

어성초, 자소엽, 녹차 식물 추출 혼합물의 항산화 및 Tyrosinase 저해 효과에 관한 연구

이 경 은 · 이 은 선 · 강 상 구[†]

영남대학교 생명공학부 생명공학전공
(2015년 6월 18일 접수, 2015년 6월 22일 수정, 2015년 6월 22일 채택)

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of the Extract Mixtures of *Perilla frutescens*, *Houttuynia cordata* and *Camellia sinensis*

Kyung Eun Lee, Eun Sun Lee, and Sang Gu Kang

Department of Biotechnology, Yeungnam University, 280 Daehak-Ro, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-749, Korea
(Received June 18, 2015; Revised June 22, 2015; Accepted June 22, 2015)

요약: 본 연구에서는 항산화 기능을 가진 자소엽, 어성초 그리고 녹차 추출물들과 이들 추출물의 혼합물을 사용하여 항산화, 미백, 세포독성실험을 진행하였다. 자소엽, 어성초와 녹차의 추출물을 동일 양으로 혼합하였을 때 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성이 높아졌으며, 추출물을 혼합한 경우 낮은 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 80.2%, 98.0%의 DPPH와 ABTS 라디칼을 소거시키는 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 미백효과의 정도를 조사하기 위하여 tyrosinase 저해효과를 조사한 결과 자소엽과 녹차추출물 그리고 각 추출물의 혼합물이 농도 의존적으로 tyrosinase 저해효과가 증가되었다. HaCaT 세포를 사용한 세포독성실험의 경우 자소엽, 어성초 추출물의 경우 세포생존율이 무처리 대조군과 같거나 높게 나타났으며 특히 어성초추출물의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 무처리 대조군 보다 10% 이상의 높은 생존율을 보였다. 녹차와 각 식물 추출물 혼합물의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서는 무처리 대조군에 비하여 세포생존율이 감소하였다. 그러므로 세 가지 식물의 추출물 혼합물이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도일 때 세포에 안전하며 높은 항산화 활성과 함께 tyrosinase 저해 효과가 있었다.

Abstract: In the present study, antioxidant activities and tyrosinase inhibition of *Perilla frutescens*, *Houttuynia cordata* and *Camellia sinensis* extracts and the extract mixtures (PHC) were investigated. PHC showed 80.2% and 98.0% of free radical scavenging activity in DPPH and ABTS analysis, respectively, and 50% tyrosinase inhibition in 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. HaCaT cells did not show cell toxicity in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the PHC. Furthermore, HaCaT cell viability by co-culture with extract *H. cordata* was increased more than 10% compared with untreated cells. However, the cell viability was decreased in 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract *C. sinensis* and the PHC. These results suggested that about 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of the PHC showed proper tyrosinase inhibitory effect and antioxidant activities. The PHC could be used as multifunctional cosmeceutical agents.

Keywords: anti-oxidant, DPPH, ABTS, tyrosinase inhibition, cell viability

[†] 주 저자 (e-mail: kangsg@ynu.ac.kr)
call: 053)810-3025

1. 서 론

현대에는 수명이 연장되면서 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 사회적 현상 중 하나로 건강 기능성 식품에 대한 관심과 소비가 지속적으로 늘어나고 있는 추세이다[1]. 그러나 스트레스, 공해, 과다 영양공급 및 불규칙한 식생활 등으로 인하여 체내 활성 산소의 축적으로 인한 만성고혈압, 당뇨, 비만 등 성인병 발생은 급속히 증가하고 있다[2-5]. 또한 인체 내 과다하게 생성되어 제거되지 않고 남아있는 활성산소는 세포막의 지질과 결합하므로 과산화물을 생성한다. 특히 피부의 경우 자외선, 공해, 산업 산물의 산화제노출 등 환경적 요인에 의한 산화적 스트레스로 노화가 촉진된다. 피부세포의 산화적 스트레스를 발생은 햇빛에 포함된 자외선에 장시간 노출되면, 피부 세포 내에 1O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생하게 되며 이러한 원인으로 생체 내 DNA를 손상시켜 세포의 노화를 촉진시키거나 암을 유발하게 한다[6,7]. 현재 사용하고 있는 합성 항산화제는 독성에 대한 문제가 제기되고 있다[8,9]. 따라서 활성산소를 보다 안전하게 소거하기 위하여 그에 따른 대안으로 천연 항산화 물질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 천연 물질이나 식품을 이용한 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[10,11]. 본 연구에서는 탁월한 항산화 기능 식품으로 알려진 녹차, 어성초, 자소엽을 사용하여 항산화 기능이 우수한 복합물질을 개발하고자 연구를 진행하였다. 녹차(*Camellia sinensis*)의 카테킨(catechin)과 EGCG는 암 발생 예방, 항산화, 항염증효과가 있다[12-14]. 어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과(*Saururaceae*) 다년생 초본 식물로서 methyl-n-nonylketon, decanoyl acetaldehyde, α -pinene, linalool, δ -limonen, camphene, quercitrin, quercetin, reynoutrin, isoquercitrin, hyperin 등 다양한 성분들을 함유하고 있으며 항산화, 항균, 항알러지, 면역력 증진 등의 효능이 우수한 것으로 보고된 바 있다[15-20]. 자소엽(*Perilla frutescens*)은 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하는 식물로 항산화작용, 항염증, 항균작용, 항알레르기작용 등의 약리작용이 보고되어 있다[21-27]. 최근 어성초, 자소엽과 녹차에 대한 항산화기능을 활용한 안티에이징, 발모방지 등의

기능성 화장품과 식품개발에 관한 연구가 진행되고 있으나 이들을 혼합하였을 때 어떠한 기능을 나타내는지에 관한 연구나 활용에 관한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서 자소엽, 어성초, 그리고 녹차의 단일 식물 추출물과 이들 각 추출물의 혼합물을 사용하여 항산화 효과, tyrosinase 저해 효과, 세포독성과 세포증식효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 추출물의 제조

실험재료인 자소엽(*Perilla frutescens*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 녹차엽(*Camellia sinensis*)은 경북 경산시 소재 약재상에서 구입하여 사용하였다. 건조된 시료는 흐르는 물에 세척한 후 수분을 제거하고 칭량하여 파쇄한 한 분말을 사용하였다. 각 실험재료는 시료 무게의 10배에 해당하는 멸균된 순수정제수를 첨가하여 80 °C에서 24 h 중탕하였으며, 3회 반복 추출하였다. 추출 후 여과지(Advantec No. 2)로 여과한 후 회전감압농축기(N-1000, Eyela, Japan)를 이용하여 농축하고 건조한 후 중량법으로 수율을 계산하였다. 각 식물 추출물 혼합물의 처방은 자소엽, 어성초, 녹차 각각의 질량비를 1 : 1 : 1로 조합하여 준비하였다. 모든 실험재료는 사용 전까지 4 °C에 보관하였다.

2.2. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성능을 이용한 항산화력은 Blois의 방법[29]을 변형하여 측정하였으며 항산화능을 측정하는 방법 중에 하나로 많이 사용되고 있는 방법이다. 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Sigma, USA)은 라디칼 소거능은 DPPH 자유환원력을 측정하였다. 실험방법은 각 농도별로 희석된 시료 500 μ L에 에탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 250 μ L를 진탕기로 잘 혼합하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DPPH 대신 에탄올을 처리하였다. DPPH의 활성 저해율을 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.3. ABTS radical 소거활성 측정

ABTS [2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] 라디칼 소거활성 측정은 Re 등의 방법[30]을 변형하여 측정하였다. ABTS (Sigma, USA)를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.45 mM potassium persulfate를 가하여 1:1의 비율로 혼합하여 실온인 암실에서 24 h 동안 반응 시킨 후 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 사용하였다. 라디칼이 형성된 ABTS 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정된 흡광도가 0.70 ± 0.02가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 500 μL과 시료 500 μL을 혼합하여 6 min 간 반응 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 734 nm에서 각 농도별 시료와 혼합하여 사용하였다. 라디칼 활성 저해율(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.4. In vitro Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 측정하기 위하여 *in vitro* Tyrosinase inhibition assay를 실시하였다. *in vitro* Tyrosinase inhibition assay는 Mason 등의 방법[43]을 변형하여 측정하였다. 실험방법은 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 250 μL와 각 농도별로 희석된 시료 225 μL, mushroom Tyrosinase (2000 U/mL)(Sigma, USA) 25 μL와 1.5 mM Tyrosine 225 μL를 순서대로 첨가한 후 37 °C에서 10 ~ 15 min 동안 반응시켰다. 반응을 완료한 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5)을 사용하였다. 또한 양성 대조군은 알부틴을 사용하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율}(\%) = \left[100 - \left(\frac{b - b'}{a - a'} \right) \times 100 \right]$$

- a: 공시료액의 반응 후 흡광도
- b: 시료액의 반응 후 흡광도
- a', b': 완충용액으로 대체하여 측정한 흡광도

2.5. 세포배양

인간각질세포(human keratinocyte cell line, HaCaT) 세포를 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (100 units/mL) / streptomycin (100 μg/mL)을 첨가하여 CO₂세포배양기(NU-4750G, NuAire, USA)에서 5% CO₂ 공급 하에 배양하였으며, 2 - 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.6. 세포생존율 측정

단일 식물 추출물과 각 식물 추출물 혼합물(1 : 1 : 1)을 농도별로 희석한 시료를 96well plate에 5 × 10³ cell/well로 균일하게 분주한 다음 24 h 후 각 추출물을 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 농도별 처리에 의한 세포의 증식에 미치는 효과는 Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell proliferation assay kit (Promega, USA)를 사용하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 DMEM 배지 100 μL와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) solution 20 μL를 첨가하여 5%, CO₂, 37 °C 암상태 조건에서 3 h 반응시킨 후 ELISA reader (Infinite™ F200, TECAN, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 배양액을 대조군으로 사용하였다. 세포 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.7. 통계적 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였고 통계분석은 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

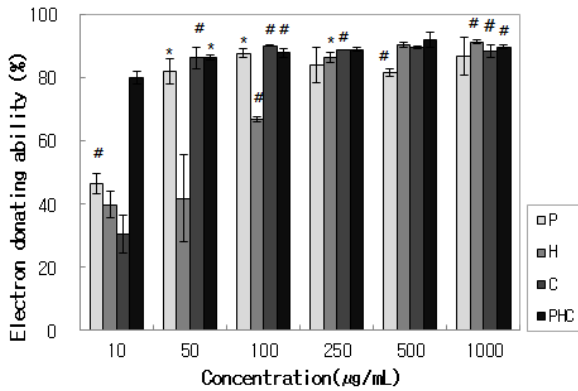


Figure 1. DPPH free radical scavenging activities of single or mixture of herb extraction (P; *Perilla frutescens*, H; *Houttuynia cordata*, C; *Camellia sinensis*, PHC; mixture of three plant extracts). Results are the means \pm S. D of three samples (* indicates $p < 0.05$, # indicates $p < 0.005$).

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical 소거활성 측정

본 연구에서는 DPPH를 이용하여 단일 식물 추출물과 각 추출물 혼합물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 단일 식물 추출물의 DPPH 자유라디칼 소거활성능을 조사하기 위하여 자소엽, 어성초 그리고 녹차의 추출물 각각의 단일 물질과 이들 추출물을 1 : 1 : 1로 혼합한 혼합물의 항산화 기능성을 측정된 결과 대부분 단일 식물추출물의 경우 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 자유라디칼 소거활성능이 높아졌으나, 추출물을 혼합한 경우 가장 낮은 농도인 10 µg/mL에서 80% 이상의 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다(Figure 1). Figure 1에서 보는 바와 같이 자소엽(*P. frutescens*)과 어성초(*H. cordata*)의 추출물은 10 µg/mL 농도에서 약 40% 이상의 자유라디칼 소거능을 보였다. 특히 자소엽 추출물은 50 µg/mL 이상은 80%에서 90% 정도의 자유라디칼 소거능이 있었다. 그러나 어성초 추출물의 경우 농도 250 µg/mL 정도에서 85%의 자유라디칼 소거능을 보였다. 녹차(*C. sinensis*)의 경우 단일 추출물의 농도가 50 µg/mL 이상에서 거의 90% 정도의 높은 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 그리고 자소엽, 어성초 그리고 녹차 추출물을 혼합한 경우 10 µg/mL의 적은 양에서도 80% 이상의 자유라디칼 소거능을 보였다. 산화스트레스에 의해 생체 내에서 생성되는

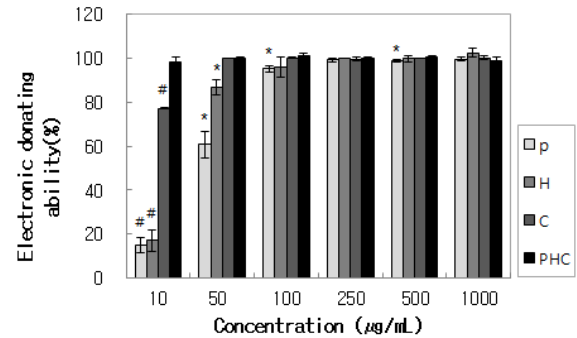


Figure 2. ABTS free radical scavenging activities of single extraction or mixture of herb extraction (P; *Perilla frutescens*, H; *Houttuynia cordata*, C; *Camellia sinensis*, PHC; extract complex). Significantly different from the control (* indicates $p < 0.05$, # indicates $p < 0.005$).

자유라디칼에 의해 세포손상이 발생하며 그 결과로 노화와 질병이 발생한다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 자유라디칼 화합물로서 자유라디칼 소거능 측정에 이용되며 방향족 화합물 및 아민류인 to-copherol 및 ascorbic acid 등의 환원능을 이용하여 항산화능 측정에 사용된다[31]. 자유라디칼의 안정된 모델인 DPPH는 반응 중 DPPH의 감소를 통해 자유라디칼 소거반응이 진행된다는 것을 알 수 있다. 또한 초기 지질 과산화 반응의 억제 정도가 예측 가능하다. 활성산소는 유해산소라 불려 지기도 한다. 불포화 지방산은 세포 생체막의 구성성분으로 활성산소가 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 유발시켜 체내에 과산화 지질을 축적한다. 이로 인해 생체 기능이 저하됨과 동시에 노화와 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되고 있다[36,37]. 그러므로 본 연구에서는 DPPH를 이용하여 항산화능을 조사한 결과 자소엽, 어성초 그리고 녹차 각 단일 추출물보다 이들 추출물을 혼합한 경우 10 µg/mL의 적은 양에서도 80% 이상의 자유라디칼 소거능을 보였다.

3.2. ABTS radical 소거활성 측정

본 연구에서는 추출물들의 보다 자세한 항산화능을 조사하기 위하여 ABTS를 이용하여 라디칼 소거활성을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성 측정의 원리를 간략히 이해하면, 먼저 ABTS가 potassium persulfate

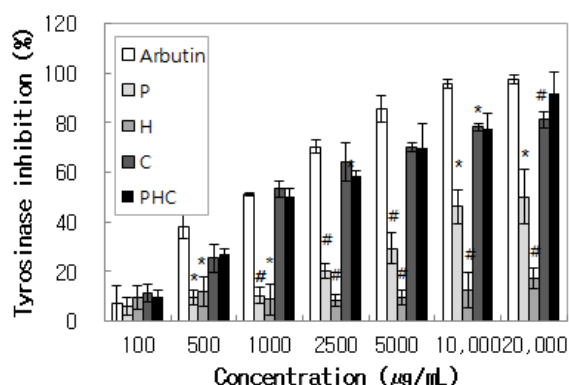


Figure 3. Tyrosinase inhibition of single plant extraction and or mixture of herb extraction(P; *Perilla frutescens*, H; *Houttuynia cordata*, C; *Camellia sinensis*, PHC; extract complex). Significantly different from the control (* indicates $p < 0.05$, # indicates $p < 0.005$).

에 의해 전자가 산화되어 청록색을 나타내며, 이후 추출물에 포함된 항산화 물질에 의하여 전자공여능이 환원됨에 따라 청록색이 점차 열어지는 과정을 측정하는 방법이다. 또한 ABTS 양이온 소거 측정 방법은 연쇄 절단형 항산화제와 수소 공여 항산화제 모두를 측정할 수 있으며, 친수성과 소수성 모두에 적용이 가능하기 때문에 DPPH 방법보다 더 민감하게 항산화 능력을 알아볼 수 있는 방법으로 알려져 있다[32-35]. 자소엽과 어성초 각 단일 추출물을 농도별로 처리한 시험군은 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 증가하기는 하였으나, 낮은 농도인 10 µg/mL에서는 라디칼 소거능이 매우 낮았다. 반면 녹차는 10 µg/mL에도 약 80%의 전자공여능력을 보였다. 그러나 추출물을 혼합한 경우 가장 낮은 농도인 10 µg/mL에서 약 98.1%의 매우 높은 라디칼 소거활성을 나타내며 50 µg/mL에서 곧 포화상태에 도달하였다(Figure 2). 이는 자소엽, 어성초와 녹차를 화장품 등에 포함시킬 때 단일 식물 추출물의 처방보다 식물추출물의 복합처방일 경우 낮은 농도를 사용하여도 훨씬 효과적임을 시사한다.

3.3. *In vitro* Mushroom tyrosinase inhibition assay

본 연구에서 자소엽, 어성초 그리고 녹차의 추출물들과 이들을 혼합한 물질이 나타내는 미백효과를 *in vitro* tyrosinase 저해정도(tyrosinase inhibition assay)를 통하여 조사하였다(Figure 3). 단일 식물추출물인 경우

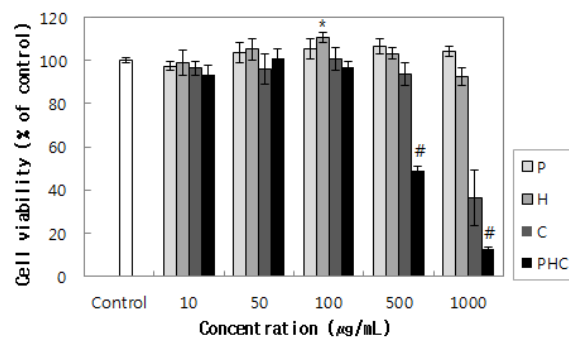


Figure 4. Cell viability of single extraction or mixture of herb extraction(P; *Perilla frutescens*, H; *Houttuynia cordata*, C; *Camellia sinensis*, PHC; extract complex). Significantly different from the control (* indicates $p < 0.05$, # indicates $p < 0.005$).

어성초는 매우 낮은 tyrosinase 저해를 나타내었으나 녹차추출물의 경우 매우 높은 tyrosinase 저해 정도를 나타내었다. 또한 tyrosinase의 저해 효과는 자소엽과 녹차 추출물은 대조구로 사용한 알부틴과 같이 농도 의존적으로 증가하였다. 단일 식물 추출물 중 녹차의 경우 높은 tyrosinase 저해 효과를 보였다(Figure 3). 그러나 자소엽, 어성초 그리고 녹차 추출물의 복합물질은 매우 높은 tyrosinase 저해정도를 나타내었다. 멜라닌(melanin)은 멜라닌 세포(melanocyte) 내의 특수한 세포소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 생성되는 색소이다. 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP2) 등의 여러 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히 tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절 단계(rate-limiting step)인 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 hydroxylation 된 후 dopaquinone으로 산화되는 과정에서 작용하는 주요 조절 효소이다[38-40]. 멜라닌 합성을 조절, 저해하는 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 C 유도체(vitamin C derivative) 등의 물질이 색소 침착을 방지하고 해결하기 위해 개발되었으나 충분한 효과를 나타내지 않거나, 피부에 대한 안전성, 제형 내 안정성 등의 한계로 인하여 화장품 제형을 제작할 때 제한적으로 처방되어 왔다[41,42]. 그러므로 자소엽, 어성초 그리고 녹차의 추출물들을 혼합한 경우 높은 tyrosinase 활성억제를 보였으므로 보다 안전한 화장품 미백제로 사용이 가능할 것이다.

3.4. 세포독성실험

단일 식물 추출물과 각 추출물의 혼합물을 농도별로 세포독성을 측정된 결과는 Figure 4와 같다. 자소엽 추출물은 농도가 증가할수록 대조군보다 세포생존율이 높게 나타났다. 어성초추출물의 경우 대조군보다 세포생존율이 높거나 비슷하게 나타났으며, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 높게 나타났다. 하지만 녹차추출물의 경우 농도가 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 대조군과 같거나 비슷하게 나타났으나, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 대조군과 비교하여 세포생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 각 추출물의 혼합물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 대조군과 비슷한 세포생존율을 보였으나, 500 $\mu\text{g/mL}$ 부터는 세포생존율이 대조군과 비교하여 세포생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 따라서 세포독성실험을 통하여 세포 실험에서 이들 식물추출물의 혼합물을 사용할 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도를 사용하는 것이 안전할 것으로 사료된다 (Figure 4).

4. 결 론

본 연구에서는 자소엽, 어성초, 녹차 추출물과 이들 각 추출물의 혼합물에 대한 항산화능 및 미백효과를 알아보았으며, 이들 추출물들에 대한 세포독성실험을 관찰하였다. 항산화 실험인 DPPH radical 소거활성능에 대한 측정은 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 자소엽, 어성초, 녹차 추출물을 각각 처리했을 때 46, 39, 30%를 나타내었으나 이들 각 추출물을 혼합적으로 처리하였을 때 80% 이상의 항산화성을 나타내었으며, ABTS radical 소거활성능은 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 단일 식물 추출물은 각각 14, 17, 77%를 나타내었으나, 각 추출물의 혼합물은 98% 이상의 효과를 나타내었다. 또한 미백효과를 알아보기 위해 알부틴을 대조군으로 비교한 결과 단일 식물 추출물에서는 자소엽과 녹차 추출물이 농도 의존적으로 미백효과를 나타내었으며, 특히 녹차 추출물의 경우는 이들의 각 추출물 혼합물과 비교하였을 때 비슷하게 tyrosinase 활성 저해효과를 나타내었다. 또한 세포 독성실험에서 자소엽 추출물은 대조군에 비해 세포생존율이 거의 같거나 조금 높았으며, 어성초 추출물은 세포생존율이 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군과 비교하여 10% 이상 높았다. 그러나 녹차 추출물의 경우 농도가 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 대조군과 같거

나 비슷하게 나타났으나, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우 대조군과 비교하여 세포생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 자소엽, 어성초, 녹차 식물 추출물의 혼합물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 대조군과 비슷한 세포생존율을 보였으나, 500 $\mu\text{g/mL}$ 부터는 세포생존율이 대조군과 비교하여 세포생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 따라서 상기 혼합물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 사용하는 것이 보다 안전할 것으로 사료된다. 또한 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우 항산화 작용이 매우 높았으며 tyrosinase 저해 효과 또한 알부틴의 tyrosinase 저해 효과와 비슷한 수치를 나타내었다. 이상의 결과들을 종합해 보면 자소엽, 어성초 그리고 녹차 식물들을 추출물을 단독으로 사용하는 것보다 혼합하여 사용하였을 때 낮은 농도에서 미백 기능성을 나타내었으며 피부세포의 노화를 지연시킬 수 있는 우수한 항산화 소재로서 기초 화장품에 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소기업기술정보진흥원(TIPA)의 지원사업(과제번호S2182068 책임자 이경은)으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

Reference

1. P. Albertazzi, S. A. Steel, E. Clifford, and M. Bottazzi, Attitudes towards and use of dietary supplementation in a sample of postmenopausal women, *Climacteric*, **5**(4), 374 (2002).
2. J. Kedziora and G. Bartosz, Down's syndrome: a pathway involving the lack of blance of reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.*, **4**(5), 317 (1988).
3. E. E. Cross, B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, and J. M. McCord, Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intren. Med.*, **107**, 536 (1987).
4. E. Y. Sozmen, T. Tanyakin, T. Onat, F. Kufay, and S. Erlacin, Ethanol-induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes, *European J. of Clinical Chem. and Clinical Biochem.*, **32**, 741 (1994).

5. B. Frei, Academic Press, Inc., 25, ed. A Division of Harcourt Brace and Company, San Diego, California (1994).
6. I. Fridorich, The biological activity of oxygen radicals, *Science*, **201**, 875 (1978).
7. I. A. Imlay and S. Linn, DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, **240**, 1302 (1986).
8. A. L. Branen, Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1991).
9. S. M. Barlow, Food Antioxidant. ed. B. J. F. Hudson, 253, Elsevier, Amsterdam (1990).
10. S. J. Yang, K. S. Youn, H. K. No, S. H. Lee, and J. H. Hong, Optimization of extraction conditions for mate (*Ilex paraguarensis*) ethanolic extracts, *Korean J. Food*, **18**, 319 (2011).
11. S. J. Lee, J. H. Kim, M. J. Kim, S. M. Yoon, J. C. Jeong, and N. J. Sung, Effect of garlic and medicinal plants composites on antioxidant activity and lipid levels of liver in hypercholesterolemic rats, *J. Life Sci.*, **19**, 1769 (2009).
12. Z. D. Draelos, Botanicals as topical agents, *Clin. Dermatol.*, **19**, 474 (2001).
13. A. Chiu and A. B. Kimball, Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage, *Br. J. Dermatol.*, **149**, 681 (2003).
14. N. Ahmad and H. Mukhtar, Cutaneous photochemoprotection by green tea: a brief review, *Skin Pharmacol, Appl. Skin Physiol.*, **14**, 69 (2001).
15. C. K. Chung, S. S. Ham, S. Y. Lee, D. H. Oh, S. Y. Choi, I. J. Kang, and S. M. Nam, Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 205 (1999).
16. B. J. Ha, Effects of *Houttuynia cordata thunb* on anti-oxidative activity against TCDD damage, *J. Environ Sci.*, **12**, 599 (2003).
17. Y. Y. Chen, J. F. Liu, C. M. Chen, P. Y. Chao, and T. J. Chang, A study of antioxidative and anti-mutagenic effects of *Houttuynia cordata thunb* using an oxidized frying oil-fed model, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **49**, 327 (2003).
18. J. H. Song, M. J. Kim, H. D. Kwon, and I. H. Park, Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**, 1053 (2003).
19. E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, H. Y. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park, The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component on lipid peroxidation, *Am. J. Chin. Med.*, **31**, 907 (2003).
20. J. Kim, H. S. Ryu, J. H. Shin, and H. S. Kim, *In vitro* and *ex vivo* supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **34**, 167 (2005).
21. H. Ueda, C. Yamazaki, and M. Yamazaki, Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 560 (2003).
22. T. Makino, A. Furuta, H. Fujii, T. Nakagawa, H. Wakushima, K. Saito, and Y. Kano, Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-1 allergy in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1206 (2001).
23. T. Y. Shin, S. H. Kim, S. H. Kim, Y. K. Kim, H. J. Park, B. S. Chae, H. J. Jung, and H. M. Kim, Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **22**, 489 (2000).
24. H. A. Oh, C. Park, H. J. Ahn, Y. S. Park, and H. M. Kim, Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **236**, 99 (2011).
25. T. Makino, Y. Furuta, H. Wakushima, H. Fujii, K. Saito, and Y. Kano, Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents, *Phytother. Res.*, **17**, 240 (2003).
26. U. K. Choi, O. H. Lee, S. I. Lim, and Y. C. Kim, Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *pseudomonas aeruginosa* using the evolutionary operation factorial de-

- sign technique, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 3922 (2010).
27. L. Meng, Y. F. Lozano, E. M. Gaydou, and B. Li, Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties, *Molecules*, **14**, 133 (2008).
 28. N. H. Kim, D. C. Yang, and A. H. Eom, A phylogenetic relationships of *Araliaceae* based on PCR-RAPD and ITS sequences, *Korean J. Plant Res.*, **17**, 82 (2004).
 29. M. L. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 30. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 1231 (1999).
 31. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang, F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**(44), 10701 (2014).
 32. S. Y. Qusti, A. N. Abo-khatwa, and M. A. Bin Lahwa, Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holy Quran, *Eur. J. Biol. Sci.*, **2**, 40 (2010).
 33. Y. M. Choi, M. H. Kim, J. J. Shin, J. M. Park, and J. S. Lee, The antioxidant activities of the some commercial teas, *J. Kor. Soc. Nutr.*, **32**, 723 (2003).
 34. L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, and M. J. Burkitt, Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Prooxidant and antioxidant properties of glutathione, *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 102 (1993).
 35. B. S. Wolfenden and R. L. Willson, Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2**, 805 (1982).
 36. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of *r*-irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
 37. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species: Tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**(4), 357 (1995)
 38. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**(12), 1141 (1987).
 39. T. Kuzumaki, A. Matsuda, K. Wakamatsu, S. Ito, and K. Ishikawa, Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes, *Exp. Cell Res.*, **207**(1), 33 (1993).
 40. V. del Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, **381**(3), 165 (1996).
 41. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
 42. F. Solano, S. Briganti, M. Picardo, and G. Ghanem, Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment Cell Res.*, **19**(6), 550 (2006).
 43. H. S. Mason and E. W. Peterson, Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **111**, 134 (1965).
 44. B. R. Lee and P. S. Park, Potentiating dietary green tea extracts anti-tumor activity of cisplatin in BALB/c mice bearing CT26 colon carcinoma, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(8), 1100 (2012).