkanen, and T.

- Kivela, Population-based assessment of clinical characteristics predicting outcome of conjunctival melanoma in whites, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**(11), 3399 (2002).
4. H. K. Kim, S. K. Kim, and S. W. Hwang, Daily topical sequential triple therapy of tretinoin, beta-methasone valerate and hydroquinone on melasma, *Kor. J. Dermatol.*, **18**(6), 529 (1980).
 5. J. H. Paik and M. H. Lee, Antimelanogenic effects of arbutin, *Kor. J. Dermatol.*, **38**(10), 1303 (2000).
 6. A. Perez-Bernal, M. A. Munoz-perez, and F. Camacho, Management of facial hyperpigmentation, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **1**(5), 261 (2000).
 7. K. Jimbow, H. Obata, M. A. Pathak, and T. B. Fitzpatrick, Mechanism of depigmentation by hydroquinone, *J. Invest. Dermatol.*, **62**(4), 436 (1974).
 8. M. E. Winkler, K. Lerch, and E. I. Solomon, Competitive inhibitor binding to the binuclear copper active in tyrosinase, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**(23), 7001 (1981).
 9. A. Perez-Bernal, M. A. Munoz-Perez, and F. Camacho, Management of facial hyperpigmentation, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **1**(5), 261 (2000).
 10. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**(2), 765 (1996).
 11. J. H. Paik and M. H. Lee, Antimelanogenic effects of arbutin, *Kor. J. Dermatol.*, **38**(10), 1303 (2000).
 12. K. Kameyama, C. Sakai, S. Kondoh, K. Yonemoto, S. Nishiyama, M. Tagawa, T. Murata, T. Ohnuma, J. Quigley, A. Dorsky, D. Bycks, and K. Blanock, Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis *in vitro* and *in vivo*, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **34**(1), 29 (1996).
 13. D. I. Jang, B. G. Lee, C. O. Jeon, N. S. Jo, S. Y. Park, H. Lee, and J. S. Koh, Melanogenesis inhibitor from paper mulberry, *Cosme. & Toilet.*, **112**(3), 59 (1997).
 14. K. H. Jeon, B. G. Lee, D. G. Park, and B. S. Lee, Cosmetic composit for whitening containing *Broussonetia kazinoki* extract, KP 10-0070824 (2001).
 15. G. T. Lee, J. N. Lee, G. H. Jeong, Y. J. Lee, and S. G. Lee, Cosmetic composit for whitening containing senkunolide A, KP 10-0504408 (1995).
 16. S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim, and S. R. Chung, The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product, *Yakhak Haeji*, **41**(4), 456 (1997).
 17. F. Nanjo, K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara, Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**(6), 895 (1996).
 18. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**(1), 55 (1983).
 19. H. Ando, Y. Funasaka, M. Oka, A. Ohashi, M. Furumura, J. Matsunaga, N. Matsunaga, V. H. Hearing, and M. Ichihashi, Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis, *J. Lipid Res.*, **40**(7), 1312 (1999).
 20. J. H. Park, G. S. Young, U. K. Shin, and S. K. Baek, Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs, *Yakhak Haeji*, **41**(4), 518 (1997).
 21. H. Shimomura, Y. Sashida, Y. Mimaki, Y. Kudo, and K. Maeda, New phenylpropanoid glycerol glucosides from the bulbs of *Lilium* species, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(12), 4841 (1988).
 22. JP 1994-60157273.
 23. H. Shimomura, Y. Sashida, and Y. Mimaki, Phenolic glycerides from *Lilium auratum*, *Phytochem.* **26**(3), 844 (1987).