J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 33, No. 2, June 2007, 79-86

천연한방소재인 연교 추출물의 미백 효과에 관한 연구

이 정 노† · 박 재 희 · 김 상 우 · 유 영 경 · 이 강 태 · 이 건 국

코리아나 화장품 송파기술연구소
(2007년 5월 30일 접수, 2007년 6월 8일 채택)

A Study on the Whitening Effect of the Oriental Medicinal Herb *Forsythia suspensa* Fruit as a Cosmetic Ingredient

Jung Noh Lee†, Jea Hee Park, Sang Woo Kim, Young Kyoug Yoo, Ghang Tai Lee, and Kun Kook Lee

Coreana Cosmetic Songpa R&D Center, 204-1 Jeongchon-ri Senggeo-eup, Cheonan-si 330-833, Korea
(Received May 30, 2007; Accepted June 8, 2007)

요 약: 본 연구는 연교 추출물과 연교 추출물에서 분리한 활성물질의 멜라닌 생성 억제 효과에 관한 것이다. 연교 추출물은 0.1 ~ 1.0 % (v/v)에서 세포독성이 없는 것을 확인하였으며 이를 바탕으로 멜라닌 생성억제 실험결과 1.0 %에서 63.1 ± 3.1 % 저해 효과를 확인하였다. 또한 활성물질을 분리하여 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, Mass analysis 등의 기기분석 결과 리그난 계열의 활성물질인 4-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl)]dihydro-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-2(3H)-furanone (arctigenin)으로 동정되었다. 활성물질에 대한 멜라닌 저해효과를 확인한 결과 농도 의존적으로 3.0 μg/mL에서 52.7 ± 3.1 %를 저해하는 것을 확인하였다. 또한 연교 추출물을 3 % 함유한 크림의 미백효과에 대한 임상실험을 진행한 결과 전문의의 육안평가와 기기평가 모두 통계적으로 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 결론적으로 연교 추출물은 미백 효능을 갖는 화장품 소재로서의 개발 가능성이 클 것으로 기대된다.

Abstract: The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of *Forsythia suspensa* fruit extracts (FSfE) (0.1 ~ 1.0 %) and their active component on melanogenesis. FSfE dose-dependently inhibited melanin synthesis (up to 63.1 ± 3.1 % at the concentration of 1.0 %) without cell cytotoxicity. We purifed one active compound from FSfE and identified its structure. It was identified as 4-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl)]dihydro-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-2(3H)-furanone (arctigenin) by ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, and Mass analysis. Arctigenin also inhibited melanin synthesis in a dose dependent manner (up to 52.7 ± 3.1 % at the concentration of 3.0 μg/mL). In order to verify the whitening activity of the cream containing 3 % FSfE, we performed the clinical test with twenty five female volunteers for 8 weeks. Bioengineering analyses and visual assessment by doctors at the initial time point and 8 weeks after applications showed that cream containing FSfE have significant whiteining effect (paired *t*-test). From the results, we conclude that the FSfE can be used as a useful whitening agent.

Keywords: *whiteing agent, Forsythia suspensa fruit extracts (FSfE), melanogensis, arctigenin*

1. 서 론

피부는 다양한 외부의 환경으로부터 우리의 내장 기관을 보호하는 가장 큰 기관인 동시에 우리 몸의 최전선에 존재하는 기관이다. 피부 내에는 여러 가지의 보호 기능을 담당하는 세포들이 존재하게 된다. 피부의 최외각층에서 이물질의 침입을 억제하는 케라티노사이트(keratinocytes), 피부 내의 면역을 담당하는 랑겔한스세포(Langerhans cells), 마크로파지(macrophage), 진피에서 매트릭스를 구성하며 피부 조직을 견고하게 유지시켜 주는 섬유아세포(fibroblasts), 외부 자극으로 인해 발생하는 피부 내의 유해산소, 자외선 차단 등을 담당하는 멜라닌을 만드는 멜라노사이트(melanocytes) 등이 대표적으로 존재한다. 특히 멜라노사이트는 외부의 자극으로부터 쉽게 반응하며, 그 결과물로써 멜라닌을 생합성하는데 생성된 멜라

† 주 저자 (e-mail: jnlee200@coreana.co.kr)

닌은 피부의 손상을 최소화 하는 역할을 수행하게 된다. 그러나 이러한 멜라닌이 과량으로 생성되게 되면 피부는 부분적으로 색소 침착현상이 발생하게 되어 피부가 거뭇거뭇하거나 칙칙해지는 현상이 발생하게 된다. 화장품 업계에서는 이러한 것을 피부 색소 침착이라고 정의하며 이를 해결하기 위한 화장품 개발에 많은 연구를 수행하고 있다. 즉, 피부 기저층에 존재하는 멜라노사이트에서 생성되는 멜라닌 생성과 관련된 기작을 이해하고 멜라닌 과다생성을 해결할 수 있는 방법들을 찾는 것에 초점을 맞추어 연구를 수행하고 있다. 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 요인일 뿐만 아니라 자외선 흡수 작용, 자유 라디칼 소거작용과 같은 피부 보호 작용의 역할도 수행한다[1]. 그러나 우리의 피부는 외부의 환경 변화[자외선(UVA, UVB, UVC), 스트레스, 대기오염, 염증반응]에 의해 쉽게 피부가 반응을 하고 이에 따라 피부세포가 반응을 하고 멜라노사이트에 직·간접적으로 영향을 주어 멜라닌 과생성이 일어나고 결과적으로 피부 색소 침착 현상(skin pigmentation) 등의 부작용이 일어나게 된다. 피부 외적인 자극에 의해 우리 피부는 다양한 경로를 통해 반응하게 되는데 대표적인 것이 케라티노사이트, 랑겔한스세포 등에 의해 분비되는 paracrine factor들이다. 즉, 외부 자극에 의해 생성 촉진되는 물질은 멜라노사이트 자극 호르몬(alpha-melanocyte stimulating hormone: α-MSH)[2], 엔도쎄린(endothelin)[3], NO (nitric oxide)[4] 등 다양하며 이러한 인자들은 피부 내의 멜라노 사이트를 자극하여 멜라닌의 생성을 촉진하거나, dendricity, 멜라닌 생성 촉진 인자(tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, cAMP)에 영향을 주어 멜라닌 생성을 야기시켜 멜라닌이 피부에 과다하게 침착되는 것을 유도하게 된다[5]. 멜라노사이트에서의 멜라닌 합성 과정을 살펴보면 다음과 같다. 먼저, 세포 내의 티로신(tyrosine)을 기질로 하여 티로시나제가 도파크롬(DOPAchrome)을 생성하고 도파크롬은 도파퀴논(DOPAquinone)을 생성시키며, 도파퀴논으로부터 자동산화 반응과 효소반응을 거쳐 공중합체인 멜라닌이 생성된다. 일반적으로 멜라닌 생성을 억제하는 기본적인 반응은 티로시나제의 활성을 억제하여 주는 것인데 대표적으로 알부틴(arbutin), 글라브리딘(glabridin), 코직산(kojic acid) 등의 미백제가 이러한 기능을 가지고 있다. 그러나 최근 들어서는 티로시나제 활성을 억제하지 않으면서 멜라닌 생성을 억제하는 물질들의 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 예를 들면 티로시나제 합성 유전자의 전사를 억제하여주는 물질[6], 엔도쎄린-1의 신호전달을 억제하여주는 물질, 멜라노좀 트랜스퍼를 억제하여주는 물질[7], α-MSH antagonist[8] 등이 있다. 한편 본 연구에서 사용된 연교(*Forsythia suspensa*)는 물푸레나무과에 속하는 개나리의 과실로 한방과 민간에서는 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결혈, 나력, 옴, 해독 등에 널리 사용되고 있다[9]. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan 류(pillygenin, pinoresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside 류(pillyrin, pinoresinol-β-D-glucoside, arctin, matairesinoside), flavonoid (rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl flycoside 류(forsythiaside, acteoside, suspensaside)가 보고되어 있다[10]. 그 중 philyrin이 혈압 강화작용이 있으며, pinoresinol과 pinoresinol-D-glucoside가 cyclic AMP-phosphodiestrerase 활성을 억제 및 혈압강화 작용이 있다고 보고되었다[11]. 또한 phenylpropanoid glycosides는 항균작용, 3β-acetoxy-20, 25-epoxydammarane-24-ol은 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다[12].

본 연구에서는 연교 추출물의 멜라닌 생성억제에 의한 미백효과를 확인하였고 생리활성 물질인 리간드계열의 actigenin을 유효성분을 분리하였다. 또한 연교 추출물의 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하기 위해 임상실험을 실시하여 미백효과 등을 평가하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 연교는 국내산으로 경동시장에서 직접 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 시약들은 Sigma (USA)사 제품으로 사용하였다. 또한 Mouse meanoma cell line B16-f1 cells은 ATCC에서 분양 받아 사용하였다. 실험에 사용된 기기는 evaporator (EYELA, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, USA), steam generator (Vaporzone 707, Taiwan)를 사용하였다.

2.2. 연교 추출물의 제조

본 실험에 사용된 연교는 국내 약초시장인 경동시장에서 구입하였다. 그늘진 곳에서 건조한 연교 1 kg을 분쇄하여 70 % ethanol 6 L로 환류하면서 3 h씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 50 % butylene glycol에 용해하여 실험에 사용하였다.

2.3. 유효성분의 분리 및 정제

70 % ethanol을 이용한 농축액을 극성 차를 이용하여 n-hexane, chloroform ($CHCl_3$), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol 및 water 분획으로 나누었다. 이 분획 중 활성에 효과가 있는 분획을 silical gel, HP-20, sephadex LH20을 이용한 컬럼크로마토그래피, 재결정 등을 실시하

여 활성 물질을 얻었다.

2.4. 연교추출물의 미백효과

2.4.1. 세포배양

Mouse meanoma cell line B16-f1 cells은 한국세포주은행에서 구입하였으며, DMEM에 10 % FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 ℃, 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80 ~ 90 %의 confluency에서 실험하였다.

2.4.2. 연교 추출물 및 arctigenin의 세포 생존에 미치는 영향

B16-f1 melanoma cells를 10 % FBS가 함유된 DMEM으로 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 100 mL씩 넣고 5 % CO_2, 37 ℃ 조건하에서 24 h 동안 배양한다. 배양 후 배양액을 제거하고 시험액(연교 추출물 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 %, arctigenin 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 μg/mL)을 α-MSH가 있는 조건 및 α-MSH가 없는 조건 두 가지로 준비하여 각 그룹 당 3개의 well에 처리한 뒤 5 % CO_2, 37 ℃ 조건으로 24 h 배양한다. 이때, 대조군은 연교 추출물 혹은 arctigenin을 첨가하지 않은 것과 α-MSH만 첨가한 것으로 한다. 배양 후 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였다.

2.4.3. 연교 추출물 및 arctigenin의 멜라닌 생성 억제 효과

B16-f1 melanoma cells를 10 % FBS 가 함유된 DMEM으로 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 2 mL씩 넣고 5 % CO_2, 37 ℃ 조건 하에서 24 h 동안 배양한다. 배양 후 배양액을 제거하고 시험액(연교 추출물 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 %, arctigenin 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 μg/mL)을 10 % FBS 함유 DMEM 배양액에 넣고, 여기에 성장인자로 α-MSH (100 nM)를 첨가하였으며, 5 % CO_2, 37 ℃ 조건으로 72 h 동안 배양한다. 이때, 대조군은 연교 추출물 혹은 arctigenin을 첨가하지 않고 α- MSH만 첨가하였다. 배양 후 배양액을 제거하여 PBS로 3회 세척하고 이것을 trypsin-EDTA로 처리하여 세포 pellet을 회수한다. 회수된 pellet은 10,000 rpm으로 10 min 동안 원심 분리한 다음 상등액을 제거한다. 그리고 이 세포 pellet을 70 ℃에서 건조한 후 10 % DMSO가 함유된 1 M NaOH 400 μL를 넣어 90 ℃ 항온조에서 세포내의 멜라닌을 얻는다. 이 액 100 μL를 96-well plate에 넣고 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 양을 구한다. 시험물질의 유의성 여부는 *t*-test를 통해 생물학적 통계기준($p < 0.05$)에 맞추어 확인하였다. 멜라닌 표준 정량 곡선은 아래 표와 같이 표준액을 희석하여 96-well plate에 100 μL가 되게 하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다.

2.5. 피부안전성 시험

2.5.1. 인체 첩포시험(Irritation Test)

피부일차 자극을 평가하기 위한 인체 첩포시험을 CTFA 가이드라인에서 제시한 방법에 약간의 변형을 가하여 실시하였다. 평소 피부 질환 및 알러지가 없는 15명의 피험자를 대상으로 실시하였으며, 연령분포는 24 ~ 34세, 평균은 28세였다. 우선, 첩포 부위인 전박을 물로 닦아내고 건조시킨 후, 시험물질이 적용된 finn chamber를 시험 부위에 첩포하였다. 24 h 후에 첩포를 제거하고 30 min, 24 h, 48 h에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 international contact dermatitis research group (ICDRG)의 판정기준에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{Mean Score} = \frac{\text{Grade No. of responses} \times 100 \times \frac{1}{3}}{3\,(\text{Maximum grade}) \times 15\,(\text{Total subjects})}$$

Grade Score	Score	
-	0	No reaction
+-	0.5	Weak postive reaction (erythema)
+	1	Moderate positive reaction (erythema)
++	2	Strong positive reaction (erythema,edema)
+++	3	Severe positive reaction (erythema, edema, vesicle)

2.5.2. 자극감 시험(Stinging Potential Test)

연교 추출물을 함유하는 크림의 주관적 자극을 평가하기 위하여 자극감 시험을 수행하였다. Stinger는 steam generator (Vaporzone 707, Taiwan)를 사용하여 15 min 동안 충분히 sweating 시키고 나서 충분량의 시료를 손에 묻혀 시험물질을 각각 왼쪽과 오른쪽의 코 주위 및 뺨을 중심으로 강하게 비빈다. 20명의 피험자(남자 10명, 여자 10명)를 대상으로 실시하였으며 연령 분포는 23세 ~ 33세, 평균 연령은 29세였다. 피험자들은 주관적인 자극(stinging, itching, burning, and etc.)의 자극 정도를 평가하게 된다. 즉 0 = 자극 없음, 1 = 자극 약간 있음, 2 = 자극이 강함, 3 = 자극이 매우 강함으로 표시하였다. 또한, 적용 후 자극 반응이 나타나는 시간에 따라 30 s, 2.5 min, 5 min, 8 min 등의 4구분으로 나눴으며, 30 s 이내에 나타나는 경우를 intense stinging (4점), 2.5 min mild

stinging (3점), 5 min moderate stinging (2점), 그리고 8 min 이내에 나타나는 경우를 delayed stinging (1점)으로 구분하여 평가하였다. 자극의 정도는 하기의 공식으로부터 계산된 자극양성율로 판정하였다.

$$\text{Response rate}(\%) = \frac{\text{Response score} \times 100}{\text{Maximum score}\ (30 \times \text{totalsubjects} \times \text{No.of response})}$$

2.6. 연교추출물 함유 크림의 피부 미백효과

연교추출물 함유 크림의 피부 미백 효과에 대한 효능을 평가하기 위해 27세에서 45세까지의 여자 25명을 선별하여 인위적으로 색소 침착된 팔 부위에 대조 제품과 시험제품을 8주 동안 도포하였다. (주)엘리드 피부 과학연구소에서 실시하였다.

2.6.1. 피부과 전문의에 의한 육안평가

시험부위의 피부 색상은 두 명의 피부과 전문의에 의해 평가되었다. 자외선 조사에 의한 마지막 인공 색소침착 후(0.7 MED 3회 조사 후 7일 경과 후)(0 week), 4주 경과 후(4 weeks), 6주 경과 후(6 weeks), 8주 경과 후(8 weeks) 피험자들 대상으로 8단계로 구분하여 평가하였다.

Rating	Description
0	None
1	None / mild pigmented
2	Mild pigmented
3	Mild / moderate pigmented
4	Moderate pigmented
5	Moderate / severe pigmented
6	Severe pigmented
7	Very severe pigmented

2.6.2. 기기적 평가

Chromameter CR-400(Minolta, Japan)에 의한 피부 밝기 측정은 색소 침착된 부위의 L^*, a^*, b^* value의 변화를 측정하여 평가하였다. 평가는 자외선 3회 조사 뒤 7일 경과 후(0 week), 제품 도포 4주 경과 후(4 weeks), 6주 경과 후(6 weeks), 8주 경과 후(8 weeks) 피험자들 대상으로 Chromameter CR-400의 L^*, a^*, b^* value를 측정하였다. Chromameter는 사람에 의해서 인지되는 색들을 세 가지 인자로 구성된 디지털 코드로 전화하는 장비로 화장품 연구에 있어 피부색 측정을 위해 널리 사용되고 있다. L^*, a^*, b^* value는 각각 다음과 같은 parameter이다[13].

L^*: 밝기
a^*: green-to-red spectrum
b^*: blue-to-yellow spectrum

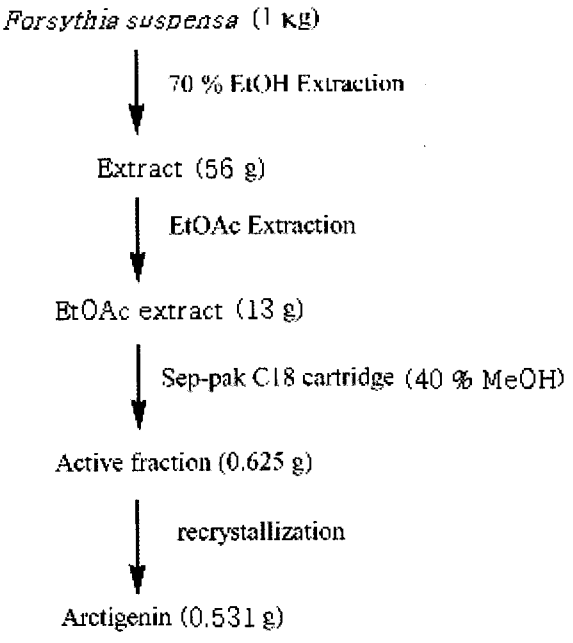


Figure 1. Isolation procedure of arctigenin from *Forsythia suspensa*.

이때 a^*, b^*는 chrominance parameters (색채인자)이고, L^*는 luminance parameters (채도인자)이다.

2.6.3. 통계분석

전문가에 의한 육안평가는 paired t-test를 통해 대조제품과 시험제품간의 유의성 여부를 가설 평균차 5 %로 확인하였다. Chromameter (CR-400)을 사용한 기기적 평가는 paired t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설 평균차 5 %로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 연교 추출물의 유효성분 정제

연교 1 kg을 70 % ethanol로 추출하여 농축시키고 동결건조기를 이용하여 파우더형태로 56 g을 얻었다. 파우더를 100 % 물을 가하여 용해시킨 후, 이를 n-hexane 500 mL를 이용하여 탈지, 탈색을 시켰다. 이를 EtOAc 약 1 L를 가하여 EtOAc fraction을 농축하여 13 g의 농축물을 얻었다. 이를 MeOH로 Diaion HP-20 이온수지를 칼럼에 충진시킨 후 물, 10 %, 20 %, 40 %, 50 %에서 각각 용출시킨 후 농축시켰다. 이를 benzene과 ethylether (1 : 1)에서 재결정을 잡아 0.531 g의 arctigenin을 얻었다. 이를 Figure 1에 간단히 묘사하였다. 이를 기기분석을 실시하였다. ^{1}H NMR (300 MHz, Me_2Co-d_6) δ: 2.54 (4H, br), 2.84 (2H, br), 3.72 (6H, s), 3.80 (3H, s), 6.50-6.82 (6H,

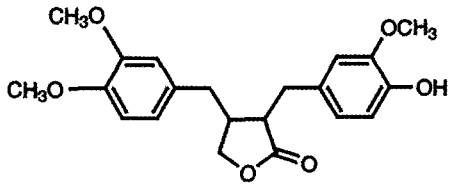
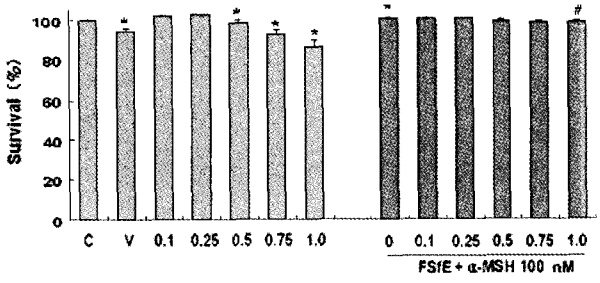


Figure 2. Chemical structures of a arctigenin isolated from *Forsythia suspensa*.



C : control, V : vehicle
FSfE : *Forsythia suspensa* fruit extracts
*p-value < 0.05

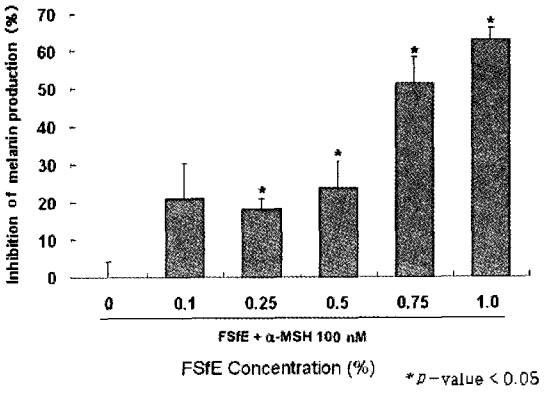
(A)

		Mean ± S.D. (%)
Control		100.0 ± 0.6
Vehicle		95.7 ± 1.1
α-MSH 100 nM		101.4 ± 0.3
FSfE (%)	0.1	101.9 ± 0.5
	0.25	102.3 ± 0.7
	0.5	99.1 ± 1.4
	0.75	92.9 ± 2.2
	1.0	86.4 ± 4.0
α-MSH + FSfE (%)	0.1	100.6 ± 0.8
	0.25	101.0 ± 0.2
	0.5	99.4 ± 0.9
	0.75	98.7 ± 0.9
	1.0	98.6 ± 0.9

(B)

Figure 3. Cell viability of *Forsythia suspensa* fruit extracts (FSfE) and α-MSH on B16-f1 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of FSfE for 24 h. The cell viability was measured by the MTT method. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments.

m), ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ: 34.5, 38.3, 40.9, 46.5, 55.7, 71.3, 129.4, 110.8, 111.3, 113.9, 114.3, 121.2, 121.9 129.5, 146.4, 144.3, 144.2, 146.5, 178.6: MS (m/z) M+ = 372, m/z = 221, 194, 178, 151, 137 (100), 107, 91, 73 data를 확인한 결과 arctigenin으로 동정되었다.



*p-value < 0.05

(A)

		Mean ± S.D. (%)	p-value
α-MSH 100 nM		0 ± 4.3	0.004
α-MSH + FSfE (%)	0.1	20.9 ± 9.5	0.116
	0.25	18.1 ± 2.8	0.024
	0.5	23.6 ± 7.2	0.048
	0.75	51.5 ± 7.0	0.003
	1.0	63.1 ± 3.1	0.0003

(B)

Figure 4. The inhibitory effect of FSfE on melanin production in B16-f1 melanoma cells. The cells were incubated with arctigenin for 72 h. Melanin quantified by absorption at 490 nm calibrated with synthetic melanin as standard. FSfE decreased the intracellular melanin contents at treated concentration.

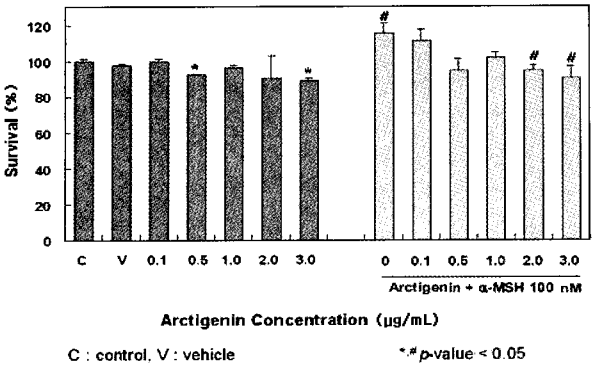
3.2. 연교추출물의 미백효과

3.2.1. 연교 추출물의 세포 생존에 미치는 영향에 대한 시험

연교 추출물의 세포독성 측정과 실험에 사용할 농도범위를 결정하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 세포독성을 측정한 결과 α-MSH를 처리한 연교추출물과 연교 추출물이 최대 1.0 %까지 B16-f1 melanoma cells에서 세포생존에 영향이 없는 것으로 확인되어 이후 실험에서는 1.0 % 이하의 농도로 실험을 진행하였다(Figure 3).

3.2.2. 연교 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

연교 추출물에 대한 α-MSH를 처리한 B16-f1 melanoma cells에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정한 결과, Figure 4에서 보듯이 연교 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해 되었으며 1.0 %에서 약 63.1 %의 멜라닌 생성 저해효과가 있었다.



(A)

		Mean ± S.D. (%)
Control		100 ± 1.1
Vehicle		110.3 ± 5.6
α-MSH 100 nM		138.4 ± 6.6
Arctigenin (μg/mL)	0.1	119.0 ± 1.7
	0.5	110.3 ± 0.8
	1.0	115.3 ± 1.3
	2.0	107.6 ±15.6
	3.0	106.7 ± 1.5
α-MSH + arctigenin (μg/mL)	0.1	133.3 ± 6.7
	0.5	113.0 ± 7.6
	1.0	121.3 ± 4.0
	2.0	113.0 ± 4.0
	3.0	108.1 ± 7.7

(B)

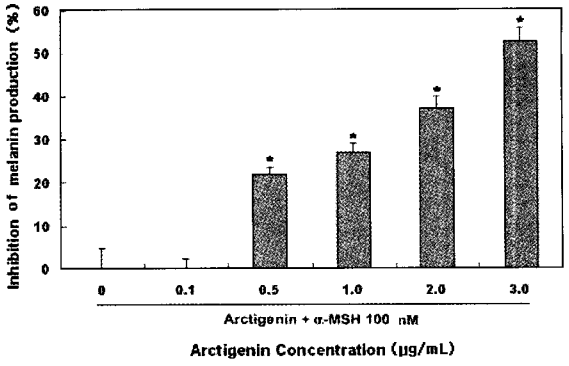
Figure 5. Relative cell viability of arctigenin and α-MSH on B16-f1 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of arctigenin for 24 h. The cell viability was measured by the MTT method. Results are means ± S.D. from 3 seperate experiments.

3.2.3. Arctigenin의 세포 생존에 미치는 영향에 대한 시험

Arctigenin의 농도에 따른 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. B16-f1 melanoma cells에 0.01 μg/mL부터 5.0 μg/mL까지 다양한 농도로 실험한 결과 arctigenin 3.0 μg/mL 이하에서 90 % 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, melnogenesis inhibition assay에서도 동일한 농도로 실험하였다(Figure 5).

3.2.4. Arctigenin의 멜라닌 생성 억제 효과

Arctigenin에 대한 α-MSH를 처리한 B16-f1 melanoma cells에서의 멜라닌 생성 억제 효과는 Figure 6에서 보여주는 것과 같이 0.5 μg/mL에서는 21.9 % ± 1.6, 3.0 μg/mL에서는 52.7 ± 3.1 %로 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제하였다.



(A)

		Mean ± S.D. (%)	p-value
α-MSH 100 nM		0 ± 4.8	0.0007
α-MSH + arctigenin (μg/mL)	0.1	-12.2 ± 2.2	0.086
	0.5	21.9 ± 1.6	0.012
	1.0	26.9 ± 2.2	0.007
	2.0	37.2 ± 2.6	0.0024
	3.0	52.7 ± 3.1	0.0008

(B)

Figure 6. The inhibitory effect of arctigenin on melanin production in B16-f1 melanoma cells. The cells were incubated with arctigenin for 72 h. Melanin quantified by absorption at 490 nm calibrated with synthetic melanin as standard. Arctigenin decreased the intracellular melanin contents at treated concentration.

3.3. 인체첩포시험과 자극감시험

연교 추출물의 누적첩포자극 및 주관적 자극에 대한 평가를 실시한 결과, 연교 추출물을 함유한 제형은 무자극으로 판정되었다. 자극감 시험에서는 연교 추출물을 함유하지 않는 대조 크림과 비교하였을 때 무자극으로 판정되었다(Figure 7).

3.4. 연교 추출물 함유 크림의 피부 미백효과

3.4.1. 전문의에 의한 육안 평가

전문의의 육안평가에 의한 분석 결과, 8주 경과 후 인공색소 침착된 시험 부위에서 제품 사용에 따른 대조제품과 시험제품간의 육안 평가 변화 결과 Figure 8에서 알 수 있듯이 연교 추출물을 함유한 시험제품과의 값을 비교해 보면 시험제품은 -3.2 ± 1.6, 대조제품은 -2.8 ± 1.1, ($p < 0.05$)으로 시험제품은 대조제품에 비해 통계학적으로 유의한 미백 효과를 관찰 할 수 있었다.

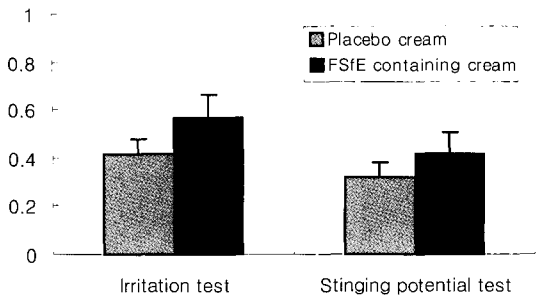


Figure 7. Results of skin irritation & stinging potential test.

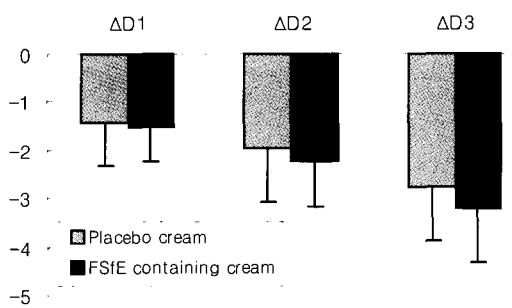


Figure 8. Results of visual assessment by doctors of dermatology. △D1 = 4 weeks ~ 0 week, △D2 = 6 weeks ~ 0 week, △D3 = 8 weeks ~ 0 week.

3.4.2. 기기적 평가

제품 사용기간에 따른 대조제품과 시험제품의 기기적 평가를 통한 L^* value(피부밝기변화)를 분석한 결과, 8주 경과 후 대조제품과 시험제품간의 L^* value가 시험제품은 4.2 ± 1.5, 대조제품은 3.8 ± 1.5, ($p < 0.05$)으로 시험제품은 대조제품에 비해 통계학적으로 유의한 미백효과를 나타내었다(Figure 9).

4. 결 론

연교 추출물은 위 시험에서 보여주는 것과 같이 B16-f1 melanoma cells에서 연교 추출물 1.0 % 일 때, 멜라닌 생성을 63.1 % 저해하는 것으로 보아, 연교 추출물은 멜라닌 생성 억제 효과가 매우 높은 것으로 나타났다. 이 값은 다른 미백원료와 비교해 볼 때 매우 높은 결과로서 연교 추출물이 매우 뛰어난 미백 효과가 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다. 또한 연교 추출물로부터 arctigenin이라는 활성 성분을 분리하여 이 물질의 멜라닌 생성 억제 효과를 규명하였다. 그 결과 연교 추출물의 미백 효과는 arctigenin에 의해 그 주요 효능이 나타나는 것을 확인 하였다. 연교 추출물의 피부안전성시험에도 문제가 없는 것으로 확인되었다. 또한 연교 추출물을 함유한 크림의 미백 효과에 대한 임상결과 피부가 전문의에 의한 육안평가와 Chromameter CR-400에 의한 기기 평가 모두에서 통계학적으로 유의한 미백 효과($p < 0.05$)를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 보면 연교 추출물은 안전성이 매우 높으며 뛰어난 미백 효과를 가지고 있어, 매우 우수한 미백 화장품 원료로 개발 될 수 있을 것이다.

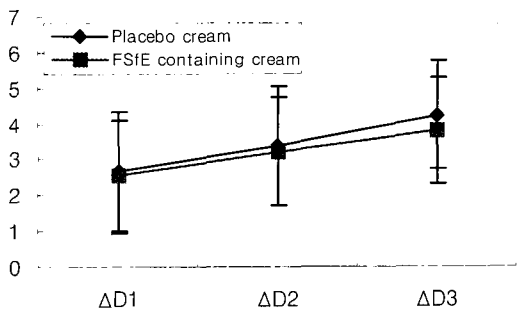


Figure 9. Changes in the L^* values of spectrometer by Chromameter CR-400.

참 고 문 헌

1. G. Prota, Pigment cell research; what directions?, *Pigment cell research*, **10**, 5 (1997).
2. K. Wakamatsu, A. Graham, D. cook, and A. J. Thody, Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor, *Pigment cell research*, **10**, 288 (1997).
3. U. Yada, Effects of endothelin on signal transduction and proliferation in human melanocytes, *J. Bio. Chem.*, **266**(27), 18352 (1997).
4. T. Horikoshi, M. Nakahara, H. Kaminaga, M. Sasaki, H. Uchiwa, and Y. Miyachi, Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in Guinea pig skin, *Pigment cell research*, **13**, 358 (2000).
5. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment cell research*, **13**, 60 (2000).
6. H. M. Aoki, Identification of a new microphthalmia (Mi)-interacting protein, rKr2, involved in the regulation of melanogenesis, *IFSCC* (1998).
7. M. Seiberg, C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade-Gordon, M. Costanzo, M. Eisinger, and S. S. Shapiro, The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interaction, *Experimental cell research*, **254**, 25 (2000).
8. T. Motogawa, Inhibition of α-MSH induced me-

lanogenesis by sophorae radix extracts, *Fragrance J.*, **9**, 38 (2000).
9. T. J. Kim, Korean resource plants, 262, Seoul National University Pub., Korea (1991).
10. J. H. Kim, Y. H. Kho, M. R. Kim, H. A. Kim, S. M. Lee, and C. H. Lee, A caspase inducing inhibitor isolated from *Forsythiae fructus*, *Kor. J. Food. Sci. Technol.*, **34**(1), 114 (2002).
11. E. B. Lee and H. J. Keum, Pharmacological studies on *Forsythiae fructus*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **19**(4), 262 (1988).
12. S. Kitagawa, S. Nishibe, and H. Baba, Studies on the chinese crude drug "*Forsythiae fructus*". VIII. On isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of *Forsythiae koreana* and their antibacterial activity, *J. the Pharmaceutical Society of Japan*, **107**(4), 274 (1987).
13. N. Muizzuidin, K. Marenus, D. Maes, and W. P. Smith, Use of a chromameter in assessing the efficacy of anti-irritants and tanning accelerators, *J. Soc. Cos. Chem.*, **41**, 369 (1990).