pISSN 1226-2587
J. Soc. Cosmet. Sci. Korea eISSN 2288-9507
Vol. 43, No. 1, March 2017, 43-52 http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2017.43.1.43

화장품 소재로서 후박 에틸아세테이트 분획물의 미백활성에 관한 효과

강 희 철 · 주 광 식 · 주 세 진* · 하 영 애* · 김 학 수* · 차 미 연†

(주)지에프씨 생명과학연구원, *(주)서울화장품

(2017년 1월 24일 접수, 2017년 3월 13일 수정, 2017년 3월 30일 채택)

A Study of the Whitening Activities of *Magnolia obovata* Bark Ethyl Acetate Fractions as Cosmetic Ingredient

Hee Cheol Kang, Kwang Sik Joo, Se Jin Joo*, Young Ae Ha*, Hack Soo Kim*, and Mi Yeon Cha†

Life Science Research Institute, GFC Co. Ltd., 1005 Yeongdeok-dong, Giheung-gu, Yongin, Gyeonggi-do 16954, Korea
*R&D 2 Dept. Skin Care Team, Seoul Cosmetics Co, Ltd., Incheon 21694, Korea

(Received January 24, 2017; Revised March 13, 2017; Accepted March 30, 2017)

요 약: 천연물인 후박(*Magnolia obovata* Bark, *M. obovata* Bark)을 에탄올 추출 및 농축하여 에틸아세테이트층으로 분획한 분획물이 피부에 안전하고 효과적인 미백 활성을 확인함으로써 미백 화장품 원료 소재로서 가능성을 확인하였다. 후박의 에탄올 농축물을 에틸아세테이트 분획하여 유효물질 honokiol을 HPLC로 정량하였다. 후박 에틸아세테이트 분획물에 대한 *in vitro* 미백활성 결과, 농도 의존적으로 세포 외 멜라닌 분비를 감소시켜 IC_{50} = 11.05 μg/mL임을 확인하였다. 또한 세포에 독성을 가지지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 60%의 멜라닌 분비 억제로 세포 외로 분비되는 멜라닌의 양을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 또한 α-MSH (50 nM) 처리한 그룹과 비교하여 IC_{50} = 10.85 μg/mL로 우수한 세포 내 멜라닌 생성억제 효과를 보였으며 세포에 자극이 되지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 59%의 멜라닌 생성 억제를 확인하여 세포 외 멜라닌 분비 뿐만 아니라 세포 내에 존재하는 멜라닌의 양 또한 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용된 α-arbutin의 경우, IC_{50} = 59.99 μg/mL로 후박 에틸아세테이트 분획물이 양성대조군 α-arbutin과 비교하여 우수한 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과를 가짐을 확인하였다. 임상연구의 경우, 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 크림은 (주)대한피부과학연구소(KDRI) 윤리위원회의 IRB 승인(KDRI-IRB-1536) 후 반복 첩포를 통한 인체 누적첩포시험을 진행하여 무감작 물질로 확인하였다. 또한 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 크림은 대조군 대비 국소적 미백효과와 신뢰성 있는 피부 안전성을 보여주었다. 최종적으로 후박 에틸아세테이트 분획물이 안전하고 효과적인 미백효과를 가지는 화장품 소재로 충분한 이용 가능성이 있음을 확인하였다.

Abstract: EtOAc fractions of *Magnolia obovata* (*M. obovata*) Bark extracts were studied for the potential ingredient as a safe and effective whitening cosmetic material. The concentration of active substances honokiol was determined by HPLC. *In vitro*, the fractions reduced the extracellular and intracellular melanin contents in B16F10 cells in dose dependently and inhibited extracellular melanin secretion (IC_{50} = 11.05 μg/mL). The 12.5 μg/mL treatment of maximum concentration effectively inhibited up to about 60% to the amount of extracullular melanin. Also, the 12.5 μg/mL treatment of maximum concentration effectively inhibited up to about 59% to the amount of intracullular melanin (IC_{50} = 10.85 μg/mL). The IC_{50} value of α-arbutin used as a positive control was 59.99 μg/mL. So, EtOAc fractions of *M. obovata* Bark extracts showed whitening effect when compared with the non-treatment group. In case of *in vivo* study, Cosmetic cream with EtOAc fractions of *M. obovata* Bark extracts was approved by Ethics committee of KDRI

† 주 저자 (e-mail: my.cha@gfcos.co.kr)
call: 070)4251-9311

(IRB number: KDRI-IRB-1537). As a result in progress for skin sensitization as well as assessment of skin irritation through repeated patch test, skin allergens was identified as non sensitizing agents. Also, cosmetic cream with EtOAc fractions of *M. obovata* Bark extracts showed significant topical whitening effect and reliable skin safety when compared with the non-treatment group. In conclusion, EtOAc fractions of *M. obovata* Bark extracts may be a useful cosmetic ingredient for effective skin whitening.

Keywords: *whitening, Magnolia obovata bark, cosmetic agents, skin safety*

1. 서 론

멜라닌은 자색에서 검은색을 띄는 eumelanin과 황색에서 적색을 띄는 pheomelanin 두 종류가 있으며, 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에 의해 생산되고 주변 keratinocyte로 전이되어 피부색을 나타낸다[1-3]. 멜라닌 자극 호르몬(melanocyte stimulating hormones, α-MSH)이 멜라닌 자극 호르몬 수용체(melanocortin-1 receptor, MC1-R)와 결합하여[4] adenylyl cyclase를 활성화 시키게 되고, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준이 증가하게 되면 cAMP-dependent kinase (PKA)가 cAMP response element binding protein (CREB)을 인산화 시켜 melanocyte 특이적인 microphthalmia associated transcription factor (MITF) promoter를 활성화 시킨다[5-8]. 멜라닌 생성에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase와 tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)의 발현에 관여하는 전사인자 MITF는 이들 유전자를 과발현 시켜 멜라닌을 합성시킨다[9-11]. 자외선이나 염증 등의 외부 자극에 의해서도 멜라닌 생성이 촉진되므로 이러한 자극을 줄이거나, 자극이 melanocyte로 전달되는 신호를 차단하거나[12-15], 멜라닌 색소 생성 효소인 tyrosinase의 합성을 저해하는 방법 등이 있을 수 있다[16,17].

화장품 미백제로 가장 많이 사용되는 성분 중 하나인 알부틴(arbutin)은 가장 대표적인 tyrosinase 활성 억제제이다. 알부틴은 melanosome 내의 tyrosinase와 5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid (DHICA) polymerase의 활성을 저해한다. 또한 tyrosinase의 기질인 tyrosine과의 구조적인 유사성으로 효소에 대한 경쟁적 저해제로서 작용한다[18,19]. 알부틴과 마찬가지로 쿠마릭산(coumaric acid)은 알부틴과 유사한 경쟁적인 저해제로 억제 효과를 나타내며, 코직산(kojic acid)은 알부틴과는 다른 방식으로 tyrosinase의 활성을 저해한다[20,21]. 이처럼 화장품 산업에서는 미백 기능성이 확인된 물질이 광범위하게 사용되고 있으며 천연소재에서 멜라닌 합성 및 분비를 억제하는 새로운 소재발견 및 연구가 활발히 이루어지고 있다.

후박은 쌍떡잎식물 목련목으로 열매는 타원형으로 가을에 홍자색으로 익는다. 후박은 honokiol, magnolol 등과 같은 유효성분들이 함유되어 있으며 후박 나무껍질에 대한 항염, 피부암 증식 억제능, 항진균 활성 등 다양한 효과가 보고되고 있다[22-25]. 본 연구에서는 천연물인 후박 추출물로부터 B16F10 세포를 이용하여 멜라닌 생성 저해 효과와 임상시험을 통한 안전성 및 피부 미백 효능에 대한 유의성을 확인하여 후박의 미백 화장품 소재로서 이용 가능성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

실험에 사용된 후박은 경북 경산의 초원한방플러스에서 구입한 것으로 에탄올(4019-4400, Daejungchem, Korea)추출 후 농축과 분획하여 실험에 사용하였다. HPLC 기기는 agilent 1260 HPLC system을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 그리고 trypsin-EDTA Hyclone (USA)에서 구매하였고, DPBS는 웰진(Korea)에서 구매하였다. 표준물질인 호노키올(honokiol, ≥ 98%, H4914)은 Sigma (USA)에서 구매하였다.

2.2. 추출 및 분획

후박 8.35 kg을 18 L의 90% 에탄올 수용액을 가하여 24 h 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 Whatman filter paper (No 2.)로 여과하고, 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하여 모두 합치고, 50 ℃에서 rotary vacuum evaporator (N-3010S, Eyela, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 에탄올 추출

물을 얻었다. 얻어진 에탄올 추출물을 헥산과 물로 분배 추출하였고, 물층을 에틸아세테이트로 분배 추출하였다. 다시 물층을 부탄올로 분배하여 얻었으며, 각 층을 감압 농축하여, 헥산 분획(135 g, MH), 에틸아세테이트 분획(38 g, ME), 부탄올 분획(26 g, MB) 및 물 분획을 얻었다.

2.3. HPLC 분석

후박 에틸아세테이트 분획물을 0.22 μm membrane filter로 여과한 액을 검액으로 한다. HPLC분석 column은 C18 (250 × 4.6 mm, ID 5 μm)을, sample 주입양은 20 μL, 이동상은 acetonitrile : 0.1% phosphoric acid 혼합액(55 : 45) 조건을 이용하였고 유속은 1.2 mL/min, UV detector로 288 nm에서 측정하였다.

2.4. 세포 배양

Murine 유래 흑색종 세포, B16F10 melanoma cell은 한국 세포주 은행(Korea cell line bank)에서 구입하였으며, 이 세포를 5% CO_2, 37 ℃ 조건에서 10% FBS, penicilliin-streptomycin (100 units/mL)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위해 주 3회 계대 배양을 실시하였다.

2.5. 세포 독성 측정

후박 에틸아세테이트 분획물의 세포독성은, 살아있는 세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소가 tetrazolium salt에서 생성되는 formazan이라는 발색물질을 측정하여 살아있는 세포의 수로 확인하였다. B16F10 melanoma 세포를 96-well plate에 4.0 × 10^3 cells의 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하고 시료를 농도별로 0.391 μg/mL에서 25 μg/mL까지 처리하였다. 다시 48 h 동안 배양하였다. 그 뒤 배양액을 제거한 후 10% EZ-Cytox (Daeil lab service, Korea)를 처리하여 37 ℃에서 2 h 반응 후 450 nm에서 각 well의 흡광도를 microplate spectrophotometer (Biotek, USA)를 이용하여 cell viability를 측정하였다. 세포독성 효과는 시료를 처리하지 않은 대조군 세포와 비교하여 결정하였다.

Cell viability (%) = (absorbance at 450 nm with test sample/ absorbance at 450 nm without test sample) × 100

2.6. 세포내・외 멜라닌 생성저해능(Melanin Contents) 측정

B16F10 melanoma 세포에서 α-MSH에 의해 과발현된 멜라닌의 저해 활성을 확인하기 위하여 세포 내・외 멜라닌을 측정하였다. B16F10 melanoma 세포를 60 mm cell dish에 2.0 × 10^5 cells 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 이후 α-MSH 50 nM와 시료 0.391 μg/mL에서 25 μg/mL까지 처리 후 48 h 배양하였다. 양성 대조군으로는 알부틴을 사용하였다.

세포 외 멜라닌 측정은 배양이 완료된 세포의 배양액을 96-well culture plate에 옮겨 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 내 멜라닌은 PBS로 washing한 cell pellet을 40 ℃에서 건조 후 1 N NaOH를 처리하여 lysis하여 상층액을 450 nm에서 microplate spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Lysis는 80 ℃ 30 min 동안 중탕하여 17,000 rpm 30 min 고속원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다.

Melanin inhibition (%) = (A/B) × 100
A = Absorbance at 450 nm with test sample
B = Absorbance at 450 nm with α-MSH

2.7. 화장품 제형에서의 누적첩포시험

후박 에틸아세테이트 분획추출물을 이용한 화장품 제형에서 피부에 따른 부작용이 관찰되는지 확인하기 위해 누적첩포 평가를 실시하였다. 선정기준에 부합한 피험자 44명을 선정하여 진행하였으며 피험자의 일측 상환부 총 9회에 격일로 24 h 반복적 첩포를 통한 유도기(induction phase)의 피부 자극성평가 뿐 아니라 야기기(challenge phase)의 피부 감작성을 평가할 수 있게 양측 상완부 1회 24 h 첩포하였다. 본 임상시험은 (주)대한피부과학연구소(Korea dermatology research institute, KDRI)에 의뢰하여 진행하였으며 임상시험심사위원회(institutional review board, IRB) 승인(KDRI-IRB-1536) 후 임상기관 실험 규정 및 임상시험 실시 기준(good clinical practice)에 따라 실시되었다. 시험에 대한 결과는 미국화장품협회(personal care products council, PCPC)의 기준에 의거해 유도기를 평가하였고, 국제접촉피부염학회(international contact dermatitis research group, ICDRG) 기준에 의거해 야기기를 평가하였다. 미국화장품협회의 유도기 피부반응 육안평가 판정기준과 국제접촉피부염학회(ICDRG)의 야기기 피부 감

Table 1. Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT) Scoring Scale by Evaluation Guide Line (The Induction Phase) of PCPC

Grade	Indication standard
0	No visible erythema
1	Mild erythema (faint pink to definite pink)
2	Moderate erythema (definite redness)
3	Severe erythema (very intense redness)

: -Erythema scale

Table 2. Evaluation Guide Line (The Challenge Phase) of ICDRG

Symbol	Indication standard
-	No visible erythema
±	Mild erythema (faint pink to definite pink)
+	Moderate erythema (definite redness)
++	Severe erythema (very intense redness)
+++	Severe erythema (very intense redness)

: If the (++) grade skin reaction that lasts more than 24 h in both sides test site, it is determined that there is a sensitizer.

작성 유무 평가는 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

2.8. 화장품 제형에서의 피부 미백효능시험

후박 에틸아세테이트 분획 추출물이 10% 적용된 화장품 제형에서 피부 미백 효과가 확인되는지 KDRI에 의뢰하여 임상시험심사위원회 승인(KDRI-IRB-1537) 후 임상시험을 실시하였다. 화장품의 미백 효과 평가 방법 중 인공책소 침착 후 미백 효능을 평가하는 efficacy evaluation on induced pigmentation을 진행하여 원하는 정도의 색소침착을 인공적으로 유도하여 미백 효능을 평가하였다. 과색소 침착 조건은 자외선 인공 조사기(multiport solar simulator, Solar Light, USA)를 이용하여 피험자의 안쪽 상완부에 0.8 cm × 0.8 cm 크기의 정사각형의 면적을 갖는 6개의 조사부위를 구획하여 조사하였으며, 특수 필터를 사용하여 인체에 특히 유해한 290 nm 이하의 자외선 영역의 파장은 제거하였다. 선정기준에 부합한 피험자 23명을 선정하여 첫 번째 자외선 조사 후 최소홍반량(minimal erythema dose, MED)을 측정하여 개인의 MED와 피험자의 자외선 조사부위 상태에 따라 0.7-1 MED에 해당하는 광량을 두 차례 조사 하여 총 누적광량이 2-3 MED가 되도록 과색소침착을 진행하였다. 멜라닌 값이 유사한 시험부위에 시험군과 대조군을 도포하여 도포 전과 도포 2주, 4주, 8주 후 mexameter 기기평가와 피부과 전문의에 의한 육안 및 안전성 평가, 그리고 피험자 설문 평가를 통해 평가하였다. 기기평가는 평가의 신뢰성을 높이기 위해 각 부위당 총 5회 반복하여 측정하였고 대조군과 시험군의 육안적 평가 값과 기기평가 값(M-value)의 변화차이는 R (version 3.1.0, 2014 the R foundation for statistical computing) 프로그램의 Mann-Whitney 검정을 이용하여 분석 검정하여 통계적 유의성을 확보하였다. 본 효능시험 시 후박 추출물을 제외한 나머지 조성은 같은 대조군을 동시 진행하여 평가하였다.

2.9. 통계처리 및 분석방법

모든 실험은 삼반복 실험을 통해 결과 값을 도출하였으며 ANOVA 검정을 하였으며. 대조군과 실험군 간의 결과는 mean ± S.D.로 나타냈으며 Student's *t*-test로 통계처리의 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC에 의한 지표물질 Honokiol 정량

후박 에틸아세테이트 분획물 내 유효물질 honokiol을 HPLC를 이용하여 정량하였다. Honokiol은 후박에 유효성분으로 함유되어 있으며 항염, 항진균 활성 등이 보고되어져 있다[22-25]. 후박 에틸아세테이트 분획

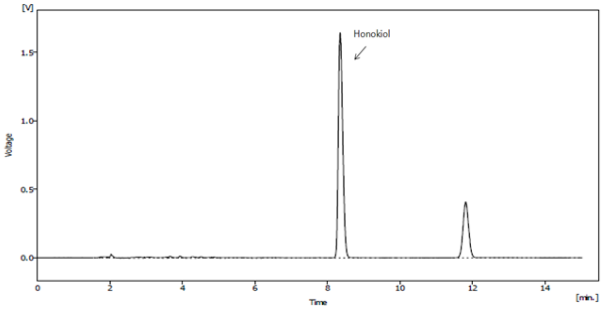

Figure 1. HPLC assay of honokiol by *M. obovata* Bark EtOAc fractions.

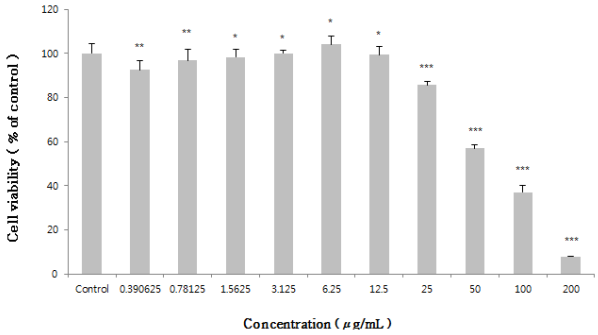

Figure 2. Cytotoxicity of *M. obovata* Bark EtOAc fractions to B16F10 melanoma cells. Cell viability was examined by WST-1 assay. Cells were treated with various concentrations (0.391-200 μg/mL) of *M. obovata* Bark EtOAc fractions. Each value represents the mean ± S.D. (N = 5). $^{*}p < 0.5$, $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.005$ as compared to the untreated group (blank).

물의 효능지표로써 주성분인 honokiol을 확인하였으며, 우수한 미백 효능으로 확인된[26] honokiol이 후박 에틸아세테이트 내 지표성분으로 0.51 mg/mL로 정량됨을 확인하였다(Figure 1).

3.2. 세포독성(WST-1 Assay)

B16F10 melanoma 세포에 대한 후박 에틸아세테이트 분획물의 세포독성 효과를 WST-1 assay로 측정하였다. 후박 에틸아세테이트 분획물 0.391-200 μg/mL의 다양한 농도로 세포에 처리하여 WST-1 assay로 세포독성을 측정한 결과, 25 μg/mL 이하 농도에서 독성을 보이지 않음을 확인하였다(Figure 2). 세포에 영향을 주지 않는 수준의 시료농도로 이후 실험을 진행하여 후박 에틸아세테이트 분획물의 미백효과가 세포생존율 감소에 관계없이 후박 에틸아세테이트 분획물 본연의 효과임을 확인하였다.

3.3. 세포 외 멜라닌 함량(Melanin Contents) 측정

Melanoma cell에 대한 후박 에틸아세테이트 분획물의 세포 외 멜라닌 양을 α-MSH을 처리하여 측정하였다. 후박 에틸아세테이트 분획물을 세포독성을 보이지 않는 농도로 세포에 처리하여 48 h 배양 후 세포 외로 분비되는 멜라닌의 양을 확인해본 결과, 농도 의존적으로 멜라닌 분비가 감소함을 확인할 수 있었으며 IC_{50} 값이 11.05 μg/mL로 우수한 세포 외 멜라닌 분비억제 효과를 보였다. 세포에 자극이 되지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 60%의 멜라닌 분비 억제로 후박 에틸아세테이트 분획물이 세포 외로 분비되는 멜라닌의 양을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 3A). 양성 대조군으로 사용된 α-arbutin의 경우, 농도에 비례하여 세포 외 멜라닌 분비를 감소시킴을 확인하였으며 IC_{50} 값이 26.22 μg/mL으로 확인하였다. 결과적으로 후박 에틸아세테이트 분획물이 양성대조군 α-arbutin과 비교하였을 때 더 우수한 세포 외 멜라닌 분비억제 효과를 가짐을 확인하였다(Figure 3B).

3.4. 세포 내 멜라닌 함량(Melanin Contents) 측정

Melanoma cell에 대한 후박 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 멜라닌 양을 α-MSH를 처리하여 측정하였다. 후박 에틸아세테이트 분획물을 세포독성을 보이지 않는 농도로 세포에 처리하여 48 h 배양 후 세포 내에 존재하는 멜라닌의 양을 확인해본 결과, 농도 의존적으로 세포 내 멜라닌이 감소함을 확인할 수 있었으며 IC_{50} 값이 10.85 μg/mL로 우수한 세포 내 멜라닌 생성억제 효과를 보였다. 세포에 자극이 되지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 59%의 멜라닌 생성억제로 후박 에틸아세테이트 분획물이 세포 내에 존재하는 멜라닌의 양을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 4A). 양성대조군으로 사용된 α-arbutin의 경우, 농도에 비례하여 세포내 멜라닌 양이 감소됨을 확인하였으며 IC_{50} 값이 59.99 μg/mL로 후박 에틸아세테이트 분획물이 양성대조군 α-arbutin과 비교하였을 때 우수한 세포내 멜라닌 감소 효과를 가짐을 확인하였다(Figure 4B).

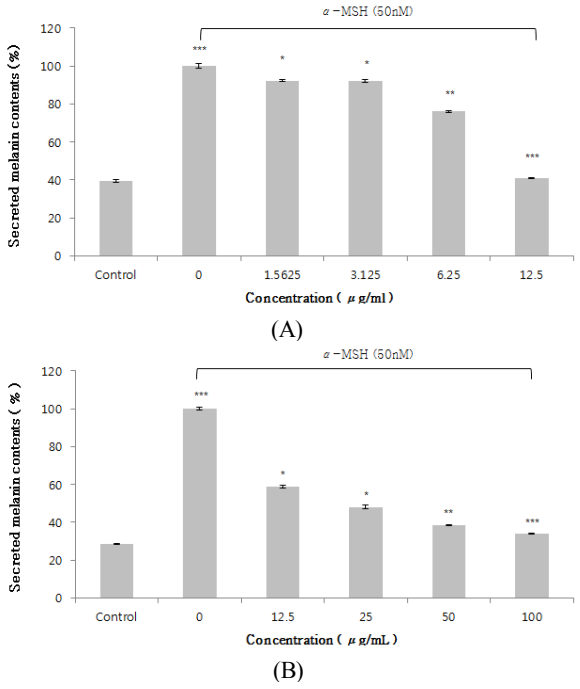

Figure 3. Effect of *M. obovata* Bark EtOAc fractions on secreted melanin content in B16F10 melanoma cells. (A) Melanoma cells were stimulated with 50 nM of α-MSH for 48 h in presence of *M. obovata* Bark EtOAc fractions. (B) Melanoma cells were stimulated with 50 nM of α-MSH for 48 h in presence of α-arbutin (positive control). Secreted melanin content was determined by measuring absorbance at 450 nm. Each value represents the mean ± S.D. (N = 5). $^{*}p$ < 0.1, $^{**}p$ < 0.01, $^{***}p$ < 0.001 as compared to the untreated group (blank).

3.5. 화장품 제형에서의 누적첩포시험

후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형에서 피부에 따른 부작용이 관찰되는지 확인하기 위해 피부에 대한 누적첩포 시험을 KDRI에 의뢰하여 IRB 승인(KDRI-IRB-1536) 후 실시하였다. PCPC 판정 기준에 의거하여 유도기의 육안평가 결과, 9번에 걸친 24 h 패치 적용 후 피험자 44명 모두에게서 피부자극 증상이 관찰되지 않았으며, ICDRG 평가 기준에 의거한 야기기의 피부 감작성 유무 결과 또한 양측 상완 24 h 패치 적용 후 30 min, 24 h, 72 h에 피험자 44명 모두 ++ 이상의 grade의 피부 반응이 관찰되지 않았다. 이 결과를 통해 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형이 피부 알러지 유발 측면에서 무감작성 물질임을 검증하였다.

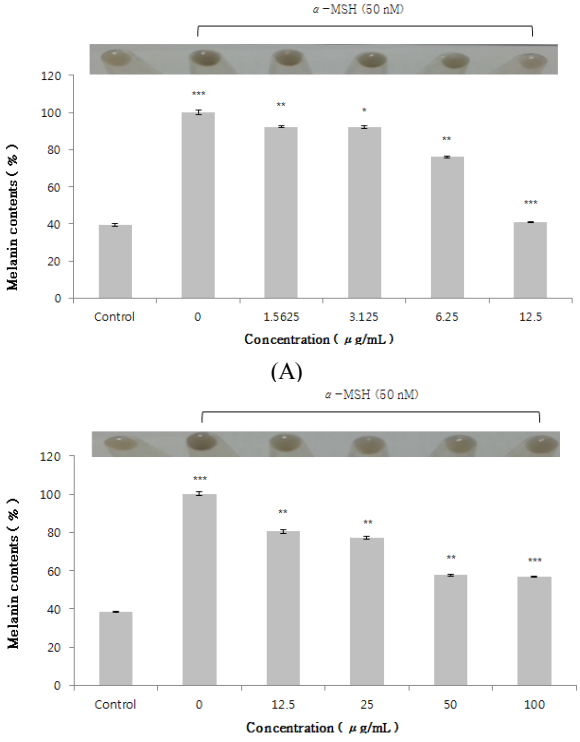

Figure 4. Effect of *M. obovata* Bark EtOAc fractions on intracellular melanin content in B16F10 melanoma cells. (A) Melanoma cells were stimulated with 50 nM of α-MSH for 48 h in presence of *M. obovata* Bark EtOAc fractions. (B) Melanoma cells were stimulated with 50 nM of α-MSH for 48 h in presence of α-arbutin (positive control). Intracellular melanin content was determined by measuring absorbance at 450 nm. Each value represents the mean ± S.D. (N = 5). $^{*}p$ < 0.1, $^{**}p$ < 0.01, $^{***}p$ < 0.001 as compared to the untreated group (blank).

3.6. 화장품 제형에서의 피부 미백 효능평가

후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형을 피부에 적용 시 자외선으로 인위적으로 유도된 멜라닌에 미백 효과가 보이는지 KDRI에 의뢰하여 IRB 승인(KDRI-IRB-1537) 후 실시하였다. 전문가 육안평가 결과, 측정 시간별로 수치가 감소하지만 통계적으로 유의한 차이를 보이진 않았으며(not shown), 반면 mexameter의 M-value를 이용한 기기측정 수치 변화는 평가의 신뢰성을 높이기 위해 부위당 총 5회 반복 측정을 실시하여 통계적으로 유의한 결과를 보였다 (Table 4). 평가결과, 시험부위와 대조부위 모두 8주간의 시험기간 동안 M-value가 감소하는 양상을 보였으

Table 3. Melanin Pigment Change using Mexameter (Control vs Test). Melanin Pigment Decrease by Mexameter Measurement Index (Control vs Test)

	0 Week	2 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
Control (blue)	-	-1.00	-0.13	2.84
Test (red)	-	0.55	3.46^{***}	9.75^{***}
p-value	-	0.097	< 0.001	< 0.001

$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$

Table 4. Result of Statistics the Melanin Pigment Decrease (Mann-Whitney Test)

Melanin contents (Weeks)		Average	Total	Statistics	
2 Weeks	Test	26.8	616.5	U-value	188.5
				Z-value	-1.6587
	Control	20.2	464.5	***P*-value**	**0.097**
4 Weeks	Test	30.89	710.5	U-value	94.5
				Z-value	-3.7238
	Control	16.11	370.5	***P*-value**	**< 0.001**
8 Weeks	Test	32.91	757	U-value	48
				Z-value	-4.7453
	Control	14.09	324	***P*-value**	**< 0.001**

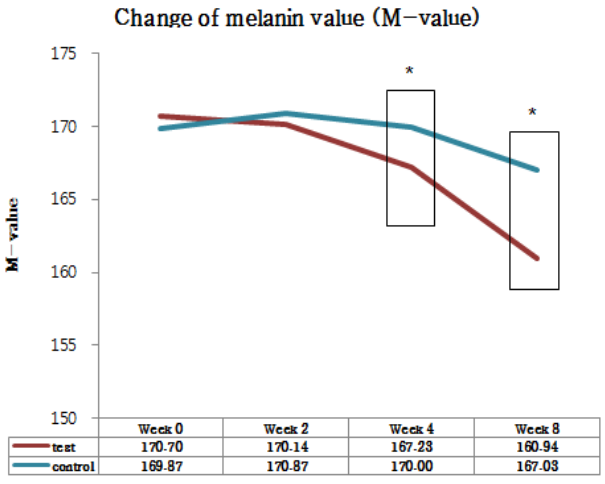

Figure 5. Melanin pigment change using mexameter (control vs test). Change of mexameter measurement index between control and test. $^{*}p < 0.1$ as compared to the untreated group. The experiment number of KDRI is KDRI-B-150424-0524.

나 그 감소치의 크기는 시험부위에서 더 큰 것으로 나타났다. 이는 사용 4주차 이후부터 통계적으로 유의한 수준의 차이로 멜라닌 색소를 감소시킴을 확인하였다 (Figure 6). 이로서 mexameter 기기를 이용한 멜라닌 색소 감소 정도는 시험기간에 비례하여 증가하였고 4주차부터 유의성을 확인하여 4주 이상 꾸준한 사용으로 멜라닌 색소 감소 효과를 보일 수 있을 것으로 판단된다. 참여한 피험자에 대한 미백효과는 실험종료 후 피험자를 상대로 실시한 설문 평가에서 조금 호전되었다고 판단한 피험자가 8명, 매우 호전되었다고 판단한 피험자 6명으로 확인되었다. 또한 시험기간 동안 홍반, 부종, 가려움, 자통, 작열감 등 피부 이상증은 피험자 모두에게 발생하지 않아, 최종적으로 후박 에틸아세테이트 분획 추출물이 함유된 화장품 제형은 안전하고 통계적으로 유의한 미백효과를 가짐을 확인하였다.

4. 결 론

이상의 실험을 통하여 천연소재인 후박을 에탄올 추출 및 농축하여 인체에 안전하고 효과적인 미백 화장품 원료 소재로서 가능성을 확인하였다. 후박을 에탄올로 추출 및 농축하여 에틸아세테이트 분획물 내 유

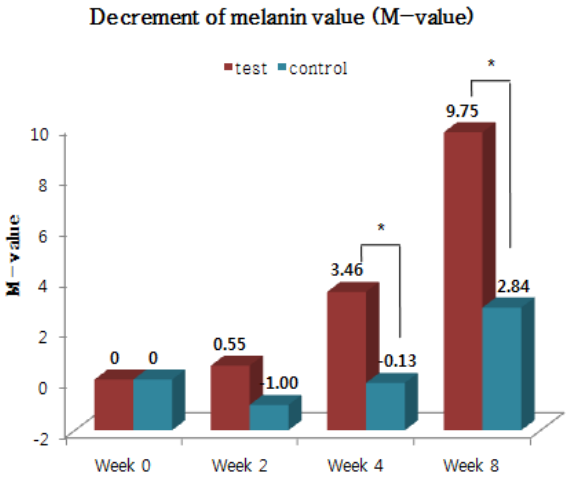

Figure 6. Melanin pigment decrease by mexameter and significance of results. The reports blue is control and red is test. The report is determined by KDRI. The experiment number of KDRI is KDRI-B-150424-0524.

효물질인 honokiol을 HPLC로 정량하였고, 후박 에틸아세테이트 분획물에 대한 *in vitro* 미백활성을 확인하였다. 후박 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 세포 외 멜라닌 분리를 감소시켜 멜라닌 50% 저해하는 IC_{50} 값이 11.05 μg/mL로 세포에 독성을 가지지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 60%의 세포 외로 분비되는 멜라닌의 양을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 세포 내 멜라닌 생성억제능 또한 α-MSH (50 nM)처리한 그룹과 비교하여 IC_{50} 값이 10.85 μg/mL를 보여 우수한 세포 내 멜라닌 생성억제 효과를 확인하였다. 세포에 자극이 되지 않는 최대농도인 12.5 μg/mL 처리 시 최대 약 59%의 세포 내 멜라닌 생성억제로 세포 외로 분비되는 멜라닌뿐만 아니라 세포 내에 존재하는 멜라닌의 양 또한 효과적으로 억제함을 확인하였다. 양성대조군으로 사용된 α-arbutin의 경우, IC_{50} 값이 59.99 μg/mL로 후박 추출물이 양성대조군 α-arbutin과 비교하여 우수한 세포 내 멜라닌 감소 효과를 가짐을 확인하였다. 세포독성을 가지지 않는 농도범위 내에서 위와 같은 효과를 보여, 후박 에틸아세테이트 분획물의 미백효과가 세포생존율 감소에 관여하지 않고 후박 에틸아세테이트 분획물 본연의 효과임을 확인하였다.

또한 IRB 승인 후 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형에서의 인체 누적첩포시험을 진행하여 반복첩포를 통한 유도기(induction phase)의 피부 자극성 뿐 아니라 야기기(challenge phase)에 있어서의 피부 감작성 평가를 하였다. PCPC 판정 기준에 따른 유도기의 육안평가 결과, 피험자 44명 모두에게서 자극증상이 관찰되지 않았으며, ICDRG 기준에 의거한 야기기의 피부 감작성 유무 판정 결과, ++ grade 이상의 피부 반응 뿐 아니라 낮은 피부 반응 또한 관찰되지 않아 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형이 피부 알러지 유발측면에서 무감작 물질임을 검증하였다.

후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형에서 피부 안전성과 무감작 물질임을 확인 후 후박 에틸아세테이트 분획물의 피부 미백 효능 시험을 8주간 23명의 피험자들을 대상으로 실시하였다. 그 결과, 시험부위와 대조부위 모두 8주간의 시험기간 동안 색소침착의 정도가 감소하는 양상을 보였으나 육안평가로서 통계적 유의성을 없었다. 하지만 mexameter의 M-value 이용한 기기평가에서 시험 4주차부터 통계적으로 유의한 수준의 효과를 확인하였다. 또한 시험기간 중 피험자들에게 특별한 이상 반응이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로, 후박 에틸아세테이트 분획물을 적용한 화장품 제형이 안전하고 효과적인 미백 기능을 가짐을 검증하였으며 화장품 소재로서 이용 가능성을 확인하였다.

Reference

1. A. J. Thody, E. M. Higgins, K. Wakamatsu, S. Ito, S. A. Burchill, and J. M. Marks, Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **97**(2), 340 (1991).
2. A. Hennessy, C. Oh, B. Diffey, K. Wakamatsu, S. Ito, and J. Rees, Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation, *Pigment Cell Res.*, **18**(3), 220 (2005).
3. T. H. Nasti and L. Timares, MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer, *Photochem. Photobiol.*, **91**(1), 188 (2015).
4. F. Rouzaud, A. L. Kadekaro, Z. A. Abdel-malek, and V. J. Hearing, MC1R and the response of melano-

cytes to ultraviolet radiation, *Mutat. Res.,* **571**(1-2), 133 (2005).
5. R. A. Newton, S. E. Smit, C. C. Barnes, J. Pedley, P. G. Parsons, and R. A. Sturm, Activation of the cAMP pathway by variant human MC1R alleles expressed in HEK and in melanoma cells, *Peptides.,* **26**(10), 1818 (2005).
6. R. A. Newton, D. W. Roberts, J. H. Leonard, and R. A. Sturm, Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways, *Peptides.,* **28**(12), 2387 (2007).
7. R. A. Sturm, D. L. Duffy, N. F. Box, R. A. Newton, A. G. Shepherd, W. Chen, L. H. Marks, J. H. Leonard, and N. G. Martin, Genetic association and cellular function of MC1R variant alleles in human pigmentation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **994**(1), 348 (2003).
8. D. Jian, D. Jiang, J. Su, W. Chen, X. Hu, Y. Kuang, H. Xie, J. Li, and X. Chen, Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells, *Steroids.,* **76**(12), 1297 (2011).
9. S. S. Kim, M. J. Kim, Y. H. Choi, B. K. Kim, K. S. Kim, K. J. Park, S. M. Park, N. H. Lee, and C. G. Hyun, Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16F10 melanoma, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.,* **3**(8), 617 (2013).
10. W. J. Yoon, M. J. Kim, J. Y. Moon, H. J. Kang, G. Kim, N. H. Lee, and C. G. Hyun, Effect of palmitoleic acid on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma, *J. Oleo. Sci.,* **59**(6), 315 (2010).
11. M. Otręba, J. Rok, E. Buszman, and D. Wrześniok, Regulation of melanogenesis: the role of cAMP and MITF, *Postepy. Hig. Med. Dosw.,* **30**(66), 33 (2012).
12. E. Jung, J. A. Lee, S. Shin, K. B. Roh, J. H. Kim, and D. Park, Madecassoside inhibits melanin synthesis by blocking ultraviolet-induced inflammation, *Molecules.,* **18**(12), 15724 (2013).
13. J. W. Haycock, M. Wagner, R. Morandini, G. Ghanem, I. G. Rennie, and S. M. Neil, α-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-κB activation in human melanocytes and melanoma cells, *J. Invest. Dermatol.,* **113**(4), 560 (1999).
14. A. Soumyanath, R. Venkatasamy, M. Joshi, L. Faas, B. Adejuyigbe, A. F. Drake, R. C. Hider, A. R. Young. A. Soumyanath, R. Venkatasamy, M. Joshi, L. Faas, B. Adejuyigbe, A. F. Drake, R. C. Hider, and A. R. Young, UV Irradiation affects melanocyte stimulatory activity and protein binding of piperine, *Photochem. Photobiol*., **82**(6), 1541 (2006).
15. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol*., **84**(3), 539 (2008).
16. R. Uchida, S. Ishikawa, and H. Tomoda, Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol, *Acta. Pharm. Sin. B.,* **4**(2), 141 (2014).
17. M. R. Loizzo, R. Tundis, and F. Menichini, Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as anti browning agents: an update, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.,* **11**(4), 378 (2012).
18. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **276**(2), 765 (1996).
19. Y. H. Jin, S. J. Lee, M. H. Chung, J. H. Park, Y. I. Park, T. H. Cho, and S. K. Lee, Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism, *Arc. Pharm. Res.*, **22**(3), 232 (1999).
20. J. Y. Lim, K. Ishiguro, and I. Kubo, Tyrosinase inhibitory *p*-coumaric acid from ginseng leaves, *Phytother. Res*., **13**(5), 371 (1999).
21. S. M. An, J. S. Koh, and Y. C. Boo, *p*-Coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity *in vitro* but also melanogenesis in cells exposed to UVB, *Phytother. Res.,* **24**(8), 1175 (2010).
22. J. L. Shen, K. M. Man, P. H. Huang, W. C. Chen, D. C. Chen, Y. W. Cheng, P. L. Liu, M. C. Chou, and Y. H. Chen, Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders, *Molecules*., **15**(9), 6452 (2010).

23. J. Lee, E. Jung, J. Park, K. Jung, S. Lee, S. Hong, J. Park, E. Park, J. Kim, S. Park, and D. Park, Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in NF-κB activation signaling, *Planta. Med*., **71**(4), 338 (2005).
24. G. Kaushik, S. Ramalingam, D. Subramaniam, P. Rangarajan, P. Protti, P. Rammamoorthy, S. Anant, and J. M. V. Mammen, Honokiol induces cytotoxic and cytostatic effects in malignant melanoma cancer cells, *Am. J. Surg*., **204**(6), 868 (2012).
25. N. H. Choi, G. J. Choi, B. S. Min, K. S. Jang, Y. H. Choi, M. S. Kang, M. S. Park, J. E. Choi, B. K. Bae, and J. C. Kim, Effects of neolignans from the stem bark of *Magnolia obovata* on plant pathogenic fungi, *J. Appl. Microbiol.,* **106**(6), 2057 (2009).
26. Z. L. Kong, S. C. Tzeng, and Y. C. Liu, Cytotoxic neolignans: an SAR study, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **15**(1), 163 (2005).