

변수 분석을 통한 아토카푸스 니티두스 추출물과 분획물의 항산화, 타이로시나제 및 콜라제나제 *In Vitro* 저해활성 연구

손 광 희[†] · 김 영 국 · 최 상 호 · 장 지 윤^{**} · 신 동 하^{***} · 이 종 석^{****} · 박 호 용

한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터 · *한국생명공학연구원 해외생물소재연구센터^{**}
중국과학원 식물학연구소 · *** (주)인섹트바이오텍 · **** 경기도경제과학진흥원
(2019년 5월 16일 접수, 2019년 6월 7일 수정, 2019년 6월 16일 채택)

Studies on Antioxidant Activity and *In Vitro* Inhibitory Activity of Tyrosinase and Collagenase in *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnaensis* (Merr.) F.M. Jarrett using 4 Parameter Logistic

Kwang-Hee Son[†], Young Kook Kim, Sangho Choi^{*}, Zhiyun Zhang^{**}, Dong-Ha Shin^{***}, Jong Suk Lee^{****}, and Ho-Yong Park

Industrial Bio-material Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Korea

^{*}International Biological Material Research Center, KRIBB, Korea

^{**}Institute of Botany, CAS, China

^{***}R&D Center, InsectBiotech, Korea

^{****}Biocenter, GBSA, Korea

(Received May 16, 2019; Revised June 7, 2019; Accepted June 16, 2019)

요 약: 본 연구에서는 아토카푸스 니티두스의 용매추출물 및 실리카 컬럼 분획물의 항산화 활성, 콜라제나제 저해활성 및 미백활성을 평가하였다. *In vitro* 실험의 활성 분석은 sigmoid 곡선형 반응에 적합한 4 매개변수 회귀곡선 분석(4 parameter logistic, 4PL)을 활용하여 정량화 하였다. HPLC와 LC/MS 분석에 따르면 아토카푸스 분획물은 폴리페놀류가 주성분이었으며, 추출물의 총 폴리페놀의 함량은 갈릭산 기준 48.1 ± 2.6 mg GAE/g 이었다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 평가한 결과, 용매추출물, 분획물-1과 분획물-2는 각각 16.7, 42.0 및 10.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50%의 라디칼 소거활성(SC_{50})을 보였고, 분획물-2는 양성 대조구 ascorbic acid (1.5 $\mu\text{g/mL}$)에 가장 근접한 활성을 보였다. Tyrosinase 저해활성은 추출물과 분획물 2종이 각각 64.9, 0.9 및 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 를 보여 대조구인 코직산(7.4 $\mu\text{g/mL}$) 및 알부틴(119.0 $\mu\text{g/mL}$) 대비 전반적으로 높은 활성을 보였다. 제브라피쉬 배아를 이용한 색소침착도 억제활성에서는 분획물-2(27.5%)가 대조구인 코직산(18.6%) 대비 유의하게 미백활성 결과를 보였으며 동시에 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지 배아 성장에 영향이 없음을 확인하였다. 아토카푸스 추출물과 분획물-1 및 분획물-2는 콜라제나제 저해활성에서 각각 139.8, 20.6, 및 16.8 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 를 보여, 대조구인 1, 10-Phenanthroline (55.4 $\mu\text{g/mL}$) 대비 우수한 활성을 보였다. 추출물과 분획물-2에 대한 엘라스타제 저해활성은 각각 61.8과 67.1 $\mu\text{g/mL}$ 으로 암라 및 사포타 추출물과 유사한 활성 범위를 보여주었다. 이상의 결과는 아토카푸스 추출물이 항산화, 미백 및 피부노화 방지에 유용한 폴리페놀계 화장품소재로 활용이 가능하며, 추출물-2는 고농도에서도 안전함을 시사한다.

[†] 주 저자 (e-mail: sonkh@kribb.re.kr
call: 042-860-4553

Abstract: In this study, the antioxidative and inhibitory activity of tyrosinase and collagenase for the solvent extract and silica column fractions of *Artocarpus nitidus* were evaluated. The activities were quantified using the 4 parameter logistic. LC/MS analysis showed that the major component of the fractions was polyphenol and the total polyphenol content of the extract was 48.1 ± 2.6 mg GAE/g. The radical scavenging activities (SC_{50}) for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of the extract, fraction-1 and fraction-2 were 16.7, 42.0 and 10.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The value for fraction-2 was the closest to ascorbic acid (1.5 $\mu\text{g/mL}$). The tyrosinase inhibitory activity of the extracts and the fractions showed IC_{50} of 64.9, 0.9 and 1.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and overall activity was higher than that of kojic acid (7.4 $\mu\text{g/mL}$) and arbutin (119.0 $\mu\text{g/mL}$). In the experiment by zebrafish embryo, the whitening activity of fraction-2 (27.5%) was higher than that of kojic acid (18.6%), and there was no adverse effect up to 500 $\mu\text{g/mL}$ of fraction-2. For the collagenase inhibitory activity, the samples showed IC_{50} of 139.8, 20.6, and 16.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were competitive to 1, 10-Phenanthroline (55.4 $\mu\text{g/mL}$). The extract and fraction-2 showed IC_{50} of 61.8 and 67.1 $\mu\text{g/mL}$ for elastase. These results suggest that *A. nitidus* extract can be used as a cosmetic material useful for antioxidant, whitening, and prevention of skin aging without adverse effects.

Keywords: antioxidant, polyphenol, collagenase inhibition, tyrosinase inhibition, *Artocarpus nitidus*

1. 서 론

천연물은 역사적으로 각종 질병의 치료제로 사용되어 그 생물학적 활성의 적용성이 입증된 자원일 뿐 아니라 화학적으로도 풍부한 구조 다양성을 제공하고 있다[1]. 이러한 특성으로 인해 천연물은 신약, 식품 및 향장소재를 비롯한 생리활성물질 개발의 중요한 자원으로서 선도적 구조를 포함하는 소재 및 기능을 제공하고 있다[2,3]. 천연물은 그 생합성 단계마다 생합성에 관여하는 효소들과의 결합 및 반응의 상호작용을 거치는 과정을 겪으므로, 원천적으로 단백질 부위와 결합할 수 있는 친화력 높은 구조적 특성 가진다고 해석되며, 이는 물질과 효소의 결합을 바탕으로 하는 효소저해제 개발에 좋은 특성을 갖는 것으로 알려져 있고[4], 생리활성 표적에 결합하는 리간드로서 저분자 활성물질 및 신약 라이브러리의 우수한 후보군이 된다[5].

특히 식물 천연물은 안전한 그래스(GRAS; generally recognized as safe) 수준의 성분을 기대할 수 있고, 복합성분(MCBTs; multicomponent botanical therapeutics)에 의한 효능의 시너지를 기대할 수 있는 장점이 있다[6]. 또한 다양한 구조 정보를 바탕으로 테르펜(terpene)과 같은 선도물질 형태의 대표적 모핵 구조를 제공하며[7], 이를 바탕으로 관련 유도체의 합성에 방향성을 제공하기도 한다[8]. 이러한 특성적 장점으로 인해, 식물 천연자원은 전통 지식적 용도와 아울러 기작 중심의 코스메슈티컬(cosmeceuticals) 개념의 실현을 가능하게 하였을 뿐 아니라, 상당수의 자원이 이미 기업 수준의 활용성 및 공정 적용성을 갖춘 혁신적

향장소재로 평가되고 있다[9,10].

피부 개선에 효과적인 천연물의 활성 분석은 대개 일정한 농도(dose)에서 발휘되는 활성(response)의 크기를 평균값, 편차 및 t-test에 의한 유의성 분석으로 표현한다. 또한 기존 소재 혹은 활성 수치와의 정량화된 객관적 비교를 위해서는 최대 활성의 중간 값에 해당하는 유효농도(EC_{50}), 저해농도(IC_{50}), 혹은 소거농도(SC_{50}) 등으로 활성의 크기를 표시한다. 그러나 효소 저해와 같은 효소기질-저해제가 개입하는 복잡한 kinetic 반응에 대한 신뢰성 높은 수치 분석은, 단순한 평균값과 유의성 분석 이상의 수치처리를 필요로 하며 이에 대한 다양한 해결책이 제시되고 있다[11-13]. 이 논문에서는 최대값과 최소값을 갖는 효소 반응 및 저해 작용의 sigmoid 형태 분석에 적합한 4 매개변수 회귀식 (4PL, 4 parameter logistic regression)을 활용하여 IC_{50} 및 SC_{50} 의 수치를 도출하였다.

피부는 각종 내부적 혹은 외부적 스트레스로 인해 야기되는 과산화물로 스트레스를 겪게 되는데[14-16], 식물 천연물은 이에 대한 노화 방지의 중요한 항산화 활성을 보여 주는 자원이다[17,18]. 향장소재로서 식물천연물이 가지는 또 하나의 중요한 활성이 멜라닌 합성의 저해이다. 자외선 등에 의해 촉발되는 멜라닌 생합성은 자외선 차단이나 항산화 활성물질에 의해 완화 시킬 수 있으며, 근본적으로는 멜라닌 생합성의 속도결정단계인 tyrosinase를 억제하여 미백 활성을 기대할 수 있다[19]. 멜라닌 합성은 신체의 정상적 방어기작이지만, 원치 않는 색소의 침착은 밝고 투명한 피부유지와 개선에 방해가 되므로 알부틴과 같은 tyrosinase 저해제는 미백기능을 가지는 피부개선의 탁월하

고 안전한 소재로 제시되고 있다[20]. 이들 tyrosinase 저해 활성물질은 하이드로퀴논의 구조 유사체와 같은 페놀계 화합물, 폴리페놀계 화합물 등 다양한 구조 및 폭 넓은 저해활성도를 가지고 있으며, 그 식물자원도 다양하게 밝혀져 있다[21]. 플라보노이드는 이러한 미백 활성의 주요자원이며 그 저해 기작에 대한 심도 있는 연구가 이어지고 있다[22].

피부의 노화는 피부기저층의 결합조직 손상을 통해 주름의 형태로 드러나기도 하는데, 이러한 경우 콜라젠을 공급해주거나[23], 결합조직의 분해를 억제함으로써 주름방지의 가능성을 나타낼 수 있다. 결합조직의 분해에 관여하는 효소를 억제하는 활성물질은 피부의 주름 발생을 완화하는 소재로 보고되고 있다[24]. 식물 천연물은 항산화 가능성을 갖는 폴리페놀류 함량이 높을 뿐 아니라 주름생성의 원인을 제공하는 분해효소인 collagenase 및 elastase 억제 활성 등 복합 가능성을 보여주며[25], hyaluronidase 저해 등 다양한 복합 화합물의 생리활성을 갖는다고 알려져 있다[26].

아토카푸스(*Artocarpus*)는 빵나무 속의 열대 식물자원으로 브레드프루트(Breadfruit, *Artocarpus altilis*), 잭프루트(Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*), 와일드잭(*Artocarpus hirsutus*), 마랑(Terap, *Artocarpus odoratissimus*) 및 잭프루트와 유사한 첼페딕(*Chempedak, Artocarpus integer*) 등의 식용 과실을 포함하는 유용 식물자원이다. 이러한 식용을 기원으로 하는 식물자원은 전통적 지식, 독성 및 안전성에서 탁월한 특성을 가지고 있어서, 코스메슈티컬의 안전한 기능성 소재의 좋은 후보이다. 특히, 범람하는 기능성 원료의 잠재적 부작용에 대한 우려가 커지는 상황에서[27] 식용 수준의 안전한 자원을 기반으로 하는 아토카푸스는 가치 있는 소재 자원이다.

아토카푸스 속의 식물자원은 식용 및 약용으로 연구가 이루어져, 미국 국립보건원의 펍메드(Pubmed) 및 국내 특허정보 키프리스(Kipris) 기준으로 2019년 4월 기준, 각각 648개 및 1,044개의 다양한 연구결과가 보고되고 있다. 이에 반해, 그 중의 한 종인 *Artocarpus nitidus*는 플라반 및 스틸벤 계통의 물질과 지질분해효소 저해 활성 등 매우 제한적인 연구보고가 있는 미답지 분야의 자원이다[28-30].

본 연구에서는 해외생물자원센터(www.ibnrc.re.kr)로부터 분양받은 *A. nitidus* 줄기와 잎의 건조물을 기원으로 확보한 용매 추출물 및 이의 분획물을 연구시료로 하여, 소재의 주요 활성성분을 LCMS 및 HPLC로 분석하였고, 폴

리페놀 함량 분석과 DPPH 라디칼 소거기능 분석을 통한 항산화 효과를 확인하고 아울러, 이들 *A. nitidus* 시료의 *in vitro* tyrosinase 억제활성에 의한 미백 가능성을 확인하고자 하였다. 또한, 피부 기저층 조직을 분해하여 피부노화 및 주름 형성의 원인이 되는 효소인 collagenase와 elastase의 *in vitro* 억제효과를 확인하여, 향후 피부 노화 및 미백 등의 피부개선을 위한 소재로서의 활용성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. *A. nitidus* 추출 및 Silica 컬럼 분획

본 연구에 사용된 아토카푸스 니티두스(*Artocarpus nitidus* subsp. *lingnaensis* (Merr.) F.M. Jarrett)는 해외자원소재센터(https://www.ibnrc.re.kr, Korea)에서 잎과 줄기를 포함하는 중국원산의 건조시료를 분양 받아 사용하였다. 추출 용매는 methanol (Sigma, USA)을 사용하였으며 분쇄된 20 g의 *A. nitidus* 건조 식물체에 용매 500 mL를 넣고 삼각 플라스크에 담아 40 °C, 110 rpm의 shaker에서 20 h 동안 1차 추출하였고, 동일 조건에서 5 h 동안 2차 추출하여 가용성 부분을 회수 하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 1, Merck, USA)를 통과 시킨 후, 감압 농축하여 분석 및 후속 분리정제에 사용할 methanol 추출물을 확보하였다.

Methanol 추출물의 추가 분리정제를 위해 ethyl acetate (Sigma, USA)와 3차 증류수를 1 : 1 비율로 담은 분액깔때기에서 액체-액체 분배를 수행하여, 용매 층으로 이동한 부분을 3 차에 걸쳐 회수하여 감압 농축하였고, 추출물 무게의 4배에 해당하는 silica (Silica gel 60, 0.040 - 0.063 mm, Merck, USA) 분말에 흡착시켜 dry packing을 위한 시료를 제조하였다.

이들 dry packing용 시료를 chloroform (Sigma, USA)을 이동상으로 미리 충전 된 silica open column 상단에 얹고 (6 g silica 당, 추출물 건조중량 160 mg의 비율로 loading), chloroform과 methanol 혼합 용매를 이용하여 (CHCl₃ : CH₃OH, 49 : 1 부터 4 : 1 까지 단계별 구배) 비극성 분획부터 용출시키며 분취물을 받았다. 분취물은 TLC (silica plate, 전개용매 조성 = CHCl₃ : CH₃OH, 4 : 1, anisaldehyde 염색) 및 *in vitro* tyrosinase 저해도를 기준으로 스크리닝하여 활성이 확인되는 두 곳의 분취물로부터 *A. nitidus* 분획물-1 과 분획물-2를 확보하였다.

이들 분획은 HPLC (Agilent 100, Agilent, USA)를 이용하여 순도 및 조성을 분석하였다. 분석용 컬럼은 YMC-Triart C₁₈ column (150×4.6 mm, 5 μm, 12 nm, YMC, Japan)이었으며, 이동상 용매는 acetonitrile 40%의 isocratic 조건이었고, 유속 0.5 mL/min의 속도로 20 min까지 용출시켰다. 분획물-1 및 분획물-2는 각각 t_R (retention time) 4 - 14 min 및 5 - 6 min 사이에 보이는 피크를 기준으로 판별하였다. 기타 판별원이 표시되지 않은 시약 및 용매는 SigmaAldrich-Merk, USA로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. *A. nitidus* 추출물의 성분 프로파일링을 위한

LC/MS 분석

성분 분석 및 내부 기준물질 확보를 위한 분리정제는 25 g의 고정상이 pre-pack 된 Silica-Biotage 컬럼(Biotage SNAP Ultra, Biotage, Sweden)을 사용하였다. 용매 조건은 chloroform과 methanol의 99 : 1에서 0 : 100의 구배로 1 - 2 mL/min의 속도로 용출시켜, 앞서 open column과 같은 두 개의 분획물을 확보하였다. 건조된 두 개의 분획물을 25% methanol (CH₃OH : H₂O = 1 : 3, v/v)에 현탁하여 C₁₈-Biotage (12 g, silica-C₁₈) 컬럼에 로딩하였다. 이동상의 용매는 CH₃OH : H₂O (v/v)를 1 : 3에서 100 : 0의 구배까지 0.5 - 1.0 mL/min의 속도로 용출시켰다. 각 2 mL씩 분취한 분리물의 유효성분 확인은 *in vitro* tyrosinase 저해활성을 기준으로 진행하였다. 이 과정에서 확보된 분취물 7번과 12번을 compound-1(C1)과 compound-2(C2)로 명명하고, LC/MS 및 시료의 동등성 확인에 적용하였다.

C1과 C2는 LC/MS를 이용하여 역상 컬럼에서의 물질군 구성 프로파일을 분석하고, 분자량이 확인되는 피크에 대한 화학식 결정을 위해 ESI Full MS를 진행하였다. 사용한 LC 장비는 Acquity UHPLC (Waters, USA)이었고, 질량분석을 위한 장비는 Orbitrap Fusion Mass Spectrometer (ThermoFisher Scientific, USA)이었다. 분석에 적합한 컬럼은 Acquity BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm, Waters, USA)이었고, 용매조건은 A (0.1% formic acid, H₂O)와 B (0.1% formic acid, CH₃CN), 검출은 PDA (200 nm - 500 nm)와 MS (m/z; 150.0000 - 1,800.0000)이었다. 용매 펌프 속도는 0.4 mL/min이었고, 농도 구배는 A에 대한 B용액의 비율로 5 B% (0 - 1 min), 5 - 70 B% (1 - 20 min), 70 - 100 B% (20 - 24 min), 100 B% (24 - 27 min)의 구간으로 진행하였다.

2.3. *A. nitidus* 추출물의 총 폴리페놀 함유량 평가

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Jeong 등[31]의 Folin-Ciocalteu (FC) 방법을 개량하여 사용하였다. 농도 1 mg/mL인 시료 80 μL와 50% FC 시약(Sigma, USA) 20 μL을 혼합하여 3 min 동안 반응한 후, 2% 탄산나트륨(Na₂CO₃, Sigma, USA) 100 μL와 혼합하여 microplate reader (Infinite M200-Pro, TECAN, Switzerland)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 3 반복 평균값 및 편차를 계산하여, 건조 추출물 무게(g)에 대한 갈릭산(gallic acid, Sigma, USA)의 당량 무게(mg GAE)로 표시하였다.

2.4. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 평가

추출물 및 분획물의 항산화 활성은 Ren 등의 방법[32]을 근간으로 개량하여 DPPH 라디칼 소거활성을 3반복 실험을 통해 평가하였다. 메탄올로 농도별 희석된 시료 10 μL과 190 μL의 0.1 mM DPPH 용액을 기준으로 microplate reader에서 반응 시간별로 517 nm 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조구를 기준으로 라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 양성 대조구로 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하여 소거 활성을 비교 분석하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성 (\%)} = \{(H_0 - H)/H_0\} \times 100$$

(H = 시료 및 양성 대조구의 흡광도;

H₀ = Blank 실험구의 흡광도)

최대 활성의 50% 라디칼 소거에 필요한 시료의 농도 (SC₅₀) 계산은, 시료 농도와 3회 반복 소거 활성치를 두 축으로 하는 회귀방정식을 통해 진행하였다.

2.5. *In Vitro* Tyrosinase 활성 저해능 평가

Mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1, Sigma, USA) 효소와 기질인 L-tyrosine (Sigma, USA)을 사용하여 저해능을 평가하였다. 저해활성을 결정하는 기본정량 조건은 Tyrosinase Inhibitor Screening Kit (Colorimetric) ab204715 (Abcam, England)의 방법을 개량하여 사용하였고, arbutin 및 kojic acid를 양성 대조구로 하여 저해활성 평가에 적용하였다. 순차별로 희석된 농도의 시료 3 μL를 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 27 μL에 섞어, 300 U/mL의 효소 120 μL과 혼합하여 10 min 간 반응시키고, 1.5 mM L-tyrosine 50 μL을 넣어 25 °C 조건의 microplate reader에

서 490 nm 흡광도를 10 min 동안 측정하였다. 용매, 완충액 및 효소만 사용한 음성 대조구, 농도별 양성 대조구를 바탕으로, 3회 반복 시료의 평균치와 양성 대조구의 저해농도 (IC₅₀)를 수치화 하여 저해활성을 평가하였으며, 회귀 곡선 확보의 실험수치는 screening kit에 제시된 % 상대활성 계산식 및 Jeong 등이 제시한[31] 아래의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해율 (\%)} = \{1 - (C - D)/(A - B)\} \times 100$$

- A: 효소 처리, 저해시료 무처리군의 흡광도
- B: 효소 무처리, 저해시료 무처리군의 흡광도
- C: 효소 처리, 저해시료 처리군의 흡광도
- D: 효소 무처리, 저해시료 처리군의 흡광도

2.6. *In Vivo* Zebrafish 배아 색소침착 억제능 평가

다양한 기능성 활성소재는 그 활성과 아울러 안전성이 중요한 선발 요인이 된다[6]. 제브라피쉬 모델은 마우스 독성실험이나 기니피그 피부반응 실험 등 소동물을 이용한 동물실험의 부담을 경감시키는 동시에, 생물활성 및 안전성을 확인할 수 있는 장점이 있다[33]. *In vitro* 활성이 확인된 분획물에 대한 미백기능을 *in vivo* 환경에서 확인하기 위해, 유전적 변형이 없는 wild type 제브라피쉬 (*Danio rerio*)의 배아를 이용해서 색소 침착연구를 진행하였다. 전반적인 과정은 MacRae의 문헌[33]과 콜드스프링하버(CSH, Cold Spring Harbor, USA) 프로토콜을 기초로 구성하였다. 성체의 관리는 적정 생육 온도인 28 - 29 °C 항온 시설에서 진행하였다. 먹이는 테트라민(Tetramin Brine Shrimp, Tetra, Germany)를 부화시켜 하루 2 번씩 급이 하였으며 낮과 밤 14/6 h 주기로 빛을 조절하였다. 오후 5 h - 다음 날 오전 10 h까지 제브라피쉬의 암수 두 쌍씩 전용 mating cage에 함께 넣어 지내게 하고, 빛을 주어 산란 유도하여 배아를 확보하였다. 배아는 콜드스프링하버 E3 zebrafish embryo media (60X 농축액; NaCl 34.8 g, KCl 1.6 g, CaCl₂ · 2H₂O 5.8 g, MgCl₂ · 6H₂O 9.78 g, 증류수 1 L)를 제조하고, 이를 희석하여 배양액으로 사용하였고, 페트리디쉬와 28.5°C incubator (JeioTech, Korea) 및 항온실 환경에서 배양 및 실험을 진행하였다. 수정 후, 7 h(hpf, hours post fertilization) 된 배아를 96-well microplate (Costar, Coming Inc., USA)의 각 well당 2개씩 분주하였다. 용매 음성 대조구 용매 DMSO (Sigma, USA), 일반 양성 대조구 PTU (phenylthiourea, Sigma, USA), 미백 소재로서 양성 대조구 arbutin과 kojic

acid를 사용하였으며, 농도별 시료를 200 μL/well 처리하여 16배수로 실험하였다.

배아 성장에 따른 색소의 발현은 Olympus SZ2-ILST (eXscope T1000 camera) Stereoscopic Microscope와 Optika XDS-2 (Optika 4083.13 HDMI Prof Camera) Inverted Microscope를 이용하여 24 - 54 hpf 동안 관찰하여 사진 이미지를 확보하였고, 이를 NIH 제공의 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)를 활용하여, 전체 면적 대비 멜라닌 색소부분을 흑백 영상 전환 후 pixel 화소수 단위로 영상 분석하여, 색소 침착 저해도를 계산하였다.

2.7. *In Vitro* Collagenase와 Elastase 활성 저해능 평가

Collagenase에 대한 저해활성의 측정은 Wittenauer[34] 및 Thring[25]의 방법을 적용하여 실험 및 계산을 진행하였다. *Clostridium histolyticum* collagenase (EC 3.4.24.3, Sigma, USA) 효소와 합성펩타이드 FALGPA (N-{3-[2-furyl]acryloyl}-Leu-Gly-Pro-Ala) 기질을 사용하였다. 완충용액 50 mM Tris buffer (pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 400 mM NaCl) 85 μL 와 시료 40 μL, 0.3 mg/mL collagenase 20 μL를 혼합하여 10 min간 반응시키고 0.2 mg/mL FALGPA를 55 μL 첨가하여 microplate reader에서 340 nm 흡광도를 10 min 간 측정하였다. 용매 음성 대조구와 1, 10-Phenanthroline을 양성 대조구로 아래의 식과 같이 저해활성을 계산하였고, 처리 농도별 저해율을 바탕으로 회귀식을 통해 수치 IC₅₀을 도출하였다.

$$\text{Collagenase 저해율 (\%)} = \{1 - (\text{저해제 처리군의 흡광도})/(\text{저해제 무처리군의 흡광도})\} \times 100$$

과산화물 등의 요인에 의한 피부 기저층에 영향을 주어 주름발생을 촉발하는 elastase에 대한 저해 활성은 Kim 등 [35]의 방법을 적용하여 진행하였다. 활성의 측정은 porcine pancreas elastase (EC 3.4.21.36, Sigma, USA) 효소와 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma, USA) 기질을 사용하였다. 100 mM Tris buffer (pH 8) 125 μL에 저해활성을 확인할 시료 10 μL와 효소 5 μL 를 첨가하여 10 min간 저해 반응을 유도하고, 2 mg/mL의 기질 10 μL를 혼합하여 활성 측정을 위해 microplate reader에서 410 nm 흡광도를 15 min 간 측정하여, 저해율 도출은 collagenase와 같은 방법으로 산출하였다.

2.8. 효소 저해활성 (IC₅₀) 계산 및 통계처리

활성도(response, %)와 처리 농도(dose, $\mu\text{g/mL}$) 간의 상관 함수를 회귀식으로 도출하여 최고 활성의 50%에 해당하는 처리농도(SC₅₀, IC₅₀)를 계산하였다. 효소 저해반응 kinetics에 적용한 모델은 Sigmoidal-Hill-4PL (four parameter logistics)이었으며[11-13], half-max graphic tool의 curve calculator를 사용하였다(AAT Bioquest[®], USA). 이는 엑셀 및 효소저해 키네틱스를 활용한 회귀식에 비해, 복수 실험에 대한 편차를 하나의 회귀곡선 상에 표시하는 또 하나의 간편한 방법을 제공하며, 4PL에 의거한 회귀식은 아래와 같이 구성된다.

$$Y = (A - D) / [1.0 + (X/C)^B] + D$$

(X=dose, Y=response; A=min. 값(blank), B=slope, C=inflection point, D=max. 값)

유의성 확보를 위해 진행한 n 반복실험 수치를 [X, Y₁, Y₂, ... Y_n]의 형태로 입력하여 편차를 포함하는 회귀곡선과 SC₅₀ 및 IC₅₀를 구할 수 있었다.

회귀곡선의 실험수치와의 부합성(fitness)은 Bioquest tool 및 SigmaPlot12 (Systat Software, UK)을 활용하여, r (multiple correlation coefficient) 및 r² (coefficient of determination)값으로 분석하였으며, 회귀 모델은 앞서와 같이 Sigmoidal-Hill-4PL regression 조건으로 설정하였다. 시료 *A. nitidus* 추출물 및 분획물의 농도별 tyrosinase 및 collagenase 저해 활성계에 대한 *in vitro* 저해실험의 r²값 분석은 Table 1과 같으며, 신뢰성이 있음을 확인하였다.

Table 1. The Coefficient of Determination (r²) Values in the Regression Model for the Enzyme Inhibitory Assays of the *A. nitidus* Extract and Fractions

Samples	r ² for the inhibition assay of	
	Tyrosinase	Collagenase
<i>A. nitidus</i> methanol extract	0.9968	0.9879
<i>A. nitidus</i> fraction-1	0.9981	0.9976
<i>A. nitidus</i> fraction-2	0.9991	0.9713

3. 결과 및 고찰

3.1. *A. nitidus* 추출물의 분리정제 및 LC/MS 분석

A. nitidus 건조 식물체 20 g으로부터, 감압건조중량 기준의 methanol 추출물 2.28 g을 회수하여 11.4%의 수율로 건조추출물을 분리하였으며, ethyl acetate 분배 및 silica 컬럼을 이용한 분획물-1(F1)과 분획물-2(F2)의 분리 수율은 Figure 1과 같다. 확보된 추출물 F1과 F2는 각각 9.8 mg, 21.6 mg이었다.

분리된 F1과 F2의 조성에 대한 HPLC 분석 결과 Figure 2과 같이 용출 시간별 각각 DAD (diode array detection) 288 nm의 흡광도를 기준으로 피크를 분석할 수 있었다. 분획물 F1의 경우 t_r = 8.676에서의 면적기준 11.3% 함량에 해당하는 주 피크를 비롯하여 6개 이상의 피크 군으로 구성된 혼합물이었고, 분획물 F2의 경우 F1의 주 피크보다 극성이 높은 t_r = 5.697 부분에서 면적기준 65.3% 함량의 비교적 순도가 높은 주 피크를 보였다.

실리카 분획물 F1과 F2를 Biotage C₁₈ 컬럼을 통해 2차 정제한 compound-1 (C1)과 compound-2 (C2)를 대상으로, 화합물 수준의 성분 분석을 위해 LC/MS를 수행하였다. 검출 기준으로 흡광도에 의한 PDA 분석과 달리, 질량에 의한 분획물 유래 분리물질군의 분석은 훨씬 다양한 분자량 (m/z) 분포를 보여주고 있었으며(Figure 3A.) 이는 발색단이 없거나 약한 물질을 다량 포함함을 알 수 있었다. 상대적 함량과 검출량이 높은 주 피크에 대한 FTMS 및 ESI Full MS를 진행한 결과 C2로부터 분자량 244.0810을 갖는

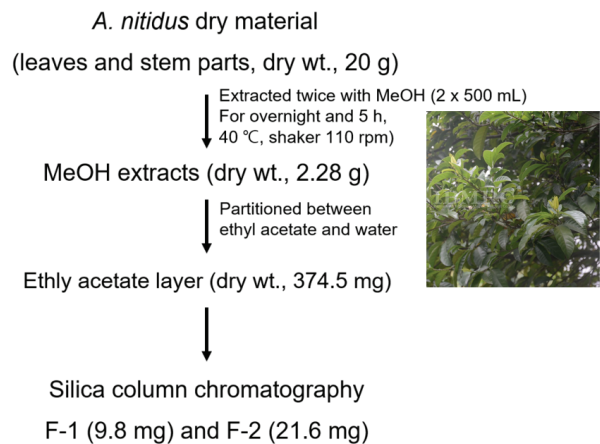


Figure 1. Preparation of the methanol extract and fraction-1 and fraction-2 from *A. nitidus*. The plant picture was taken from the International Biological Material Research Center(ibmrc.re.kr).

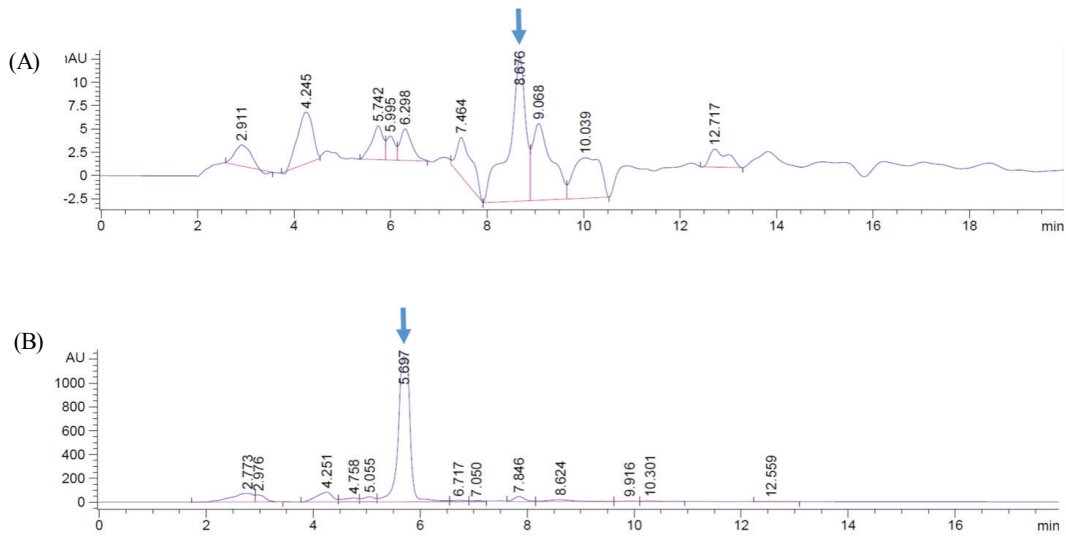


Figure 2. Analytical HPLC chromatogram of the *A. nitidus* fractions. (A) The fraction-1 showed over 7 peaks with a main peak at $t_R = 8.676$ min. (B) The fraction-2 showed a main peak at $t_R = 5.697$ min. with area percentage of 65.3%. (YMC Triart C18 column; 0.5 mL/min flow rate with isocratic acetonitrile 40% solution; DAD 288 nm; Injection volume 10 μ L).

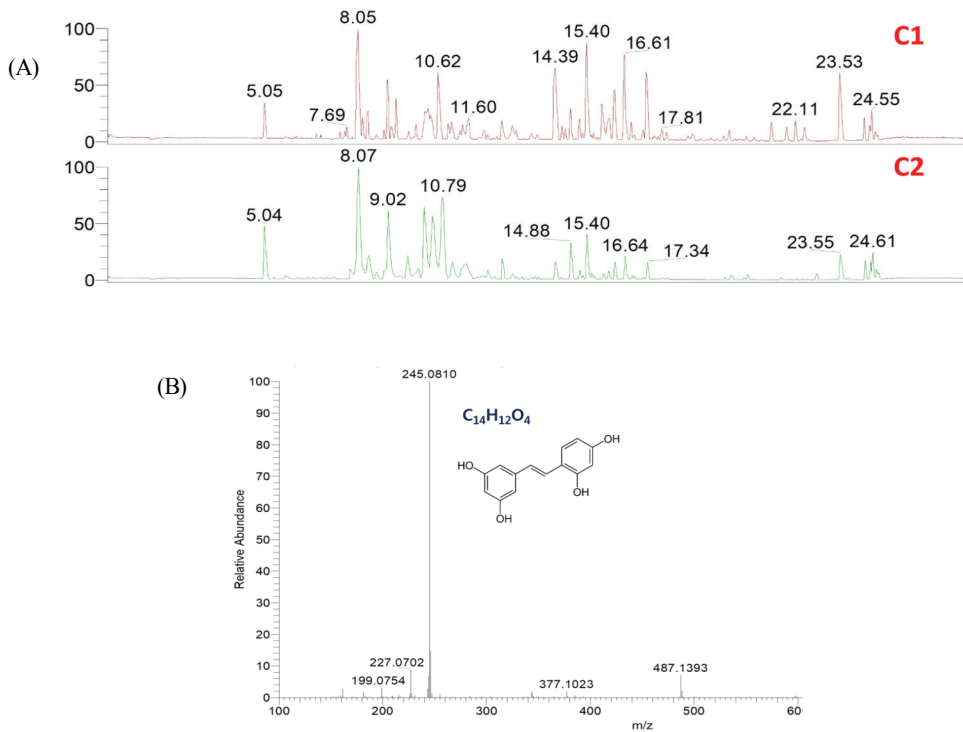


Figure 3. LC-MS profiles of the *A. nitidus* fractions. (A) The LC-MS profile of the compound-1 (C1) and compound-2 (C2). The two parts shows slightly different LC-MS pattern. The x-axis represent the retention time of the LC, and the y-axis denote detection frequency of the materials between 150.0000 and 1,800.000 in molecular weight. The numbers over the peaks were retention times, respectively. (B) The main peak of LC-MS profile at the retention time 8.07 min of the F2 was captured and analyzed to estimate its chemical entity, and it turned out C₁₄H₁₂O₄, a kind of stilbene having protonated molecular mass of 245.0810 (FTMS+p).

stilbene 계열의 물질($C_{14}H_{12}O_4$)이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다(Figure 3B). 이는 stilbene 계열의 화합물 oxyresveratrol (Sigma, USA)과 F2를 각각 1 mg/mL로 만들어 5 μ L를 HPLC로 분석한 internal standard 비교에서 동일 분석조건에서 t_R 10.599와 10.576 min 동일 위치에서 피크가 검출되었고, 두 시료를 50%씩 포함된 혼합물의 HPLC에서 10.582 min에서 한 가지의 피크만 검출함으로써 추정할 수 있었다.

3.2. *A. nitidus* 추출물의 총 폴리페놀 함량 분석

*A. nitidus*의 메탄올 추출물에 포함된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. LC/MS 분석을 바탕으로 분획물 F2의 주성분으로 밝혀진 stilbene 화합물 중 분자량이 일치하는 oxyresveratrol (Sigma, USA)을 양성 대조구로 함께 함량을 측정하였다. FC 시약을 사용하여 분석한 추출물의 총 폴리페놀 함량은 48.1 ± 2.6 mg GAE/g로 분석되었다. 이것은 기존 천연추출물과 비교할 수 있는 수치로 Table 2에 함께 표시한 레몬밤[31] 또는 갯버들[36]에 비해 낮으며, 양성

대조구 대비 13.7%에 해당하는 함량을 나타내었다.

3.3. DPPH 라디칼 소거활성

*A. nitidus*의 줄기 및 잎의 지상부 건조분쇄물의 methanol 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능을 통하여 분석하였다(Table 3). *A. nitidus* 용매 추출물의 라디칼 소거활성 (scavenging concentration, SC_{50})은 26.1 μ g/mL를 보여, 기존 보고된 활성물질인 하수오 추출물의 경우에서 60 μ g/mL 이하의 활성을 보이는 것과 유사한 추출물 수준에서의 라디칼 소거 활성을 보였다[37]. 이들의 활성은 Table 3에 함께 비교 표시하였다. 양성 대조군 ascorbic acid는 코스메슈티컬을 구성하는 유효성분의 임상적 실용성에 의문을 제시하는 비판적 시각에도 불구하고 가장 보편적으로 인정되는 대표적 항산화 성분으로[38] 동일한 실험조건에서 라디칼 소거 활성 8.9 μ M (1.6 μ g/mL)를 보였으며, 이는 Ren 등[32]이 보고한 플라보노이드 류에 대한 활성 및 Kim 등[35]이 확인한 catechin과 아울러 *A. nitidus* 대비 매우 강력한 항산화력을 보이고 있다. 앞서의 LC/MS에서 확인된 *A. nitidus* 분획물 F2에 포함된 stilbene 계열의 resveratrol의 경우, 심장질환, 암 등 다양한 활성에 덧붙여 산화성 염증질환에 매우 유용한 결과들이 보고되어 있고[39], 이중 trans-resveratrol 및 cis-resveratrol은 이성질체 모두 *A. nitidus* 분획물과 비슷한 활성범위를 보여주고 있다[40]. 따라서 F2의 경우 단일 화합물 기준의 항산화 기작에 기반을 둔 생물활성의 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 2. The Concentration of Total Polyphenols in *A. nitidus* Preparations

Sample	Polyphenol content, mg GAE/g	Reference
<i>A. nitidus</i> methanol extract	48.1 ± 2.6	
Oxyresveratrol	349.8 ± 46.8	
<i>M. officinalis</i> ethanol extract	302.7 ± 8.9	[31]
<i>S. gracilistyla</i> extract	151.9 ± 0.9	[36]

Table 3. The DPPH Radical Scavenging Activity of the *A. nitidus* Extract and Fractions

Sample	Radical scavenging activity		Reference
	(SC_{50} , μ g/mL)	(SC_{50} , μ M)	
<i>A. nitidus</i> methanol extract	16.7	ND ^a	
<i>A. nitidus</i> fraction-1	42.0	ND	
<i>A. nitidus</i> fraction-2	10.1	ND	
Ascorbic acid	1.5	8.9	
Catechin	4.4	15.2	[35]
<i>P. multiflora</i> extract	< 60.0	ND	[37]
cis-Resveratrol	22.1	97.0	[40]
trans-Resveratrol	16.9	74.0	[40]

^a Not determined.

Table 4. Tyrosinase Inhibitory Activity of the *A. nitidus* Extract and Fractions

Sample	Inhibitory activity		Reference
	(IC ₅₀ , μg/mL)	(IC ₅₀ , μM)	
<i>A. nitidus</i> methanol extract	64.90	ND ^a	
<i>A. nitidus</i> fraction-1	0.90	ND	
<i>A. nitidus</i> fraction-2	1.20	ND	
Arbutin	119.00	437.10	
Kojic acid	7.40	52.10	
Resveratrol	57.00	249.90	[19]
Phenylthiourea	0.20	1.50	[19]
Chalcone derivative-3	67.80	256.70	[21]
Chalcone derivative-12	0.04	0.17	[21]

^a Not determined.

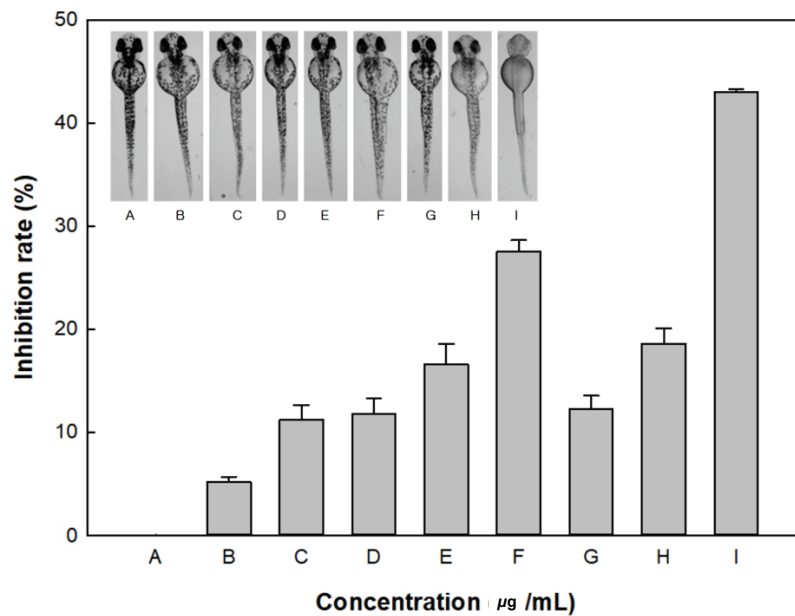


Figure 4. Melanogenesis inhibition assay of *A. nitidus* using *Danio rerio* embryo. The inhibition rate (%) represent the relative pixels to the control value. Reagents were added when the embryos reached 7 hpf according to the experimental procedure. The images were analyzed between 24 and 54 hpf during fixation with 2.5% methylcellulose. The survival rate was judged by the heartbeat and vertebrae under microscope. Reagents (survival rate) was A, Control (16/16); B, *A. nitidus* extract, 20 μg/mL (16/16); C, *A. nitidus* extract, 100 μg/mL (16/16); D, *A. nitidus* F2, 20 μg/mL (16/16); E, *A. nitidus* F2, 100 μg/mL (16/16); F, *A. nitidus* F2, 500 μg/mL (12/16); G, Arbutin, 27.23 mg/mL (16/16); H, Kojic acid, 1.42 mg/mL (16/16); I, PTU, 20 μg/mL (16/16). Pictures for 16 embryos per experiment were analyzed by Image-J and calculated to get mean values and deviations.

3.4. *A. nitidus* 추출물 및 분획물의 *In Vitro* Tyrosinase 억제 활성 및 *In Vivo* 활성

*A. nitidus*의 추출물, 분획물 F1 및 F2를 대상으로 tyrosinase 억제 활성 평가를 수행하였다. 추출물은 대조구인 arbutin과 kojic acid의 활성의 중간범위를 나타내었으며, 정제된 분획물 F1과 F2는 양성 대조구인 kojic acid보다 우수한 활성을 보였다. 이것은 구조 유사성이 높은 resveratrol 화합물에 비해서도 높은 활성으로, 함께 제시된 기존 문헌 자료 및 구조-활성 연구에 제시된 다양한 화합물의 비교연구와 같은 심층적 연구 및 활용의 좋은 물질 군을 제시하고 있다(Table 4).

*A. nitidus*의 추출물 및 분획물의 *in vitro* 평가에서 tyrosinase 저해활성을 바탕으로, 이에 대한 *in vivo* 활성을 제브라피쉬 배아를 대상으로 멜라닌 색소의 형성 저해율로 확인하였다. *A. nitidus* 추출물과 분획물 F2는 농도 의존적으로 색소 침착이 억제되었으며, 추출물 F2의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% (16 생존개체/16 총개체) 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지도 75%의 생존율(12 생존개체/16 총개체)을 보여주어 높은 농도까지 안전한 물질 군을 포함한 것으로 분석되었다(Figure 4).

3.5. *A. nitidus* 추출물 및 분획물의 Collagenase 및 Elastase 억제 활성

A. nitidus 추출물 및 분획물을 대상으로 collagenase 억제 활성 평가를 수행하였다. 추출물은 Pientaweeratch[41] 등이

발표한 추출물 암라(Amla) 및 사포타(Sapota) 등과 같은 범위의 활성을 보이며, 분획물은 4배 이상의 비교우위 활성을 보였으며, Table 5에 비교 표시한 기지의 화합물 linarin[42]과 유사한 활성을 보였다. 분획물 F1과 F2는 대조군 1, 10-Phenanthroline보다 고효성을 나타냈으며, 대조군 oxyresveratrol에 근접하는 활성을 확인할 수 있었다.

A. nitidus 추출물의 elastase 억제활성은 암라 추출물, 사포타와 대등하거나 우수한 저해 활성[41]을 보였으며, Satyanain[43]등이 보고한 침향 추출물(80 $\mu\text{g/mL}$, 82.7% 저해)과 같은 범위의 활성을 보이고 있다(Table 5). 그러나 추출물과 분획물 사이의 정제도에 따른 차이점은 없었다.

4. 결 론

본 연구에서는 아토카푸스 니티두스(*A. nitidus*)의 추출물에 대한 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 확인하고, 또한 정제된 분획물을 대상으로 그 주성분에 대한 추가적인 연구를 통하여 향후 물질 수준의 기능성 소재에 대한 가능성을 모색하고자 실험을 수행하였다. 아토카푸스 속의 식물자원은 다양한 전통 지식과 연구를 바탕으로 항산화 및 미백 성분 등 피부 개선에 관한 많은 연구가 보고되었다. 식용자원으로서, 항균, 항염, 항당뇨, 항산화 및 면역조절 기능을 가지는 *A. heterophyllus*[45] 및 미백소재 자원으로서 다양성[46]등이 보고되었다. 본 연구에서는 아직

Table 5. Anti-wrinkle Related Enzyme Inhibitory Activities of the *A. nitidus* Extract and Fractions

Sample	IC ₅₀ (μM) or ($\mu\text{g/mL}$) ^a for		Reference
	Collagenase inhibition	Elastase inhibition	
<i>A. nitidus</i> methanol extract	139.8 ^a	61.8 ^a	
<i>A. nitidus</i> fraction-1	20.6 ^a	ND ^b	
<i>A. nitidus</i> fraction-2	16.8 ^a	67.1 ^a	
1, 10-Phenanthroline	307.4 (55.4 ^a)	ND	
Oxyresveratrol	43.9 (10.7 ^a)	ND	
<i>P. emblica</i> extract (Amla)	95.9 ^a	387.8 ^a	[41]
<i>M. zapota</i> extract (Sapota)	89.6 ^a	35.7 ^a	[41]
Linarin	79.4 (47.0 ^a)	-	[42]
Methyl rosmarinat	14.7	2.7	[44]
Tetrahydroxyxanthoin	11.3	ND	[44]
Quercetin	ND	10.2	[44]

^a The IC₅₀ was calculated based on $\mu\text{g/mL}$.

^b Not determined.

까지 연구보고 사례가 적은 *A. nitidus*를 대상으로 추출물 및 분획물 수준에서 항산화, 미백 및 피부의 주름 방지에 관여하는 기초 효과를 규명하고자 하였고, 또한 기존 보고된 여타 자원 및 물질과의 정량적 비교를 위해 회귀식을 활용하여 저해율을 IC₅₀ 값으로 도출하고 이를 바탕으로 *in vitro* 수준의 경쟁성이 높은 활성군을 스크리닝하고자 하였다. IC₅₀ 수치는 다양한 실험 조건과 시료 조건하에 보고된 천연자원 혹은 물질의 활성을 가장 객관성 있게 비교할 수 있는 수치로 간주하여[1,10] 실험에 사용한 아토카푸스의 활성과 비교할 수 있는 객관적 문헌과 비교 분석하였다. *A. nitidus*의 methanol 추출물은 부분 정제된 분획물 F1보다 라디칼 소거활성이 더 높았으며, 분획물 F2는 문헌에 보고된 resveratrol, catechin과 경쟁성이 있는 활성을 보여주었다. 가장 넓은 활용성을 보여주는 미백활성의 경우, *A. nitidus* 추출물과 분획물은 임상적용성이 가장 높은 arbutin은 물론 대조구 kojic acid와 비교해서 *in vitro* 수준에서 현저히 좋은 활성을 보여 주었고, 분획 F2의 경우 *in vivo* 검정에서도 경쟁력 있는 활성 및 안전성을 보여주었다. 이는 식용자원 군의 안전성을 물질 수준에서 확인한 것으로 의미가 있다고 사료된다. 내외적 요인에 의해 발생하는 피부의 스트레스가 초래하는 MMPs (matrix metalloproteinases) 과발현이 주름 발생 및 피부 노화에 관여함은 주지의 사실이며, 이에 대한 구조-활성간의 연구[47] 및 플라보노이드 자원으로부터 NMR 구조에 기반을 둔 MMP 저해제의 발굴은 새로운 기작의 소재에 대한 관심을 반영하고 있어서 [48], 본 연구에서도 MMP 중 두 가지 효소 collagenase와 elastase에 대한 저해활성을 확인하였다. *A. nitidus* 추출물이 기존 보고되는 암라 혹은 사포타 추출물과 대비하여 collagenase 및 elastase의 저해소재로서의 경쟁성이 있음을 확인하였고, 특히 분획물 F1과 F2의 경우 collagenase 저해 활성 대조구인 1,10-phenanthroline보다 우수한 *in vitro* 성능을 보였다. 분획물의 HPLC 및 LC/MS 분석한 결과로 확인되는 stilbene 계열의 화합물은 resveratrol을 근간으로 다양한 수산기에 의한 물질의 다양성이 보고되고 있다[40]. 따라서 본 연구결과에서 확인된 *A. nitidus* 추출물 및 분획물의 항산화 활성, 미백 활성 및 MMP 저해제로서 주름 방지의 가능성을 보이는 것은 이러한 물질군의 영향으로 해석할 수 있으며, *A. nitidus*를 이러한 폴리페놀류의 공급원으로서 새로운 소재의 발굴에 활용을 모색하고자 한다.

Acknowledgement

이 연구는 과학기술정보통신부가 지원하는 연구재단의 해외생물소재확보 및 활용사업비로 진행되었으며(NRF-2016K1A1A8A01938969)/(PRM0211821, KRIBB). 시스템을 구축한 조한영, 이민지 연구원과 기초연구를 진행한 고소영, 권혁빈, 권혜원, 황다슬 및 최종 결과 도출에 기여한 김도은, 박경민, 조성환 학생에게 깊은 감사를 드립니다.

Reference

1. S. Wang, G. Dong, and C. Sheng, Structural simplification of natural products, *Chem. Rev.*, **119**(6), 4180 (2019).
2. A. L. Harvey, R. E. Ebel, and R. J. Quinn, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, *Nat Rev Drug Discov*, **14**(2), 111 (2015).
3. B. Shen, A new golden age of natural products drug discovery, *Cell*, **163**(6), 1297 (2015).
4. R. Breinbauer, I. R. Vetter, and H. Waldmann, From protein domains to drug candidates – Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**(16), 2879 (2002).
5. J. Gu, Y. Gui, L. Chen, G. Yuan, H. Z Lu, and X. Xu, Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology, *PLoS ONE*, **8**(4), e62839 (2013).
6. B. M. Schmidt, D. M. Ribnicky, P. E. Lipsky, and L. Raskin, Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics, *Nat. Chem. Biol.*, **3**(7), 360 (2007).
7. J. Gershenzon and N. Dudareva, The function of terpene natural products in the natural world, *Nat. Chem. Biol.*, **3**(7), 408 (2007).
8. M. Elkin and T. Newhouse, Computational chemistry strategies in natural product synthesis, *Chem Soc Rev*, **47**(21), 7830 (2018).
9. M. L. W. Juhasz, M. K. Levin, and E. S. Marmur, The use of natural ingredients in innovative Korean cosmeceuticals, *J Cosmet Dermatol*, **17**(3), 305 (2018).

10. A. I. C. Dorni, A. Amalraj, S. Gopi, K. Varma, and S. N. Anjana, Novel cosmeceuticals from plants - An industry guided review, *J Appl Res Med Aromat Plants*, **7**, 1 (2017).
11. W. Zhao, E. Baldwin, and R. Cameron, A digital data interpretation method for hemagglutination inhibition assay by using a plate reader, *Anal. Biochem.*, **571**, 37 (2019).
12. P. Sondag, L. Zeng, B. Yu, R. Rousseau, B. Boulanger, H. Yang, and S. Novick, Effect of a statistical outlier in potency bioassays, *Pharm Stat*, **17**(6), 701 (2018).
13. C. A. Holstein, M. Griffin, J. Hong, and P. D. Sampson, Statistical method for determining and comparing limits of detection of bioassays, *Anal. Chem.*, **87**(19), 9795 (2015).
14. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
15. J. A. Lewis II, J. C. DiNardo, and D. H. McDaniel, Oxidative stress, the damage accumulation theory of skin aging, and the role of antioxidants in the future of topical skin protection, *Cosmetic Dermatology*, **22**(11), 576 (2009).
16. D. Stojiljkovic, D. Pavlovic, and I. Arsic, Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy, *ACTA Facultatis Medicae Naissensis*, **31**(4), 207 (2014).
17. S. Dunaway, R. Odin, L. Zhou, L. Ji, Y. Zhang, and A. L. Kadekaro, Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation, *Front Pharmacol*, **9**, 392 (2018).
18. B. Olas, Berry phenolic antioxidants – Implications for human health?, *Front Pharmacol*, **9**, 78 (2018).
19. T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *J Enzyme Inhib Med Chem*, **32**(1), 403 (2017).
20. K. Sugimoto, T. Nishimura, K. Nomura, K. Sugimoto, and T. Kuriki, Inhibitory effects of α -arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(4), 510 (2004).
21. S. Zolghadri, A. Bahrami, M. T. H. Khan, J. M. Munoz, F. G. Molina, F. G. Canovas, and A. A. Saboury, A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, *J Enzyme Inhib Med Chem*, **34**(1), 279 (2019).
22. D. Söhretoglu, S. Sari, B. Barut, and A. Özel, Tyrosinase inhibition by some flavonoids: inhibitory activity, mechanism by *in vitro* and *in silico* studies, *Bioorg. Chem.*, **81**, 168 (2018).
23. M. I. A. Rodriguez, L. G. R. Barroso, and M. L. Sanchez, Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications, *J Cosmet Dermatol*, **17**(1), 20 (2018).
24. A. K. Ghimeray, U. S. Jung, H. Y. Lee, E. K. Ryu, and M. S. Chang, *In vitro* antioxidant, collagenase inhibition, and *in vivo* anti-wrinkle effects of combined formulation containing *Punica granatum*, *Ginkgo biloba*, *Ficus carica*, and *Morus alba* fruits extract, *Clin Cosmet Investig Dermatol*, **8**, 389 (2015).
25. T. S. Thring, P. Hili, and D. P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extract from 21 plants, *BMC Complement Altern Med*, **9**, 27 (2009).
26. W. Widowati, A. P. Rani, R. A. Hamzah, S. Arumwardana, E. Afifah, H. S. W. Kusuma, D. D. Rihibiha, H. Nufus, and A. Amalia, Antioxidant and antiaging assays of *Hibiscus sabdariffa* extract and its compounds, *Natural Product Sciences*, **23**(3), 192 (2017).
27. M. Bilal and H. M. N. Iqbal, An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals- A review, *Sci. Total Environ.*, **670**, 555 (2019).
28. H. Ti, L. Lin, W. Ding, and X. Wei, A new flavan-3-ol from *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*, *J Asian Nat Prod Res*, **14**(6), 555 (2012).
29. H. Ti, P. Wu, L. Lin, and X. Wei, Stilbenes and flavonoids from *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*, *Fitoterapia*, **82**(4), 662 (2011).
30. T. Zhao, G. R. Yan, S. L. Pan, H. Y. Wang, and A. J. Hou, New isoprenylated 2-arylbenzofurans and pancreatic lipase inhibitory constituents from *Artocarpus*

- nitidus*, *Chem. Biodivers.*, **6**(12), 2209 (2009).
31. Y. U. Jeong, H. Lee, H. Park, K. Kim, S. Kim, and Y. J. Park, Studies on antioxidant, anti-inflammation and tyrosinase inhibition inhibitory activities of *Melissa officinalis* extracts and their fractions, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(4), 465 (2018).
 32. G. Ren, P. Xue, X. Sun, and G. Zhao, Determination of the volatile and polyphenol constituents and the antimicrobial, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activities of the bioactive compounds from the by-product of *Rosa rugosa* Thunb. var. *plena* Regal tea, *BMC Complement Altern Med*, **18**(1), 307 (2018).
 33. C. A. MacRae and R. T. Peterson, Zebrafish as tools for drug discovery, *Nat Rev Drug Discov*, **14**(10), 721 (2015).
 34. J. Wittenauer, S. Mackle, D. Submann, U. S. Weisz, and R. Carl, Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity, *Fitoterapia*, **101**, 179 (2015).
 35. J. H. Kim, J. C. Byun, A. K. R. Bandi, C. G. Hyun, and N. H. Lee, Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolatus*, *J Med Plant Res*, **3**(11), 914 (2009).
 36. Y. U. Jeong and Y. J. Park, Studies on antioxidant and whitening activities of *Salix gracilistyla* extracts, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(3), 317 (2018).
 37. H. S. Shin, M. Kim, J. Song, J. Lee, Y. Ha, Y. H. Jeon, J. W. Kim, Y. J. Lee, and S. N. Park, Evaluation of antioxidant, cytoprotective and antimicrobial properties of *Polygoni multiflori Radix* extract, fractions and its major constituent, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(4), 407 (2018).
 38. Z. D. Draelos, Cosmeceuticals: What's real, what's not, *Dermatol Clin*, **37**(1), 107 (2017).
 39. C. Colica, M. Milanovic, N. Milic, V. Aiello, A. D. Lorenzo, and L. Abenavoli, A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol, *Nat Prod Commun*, **13**(9), 1195 (2018).
 40. S. He and X. Yan, From resveratrol to its derivatives: New sources of natural antioxidant, *Curr. Med. Chem.*, **20**(8), 1005 (2013).
 41. S. Pientaweeratch, V. Panapisal, and A. Tansirikongkol, Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activity of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: An *in vitro* comparative study for anti-aging applications, *Pharm Biol*, **54**(9), 1865 (2016).
 42. R. Widyowati, S. Sugimoto, Y. Yamano, Sukardiman, H. Otsuka, and K. Matsunami, New isolinariins C, D and E, flavonoid glycosides from *Linaria japonica*, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**(5), 517 (2016).
 43. K. Satyavani, S. Gurudeban, and T. Ramanathan, Inhibitory effect of *Excoecaria agallocha* L. extracts on elastase and collagenase and identification of metabolites using HPLC-UV-MS techniques, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **51**(11), 960 (2017).
 44. L. Wang, X. Li, S. Zhang, W. Lu, S. Liao, X. Liu, L. Shan, X. Shen, H. Jiang, W. Zhang, J. Huang, and H. Li, Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**(13), 4164 (2012).
 45. O. Prakash, R. Kumar, A. Mishra, and R. Gupta, *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit): An overview, *Pharmacogn Rev*, **3**(6), 353 (2009).
 46. E. T. Arung, K. Shimizu, and R. Kondo, *Artocarpus* plants as a potential source of skin whitening agents, *Nat Prod Commun*, **6**(9), 1397 (2011).
 47. R. P. Verma and C. Hansch, Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**(6), 2223 (2007).
 48. M. Mandrone, A. Coqueiro, F. Poli, F. Antognoni, and Y. H. Choi, Identification of a collagenase-inhibiting flavonoid from *Alchemilla vulgaris* using NMR-based metabolomics, *Planta Med.*, **84**(12-13), 941 (2018).