

## 용담화 추출물의 미백 활성 연구

이 현 상 · 석 지 현 · Cheung Wai Ting\* · 김 윤 정†

매니아시아 알앤디센터, \*Shenzhen Mannay Cosmetics  
(2017년 12월 27일 접수, 2018년 2월 26일 수정, 2018년 3월 6일 채택)

### A Study on the Whitening Activities of *Gentiana scabra* Extract

Hyun Sang Lee, Ji Hyun Seok, Cheung Wai Ting\*, and Yun Jeong Kim†

Mannay Asia R&D Center, #1603 Daeryoung Technotown (15th), Simin-daero 401, Dongan-gu,  
Anyang-si, Gyeonggi-do 14057, Korea

\*#2008, #A, Jia He Hua Qing Building, Shennan Middle Road, Futian District, Shenzhen, China

(Received December 27, 2017; Revised February 26, 2018; Accepted March 6, 2018)

**요약:** 본 연구에서는 항산화 및 미백 소재의 개발을 위해 다양한 추출법을 이용하여 용담화 추출물을 제조하고 항산화 효과 및 멜라닌 생합성 저해능을 평가하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 평가한 결과 용담화 추출물의 항산화 활성은 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 용담화 추출물은 tyrosinase 활성을 저해시켰으며, B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 감소시키는 효과를 보였다. 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 tyrosinase-related protein (TRP)-1 및 2 mRNA 발현을 확인한 결과 용담화 추출물에 의해 TRP-1 및 2의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 용담화 추출물은 항산화 및 미백 기능성 화장품 소재로서의 응용이 가능할 것으로 사료된다.

**Abstract:** In order to find new functional materials for the cosmetics application, we investigated the anti-oxidant and anti-melanogenic properties of *Gentiana scabra* extracts (GSE), which were prepared by the various extraction methods. Results showed that GSE had high DPPH radical scavenging activity in a dose-dependent manner. Also, GSE inhibited the production of melanin in B16F10 melanoma cell as well as tyrosinase activity. We also found that GSE inhibited mRNA expression of tyrosinase-related protein (TRP)-1 and 2. In conclusion we suggest that GSE is applicable to cosmetics as a potential ingredient for their anti-oxidant and whitening effects.

**Keywords:** *Gentiana scabra* extract, anti-oxidant, whitening, tyrosinase, melanin

## 1. 서 론

건강한 피부는 피부에 질병이 없는 상태뿐 아니라 피부가 윤기 있고, 촉촉하며, 탄력이 있고, 색이 고른 것을 말한다. 현대 사회는 다양한 외부 자극으로 인해 피부 손상도가 증가하고 있으며 이로 인한 피부 노화, 피부색의 변화, 색소 침착 등의 피부 질환이 증가하고

있다. 다양한 외부 자극 중에서도 자외선은 피부 노화의 큰 요인으로 작용하며 자외선으로 유도된 활성산소는 피부 노화를 가속화 시키고 피부에서 멜라닌 합성을 증가시킨다고 보고되고 있다[1,2]. 또한 활성산소는 세포의 구성성분을 파괴하고 노화나 암, 신경계 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다[3,4].

멜라닌은 신체의 머리카락, 눈동자 또는 사람의 피부색을 결정하는 요인으로 자외선으로부터 피부세포를 보호하는 기능을 갖고 있어 자외선에 의하여 유발

† 주 저자 (e-mail: bree.kim@manny.com)  
call: 070)5133-5376

될 수 있는 각종 질환으로부터 보호되고 있다[5]. 그러나 과도한 멜라닌의 생성이나 분포 이상은 색소 침착, 피부암 등의 원인이 되기도 한다[6]. 멜라닌 합성은 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공동합체인 멜라닌을 생성하게 된다[7,8]. 이들 중 tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하여 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하는 효소이며 TRP-1, TRP-2는 멜라닌 형성의 조절인자로 잘 알려진 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)에 의해 조절되어 멜라닌 형성에 관여하므로 피부 미백제의 개발에 있어서 이들에 대한 연구가 중요시되고 있다 [9-11].

따라서 피부 건강 뿐 아니라 미용적인 면에서도 피부 미백에 대한 관심은 지속적으로 증가하고 있고 이에 따른 미백 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있으나 기존 미백 소재들 중 일부 소재는 안정성이 떨어지거나 피부 알레르기 반응, 독성 반응 등을 보이기 때문에 미백 소재로서 한계점이 있어 이러한 점을 극복하기 위해 보다 안정적이며 효과적인 소재에 대한 연구가 필요하다[12].

이처럼 피부 미백에 대한 중요성이 높아지면서 피부 미백을 위해 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있고 본 연구에서도 피부 미백을 위해 이용 가능한 소재를 확인 하는 과정에서 용담화에 대한 연구를 통해 미백 소재로서의 가치가 있다고 판단하였다.

용담화(*G. scabra*)는 용의 쓸개라는 뜻의 용담(龍膽)의 꽃이다. 용담은 여러해살이 풀로 산지의 풀밭에서 자라며 그 뿌리가 동물의 쓸개처럼 쓰다 하여 붙여진 이름이다. 한방과 민간에서는 용담을 달인 물로 종기, 습진 등을 씻어내면 시원한 느낌이 들면서 가라앉는 효과를 보게 되고 대장균, 백선균, 피부진균에 대하여 항균작용 및 소염 작용을 한다고 보고되어 있다[13]. 이러한 연구를 토대로 하여 용담화의 피부 효능을 높이기 위해 추출 방법을 달리하여 다양한 용담화 추출물을 제조하였고 본 연구는 용담화의 다양한 효능에 대한 연구에 이어 용담화 추출물에 의한 피부 미백 화장품의 원료로서 가능성이 있는지를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 용담화 추출물 제조

본 실험을 위하여 사용된 용담화는 중국의 Shenzhen Mannay Cosmetics Co.,에서 제공받아 사용하였다.

용담화 25 g에 정제수 500 mL를 넣고 100 °C에서 추출한 뒤 여과지(Qualitative Filter Papers NO.2)를 이용하여 여과하고 감압농축기를 이용하여 농축한 뒤 농축액 상태로 수득하였다. 또한 용담화 추출물의 최적 추출 조건 선정을 위하여 50% 및 95% 에탄올, 50% 및 100% 1, 3-부틸렌글라이콜을 사용하여 상온(20-30 °C)에서 추출한 뒤 농축액 상태로 수득하였다.

### 2.2. 세포독성 측정(MTT Assay)

세포 생존율 측정은 Mosmann의 방법에 의하여 실시하였다. 세포를 96-well plate의 각 well에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 후 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24 h 동안 배양하여 용담화 추출물을 농도별로 처리하고 다시 24 h 동안 배양하였다. 배양 완료 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척해주고 0.5 mg/mL MTT를 각 well에 첨가하여 4 h 동안 배양하였다. 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150  $\mu$ L 넣고 20 min 동안 상온에서 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다.

### 2.3. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

메탄올에 녹인 각 농도별 시료 50  $\mu$ L와 0.1 mM DPPH 용액 100  $\mu$ L를 96-well plate에 주입하여 상온에서 30 min 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거효과를 나타내었다.

### 2.4. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 측정은 mushroom tyrosinase와 기질인 L-DOPA를 사용하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.5 mL에 5 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL를 넣고 용담화 추출물 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (100 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 2 min 간 반응시켰다. 그 후 475 nm에서 흡광값을 측정하였고 tyrosinase 저해활성은 용담화 추출물이나 양성대조

Table 1. Primer Pair

Gene		Primer sequence
GAPDH	Forward	5'-TCA GAA GGA CTC CTA TGT GG-3'
	Reverse	5'-TCT CTT TGA TGT CAG CAC G-3'
TRP-1	Forward	5'-CTT TCT CCC TTC CTT ACT GG-3'
	Reverse	5'-AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T-3'
TRP-2	Forward	5'-TGA GAA GAA ACA AAG TAG GCA CAA-3'
	Reverse	5'-CAA CCC CAA GAG CAA GAC GAA AGC-3'

군을 첨가한 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.5. 멜라닌 합성 저해 활성

멜라닌 합량 측정은 B16F10 세포주를 6-well plate의 각 well 당  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 후 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함된 배지에 100 nM  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)와 시료를 동시에 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 48 h 동안 배양하였다. 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 회수한 뒤 4 °C, 12,000 rpm에서 10 min 간 원심분리하여 상등액을 제거하고 pellet을 얻어 1 M NaOH 수용액을 첨가하여 65 °C에서 반응시켜 세포 내의 멜라닌을 얻었다.

### 2.6. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받은 B16F10 세포주를 37 °C, 5%의 CO<sub>2</sub> 하에서 10%의 FBS, 50 units/mL의 streptomycin과 100 IU/mL의 penicillin을 첨가한 DMEM에서 24 h 동안 배양한 뒤 100 nM  $\alpha$ -MSH와 추출방법을 달리하여 준비한 용담화 추출물을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 멜라닌 생성 관련 유전자의 mRNA 분석을 위해 세포 내의 total RNA를 RNAiso reagent (TaKaRa, Japan)를 사용하여 추출하여 mRNA 함량을 측정하였다. 측정된 mRNA는 First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (Tragen, China)를 이용하여 65 °C에서 5 min, 42 °C에서 15 min, 85 °C에서 5 min 간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA는 RT-PCR 증폭을 위한 template로 사용되었으며 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입한 PCR primer를 사용하였다(Table 1). PCR에 의하여 생성된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여

Gel Documentation system (Gel Doc EZ system, BioRad, Korea)으로 확인하였다.

### 2.7. 통계적 검증

모든 실험은 3회 반복으로 실시하였고 실험 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였다. 본 실험 결과에 대한 유의차 검정은 ANOVA test로 평균값을 분산분석 한 후 Tukey's multiple range test를 이용하여 사후 검정하였으며,  $p < 0.05$  수준에서 유의성 여부를 검정하였다.

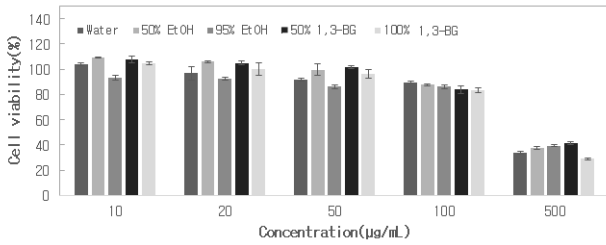
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포 생존율 확인

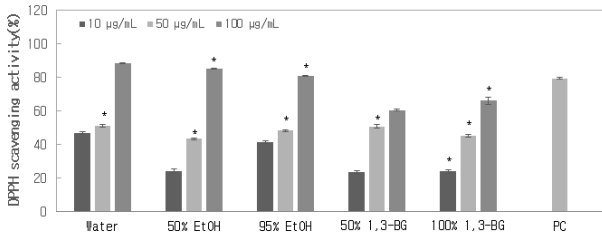
용담화 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 10, 20, 50, 100, 500  $\mu$ g/mL로 농도별로 B16F10 세포에 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 용담화 추출물의 사용 농도가 100  $\mu$ g/mL 이하일 때 80% 이상의 세포 생존율을 보였고 500  $\mu$ g/mL에서는 세포의 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하여 앞으로 실험은 100  $\mu$ g/mL 이내에서 실시하였다(Figure 1).

### 3.2. DPPH Radical 소거 효과

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 용담화 추출물의 항산화 작용을 측정된 결과 추출방법에 따른 용담화 추출물의 처리 농도에 의존적으로 항산화 작용이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 2). 특히 5가지 추출물 중 열수 추출법에 의해 제조된 용담화 열수 추출물은 100  $\mu$ g/mL 사용 시 DPPH radical 소거능이 약 88%로 확인되어 양성 대조군으로 사용한 quercetin보다 효과가 우수하였다. 과도한 활성산소의 생성은 nitric oxide (NO)의 축적을 야기하면서 염증의 과활성



**Figure 1.** Effect of *G. scabra* extract on cell viability. Cells were treated with various concentration of *G. scabra* extract and cell viability measured by MTT assay. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments.

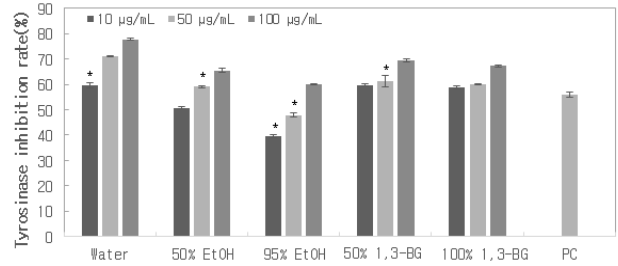


**Figure 2.** Effect of *G. scabra* extract on DPPH scavenging activity. PC (Positive Control); Quercetin 100 ppm. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments (Significant as compared to control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

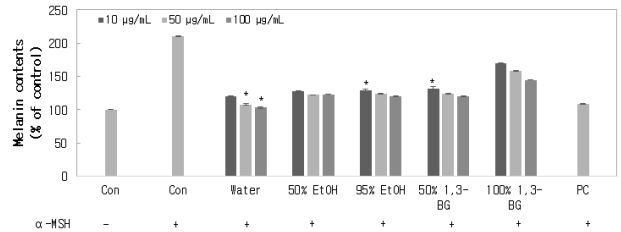
화를 유발하게 된다[14]. 기존 연구에 따르면 용담화 추출물에서 분리된 5-(hydroxymethyl)-2-furfural 가 NO 생성을 저하시키는 효과가 있다고 하였고[15] 이러한 결과는 용담화 추출물에 의한 항산화 작용과 관련이 있을 것으로 사료된다.

3.3. Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요하게 관여하는 효소로서 이 효소의 활성억제 효과 정도를 확인함으로써 미백 효능을 확인할 수 있다. 따라서 추출방법을 달리한 용담화 추출물을 이용하여 tyrosinase 활성 억제를 측정하였다. 그 결과 추출방법에 따른 용담화 추출물의 처리 농도에 의존적으로 tyrosinase 활성 억제능이 증가하였고 특히 열수 추출법에 의해 제조된 용담화 열수 추출물은 100 µg/mL 사용시 tyrosinase 저해능이 약 78% 증가하여 열수 추출법에 의해 제조된 용담화 열수 추출물에서 효과가 가장



**Figure 3.** Effect of *G. scabra* extract on tyrosinase inhibition rate. PC (Positive Control);  $\alpha$ -arbutin 50 ppm. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments (Significant as compared to control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

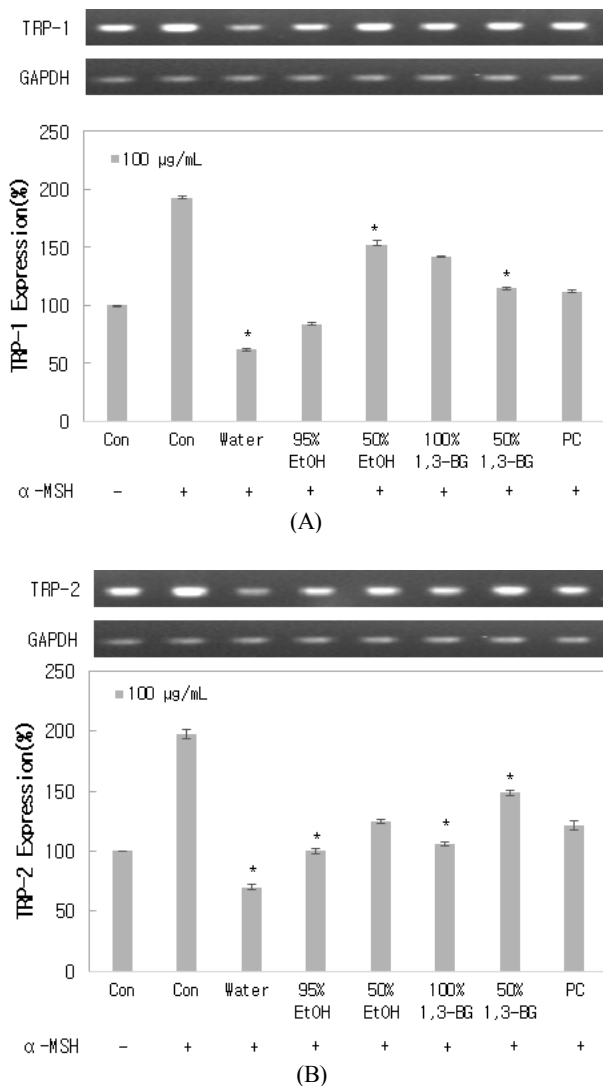


**Figure 4.** Effect of *G. scabra* extract on melanin contents in  $\alpha$ -MSH stimulated B16F10 melanoma cells. PC (Positive Control);  $\alpha$ -arbutin 50 ppm. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments (Significant as compared to control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

우수함을 확인하였다(Figure 3).

3.4. 멜라닌 생성 저해 효과

외부자극에 의한 과색소 침착에 대해 용담화 추출물이 영향을 미치는지 확인하기 위하여  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리하여 세포 내 멜라닌 양을 측정하였다. 추출방법을 달리하여 준비한 용담화 추출물을 세포독성을 보이지 않는 농도로 세포에 처리하여 세포 내에 존재하는 멜라닌의 양을 확인해본 결과, 농도 의존적으로 세포 내 멜라닌이 감소함을 확인할 수 있었다. 특히 열수 추출법에 의해 제조된 용담화 열수 추출물은 100 µg/mL 사용시  $\alpha$ -MSH 처리군에 비해 멜라닌 함량이 약 108% 감소하여 5가지 추출물 중 가장 우수한 효과를 확인하였다. 이는 양성대조군으로 사용한  $\alpha$ -arbutin 과 비교하였을 때 더 우수한 효과를 가짐을 확인하였다 (Figure 4).



**Figure 5.** Effect of *G. scabra* extract on gene expression of TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells (A, B). PC (Positive Control);  $\alpha$ -arbutin 50 ppm. The results were expressed as the mean  $\pm$  S.D. from the three independent experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

3.5. TRP-1, TRP-2 mRNA 발현 저해 효과

Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과 관련된 효소로는 TRP-1과 TRP-2 등이 있다. 따라서 추출방법에 따라 달린 제조된 용담화 추출물의 멜라닌 생성성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 TRP-1 및 TRP-2 각각의 mRNA 발현을 확인하였다. 용담화 추출물을 농도별로 처리한 세포 내에서 TRP-1 및 TRP-2 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인하였고 특히

열수 추출법에 의해 제조된 용담화 열수 추출물은 양성대조군으로 사용한  $\alpha$ -arbutin과 비교하였을 때 더 우수한 효과를 가짐을 확인하였다(Figure 5).

4. 결 론

본 연구에서는 피부 미백 효과와 관련하여 용담화 추출물의 효능을 확인하는데 중점을 두었다. 용담화는 secoridoid 배당체를 함유하고 있는 식물로서 함염증 효과가 있고 한방에서는 열을 내리고 염증을 억제하는 작용이 있는 것으로 보고되었다[15]. 또한 용담화는 gentianine을 비롯한 여러 종류의 알칼로이드를 함유하고 있으며 약리작용으로는 항균 및 항기생충 작용, 소염 작용, 면역증강 작용, 간기능 보호 작용, 이담 작용 등이 있다[16]. 기존 연구에 따르면 용담화 추출물의 항산화 효과를 입증하였고 용담화 메탄올 추출물이 염증질환에 효과가 있다고 하였다[17,18]. 용담화의 효능을 높이기 위해 추출방법을 달리하여 5가지의 용담화 추출물을 제조하였고 이러한 연구 내용을 토대로 하여 항산화 및 미백 효과에 관한 연구를 진행하였다. 본 연구결과에 따르면 용담화 추출물은 피부노화에 영향을 주는 free radical을 소거하는 항산화 효능을 나타내었으며, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성을 저해하는 효능을 나타내었다. 이는 용담화 추출물이 항산화 효능과 미백 효능을 갖는 기능성 화장품의 소재로서 활용이 가능할 것을 시사한다. 즉, 용담화 추출물은 천연 화장품에 적용 가능한 우수한 소재로서의 이용이 가능할 것으로 기대된다.

Reference

1. B. A. Gilchrest and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Investiq. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**, 35 (1999).
2. A. L. Jeon, J. E. Kim, and N. H. Lee, Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of *Citrullus lanatus* vines, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(1), 53 (2017).
3. C. E. Cross, B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord, and D.

- Harman, Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526 (1987).
4. R. Adelman, L. R. Saul, and N. B. Ames, Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2706 (1998).
  5. E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee, Antioxidant and skin whitening effects of *Ramnus yoshinoi* extracts, *J. Food Sci. Technol.*, **42**, 750 (2010).
  6. A. A. Bell and M. H. Weeler, Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**, 411 (1986).
  7. C. A. Ferguson and S. H. Kidson, The regulation of tyrosinase gene transcription, *Pigment Cell Res.*, **10**(3), 127 (1997).
  8. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.*, **5**(14), 2902 (1991).
  9. N. J. Bentley, T. Eisen, and C. R. Goding, Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7996 (1994).
  10. K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase, *EMBO J.*, **11**(2), 519 (1992).
  11. R. E. Boissy, C. Sakai, H. Zhao, T. Kobayashi, and V. J. Hearing, Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1, *Exp. Dermatol.*, **7**(4), 198 (1998).
  12. H. J. Chun, W. H. Choi, S. H. Baek, and W. H. Woo, Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells, *Korean J. Pharmacogn.*, **33**, 245 (2002).
  13. J. G. Lee, E. W. Kim, and J. H. Lee, Effect of gentianae radix on neurogenesis and apoptosis in hippocampus of ethanol-induced newborn rats, *J. Oriental Neuropsychiatry.*, **21**(2), 29 (2010).
  14. J. H. Song and S. R. Lee, Anti-oxidant and inhibitory activity on no production of extract and its fractions from *Rosa davurica* pall. Leaves, *Korean J. Med. Crop Sci.*, **23**, 20 (2015).
  15. H. W. Choi, M. H. In, S. H. Lee, E. J. Kim, K. S. Lim, and W. H. Woo, Study on anti-inflammatory effect of ethanol extract of gentiana sin o-ornata, *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **28**(4), 51 (2015).
  16. H. J. Lee, M. Y. Jang, M. R. Kim, K. H. Bae, and D. E. Sok, Screening of inhibitor of thyroid peroxidase, and oxidative coupling enzyme from Natural Products, *The Pharmaceutical Society of Korea*, **43**(3), 334 (1999).
  17. M. S. Kim, S. C. Kim, S. Y. Jee, S. Y. Hwang, W. J. Cho, and J. R. Lee, Inhibitory effect of *Gentianae radix* MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw264.7 cells, *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **21**(1), 28 (2008).
  18. H. W. Choi, M. H. In, Y. J. Mun, K. S. Lim, and W. H. Woo, Study on pharmacological activation as cosmetic material of *Gentianae scabrae* bunge Extract, *J. Korean Med. Physiol. Pathol.*, **29**(3), 223 (2015).