

제주도 자생식물들에 대한 미백 및 항산화 효능 탐색

문지영·김주호·현진원*·강경아*·고재숙**·서영경**·백지훈**·박덕훈***·
이종성***·정은선***·유병삼†

코스맥스(주), *제주대학교 의학과, **더마프로, ***바이오스펙트럼
(2006년 5월 22일 접수, 2006년 7월 18일 채택)

Preliminary Screening of Some Jeju Island Native Plants for Whitening and Antioxidant Activity

Jiyoung Moon, Juho Kim, Jinwon Hyun*, Kyoungah Kang*, Jeasook Koh**, Youngkyoung Seo**,
Jihwoon Baek**, Deokhoon Park***, Jongsung Lee***, Eunsun Jung***, and Byoung-Sam Yoo†

Cosmetic R&D Center, Cosmax Inc. 902-4, Hwa Sung-si, Gyeonggi-do 445-746, Korea

*Department of Biochemistry, College of Medicine and Applied Radiological Science Research Institute,
Cheju National University

**Dermapro Co., LTD.

***Biospectrum Life Science Institute

(Received May 22, 2006; Accepted July 18, 2006)

요약 본 연구에서는 제주도에서 자생하는 37종의 식물추출물에 대한 미백 및 항산화 효능을 조사하였다. 미백 효능은 *in vitro* tyrosinase 저해활성과 B16-F1 세포를 이용한 멜라닌 합성 저해효과를 조사하여 확인하였고, 항산화 효능은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 전자공여능 측정방법과 DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate)를 이용한 V79-4 폐 섬유아 세포에서 활성 산소종 소거작용 능력을 조사하여 측정하였다. 세포실험 조건에서 식물추출물들의 투여농도에 따른 세포독성 정도를 조사하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 수행하였다. 미백 효능조사 실험에서 우수한 결과를 나타내었던 8종의 식물 추출물들은 토끼를 이용한 국소 독성 시험 및 인체 피부 자극 임상 시험에 적용하여 안전성을 조사하였다. 연구결과에서 높은 미백과 항산화 효능을 동시에 나타내었던 비수리(*Lespedeza cuneata*), 제주광나무(*Ligustrum lucidum* (stem)), 산뽕나무(*Morus bombycis* (stem)), 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. lilacina)의 식물추출물들은 화장품 원료화에 매우 유리한 조건을 갖고 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, we investigated the whitening and anti-oxidant activity of 37 Jeju island native plants. The active ingredients of the plants were prepared by methanol extraction. Whitening activity of plant extracts was examined from the inhibitory effect of tyrosinase and the inhibition of melanin synthesis of the B16-F1 cell line. Their anti-oxidant activity was measured by electron donating ability of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ROS (reactive oxygen species) scavenging activity in V79-4 lung fibroblast cells using DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate). Cytotoxicity of the extracts on cells based experiments was investigated by MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. Also, the toxicity test using a rabbit and the human skin patch test were carried out for examining the safety of the extracts which showed the high whitening activity. It is interesting that the extracts of *Lespedeza cuneata*, *Ligustrum lucidum* (stem), *Morus bombycis* (stem) and *Prunella vulgaris* var. lilacina showed both potent whitening and anti-oxidant activities.

Keywords: tyrosinase, DPPH, DCF-DA, MTT, skin-patch test

† 주 저자 (e-mail: ybs0507@cosmax.com)

1. 서 론

사람의 피부색은 멜라닌이나 카로틴과 같은 색소 성분과 혈관 분포, 각질층의 두께 등에 의해서 결정되며 이중 멜라닌이 가장 결정적인 요소로서 멜라닌 생성에 이상이 발생하면 기미나 주근깨 등과 같은 과색소 침착증이 나타난다[1]. 최근에는 화장품 소재 연구에서 피부색소 침착의 원인이 되는 멜라닌 생성을 억제하는 천연 식물 유래 성분의 미백효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

미백효과에 대한 연구는 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등과 관련하여 수행되고 있다. 특히, mushroom tyrosinase를 이용한 *in vitro* tyrosinase 저해 활성 검색법이 일반적으로 사용되고 있고, 위 효소는 인체에 존재하는 tyrosinase와 다르지만 위의 방법을 통하여 코직산, 알부틴 등의 미백 소재를 찾아냈으며 현재까지도 폭넓게 사용되고 있다[2, 3]. 코직산, 알부틴 외에 상백피추출물의 oxyresveratrol, 닥나무추출물의 kazinol F, F. kojic acid와 유용성 감초추출물에서의 glabridin의 병용에 의한 상승적 미백작용도 보고되어 있다[4,5]. 화장품 소재 개발에서 관심을 갖는 또 하나의 연구 분야는 피부 노화에 대한 것이다. 이러한 효능을 탐색하는 가장 일반적인 방법으로 DPPH radical 소거능력을 조사하는 것이 있고, 세포수준에서의 검색법으로는 섬유아세포의 증식을 감소시키는 효과를 측정하는 방법이 있다. 노화와 관련된 피부의 생리적 변화들 중의 하나로 섬유아세포 증식의 감소는 collagen 합성 감소로 이어진다고 보고되고 있다[6]. 현재까지 알려진 항산화제로는 phenol성 화합물, flavone 유도체, tocopherol, ascorbic acid 등의 천연항산화제와 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) 등 합성항산화제가 개발되어 있다[7,8]. 그러나 ascorbic acid의 경우, 산화조건의 외부환경에 놓이게 되면 급격하게 효능이 감소되고, 변취 및 변색이 되기 쉽다. Tocopherol과 같은 천연물은 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 생산비용이 높은 단점이 있다. BHT, BHA는 탁월한 효과와 저 생산비용의 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있지만, 열 안정성이 떨어지고 암과 같은 질병유발의 위험성이 제기되고 있다[9,10]. 한편, 천연물을 소재로 하는 화장품에 응용되는 높은 free radical 소거능력을 갖는 식물추출물로는 녹차추출물, 은행추출물, 솔잎추출물 등이 개발되어 왔다[11-13].

제주도는 한반도의 최남단에 위치한 섬이면서 중앙에는 1950 m의 한라산이 있기 때문에 아고산과 아열대 기후를 동시에 형성하고 있다. 이러한 특성으로 약 7,800 여종 이상의 육상 및 해양 생물자원이 서식하고 있으며, 338 종

Table 1. Criterion about the Responses after Human Skin Patch Test

Symbol	Grade	Clinical observation
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

의 약용식물을 포함하여 총 2,100 종의 자생식물이 서식하고 있다[14,15]. 이와 같은 다양한 생물종들의 서식으로 제주의 자생식물에 대한 활성 및 성분연구도 체계적으로 조사되기 시작하고 있다[14]. 본 연구에서는 제주도의 다양한 자생식물들로부터 미백 및 항산화 효능을 갖는 새로운 천연물들을 탐색하고, 향후 기능성 화장품 소재 개발 및 제주도의 아름다운 자연 이미지가 부각된 화장품 브랜드의 개발을 목적으로 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험재료 및 시료의 추출

본 연구에 사용된 시료는 한국생명공학연구원 산하 한국식물추출물은행에서 구입하거나 제주농업기술원에서 제공받았다. 한국식물추출물은행의 추출물 시료는 메탄올 추출물로서, 자세한 시료 제조 과정은 웹사이트(extract.pdrc.re.kr)에서 확인할 수 있다. 제주농업기술원의 추출물 시료는 장기간 메탄올에 침출된 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 동결건조되었고, DMSO에 정확한 농도로 녹여서 효능평가 실험에 사용하였다. 그리고 모든 추출물 시료의 분석 실험은 3번 반복하여 수행하였다.

2.2. 후보 시료 추출물의 미백 효능 평가

2.2.1. Mushroom Tyrosinase 활성 저해율 측정

Bernard[16] 방법을 변형하여 실험하였다. 시료 추출물 30, 150, 300 $\mu\text{g/mL}$ 를 포함한 인산화완충용액 100 μL 에 mushroom tyrosinase (320 units/mL) 20 μL 와 1.5 mM L-DOPA 80 μL 를 첨가하였다. 37°C에서 10 min간 반응시킨 후 생성되는 dopaquinone의 양을 475 nm에서 microplate reader (μ -Quant, Bio-tech)를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 알부틴을 사용하여 시료 추출물의 mushroom tyrosinase의 활성 저해 정도를 비교하였다.

2.2.2. B16-F1 세포배양 시스템에서 멜라닌 합성 저해효과

Kim[17]의 방법을 변형하여 실험하였다. 96-well plate

에 5.0×10^3 cells/well이 되도록 세포를 분주하고, 37°C의 10% CO₂ 조건하에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. D-phosphate buffered saline (D-PBS)으로 세척한 후 시료추출물을 농도별로 첨가한 배지로 3일간 배양하였다. 3일 경과 후 배지로 배출된 멜라닌의 함량을 microplate reader로 405 nm에서 측정하였다.

2.2.3. MTT 방법에 의한 세포 독성 평가

MTT assay는 Mosmann[18]의 방법을 변형하여 수행하였다. 96-well plate에서 시료추출물들에 대한 B16-F1 멜라닌 합성 저해효과 실험을 수행한 후 배지를 제거하였다. 그리고 D-PBS로 각각의 well을 세척한 후 500 µg/mL MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)를 well 당 50 µL씩 첨가하였다. 37°C의 10% CO₂ 조건하에서 4 h 동안 반응시킨 후 MTT 용액을 제거하고 well 당 DMSO 200 µL씩 첨가하였다. 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 후보 시료 추출물의 항산화 효능 평가

2.3.1. 전자공여능(DPPH) 실험

여러 농도의 시료추출물과 1.5×10^{-4} M의 DPPH 용액을 혼합하여 격렬하게 섞은 후 1 h 동안 실온에서 반응시킨다. 이 때 남아 있는 DPPH 양을 microplate reader로 520 nm에서 측정하였다[19]. 그리고 시료를 넣지 않은 경우를 대조군으로 하여 다음 식에 의해 시료의 산소 소거율(radical scavenging activity %)을 계산하였다.

$$\text{라디칼 소거율(\%)} = \frac{\text{대조군 OD} - \text{시료 처치군 OD}}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

2.3.2. 세포내 활성 산소종 측정을 위한 DCF-DA (Dichlorofluorescein Diacetate) 법

V79-4 세포들을 DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C의 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 대수기에서 성장하는 세포를 주로 실험에 사용하였다. Well당 약 4×10^5 세포 수가 되도록 96 well plate에 각각 접종한 후에 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 30 min간 배양하였다. H₂O₂ (stock 20 mM)를 10 µL씩 가한 후 (final concentration 1 mM) 다시 30 min간 배양하고, DCF-DA (stock 500 µM)를 20 µL씩 가한 후 spectrofluorophotometer (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 형광 측정하였다[20]. 시료를 넣지

않고 활성 산소종(reactive oxygen species)의 형성만을 측정할 것을 대조군으로 정하고, 시료 추출물을 넣어 활성 산소종을 소거시키는 시료 처치군과 비교하여 활성 산소종 저해율을 구하였다.

$$\text{라디칼 소거율(\%)} = \frac{\text{대조군 OD} - \text{시료 처치군 OD}}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

2.4. 후보 시료 추출물의 안전성 시험

토끼를 이용한 국소 독성 시험과 인체피부 일차자극 시험은 전문 임상시험 기관인 (주)더마프로에 의뢰하여 수행하였고, 임상용 시료추출물은 1,3-butylene glycol 용액에 1% (weight/volume)의 농도로 준비하였다.

2.4.1. 토끼를 이용한 국소 독성 시험

수컷 토끼 24 마리를 대상으로 한 마리당 총 8부위(좌우 각각 4 부위)의 피부에 시료 물질을 도포하였다. 피부 도포 후 24 h, 72 h 이후의 피부 자극성에 대해 판정하였다.

2.4.2. 인체피부 일차자극 시험

임상 시험 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 피험자 30 명 이상을 선정하였다. 피험자를 대상으로 등 부위에 시료물질을 도포한 후 48 h 후에 제거하였다. 제거 후 30 min, 24 h 후에 시험 부위를 관찰하였다. 피부 평가는 Table 1의 기준으로 평가하였고, 48 h 및 72 h의 평균 반응도를 비교하였으며, 각 물질에 대한 평균 반응도를 기준으로 하여 그 결과를 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 후보 시료 추출물의 미백 효능 평가

3.1.1. Tyrosinase 활성 저해 효과

제주도 자생식물 37 종으로부터 미백 기능성 화장품 원료를 개발하기 위하여 *in vitro* mushroom tyrosinase 방법에 의한 각각의 식물 추출물들의 tyrosinase 저해 활성 능력을 조사하였다. 식물 추출물을 30, 150, 300 µg/mL의 농도로 처리할 때, mushroom tyrosinase의 저해 활성 정도를 조사하였다. 이때 식품의약품안전청에서 미백 기능성 화장품 원료로 고시한 알부틴을 양성대조군으로 사용하였다. 실험 결과에서 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄기, 청미래덩굴(*Smilax china* L.)-열매, 비수리(*Lespedeza cuneata*), 제주조릿대(*Sasa guelpaertensis* Nakai)-잎, 솔비나무(*Maackia fauriei*)-잎, 금창초(*Ajuga decumbens*), 마삭줄(*Rachelospermum asiaticum* var. *interme-*

Table 2. Inhibitory Effect of Jeju Island Native Plant Extracts on Tyrosinase Activity

Plants	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Tyrosinase inhibition (%)		
		300	150	30
<i>Morus bombycis</i> (stem)		68.6	75.9	82.5
<i>Smilax china</i> L. (fruit)		35.2	27.2	15.0
<i>Lespedeza cuneata</i>		32.9	25.7	24.3
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)		31.3	27.4	18.5
<i>Maackia fauriei</i> (leaf)		31.0	25.9	11.2
<i>Ajuga decumbens</i>		30.7	43.4	9.6
<i>Rachelospermum asiaticum</i> var. <i>intermedium</i> (leaf)		29.9	26.7	12.3
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (stem)		28.8	28.4	17.2
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)		28.4	24.2	22.1
<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>		27.0	26.6	18.2
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)		26.1	24.1	21.5
<i>Viburnum furcatum</i> (leaf)		25.2	21.1	11.5
<i>Aster hayatae</i>		25.2	14.0	13.7
<i>Maackia fauriei</i> (stem)		23.8	25.5	18.7
<i>Peucedanum japonicum</i> (root)		23.5	23.3	22.3
<i>Tetragonia tetragonoides</i>		23.4	19.6	14.2
<i>Macrolepiota procera</i>		23.2	20.9	19.5
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (leaf)		22.9	18.8	16.1
<i>Hepatica insularis</i>		22.8	14.9	12.8
<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>		22.4	20.4	15.8
<i>Ixeris dentata</i>		21.9	19.8	13.0
<i>Rubus crataegifolius</i> (leaf)		21.0	18.4	18.1
<i>Senecio nemorensis</i>		20.5	16.5	12.8
<i>Hedera rhombea</i> (fruit)		20.4	18.6	8.5
<i>Rosa multiflora</i>		20.0	14.2	0.5
<i>Erigeron annuus</i>		19.2	17.4	17.2
<i>Rubus coreanus</i> (leaf, stem)		19.2	16.2	8.9
<i>Melia azedarah</i> var. <i>japonica</i> (root)		18.6	13.2	9.4
<i>Prunus buergeriana</i> (leaf)		17.8	17.1	16.0
<i>Houttuynia cordata</i>		17.8	16.7	14.2
<i>Scilla scilloides</i>		17.5	15.7	15.0
<i>Sorbus commixta</i> (leaf)		16.8	14.3	12.5
<i>Hedera rhombea</i> (stem)		16.7	10.8	0.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (root)		16.5	12.0	10.2
<i>Ranunculus japonicus</i>		16.4	16.2	12.2
<i>Viburnum furcatum</i> (bark)		15.8	14.9	6.5
<i>Ixeris stolonifera</i>		9.7	4.8	2.8
Arbutin		25.7	20.2	13.9

(Conc: concentration)

dium)-잎, 제주조릿대(*Sasa guelpaertensis* Nakai)-줄기, 제주광나무(*Ligustrum lucidum* Rubus)-줄기, 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina*), 담팔수(*Elaeocarpus sylvestris*)-열매 등 11 종의 추출물들이 알부틴보다 높은 tyrosinase 저해 활성 효과를 나타내었다(Table 2).

3.1.2. B16-F1 세포배양 시스템에서 멜라닌 합성 저해효과
세포 수준에서의 미백 효과를 확인하기 위해 시료 추출물들의 B16-F1 세포배양 시스템에서 멜라닌 합성 저해 효과를 확인하였다. 그 결과 제주조릿대(*Sasa guelpaertensis* Nakai)-뿌리, 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄

Table 3. Inhibitory Effect of Jeju Island Native Plant Extracts on the Melanin Biosynthesis in B16-F1 Melanoma Cells

Plants	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition of melanin synthesis (%)		
		100	50	10
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (root)		97.5	54.8	50.8
<i>Morus bombycis</i> (stem)		96.3	75.1	37.3
<i>Hedera rhombea</i> (stem)		96.2	0.0	0.0
<i>Ajuga decumbens</i>		95.2	88.6	0.0
<i>Hedera rhombea</i> (fruit)		95.2	20.5	0.0
<i>Prunella vulgaris</i> var. lilacina		95.2	34.9	24.4
<i>Hepatica insularis</i>		93.5	49.7	0.0
<i>Peucedanum japonicum</i> (root)		92.7	82.8	29
<i>Maackia fauriei</i> (stem)		92.7	82.8	49.2
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)		91.7	94.3	43.2
<i>Ixeris stolonifera</i>		84.1	57.3	0.0
<i>Ixeris dentata</i>		81.7	0.0	0.0
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)		79.4	14.0	6.7
<i>Sorbus commixta</i> (leaf)		77.5	39.5	8.3
<i>Lespedeza cuneata</i>		76.1	42.1	34.3
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)		66.5	84.9	43.0
<i>Viburnum furcatum</i> (bark)		42.6	13.7	8.2
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (stem)		41.2	10.4	4.0
<i>Rachelospermum asiaticum</i> var. intermedium (leaf)		39.4	17.9	0.0
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (leaf)		35.3	15.2	0.0
<i>Prunus buergeriana</i> (leaf)		35.1	24.2	7.6
<i>Ranunculus japonicus</i>		28.0	25.5	0.8
<i>Scilla scilloides</i>		22.0	14.5	0.0
<i>Houttuynia cordata</i>		17.8	2.3	0.0
<i>Senecio nemorensis</i>		14.0	7.9	0.3
<i>Viburnum furcatum</i> (leaf)		12.9	31.3	34.2
<i>Lotus corniculatus</i> var. japonicus		12.0	4.1	0.0
<i>Aster hayatae</i>		4.2	0.0	0.0
<i>Smilax china</i> L. (fruit)		3.7	0.8	0.3
<i>Rubus crataegifolius</i> (leaf)		3.5	0.0	0.0
<i>Rubus coreanus</i> (leaf,stem)		1.2	0.0	0.0
<i>Maackia fauriei</i> (leaf)		0.0	0.0	0.0
<i>Macrolepiota procera</i>		0.0	0.0	0.0
<i>Erigeron annuus</i>		0.0	0.0	0.0
<i>Melia azedarah</i> var. japonica (root)		0.0	0.0	0.0
<i>Rosa multiflora</i>		0.0	0.0	0.0
<i>Tetragonia tetragonoides</i>		0.0	0.0	0.0
Arbutin		84.1	57.2	0.0

기, 송악(*Hedera rhombea*)-줄기, 금창초(*Ajuga decumbens*), 송악(*Hedera rhombea*)-열매, 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. lilacina), 새끼노루귀(*Hepatica insularis*), 갯기름나무(*Peucedanum japonicum*)-뿌리, 솔비나무(*Maackia fauriei*)-줄기, 담팔수(*Elaeocarpus sylvestris*)-열매, 쯤썸바귀(*Ixeris stolonifera*) 등 11 종의 식물 추출물들이

100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리했을 때 알부틴과 비교해서 유사하거나 높은 멜라닌 합성 저해 효과를 나타내었다(Table 3). 위 결과들을 앞의 tyrosinase 저해 활성 결과와 비교할 때, 산뽕나무-줄기, 금창초, 꿀풀, 담팔수-열매 등의 추출물들은 일치하는 결과를 보였지만, 나머지 7 종의 추출물들은 그렇지 못하였다. 특히, 제주조릿대-뿌리와 쯤썸바

Table 4. Effect of Jeju Island Native Plant Extracts on Cell Viability

Plants	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability		
		100	50	10
<i>Macrolepiota procera</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Tetragonia tetragonoides</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Peucedanum japonicum</i> (root)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Scilla scilloides</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Melia azedarah</i> var. japonica (root)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Viburnum furcatum</i> (bark)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Lotus corniculatus</i> var. japonicus	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Senecio nemorensis</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Prunus buergeriana</i> (leaf)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Ixeris stolonifera</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (stem)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Ranunculus japonicus</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Viburnum furcatum</i> (leaf)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Maackia fauriei</i> (stem)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Hepatica insularis</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Aster hayatae</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Lespedeza cuneata</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Erigeron annuus</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Maackia fauriei</i> (leaf)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Houttuynia cordata</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Prunella vulgaris</i> var. lilacina	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Rachelospermum asiaticum</i> var. intermedium (leaf)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Rosa multiflora</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Rubus crataegifolius</i> (leaf)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Rubus coreanus</i> (leaf,stem)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (leaf)	0.9	1.0	1.0	1.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (root)	0.9	1.0	1.0	1.0
<i>Hedera rhombea</i> (stem)	0.9	1.0	1.0	1.0
<i>Smilax china</i> L. (fruit)	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Morus bombycis</i> (stem)	0.8	1.0	1.0	1.0
<i>Sorbus commixta</i> (leaf)	0.8	1.0	1.0	1.0
<i>Ixeris dentata</i>	0.8	1.0	1.0	1.0
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)	0.8	0.9	0.9	1.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)	0.8	0.9	0.9	1.0
<i>Ajuga decumbens</i>	0.5	0.9	0.9	1.0
<i>Hedera rhombea</i> (fruit)	0.2	0.3	0.3	1.0

귀 추출물의 경우 tyrosinase 저해 활성 효과가 매우 저조하였다. 아마도 이들 추출물들은 멜라닌 생성 초기 단계를 조절하는 tyrosinase의 활성은 억제하지 않지만 그 이후 단계인 DOPAchrome에서 DHICA으로 이어지는 생합성 경로에 관여하는 TRP-2의 활성을 저해할 것으로 예상된다[21].

3.1.3. 세포독성 확인

식물 추출물들의 B16-F1 세포에 대한 독성 여부를 확인하기 위해 MTT 방법을 시행하였다. 이 방법은 살아있는 세포의 미토콘드리아로 유입된 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium이 탈수소 효소작용에 의해 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원되는 특성을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는

Table 5. Effect of Jeju Island Native Plant Extracts on Scavenging DPPH

Plants	Conc. (µg/mL)	DPPH Scavenging (%)		
		10	1.0	0.1
<i>Rubus coreanus</i> (leaf,stem)		26.4	0.7	0.0
<i>Rubus crataegifolius</i> (leaf)		25.2	11.7	6.2
<i>Ixeris dentata</i>		24.9	7.0	4.0
<i>Rosa multiflora</i>		24.0	5.4	5.0
<i>Rachelospermum asiaticum</i> var. <i>intermedium</i> (leaf)		23.8	4.5	0.0
<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>		23.3	0.9	0.0
<i>Houttuynia cordata</i>		23.0	8.0	3.2
<i>Sorbus commixta</i> (leaf)		22.9	1.2	0.0
<i>Hedera rhombea</i> (stem)		21.2	4.3	3.9
<i>Smilax china</i> L. (fruit)		20.1	0.0	0.4
<i>Morus bombycis</i> (leaf)		18.6	2.7	0.0
<i>Maackia fauriei</i> (leaf)		17.7	6.6	4.9
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)		16.9	0.0	0.0
<i>Erigeron annuus</i>		13.1	5.7	4.2
<i>Lespedeza cuneata</i>		11.3	0.0	0.0
<i>Aster hayatae</i>		10.5	0.0	0.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (root)		8.5	0.0	0.0
<i>Hepatica insularis</i>		7.1	0.0	0.0
<i>Maackia fauriei</i> (stem)		4.7	0.0	0.0
<i>Viburnum furcatum</i> (leaf)		4.4	0.0	0.0
<i>Ranunculus japonicus</i>		4.2	0.0	0.0
<i>Ixeris stolonifera</i>		3.6	0.4	0.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (stem)		3.6	0.0	8.7
<i>Prunus buergeriana</i> (leaf)		3.4	0.2	0.3
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)		2.9	0.4	0.0
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (leaf)		2.9	4.4	1.9
<i>Senecio nemorensis</i>		2.5	0.0	0.0
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)		2.1	0.0	0.0
<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>		1.5	0.0	0.0
<i>Viburnum furcatum</i> (bark)		1.3	0.9	0.0
<i>Melia azedarah</i> var. <i>japonica</i> (root)		0.3	0.0	0.0
<i>Hedera rhombea</i> (fruit)		0.0	10.4	2.8
<i>Ajuga decumbens</i>		0.0	1.7	0.0
<i>Scilla scilloides</i>		0.0	0.0	0.0
<i>Tetragonia tetragonoides</i>		0.0	0.0	0.0
<i>Macrolepiota procera</i>		0.0	0.0	0.0

540 nm의 파장에서 최대가 되며, 흡광도가 높을수록 대사가 왕성한 살아있는 세포의 수가 많음을 의미한다. 시료 추출물들을 각각 10, 50, 100 µg/mL의 농도 조건으로 B16-F1 세포에 처리한 후, 세포독성을 조사하였다. 식물 추출물들의 세포독성이 없다는 판단 기준은 cell viability가 다음과 같은 범위 일 때로 정의하였다.

0.9 < cell viability < 1
(cell viability ; sample 처리 군 흡광도 / sample 무 처리군 흡광도)

실험 결과에서 금창초(*Ajuga decumbens*)와 송악(*Hedera rhombea*)-열매 추출물이 가장 높은 세포독성을 나타내었으며, 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄기, 마가목(*Sorbus commixta*)-잎, 씬바귀(*Ixeris dentata*)-전초, 담팔수(*El-*

Table 6. Effect of Jeju Island Native Plant Extracts on Scavenging Intracellular ROS Induced by H₂O₂

Plants	Conc. (μg/mL)	DCF-DA Scavenging (%)		
		10	1	0.1
<i>Hedera rhombea</i> (stem)		78.6	49.3	36.0
<i>Rachelospermum asiaticum</i> var. <i>intermedium</i> (leaf)		76.3	36.2	23.3
<i>Morus bombycis</i> (stem)		74.4	16.7	12.9
<i>Rosa multiflora</i>		74.0	52.8	46.5
<i>Aster hayatae</i>		70.7	56.1	54.3
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)		70.7	0.5	11.9
<i>Sorbus commixta</i> (leaf)		68.8	25.4	13.0
<i>Rubus crataegifolius</i> (leaf)		68.4	41.9	31.4
<i>Ixeris stolonifera</i>		68.3	53.0	41.2
<i>Houttuynia cordata</i>		68.3	8.6	0.0
<i>Rubus coreanus</i> (leaf,stem)		66.1	43.6	29.6
<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>		63.2	19.9	28.0
<i>Ixeris dentata</i>		61.0	22.1	11.8
<i>Macrolepiota procera</i>		60.7	38.0	38.1
<i>Ranunculus japonicus</i>		60.3	53.6	54.1
<i>Maackia fauriei</i> (leaf)		57.0	32.3	14.5
<i>Smilax china</i> L. (fruit)		51.3	21.6	22.1
<i>Lespedeza cuneata</i>		50.1	22.3	11.5
<i>Hepatica insularis</i>		49.7	17.8	10.4
<i>Hedera rhombea</i> (fruit)		48.5	18.1	31.1
<i>Erigeron annuus</i>		44.3	31.6	20.6
<i>Ajuga decumbens</i>		43.0	22.8	20.2
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (root)		40.9	7.4	3.9
<i>Tetragonia tetragonooides</i>		39.9	25.3	16.2
<i>Melia azedarah</i> var. <i>japonica</i> (root)		38.9	0.0	0.0
<i>Prunus buergeriana</i> (leaf)		35.9	27.8	19.3
<i>Senecio nemorensis</i>		34.6	16.9	20.9
<i>Viburnum furcatum</i> (bark)		31.9	0.0	8.2
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (stem)		30.3	0.0	30.6
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (leaf)		28.3	14.1	2.5
<i>Viburnum furcatum</i> (leaf)		26.6	0.9	24.2
<i>Scilla scilloides</i>		23.6	2.7	0.0
<i>Maackia fauriei</i> (stem)		16.7	0.0	0.0
<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>		14.4	0.0	0.0
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)		12.2	0.0	0.0
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)		5.5	9.2	0.0
<i>Peucedanum japonicum</i> (root)		2.0	0.0	0.0

aeocarpus sylvestris)-열매, 제주조릿대(*Sasa guelpaertensis* Nakai)-잎 추출물들에서는 약간의 세포독성을 확인할 수 있었다. 그 외에 다른 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Table 4). 이러한 결과에서 금창초와 송악-열매 추출물의 높은 멜라닌 합성 저해 효과는 이들 추출물들의 세포독성 작용으로 인하여 기인되었음을 알 수 있었다.

3.2. 후보 시료 추출물의 항산화 효능 평가

식물 추출물들의 항산화 능력을 조사하기 위하여 DPPH에 의한 전자공여능 확인실험을 우선적으로 수행하였다. 각각의 식물 추출물들을 0.1, 1, 10 μg/mL의 농도로 처리했을 때, 대체적으로 DPPH radical 소거 능력에 의한 항산화 활성은 낮은 수치로 나타났다(Table 5). 하지만 식물 추출물들의 항산화 능력을 비교 평가하는 것은 가능

Table 7. Safety Evaluation of *Maackia fauriei* Extract by Toxicity Test Using Rabbits

Plants	Site	Grade	Normal skin					Abrasion				
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<i>Maackia fauriei</i> (stem)	24 h		4	0	0	0	0	4	0	0	0	0
	72 h		4	0	0	0	0	4	0	0	0	0

(Grade : 0-no redness, 1-slight redness, 2-mild redness, 3-severe redness, 4-very severe redness)

Table 8. Safety Evaluation of Selected Plant Extracts by Human Skin Patch Test

Plants	No. of Responder	48 h			72 h			Reaction grade		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	48 h	72 h	Mean
<i>Lespedeza cuneata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morus bombycis</i> (stem)	1	0	0	0	1	0	0	0	0.8	0.4
<i>Smilax china</i> L. (fruit)	2	0	1	0	2	0	0	1.7	1.7	1.7
<i>Sasa guelpaertensis</i> Nakai (leaf)	3	0	1	0	3	0	0	1.7	2.5	2.1
<i>Ligustrum lucidum</i> Rubus (stem)	3	1	1	0	2	0	0	2.5	1.7	2.1
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> (fruit)	3	0	0	0	3	0	0	0	2.5	1.3
<i>Peucedanum japonicum</i> (root)	4	2	0	0	2	0	0	1.7	1.7	1.7

하였다. 다음 단계로 H₂O₂에 의한 산화 스트레스를 받은 V79-4 폐 섬유아세포 배양에 식물 추출물들을 0.1, 1, 10 µg/mL의 농도로 처리한 후, DCF-DA를 이용하여 이들 추출물들의 활성 산소종 소거능력을 조사하였다. 실험결과에서 송악(*Hedera rhombea*)-줄기, 마삭줄(*Rachelospermum asiaticum* var. *intermedium*)-잎, 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄기, 찔레꽃(*Rosa multiflora*), 눈개쭈부쟁이(*Aster hayatae*), 제주광나무(*Ligustrum lucidum* Rubus)-줄기, 마가목(*Sorbus commixta*)-잎, 산딸기(*Rubus crataegifolius*)-잎, 쯤썸바귀(*Ixeris stolonifera*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 복분자딸기(*Rubus coreanus*)-잎, 줄기, 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina*), 썸바귀(*Ixeris dentata*), 큰갓버섯(*Macrospora procera*), 미나리아재비(*Ranunculus japonicus*), 솔비나무(*Maackia fauriei*)-잎, 청미래덩굴(*Smilax china* L.)-열매, 비수리(*Lespedeza cuneata*) 등 총 18 종의 추출물들이 10 µg/mL 농도로 처리했을 때 50% 이상의 활성 산소종 소거능을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 6). DPPH 라디칼 소거능에서 비교적 높은 항산화 효과를 나타낸 식물들이 V79-4 폐 섬유아세포 내에서의 활성 산소종 소거능을 측정할 결과에서도 높은 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서

위의 두 가지 방법을 항산화 능력 평가에 동시에 적용하는 것은 그 결과들에 대한 신뢰도를 더욱 높일 수 있을 것이다. 항산화 능력이 두 가지 방법에서 모두 우수했던 송악-줄기, 마삭줄-잎, 산뽕나무-줄기, 찔레꽃, 마가목-잎, 산딸기-잎, 어성초, 복분자딸기-잎 및 줄기, 꿀풀, 썸바귀 등의 추출물들은 노화를 억제하는 기능성 화장품 원료로 개발이 가능할 것이다.

3.3. 후보 시료 추출물의 안전성 시험

식물 추출물들의 안전성 조사를 위하여 토끼를 이용한 국소 독성 임상 시험과 인체 피부 일차 자극 임상 시험을 수행하였다. 각 추출물들 중 tyrosinase 활성저해 효과와 B16-F1 melanoma내의 멜라닌 생성 억제 확인 실험에서 높은 효과를 나타낸 식물 추출물들을 선발하여 안전성 시험을 수행하였다. 솔비나무(*Maackia fauriei*)-줄기 추출물에 대하여 토끼를 이용한 국소 독성 시험을 수행하였다. 자극성 판정 시험 결과 솔비나무-줄기 추출물의 경우 정상비부와 상처부위에서의 테스트 결과들 모두 비자극성을 나타내었다(Table 7). 한편, 갯기름나무(*Peucedanum japonicum*)-뿌리, 제주조릿대(*Sasa guelpaertensis* Nakai)-잎, 비수리(*Lespedeza cuneata*), 제주광나무(*Lig-*

ustrum lucidum Rubus)-줄기, 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄기, 청미래덩굴(*Smilax china* L.)-열매, 담팔수(*Elaeocarpus sylvestris*)-열매 등의 추출물들에 대하여 인체 피부 일차 자극 임상 시험을 수행하였다. 청미래덩굴-열매, 제주조릿대-잎, 제주광나무-줄기, 담팔수-열매, 갯기름나무-뿌리 등의 추출물들에서 2명 내지는 4명에게서 1+grade (slight erythema, either spotty or diffuse)의 피부반응이 관찰되었다. 그리고 비수리 추출물에서는 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다(Table 8). 3명 이상의 피부 반응이 관찰되었던 식물 추출물들에서 미백 활성 성분은 정제 과정을 통하여 세포독성 성분의 농도가 완화된다면, 미백 화장품 원료화가 가능할 것이다. 또한, 높은 미백 효능과 인체 피부에도 자극이 없는 산뽕나무(*Morus bombycis*)-줄기 추출물의 경우 가장 우수한 기능성 미백 화장품 원료화의 잠재성이 있다고 판단된다.

4. 결 론

제주도 자생 식물 37종을 대상으로 미백 및 항산화 효능을 조사하였다. Tyrosinase 저해 활성 효과를 조사한 결과, 양성대조군인 알부틴 보다 우수했던 식물 추출물들은 산뽕나무-줄기, 청미래덩굴-열매, 비수리, 제주조릿대-잎, 솔비나무-잎, 금창초, 마삭줄-잎, 제주조릿대-줄기, 제주광나무-줄기, 꿀풀, 담팔수-열매 등으로 나타났다. 또한, 제주조릿대-뿌리, 산뽕나무-줄기, 송악-줄기, 금창초, 송악-열매, 꿀풀, 새끼노루귀, 갯기름나무-뿌리, 솔비나무-줄기, 담팔수-열매, 좁쌀바귀 등의 추출물들 역시 B16-F1 세포의 멜라닌 생성 억제 효과가 알부틴보다 우수하거나 대등한 것으로 나타났다. 산뽕나무-줄기, 금창초, 꿀풀, 담팔수-열매 등의 추출물들은 두 종류의 미백 효능실험 결과에서 일치하였지만, 나머지 추출물들은 그렇지 못하였다. 특히, 제주조릿대-뿌리와 좁쌀바귀 추출물의 경우 tyrosinase 저해 활성 효과가 매우 저조하였는데, 아마도 이들 추출물들은 멜라닌 생성 초기 단계를 조절하는 tyrosinase의 활성을 억제하지 않지만 그 이후 단계인 DOPAchrome에서 DHICA으로 이어지는 생합성 경로에 관여하는 TRP-2의 활성을 저해할 것으로 예상할 수 있었다. 식물 추출물들의 세포독성을 조사하기 위한 MTT assay 실험 결과에서는 금창초와 송악-열매 추출물의 높은 멜라닌 합성 저해 효과가 이들 추출물들의 세포독성 작용으로 인하여 기인되었음을 알 수 있었다. 한편, DPPH 라디칼 소거능에서 비교적 높은 항산화 효과를 나타낸 식물 추출물들이 V79-4 폐 섬유아세포 내에서의 활성 산소종 소거능을 측정한 결과에서도 높은 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다. 항산화 능력이 두 가지 방법에서 모두 우수했던 송악-줄기, 마삭줄-잎, 산뽕나무

-줄기, 찔레꽃, 마가목-잎, 산딸기-잎, 어성초, 복분자딸기-잎 및 줄기, 꿀풀, 씀바귀 등의 추출물들은 항노화 기능성 화장품 원료로 개발이 가능할 것이다.

이와 같은 결과들에서 산뽕나무-줄기, 제주광나무-줄기, 꿀풀, 비수리 등의 추출물들은 미백과 항산화 효능 모두 우수함을 확인하였다. 그리고 미백 효능과 항산화 효능이 우수하면서 인체 피부 일차 자극 임상 시험에서도 자극이 없었던 산뽕나무-줄기 추출물의 경우 매우 우수한 기능성 미백 화장품 원료로 개발될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구 논문은 산업자원부 “지역산업중점기술개발”에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며(과제번호 : IH-9-12-10018193), 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Iwata, T. Corn, S. Iwata, M. Evertte, and B. B. Fuller, The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins, *J. Invest. Dermatol.*, **195**, 9 (1990).
2. K. Maeda and M. Fkuda, Mechanism of its depigmentation in human melanocyte culture, *American Soc. Pharm. Exp. Therapeutics*, **276**(2), 765 (1996).
3. K. Maeda and M. Fkuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
4. 박수남, 천연물의 피부세포에 미치는 영향, *대한화장품학회지*, **25**(1) (1999).
5. C. Koide, M. Senoo, and I. Hoshino, Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid-glabridin(oil soluble licorice extract) composite, *Fragrance J.*, **25**(9), 43 (1997).
6. S. Marklund and G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469 (1974).
7. A. L. Branen, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxytoluene, *J. AM. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1975).
8. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).

9. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi and H. Sakurai, Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
10. S. T. Omaye, K. A. Reddy, and C. E. Cross, Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism, *J. Toxicol. Environ. Health*, **3**, 829 (1977).
11. R. Lutan and D. Lutan, Stimulation of melanogenesis in a human melanoma cell line by retinoids, *Cancer Res.*, **40**, 3345 (1980).
12. S. K. Khan, R. Agarwal and H. Mukhtar, Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate tumor promotion in 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-initiated SENCER mouse skin by a polyphenolic fraction isolated from green tea., *Cancer Res.* **52**, 6890 (1992).
13. 안명수, 원종숙, 솔잎추출물의 옥배유에 대한 항산화 효과, *성신여대 생활문화연구*, 83 (2001).
14. 김보건, 제주자생 약용식물의 활성 및 성분에 관한 조사 연구, 제주대학교 교육대학원 석사학위논문 (2002).
15. 김문홍, 제주식물도감, 제주도인쇄협동조합 (1992).
16. P. Bernard, N. Burine, E. Arnoult, T. Scior, and Q. T. Do, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *J. Ethnopharmacology*, **82**, 155 (2002).
17. 김정호, HS-시리즈의 미백 효과와 tyrosinase의 활성 저해 연구, 부산대학교 대학원 석사 학위 논문 (2005).
18. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
19. S. F. Lo, S. M. Mulabagal, S. Matthew, C. L. Chen, C. L. Kuo, and H. S. Tsay, *In vitro* propagation by asymbiotic seed germination and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity studies on tissue culture raised plants of three medicinally important species of Dendrobium, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 731 (2004).
20. A. R. Rosenkranz, S. Schmaldienst, K. M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G. J. Zlabinger, A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',6'-dichlorofluorescein-diacetate, *J. Immunol. Methods*, **156**, 39 (1992).
21. 김원희, 천연식물 추출물의 멜라닌 생성 저해에 관한 연구, 덕성여자대학교 대학원 석사학위 논문, 45 (2003).