

추출조건에 따른 陳皮 및 升麻 추출물의 미백 활성효과

원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소
이윤정, 송현우, 이보리, 나혜림, 송봉준, 이영미

ABSTRACT

Inhibitory Effect of *Citrus Unshiu* Peel and *Cimicifuga Dahurica* Extracts on Melanogenesis according to the Various Extraction Methods

Yun-Jung Lee, Hyun-Woo Song, Bo-Ri Lee,
Hye-Rim Na, Bong-Joon Song, Young-Mi Lee
Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University
and Wonkwang Oriental Medicines Research Institute

Objectives: Excessive melanin production leads to skin pigmentation, which causes various cosmetic and health problems. *Citrus unshiu Markovich* peel (CS) and *Cimicifuga dahurica* (CD) have long been widely used as a oriental medicinal plant because of their pharmacological properties including anti-ulcer, anti-oxidant, and anti-inflammatory properties.

Methods: In this study, we investigated the inhibitory effects of CS, CD extracts or CS:CD=1:2 mixture on melanogenesis according to the various extraction methods. CS and CD extracted were prepared by ethanol extraction (EE), ultrasonification extraction (USE), Supercritical extraction (SCE), reflux extraction (RE), respectively.

Results: DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of CD extracts or CS:CD=1:2 mixture were increased in dose-dependent manners. In addition, we evaluated the effect of CS, CD extracts or CS:CD=1:2 mixture on tyrosinase activity and melanogenesis in α -melanocyte stimulating hormone-induced B16-F10 melanoma cells. CS, CD extracts or CS:CD=1:2 mixture significantly inhibited tyrosinase activity and melanogenesis at 10-200 μ g/mL.

Conclusions: Therefore, our study suggests that CS and CD extracts have potential as a safe treatment for excessive pigmentation or as a natural ingredient in cosmetics.

Key Words: *Citrus Unshiu* Peel, *Cimicifuga Dahurica*, Skin-whitening, Melanogenesis

I. 서 론

멜라닌은 햇빛에 포함된 UV의 빛 에너지를 흡수하여 UV에 의한 손상으로부터 진피 이하의 피부 기관을 보호하는 역할을 하며, 피부 생체 내에 생겨난 유해산소 및 유리기(free radical) 등을 잡아주는 등 외부 유해인자로부터 피부를 보호해주는 유용한 역할을 한다¹⁾. 그러나 멜라닌이 비정상적으로 소량 생산되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고, 반대로 일광, 호르몬 변화, 염증 또는 약제 등 여러 가지 환경적 요인에 의해 멜라닌이 과도하게 합성되거나 색소가 침착되면 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변으로부터 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다²⁾. 그러므로 이러한 색소 침착 현상을 방지하고 미백효과를 얻기 위해서 멜라닌 생성 과정 특히 tyrosinase 활성을 저해를 통한 멜라닌 생성억제 연구가 활발히 진행되고 있다.

멜라닌(melanin)은 적갈색 또는 흑갈색의 고분자화합물로서 주로 흑색이나 갈색을 나타내는 eumelanin과 노란색이나 적색을 나타내는 pheomelanin이 있으며, 멜라닌세포(melanocyte) 내 melanosome에서 합성된다³⁾. 멜라닌 합성의 출발 물질은 아미노산의 일종인 Tyrosine이며, tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로, 이것이 다시 DOPA quinone으로 산화되고, DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole 5,6-quinone이 되어 최종적으로 멜라닌이 합성된다^{4,5)}. 합성된 멜라닌색소는 멜라닌세포의 수지상돌기(dendrite)를 통하여 인접세포인 각질세포(keratinocyte)로 전달되며, 전달된

멜라닌색소는 각질세포를 통하여 피부 내 여러 부위에 분포하게 되어 멜라닌은 현대 여성의 피부 미백 연구에 중심이 되고 있다.

현재 화학적 미백 성분으로서, Kojic acid, Arbutin 등과 같은 tyrosinase 활성억제제, 또는 Hydroquinone, ascorbic acid 등이 사용되어 왔는데, 이러한 물질들은 안정성이 열악하여 분해 혹은 착색되거나, 이취, 불안정성, 생체 레벨에서의 효능의 여부 및 자극성 피부염과 같은 안전성 문제 등으로 그 사용에 한계가 있다⁶⁾. 이러한 성분 외에도 녹나무, 백삼, 홍화, 뽕잎, 등 다수의 천연물이 연구되었는데, 이들 역시 안전성, 변색 가능성 등의 한계점이 있어 tyrosinase 형성 자체를 억제할 수 있는 미백 기능성을 가지면서도 부작용이나 독성 등의 문제가 없는 천연소재의 미백제가 절실히 요구되고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

진피(陳皮, *Citrus unshiu Markovich peel*)는 진굴피, 즉 진굴(陳橘, *Citrus sunki*)이라 불리는 제주 재래 감귤의 껍질을 말려 묵힌 것을 말한다. 예로부터 자생 또는 재배하였고, 최근에는 제주 애월읍 일대에서 주로 재배하고 있다^{11,12)}. 폐경 후 여성 질환 및 유방암에 효과가 있다는 보고가 있다^{13,14)}.

승마(升麻, *Cimicifuga heracleifolia*)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하며 대한민국약전에서는 승마(*Cimicifuga heracleifolia Komarov*), 쫄대승마(*Cimicifuga heracleifolia Wormskjold*), 눈빛승마(*Cimicifuga dahurica Maximowicz*) 또는 황새승마(*Cimicifuga foetida Linne*)의 뿌리줄기를 말한다. 한의학적으로 승마의 맛은 맵고 약간 달며, 약효로는 입안이 허는 병

증, 급성 전염병, 목안이 붓고 아픈 증상, 두통이나 치통, 만성 설사, 만성 이질, 탈항에 효과가 있다. 유럽과 미국에서는 천연 에스트로겐 성분으로 월경과 폐경에 관련된 증상의 완화에 사용되고 있으며 일반적으로 신장 질환, 류머티즘 및 말라리아 치료제로 알려져 있다¹⁵⁻⁷⁾.

현재 승마 및 진피에 대하여 각각 여성 질환에 대한 연구는 있으나 복합적인 소재를 활용하여 피부 미백 효능은 보고된 바 없으며, 따라서 본 연구에서는 진피 및 승마를 다양한 방법으로 추출하고 배합하여 미백 효능을 검증함으로써 미용뿐만 아니라 여성의 노화 예방 및 치료를 위한 기초 한의학적 자료를 제공하는 데 그 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 진피(*Citri Unshius Pericarpium*) 및 눈빛승마(*Cimicifuga dahurica*)는 Omniherb(Dae-gu, Korea)에서 구입하여 원광대학교 원광한약연구소에서 정선하여 사용하였다. 먼지 및 잡질을 제거하고 동결건조(PVTFD20R, Ilshin lab., Suwon, Korea)하여 분쇄기(IKA A11 basic, IKA-Werke GmbH, Staufen, Germany)로 분말화하여 -70°C deep freezer에 보관하면서 실험에서 적절한 용매에 녹여 사용하였다.

2. 추출물의 제조

진피 및 승마의 추출방법은 각각 용매 추출(ethanol extraction, EE), 초음파추출(ultrasonification extraction, USE), 초

임계추출(supercritical extraction, SCE), 환류냉각추출(reflux extraction, RE)로 추출물을 제조하였다. 용매추출(EE)은 시료 50 g에 50% EtOH 1000 mL를 사용하여 50°C에서 24시간 동안 추출하고 이를 2회 반복하였다. 추출물은 1차 여과(추출포)하고 진공펌프(EYELA, N-1110, Tokyo, Japan)를 이용하여 2차 여과하여 농축하고 동결 건조하였다(OPERON, FDU-8606, Gimpo, Korea). 초음파추출(USE)은 초음파 발생수조(POWER SONIC410, 40 kHz)를 사용하여 추출을 진행하였다. 시료 25 g에 20배의 70% 에탄올 250 mL를 가하고 50°C에서 2회 반복하여 추출하였다. 초임계추출(SCE)은 전남 장성의 나노바이오연구센터에 의뢰하여 진행하였다. 진피, 승마 등 시료는 분쇄하여 준비하고 시료 200 g을 초임계 추출기에 넣고 압력 400 bar, 50°C 추출온도에서 120분 동안 CO₂ 추출을 진행한 후 에탄올 보조용매를 3 mL/min 속도로 60분 동안 분사하여 추출하여 1차(CO₂), 2차(EtOH) 추출물을 각각 얻었다. 환류냉각추출(RE)은 시료 50 g에 70% 에탄올을 1000 mL 넣고 80°C 온도에서 2시간 동안 환류냉각 추출하였다. 추출물은 1차 여과(추출포)하고 진공펌프를 이용하여 2차 여과하여 농축하고 동결 건조하였다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

각각의 추출물 0.4 mL에 0.4 mM DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 에탄올 용액 0.8 ml를 진탕 혼합하고, 10분간 방치 후 microplate reader(Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Mushroom tyrosinase 활성 측정

멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 억제 활성을 분석하기 위해 Mushroom tyrosinase 및 L-DOPA 기질이 사용되었다. 먼저 0.1 M의 150 μ L 인산염 완충액(pH 6.8), 20 μ L의 5 mM L-DOPA 용액, 그리고 20 μ L의 각각 추출물을 순차적으로 첨가하고 250 U/mL의 100 μ L Mushroom tyrosinase를 첨가하여 반응을 개시하였다. 혼합물은 37°C에서 10분 동안 가열하고 microplate reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 배양

Murine melanoma B16-F10 cell line (CRL-6475)은 American Type Culture Collection(ATCC, VA, USA)에서 구입하였다. B16-F10 세포는 10% FBS와 1% streptomycin (100 μ g/mL)/penicillin (100 units/mL)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였고 5% CO₂와 37°C 조건에서 배양하였다.

6. 세포독성 측정

진피 및 승마의 세포독성 여부를 확인하기 위해 MTT 방법에 의해 측정하였다. B16-F10 세포를 5 \times 10³ cells/100 μ L의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 24시간 후에 새로운 배지로 씻어내었다. 진피 및 승마를 10-500 μ g/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 각 well에 10 μ L 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에 4시간 동안 반응시켜 MTT가 환원되도록 하였다. 배지

를 제거한 후, 각 well에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액 대신 PBS를 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 세포 생존율을 산출하였다.

7. 세포 내 Tyrosinase 활성 저해 측정

B16-F10 세포의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza et al.(1998)의 방법을 사용하였다¹⁸⁾. 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 세포를 1 \times 10⁵ cells/well로 분주하고, 각각의 추출물을 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후 각 well을 10 mM PBS로 세척하였으며, 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 μ L에 현탁 시켰다. 현탁액을 vortexing 한 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 활성측정 효소액으로 사용하였다. 96 well plate에 이 효소액을 40 μ L 넣고 기질인 L-dopa(2 mg/ml) 100 μ L를 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, microplate reader(Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

8. B16-F10 세포의 Melanin 생합성 저해율 측정

B16-F10 세포의 Melanin 생성량 측정은 Hosoi et al.(1985)의 방법을 변형하여 사용하였다¹⁹⁾. B16-F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 세포를 1 \times 10⁵ cells/well로 분주하고, 각각의 추출물을 처리한 후 48시간 동안 배양하였

다. 각 well을 PBS로 세척 후 0.2N NaOH 용액 400 μ l를 첨가하고 60°C에서 1시간 동안 용해하였으며, micro plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 정량은 대조군의 melanin 양에 대한 백분율로 계산하였다.

9. 통계분석

결과의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하였으며, 실험 결과의 통계처리는 Systat의 SigmaPlot version 10.0을 사용하여 Student's t-test를 통하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

III. 결 과

1. 추출방법에 따른 수득률의 변화

추출방법을 달리한 진피와 승마 추출 수율은 Table 1과 같다. 이들 추출물은 각각 용매추출(EE), 초음파추출(USE), 초임계추출(SCE), 환류냉각추출(RE)의 추출방법에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며($P < 0.05$), 진피는 EE, RE, USE, SCE 순으로 높은 수율을 나타내었다. 승마 역시 같은 순으로 수율을 나타내었다. 가장 높은 수득률은 나타낸 것은 용매추

출과 환류냉각추출 방법이었으며 가장 낮은 것은 초임계 추출방법이었다. 압력을 다르게 설정하여 초임계 추출을 반복하였으나 회수율은 3%도 되지 않았다.

Table 1. Extraction Yields of CS and CD Extracts according to Extraction Methods

Extraction method	Extraction yield (dry basis, %)	
	CS	CD
EE	39.8±0.64	26.2±0.36
USE	24.20±0.24	12.32±0.44*
SCE	2.22±0.02*	0.73±0.02*
RE	33.4±0.87	25.00±0.67

EE : ethanol extraction, USE : ultrasonification extraction, SCE : supercritical extractio, RE : reflux extraction

Values are mean±SD of triplicate determinations. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ vs. EE.

2. 진피와 승마 추출물에 대한 항산화 효과

추출방법에 따른 진피와 승마 추출물에 대한 항산화능은 DPPH radical 소거능을 근거로 평가하였다. 진피 추출물은 농도의존적으로 증가하는 경향을 보여주었지만 모든 추출조건에서 승마 추출물에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물은 농도의존적으로 증가하였으며 200 μ g/ml의 농도에서 항산화 대조군인 ascorbic acid 활성과 대등한 값을 나타내었다(Fig. 1).

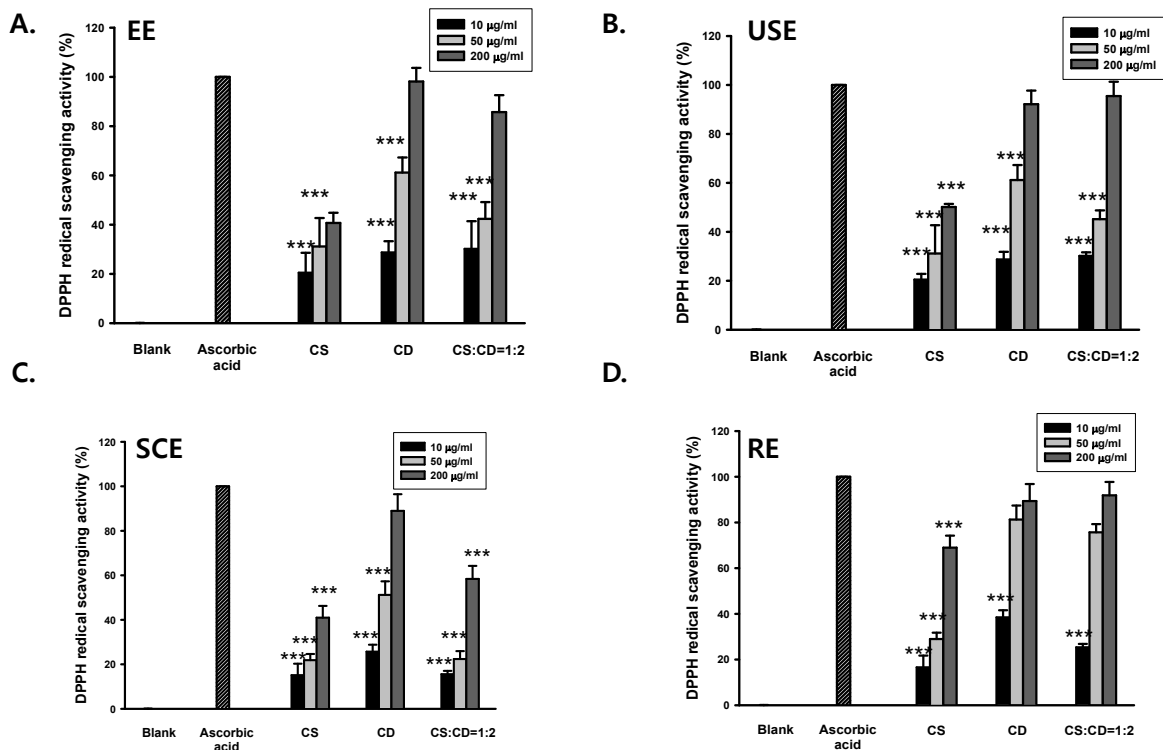


Fig. 1. Radical scavenging activity of DPPH of CS, CD extract or CS:CD = 1:2 mixture.

Ascorbic acid (20 µg/mL) was used as a positive control. All graphs show percentages of control, and data are expressed as means±S.E.M. (n=3). Statistical significance was set at ***p<0.001 when compared with the ascorbic acid group.

3. 진피 및 승마 추출물의 mushroom tyrosinase 활성 억제 효과

진피 및 승마 추출물의 melanin 생합성에 있어서 tyrosinase의 직접적인 작용을 미치는지 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다. Tyrosinase의 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 이용하였으며 양성대조군은 10 mM arbutin을 사용하였다. 그 결과 약 58%의 저해

활성을 나타내었다. 진피 및 승마 추출물은 10-200 µg/ml의 농도로 mushroom tyrosinase의 저해 활성을 측정하였다. 진피 추출물은 어떠한 추출방법을 사용하더라도 tyrosinase 활성 억제효과를 보이지 않았다. 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물에서 농도 의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

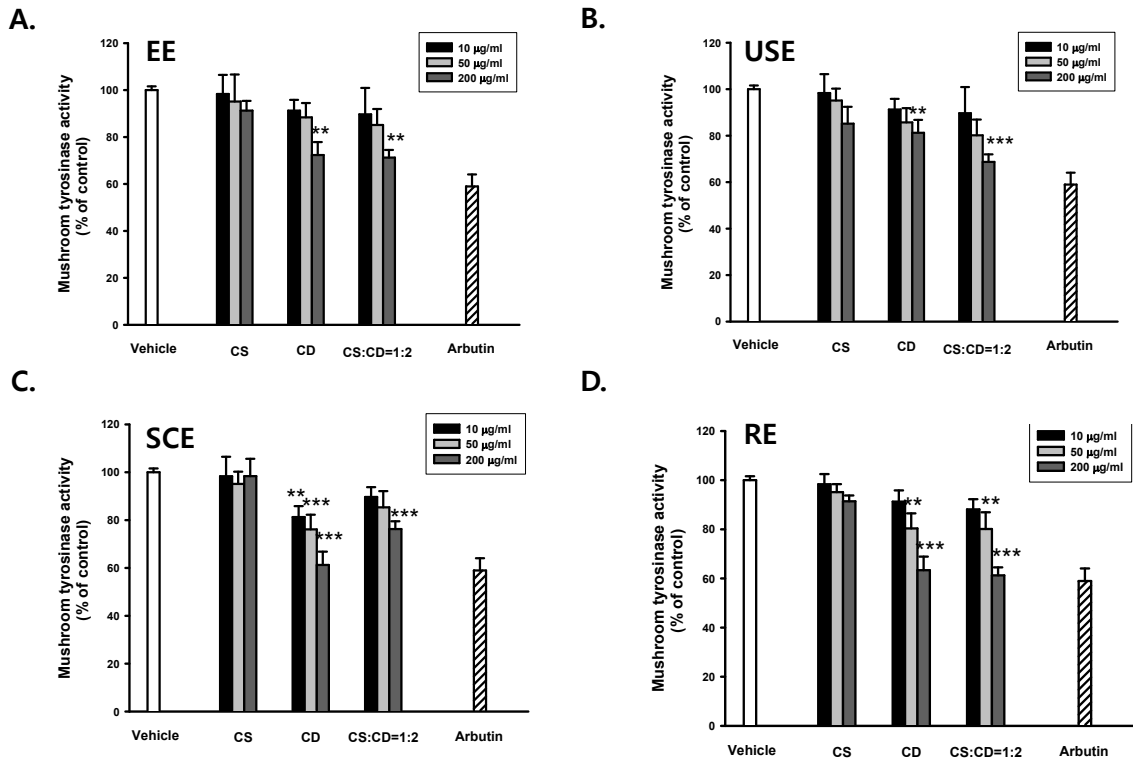


Fig. 2. Mushroom tyrosinase inhibition activity of CS, CD extract or CS:CD = 1:2 mixture.

The tyrosinase inhibitory effect using L-DOPA of CS, CD extract or CS:CD = 1:2. Arbutin (10 mM) was used as a positive control. All graphs show percentages of control, and data are expressed as means±S.E.M. (n=3). Statistical significance was set at **p<0.01 and ***p<0.001 when compared with Vehicle.

4. B16-F10 세포에서 진피 및 승마의 세포독성에 대한 분석

다양한 방법으로 추출된 진피 및 승마의 세포독성 범위를 확인하기 위하여 MTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 확인하였다(Table 2). 진피 및 승마를 10-500 µg/ml의 농도로 각각 처리했을 때 200 µg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다.

그러나 500 µg/ml의 농도로 처리했을 때 세포 생존율이 약 70-80% 정도로 감소하여 세포독성을 나타내었다. 특히 500 µg/ml 농도에서 진피/승마(1:2) 혼합물이 가장 높은 세포 생존율을 보였다. 따라서 이후 모든 추출물의 세포 실험은 독성이 없는 10, 50, 200 µg/ml 농도 범위에서 수행하였다.

Table 2. Effects of CS, CD Extract or CS:CD = 1:2 Mixture on Cytotoxicity in B16-F10 Melanoma Cells

Extract	% viability of cells				
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ml
EE (Ethanol extraction)					
CS	98.1±3.22	98.1±3.48	96.3±6.4	96.2±3.82	72.5±5.45 [†]
CD	99.5±0.26	99.1±3.72	98.5±3.11	97.5±2.26	83.6±3.24 [*]
CS:CD = 1:2	98.6±2.41	99.3±2.47	99.5±1.04	97.6±3.07	80.5±2.28 [*]
USE (Ultrasonification extraction)					
CS	99.5±1.36	99.7±2.65	98.4±3.01	97.7±1.46	71.8±3.81 [†]
CD	98.1±2.07	98.1±4.28	98.4±2.21	95.1±4.28	85.6±1.28 [*]
CS:CD = 1:2	99.7±0.57	98.3±2.54	99.1±1.54	96.1±3.85	82.4±4.11 [*]
SCE (Supercritical extraction)					
CS	98.7±2.46	98.7±2.46	98.7±2.46	98.7±2.46	68.8±5.69 [†]
CD	98.1±4.28	98.1±4.28	98.1±4.28	98.1±4.28	71.3±3.56 [†]
CS:CD = 1:2	99.1±1.54	99.1±1.54	99.1±1.54	97.1±0.41	80.3±6.44 [*]
RE (Reflux extraction)					
CS	98.7±1.42	99.7±1.41	98.5±4.57	95.7±2.46	75.8±1.64 [*]
CD	98.2±1.22	98.5±3.26	98.1±2.18	97.1±0.27	82.3±2.53 [*]
CS:CD = 1:2	99.1±3.47	99.2±2.04	98.1±2.54	98.1±3.41	85.6±3.41 [*]

B16-F10 melanoma cells were treated with various concentrations (10-500 µg/ml) of CS, CD or CS:CD = 1:2 mixture according to EE, USE, SCE, RE, respectively. Cells are incubated for 24 h, then MTT assay was performed. Values are mean±SE of three individual experiments. *P<0.05, †P<0.01 vs. control.

5. 진피 및 승마 추출물의 멜라닌세포 tyrosinase 활성 억제 효과

용매추출(EE), 초음파추출(USE), 초임계추출(SCE), 환류냉각추출(RE) 방법으로 추출한 진피 및 승마 추출물의 melanin 생합성과 관련한 tyrosinase의 저해 활성을 100 nM α -MSH로 자극한 B16-F10 melanoma 세포를 이용하여 측정하였다

(Fig. 3). 양성대조군으로는 100 µg/mL arbutin을 사용하였다. 진피 EE 추출물은 tyrosinase 억제 효과가 나타나지 않았으며, 승마 추출물은 모든 종류의 추출방법에서 농도 의존적인 tyrosinase 억제 효과를 나타내었다. 진피/승마 혼합물 역시 승마 추출물과 같이 농도 의존적으로 tyrosinase 억제 효과를 나타내었다.

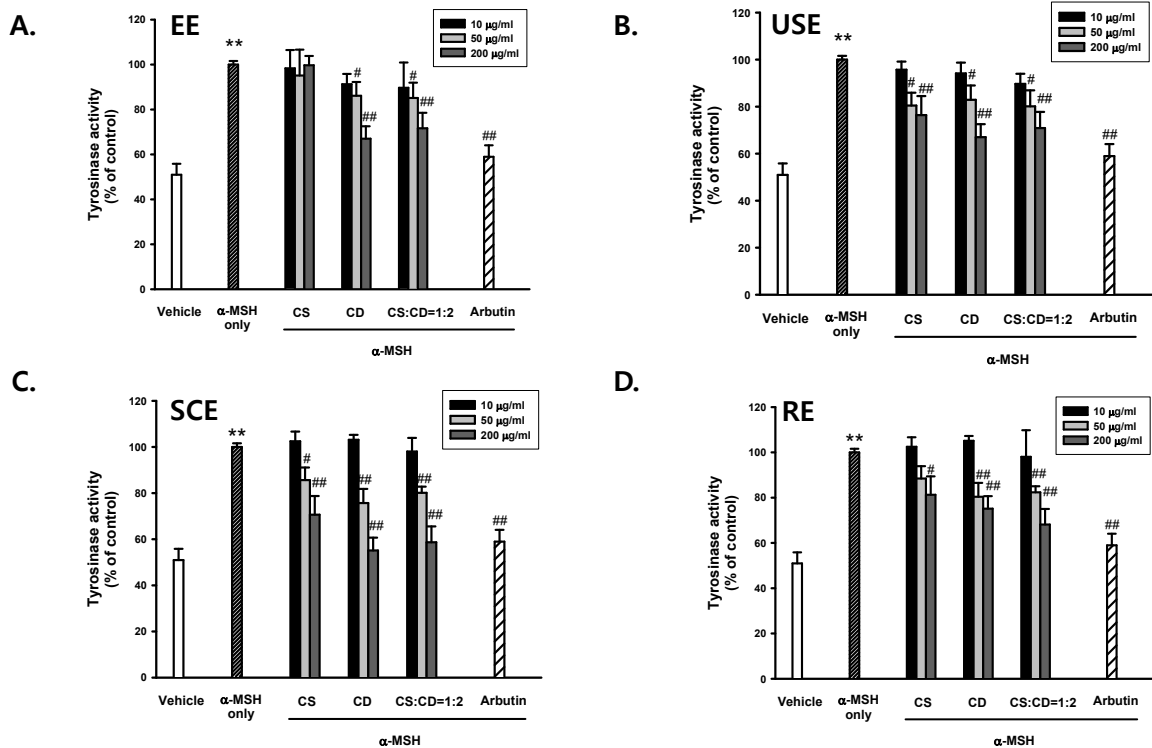


Fig. 3. Melanin contents of CS, CD extract or CS:CD = 1:2 mixture in B16-F10 melanoma cells.

A. EE : ethanol extraction. B. USE : ultrasonification extraction. C. SCE : Supercritical extraction. D. RE : reflux extraction. Results are presented as percentages based on the α-MSH group. Data are expressed as the means±S.E.M. (n=3). Statistical significance was set at **p<0.001 when compared with vehicle, and #p<0.05, and ##p<0.01 compared with α-MSH group.

6. 진피 및 승마 추출물의 세포 내 melanin 생성 억제 효과

진피 및 승마 추출물이 melanin 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 α-MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 melanin 생성 억제 효과를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 melanin 생성은 α-MSH의 처리로 증가하였으며, 진피 및 승마 추출물을 50-200 µg/mL 처리했을 때 농도 의존적으로 감소 효과를 나타내었다. 진피 EE 추출물은 tyrosinase 결과

와 마찬가지로 melanin 저해 효과가 나타나지 않았다. 그 외의 여러 추출법을 이용한 진피 및 승마 추출물은 농도 의존적으로 melanin 저해효과를 나타내었다. 특히 진피/승마(1:2) 혼합물을 초임계추출하여 처리 시 양성대조군 arbutin보다 더 높은 melanin 억제효과를 보여 주었다. 따라서 진피와 승마 추출물의 melanin 저해 활성은 추출 방법에 따라 다양하게 나타나는 것으로 보여진다.

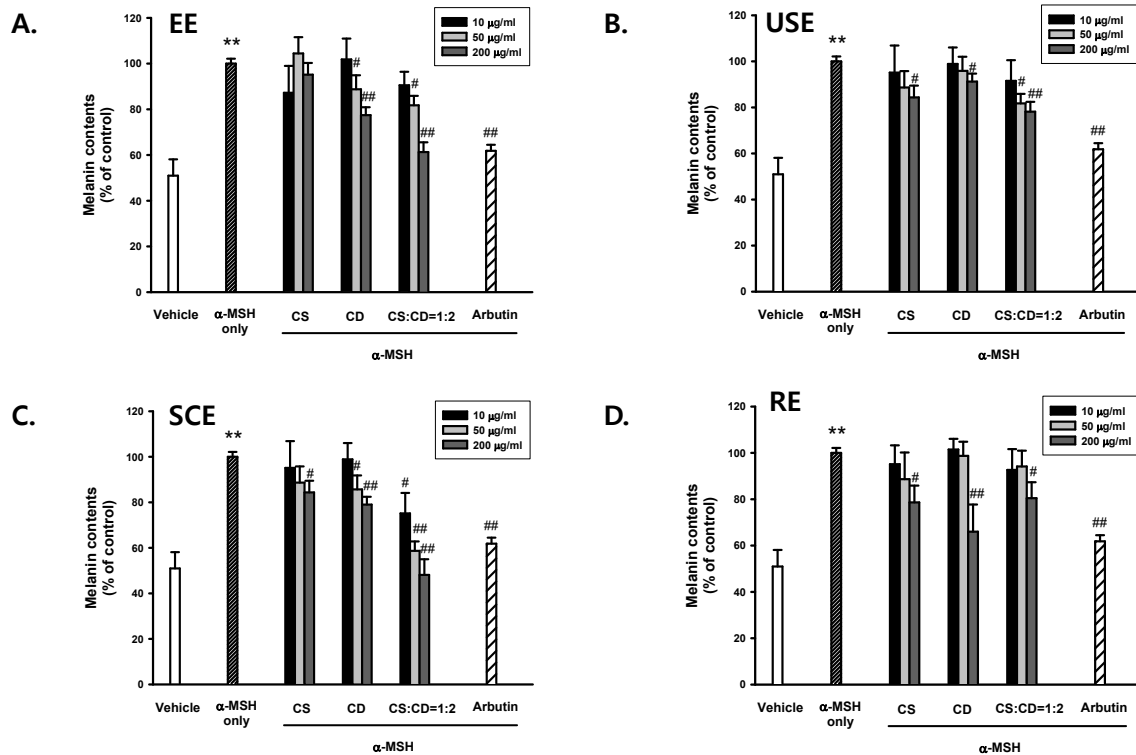


Fig. 4. Effects of CS, CD extract or CS:CD = 1:2 mixture on tyrosinase activity in B16-F10 melanoma cells. Tyrosinase activity in B16-F10 melanoma cells treated with various concentrations (10-200 µg/mL). A, EE : ethanol extraction. B, USE : ultrasonification extraction. C, SCE : Supercritical extraction. D, RE : reflux extraction. Results are presented as percentages based on the α-MSH group. Results are presented as percentages based on the α-MSH group. Data are expressed as the means±S.E.M. (n=3). Statistical significance was set at **p<0.001 when compared with vehicle, and #p<0.05, and ##p<0.01 compared with α-MSH group.

IV. 고 찰

사회가 발전함에 따라 아름답고 건강한 여성의 미백에 대한 욕구가 커지면서 천연물 유래 미백제의 수요가 증가하고 있다. 한방 미백연구가 다른 화장품 연구와 가장 특징적으로 다른 점은 한의학의 이론적 토대 위에 여성의 피부 노화를 예방적인 차원으로 접근한다는 점이다. 또한 동의보감과 같은 한의학 원전에 근거하여 피부에 유효한 성분들을 엄선하여 화장품에 응용하는 점도 근본적인 특징이다²⁰⁾. 전통적인 약물 제조방식

을 현대 추출방식으로 보완하여 한약의 치료 효능을 높이고 독성과 부작용을 없애며, 조제, 제제, 보관에 편리하기 위한 과정이 필요하다. 이에 본 연구는 전통 한약 소재인 진피 및 승마를 여러 방법으로 추출하고 배합하여 시험관 또는 멜라닌 세포에서 미백 기능을 평가하기 위하여 수행되었다. 진피 및 승마 추출물은 모두 용매, 환류냉각추출, 초음파추출, 초임계추출 순으로 수득률이 다르게 나타났다. 가장 낮은 수득률을 보인 것은 초임계 추출이며, 압력을 다르게 하여 추출하여도 그 회수율이 3%도 되지 않아 추후 미백 관련 제품 개발을 감안할 때

경제성이 매우 낮을 것으로 사료된다.

광노화 과정에서도 활성산소는 중요한 원인인자이다. L-ascorbic acid와 같은 항산화제는 지질과산화 반응과 같이 산소 유래 라디칼에 의해 일어나는 여러 가지 손상 반응에서 라디칼을 환원시켜 손상을 방지하고 지질과산화 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 항산화제는 환원력이 클수록 생체 보호 효과가 크다. 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력은 상대적으로 안정한 라디칼 구조를 갖는 DPPH와 의 반응을 통하여 알아볼 수 있다²¹⁾. 본 연구에서 진피 및 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물은 농도 의존적으로 증가하였으며 200 µg/ml의 농도에서 항산화 대조군인 ascorbic acid 활성과 대등한 값을 나타내었으므로, 이들 추출물의 항산화효과를 보여주고 있다.

본 연구에서는 진피 및 승마 추출물의 미백 활성을 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase 활성 억제를 측정하였다^{22,23)}. 진피 추출물을 제외하고 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물에서 농도 의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 보여주었다. 세포 독성이 없는 10, 50, 200 µg/ml 농도 범위에서 진피 단독 추출물을 제외한 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물에서 농도 의존적인 tyrosinase 활성 저해율을 나타냈다. 그러므로 이러한 결과는 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물이 melanin 형성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase 효소 활성을 억제할 뿐만 아니라 멜라닌 생성세포 내에서 tyrosinase의 발현을 조절함으로써 미백 활성에 기여하는 것으로 사료된다.

세포 내 melanin의 형성을 촉진시키는 melanogenesis은 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 protein-1(TRP-1), tyrosinase related

protein-2(TRP-2), adrenocorticotrophic hormone(ACTH), forskolin 및 α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH) 등의 다양한 인자들에 의해서 조절된다^{24,25)}. 여기에서 α-MSH는 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로 melanocortin receptor 1(MC1R)와 결합하여 tyrosinase 활성 등을 통하여 melanin 생성을 촉진시키며, microphthalmia-associated transcription factor(MITF) 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 진피 추출물 처리는 일부 추출방법에서 melanin 함량 억제효과를 보였으나, 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물은 훨씬 높은 유의적인 melanin 생성 억제효과를 보여주었다. 따라서 진피 및 승마 추출물은 melanocyte에서 α-MSH로 유도하는 melanogenesis를 효과적으로 억제한다는 사실을 알 수 있다.

V. 결 론

본 연구는 다양한 추출방법으로 얻어진 진피 및 승마 추출물의 미백효과를 확인하기 위하여 수행되었다. 용매, 초음파추출, 초임계추출, 환류냉각추출 방법에 따라 각각 추출되었으며 각기 다른 수득률을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능 및 tyrosinase 억제능을 관찰한 결과 승마 및 진피/승마(1:2) 혼합물의 농도가 증가할수록 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 B16-F10 세포 내 melanogenesis 과정을 억제시키는 지 알아보기 위하여 진피 및 추출물을 처리한 결과 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 및 melanin의 형성이 감소되는 것을

알 수 있었다. 이상의 결과로 다양한 추출방법으로 얻어진 진피 및 승마 추출물의 미백 활성을 확인할 수 있었으며, 향후 유효성분 규명을 통해 세부 작용기전 및 임상적 활용 가능성을 위한 추가연구가 수행된다면 부작용이 없는 미백 소재로 그 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2022년)에 의해 수행되었음.

- Received : Jul 14, 2022
- Revised : Jul 16, 2022
- Accepted : Aug 26, 2022

References

1. Desmedt B, et al. Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016; 30(6):943-50.
2. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007;21(4):976-94.
3. Karunaratne WAHM, et al. Anthocyanins from *Hibiscus syriacus* L. Inhibit Melanogenesis by Activating the ERK Signaling Pathway. *Biomolecules.* 2019; 9(11):645.
4. Lee A, et al. The Inhibition of Melanogenesis Via the PKA and ERK Signaling Pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* Extract in B16F10 Melanoma Cells and Artificial Human Skin Equivalents. *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28(12):2121-32.
5. Lee JY, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanin synthesis through suppressing transactivation activity of microphthalmia-associated transcription factor. *J Nat Prod.* 2013; 76(8):1399-405.
6. Choung MG, et al. Antimelanogenic Effect and Whitening of Anthocyanin Rich Fraction from Seeds of *Liriope platyphylla*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2013;21(5):361-71.
7. Ha SK, et al. Effect of the BuOH soluble fraction of *Cinnamomum camphora* on melanin biosynthesis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2009;17(4):293-300.
8. Jo YC, et al. Inhibitory effect of white ginseng fraction on skin pigmentation. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2008; 16(3):192-4.
9. Roh JS, et al. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2004;27(12):1976-8.
10. Lee SH, et al. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2002;25(8):1045-8.
11. Kang SI, et al. Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat

- diet-induced obese mice. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(2):223-30.
12. Jin YJ, et al. Anti-Obesity Effects of Polymethoxyflavone-Rich Fraction from Jinkyool (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) Leaf on Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Nutrients.* 2022;14(4):865.
 13. Choi YS, et al. Chloroform extract of *Citrus unshiu* Markovich peel induces apoptosis and inhibits stemness in HeLa human cervical cancer cells. *Mol Med Rep.* 2021;23(1):86.
 14. Han NR, et al. Improvement effects of a mixed extract of flowers of *Pueraria thomsonii* Benth. and peels of *Citrus unshiu* Markovich on postmenopausal symptoms of ovariectomized mice. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:524-30.
 15. Yim SH, et al. Cytotoxic caffeic acid derivatives from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia*. *Arch Pharm Res.* 2012;35(9):1559-65.
 16. Jia H, et al. *Cimicifuga dahurica* extract inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2021;277:114057.
 17. Thao NP, et al. Inhibition Potential of Cycloartane-Type Glycosides from the Roots of *Cimicifuga dahurica* against Soluble Epoxide Hydrolase. *J Nat Prod.* 2017;80(6):1867-75.
 18. Martinez-Esparza M, et al. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 1998;255(1):139-46.
 19. Hosoi J, et al. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. *Cancer Res.* 1985;45(4):1474-8.
 20. Lee DS, et al. Antioxidative Activity and Componential Analysis of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract. *Appl Chem Eng.* 2012;23(1):93-9.
 21. Park SA, et al. Antioxidative Activity and Component Analysis of *Broussonetia kazinoki* SIEB Extracts. *Appl Chem Eng.* 2013;24(2):177-83.
 22. Kikuchi H, et al. Detection of point mutation in the tyrosinase of a Japanese albino patient by a direct sequencing of amplified DNA. *Hum Genet.* 1990;85(1):123-4.
 23. Park CH, et al. A natural compound harmine decreases melanin synthesis through regulation of the DYRK1A/NFATC3 pathway. *J Dermatol Sci.* 2021;103(1):16-24.
 24. Zhou S, Sakamoto K. Citric acid promoted melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cells, but inhibited it in human epidermal melanocytes and HMV-II melanoma cells via the GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *PLoS One.* 2020;15(12):e0243565.
 25. Sato K, et al. 2-Ethoxybenzamide stimulates melanin synthesis in B16F1 melanoma cells via the CREB signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2016;423(1-2):39-52.
-