

# 가래나무 추출물의 미백효과

이계원 · 이주연<sup>1</sup> · 조영호\*

건양대학교 제약공학과, <sup>1</sup>의료뷰티학과

## Whitening Effect of the Extracts from *Juglans mandshurica*

Gye Won Lee, Ju Yeon Lee<sup>1</sup>, and Young Ho Cho\*

Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, 119 Daehangro, Nonsan, Chungnam 320-711, Korea

<sup>1</sup>Department of Medical Beauty, Konyang University, 119 Daehangro, Nonsan, Chungnam 320-711, Korea

**Abstract** *Juglans mandshurica* belongs to the family Juglandaceae is known to contain a wide range of pharmacological activities including anti-cancer, anti-inflammation, astringent, and anti-human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1). Melanogenesis refers to the biosynthesis of melanin pigment in melanocytes. In this study, to investigate the whitening activity of the extracts from *Juglans mandshurica*, we measured effects on a tyrosinase activity, a melanogenesis, and a tyrosinase synthesis in the B16/BL6 melanoma cells and an antioxidant activity. The extracts significantly scavenged a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and a superoxide anion radicals in a dose-dependent manner with a SC<sub>50</sub> value of 20 µg/mL and 25 µg/mL, respectively. Also, the tyrosinase activity and melanogenesis were significantly inhibited by the extracts. Furthermore, the synthesis of tyrosinase protein was significantly decreased by the extracts in enzyme-linked immunosorbent assay. Double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 2% of the extracts showed that the extracts have a significant skin whitening effect. Therefore, this study demonstrates that the extracts from *Juglans mandshurica* may be useful as a potential agent for skin whitening.

**Keywords:** *Juglans mandshurica*, melanogenesis, tyrosinase, whitening effect

### 서 론

가래나무 (*Juglans mandshurica* Maximowicz)는 가래나무과에 속하는 낙엽교목으로 높이가 10-20 m 정도로 나무껍질은 암회색이며 꽃은 4-5월 사이에 피며, 중국, 시베리아, 한국 등지에 널리 분포하고 있다 [1]. 한방에서는 봄에서 가을 사이에 수피를 채취하여 말린 것을 추목피(楸木皮)라 하며 수렴과 해열, 눈을 맑게 하는 등의 효능이 있어 장염, 이질, 설사, 맥립증, 눈이 충혈하고 붓는 통증 등에 처방하고 있다 [2]. 가래나무의 주성분으로는 naphthoquinones, naphthalenyl glucosides, α-tertalonyl glucopyranosides, diarylheptanoyl glucopyranosides, flavonoids 등의 페놀성 화합물들이 보고되었다 [3-5].

멜라닌 (melanin)은 적갈색 또는 흑갈색의 고분자 화합물

로서 멜라노사이트 (melanocyte)내 멜라닌소체 (melanosome)라는 소기관에서 단계적 (cascade) 효소반응에 의해 합성된다 [6]. 사람의 피부색을 결정하는 가장 큰 인자는 멜라닌 색소로 멜라노사이트의 멜라닌 합성능, 케라티노사이트 (keratinocyte)로 이행된 멜라닌소체의 수, 그 성숙도, 존재 양식에 따라 인종에 따라 피부색이 차이가 나는 것으로 알려져 있다 [7]. 멜라닌은 외부 환경으로부터 피부세포를 보호해주는 역할을 하지만 자외선 노출 및 피부 노화로 인해 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 형성하고 심하게는 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다 [8].

멜라닌의 부정적인 기능 때문에 최근 멜라닌 생합성 대사에 대한 연구가 arbutin [9], kojic acid [10], oxyresveratrol [11], hydroquinone [12] 등에 대해 이루어져 화장품 산업에서 미백제, 의약품 산업에서 피부 질환 치료제 등으로 사용되고 있다. 그러나 미백 화장품의 원료로 사용되었던 kojic acid와 hydroquinone에서 부작용이 보고되면서 [12], 최근

### \*Corresponding author

Tel: +82-41-730-5695, Fax: +82-41-730-5695

e-mail: micael@konyang.ac.kr

에는 안전성을 고려하여 천연물을 이용한 미백연구가 활발히 이루어지고 있다 [13,14].

본 연구에서는 가래나무 추출물의 티로시나제 (tyrosinase) 저해 활성, 멜라닌 생성 억제 효과 및 티로시나제 합성 저해 효과를 측정하고, 이 추출물을 함유하는 제품의 임상시험을 실시하여 미백 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있는지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 가래나무는 *Juglans mandshurica* Maximowicz의 수피로 서울 경동시장 내의 한약 견재상에서 구입하여 사용하였다. 건조된 가래나무를 분쇄하여 70% 에탄올로 환류 추출하여 감압농축 및 동결건조한 후 그 분말을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였다.

세포 배양에 사용된 Eagle's minimum essential medium (EMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS) 및 fetal bovine serum (FBS)는 Lonza사 (Basel, Switzerland) 제품을 구입하였고 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), DMSO, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), vitamin C, 3-*t*-butyl-4-hydroxy anisole (BHA), bovine serum albumin (BSA) 및 nitroblue tetrazolium (NBT)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, Mo, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 마우스 멜라노마 (melanoma) 세포주인 B16/BL6로서 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다.

B16/BL6 멜라노마 세포는 EMEM 배지에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건 하에서 배양하였다.

### 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 효과 측정

Free radical의 소거 작용은 Blois [15]가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 DPPH radical에 대한 소거 효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 micro plate reader (ELx800, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹

과 비교하여 DPPH radical의 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조그룹으로는 vitamin C를 사용하였으며, 농도별로 처리하여 DPPH radical을 50% 소거하는 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하여 시료와 활성을 비교하였다.

### 초산화 음이온 라디칼 (Superoxide anion radical) 소거 효과 측정

초산화 음이온 라디칼의 소거작용은 Furuno 등 [16]의 방법에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 초산화 음이온 라디칼을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer에 3mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT, 0.15% BSA 용액과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10분간 반응하였다. 그 후 각 tube에 xanthine oxidase (0.25 U/mL) 용액을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응한 후, 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 초산화 음이온 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조 그룹으로는 BHA를 사용하였으며, 농도별로 처리하여 초산화 음이온 라디칼을 50% 소거하는 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하여 시료와 활성을 비교하였다.

### 세포 생존율 측정

세포독성은 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann [17]의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 B16/BL6 멜라노마 세포를 2 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 µg/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader (USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 대조그룹과 비교하였다.

### 세포내 티로시나제 활성 저해 효과 측정

세포내 티로시나제 저해 활성은 Matinez-Esparza [18]의 방법을 변형시켜 측정하였다. 6-well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 48시간 배양한 후, 세포를 수집하여 1% (W/V) Triton X-100을 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 100 µL 가하여 용해하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 상등액을 티로시나제 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용하였다. 96-well plate에 시료 처리 후 얻은 상등액 40 µL를 분주하고 0.2 µg/mL 3,4-hydroxyphenylalamine (DOPA)가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 200 µL씩 넣고 37°C에서 1시간 배양한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

## 멜라닌 정량

티로시나제 활성을 측정하는 과정에서 얻은 pellet에 10% DMSO를 함유한 1 N NaOH 용액 100  $\mu$ L와 증류수 200  $\mu$ L를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌을 사용하여 작성된 표준 검량선에서 구하고, 실험그룹의 멜라닌 양은 대조그룹의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다. 멜라닌 양은 각 well에서 측정한 단백질 농도를 기준으로  $\mu$ g/mg protein으로 표기하였다.

## 티로시나제 합성 저해 효과 측정

티로시나제 합성량 측정은 Fuller 등 [19]이 실시한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24시간 배양한 후, 세포를 수집하여 1% (W/V) Triton X-100을 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 75  $\mu$ L씩 가하여 용해시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 티로시나제 합성량 측정에 사용하였다. 96-well plate에 시료 처리 후 얻은 상등액 75  $\mu$ L와 동량의 coating buffer (0.159%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.293%  $\text{NaHCO}_3$ , 0.02%  $\text{NaN}_3$ , pH 9.6)를 각각 분주하고 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 각 well의 내용물을 제거 한 후 세척용 완충제 (wash buffer)로 세척과정을 3회 반복하였다. 각 well에 3% BSA를 함유한 세척용 완충제를 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 well을 세척용 완충제로 3회 세척한 후 적정 농도로 희석된 1차 항체 (anti-tyrosinase)를 150  $\mu$ L씩 분주하고 90분 동안 반응시켰다. 각 well을 세척용 완충제로 3회 세척한 후 적정 농도로 희석된 2차 항체 (Goat anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase)를 150  $\mu$ L씩 분주하고 90분 동안 반응시켰다. 각 well을 세척용 완충제로 5회 세척한 후 기질 용액을 150  $\mu$ L씩 분주하고 40분간 반응시켰다. 반응 정지 용액을 50  $\mu$ L씩 넣고 30분 내에 micro plate reader (USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 인공색소침착 후 제품의 미백 효과 평가

가래나무 추출물을 2% 함유한 크림 제형에 대한 미백 효과는 피시험자 20명을 대상으로 가래나무 추출물 무첨가 크림 제형을 대조제품으로 하여 이중 맹검법 (double-blind test)으로 평가하였다. 피시험자는 25세부터 55세의 여성을 대상으로 기능성화장품 유효성 평가 가이드라인의 피시험자 선정방법에 따라 선발하였다. 피시험자의 평균 연령은 35.5세이었으며, 색소 침착 (1.0 minimum erythema dose (MED))을 위한 1회 조사 광량 ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )은 평균 29.8이었다. 피시험자의 등에 1,000 W xenon arc lamp가 장착된 인공 자외선 방출기 (Oriel solar UV simulator 91294, Oriel

Instrument, Stratford, CT, USA)로 1 MED에 해당하는 광량의 자외선을 1일 1회씩 총 3일간 조사하였다. 색소침착이 시작되는 마지막 자외선 조사 1주일 후부터 광조사된 시험부위에 대조제품과 시험제품을 하루 2회씩 총 8주간 도포하였다. 자외선 조사 종료 1주 (제품사용 0주), 3주 (제품사용 2주), 5주 (제품사용 4주), 7주 (제품사용 6주), 9주 (제품사용 8주)후 경과 후에 각각 색차계 (Chromameter CR-400, Konica Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  value 변화를 총 5회 측정하여 미백효과를 평가하였다 ( $L^*$ : Lightness ( $L^* = 0$  yields black and  $L^* = 100$  indicate diffuse white),  $a^*$ : Green to red spectrum,  $b^*$ : Blue to yellow spectrum).

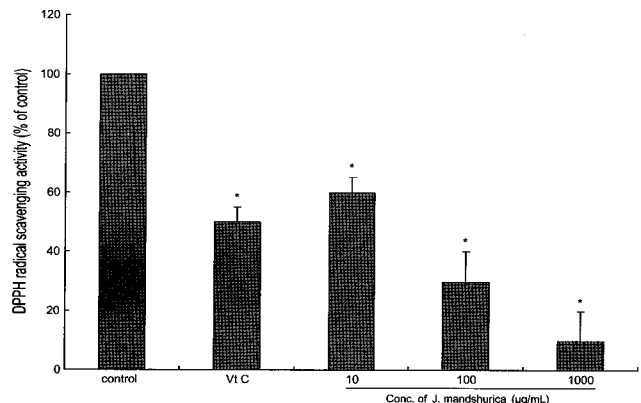
## 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test로 하여, *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 색차계를 이용한 기기적 평가는 SPSS 12.0 프로그램의 paired *t*-test로 시험제품과 대조제품간의 유의성을 검증하였으며, *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다.

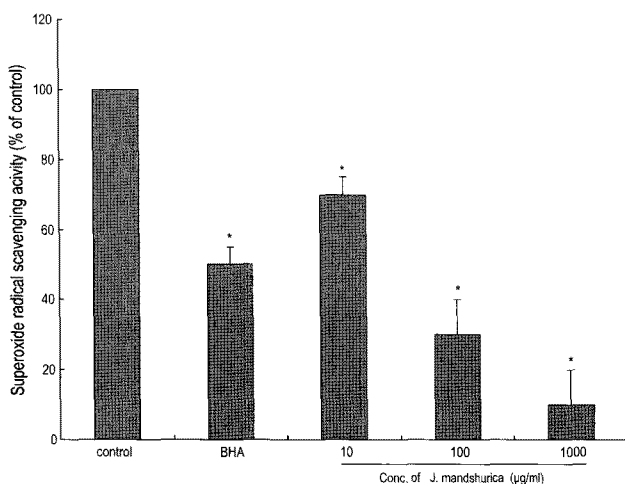


**Fig. 1.** Scavenging effects of the extracts from *Juglans mandshurica* on DPPH radical. 0.1 mM DPPH solution in methanol was gently mixed with an aliquot of the extracts for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The results were expressed as the average of triplicate experiments with S.D. The  $\text{SC}_{50}$  of vitamin C, a positive control, showed 11  $\mu$ g/mL. \*  $p < 0.05$  compared with control.

멜라닌 생성과정은 전체적으로 tyrosine이 산화되어 멜라닌 고분자를 합성하는 과정이기 때문에 항산화 효과가 있는 성분이 멜라닌 생성을 저해할 가능성이 높다. 따라서 가래나무 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 가래나무 추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다 (Fig. 1). 즉, 가래나무 추출물을 10, 100, 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 각각의 DPPH radical 소거능은 40%, 70%, 90%로 나타났다. 양성 대조그룹으로는 항산화 작용이 우수한 것으로 알려진 vitamin C를 이용하여 가래나무 추출물의 항산화 효과와 비교하였다. 그 결과 vitamin C는 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가래나무 추출물은 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 DPPH radical을 50% 소거하였다. 본 실험에서는 가래나무 추출물의 free radical 소거효과가 단일 성분인 비타민 C에 뒤지지 않는 매우 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

### 초산화 음이온 라디칼 소거 효과

초산화 음이온 라디칼의 저해작용은 초산화 음이온 라디칼 소거작용과 xanthine oxidase의 효소 활성 저해에 의해 나타난다고 알려져 있다 [20]. 또한 이에 따른 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다 [21,22]. 따라서 가래나무 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성되는 초산화 음이온 라디칼의 소거능을 측정하였다. 가래나무 추출물의 xanthine oxidase에 의해 생성되는 초산화 음이온 라디칼의 소거 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

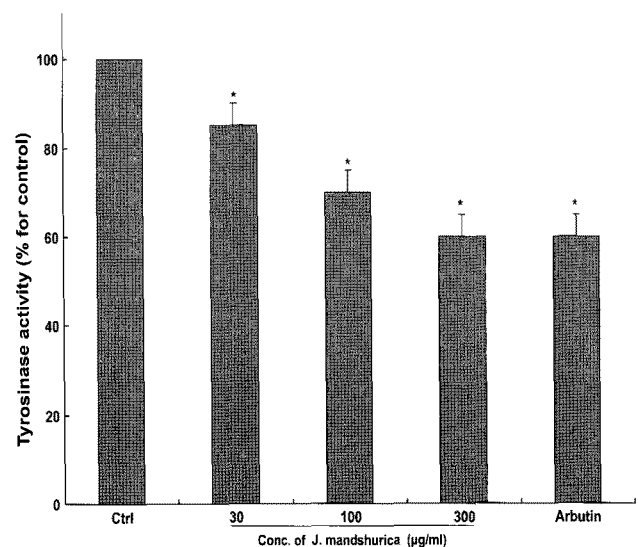


**Fig. 2.** Scavenging effects of the extracts from *Juglans mandshurica* on superoxide anion radicals. Superoxide anion radicals were generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method as described in the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate experiments with S.D. The  $\text{SC}_{50}$  of BHA, a positive control, showed 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . \*  $p < 0.05$  compared with control.

양성 대조그룹으로 BHA를 이용하여 가래나무 추출물의 초산화 음이온 라디칼 소거효과를 비교하였다. 그 결과 가래나무 추출물은 투여 농도 의존적으로 초산화 음이온 라디칼 소거작용을 나타내 10, 100, 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우, 각각의 초산화 음이온 라디칼 소거능은 30%, 70%, 90%로 나타났다. 양성 대조그룹인 BHA는 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가래나무 추출물은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 초산화 음이온 라디칼을 50% 소거하였다. 상기의 결과로 볼 때 가래나무 추출물은 양성 대조그룹인 BHA보다 우수한 초산화 음이온 라디칼 소거능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

### 세포내 티로시나제 활성 저해 효과

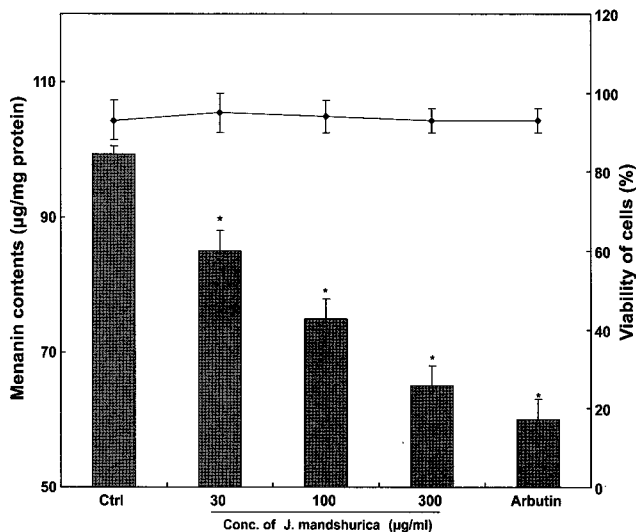
티로시나제는 멜라닌 합성 과정에서 속도결정단계인 초기 반응에 관여하는 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소로 티로신을 DOPA로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 가지고 있다 [6]. 가래나무 추출물의 세포내 티로시나제 활성 저해 효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 티로시나제의 활성을 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 즉, 가래나무 추출물을 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 티로시나제 활성 저해는 각각 15%, 30%, 40%로 나타났다. 양성 대조그룹으로 사용된 알부틴 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )보다 더 낮은 농도에서 비슷한 효과를 보임을 알 수 있다.



**Fig. 3.** Effects of the extracts from *Juglans mandshurica* on the activity of tyrosinase. The lysates of B16/BL6 melanoma cells containing tyrosinase were incubated with DOPA for 1 h. Tyrosinase activity was measured as described in the Material and Methods. The results were expressed as the average of triplicate experiments with S.D. The inhibitory effects of arbutin, a positive control, showed 40  $\pm$  5% at concentration of 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . \*  $p < 0.05$  compared with control.

## 멜라닌 생합성 저해 효과

B16/BL6 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 저해 효과는 Matinez-Esparza [18]의 방법을 변형시켜 측정하였다. B16/BL6 멜라노마 세포에 가래나무 추출물을 30, 100, 300 µg/mL의 농도로 각각 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성량을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 전 실험농도에서 세포 독성은 거의 나타나지 않았으며, 가래나무 추출물 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 감소하였다. 즉, 30 µg/mL에서 15%, 100 µg/mL에서 25%, 300 µg/mL에서 35%의 감소율을 보여 멜라닌 양이 유의적으로 감소되었다. 특히, 양성 대조군으로 사용된 알부틴이 400 µg/mL에서 40%의 감소율을 보인 것과 비교하여 볼 때 가래나무 추출물은 알부틴 보다 더 낮은 농도에서 비슷하거나 우수한 멜라닌 생성 저해 효과를 나타내는 것으로 나타났다.



**Fig. 4.** Inhibitory effects of the extracts from *Juglans mandshurica* on the melanin synthesis in B16/BL6 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of the extracts at concentration of 30, 100, 300 µg/mL for 48 h. The concentration of arbutin was 400 µg/mL. The determination of melanin content (■) was measured as described in the Materials and Methods. Cell cytotoxicity was measured by the MTT assay (◆). The viability of cells was expressed as a percentage. The results were expressed as the average of triplicate experiments with S.D. \*  $p < 0.05$  compared with control.

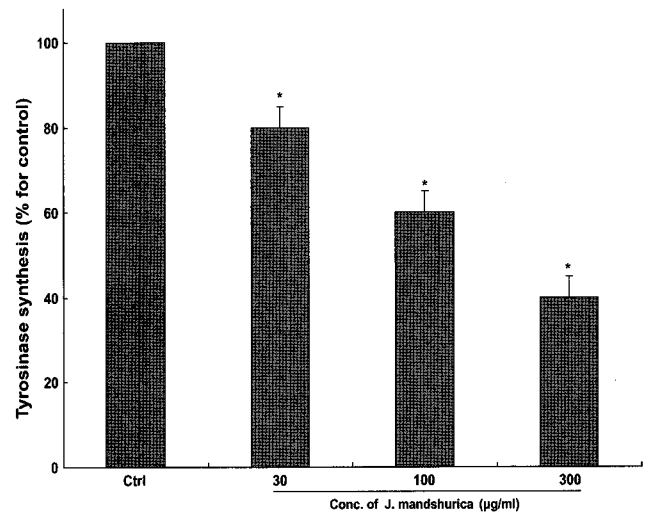
## 티로시나제 합성 저해 효과

B16/BL6 멜라노마 세포를 이용한 티로시나제 합성 저해 효과는 Fuller 등 [19]이 실시한 ELISA 방법을 약간 변형하여 측정하였다. B16/BL6 멜라노마 세포에 가래나무 추출물을 30, 100, 300 µg/mL의 농도로 각각 처리하고 24시간 배양한 다음 티로시나제 합성량을 측정하였다. Fig. 5에서

보는 바와 같이 가래나무 추출물 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 티로시나제 합성량이 감소하였다. 즉, 30 µg/mL에서 20%, 100 µg/mL에서 40%, 300 µg/mL에서 60%의 감소율을 보여 티로시나제 합성이 유의적으로 감소되었다.

본 연구의 결과 B16/BL6 멜라노마 세포에 가래나무 추출물을 처리하면 농도 의존적으로 티로시나제 활성, 멜라닌 및 티로시나제 합성이 모두 감소하는 것으로 나타난 것으로 보아 티로시나제가 멜라닌 합성에 관여하는 주요한 효소로 작용함을 알 수 있다. 이러한 사실은 Englaro [23] 등이 보고한 연구와 일치하는 사실이다.

따라서 가래나무 추출물은 멜라닌 생합성 과정의 upstream에 작용하는 티로시나제 단백질의 활성을 저해함으로써, downstream으로의 진행을 저지하여 B16/BL6 멜라노마 세포의 티로시나제 및 멜라닌 합성 억제 효과에 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다.

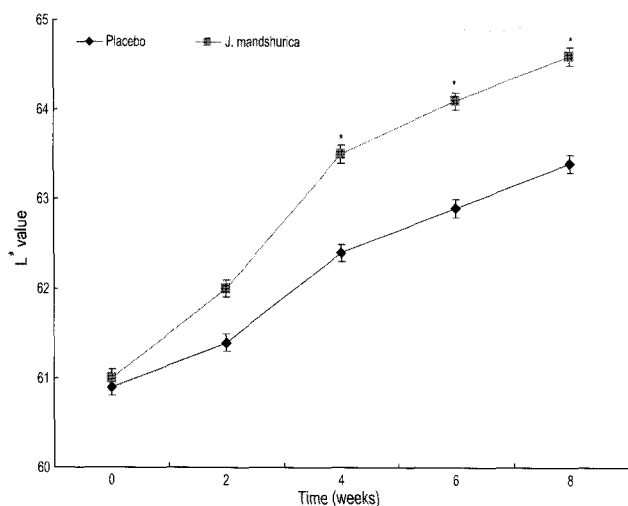


**Fig. 5.** Inhibitory effects of the extracts from *Juglans mandshurica* on the tyrosinase synthesis in B16/BL6 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of the extracts at concentration of 30, 100, 300 µg/mL for 24 h. The tyrosinase synthesis was determined by the ELISA as detailed under the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate experiments with S.D. \*  $p < 0.05$  compared with control.

## 인공색소침착 후 제품의 미백 효과

가래나무 추출물을 2% 함유한 크림 제형에 대한 미백 효과를 평가하기 위하여 피시험자 20명을 대상으로 8주 동안 인체적용 시험을 실시하였다. 피시험자에게 시험제품과 대조제품을 1일 2회씩 사용하게 하였고, 자외선 조사에 의한 인공색소 침착 후 (제품사용 0주), 색소침착 2주 후 (제품사용 2주), 4주 후 (제품사용 4주), 6주 후 (제품사용 6주) 및 8주 후 (제품사용 8주)에 각각 색차계를 사용하여 미백 효과를 평가하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이

가래나무 추출물 함유 제품을 사용한 4주 후부터 대조 제품에 비해 통계적으로 유의한 수준의 피부 미백 효과를 나타내었다. 또한, 시험제품과 대조제품 모두 사용 후 특별한 피부 이상반응이 관찰되지 않았으므로 (data not shown) 본 제품은 매우 안전한 미백소재가 될 것으로 사료된다.



**Fig. 6.** The whitening effect of the extracts from *Juglans mandshurica*. The placebo cream without and the test cream with 2% of the extracts were used for 8 weeks. The change in skin brightness ( $\Delta L^*$  value) was measured by Chromameter as detailed under the Materials and Methods. The results were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). \*  $p < 0.05$  compared with placebo.

## 요약

본 연구에서는 가래나무 추출물의 항산화 효과와 티로시나제 활성 저해, 멜라닌 생성 및 티로시나제 합성 억제 효과를 측정하고 이 추출물을 함유하는 제품의 임상시험을 실시하여 미백 화장품 소재로서의 개발 가능성을 관찰하였다. 가래나무 추출물은 농도 의존적으로 DPPH radical 과 초산소 음이온 라디칼을 소거하였고,  $SC_{50}$  값은 각각 20  $\mu\text{g/mL}$  및 25  $\mu\text{g/mL}$  이었다. B16/BL6 멜라노마 세포를 이용하여 세포내 티로시나제 활성, 멜라닌 생성 및 티로시나제 합성 억제 효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 티로시나제의 활성 및 멜라닌 생성을 억제하였으며, 티로시나제 단백질의 합성도 감소시켰다. 또한, 임상시험을 통하여 가래나무 추출물을 함유한 화장품이 대조 제품에 비해 통계적으로 유의한 피부 미백 효과가 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 가래나무 추출물은 색소침착 방지와 개선에 효과있는 새로운 미백 원료로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

접수 : 2009년 10월 22일, 게재승인 : 2009년 11월 16일

## REFERENCES

- Bai, W. N., Y. F. Zeng, and D. Y. Zhang (2007) Mating patterns and pollen dispersal in a heterodichogamous tree, *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *New Phytologist* 176: 699-707.
- Min, B. S., H. K. Lee, S. M. Lee, Y. H. Kim, K. H. Bae, T. Otake, N. Nakamura, and M. Hattori (2002) Anti-human immunodeficiency virus-type 1 activity of constituents from *Juglans mandshurica*. *Arch. Pharm. Res.* 25: 441-445.
- Joe, Y. K., J. K. Son, S. H. Park, I. J. Lee, and D. C. Moon (1996) New naphthalenyl glucosides from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* 59: 159-160.
- Kim, S. H., K. S. Lee, J. K. Son, G. H. Je, J. S. Lee, C. H. Lee, and C. J. Cheong (1998) Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* 61: 643-645.
- Son, J. K. (1995) Isolation and structure determination of a new tetralone glucoside from the roots of *Juglans mandshurica*. *Arch. Pharm. Res.* 18: 203-205.
- Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Sym. Proc.* 4: 24-28.
- Hill, H. Z., W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell (1997) Melanin: A two edged sword? *Pigment Cell Res.* 10: 158-161.
- Kubo, M and H. Matsuda (1995) Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* 8: 48-55.
- Hori, I., K. Nihei, and I. Kubo (2004) Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother. Res.* 18: 475-479.
- Canabaz, J., S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 982-985.
- Ikeda, T. and T. Tsutsumi (1990) Function and skin depigment activity of crude drugs. *Fragrance J.* 18: 59-66.
- Elsner, P. and H. I. Maibach (2000) *Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics*. pp. 123-145. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Jang, D. I., B. G. Lee, C. O. Jeon, N. S. Jo, J. H. Park, S. Y. Cho, H. Lee, and J. S. Koh (1997) Melanogenesis inhibitor from paper mulberry. *Cosme. & Toilet.* 112: 59-62.
- Lee, S. H., J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim, and S. R. Chung (1997) The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity for the natural product. *Yakhak Haeji* 41: 456-461.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.

16. Furuno, K., T. Akasako, and N. Sugihara (2002) The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 19-23.
17. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
18. Martinez-Esparza, M., C. Jimenez-Cervantes, F. Solano, J. A. Lozano, and J. C. Garcia-Borron (1998) Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255: 139-146.
19. Fuller, B. B., D. S. Iman, and J. B. Lunsford (1988) Comparison of tyrosinase levels in amelanotic and melanotic melanoma cell cultures by a competitive enzyme-linked immunoadsorbent assay and by immunotitration analysis. *J. Cell. Physiol.* 134: 149-154.
20. Kuppusamy, P. and J. L. Zweier (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 264: 9880-9884.
21. Hatano, T. (1995) Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* 49: 357-363.
22. Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai (1995) Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 162-166.
23. Englaro, W., R. Rezzonico, M. Durand-Clement, D. Lallemand, J. P. Ortonne, and R. Ballotti (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 270: 24315-24320.