

화장품 소재로서 빈랑자의 항산화 및 미백활성에 관한 효과

강 희 철 · 차 미 연 · 김 재 영[†]

(주)지에프씨 생명과학연구원

(2015년 9월 18일 접수, 2015년 9월 22일 수정, 2015년 9월 25일 채택)

A Study of the Antioxidant Activities and Whitening Activities of *Areca semen* Extracts as Cosmetic Ingredient

Hee Cheol Kang, Mi Yeon Cha, and Jae Young Kim[†]

Life Science Research Institute, GFC Co. Ltd., 1005, Yeongdeong-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 16954, Korea

(Received September 18, 2015; Revised September 22, 2015; Accepted September 25, 2015)

요약: 항산화 활성과 미백활성을 갖는 새로운 화장품 소재를 찾기 위하여 한방 소재로 사용되는 빈랑자[*Areca semen* (*A. semen*)]를 유기용매 추출을 통하여 활성분획을 분리하였다. 추출된 활성 분획을 이용하여 항산화 활성, 피부 상재균에 대한 항균 활성, 세포독성 및 세포 내 멜라닌 합성 저해능 및 멜라닌 합성에 관여하는 유전자의 저해 활성을 확인함으로써 미백 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. 빈랑자는 에틸아세테이트 용매의 분획을 동결 건조하여 분말형태로 제조하였으며 이를 이후 실험에 사용하였다. 빈랑자 추출물에서 페놀성 물질은 $301.35 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 측정되었다. 항산화 효과는 DPPH assay와 FRAP assay를 이용하여 측정하였으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 비슷하게 측정되었다. 피부상재균에 대한 항균활성은 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)에서 모두 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 항균활성을 갖는 것으로 나타났으며 *Escherichia coli* (*E. coli*)에서는 항균활성을 나타내지 않았다. 미백소재로서의 활성을 확인하여 B16/F1 mouse melanoma cell을 이용하였으며 최대 처리농도인 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 독성을 나타내지 않았다. 또한 세포 내 멜라닌 합성 저해능은 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $29.44 \pm 0.71\%$ 로 측정되었다. 또한 멜라닌 합성에 관여하는 유전자의 발현량은 mRNA expression assay를 통하여 확인하였으며, 그 결과 tyrosinase와 MITF 유전자는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 이러한 결과를 통하여 빈랑자의 에틸아세테이트 분획은 항산화와 미백효과를 나타내는 것으로 확인되었으며 화장품 소재로서의 사용 가능성을 확인하였다.

Abstract: Herbal plant extracts are good resources to find functional compounds for cosmetic ingredient. In this study, the extract of *Areca semen* (*A. semen*) was studied for melanogenesis inhibition and antioxidant activity. The results showed that ethyl acetate fraction of *A. semen* contained phenolic contents, $301.35 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$, and exhibited potent antioxidant activity with IC_{50} value of $1.02 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mL}$. Further, FRAP value exhibited potent antioxidant activity with $9.07 \pm 0.36 \text{ mM}$. Disk diffusion assay was performed for antibacterial activity. Ethyl acetate fraction of *A. semen* showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) at $80 \mu\text{g}/\text{mL}$, whereas it showed no significant antibacterial activity against *Escherichia coli* (*E. coli*). The results of cell viability indicated that ethyl acetate fraction did not show cytotoxicity to B16/F1 cells at $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ and showed

[†] 주 저자 (e-mail: roka0822@gmail.com)
call: 070)4192-9363

significant cytotoxicity at 100 $\mu\text{g/mL}$ of concentration and showed inhibition of melanin synthesis inhibitory, $29.78 \pm 0.31\%$ at 80 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, mRNA expressions of tyrosinase and MITF were decreased after treatment with ethyl acetate fraction in a dose-dependent manner. As a result, the ethyl acetate fraction of *A. semen* could be considered as potential as whitening agents.

Keywords: antioxidant, whitening, *Areca semen*, cosmetics, antibacterial

1. 서 론

최근 화장품 산업에서 피부의 미백에 도움을 주는 제품이나 주름개선에 도움을 주는 등 특정 기능이 강조된 기능성 화장품 사업이 크게 성장하고 있다. 이에 따라 식물 등 천연물로부터 얻어지는 기능성 물질들을 원료로서 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[1]. 이러한 요구에 대응하여 천연물 특히 한방소재 또는 약용식물을 중심으로 한 미백효과, 노화억제 및 자외선 차단 기능 등 유용한 소재에 대한 개발이 이루어지고 있다[2]. 사람의 피부 및 세포에 광산화적 손상을 일으키는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 강한 산화력으로 생체 내 세포를 구성하는 지질 및, 단백질 및 DNA 손상뿐만 아니라 진피층의 matrix metalloproteinase (MMPs) 효소의 발현을 증가시켜 피부의 엘라스틴 섬유 및 콜라겐의 분해를 일으킨다. 또한 이러한 구성성분의 비정상적인 교차결합을 일으켜 탄력손실 및 피부 노화를 가속화 시킨다[3-5]. 이에 더하여 자외선으로 인하여 생성된 ROS는 멜라닌 세포에 멜라닌 합성을 증가 시킨다[6]. 멜라닌의 생성은 UV 노출 등의 외부환경에 대한 피부방어기작이다[7]. 멜라닌은 여러 효소에 의해 합성되며 tyrosinase는 L-tyrosine을 L-dihydroxy phenylalanine (L-DOPA)으로, L-DOPA를 DOPAquinone으로 변화시킨다. tyrosinase-related protein-1 (TRP-1)은 black과 brown 색소인 eumelanin 생성에 관여 하며 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 등의 발현에 관여하는 전사인자로 이들 효소의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌을 합성하게 된다[8]. 그러나 외부자극에 의하여 과발현된 멜라닌은 기미, 주근깨를 형성하며 나아가 병변으로 발달되어 흑색종으로 발달되기도 한다. 따라서 이러한 멜라닌의 과발현을 억제하고 미백효과를 얻기 위해서는 멜라닌합성 효소의 발현을 저해시켜야 한다. 따라서 화장품산업에서는 멜라닌합성 관련효소들을 저해하는 원료를 찾

기 위하여 한방소재를 이용한 미백물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 빈랑자는 *A. semen* Linne의 성숙한 열매의 껍질을 벗겨 가공한 것으로 guvacine, arecaidine, arecoline 등과 같은 alkaloid 성분들이 함유되어 있으며[9], 장양(壯陽: 신(身)의 양기를 강장시킴) 한방소재로서 사용되어 왔으며 최근에는 tyrosinase 저해 활성에 대한 효과도 보고되어 있다[10].

본 연구에서는 빈랑자의 에틸아세테이트 분획을 분리하고 이 분획에 대한 항산화 활성 및 α -melanin stimulating hormone (α -MSH) 의하여 활성화된 B16/F1 마우스 세포에서의 미백효과를 확인하였다. 항산화 활성을 확인하기 위한 방법으로 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) assay와 Ferric-reducing antioxidant potential (FRAP) assay를 수행하였으며 B16/F1 세포에 대한 세포독성 및 멜라닌 합성량과 나아가 멜라닌합성 관련 유전자의 저해 효과를 확인함으로써 빈랑자의 화장품 소재로서 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

실험에 사용된 빈랑자는 서울의 경동시장 한약재상에서 2015년 4월에 구매한 것으로 건조된 것을 균질기로 마쇄하여 실험에 사용하였다.

2.2. 시료제조

재료로 사용한 빈랑자의 추출은 에탄올을 이용하여 추출하였으며 시료 1 kg을 10 L의 100% 에탄올에 24 h 동안 교반추출 하였으며 2회 반복 추출하였다. 이 추출액을 Whatman filter Paper (No 2.)로 여과한 후, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 rotary vacuum evaporator (NVC-2200, Eyela, Japan)를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물을 헥산을 이용하여 지질층을 제거해준 뒤 다시 에틸아세테

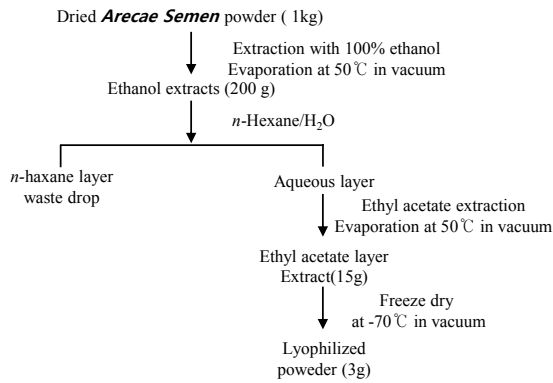


Figure 1. Scheme of the organic solvent fractionation of *A. semen*.

이트를 이용하여 추출하였다. 이렇게 분리된 에틸아세테이트 층을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축한 뒤 동결건조기를 이용하여 완전 건조 분말상태로 농축 후 -70°C 에서 갈색 유리병에서 보관하였으며 이 분말시료를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)로 녹여 다양한 농도로 희석하여 본 실험의 시료로 사용하였다(Figure 1). 시료의 추출을 위하여 사용되는 용매는 모두 특급시약(J.T baker, USA)을 사용하였다.

2.3. 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량 분석은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색의 변화량을 측정하는 비색정량법을 이용한 Folin-Denis법[11]을 변형하여 측정하였다. 시료 1 mL에 95% 에탄올 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고, 1 N의 Folin-Ciocalteu 시약 0.5 mL을 첨가 후 혼합하여 5 min 동안 방치한 후, 5% Na_2CO_3 1 mL를 가한 후 흡광도 725 nm에서 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, USA)를 이용하여 측정하였다. 폴리페놀의 표준 검량선은 catechin (Sigma, USA)을 이용하여 정량하였다.

2.4. DPPH Assay 항산화 활성 측정

빈랑자 추출물의 전자공여능 측정은 Blois[12]의 방법에 변형하여 측정하였다. 시료 용액 2.0 mL에 0.2 mM을 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 0.5 mL을 넣고 교반한 후 30 min 방치한 다음 517 nm에서 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek,

USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 전자공여 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity was calculated as follows:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

where A = absorbance at 517 nm without test sample

where B = absorbance at 517 nm with test sample

2.5. Ferric-reducing Antioxidant Potential (FRAP)

Assay 항산화 활성 측정

FRAP에 의한 환원력 실험은 금속이온(Fe^{2+})에 대한 킬레이트 환원력이 높을수록 산화 반응의 촉매반응을 감소시켜 항산화 활성을 나타내는 Benzie와 Strain[13]의 방법을 변형하여 측정하였다. FRAP 시약은 25 mL acetate buffer (300 mM, pH 3.6)에 40 mM의 HCl에 용해시킨 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ Sigma, USA) 5 mL에 20 mM ferric sulfate (FeSO_4) 2.5 mL을 첨가하여 제조하였다. 이렇게 만들어진 FRAP reagent 0.9 mL에 농도별로 희석된 빈랑자 에틸아세테이트 분획을 0.03 mL와 증류수 0.09 mL 첨가한 다음 37°C 에서 10 min 반응시킨 다음 593 nm에서 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 공시료는 추출용매인 에탄올을 이용하였으며 대조군으로 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였고, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mM 농도로 반복하여 작성된 FeSO_4 의 표준검량선으로 대입하여 도출하였다.

2.6. 피부상재균에 대한 항균활성 확인

피부상재균에 대한 항균활성 확인을 위하여 사용된 공시 균주는 *S. aureus* KCTC3881, *S. epidermidis* KCTC1917과 *E. coli* KCTC2441를 사용하였으며 모두 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 균주를 배양하기 위한 배지로 nutrient agar, luria bertani agar 및 tryptic soy agar를 Difco Lab. (Sparks, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 빈랑자의 항균활성을 확인하기 위하여 disc diffusion assay를 수행하였으며 추출물이 나타내는 생육저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 측정하였다. 각각의 균주

를 고체배지에 도말한 뒤, 멸균된 paper disc에 농도별로 희석된 빈랑자 추출물을 점적하고 건조과정을 거친 뒤 37 °C에서 배양하며 측정하였다.

2.7. 세포배양

마우스의 흑색종 세포(B16/F1 malignant melanoma cell)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였으며, 이 세포를 37 °C, 5% CO₂의 조건에서 10% FBS, 50 units/mL의 streptomycin, 100 U/mL의 penicillin (Hyclone, USA)을 첨가하고 Dulbecco's modified Eagle's medium (Hyclone)에서 배양하였다.

2.8. MTT assay

빈랑자의 세포독성을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 세포를 96-well plate의 각 well에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하고 빈랑자 추출물을 20 µg/mL에서 500 µg/mL까지 처리하였다. 다시 24 h 동안 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 뒤 MTT를 5 mg/mL 농도가 되도록 PBS에 희석하고 새 배양액에 500 µg/mL가 되도록 희석하여 각 well에 100 µL씩 분주한 후 4 h 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 DMSO와 에탄올을 1 : 1 비율이 되도록 섞어준 용액을 150 µL씩 각 well에 분주하고 교반 용해시킨 후 550 nm에서 각 well의 흡광도를 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.9. 세포 내 멜라닌 함량 측정

B16/F1 세포에서 α -melanin stimulating hormone (α -MSH)에 의해 과발현된 멜라닌을 저해 활성을 확인하기 위하여 세포 내 멜라닌 정량은 Hosoi 등[14]의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 100 mm culture dish에서 1×10^5 cells/well 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 이 후 α -MSH를 100 nM이 되도록 처리한 다음 6 h 동안 배양하였다. 다시 여기에 빈랑자 추출물을 농도별로 처리하고 대조군으로 kojic acid와 arbutin을 빈랑자 최대 처리농도인 80 µg/mL가 되도록 처리하였다. 다시 24 h 동안 배양한 후 세포를 PBS으로 2회 세척 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 침전된 세포에 5% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL

을 첨가한 뒤 원심분리하여 다시 침전물만 회수하였다. 이 침전물에 에탄올 : 에터 (3 : 1) 용액을 첨가하여 세척하고 1 N NaOH를 첨가하여 100 °C에서 10 min 동안 용해시켰다. 이 용해액의 흡광도를 475 nm에서 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.10. 멜라닌 합성 관련 유전자의 발현저해 실험

멜라닌 함량 측정과 동일한 방법으로 배양한 세포의 total cellular RNA를 추출하기 위하여 easy-BLUE kit (Intron, Korea)을 사용하였다. 추출된 mRNA로부터 oligo d(T)16 primer를 이용하여 cDNA (reverse-transcriptase synthesis Kit, Fermentas, USA)를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 멜라닌 합성과 관련된 유전자의 발현 양상을 polymerase chain reaction (Qiagen, USA)을 통하여 확인하였다. PCR에 사용한 primer는 다음과 같다.

tyrosinase(sense primer :

5'-GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT-3',

anti-sense primer :

5'- TGGTGCTTCATGGGCAAATC-3'),

TRP-1(sense primer :

5'-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3',

anti-sense primer :

5'-AAGACGCTGCACACTGCTGGTCT-3'),

TRP-2(sense primer :

5'-GGATGACCGTGAGCAATGGCC-3',

anti-sense primer :

5'-CGGTTGTGACCAATGGGTGCC-3'),

MITF(sense primer :

5'-GTATGAACACGCACTCTCTCGA-3',

anti-sense primer :

5'-CTTCTGCGCTCATACTGCTC-3'),

β -actin(sense primer :

5'-ACCGTGAAAAGATGACCCAG-3',

anti-sense primer :

5'-TACGGATGTCAACGTACAC-3').

발현양상을 확인하기 위하여 PCR 증폭 조건은 94 °C에서 30 s, 55 °C에서 30 s, 72 °C에서 40 s로 하여 총 30 cycle을 반복하였다. 증폭된 유전자는 1% 아가

Table 1. Total Phenolic Contents of the Ethyl Acetate Fraction from *A. semen*

Fraction	Polyphenol contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Catechin ¹⁾)
Ethyl acetate	301.35 \pm 0.88 ²⁾

¹⁾ Catechin equivalents

²⁾ Value are mean \pm SD (n = 3)

로스 젤 전기영동을 통하여 확인하였다.

2.11. 통계처리 및 분석방법

모든 실험은 3회 반복실험을 통하여 결과값을 도출하였으며 ANOVA 검정을 적용하였으며 대조군과 실험군 간의 결과는 mean \pm SD로 나타냈으며 Student's *t*-test로 통계처리의 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량

일반적으로 천연 항산화제는 식물 추출물의 폴리페놀 화합물로 알려져 있다[15]. 폴리페놀성 물질은 식물계에 존재하는 2차 대사물질로서 다양한 구조를 가지며 강한 전자공여능으로 항산화 효과를 비롯한 다양한 생리활성 기능을 나타낸다[16]. Lee 등[17]의 연구에 따르면 빈랑자의 에틸아세테이트 분획에서 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고하고 있으며, 따라서 빈랑자의 에틸아세테이트 분획을 추출하여 이용하였다. 항산화 활성의 원인물질인 폴리페놀성 물질은 catechin을 표준용액으로 하여 작성한 표준검량선으로부터 빈랑자의 에틸아세테이트 분획의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획의 총 폴리페놀성 함량은 301.35 \pm 0.88 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 측정되었다. Kim 등[18]의 연구에 따르면 자생식물인 비수리 228.90 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 감나무 112.98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타났으며 생약식물에서는 삼백초 194.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 애엽 203.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 측정되었다고 보고하였다. 이 보고에 비교할 때 빈랑자의 에틸아세테이트 분획은 비교적 많은 폴리페놀 함량을 갖는 것으로 측정되었다.

Table 2. DPPH Radical Scavenging Activity of Ethyl Acetate Fraction from *A. semen*

Fraction	IC ₅₀ value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ethyl acetate fraction	1.02 \pm 0.07
Ascorbic acid	0.96 \pm 0.03

¹⁾ Concentration required for 50% reduced of DPPH at 30 min after starting the reaction

²⁾ Each value is mean \pm SD (N \geq 3)

³⁾ Value Sharing the same latter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Student's *t*-test

3.2. DPPH Radical 소거능

빈랑자 추출물의 DPPH 전자공여능을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. DPPH는 free radical로서 진한 보라색의 안정한 화합물이며, free radical 소거활성을 갖는 플라보노이드 또는 폴리 페놀성 물질과 같은 항산화 물질에 의해 정량적으로 탈색되어 항산화 물질의 지표로서 사용되며[19], 환원력과 전자공여능에 비례한다고 보고되었다. 따라서 빈랑자 추출물에 대하여 DPPH를 이용한 전자공여능을 분광광도계 분석에 의해 측정하였다. DPPH radical의 초기농도를 50% 감소시키는데 필요한 추출물의 농도를 IC₅₀ 값으로 산출한 결과를 Table 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 0.96 \pm 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고 빈랑자는 1.02 \pm 0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 ascorbic acid와 거의 비슷한 우수한 항산화 효과를 나타내었다. Kim 등[20]의 보고에 따르면 총 폴리페놀의 양과 항산화력이 비례한다는 연구보고와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 빈랑자의 에틸아세테이트 분획에 페놀성 물질이 다량 분포하는 것으로 사료된다.

3.3. FRAP 활성

빈랑자의 에틸아세테이트 분획의 FRAP value의 결과는 Table 3에 나타내었다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획에서는 9.07 \pm 0.36 mM로 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 9.07 \pm 0.36 mM과 비슷한 FRAP value를 나타내었다. 이 결과는 DPPH assay와 비슷한 경향을 나타내고 있으며 또한 Kim 등의 보고와 유사한 결과를 나타내었다[21]. 이러한 결과를 토대로 빈랑자의 에틸아세테이트 분획은 매우 우수한 항산화력을 나타내는 것으로 측정되었다.

Table 3. FRAP Value of Ethyl Acetate Fraction from *A. semen*

Fraction	FRAP value (mM)
Ethyl acetate fraction	9.07 ± 0.36
Ascorbic acid	9.11 ± 0.44

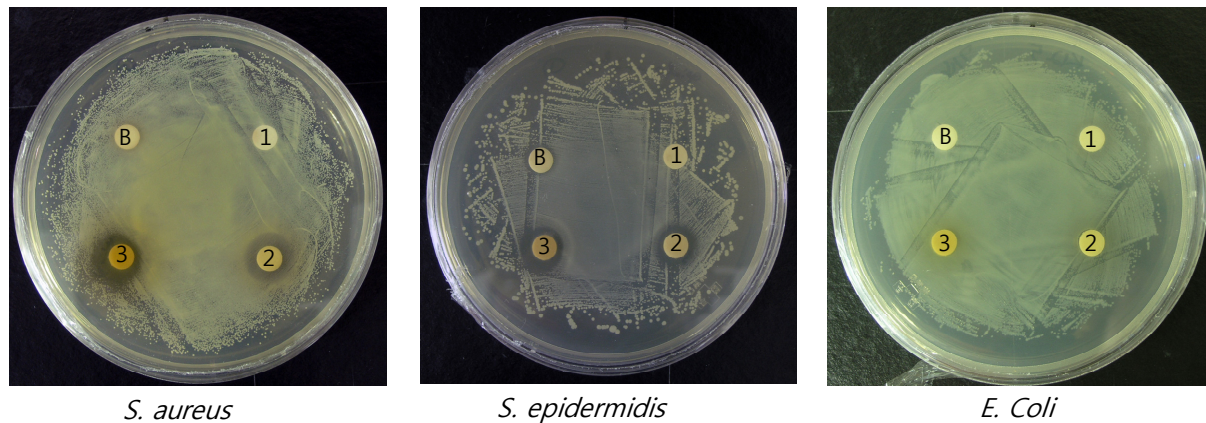
¹⁾ Each value is mean ± SD (N ≥ 3)

²⁾ Means significant difference between ascorbic acid and ethyl acetate fraction of *A. semen* at the same concentration (row) by student's *t*-test ($p < 0.05$)

Table 4. Antibacterial Effect of the Ethyl Acetate Fraction from *A. Semen*

	Inhibition zone ¹⁾ (mm)		
	20	40	80
<i>S. aureus</i>	N.D	0	10
<i>S. epidermidis</i>	N.D	5	8
<i>E. coli</i>	N.D	N.D	N.D

¹⁾ $\mu\text{g/mL}$ of fraction was absorbed into paper disc (8 mm) and diameter (mm) of clear zone was measured N.D : not detect

**Figure 2.** Antibacterial effect of various concentration ethyl acetate fraction from *A. semen* by disc diffusion assay (B : DMSO; 1 : 20 $\mu\text{g/mL}$; 2 : 40 $\mu\text{g/mL}$; 3 : 80 $\mu\text{g/mL}$).

3.4. 피부상재균에 대한 항균활성 확인

피부상재균에 대한 항균활성을 검토하기 위하여 disc diffusion assay법을 이용하여 측정하였다. 피부상재균 3종에 대한 생육저해환의 형성 결과를 Figure 2 과 Table 4에 나타내었다. 빈랑자의 에틸아세테이트 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 항균활성을 나타내지는 않았으나 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에서 모두 생육저해환을 형성하였다. 하지만 *S. aureus*의 경우 48 h 이후

에는 생육저해환을 유지하지 못했다. 반면 같은 농도에서 *S. epidermidis*의 경우 72 h 이상까지 5 mm의 생육저해환을 유지하였다. 또한 80 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 경우 *S. aureus*와 *S. epidermidis* 모두 각각 10 mm, 8 mm의 생육저해환을 72 h 이상 유지하였다. 반면 *E. coli*의 경우 최대 처리 농도에서도 생육저해환을 나타내지는 않았다. 이는 Yu 등[22]의 보고와 비슷한 효과를 나타내었다.

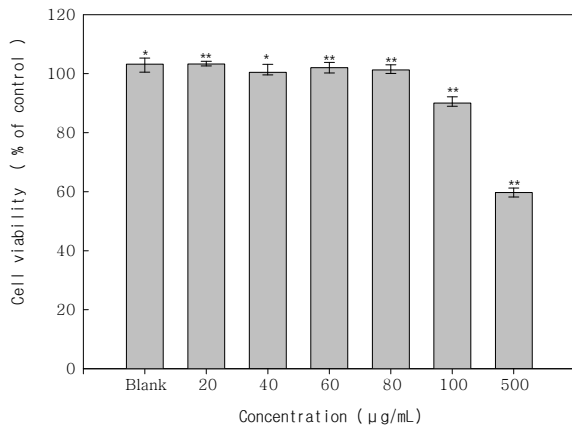


Figure 3. Effect of *A. semen* concentration on the cell viability of B16/F1 melanoma cell. B16/F1 cells were treated with various concentrations (20 - 500 µg/mL) of *A. semen*. Cell viability was measured by MTT assay. Data points and bar represent arithmetic mean ± SD (n = 3). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ as compared to the untreated group (Blank).

3.5. 세포독성

마우스의 흑색 종양 세포인 B16/F1 세포에 대한 빈랑자의 세포독성 농도를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 생존세포의 탈수효소작용에 의하여 노란색의 수용성기질이 청자색을 띠는 비수용성 MTT formazan결정체로 환원량을 비색정량법으로 확인하는 실험법[23]으로 이러한 특성을 이용하여 빈랑자의 에틸아세테이트 분획을 처리한 결과 80 µg/mL 농도에서 세포에 거의 영향을 미치지 않았으며 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 $9.49 \pm 1.61\%$ 의 생존율이 감소되었으며 세포생존율을 50%를 저해하는 IC_{50} 값은 589.55 µg/mL 측정되었다(Figure 3). Chin 등[24]의 보고와 비슷한 결과를 나타내고 있으며 이후의 실험은 세포성장률에 영향을 주지 않는 80 µg/mL 농도까지 진행하여 빈랑자의 미백효과가 세포 생존율의 감소가 아니라 빈랑자의 효과임을 확인할 수 있다.

3.6. 세포 내 멜라닌 함량측정

B16/F1 세포 내에서 빈랑자의 에틸아세테이트 분획의 멜라닌 합성 억제 작용을 확인하기 위하여 다양한 농도별로 처리한 뒤 그 세포 내 멜라닌의 양을 Hosoi 등[14]의 방식을 변형하여 측정하였다. 생체 내에서의

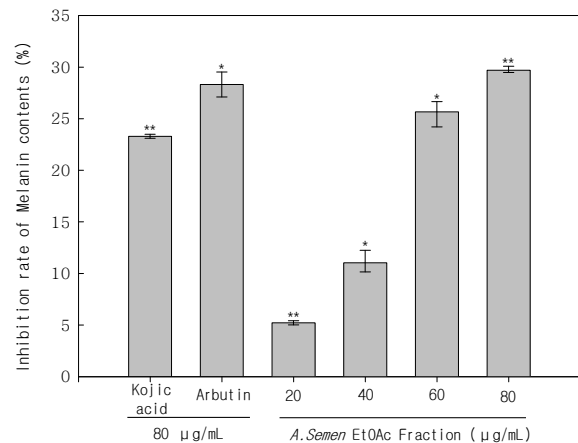


Figure 4. Effect of *A. semen* concentration on the melanin contents of B16/F1 murine melanoma cell. B16/F1 cells were treated with various concentrations (20 - 80 µg/mL) of *A. semen*. Melanin contents was measured by absorbance. Data points and bar represent arithmetic mean ± SD (n = 3). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ as compared to the untreated group (Blank).

멜라닌 합성은 기질인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPA quinone 등[25]의 중간체를 거쳐 멜라닌이 생성된다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획은 20 µg/mL에서 80 µg/mL까지 다양한 농도로 처리하고 48 h 동안 배양한 다음 멜라닌의 양을 측정하였고 Figure 4에 나타내었다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획을 80 µg/mL 처리하였을 때 $29.78 \pm 0.31\%$ 까지 저해되었다. 이 결과는 양성대조군으로 사용된 동량의 arbutin의 $28.31 \pm 1.20\%$ 저해율과 유사한 효과를 나타내었다. 또한 양성대조군으로 사용된 동량의 kojic acid의 $23.29 \pm 0.19\%$ 저해율 보다도 높은 효과를 나타냈다. 따라서 빈랑자의 에틸아세테이트 분획은 미백제로서 가치가 있는 것으로 사료된다.

3.7. 멜라닌 합성 관련 유전자의 발현저해

멜라닌 합성은 세포 중 melanocyte에서 일어나며 tyrosinase와 이와 관련된 효소에 의하여 이루어진다 [26]. 따라서 tyrosinase, TRP 유전자와 MITF 유전자를 저해한다면 멜라닌 합성을 저해할 수 있다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획이 멜라닌 합성 유전자에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분획을 20, 40 µg/mL의 농도를 처리한 뒤 48 h 뒤에 mRNA를 추출하여 그 발현정도를 PCR을 통해 확인하였다(Figure 5). 빈랑자의 에

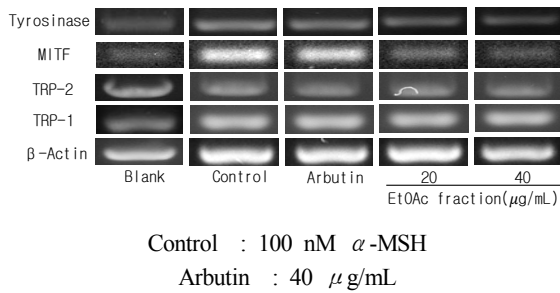


Figure 5. Effect of *A. semen* ethyl acetate fraction on mRNA expression of melanogenesis-related genes. The size amplified gene products were 528 bp for β -actin, 477 bp for tyrosinase, 268 bp for tyrosinase related protein-1, 1044 bp for tyrosinase related protein-2 and 910 bp for MITF.

틸아세테이트 분획을 40 μ g/mL 농도가 되도록 처리하였을 때 멜라닌 발현 호르몬인 α -MSH를 처리한 음성 대조군에 비하여 tyrosinase와 MITF 유전자의 mRNA 발현을 유의성 있게 감소시켰으며 이 결과는 세포 내 멜라닌 합성과 유사한 경향을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 동일한 농도의 arbutin 보다도 높은 저해 활성을 나타내었다. 반면 TRP-1과 TRP-2 유전자의 대해서는 특별한 저해를 일으키지 못하였다. 이러한 결과를 종합하였을 때 미백소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

화장품 소재로서 항산화 효과와 미백 효과가 있는 소재 발굴을 위하여 전통 한방 소재인 빈랑자로 유용성 물질을 추출 및 분획하여 소재로서 가능성을 확인하였다. 빈랑자의 마쇄된 건조 분말을 이용하여 용매별 추출을 하였고 그중 에틸아세테이트 분획을 이용하여 동결건조하여 분말형태로 제조하였다. 빈랑자의 에틸아세테이트 분획의 총 페놀성물질의 함량은 $301.35 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 측정되었다. 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 $1.02 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IC_{50} 값이 나타났으며 FRAP value 역시 $9.07 \pm 0.39 \text{ mM}$ 로 측정되어 두 결과 모두 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 비슷한 효과를 나타내었다. 또한 피부상재균에 대한 항균활성으로 Gram positive 균주인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 균주에 대해서 모두 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 생육저해환을 72 h

이상 유지하며 항균활성을 나타내었다. 빈랑자의 에틸아세테이트의 분획은 최대 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 거의 세포독성을 나타내지 않았으며 이 농도에서 멜라닌 합성량을 $29.78 \pm 0.31\%$ 까지 저해하였다. 이 결과를 유전자 수준에서 확인하기 위하여 멜라닌 합성 관련 유전자인 tyrosinase와 MITF 유전자에 대하여 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 의존적으로 저해하는 것이 확인되었다. 따라서 빈랑자는 화장품 소재로서 다양한 이용이 가능할 것으로 사료된다.

Reference

1. 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**, 283 (2001).
2. O. J. Wiedow, M. Schroder, and E. Christophers, Elafin: an elastase specific inhibition of human skin, *J. Biol. Chem.*, **265**, 14791 (1990).
3. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
4. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Circulation*, **97**, 2382 (1998).
5. D. Bagchi, D. M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
6. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, and M. Kikuchi, 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 (2003).
7. Y. Miyamura, S. G. Coelho, R. Wolber, S. A. Miller, K. Wakamatsu, B. Z. Zmudzka, S. Ito, C. Smuda, T. Passeron, W. Choi, J. Batzer, Y.

- Yamaguchi, J. Z. Beer, and V. J. Hearing, Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation, *Pigment. Cell Res.*, **20**, 2 (2006).
8. A. Snchez-Ferre, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Cánovas, and F. Garcia-Carmona, Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1247**(1), 1 (1995).
 9. S. S. Lee, S. Y. Kim, K. H. Son, S. J. Kang, S. Y. Chang, J. H. Park, and K. S. Lee, Isolation and quantitative determination of arecoline from *Arecae semen*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **32**(1), 39 (2001).
 10. J. H. Park, et al. "Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs." *Kor. J. Herbology*, **41**(4), 518 (1997).
 11. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**(11), 966 (1981).
 12. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **26**, 1190 (1958).
 13. I. F. F. Benzie and J. J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.*, **239**(1), 70 (1996).
 14. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, **45**(4), 1474 (1985).
 15. M. T. Huang, C. T. Ho, and C. Lee, Phenolic compounds in food and their effect on health (2), antioxidants and cancer prevention, *ACS Symp.*, **207**, 54 (1992).
 16. A. M. Fine, Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical application *Altern. Med. Rev.*, **5**, 114 (2000).
 17. S. E. Lee, E. M. Joo, and J. H. Kim, Protective effect of natural medicinal plants against oxidative damage induced by reactive oxygen species, *Environ. Health Toxicol.* **15**(4), 147 (2000).
 18. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee, and B. H. Lee, Total polyphenols, total flavonoid contents and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plant, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(3), 337 (2012).
 19. Y. H. Kang, Y. K. Park, S. R. Oh, and K. D. Moon, Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts, *Korean J. Food sci. Technol.*, **27**, 978 (1995).
 20. E. Y. Kim, I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim, and M. R. Rhyu, Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants, *Korean J. Sci. Technol.*, **36**, 333 (2004).
 21. K. H. Kim, N. Y. Kim, S. H. Kim, I. A. Han, and H. S. Yook, Study on antioxidant effects of fractional extracts from *Ligularia stenocephala* leaves, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(9), 1220 (2012).
 22. Y. E. Yu, E. Y. Park, D. H. Jung, S. H. Byun, S. C. Kim, and S. M. Park, Antibacterial activity of oriental medicinal herb extracts against skin pathogens, *J. Life Sci.*, **20**(7), 1143 (2010).
 23. J. M. Sargent and C. G. Taylor, Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia, *B. J. of cancer*, **60**(2), 206 (1989).
 24. J. E. Chin and N. C. Cho, The effects of *Areca catechu* extracts on tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells, *Korean J. Food & Nutr.*, **20**(2), 240 (2007).
 25. A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, **84**(4), 1155 (2004).
 26. L. Rodriguez and N. Jose, Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Bio. Chem.*, **267**(6), 3801 (1992).