

## Whitening Effect of Extracts and Fractions from *Diospyros kaki* calyx

Ju-Young Hwang, Tae-Soon Park and Jun-Ho Son\*

Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsansi, Gyeongbuk 712-260, Korea

Received December 4, 2012 / Revised February 18, 2013 / Accepted March 11, 2012

This study was performed to determine the whitening effect of several solvent fractions of *Diospyros kaki* extracts. Fractions from ethanol extracts of *D. kaki* were prepared by a systematic fractionation procedure using hexane, ethyl acetate, butanol, and H<sub>2</sub>O. The ethyl acetate fractions were used to evaluate the inhibitory effects on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Ethyl acetate fractions suppressed the expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells. These results showed that ethyl acetate fractions of *D. kaki* could be developed as a skin whitening material in cosmetics.

**Key words** : *Diospyros kaki*, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, melanin

### 서 론

피부가 자외선 자극을 받으면 각질형성세포(keratinocyte)에서 endothelin-1 (ET-1), 부신피질 자극 호르몬, 일산화 질소(NO) 등이 분비되어 피부색소가 증가하게 된다. 피부색소는 기저층에 존재하는 멜라닌 세포가 만들어내는 멜라닌의 함량에 의해 결정되며[11], 이러한 멜라닌은 자연계에 널리 존재하는 생체 고분자 물질로 자외선이나 자유 라디칼로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 역할을 담당하고 있다[17]. 오늘날 사람들은 사회활동의 증가, 환경오염에 따른 오존층 파괴로 인하여 유해 자외선에 장기 노출로 인한 멜라닌 침착 과다 현상으로 피부 흑화, 색소침착, 피부암등 피부 건강뿐만 아니라 미적 측면에서도 크게 영향을 받고 있다[6]. 특히 색소 침착과 같은 피부 흑화는 피부에 존재하는 멜라닌 합성이 원인이 되는 것으로 알려져 있다[27]. 멜라닌은 멜라닌형성세포 내에 위치하는 멜라노솜에 의해 만들어지며 형성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 피부 상피층에 축적되어 색소침착 현상이 나타난다[18, 20]. 멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 티로신을 기질로 티로시나아제에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공융합체인 멜라닌이 생성하게 된다[26]. 특히 효소인 티로시나아제는 멜라노사이트에서 멜라닌 색소의 합성에서 주요 핵심 효소로, 절대적으로 필요한 것으로 알려져 있고[8, 22, 28], 최근에는 이와

같은 효소를 억제하여 멜라닌 합성 저해를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[25, 29]. 현재 알려진 합성미백원료들은 사용 중 분해나 착색, 이취 등으로 인해 불안정하여 안정성 문제 등이 대두 되고 있다[4, 19, 30, 31]. 따라서 최근에는 세포에 영향을 미치지 않으며 멜라닌 합성을 감소시키는 천연 미백제에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 천연물을 원료로 한 미백 기능성 소재로는 신선초[23], 마황[32], 백출[5], 쨍레[7], 복분자[21] 추출물 등이 있으며 이외에도 많은 연구가 진행되고 있다.

감쪽지(*Diospyros kaki* calyx)는 한약명을 시체라고 말하며 민간요법에서는 기침과 천식, 만성기관지염 치료, 딸국질 멈춤, 야뇨증, 혈압강화작용에 효과적이라고 알려져 있다. 현재까지 감쪽지에 관한 연구로는 김 등[14]이 보고한 감쪽지 추출물의 항산화 및 항염증에 관한 활성이 알려져 있으며, 사 등[24]이 보고한 사람의 plasma에서 thrombin time (TT)를 사용한 혈액응고 저해 물질 연구와 백 등[1]이 보고한 *in vitro*와 *in vivo* 항혈전 효능 연구가 알려져 있으나 감쪽지의 미백효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 감쪽지 추출물과 용매별 분획물을 이용하여 티로시나아제 억제효과 측정과 B16F10 멜라노마 세포를 배양한 후 멜라닌 생성 억제효과와 티로시나아제 활성을 측정하고, 효과가 뛰어난 분획물을 western blotting을 이용하여 티로시나아제, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 측정하여 미백효과를 관찰하였다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-54-810-0320, Fax : +82-54-810-0399

E-mail : bio115@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### 재료 및 방법

#### 시료 추출

본 실험에 사용한 감쪽지는 경북 영천시에서 재배된 것으로 (주)휴먼허브에서 구입하여 사용하였다. 시료의 추출은 감쪽지 100 g을 시료 중량의 10배 양에 70% 에탄올을 가하여 상온에

서 24시간씩 3회 추출한 다음 filter paper (Whatman No. 2)로 여과한 뒤 감압농축기(EYELA N-300, Japan)로 농축한 후 동결 건조하여 에탄올 추출물(14.1 g)을 얻었다. 이후 용매추출법을 이용하여 극성도가 낮은 hexane으로 추출한 후, 다시 ethyl acetate와 butanol용매로 순차적으로 분획하였다. 각 용매 분획물은 감압농축기를 이용하여 용매를 모두 제거하여 농축한 뒤 동결 건조하여 핵산(4.2 g), 에틸아세테이트(10.7 g), 부탄올(35.1 g), 물(45.8 g)을 얻었다.

#### 시약

세포배양을 위한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin penicillin, trypsin 250은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, tyrosinase, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), kojic acid는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체 인 티로시나아제, TRP-1, TRP-2와 2차 항체는 Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 ELISA reader, 원심분리기, 현미경, CO<sub>2</sub> 배양기, 세포 수 측정기를 사용하였다.

#### 세포 배양

B16F10 멜라노마 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 사용하였으며, Michikaw 등[15]의 방법에 따라 배양하였다. 세포에 0.25% trypsin 용액을 희석 처리한 후 세포를 분리한 다음 DMEM배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 적응시켜 사용하였다.

#### MTT assay에 의한 세포 생존능력 측정

세포 생존률 측정은 Carmichael 등[2]의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well이 되게 180  $\mu$ l씩 분주하고, 시료를 농도 별로 20  $\mu$ l 처리한 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20  $\mu$ l를 첨가하여 3시간 처리 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 200  $\mu$ l를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정한 후 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times 100$ 에 의하여 생존율을 계산하였다.

#### 멜라닌 생성 억제 효과

멜라닌 양은 Hosoi 등[9]의 방법을 변형하여 사용하였다. B16F10 멜라노마 세포를 6 well에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 접종하여 배양하고, 각 well에 시료를 처리한 뒤 48시간 동안 배양한다. 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세

척한 후 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1 N NaOH 용액을 150  $\mu$ l 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 멜라닌 양은 무첨가군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

#### 티로시나아제 활성 측정

티로시나아제 활성 측정은 Choi 등[3]의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F10 멜라노마 세포를 6 well에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 시료를 처리한 뒤 48시간 동안 배양한다. 배양 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM PMSF, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/ml 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160  $\mu$ l에 효소용액 40  $\mu$ l를 가하고 37°C에서 1시간 반응시키고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정한 후 (1-시료의 흡광도/무첨가군의 흡광도) $\times 100$ 에 의하여 억제율을 계산하였다.

#### Western blot을 통한 미백 관련 단백질의 발현 측정

B16F10 멜라노마 세포를 6 well에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 well에 시료를 48시간 동안 처리한 뒤 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 세포를 용해시키고, 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 BCA (bicinchoninic acid) kit assay로 정량 하였으며, 60  $\mu$ l의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동 한 후, PVDF membrane에 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk로 1시간 동안 blocking을 한 뒤 1차 항체 tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 3% skim milk에 1:1,000으로 희석하여 사용하고 overnight하였다. Tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3번 세척한 뒤 2차 항체 anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit은 3% skim milk에 1:1,000으로 희석하여 1시간 동안 붙이고, TBST로 3번 세척한 뒤 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Milipore, Germany)를 이용하여 발현 양상을 측정하였다. 밴드 정량은 gel doc (Amersham Pharmacia, England)을 이용하여 확인하였다.

#### 통계처리

결과 통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance: ANOVA)으로 Tukey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

세포 생존 능력 측정

세포 수준의 연구에 많이 이용되고 있는 MTT assay는 세포 증식과 생존능의 *in vitro* 분석에 매우 유용하게 사용되고 있다 [10]. 감꼭지 추출물과 분획물에 의한 멜라노마 세포의 생존율을 확인한 결과(Fig. 1), 추출물과 분획물 모두 5 µg/ml의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 확인하였다. 따라서 본 실험을 바탕으로 B16F10 세포에 1, 5 µg/ml의 농도를 처리하여 멜라닌 생합성, 티로시나아제 활성 측정 및 단백질 발현정도 실험을 진행하였다.

멜라닌 생성 억제 효과

감꼭지 추출물과 분획물의 멜라노마 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정한 결과를 Fig. 2와 같이 나타내었다. 측정 결과 감꼭지 추출물은 5 µg/ml의 농도에서 무첨가군에 비해 멜라닌 생성을 13.2% 저해하였고, 합성 미백원료인 kojic산은 같은 농도에서 17.2% 저해하는 것을 관찰하였다. 분획물의 경우 5 µg/ml의 농도로 비교하였을 때, 에틸아세테이트 > 헥산 > 부탄올 > 물 순으로 멜라닌 생성이 억제되었고, 그 중 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 경우 5 µg/ml의 농도에서 43.2%의 멜라닌 생성을 억제하여 가장 뛰어난 활성을 관찰하였다. Jung 등[13]이 보고한 푸코이단의 경우 10 µg/ml의 농도에서 B16F10 세포 내 멜라닌 생성을 29.1% 억제한 결과와 비교하면 감꼭지 에틸아세테이트 분획물은 저농도에서 높은 활성을 나타내어 피부 색소 침착에 효능이 있는 미백 소재로 이용 가능

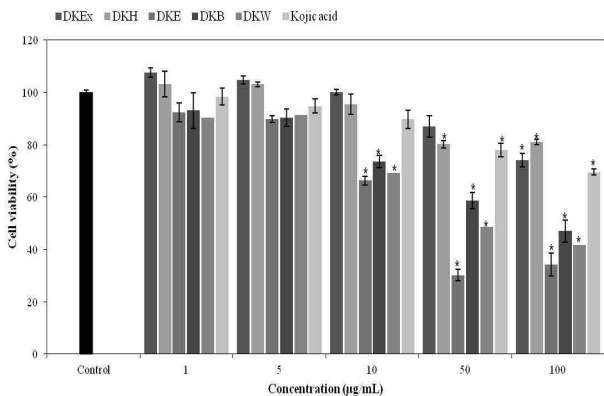


Fig. 1. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treatment with extract and fractions from *D. kaki* calyx. Results were expressed as % of control and data were means±SD. Significant differences were compared with control at \**p*<0.05 compared with no treatment. ■ *D. kaki* calyx extracted with 70% ethanol, ▒ Hexane extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Ethyl acetate extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Butanol extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Water extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Kojic acid.

할 것이라 사료된다.

티로시나아제 활성 측정

티로시나아제는 피부가 자외선에 노출되면 티로신에서 멜라닌 생성에 가장 중요하게 작용하는 효소로써 티로시나아제 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제 할 수 있으며 이로

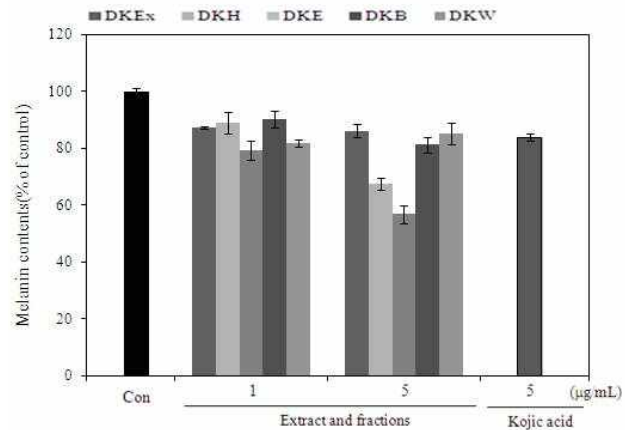


Fig. 2. Melanin synthesis effects of extract and fractions from *D. kaki* calyx. Results were expressed as % control and data were means±SD. Significant differences were compared with control at \**p*<0.05 compared with no treatment. ■ *D. kaki* calyx extracted with 70% ethanol, ▒ Hexane extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Ethyl acetate extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Butanol extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Water extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Kojic acid.

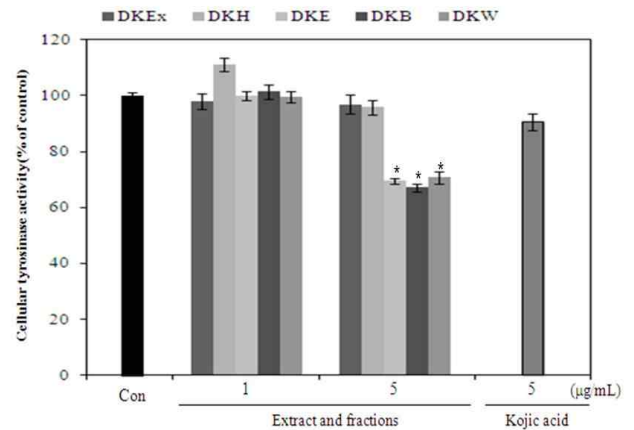


Fig. 3. Cellular tyrosinase activity effects of extract and fractions from *D. kaki* calyx. Results were expressed as % control and data were means±SD. Significant differences were compared with control at \**p*<0.05 compared with no treatment. ■ *D. kaki* calyx extracted with 70% ethanol, ▒ Hexane extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Ethyl acetate extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Butanol extracted from *D. kaki* calyx extract, ▓ Water extracted from *D. kaki* calyx extract, ▒ Kojic acid.

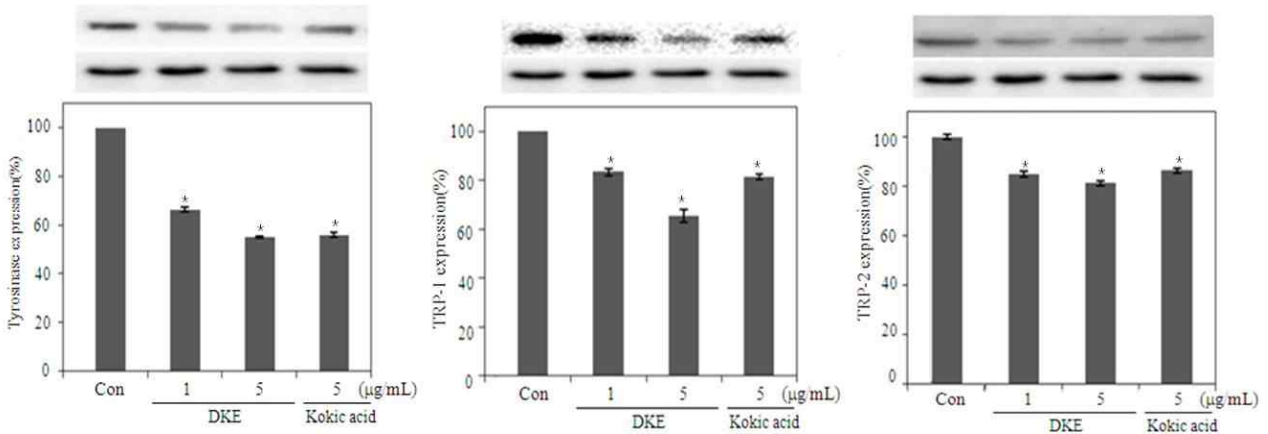


Fig. 4. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 expression effects of ethyl acetate fractions from *D. kaki* calyx. Results were expressed as % control and data were means±SD. Significant differences were compared with control at \* $p < 0.05$  with no treatment. ■ DKE: Ethyl acetate extracted from *D. kaki* calyx extract.

인해 기미, 주근깨, 노인성 홍반 등의 유발을 막을 수 있는 것으로 알려져 있다[12]. 감꼭지 추출물과 분획물을 농도 별로 처리 후 세포 내 티로시나아제 활성 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 감꼭지 분획물의 티로시나아제 활성은 5 µg/ml의 농도로 비교하였을 때, 부탄올 분획물의 경우 무첨가군에 비해 34%, 에틸아세테이트 분획물의 경우 32% 활성이 저해되어 비슷한 결과를 관찰 할 수 있었다. 코지산의 경우 5 µg/ml의 농도에서 무첨가군 보다 세포 내 티로시나아제 활성이 9.3% 저해함으로써 합성 미백원료 보다 감꼭지 분획물의 티로시나아제 저해활성 효과가 더 우수하였다.

Western blot을 이용한 단백질 발현의 측정

감꼭지 추출물과 분획물을 처리 후 세포 내 티로시나아제 저해와 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하여 에틸아세테이트 분획물의 우수한 효과를 입증하였다. 이와 같은 결과를 토대로 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하기 위하여 western blot을 이용하여 티로시나아제, TRP-1, TRP-2의 발현 양상을 측정하였다(Fig. 4). 이 중 TRP-1, TRP-2는 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)를 흑갈색으로 나타내는 IQCA (indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)로 전환시켜 최종적으로 멜라닌을 합성시키는 역할을 하며, 이들은 피부 미백제의 효능에 있어서 멜라닌의 생성을 억제하는 경로와 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 단계에 관여하는 효소의 활성 조절이 중요시 되고 있어 미백 효과의 검증 방법으로 널리 이용되고 있다[16, 19]. 감꼭지 에틸아세테이트 분획물을 1, 5 µg/ml로 처리하였을 때 무첨가군에 비해 유의성 있게 억제하였다. 티로시나아제의 경우 감꼭지 에틸아세테이트 분획물 5 µg/ml의 농도에서 무첨가군에 비해 44% 발현을 저해하였고, TRP-1의 경우 5 µg/ml의 농도에서 무첨가군에 비해 34% 발현을 저해하였고,

TRP-2의 경우 18% 저해함을 나타내었다. 김 등[15]이 보고한 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 경우 100 µg/ml의 농도를 처리하였을 때, 티로시나아제가 30.5% 저해하였고, TRP-1의 경우 41.5% 저해한 결과와 비교하였을 때 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 경우 저농도에서 높은 활성을 나타내어 미백 효과가 우수한 것으로 사료된다.

References

1. Baek, K. M. and Roh, S. S. 2011. Effects of aqueous extract of Diospyros Kaki Calyx on anti-thrombotic activity *in vitro* and *in vivo* *Korean J Herbology* **26**, 139-147.
2. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
3. Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharmacogn* **29**, 237-242.
4. Choi, Y. J. and Kim, J. 2006. A study on the propensity to consume oriental herbal cosmetics. *J Soc Cosmet Sci Korean* **32**, 283-229.
5. Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W., Baek, S. H. and Woo, W. H. 2001. Inhibitory effects of ethanol extract of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* **45**, 269-275.
6. Ferguson, C. A. and Kidson, S. H. 1997. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res* **10**, 127-138.
7. Ha, S. E., Kim, H. D., Park, J. K., Chung, Y. O., Kim, H. J. and Park, N. B. 2009. Melanogenesis inhibition effect of *Rosa multiflora* extracts in B16 melanoma cells. *Korean J Plant Res* **24**, 317-322.
8. Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* **5**, 2902-2909.
9. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. 1985. Regulation

- of melanin synthesis of B16 melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* **45**, 1474-1478.
10. Hwang, E. Y., Kim, D. H., Hwang, J. Y., Kim, H. J., Park, T. S., Lee, I. S. and Son, J. H. 2012. A study on the Depigmenting effect of *Carthamus tinctorius* Seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia* extracts. *Korean J Food Sci Technol* **44**, 76-81.
  11. Im, S. B., Lee, E. S., Kim, W. K., On, W. Y., Kim, J. H., Lee, M. O. and Kang, W. H. 2002. donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte. *J Korean Med Sci* **17**, 58-64.
  12. Jeon, M. J., Kim, M. H., Jang, H. J., Lee, S. W., Kim, J. H., Kim, H. S. and Lee, S. H. 2012. Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. *J Life Sci* **22**, 889-896.
  13. Jung, S. H., Ku, M. J., Moon, H. J., Yu, B. C., Jeon, M. J. and Lee, Y. H. 2009. Inhibitory effects of fucoidan on melanin synthesis and tyrosinase activity. *J Life Sci* **19**, 75-80.
  14. Kim, H. J., Park, T. S., Jung, M. S. and Son, J. H. 2011. Study on the anti-oxidant and Anti-inflammatory activities of sarcocarp and salyx of Persimmon (Cheongdo Bansi). *J Appl Biol Chem* **54**, 71-78.
  15. Kim, T. H., You, J. K., Kim, J. M., Baek, J. M., Kim, H. S., Park, J. H. and Choe, M. 2010. Antioxidant and whitening effects of *Sorbus commixta* HEDL Cortex extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 1418-1424.
  16. Kim, H. H., Park, G. H., Park, K. S., Lee, J. Y., Kim, T. H. and An, B. J. 2010. The effects of *Aster glehnii* Fr. Schm. Extracts on whitening and anti-wrinkle. *J Life Sci* **20**, 1034-1040.
  17. Lee, H. H., Bae, S. and Chin, J. E. 2005. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **34**, 1325-1329.
  18. Majmudar, G., Jacob, G., Laboy, Y. and Fisher, L. 1998. An *in vitro* method for screening skin-whitening products. *J Cosmet Sci* **49**, 361-367.
  19. Mallick, S., Singh, S. K., Sarkar, C., Saha, B. and Bhadra, R. 2005. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins *in vitro* *Pigment Cell Res* **18**, 25-33.
  20. Michikawa, M., Lim, K. T., McLarnon, J. G. and Kim, S. U. 1994. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neuro Sci Res* **37**, 62-70.
  21. Oh, S. M., Mun, Y. J. and Woo, W. H. 2007. Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 melanoma cells. *Korean J Oriental Physiol Pathol* **21**, 1456-1461.
  22. Park, S. H., Lee, B. Y., Lee, S. H., Han, C. S., Kim, J. G., Kim, K. T., Kim, K. H. and Kim, Y. H. 2009. Whitening effect of dayflower extract by inhibition of N-linked glycosylation process and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **35**, 73-78.
  23. Parvze, S., Kang, M. K., Chung, W. S., Cho, C. W., Hong, M. C., Shin, M. K. and Bae, H. S. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res* **20**, 921-934.
  24. Sa, Y. S., Kim, K. A. and Choi, H. S. 2003. Purification and characterization of anti-coagulant activity fraction from persimmon stem. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 1323-1327.
  25. Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H. Kim, K. S. and Lee, S. J. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Rannus yoshinoi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* **42**, 750-754.
  26. Shin, J. Y. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food Nutr* **14**, 568-572.
  27. Tobin, D., Quinn, A., Ito, S. and Thody, A. 1994. The presence of tyrosinase and related protein in human epidermis and their relationship in melanin type. *Pigment Cell Res* **7**, 204-209.
  28. Wang, K. H., Lin, R. D., Feng, L. H., Yen, H. H., Chang, H. C., Huang, C. Y. and Lee, M. H. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J Ethnopharmacol* **106**, 353-359.
  29. Yamakoshi, J., Otsuka, F., Sano, A., Tokutake, S., Saito, M., Kikuchi, M. and Kubota, Y. 2003. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment Cell Res* **16**, 629-638.
  30. Yoo, Y. G., Joung, M. S., Choi, J. W. and Kim, J. H. 2005. The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **31**, 153-159.
  31. Yoon, H. S., Kim, J. K. and Kim, S. J. 2007. The inhibitory effect on the melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cells by *Sasa quepaertensis* leaf extract. *J Life Sci* **17**, 873-875.
  32. Zhong, S., Yan, W., Ahn, S. M., Junya, Z., Wang, K., Yang, S., Yeon, J. H. and Zhu, X. 2006. Depigmentation of melanocytes by the treatment of extracts from traditional Chinese herbs: a cell culture assay. *Biol Pharm Bull* **29**, 1947-1951.

초록 : 감꼭지 추출물과 분획물의 미백효과

황주영 · 박태순 · 손준호\*

(한국한방산업진흥원)

본 연구는 감꼭지 추출물과 용매별 분획물에 대한 미백효과를 측정하였다. 감꼭지를 70% 에탄올로 추출한 다음 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 순차적으로 분획하였다. 분획물 중 에틸아세테이트 분획물은 B16F10 멜라노마 세포 내에서 멜라닌 생성을 억제 효능과 티로시나아제 활성이 우수하였고, 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현 양상을 측정하기 위해 western blotting을 한 결과, 감꼭지 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 무첨가군에 비해 티로시나아제, TRP-1, TRP-2의 발현이 억제되었다. 이상의 결과에 따라 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 미백 소재로서 개발할 수 있을 것이라 사료된다.