

골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 항산화 및 미백 효과

유경완^{*,†} · 이소민^{*,†} · 정소영^{*,†} · 허효진^{****} · 차병선^{*****} · Sofia Brito^{*****} · Lei Lei^{***} ·
이상훈^{***} · 천유연^{***} · 조하현^{***} · 김예지^{***} · 이미기^{*****,††} · 광병문^{*****,††} · 빈범호^{*****,††}

* (주)프로유화장품 부설연구소

** 아주대학교 응용생명공학과, 석사과정 학생

*** 아주대학교 생명과학과, 석사과정 학생

**** 아주대학교 응용생명공학과, 박사과정 학생

***** 아주대학교 생명과학과, 박사과정 학생

***** 경기도경제과학진흥원

***** 아주대학교 생명과학과, 박사후연구원

***** 아주대학교 응용생명공학과, 교수

(2022년 10월 26일 접수, 2022년 12월 10일 수정, 2023년 1월 4일 채택)

Antioxidant and Whitening Effect of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. Bulb Extracts

Kyung Wan Yoo^{1,2,†}, So Min Lee^{3,†}, So Young Jung^{2,†}, Hyojin Heo², Byungsun Cha³,
Sofia Brito², Lei Lei³, Sang Hun Lee³, You-Yeon Chun³, Ha Hyeon Jo³, Ye Ji Kim³,
Mi-Gi Lee^{4,††}, Byeong-Mun Kwak^{3,††}, and Bum-Ho Bin^{2,††}

¹Proyou Cosmetics, Gyeongsu-daero391beon-gil, Uiwang-si, Gyeonggi-do, 16071, Republic of Korea

²Department of Applied Biotechnology, Ajou University

³Department of Biological Science, Ajou University

⁴GBSA, Gyeonggido Business and Science Accelerator

(Received October 26, 2022; Revised December 10, 2022; Accepted January 4, 2023)

요약: 본 연구에서는 골든크로쿠스비늘줄기를 정제수와 에탄올 농도별로 추출을 하여 항산화 효과와 티로시나아제 저해 활성을 측정하고 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 확인해 보았다. 추출물의 수율은 1.8 ~ 6.0%을 얻었으며, 에탄올 용매의 농도가 증가할수록 수율은 감소하였다. 항산화 효과로 DPPH free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거 활성 분석한 결과 70% 에탄올 추출물 625 µg/mL에서 DPPH free radical 소거 활성이 91.97%로 높게 나타내었다. 총 페놀 함량에서도 447 mg/g으로 다른 추출 방법보다 높게 측정되었다. 미백 효과는 *in vitro*의 tyrosinase 저해 활성을 통해 확인하였다. 추출물의 에탄올 농도가 높아질수록 tyrosinase 저해 활성은 증가하였고 70%와 94.5% 에탄올 추출물에서 높은 저해 활성을 나타내었다. 따라서 골든크로쿠스비늘줄기 추출물은 항산화 및 미백 효과를 통해 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

Abstract: In this study, *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb extracts were extracted by purified water and ethanol, and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activity were measured to see the possibility as a cosmetic material. The yield of the extracts was 1.8% to 6.0%, and the yield decreased as the ethanol concentration increased. DPPH free radical

† 주 저자 (e-mail: kyungwan77@ajou.ac.kr)
call: 031-219-2618

†† 교신저자 (e-mail: bhb@ajou.ac.kr)
call: 031-219-2623

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activity was high at 91.97% at 625 $\mu\text{g/mL}$ of 70% ethanol extract. The total phenol content was also measured at 447 mg/g, higher than other extraction methods. The whitening effect was confirmed through *in vitro* tyrosinase inhibitory activity. As the ethanol concentration of the extracts increased, the tyrosinase inhibitory activity increased, and 70% and 94.5% ethanol extracts showed high inhibitory activity. Therefore, the *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb extracts confirmed its potential as a cosmetic material through antioxidant and whitening effects.

Keywords: *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb, extraction, whitening, antioxidant activity, total phenol

1. 서 론

천연화장품 시장은 전 세계적으로 꾸준한 성장 추세를 이어가고 있으며, 식물 등 천연물로부터 얻어지는 기능성 물질들을 원료로서 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[1,2]. 이러한 요구에 맞춰 천연물 또는 약용식물을 중심으로 한 미백효과, 노화억제 및 자외선 차단 기능 등 유용한 소재에 대한 개발이 진행되고 있다[3]. 식물체에는 자신을 보호하기 위해 폴리페놀(polyphenol)류의 항산화 물질을 세포 내에 함유하고 있어 다양한 생리활성 기능을 갖고 이를 응용하면 화장품의 소재로서 좋은 재료가 될 수 있다[4].

피부 노화는 노화에 영향을 주는 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분 지을 수 있다. 내인적 노화는 유전자에 의해 결정되어 나이를 먹어감에 따라 진행되는 자연적인 노화 현상을 말하며, 외인적 노화는 스트레스, 식습관, 자외선, 미세먼지 등과 같은 외부 환경인자들에 의해 진행되는 노화를 말한다[5]. 자외선 노출에 의한 노화는 피부노화의 80%를 차지하며 피부주름, 탄력 손실, 건조, 색소 침착 등의 문제를 발생시킨다. 피부가 자외선에 노출되면 free radical 또는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성시켜 주요 조직을 손상시키고 노화가 진행된다. ROS는 유해한 산소종으로 종류에는 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), Superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), alkoxyl radical ($\cdot\text{OR}$) 및 hydroperoxyl radical ($\cdot\text{OOR}$) 등이 있으며, 이들 ROS는 DNA, 지질 막 및 단백질과 같은 세포 구성 요소를 변형시킬 수 있다. 이는 비정상적인 세포 기능을 유발할 수 있으며, 비정상적인 단백질 생성, 결합 조직의 분해 및 발암 등을 유발한다[6-9]. 합성 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등 여러 항산화제가 있지만 생체 효소 지방의 변이 및 독성으로 인해 인체에 암을 유발 할 수 있다는 보고 있어 보다 안전하고 활성이 높은 천연 항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있다[10-12].

멜라닌은 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 하나 과도하게 생성될 경우 피부에 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며 심하면 피부암의 원인이 되기도 한다[13]. 자외선에 의해 피부가 자극을 받으면 표피의 멜라노사이트에 존재하는 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 뇌하수체에서 분비되는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-protein kinase A (PKA) 경로에 의해 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현이 증가 된다. 이로 인해 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase, tyrosinase related protein-1,-2 (TPR-1,-2) 활성이 증가되고 멜라닌 합성이 촉진된다. 현재는 미백제 개발에 있어서 tyrosinase의 저해 활성뿐만 아니라 산화반응에 의한 억제도 크게 부각 되고 있다[14,15]. 기존 화장품 분야에서는 미백성분으로 코직산, 알부틴 등과 같은 tyrosinase 효소 활성 억제하는 물질과 L-ascorbic acid와 같은 대표적으로 항산화뿐만 아니라 미백에도 탁월한 효과가 있는 물질을 사용했지만 분해나 착색, 이취 등 안정성이 떨어지는 문제로 인해 사용에 제한이 있다. 따라서 기존 미백제가 갖고 있는 여러 단점을 극복하고자 최근에는 피부에 안전한 천연물을 이용한 미백제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다[16].

골든크로쿠스(*Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb., *C. chrysanthus*)는 붓꽃과 계통의 꽃이 피는 종으로 발칸 반도와 튀르키예가 원산지이며 늦겨울이나 초봄에 개화를 하고 3 ~ 4인치의 선명한 주황색-노란색 그릇 모양의 꽃이다. 정통의학에서 *Crocus* 종은 여러 질병을 관리하는데 사용된 것으로 알려져 있고 면역을 위한 강장제, 진해제, 항천식제, 복통 진정제 등으로 사용되어 진대[17]. 골든크로쿠스 품종의 꽃잎에서 8 개의 플라보노이드를 분리했으며, 그중 5 개는 새로운 플라보노이드를 발견하였다고 보고되어 진대[18]. 또한 높은 항산화 활성과 α -amylase, α -glucosidase, tyrosinase 등의 효소 저해 활성에 대한 연구가 알려져 있다[19]. 그러나 골든크로쿠스비늘줄기에 대해서는 잘 알려져 있지 않으며 생리활성 효능에 대한 연구가 거의 보고 되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 추출 용매를 달리하여 항산화 및 미백 효과를 확인하고 최적의 추출 조건을 찾아 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용한 골든크로쿠스비늘줄기(*C. chrysanthus*)는 충청북도 청주(Korea)에서 재배하여 세척 후 건조된 시료를 사용하였다. DPPH free radical 소거 활성 분석에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical와 총 페놀 함량 측정에 쓰인 folin-denis 시약은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Thermo Max, Molecular Devices, USA)를 사용하여 측정하였다. 에탄올 (EtOH), 메탄올(MeOH), 탄산나트륨(Na₂CO₃) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였고 tyrosinase inhibitor screening kit (MAK257)는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 골든크로쿠스비늘줄기의 추출 및 수율 측정

골든크로쿠스비늘줄기의 추출방법은 분쇄한 시료 10 g에 용매 490 g을 넣은 후 냉각기가 연결된 멘틀 플라스크에서 환류냉각추출을 이용하여 80 °C의 온도 조건에서 추출시간 2 h으로 하여 추출을 진행하였다. 추출 조건은 식품의약품안전처의 한약생약 추출물 품질관리 가이드라인 식물유래추출물 추출방법을 응용하여 에탄올 용매의 비율(정제수, 20% 에탄올, 50% 에탄올, 70% 에탄올, 94.5% 에탄올)을 설정한 후 추출을 진행하였다. 추출 종료 후 추출물은 1.2 to 0.2 μm 마이크로필터로 여과한 후 rotary evaporator (NE1001N, Eyela, Japan)를 이용하여 80 °C, 80 rpm 10 hPa로 농축하고, 각 농축물은 동결건조 하여 분말화시켰다.

2.3. 항산화 효능 실험

항산화 시험이란 활성산소를 제거하는 효과를 갖는 물질의 양을 측정하는 시험이다[20]. 세포의 노화과정과 질병을 발생시키는 활성산소를 발생시켜 산화를 억제하는 개념이 항산화이다. 호흡기를 통하여 체내로 들어오는 산소는 대사작용에 필요한 에너지를 만들기도 하지만, 이 대사과정에서 여러 원인으로 인하여 인체에 해로운 활성산소가 생성되기도 한다. 체내의 정상 세포를 공격하여 각종 질병의 발생, 노화 진행에 활성산소가 작용한다[21]. 따라

서 이러한 세포의 산화를 막으려면 활성산소를 제거하여 항산화 작용을 해야 한다. 항산화 효능 실험의 이론적인 근거는 항산화 능력을 직접 확인하는 구도가 아닌, 측정된 총 페놀 함량이 많을수록 항산화 효과가 높게 나타날 것이라고 유추하는 가설에 두고 있다[22]. 따라서 본 연구에서는 DPPH free radical 소거 활성 및 총 페놀 함량 측정 등의 시험을 수행하고 시험결과를 상호 비교 평가하여 연구의 신뢰도를 높이고자 하였다.

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical 소거 활성을 측정하는 DPPH 실험법은 매우 간편하고 짧은 시간에 결과를 알 수 있기 때문에, 선정된 식물 추출물의 항산화 물질을 검색하는 경우나 항산화 화장품 원료들의 비교 평가 시에 이용하기 적합하다. Free radical은 높은 반응성을 가진 홀 전자를 갖는 원자단으로 매우 불안정하다. 이러한 특징으로 피부조직에 손상을 입혀 피부 노화를 가속화 시킨다[23]. 골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 DPPH free radical 소거 활성은 Blois의 방법을 응용하여 분석하였다[24]. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액을 동일한 용량의 각 시료에 첨가하여 섞은 다음 실온에서 15 min 동안 방치 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control optical density)은 DPPH 용액, 시료용매 혼합물(1 : 1, v/v)으로 하고 블랭크(blank optical density)는 메탄올, 시료(1 : 1, v/v)으로 하여 다음 식에 의해 라디칼 소거 활성(FSC%)을 계산하였다.

$$FSC\% = 100 \times \left(1 - \frac{\text{experimental optical density} - \text{blank optical density}}{\text{control optical density}} \right)$$

2.3.2. 총 페놀 함량 측정

골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 총 페놀 함량을 측정하기 위하여 약간 변형된 Singleton과 Rossi 방법을 사용하여 분석하였다[25]. 각 시료를 용매에 용해 시켜 시료용액을 만든 다음 Folin-Denis 시약 1 mL에 농축된 샘플 1 mL를 시험관에 첨가하고 3 min 경과 후 20% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 시험관에 투입하였다. 실온에서 1 h 경과 후, 750 nm에서 microplate reader 장비를 이용하여 총 페놀 함량을 측정하였다. 표준 검량선은 resveratrol를 사용하였다.

2.4. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase inhibitor screening kit를 사용하여 시료(S)와

tyrosinase assay buffer (EC)를 각각 20 μL 씩 96 well flat-bottom clear plate에 투입하고 50 μL의 tyrosinase enzyme solution (48 μL tyrosinase assay buffer + 2 μL tyrosinase)을 각 well에 투입하여 혼합한 후 25 °C에서 10 min 배양하였다. 그런 다음, 30 μL tyrosinase substrate solution (23 μL tyrosinase assay buffer + 2 μL tyrosinase substrate + 5 μL tyrosinase enhancer)을 각 well에 첨가하고 잘 혼합하였다. microplate reader 장비를 이용하여 510 nm에서 30 min 동안 흡광도를 측정하여 다음의 식을 이용하여 산출하였다. Slope (Ec) 및 Slope (S)는 ΔAbs (Abs₂-Abs₁)를 ΔTime (T₂-T₁)으로 나누어 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory activity (\%)} = [1 - \{\text{Slope (EC)}/\text{Slope (S)}\}] \times 100$$

2.5. 통계처리

모든 실험의 측정값은 3회 반복 실시하였으며, 실험 결과는 각 항목에 따라 평균값, 표준편차(standard division, S.D.)로 나타내었고 student's t-test를 통해 표준편차 (p-value < 0.05) 수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 수율

본 실험에서 추출된 골든크로쿠스비늘줄기의 추출 수율은 정제수 추출에서 6.0%, 20% 에탄올 추출 4.3%, 50% 에탄올 추출 4.0%, 70% 에탄올 추출 3.0%, 94.5% 에탄올 추출 1.8% 수율을 얻었다(Table 1). 정제수를 사용한 추출물

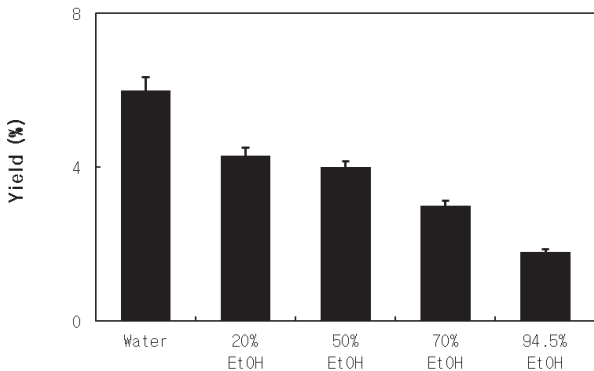


Figure 1. Comparison of yield by ethanol solvent concentration. Each value represents the mean ± SD of triplicate data.

Table 1. The Extraction Yield of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb by Ethanol Solvent Concentration

Extracts	Extraction yield (%)
Water	6 ± 0.34*
20% EtOH	4.3 ± 0.21*
50% EtOH	4 ± 0.16*
70% EtOH	3 ± 0.12*
94.5% EtOH	1.8 ± 0.06*

*The date were expressed as mean values (± SD) of three experiments (p < 0.05)

에서 추출 수율이 가장 높았으며, 에탄올 농도가 높아질수록 수율은 떨어지는 양상을 보였다(Figure 1). Catechins, pectin, caffeine, flavonoid, tocopherol과 같은 식물성 폴리페놀 화합물은 수용성 또는 지용성으로 구분되어있어 추출되는 용매에 따라 추출되는 성분들이 달라지기 때문에 추출 수율에 많은 차이를 나타낸 것으로 보이며[26,27], 정제수를 이용한 추출물에서 당, 아미노산, 유기산 등 물에 잘 녹는 hydrophilic한 성분들이 많이 용출된 것으로 생각된다. 이러한 양상은 두릅 순 및 잎 추출물과 양파껍질 추출물 연구 결과와 유사하였다[28,29].

3.2. DPPH Free Radical 소거 활성

인체에 유해한 ROS 중에서 가장 강력한 유해 인자는 free radical로 알려져 있다. 따라서 체내에서 진행되는 유해한 과산화작용을 제어하기 위해서는 free radical 인자를 제어하는 것이 효과적이다. DPPH는 비교적 안정한 free

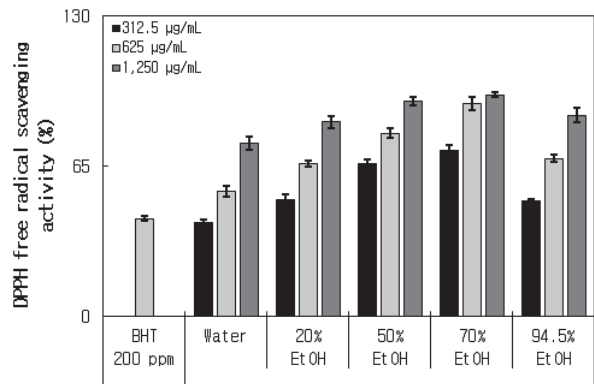


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb extracts by ethanol solvent concentration. Each value represents the mean ± SD of triplicate data.

Table 2. DPPH Free Radical Scavenging Activities of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb by Ethanol Solvent Concentration

Extracts	DPPH free radical scavenging activity (%)			
	200 ppm	312.5 $\mu\text{g/mL}$	625 $\mu\text{g/mL}$	1250 $\mu\text{g/mL}$
BHT	42.14 \pm 1.1*			
Water		40.62 \pm 1.2*	53.89 \pm 2.2*	74.79 \pm 3.1*
20% EtOH		50.34 \pm 2.4*	65.93 \pm 1.5*	83.93 \pm 2.8*
50% EtOH		66.10 \pm 1.7*	79.20 \pm 2.1*	92.82 \pm 1.8*
70% EtOH		71.71 \pm 2.4*	91.96 \pm 3.0*	95.80 \pm 1.1*
94.5% EtOH		49.93 \pm 0.9*	68.13 \pm 1.4*	86.77 \pm 3.1*

BHT : Butylated hydroxytoluene.

* The data were expressed as mean values (\pm SD) of three experiments ($p < 0.05$).

radical 화합물로서, 항산화 기질과 반응하여 DPPH 용액의 변색이 일어난다. 골든크로쿠스비늘줄기 추출물에 대한 DPPH free radical 소거 활성 실험결과 각 용매마다 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였고 625 $\mu\text{g/mL}$ 에서 70% 에탄올 > 50% 에탄올 > 94.5% 에탄올 > 20% 에탄올 > 정제수 추출 순으로 소거 활성이 좋았다(Figure 2). 70% 에탄올 추출 312.5 ~ 1250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 71.71 ~ 95.80%로 DPPH free radical 소거 활성이 가장 효과적임을 확인하였다(Table 2). 312.5 ~ 1250 $\mu\text{g/mL}$ 의 에탄올 추출물에서 대조군으로 사용된 200 ppm의 BHT와 비교를 통하여 소거 활성이 높음을 알 수 있었다. 에탄올 농도가 높아질수록 free radical 소거 활성이 증가하는 양상을 보이고 94.5% 에탄올 추출에서 감소하였는데 이는 폴리페놀의 수산화그룹(hydroxyl group)이나 분자량, 탄화수소의 길이에 따라 차이는 있지만 물과 혼합한 알코올의 경우 추출용매의 극성을 변화시켜 폴리페놀의 용해도를 증가시킨 것으로 사료된다[30]. 이러한 양상은 로즈마리와 포도잎에서 용매에 따라 추출을 진행하였던 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다[31,32].

3.3. 총 페놀화합물 함량

폴리페놀(polyphenolics)은 자연계에 널리 분포하여 수천 가지가 넘으며 식물의 색소와 쓴맛의 성분으로, 항암을 비롯하여 항고혈압, 항염증, 항당뇨, 항산화 및 항노화 등 여러 생리적 및 약리적 효능이 있는 것으로 밝혀져 왔다[33]. 본 실험에서 총 페놀화합물 함량을 알아보기 위해 resveratrol를 표준용액으로 하여 표준 곡선을 작성하고 측정한 결과 골든크로쿠스비늘줄기 추출물의 총 페놀 함량은 70% 에탄올 추출물에서 447 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며,

50% 에탄올 추출물에서 367 mg/g, 94.5% 에탄올 추출물에서 334.5 mg/g, 20% 에탄올 추출물에서 284.5 mg/g, 정제수에서 167 mg/g 순으로 높은 함량을 나타내었다(Table 3). 산채류 추출물 연구에서 폴리페놀 함량과 free radical 소거 활성이 양의 상관관계를 보인 연구와 유사한 경향을 보였다[34]. 다른 추출물보다 50%, 70% 에탄올 추출물에서 총 페놀 함량이 높게 나왔는데 이는 에탄올 추출 조건에 따른 머루의 총 페놀 함량 분석 연구 및 대파 부위별 물과 에탄올 추출물의 연구와 유사하였다[35,36].

3.4. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성과정은 여러 경로를 거쳐서 형성되는 것으로 알려져 있지만, 핵심적인 효소는 tyrosinase이다. Tyrosinase는 L-tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중에서, L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA에서 dopaquinone으로 산화되는 과정에서 촉매로 작용한다. 이 두 번의 산화 반응 후의 후속 반응은

Table 3. Total Polyphenol Contents of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb Extracts According to the Extraction Solvents

Extracts	Total polyphenol contents (mg/g)
Water	167 \pm 2.1*
20% EtOH	284.5 \pm 4.8*
50% EtOH	367 \pm 10.5*
70% EtOH	447 \pm 12.2*
94.5% EtOH	334.5 \pm 8.4*

*The data were expressed as mean values (\pm SD) of three experiments ($p < 0.05$).

Table 4. Tyrosinase Inhibitory Activity of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb Extracts by Ethanol Solvent Concentration

Extracts	Tyrosinase inhibition activity (%)			
	250 µg/mL	312.5 µg/mL	625 µg/mL	1250 µg/mL
Arbutin	38.84 ± 0.8*			
Water		15.54 ± 3.1*	20.25 ± 2.4*	33.61 ± 1.7*
20% EtOH		16.81 ± 2.2*	24.41 ± 1.9*	38.65 ± 3.2*
50% EtOH		21.60 ± 2.4*	30.26 ± 3.1*	50.72 ± 2.6*
70% EtOH		23.52 ± 3.0*	35.48 ± 2.0*	62.02 ± 3.6*
94.5% EtOH		30.78 ± 1.8*	43.19 ± 2.6*	68.84 ± 3.0*

* The date were expressed as mean values (±SD) of three experiments ($p < 0.05$).

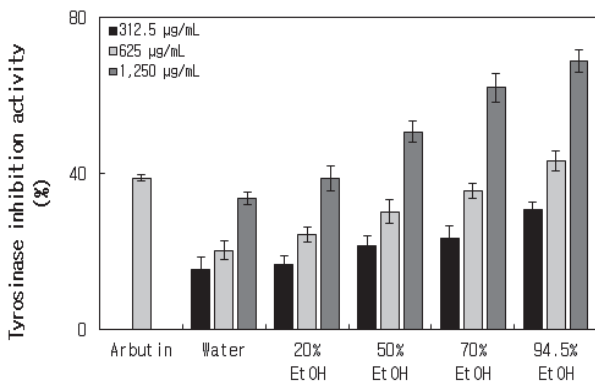


Figure 3. Tyrosinase inhibitory activity of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. bulb extracts by extraction solvent. Each value represents the mean ± SD of triplicate data.

자발적으로 일어나기 때문에, tyrosinase가 관여하는 반응이 전체 반응 속도를 결정하게 된다. 이러한 이유로 tyrosinase 저해 활성은 미백 활성을 평가하는데 매우 중요한 요소이며 멜라닌 생성과 양의 상관관계를 가진 연구들이 보고되어있다[37-40]. 본 실험에서는 용매 별 골든크로쿠스비늘줄기의 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다(Table 4). Tyrosinase 저해 활성은 정제수 < 20% 에탄올 < 50% 에탄올 < 70% 에탄올 < 94.5% 에탄올 순으로 에탄올 농도가 올라갈수록 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 625 µg/mL의 70% 에탄올 추출물부터 대조군인 arbutin 250 µg/mL과 비슷한 저해 활성을 보였고, 1250 µg/mL부터는 20% 에탄올 추출물과 저해 활성과 비슷하였다. 70%, 94.5% 에탄올 추출물 1250 µg/mL에서 62.02%, 68.84%으로 높게 분석되었다. 위의 항산화 실험 결과와 비교하여 94.5% 에탄올 추출물에서 tyrosinase 저해 활성이 가장 높아 다른 결과들과 상이 한 결과가 나왔는데 이는 활성산소를 소거하는 것보

다 항산화 물질이 tyrosinase 활성 부위인 구리 이온과 결합하여 tyrosinase 작용을 억제하는 경로를 거쳤을 가능성이 높다. 고농도의 에탄올 추출물에서 다양한 성분 중에 tyrosinase 효소를 억제하는 유효 성분이 다량 포함되어 있을 것으로 사료된다[41].

4. 결 론

본 연구에서는 연구가 미흡한 골든크로쿠스비늘줄기를 이용하여 추출 용매(정제수, 20% 에탄올, 50% 에탄올, 70% 에탄올, 94.5% 에탄올)를 달리하여 추출을 진행하고 항산화 및 미백 효과에 관한 연구를 진행하였다. 정제수를 이용한 추출이 가장 수율이 좋았으며, 에탄올 용매의 농도가 증가할수록 추출물의 수율은 떨어지는 양상을 보였다. DPPH free radical 소거 활성에서 추출물 농도가 높을수록 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보이고 정제수를 이용한 추출보다 에탄올을 이용한 추출물이 소거 활성이 높았다. 특히 70% 에탄올 추출물에서 높은 소거 활성을 보여 주었다. 총 페놀 함량에서는 정제수를 이용한 추출물보다 에탄올을 용매로 한 추출물에서 함량이 많았고 70% 에탄올 추출에서 가장 높은 총 페놀 함량 447 mg/g을 나타내었다. 추출 용매에 따라 총 페놀 함량이 증가할수록 DPPH free radical 소거 활성이 증가하는 양의 상관관계와 일치하였다. 미백 효과 측정 실험에서 tyrosinase 저해 활성을 확인해 본 결과 저해 활성이 에탄올 용매의 농도가 높아짐에 따라 증가하는 양상을 보이고 70% 에탄올 추출물, 94.5% 에탄올 추출물 1250 µg/mL에서 62.02%, 68.84%로 우수한 저해 활성을 확인할 수 있었다. 이상의 연구 결과들로부터 골든크로쿠스비늘줄기 추출물은 항산화 활성 및 미백 효능이 있음을 확인하였으며, 특히 70% 에탄올 추출물에서 높

은 효능으로 최적의 추출 조건임을 확인하였다. 골든크로쿠스비늘줄기 추출물은 천연 소재의 기능성 화장품 원료로서 다양한 이용이 가능할 것으로 기대되며, 현재 골든크로쿠스비늘줄기 추출물을 활용한 세포 실험과 화장품 제형에 직접 적용한 실험을 후속 실험으로 진행 중에 있다.

References

- H. J. Son, W. Whang, and E. J. Lee, The antioxidant activities and whitening effect *Prunus domestica* L. extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**(4), 688 (2017).
- N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem Photobiol.*, **74**(2), 283 (2001).
- V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**(4), 324 (2007).
- O. H. Yoon, B. Jeong, E. Kim, and Y. Jeong, Chemical composition and antioxidant activities of *Prunus salicina* Formosa produced in Gimcheon, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **40**(3), 379 (2011).
- N. Puizina-Ivic, Skin aging, *Acta Dermatoven.*, **17**(2), 47 (2008).
- A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
- M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
- H. J. Yang, E. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Psidium guajava* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **34**(3), 233 (2008).
- H. U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415 (2000).
- G. M. Williams, C. X. Wang, and M. J. Iatropoulos, Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies, *Food Chem. Toxicol.*, **28**(12), 799 (1990).
- A. L. Branen, Toxicology, and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J Am Oil Chem Soc.*, **52**(2), 59 (1975).
- H. M. Seog, M. S. Seo, H. M. Kim, M. S. Ahn, and Y. T. Lee, Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**(5), 59 (2002).
- J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(12), 982 (1994).
- E. J. Kwon, H. J. Park, M. M. Kim, K. R. Lee, I. Hong, D. G. Lee, and Y. H. Oh, Effect of *Ulmus macrocapa* ethanolic extracts on anti-oxidant activity and melanin synthesis in B16F1 cells, *J. Life. Sci.*, **24**(9), 946 (2014).
- J. J. Ahn, T. Y. Hwang, and H. S. Kim, Study on the physiological activities of *Cleyera japonica* extract, *Korean J. Plant Res.*, **28**(2), 153 (2015).
- E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee, The antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomogi* extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(1), 89 (2012).
- T. Aburjai, M. Hudaib, R. Tayyem, M. Yousef, and M. Qishawi, Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region, *J. Ethnopharmacol.*, **110**(2), 294 (2007).
- R. Nørbaek, J. K. Nielsen, and T. Kondo, Flavonoids from flowers of two *Crocus chrysanthus-biflorus* cultivars: "Eye-catcher" and "Spring Pearl" (Iridaceae), *Phytochemistry*, **51**(8), 1139 (1999).
- G. Zengin, M. Z. Aumeeruddy, A. Diuzheva, J. Jekó, Z. Cziáky, A. Yıldızugay, E. Yıldızugay, and M. F. Mahomoodally, A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC-MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties, *J Pharm Biomed Anal.*, **164**, 581 (2019).
- Y. S. Han and E. S. Jung, A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extract, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **1**(1), 11 (2003).
- Y. K. Park, S. H. Choi, S. H. Kim, J. G. Han, and H. G. Chung, Changes in antioxidant activity, total phenolics

- and vitamin C content during fruit ripening in *Rubus occidentalis*, *Korea J. Plant Res.*, **20**(5), 461 (2007).
22. B. H. Kang and M. J. Ryu, Physiological activities of the Neem and the comfrey extracts as cosmetic ingredients, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **19**(2), 223 (2021).
 23. S. Y. Kim, C. R. Kim, H. M. Kim, M. Kong, J. H. Lee, H. J. Lee, M. S. Lim, N. R. Jo, and S. N. Park, Antioxidant activity and whitening effect of *Cedrela sinensis* A. Juss shoots extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **36**(3), 175 (2010).
 24. M. S. Blois, Antioxidant Determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 25. V. L. Singleton and J. A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *J. Enol. Vitic.*, **16**(3), 144 (1965).
 26. J. Y. Cha, J. J. Jeong, Y. T. Kim, W. S. Seo, H. J. Yang, J. S. Kim, and Y. S. Lee, Detection of chemical characteristics in hamcho (*Salicornia herbacea*) according to harvest periods, *J. Life Sci.*, **16**, 683 (2006).
 27. J. Y. Kim, Y. S. Maeng, and K. Y. Lee., Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(5), 635 (1995).
 28. J. Y. Cha, H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, B. S. Jun, and Y. S. Cho, Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts, *J. Life Sci.*, **19**(5), 652 (2009).
 29. K. A. Lee, K. T. Kim, H. J. Kim, M. S. Chung, P. S. Chang, H. Park, and H. D. Pai, Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction, *Food Sci. Biotechnol.*, **23**(2), 615 (2014).
 30. Z. Mohammadi, and F. A. Atik, Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst, *Int. J. Pharma Bio Sci.*, **2**(1), 609 (2011).
 31. C. Y. Lee, K. M. Kim, and H. S. Son, Optimal extraction conditions to produce rosemary extracts with higher phenolic content and antioxidant activity, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(4), 501 (2013).
 32. S. K. Choi, Q. M. Yu, E.J. Lim, and J. S. Seo, The effects of extraction conditions on the antioxidative effects of extracts from campbell early and muscat bailey a grapevine leaves, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**(2), 168 (2013).
 33. C. Rice-Evans, N. Miller, and G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, **2**(4), 152 (1997).
 34. S. O. Lee, H. J. Lee, M. H. Yu, H. G. Im, and I. S. Lee, Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **37**(2), 233 (2005).
 35. H. J. Jeong, S. B. Park, S. Kim, and H. K. Kim, Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentration, *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **36**(12), 1491 (2007).
 36. I. Han and J. H. Kim, Antioxidant and physiological activities of water and ethanol extracts of diverse parts of welsh onion, *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **46**(4), 426 (2017).
 37. S. B. Han, S. K. Kwon, B. J. Kong, K. J. Kim, and S. N. Park, Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 295 (2013).
 38. M. J. Choi, Skin whitening efficacy of mixed extracts of *Crassostrea gigas*, *Trichosanthes cucumeroides*, *Angelica dahurica* and *Asarum sieboldii*, *Asian J. Beauty. Cosmetol.*, **20**(2), 157 (2022).
 39. I. H. Kim and J. H. Lee, Skin whitening and anti-wrinkle effects of chambrum (*Amaranthus mangostanus*), *Asian J. Beauty. Cosmetol.*, **20**(1), 21 (2022).
 40. Y. Jin, S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row, Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **16**(3), 348 (2005).
 41. Y. S. Han and E. S. Jung, A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extracts, *Asian J. Beauty. Cosmetol.*, **1**(1), 11 (2003).