

새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy) 및 실새삼 (*C. australis* R.Be) 추출물의 Mushroom Tyrosinase 활성 억제 효과

석귀덕* · 이승자¹ · 배정미¹
대구가톨릭대학교 약학대학, ¹보건과학대학원

Inhibitory Effects of *Cuscuta japonica* Extract and *C. australis* Extract on Mushroom Tyrosinase Activity

Kui Duk Suk*, Sung Ja Lee¹, and Jung Mi Bae¹

College of pharmacy, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Korea
¹The Graduate School of Health Sciences, Catholic University of Daegu

Abstract – The purpose of this study was to evaluate mushroom tyrosinase inhibitory activity of *Cuscuta japonica* Choisy and *C. australis* R.Be. The experimental materials were expressed juice from their stems and flowers, both water and ethanol extracts, their seeds, and two kinds of commercially available cosmetic packing Wontosa and Bupjetosa (made from seeds of *C. japonica*). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of *C. japonica* juice was 5.4 mg/ml. However, *C. australis* juice showed negligible mushroom tyrosinase inhibitory activity. The IC₅₀ of water extracted *C. japonica* seed was 54.0 µg/ml, water extracted product of Wontosa 50.0 µg/ml and Bupjetosa 40 µg/ml. The IC₅₀ of ethanol extracted *C. japonica* seed was 10 µg/ml, Wontosa 10 µg/ml and Bupjetosa 20 µg/ml.

Key words – *Cuscuta japonica* Choisy, *C. australis* R.Be, mushroom tyrosinase inhibitory activity

메꽃과(Convolvulaceae)에 속하며 콩과식물이나 국화과식물에 기생하는 일년생 덩굴식물인 새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy)과 실새삼(*C. australis* R.Be)의 잘 익은 씨앗 (종자)을 말린 것이 토사자 (菟絲子, Semen Cuscutae)로, 대한약전의 한약 (생약) 규격집에 수재되어 있다.¹⁻³ 중국 약전에는 갯실새삼(*C. chinensis* Lam.)의 씨앗을 토사자(小粒 菟絲子)로, 지방습용품으로 金燈藤 (*Cuscuta japonica* Choisy)의 씨앗을 大菟絲子(大粒 菟絲子)로 기재하고 있다.⁴

神農本草經 上品에 기재되어 있는 토사자는 補養肝腎, 補益精髓, 明目, 止瀉 및 安胎등에 응용되며,⁵⁻¹⁰ 천금요방 및 천금약방에 외용 도포 시 여드름이나 기미를 제거하는데 탁월한 효과가 있다는 기록이 있다.¹¹ 동의보감 본초에 菟絲子苗의 즙을 바르면 面黥(기미), 粉刺(여드름) 및 반점을 없애 준다고 기록되어 있다.^{12,13} 토사자는 鹽菟絲子, 酒菟絲餅, 菟絲子酒浸 및 菟絲子酢浸등으로 修治(法製)하여 사용한다. 현재 단방이나 복방으로 기미, 주근깨, 여드름 및 잡

티 제거와 피부를 윤택하게 할 목적으로 팩제 등으로 시판되고 있다.^{13,14} 민간에서 새삼 줄기의 즙을 안면에 바르고, 마사지를 계속하면 여드름 및 주근깨와 잔주름에 치료 효과가 있다고 하여 사용하기도 한다.¹⁵

새삼의 성분으로 수지배당체와 당류, sterol류와 triterpenoid 류 gibebrillin, alkaloid, cardiac glycoside, steroid saponin 등이 있다. 갯실새삼에서 coumarin 및 flavon류 인 arbutin 등의 성분이 보고 되었으며, 실새삼에서 carotene류, taraxanthin 및 lutein이 보고되었다.¹²

피부의 멜라닌 합성과정은 비교적 잘 알려져 있고 또한 멜라닌 생성세포(melanocyte)의 활성조절에 대해서도 알려진 것이 많다.¹⁶⁻²¹ 기미, 주근깨와 같은 색소 침착은 자외선과 같은 인자에 기인된 것으로 melanin 생성 혹은 melanocyte의 증식에 의하여 야기된다. 멜라닌은 melanocyte 내의 melanosome에서 생합성 된다. 즉 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화된다. 활성화된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 항진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 된다. Tyrosinase (1.14.18.1 Monophenol monooxy-

*교신저자(E-mail) : kdsuk@cu.ac.kr
(FAX) : 053-850-3602

genase)는 L-tyrosine과 dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 산화시켜 DOPA와 DOPA-quinone을 생성한다. Melanocyte가 생성하는 melanine은 eumelanin과 pheomelanin으로 대별되며, eumelanin은 DOPA chrome을 거쳐서 생성되며 pheomelanin은 melanin polymer의 생성 과정에서 DOPA chrome을 거쳐서 생성된다. Tyrosinase는 피부의 색소 성분인 melanin을 생성하는데 있어서 key enzyme으로 작용하는 효소이기 때문에 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부 미백을 목표로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용할 수 있다. 현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성 억제 물질로서 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol, 우바우르시의 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol, dihydromoririn, artocarbene, 4-prenyl oxyreveratrol, 누룩곰팡이의 secondary metabolite인 kojic acid 등이 있으며 이들 중에서 현재 arbutin은 미백을 목표로 한 기능성 화장품에 첨가제로 이용되고 있다.²⁰⁻³⁸⁾

토사자의 미백효과를 검토 위하여 새삼의 tyrosinase 억제능을 간단히 검색한 연구^{33,34)}는 있으나 새삼과 실새삼의 즙, 씨앗 및 토사자 팩제의 tyrosinase 활성 억제 효과에 대한 연구는 없다. 그러므로 저자 등은 새삼 및 실새삼의 줄기와 꽃, 씨앗 및 시판되고 있는 토사자 팩제 2종을 시료로 하여 tyrosinase의 활성 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy) 및 실새삼(*C. australis* R.Be)은 경북 하양에서 채집하여 사용하였으며, 菟絲子는 국내산을 대구에서 구입하고, 그 기원이 새삼의 씨앗임을 확인하였다.⁴⁾ 元菟絲 (토사자를 세척 후 건조하고 분말로 한 것)와 法製 菟絲 (토사자를 술에 담갔다가 건조하고 분말로 한 것)의 2종의 팩제품 (H사 제품)은 그 원료가 새삼의 씨앗임을 확인하였다.⁴⁾

시료의 제조 - 새삼 및 실새삼의 꽃이 달린 줄기 50g씩을 waring blander로 마쇄하고, 거즈를 두 겹으로 하여 압착하여 얻은 액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 즙 시료로 하였다. 건조시킨 새삼 및 실새삼의 꽃이 달린 줄기, 새삼의 씨앗(토사자), 원토사, 법제 토사 및 실새삼의 씨앗 각각 50g에 대해 초순수 500 ml을 가해서 상온에서 24시간 추출하고, 여과 후 여액을 따로 두고, 같은 조작을 2회 반복하고 여액을 같이 모았다. 이것을 Rotary evaporator (Tokyo Rikakikai Co.)로 감압 농축하고 Maxi-Dry Lyo Speed Vac (Hetero lab equipment)으로 동결 건조하여 물 추출물로 하였다. 한편 시료 각각 50g에 대해 ether 500 ml을 가해서 가끔 흔들어 주면서 상온에서 24시간 추출 후 여과하고 다시 ether 300 ml로 같은 조작을 2회 더 반복하여 여액을 제거한 잔사에 absolute ethanol (Merk,

Germany) 500 ml을 가해서 상온에서 24시간 추출하고 여과하고 ethanol 300 ml로 같은 조작을 2회 더 반복하고 모든 여액을 합쳐서 감압 농축한 후 ethanol을 완전히 제거시킨 것을 ethanol 추출물로 하였다.

시료의 Tyrosinase의 활성 측정 - Laskin²¹⁾ 등의 방법으로 측정하였다. Dopa oxidase의 방법을 채택하였다. 1.5 mM buffer L-tyrosine 900 μ l, 0.6 mM/buffer L-dopa 90 μ l, 시료 용액 900 μ l를 가하고 60 U/ml (buffer) tyrosinase 900 μ l를 가하여 전량을 2790 μ l로 하였다. 시약의 용매로 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하였다. 반응액을 37°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 ice bath내에서 효소의 반응을 정지시키고 2시간 이내에 spectrophotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 새삼 및 실새삼의 즙과 새삼 및 실새삼의 줄기, 새삼과 실새삼의 씨앗, 원토사 및 법제토사의 물 추출물은 2 mg/ml씩을 초순수를 사용하여 serial dilution을 하였고, 각 ethanol 추출물은 2 mg/ml씩을 ethanol : 초순수 (1;1)를 용매로 하여 serial dilution을 하였다. 시료 대신 시료와 동량의 용매 900 μ l를 가하여 control로 하였고, tyrosinase 대신 buffer 900 μ l를 가하여 blank로 하였다. Kojic acid를 대조 물질로 하였다. 저해율은 아래와 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC₅₀ value로 하였다.

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

이때 A; Control의 A₄₇₅, B; 시료용액이 첨가된 것의 A₄₇₅

결과 및 고찰

1. 즙의 tyrosinase 활성 억제 효과 (Table I)

새삼의 즙은 5.4 mg/ml의 농도에서 tyrosinase 활성을 50% 억제하였다. 실새삼의 즙은 6.7 g/ml (즙 원액)에서 tyrosinase 활성을 47.4%의 억제했으며 새삼의 경우와 비교하면 그 활성 억제 효과가 미약하였다.

2. 물 추출물의 tyrosinase 활성 억제 효과 (Table I, II)

새삼 줄기의 물 추출물은 2.5~320 μ g/ml 농도에서 10~26%의 tyrosinase 활성 억제 효과를 보였으나 그 효과는 미약하였다. 실새삼 줄기의 물 추출물에서는 tyrosinase 활성 억제 효과를 전혀 볼 수 없었다.

새삼의 씨앗, 원토사 및 법제 토사, 씨앗의 물 추출물의 IC₅₀은 새삼의 씨앗이 54 μ g/ml, 원토사 50 μ g/ml 및 법제 토사 40 μ g/ml이었다. 실새삼의 씨앗의 물 추출물은 20.2 μ g/ml의 농도에서 39.4%의 활성 억제 효과를 보여 새삼의 활성 저해 효과에 미치지 못하였다.

Table I. Inhibitory effects of aerial part extracts of *Cuscuta japonica* and *C. australis* on mushroom tyrosinase activity

	Inhibition (%)		
	Water extract	Ethanol extract	Juice
<i>C. japonica</i>	2.5~320 µg/ml : 1~26	no	>344.7 mg/ml : 96.5 5.4 mg/ml : 50.0
<i>C. australis</i>	no	no	6.7 g/ml : 47.4

*Inhibitory activity was expressed as arithmetic mean value of inhibitory concentrations of triplicate determines.

*No showed that the extracts didn't inhibit the mushroom tyrosinase at the same condition.

* Value of 50% inhibitory concentrations of kojic acid showed 64 µg/ml.

Table II. Inhibitory effects of water extracts of *Cuscuta australis*, *Cuscuta japonica* and *C. australis* on tyrosinase activity

	Inhibition (%)	
	Water extract	Ethanol extract
<i>Cuscuta japonica</i>	80.0 µg/ml : 100 54.0 µg/ml : 50	20 µg/ml : 100 10 µg/ml : 50
Wontosa	80.0 µg/ml : 100 50.0 µg/ml : 50	40 µg/ml : 100 10 µg/ml : 50
Bupjetosa	80.0 µg/ml : 100 40.0 µg/ml : 50	40 µg/ml : 100 20 µg/ml : 50
<i>Cuscuta australis</i>	20.2 µg/ml : 39.4	20 µg/ml : 47.2

*Inhibitory activity was expressed as arithmetic mean value of inhibitory concentrations of triplicate determines.

*Value of 50% inhibitory concentrations of kojic acid showed 64 µg/ml.

3. Ethanol 추출물의 tyrosinase 활성 억제 효과 (Table I, II)

새삼 줄기의 ethanol 추출물과 실새삼 줄기의 ethanol 추출물에서는 tyrosinase 활성 억제 효과를 볼 수 없었다. 새삼의 씨앗의 ethanol 추출물은 20 µg/ml, 원토사와 법제 토사는 40 µg/ml의 농도에서 tyrosinase 활성을 100% 억제하였다. IC₅₀은 새삼의 씨앗에서 10 µg/ml, 원토사에서 10 µg/ml 및 법제 토사에서 20 µg/ml이었다. 실새삼의 ethanol 추출물은 20 µg/ml에서는 37.2%, 5.0 µg/ml에서는 21.0%의 tyrosinase 활성 억제 효과를 볼 수 있었다. 물 추출물에 비해서 같은 농도에서 tyrosinase 활성 억제 효과가 좀더 컸으나 새삼의 경우와 비교하면 실새삼의 ethanol 추출물의 활성 억제 효과는 미약하였다.

Tyrosinase는 두 가지 기능 (tyrosine hydroxylase, dopa oxidase)이 있으므로 assay 방법도 두 가지가 있다. 그러나 tyrosine hydroxylase의 assay는 ³H-labeled tyrosine을 실험에 제약이 따르기 때문에 저자들은 dopa oxidase의 방법을 채택하였다. Dopa를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome이 475 nm에서 흡광도를 나타내는 점을 이용하여 시행하였다. 앞서 새삼 (methanol extract)의 tyrosinase 억제 효과를 검색한 보고³³⁾에 의하면 IC₅₀은 200 µg/ml 이상으로 기재되어 있으며, 토사자 (*C. chinensis* Lam.의 종자)의 70% methanol extract의 경우는 IC₅₀이 22 mg/ml로 보고하였다.³⁴⁾

결론 및 요약

새삼 및 실새삼의 미백 효과를 규명하기 위하여 새삼 및 실새삼의 꽃이 달린 줄기, 시판하고 있는 토사자 (새삼의 씨앗) 및 토사자 팩제 2종을 시료로 하여 mushroom tyrosinase의 활성 억제 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 새삼의 꽃이 달린 줄기의 즙의 tyrosinase 활성 억제 효과는 농도 의존적으로 증가하였으며 50% 저해 농도 (IC₅₀)는 5.4 µg/ml이었다. 실새삼의 경우는 즙에서 최고 6.7 µg/ml에서 47.7%의 Tyrosinase 활성 억제 효과를 보였다. 물 추출물과 ethanol 추출물은 전혀 효과를 보이지 않았다.

2. 새삼의 씨앗, 원토사 및 법제 토사의 물 추출물이 IC₅₀은 새삼에서 54.0 µg/ml, 원토사에서 50.0 µg/ml, 법제 토사에서 40.0 µg/ml이었다. 실새삼 씨앗의 물 추출물은 최고 20.2 µg/ml의 농도에서 39.4%의 tyrosinase 활성 억제 효과를 보였다.

3. 새삼의 씨앗의 ethanol 추출물의 IC₅₀은 새삼에서 10.0 µg/ml, 원토사에서 10.0 µg/ml, 법제 토사에서 20.0 µg/ml이었다.

이상의 연구 결과에서 새삼의 꽃이 달린 줄기의 즙, 새삼의 씨앗 및 토사자 팩제 (원토사와 법제 토사)의 tyrosinase의 활성 억제 효과가 우수하였고 그 중에서도 특히 ethanol 추출물의 tyrosinase의 활성 억제 효과가 우수하였다.

사 사

본 연구는 대구가톨릭대학교 교내연구비로 수행되었으므로 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- 김태정(1996) 한국자원식물 III, 서울대학교 출판부, 서울, 207.
- 정태현(1972) 한국식물도감, 교육사, 서울, 517-518.
- 이창복(1990) 대한식물도감, 향문사, 서울, 301-302.
- 지형준, 김양일(2001) 상용 수입 한약재 감별법. 신일 상사. 서울, 301-302.
- 윤성중, 이상인(1991) 토사자의 문헌학적인 고찰, *J. of Herbology*, **6**(1): 59-65.
- 陳存仁(1982) 圖說 漢方 醫藥 大辭典 (중국 과학 대전), 講談社, 東京, 202.
- Bonsky, D. and Gamble, A. (1986) Chinese Herbal Medicine Material Medica, Eastland Press, Seattle, 505
- 賀志光 원저, 김종식 역(1995) 중의학. 유한 출판사, 서울. 258.
- Namba, T. (1993) The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sina-Japanese Medicine). I, Hoikusa, Tokyo, 276.
- Huang, K. C.(1993) The Pharmacology of Chinese Herbs, CRC Press. 210
- 孫思邈 (隨) 面藥, 千金要方, 9권.
- 서울대학교 천연물과학연구소(2001) 전통 동양 약물 데이터베이스 개정판, 동양미디어, 서울.
- 서울대학교 천연물과학연구소 문헌정보학연구실편(2003) 동양의약 과학대전 I, 학술편수관, 서울, 429. 717.
- 송정식(1993) 한방피부미용, 효림, 서울, 188-189.
- <http://www.insanga.co.kr/healthbook/12/p52.htm>
- 丸尾文治, 田宮信雄(1983) 酵素 핸드ブック, 朝倉書店, 東京, 155.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**: 361.
- Korotowski, W., Pilas, B., Sarina, T., and Kalyanaraman, B. (1987) Photochemistry and photobiology of melanogenic metabolites Formation of free radicals, *Photochem. Photobiol.* **45**: 185.
- Koch, W.H. and Chedekel, M. R. (1987) Photochemistry and photobiology of melanogenic metabolites Formation of free radicals, *Photochem. Photobiol.* **46**: 229.
- Yagi, A., Kanbara, T., and Morinoby, N. (1986) *Planta Medica*, **3981**: 517.
- Laskin, J.D. and Piccinini, L.A. (1986) Tyrosinase Isozyme Heterogeneity in Differentiating B16C3 Melanoma, *J. Biol. Chem.* **261**(35): 16626-16635.
- 김진준, 이주상, 김소영, 김정아, 정시련, 장태수, 이승호 (2001) 대극과 식물 등대풀로부터 분리한 가수분해형 탄닌의 tyrosinase 활성 억제효과, *약학회지*, **45**(2): 214-219.
- 손애량(1999) 한국산 오이풀(*Sanquosorbae officinalis* L.)로부터 피부 미백물질 및 충치예방물질의 화학구조 결정, 경산대학교 석사학위 논문.
- 이승호, 박지수, 김소영, 김진준, 정시련(1997) 고등식물로부터 피부 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제 활성 억제 물질의 탐색, *약학회지*, **41**(4): 456-461.
- Yin, S.Y., Kim, Y.M., See, J.J., Jin, C. M., Yang, J.Y., Lim, K.W., Jang, M.H., and Lee, M. K. (2004) *Natural Product Sciences*, **10**(3): 114-118.
- Lee, M. K., Zhan, Y. H., and Kim, H. S. (1996) Inhibition of Tyrosine Hydroxylase by Palmatine, *Arch. Pharm. Res.* **19**(4): 258-260.
- 허용호, 유성운, 김동섭, 임제진, 최영욱(1998) 멜라닌생성 억제제인 코직산 모노스테아레이트의 가수분해와 피부투과특성 및 in vivo 미백효과, *약학회지*, **42**(1): 19-44.
- 김문정, 장동일, 신의석, 이진선, 노민수(2000) 인체 피부 세포의 공동배양계를 이용한 멜라닌 생합성 조절물질의 검색, *대한화장품학회지*, **25**(1): 1-16.
- 김경동, 임용두, 박성순, 윤성화, 이석현(2000) 자외선 흡수제로서의 식물추출성분의 안정성과 효과, *대한화장품학회지*, **26**(1): 41-58.
- 황재성, 박원만, 안수미, 강병영, 이병근, 심영철(2000) Coenzyme Q10의 멜라닌 생성억제효과, *대한화장품학회지* **26**(1): 149-161.
- Kim, Y. H., Yang, H. E., Kim, J. H., Heo, M. Y., and Kim, H. P. (2000) Protection of the Flowers of *Prunus persica* Extract from Ultraviolet B-Induced Damage of Normal Human Keratinocytes, *Arch. Pharm. Res.* **23**(4): 396-400.
- 천현자, 최은영, 윤성찬, 남향우, 백승화, 우원홍(2001) 백출의 에탄올 추출물에 의한 Melanin 생성억제 효과, *약학회지*, **45**(3): 269-275.
- 박정일, 신영근, 신연경, 백신경, 이승기, 정명희, 박영인 (1997) 수중생약의 티로시나제 억제효과, *약학회지*, **41**(4): 518-523.
- 久保道徳(1986) チロシナ-ゼ阻害活性生薬の化粧品への應用, フレグラ ンスザヤ-ナル, 臨時増刊, 6.
- Kim, S.J., Heo, M.Y., Bae, K.H., Kang, S.S., and Kim, H.P. (2003) Tyrosinase Inhibitory Activity of Plant Extracts (III) : Fifty Korean Indigenous Plants, *J. Appl. Pharmacol.* **11**: 245-248.
- 이주상, 김정아, 조세훈, 손애량, 장태수, 소명욱, 정시련, 이승호(2003) 감초의 Tyrosinase 활성 억제 성분, *생약학회지*, **34**(1): 33-39.
- 최원형, 천현자, 이정호, 백승화(2003) 산수유 메탄올 추출물이 B16/F10 Melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향, *생약학회지*, **34**(1): 70-74.
- Kim, S.J., Heo, M.Y., Son, K.H., and Kim, H.P. (2003) Tyrosinase Inhibitory Activity of 80 Plant Extracts (II), *J. Appl. Pharmacol.* **11**: 245-248.

(2004년 12월 9일 접수)