

등수국 잎 추출물 유래 미백 및 항산화 활성 성분

조성미* · 김정은** · 이남호***,†

*제주대학교 화학·코스메틱스학과, 석사과정 학생

**제주대학교 화학·코스메틱스학과, 연구원

***제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2022년 4월 21일 접수, 2022년 6월 4일 수정, 2022년 6월 17일 채택)

Whitening and Anti-oxidative Constituents from the Extracts of *Hydrangea petiolaris* Leaves

Seong Mi Jo, Jung Eun Kim, and Nam Ho Lee[†]

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University,

102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea

(Received April 21, 2022; Revised June 4, 2022; Accepted June 17, 2022)

요약: 본 연구에서는 등수국 잎 추출물의 미백 및 항산화 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 동정하였다. B16F10 melanoma 세포를 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-hexane (Hex) 분획물이 세포독성 없는 농도에서 멜라닌 생성 및 세포 내 tyrosinase 효소의 활성을 억제시키고 있음을 확인하였다. 또한 Hex 분획물이 tyrosinase 및 TRP-2 단백질의 발현을 감소시켰다. 반면, ethyl acetate (EtOAc) 분획물은 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성이 우수하였고, H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 나타내었다. Hex 및 EtOAc 분획물의 활성 성분을 규명하기 위해 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 8 개의 화합물을 분리하였다; ethyl linoleate (1), ethyl linolenate (2), 1-linoleoyl glycerol (3), 1-linolenoyl glycerol (4), *epi*-catechin (5), afzelin (6), quercitrin (7), hyperin (8). 분리된 화합물에 대한 항산화 활성 측정 결과, 화합물 5-8의 라디칼 소거 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 HPLC 분석을 통해 주성분인 quercitrin (7)의 함량을 측정한 결과, 추출물에서 31.3 mg/g, EtOAc 분획물에서 169.8 mg/g이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 잎은 미백 및 항산화 효과를 갖는 천연 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, the whitening and antioxidant effects of the extracts from *Hydrangea petiolaris* (*H. petiolaris*) leaves was confirmed, and the chemical structure was identified by separating the active ingredients. In the whitening tests using α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells, the *n*-hexane (Hex) fraction inhibited the cellular melanogenesis and intracellular tyrosinase activities without causing cell toxicity. In addition, the Hex fraction reduced expression of tyrosinase and TRP-2 protein. Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in the ethyl acetate (EtOAc) fraction. Also, for the cellular protective effects on HaCat keratinocytes damaged by H₂O₂, the EtOAc fraction indicated protective effects against oxidative stress. Eight phytochemicals were isolated from the extract of *H. petiolaris* leaves; ethyl linoleate (1), ethyl linolenate (2), 1-linoleoyl glycerol (3), 1-linolenoyl glycerol (4), *epi*-catechin (5), afzelin (6), quercitrin (7), hyperin (8). Among the isolates, the compounds 5-8 showed DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. The contents of quercitrin, a major isolated in this extract, determined by HPLC

† 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)
call: 064-754-3548

analysis were confirmed to be about 31.3 mg/g for the 70% ethanol extract and 169.8 mg/g for the EtOAc fraction. Based on these results, it was suggested that the extract from *H. petiolaris* leaves could be potentially applicable as whitening and anti-oxidative ingredients in cosmetic formulations.

Keywords: *Hydrangea petiolaris*, whitening, anti-oxidation, cell protective effect, isolation

1. 서 론

피부색은 표피에 존재하는 멜라닌(melanin), 진피의 혈관 속에 함유된 헤모글로빈(hemoglobin), 피하조직에 존재하는 β -카로틴(β -carotene) 등의 색소에 의해 영향을 받는다. 그 중에서도 멜라닌 색소의 양과 분포는 피부색을 좌우하는 결정적 인자이다[1]. 멜라닌은 자외선이나 외부 유해인자들로부터 피부를 보호하는 중요한 역할을 하지만, 과잉 생성되어 피부에 축적될 경우 기미와 주근깨, 피부 반점 등을 유발한다. 또한 멜라닌 전구물질은 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 등의 질병을 초래할 수 있다[2]. 멜라닌 합성에 관여하는 효소로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (DCT, TRP-2) 등이 있다. Tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로써, 티로신(tyrosine)을 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)를 거쳐 DOPA-quinone으로 산화시킨다. 이렇게 생성된 DOPA-quinone은 자발적 반응에 의하여 dopachrome으로 전환되며 이들은 TRP-2에 의해 축매되어 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환된다. DHICA는 TRP-1에 의해 축매되어 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화되어 최종적으로 멜라닌으로 합성된다[3]. 따라서 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2를 저해하는 물질은 멜라닌 합성을 저해하여 피부 미백 기능을 할 수 있다. 대표적인 멜라닌 생성 억제 물질로는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나 L-ascorbic acid와 그 유도체 및 arbutin, lactic acid, glucosamine, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부 자극성이나 안전성에 문제가 있어 사용량이 엄격히 제한되고 있다[4]. 이로 인해 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연유래 미백제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

세포대사에 사용되는 전체 산소의 90 ~ 95%는 미토콘드리아에서 ATP를 만들어내는 과정에서 소모되며, 이 중 1 ~ 2%는 활성산소로 전환된다[5]. 적정량의 활성산소는 외부에서 침입한 박테리아나 바이러스를 파괴하는 면역반응에 쓰이고, 필요 이상으로 생성된 활성산소는 체내 항산화 시스템에 의해 제거된다. 하지만 노화, 스트레스, 질병, 자

외선 등에 의해 활성산소의 생성과 제거 간의 속도적 균형이 깨지게 되면 과량의 활성산소가 생성되게 된다. 과량 생성된 활성산소는 생체분자들과 빠르게 반응하여 단백질 변성, 지질과산화, DNA 손상 등을 일으키며 노화, 암, 염증의 진행을 촉진시키게 된다[6]. 또한, 활성산소는 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유도시켜 탄력저하, 주름 생성에 관여하여 피부 노화를 촉진시킨다. 활성 산소는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이라고도 불리며 superoxide radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroperoxyl radical ($HO_2\cdot$) 및 singlet oxygen (1O_2) 등이 있다. 이러한 활성산소를 제거하기 위해 인체 내에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등 효소적 항산화 물질과 glutathione과 같은 비효소적 항산화 물질이 존재한다. 하지만 체내 항산화 시스템의 균형이 깨졌을 경우에는 외부에서의 항산화물질 공급이 중요하다. 항산화물질은 천연 항산화제와 합성 항산화제로 나뉘게 된다. 천연 항산화제로는 식물로부터 분리한 flavonoid, alpha-tocopherol, ascorbic acid 등이 있으며 합성 항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 있다. 합성 항산화 물질은 높은 열을 가했을 시 불안정하거나 다량으로 투여했을 때 기형 및 발암 발생의 원인으로 작용할 수 있다고 보고되어 있다 [7]. 이로 인해 보다 안전하면서 효과가 뛰어난 천연 항산화물질을 찾고자하는 많은 연구가 이루어지고 있다.

등수국(*Hydrangea petiolaris*)은 범위귀과(Saxifragaceae)에 속하는 식물로 나무나 바위에 붙어 자라는 덩굴성 식물이다. 등수국은 가지에서 발생한 기근을 이용하여 바위 겉면이나 곰솔의 줄기 등에 착생하여 20 m 가량 자라는 것으로 알려져 있다. 한국이 원산지이며 일본 등에도 분포해 있고, 국내에서는 주로 울릉도, 제주도 등 섬지역에 분포해 있다. 현재까지 보고된 등수국에 대한 생리활성 및 성분 연구로는 등수국 줄기(stems) 추출물의 항염, 미백 등의 효과와 catechin, ursolic acid 등의 성분이 보고되어 있으며 [8], 등수국 잎(leaves) 추출물의 항염, 항균 효과 및 phyto, crosolic acid, asiatic acid 등의 유효 성분 연구가 보고되어

있다[9]. 따라서 본 연구에서는 등수국 잎 추출물 및 극성 별 용매 분획물의 미백, 항산화 활성 및 세포보호 효과를 확인하고 유효 성분을 분리, 동정하여 천연 화장품 원료 등으로 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck (USA) 및 OCI (Korea) 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002 ~ 0.025 mm, Sigma, USA), gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1 ~ 0.025 mm, Fluka, USA)이 사용되었다. Medium pressur liquid chromatography (MPLC, Biotage, Sweden)에는 KP-C18-HS (Biotage, Sweden) 컬럼을 사용하였다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (USA)사의 NMR 전용 용매인 CDCl₃ 및 CD₃OD를 사용하였다.

2.2. 등수국 잎의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 등수국 잎(시료번호: 487)은 2018 년 1 월 제주생물자원(주) (Korea)에서 구입하였으며, 시료는 동결 건조 및 분쇄하여 사용하였다. 건조 및 분쇄된 등수국 잎 120.0 g을 70% 에탄올 24 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2 회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 38.5 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 30 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), H₂O 분획물을 얻었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

n-Hex 분획물 1.7 g은 VLC를 이용하여 극성 순으로 나누었으며, *n*-Hex-EtOAc (0 ~ 50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하였다. 그 후 100% EtOAc 및 100% MeOH를 각 300 mL씩 용출하여 총 13 개의 fraction을 얻었다(Fr. V1 - 12). VLC fraction 중 Fr. V4 (112.7 mg)는 화합물 1과 2가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. 또한 Fr.

V12 (72.3 mg)는 화합물 3과 4의 혼합물로 확인되었다.

EtOAc 분획물 5.0 g은 C₁₈ 컬럼 및 MPLC를 이용하여 극성에 따라 세분화하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 용매 (MeOH : DMSO = 1 : 1) 10 mL에 녹이고 0.45 μm PTFE syringe filter (Whatman, USA)를 이용하여 여과한 후, C₁₈ 컬럼에 주입하였다. 이동상은 증류수(용매 A)와 메탄올(용매 B)을 사용하였으며, 유속은 15 mL/min으로 하였다. 용출조건은 gradient mode로 100 min 동안 용매 B를 10 ~ 50%의 비율로 변화시킨 후, 10 min 동안 100% 용매 B를 용출시켜 총 48 개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1 - 48). MPLC fraction 중 Fr. MP19 (64.5 mg)은 단일 화합물인 화합물 5로 확인되었으며, Fr. MP27 (117.5 mg)은 화합물 8, Fr. MP36 (104.1 mg)은 화합물 7 및 Fr. MP41 (100.7 mg)은 화합물 6으로 확인되었다.

Ethyl linoleate (1) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 5.38 - 5.29 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 4.10 (2H, m, H-19), 2.79 (2H, m, H-11), 2.26 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2), 2.08 - 2.03 (4H, m, H-8, 14), 1.61 - 1.56 (2H, m, H-3), 1.23 - 1.21 (3H, m, H-20), 0.84 (3H, t, *J* = 8.7 Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 174.2 (C-1), 130.5 (C-13), 130.4 (C-9), 128.5 (C-12), 128.4 (C-10), 60.4 (C-19), 34.6 (C-2), 31.8 (C-16), 29.9 (C-7), 29.6 (C-6), 29.4 (C-15), 29.3 (C-5), 27.4 (C-4), 27.4 (C-8), 27.4 (C-14), 25.8 (C-11), 25.2 (C-3), 22.9 (C-17), 14.5 (C-20), 14.3 (C-18)

Ethyl linolenate (2) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 5.38 - 5.29 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 4.10 (2H, m, H-19), 2.79 (2H, m, H-11), 2.26 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2), 2.08 - 2.03 (4H, m, H-8, 14), 1.61 - 1.56 (2H, m, H-3), 1.23 - 1.21 (3H, m, H-20), 0.84 (3H, t, *J* = 8.7 Hz, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 174.2 (C-1), 132.2 - 127.4 (C-9, 10, 12, 13, 15, 16), 60.4 (C-19), 34.6 (C-2), 29.9 (C-7), 29.6 (C-6), 29.3 (C-5), 27.4 (C-4), 27.4 (C-8), 27.4 (C-14), 25.8 (C-11), 25.2 (C-3), 22.9 (C-17), 14.5 (C-20), 14.3 (C-18)

1-Linoleoyl glycerol (3) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 5.34 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 4.15 (1H, dd, *J* = 11.2, 4.6 Hz, H-1'), 4.06 (1H, dd, *J* = 11.2, 6.2 Hz, H-1'), 3.82 (1H, m, H-2'), 3.55 (2H, dd, *J* = 5.5, 1.8 Hz, H-3'), 2.35 (2H, m, H-11), 2.07 (4H, m, H-8, 14), 0.90 (3H, m, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 175.6 (C-1), 131.1 (C-9), 131.0 (C-13), 129.3 (C-10), 129.2 (C-12), 71.3 (C-2'), 66.6 (C-1'), 64.2 (C-3'), 35.1 (C-2), 33.2 (C-16), 30.9 (C-5), 30.8 (C-6),

30.8 (C-7), 30.3 (C-4), 30.3 (C-15), 28.3 (C-14), 26.6 (C-8), 26.1 (C-3), 23.9 (C-11), 23.8 (C-17), 14.6 (C-18)

1-Linolenoyl glycerol (**4**) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 5.34 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 4.15 (1H, dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, H-1'), 4.06 (1H, dd, $J = 11.5, 6.2$ Hz, H-1'), 3.82 (1H, m, H-2'), 3.55 (2H, dd, $J = 5.5, 1.8$ Hz, H-3'), 2.81 (2H, m, H-14), 2.35 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 2.07 (4H, m, H-8, 17), 0.97 (3H, m, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 175.6 (C-1), 132.8 (C-9), 131.2 (C-16), 129.3 (C-12), 129.3 (C-13), 129.0 (C-15), 128.4 (C-10), 71.3 (C-2'), 66.6 (C-1'), 64.2 (C-3'), 35.1 (C-2), 30.8 (C-6), 30.4 (C-7), 30.3 (C-4), 30.3 (C-5), 28.3 (C-8), 26.7 (C-14), 26.6 (C-11), 26.1 (C-3), 21.6 (C-17), 14.8 (C-18)

epi-Catechin (**5**) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 6.96 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 4.80 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.7, 4.6$ Hz, H-4), 2.72 (1H, dd, $J = 16.7, 2.8$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 158.0 (C-5), 157.7 (C-7), 157.4 (C-9), 145.9 (C-3'), 145.8 (C-4'), 132.3 (C-1'), 119.4 (C-6'), 115.9 (C-5'), 115.3 (C-2'), 100.0 (C-10), 96.4 (C-6), 95.9 (C-8), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4)

Afzelin (**6**) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.77 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-1''), 3.32 - 4.20 (4H, m, H-2'' - 5''), 0.92 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 179.8 (C-4), 166.0 (C-7), 163.4 (C-5), 161.7 (C-4'), 159.4 (C-9), 158.7 (C-2), 136.3 (C-3), 132.0 (C-2', 6'), 122.8 (C-1'), 116.7 (C-3', 5'), 106.1 (C-10), 103.7 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8), 73.3 (C-4''), 72.3 (C-3''), 72.2 (C-5''), 72.1 (C-2''), 17.8 (C-6'')

Quercitrin (**7**) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.34 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 7.31 (1H, dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-1''), 4.22 (1H, dd, $J = 3.2, 1.8$ Hz, H-2''), 3.75 (1H, dd, $J = 9.4, 3.2$ Hz, H-3''), 3.35 (1H, m, H-5''), 3.41 (1H, m, H-4''), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 179.8 (C-4), 166.0 (C-7), 163.4 (C-5),

159.5 (C-9), 158.7 (C-2), 149.9 (C-4'), 146.6 (C-3'), 136.4 (C-3), 123.1 (C-6'), 123.0 (C-1'), 117.1 (C-5'), 116.5 (C-2'), 106.0 (C-10), 103.7 (C-1''), 99.9 (C-6), 94.8 (C-8), 73.4 (C-4''), 72.2 (C-2''), 72.1 (C-3''), 72.0 (C-5''), 17.8 (C-6'')

Hyperin (**8**) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.85 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.48 - 3.86 (6H, m, H-2'' - 6''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 179.7 (C-4), 166.2 (C-7), 163.2 (C-5), 158.9 (C-2), 158.6 (C-9), 150.1 (C-4'), 146.0 (C-3'), 135.9 (C-3), 123.1 (C-1'), 123.0 (C-6''), 117.9 (C-5''), 116.3 (C-2'), 105.8 (C-10), 105.5 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 77.3 (C-5''), 75.2 (C-3''), 73.3 (C-2''), 70.2 (C-4''), 62.1 (C-6'')

2.4. 미백 활성

2.4.1. 세포배양

Murine B16F10 melanoma cell line은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.4.2. 멜라닌 생성 억제 활성

6 well plate에 1×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1 N NaOH를 가하여 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 반응시켜 세포 내 멜라닌을 녹여내어 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생성량(%)을 계산하였다.

2.4.3. 세포 내 Tyrosinase 억제 활성

60 mm dish에 9×10^4 cells/dish로 세포를 분주하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72 h 배양하였다. 이후 배지를 제거

하고 PBS로 세척한 후, RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용해 4 °C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4 °C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 96 well plate에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8 mM L-DOPA 160 μ L와 단백질 상등액 20 μ L를 혼합하여 37 °C 조건에서 1 h 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 단백질 정량을 통해 흡광도 값을 보정하여 저해율(%)을 계산하였다.

2.4.4. Western Blot Analysis

60 mm dish에 9×10^4 cells/dish로 세포를 분주하고, 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용해 4 °C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4 °C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약(BIO-RAD, USA)을 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8 ~ 12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90 min blocking 시킨 후, 1 차 항체와 반응시켰다. 1 차 항체 반응은 tyrosinase antibody (1 : 1,000, SantaCruze, USA), TRP-1 antibody (1 : 1,000, SantaCruze, USA), TRP-2 antibody (1 : 500, AssayBiotech, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1 : 20,000, Sigma, USA)를 이용하여 4 °C에서 overnight 반응시켰다. 1 차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5 회 세척 후, peroxidase-conjugated 2 차 항체(1 : 2,000, 1 : 5,000 또는 1 : 20,000, SantaCruze, USA)와 상온에서 1 h 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 5 회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

2.4.5. 세포독성 평가(MTT Assay)

6 well plate에 1×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, α -MSH와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 72 h 배양하였다. 이후 500 μ g/mL의 농도로 MIT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide)를 첨가하여 37 °C에서 3 ~ 4 h 동안 반응시킨 후, MIT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.5. 항산화 활성

2.5.1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Deinis 방법[10]을 응용하였고 각 시료 용액 100 μ L에 증류수 900 μ L와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 가하여 상온에서 3 min 간 반응시켰다. 여기에 7% (w/v) Na₂CO₃ 용액 200 μ L와 증류수 700 μ L를 가하여 실온에서 1 h 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 gallic acid를 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법[11]을 응용하였고 각 시료 용액 15 μ L에 ethylene glycol 150 μ L와 0.1 N NaOH 15 μ L를 가하여 상온에서 1 h 반응 시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2.5.2. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법[12]을 응용하였고 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 10 min 간 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율이 50%일 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT) 및 ascorbic acid를 사용하였다.

2.5.3. ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법[13]을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 ABTS⁺ 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 15 min 간 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity)

백분율이 50%일 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 BHT 및 ascorbic acid를 사용하였다.

2.6. 세포보호 효과 측정

2.6.1. 세포배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KLCB, Korea)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% FBS이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.6.2. 세포독성 평가(MTT assay)

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하여 24 h 배양 후, 500 µg/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3 ~ 4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.6.3. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. 세포독성 평가로 결정된 농도의 과산화수소를 처리하여 30 min 배양 후, 과산화수소를 제거하고 dubecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 2 회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 희석하여 처리하고 24 h 배양

한 후, MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 확인하였다.

2.7. Quercitrin의 함량 분석

등수국 앞에서 분리된 화합물 중 주성분인 quercitrin (7)의 함량을 확인하기 위해 HPLC (Alliance, Waters Co., USA), Kromasil 100-5-C18 (4.6 × 250 mm, AkzoNobel, Netherlands) 컬럼을 사용하여 정량 분석하였다. 이동상은 증류수(용매 A)와 메탄올(용매 B)을 사용하였으며 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 µL로 하였고 검출기는 UV detector (279 nm)를 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 60 min 동안 용매 B를 15 ~ 55%의 비율로 변화시키면서 용출시켰다. 농도별로 제조한 quercitrin의 peak 면적을 구하여 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였으며, 검량선의 r² 값은 0.999 이상이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 미백 활성

3.1.1. 멜라닌 생성 억제 활성

등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 미백 효능을 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포독성을 확인하였다. 등수국 잎은 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며, 얻어진 추출물을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 얻었다. 우선 추출물 및 용매 분획물에 대하여 100 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였으며 그 결과, 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 멜라닌 생성이 감소하였으나 세포독성이 나타났다(Figure 1). 따라서 세

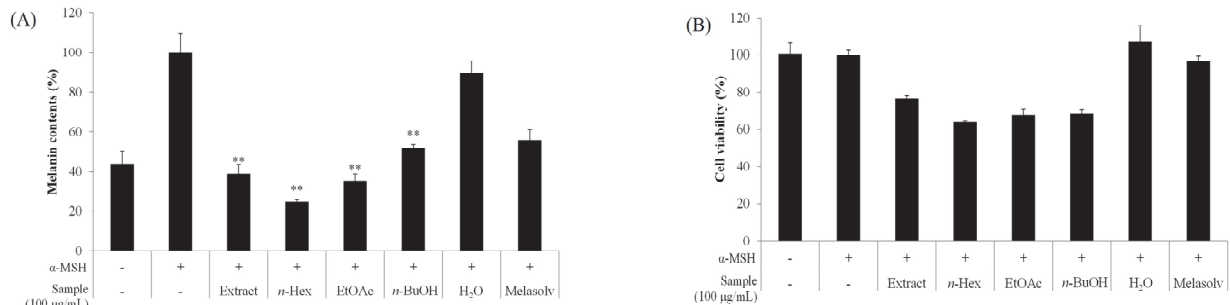


Figure 1. Effects of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus fractions from *H. petiolaris* leaves and melasolv (positive control, 20 µM) for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* p < 0.05, ** p < 0.01)

포도독성이 없으면서 효능이 나타나는 농도 범위에서 추가 실험을 진행하였으며 그 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 분획물이 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 2).

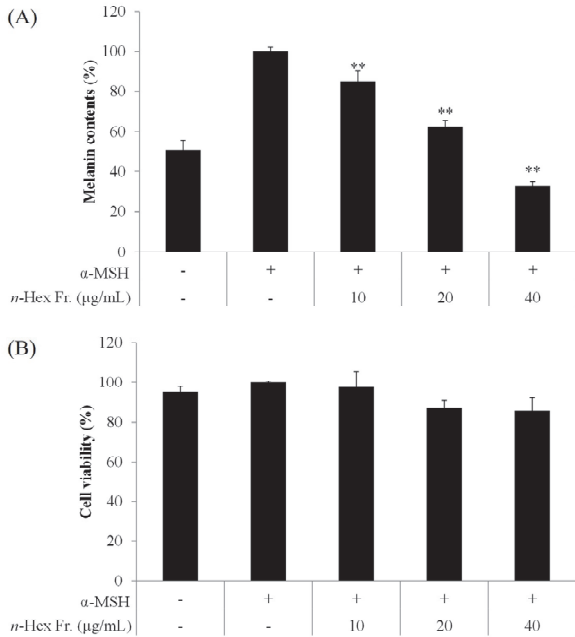


Figure 2. Effects of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* p < 0.05, ** p < 0.01)

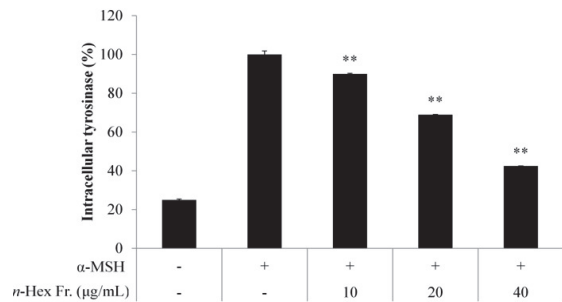


Figure 3. Intracellular tyrosinase activity of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* p < 0.05, ** p < 0.01)

3.1.2. 세포 내 Tyrosinase 억제 활성

세포독성 없이 멜라닌 생성을 효과적으로 억제시키는 *n*-Hex 분획물에 대하여 40 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포 내 tyrosinase 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 분획물은 멜라닌 생성 억제 활성과 유사한 경향으로 세포 내 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다(Figure 3).

3.1.3. Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현 억제 활성

등수국 잎 *n*-Hex 분획물의 추가적인 미백 활성 기전을 연구하기 위해 Western Blot 분석법을 이용하여 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 분획물이 tyrosinase 및 TRP-2 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소 시킴을 확인하였으며, TRP-1 단백질은 농도에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았다(Figure 4).

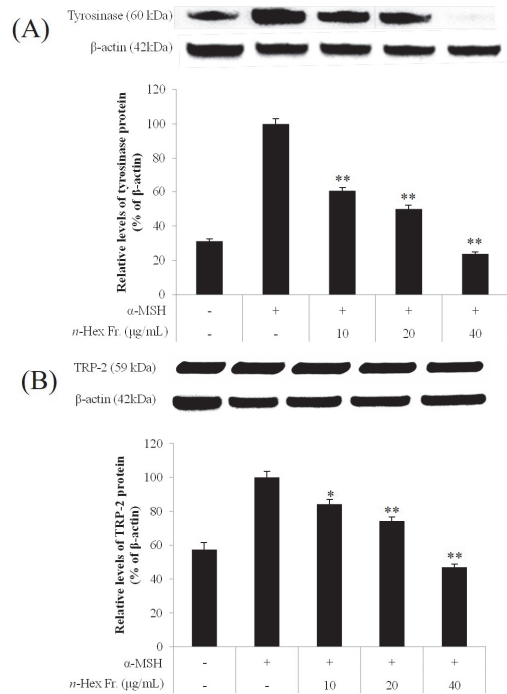


Figure 4. Effects of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves on levels of Tyrosinase and TRP-2 in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The Tyrosinase and TRP-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

3.2. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성

3.2.1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

등수국 잎의 항산화 활성을 확인하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 검정곡선을 이용하여 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE, gallic acid equivalent)으로 환산하였으며, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 검정곡선을 이용하여 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE, quercetin equivalent)으로 환산하였다. 등수국 잎 추출물 및 극성별 용매 분획물에 대한 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 측정 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀(194.8 mg/g GAE) 및 플라보노이드(88.4 mg/g QE)를 함유하고 있음을 확인하였다(Figure 5).

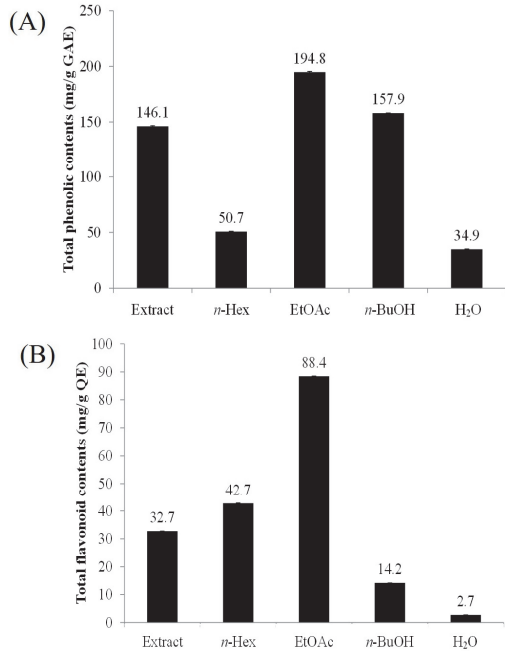


Figure 5. Total polyphenol contents and total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

3.2.2. DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

DPPH는 비교적 안정한 hydrazyl 라디칼 화합물로서, 항산화 기질과 반응하여 중성인 hydrazin으로 변환되며 DPPH 용액의 변색이 수반된다. 식물 추출물의 라디칼 소거 활성 측정법으로서 DPPH 용액의 흡광도 변화를 추적하는 방법이 매우 효과적으로 이용되고 있다. 또한 ABTS⁺를 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ 유리 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다. DPPH assay와 마찬가지로 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작이 공통적이며, DPPH 라디칼 제거능과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다[14]. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과, EtOAc 및 n-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 16.8, 18.0 µg/mL로 라디칼 소거 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험 결과, EtOAc 및 n-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 7.1, 8.1 µg/mL로 대조군과 유사한 라디칼 소거 활성을 나타내었다(Table 1).

3.3. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 세포보호 효과

3.3.1. HaCaT 세포독성 평가

MIT assay를 이용하여 등수국 잎 추출물 및 극성별 용

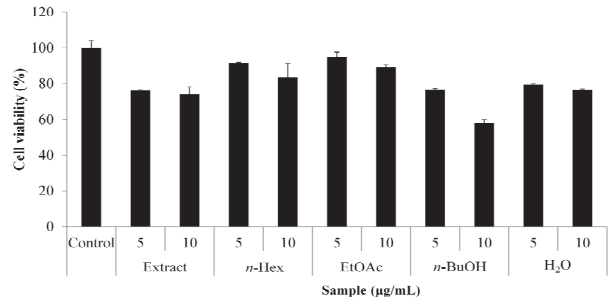


Figure 6. Cell viability of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MIT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 1. SC₅₀ Values of Extract and Solvent Fractions from *H. petiolaris* Leaves on DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities

SC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT	Ascorbic acid
DPPH radical	25.1	66.5	16.8	18.0	87.8	> 100	6.9
ABTS ⁺ radical	10.0	33.6	7.1	8.1	57.3	7.2	7.2

¹⁾SC₅₀; scavenging concentration for 50% of radical

때 분획물의 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 확인함으로써 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. EtOAc 분획물 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리했을 때 세포 생존율이 80% 이상을 나타내어 본 실험에 사용될 EtOAc 분획물의 농도는 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 설정하였다(Figure 6).

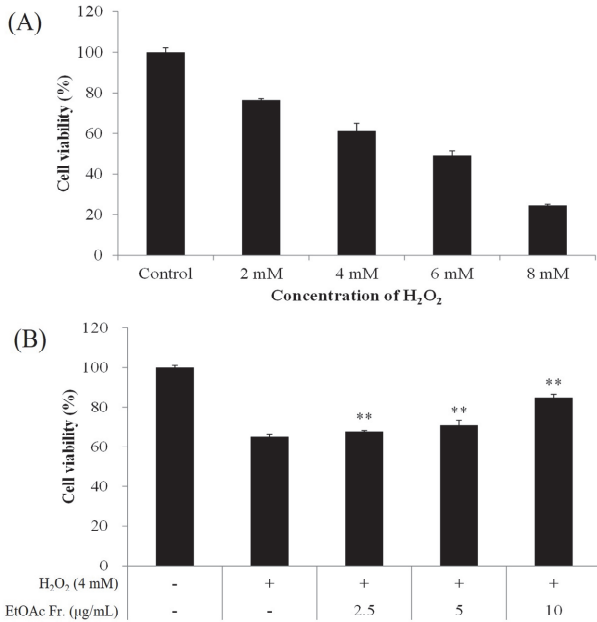


Figure 7. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H₂O₂. (B) Cell protective effects of EtOAc fraction from *H. petiolaris* leaves on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of EtOAc fraction from *H. petiolaris* leaves for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3.3.2. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과

산소의 대사과정에서 생성되거나 자외선 및 스트레스와 같은 환경적 요인에 의해서 과잉 생성된 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속이온과 반응하고 다른 활성산소를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다. 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 과산화수소를 HaCaT 세포에 농도별(2, 4, 6, 8 mM)로 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 4 mM의 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 대조군에 비하여 61.2%의 세포 생존율을 나타내었다. 이를 바탕으로 세포 손상이 유도된 HaCaT 세포에서 농도별 등수국 잎 EtOAc 분획물의 세포보호 효과를 확인하였다. EtOAc 분획물 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때의 세포 생존율은 각각 67.8%, 70.8%, 84.9%로 나타났으며, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 2.8%, 5.8%, 19.9%의 세포보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 7).

3.4. 등수국 잎 추출물로부터 분리된 화합물의 구조 동정

미백, 항산화 활성 및 세포보호 효과가 우수한 등수국 잎 *n*-Hex, EtOAc 분획물에 대해 VLC 및 MPLC를 수행하여 8 개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였다. 화합물 1과 2는 혼합물의 형태로 분리되었으며, NMR 스펙트럼 분석 및 문헌과 비교하여 ethyl linoleate, ethyl linolenate로 확인되었다[15]. 화합물 3과 4 또한 혼합물의 형태로 분리되었으며, 문헌을 통해 화합물 1과 2의 glycerol이 결합되어 있는 구조인 1-linoleoyl glycerol, 1-linolenoyl로 확인되었다[16]. 화합물 5는 플라보노이드인 *epi*-catechin[17]으로 동

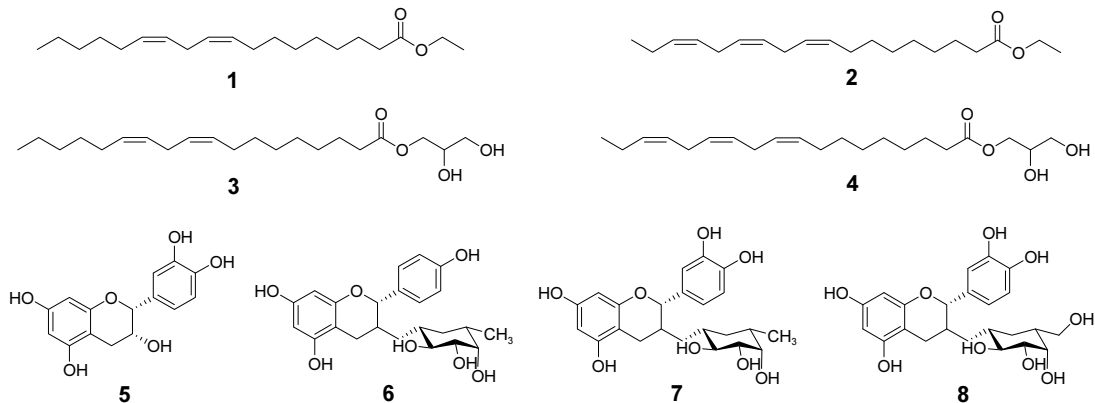


Figure 8. Isolated compounds 1 – 8 from *H. petiolaris* leaves.

정하였으며, 화합물 **6**, **7**, **8**은 문헌과 비교하여 플라보노이드 배당체인 afzelin[18], quercitrin[19], hyperin[20]으로 확인되었다(Figure 8).

3.5. 등수국 잎으로부터 분리된 화합물의 미백 및 항산화 활성

미백 효능이 우수한 등수국 잎 *n*-Hex 분획물에서 분리된 화합물 중 ethyl linoleate (**1**) 및 ethyl linolenate (**2**)는 멜라닌 저해 활성이 우수할 뿐만 아니라, 멜라닌 생합성과 관련한 다양한 작용 기전에도 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[15, 21]. 따라서 *n*-Hex 분획물의 미백 효과는 화합물 **1**, **2**에 의해 나타나는 것으로 판단된다. 또한 분리된 화합물 중 플라보노이드 계열인 화합물 **5** - **8**에 대한 라디칼 소거 활성 실험 결과, 4개의 화합물 모두 대조군과 유사한 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성이 나타남을 확인하였다.(Table 2).

3.6. 등수국 잎 추출물의 Quercitrin 함량 분석

등수국 잎에서 분리된 화합물 중 가장 많이 함유되어 있는 성분인 quercitrin (**7**)의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 등수국 잎 70% 에탄올 추출물 1 g 당 quercitrin이 31.3 mg/g (3.1%) 함유되어 있으며, EtOAc 분획물에는 169.8 mg/g (17.0%) 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Figure 9).

4. 결 론

현재까지 등수국(*H. petiolaris*) 잎은 항염 및 항균 활성 외에는 생리활성 연구가 보고된 바가 없으므로, 본 연구에서는 등수국 잎 추출물 및 극성별 용매 분획물의 미백, 항산화 및 세포보호 효과를 확인하고 유효성분의 분리 및 구조를 동정하여 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보려고 하였다. 등수국 잎 *n*-Hex 분획물은 B16F10

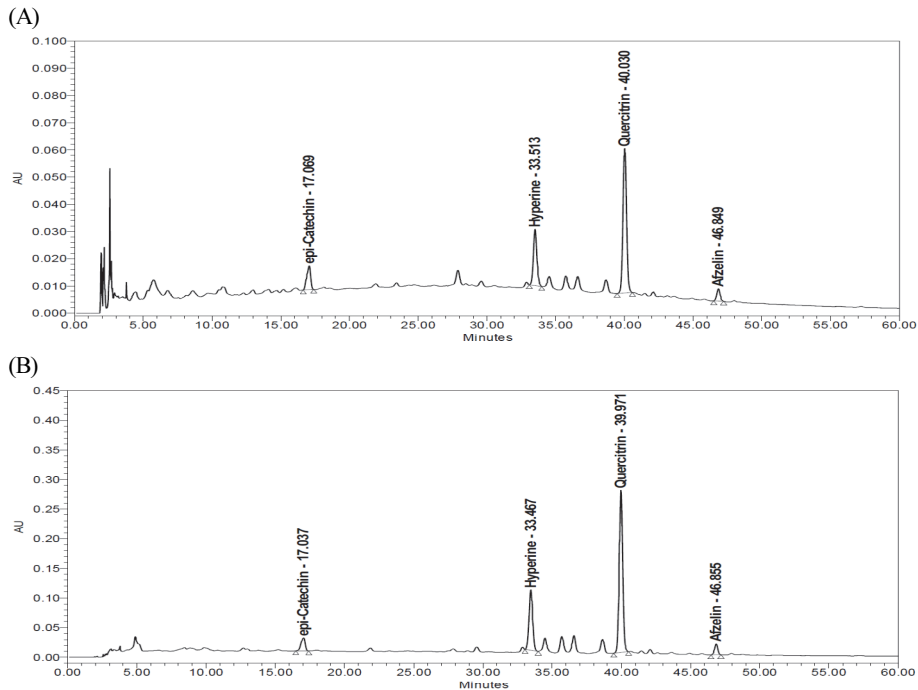


Figure 9. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract (A) and EtOAc (B) fraction from *H. petiolaris* leaves at 279 nm.

Table 2. SC₅₀ Values of Isolated Compounds **5** - **8** from *H. petiolaris* Leaves on DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities

SC ₅₀ ¹⁾ (μM)	5	6	7	8	BHT	Ascorbic acid
DPPH radical	45.9	54.9	51.6	35.0	62.1	31.2
ABTS ⁺ radical	28.5	38.8	83.5	15.1	43.1	48.7

melanoma 세포에서 멜라닌 생성 및 세포 내 tyrosinase 효소의 활성을 효과적으로 억제시킴을 확인하였으며, tyrosinase 및 TRP-2 단백질의 발현을 감소시켰다. 또한 등수국 잎 EtOAc 분획물은 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성이 우수하였고, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 활성 성분을 확인하기 위해 컬럼 크로마토그래피 및 NMR을 이용하여 화학구조를 동정하였으며, ethyl linoleate (1), ethyl linolenate (2), 1-linoleoyl glycerol (3), 1-linolenoyl glycerol (4), epi-catechin (5), afzelin (6), quercitrin (7), hyperin (8)으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 화합물 1, 2는 미백 활성이 보고되어 있으며, 플라보노이드 계열인 화합물 5 - 8은 라디칼 소거 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 등수국 잎의 주 성분인 quercitrin (7)의 함량을 HPLC를 이용하여 측정한 결과, 추출물에서의 함량이 31.3 mg/g, EtOAc 분획물에서 169.8 mg/g이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 잎은 미백 및 항산화 효과를 갖는 천연 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2021학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

1. S. H. Hwang, D. S. Yoo, and J. H. Shim, Whitening effects of banana leaf extract, *Kor. J. Soc. Cosmet. Sci.*, **42**(1), 37 (2016).
2. H. Seo, G. Y. Seo, S. Z. Ko, and Y. H. Park, Inhibitory effects of ethanol extracts from *Polygoni multiflori radix* and *Cynanhi wilfordii radix* on melanogenesis in melanoma cells, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(8), 1086 (2011).
3. T. H. Kim, J. M. Kim, J. M. Baek, T. W. Kim, D. J. Kim, J. H. Park, and M. Choe, Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.*, **19**(3), 177 (2011).
4. S. N. Park, Effects of natural products on skin cells, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **25**(2), 77 (1999).
5. R. R. Bartz and C. A. Piantadosi, Clinical review: oxygen as a signaling molecule, *Crit Care*, **14**(5), 234 (2010).
7. M. B. Kim, S. H. Hyun, J. S. Park, M. A. Kang, Y. H. Ko, and S. B. Lim, Integral antioxidative capacity of extracts by pressurized organic solvent from natural plants in Jeju, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(11), 1491 (2008).
8. J. H. Park, Master's Thesis Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2019).
9. S. M. Jo, J. E. Kim, and N. H. Lee, Anti-inflammatory and anti-bacterial active ingredients derived from the extract of the leaves of *Hydrangea petiolaris*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **46**(3), 207 (2020).
10. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**(11), 966 (1981).
11. F. B. Davis, E. Middleton, P. J. Davis, and S. D. Blas, Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca²⁺-ATPase activity, *Cell Calcium*, **4**(2), 71 (1983).
12. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
13. 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 Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
14. S. H. Park, J. E. Kim, and N. H. Lee, Isolation and evaluation of anti-oxidative constituents from the extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King leaves, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(4), 321 (2016).
15. S. Huh, Y. S. Kim, E. S. Jung, J. H. Lim, K. S. Jung, M. O. Kim, J. S. Lee, and D. H. Park, Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(7), 1242 (2010).
16. S. J. Lee, H. J. Jang, Y. S. Kim, H. M. Oh, S. Y. Lee, K. S. Jung, Y. H. Kim, W. S. Lee, S. W. Lee, and M. C. Rho, Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R.Br., *Process Biochemistry*, **51**, 2222 (2016).
17. J. T. Lee, Master's Thesis Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2018).
18. G. H. Xu, I. J. Ryoo, Y. H. Kim, S. J. Choo, and I. D.

- Yoo, Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*, *Arch. Pharm. Res.*, **32**(2), 275 (2009).
19. G. Shen, S. R. Oh, B. S. Min, J. Lee, K. S. Ahn, Y.H. Kim, and H. K. Lee, Phytochemical investigation of *Tiarella polyphylla*, *Arch. Pharm.*, **31**(1), 10 (2008).
20. M. H. Yang and L. Y. Kong, Flavonols and flavonol glycosides from *Rhododendron irroratum*, *Chemistry of Natural Compounds*, **44**, 98 (2008).
21. G. A. Ko and S. Kim Cho, Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **22**(1), 53 (2018).