

## 광곽향 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

배성윤<sup>†</sup> · 이응지 · 손락호 · 이용화

정산생명공학(주) 중앙연구소

(2008년 12월 26일 접수, 2009년 2월 20일 수정, 2009년 2월 24일 채택)

### The Inhibitory Effects of *Pogostemon cablin* Bentham Extract on Melanogenesis

Seong Yun Bae<sup>†</sup>, Eung ji Lee, Rak Ho Son, and Yong Hwa Lee

R&D Center, Jung San Biotechnology, 61, Dukjeul-ri, Jeongnam-myun, Whasoung-si, Kyunggi-do 445-964, Korea

(Received December 26, 2008; Revised February 20, 2009; Accepted February 24, 2009)

**요약:** 본 연구는 천연 미백소재 개발을 위하여 광곽향 추출물과 광곽향 추출물에서 분리한 활성물질의 멜라닌 생성에 연관된 생리활성을 분석하였다. 광곽향 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하에서 세포 독성이 없는 것으로 확인되었으며 free radical 소거능(DPPH)과 superoxide radical 소거능 결과는 각각  $\text{IC}_{50} = 24.2 \pm 2.85 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{IC}_{50} = 118 \pm 0.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었다. B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성 저해 효과는 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 광곽향 추출물을 72 h 동안 처리한 세포에서 멜라닌 억제율이 23 %로 나타났으며, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 세포 내 tyrosinase의 활성을 18 % 저해하였다. 이러한 광곽향 추출물의 활성물질을 분리하여  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Mass analysis 등의 기기분석을 실시한 결과 sesquiterpene 계열의 활성물질인 patchouli alcohol로 동정되었고, patchouli alcohol의 free radical 소거능과 superoxide radical 소거능 결과는 각각  $\text{IC}_{50} = 3.14 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{IC}_{50} = 49 \pm 3.24 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었다. 또한 멜라닌 저해효과를 확인한 결과  $\text{IC}_{50} = 3.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타났으며, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 세포 내 tyrosinase의 활성을 40 % 저해하였다. Western blot을 이용하여 tyrosinase와 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 단백질의 발현 감소를 확인하였다. 그러므로 광곽향 추출물과 patchouli alcohol은 우수한 미백 효능을 갖는 화장품 소재로서 개발 가능성이 클 것으로 기대된다.

**Abstract:** To develop a new natural whitening agent for cosmetics, we investigated the inhibitory effects of *Pogostemon cablin* Bentham extracts (PCE) and its active component on melanogenesis. PCE showed ROS scavenging activities in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and xanthine/xanthine oxidase system with the  $\text{IC}_{50}$  values of  $24.2 \pm 2.85 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\text{IC}_{50} = 118 \pm 0.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. PCE reduced melanin contents of B16 melanoma cells in a dose-dependant manner and decreased to about 23 % at a concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  without cell cytotoxicity (below 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). And the PCE reduced intracellular tyrosinase activity about 18 % at concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We purified one active compound from PCE and identified its structure. It was identified as patchouli alcohol, sesquiterpene family, by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , and Mass analysis. Patchouli alcohol also inhibited ROS scavenging activities in DPPH radical and xanthine/xanthine oxidase system with the  $\text{IC}_{50}$  values of  $3.14 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $49 \pm 3.24 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Patchouli alcohol inhibited melanin synthesis in a dose dependent manner ( $\text{IC}_{50} = 3.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). And the patchouli alcohol reduced intracellular tyrosinase activity about 40 % at concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Patchouli alcohol inhibited tyrosinase and TRP-2 expression at protein level. These results suggest that PCE and patchouli alcohol reduced melanin formation by the inhibited of tyrosinase activity and expression in B16 melanoma cells. Therefore, we suggest that PCE could be used as a useful whitening agent.

**Keywords:** melanogenesis, *Pogostemon cablin* Bentham, whitening, tyrosinase, patchouli alcohol

## 1. 서 론

인간의 피부색은 피부 내부의 멜라닌 색소의 농도 및

분포에 따라 결정된다. 정상 상태에서는 멜라닌의 과다 생성이 일어나지 않지만, 피부가 자외선, 환경오염, 스트레스 등과 같은 외부 자극이나 호르몬, 염증 유발인자 등과 같은 내적 요인에 대해 반응하면 멜라닌 색소가 과다

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: svera@naver.com)

생성되고, 정상적으로 피부로부터 배출되지 못하고 피부에 축적될 경우 색소 침착이 유발된다[1,2].

멜라닌 생합성은 멜라닌 세포의 멜라노솜에서 합성되며, 멜라노솜에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등이 있다 [3]. 이들 중 tyrosinase는 멜라닌 형성 과정의 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성화와 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. DCT는 초기에는 TRP-2로 불리었던 효소로서 DOPACHROME을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 멜라닌 합성에 필요하며, TRP-1과 TRP-2는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[4].

본 연구에서는 광곽향(*Pogostemon cablin* Bentham) 추출물과 생리활성 물질인 patchouli alcohol의 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성을 검토하기 위해 미백효과 등을 평가하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 광곽향(*Pogostemon cablin* B.)은 국내 약초시장인 경동시장에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma (USA) 제품으로 사용하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin은 Lonza (Switzerland) 제품을 사용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2,  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 B16/F10 세포는 American type cell collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 evaporator (EYELA, Japan), microplate reader (Bio-Rad, Japan), NMR은 Inova 500NB spectrometer (Varian, Australia), GC/MS은 Hewlett Packard model 5890/6987X (USA)를 사용하였다.

### 2.2. 시료 추출물의 제조

그늘진 곳에서 건조한 광곽향 1 kg을 분쇄하여 3차 증

류수 6 L을 가하고 100 °C에서 24 h 동안 가열한 후 정유층을 얻었다. 이 추출물을 물과 헥산에 넣어 녹인 후 3회 반복 분배 추출하였다. 얻은 헥산 층을 진공 건조하여 약 30 g의 추출물을 얻었다.

### 2.3. 유효성분의 분리 및 정제

Hexane-EtOAc을 용리액으로 사용하여 활성에 효과가 있는 분획을 실리카겔 컬럼, C<sub>18</sub>-resin을 이용한 역상 컬럼 크로마토그래피 등을 실시하여 활성 물질을 얻었다

### 2.4. 항산화효과 평가

#### 2.4.1. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 자유라디칼 소거효과 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거 활성 효과는 Bios와 Kim 등의 방법을 약간 변형하여 수행하였다[5,6]. 96-well plates에 메탄올에 용해시킨 0.4 mM의 DPPH 용액 100  $\mu$ L을 넣고 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 100  $\mu$ L를 첨가하여 vortex mixer로 균일하게 혼합하고, 실온의 암실에서 30 min 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 하기의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = (\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

#### 2.4.2. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 활성산소 소거효과 측정

Xanthine/xanthine oxidase (Sigma, USA) 효소반응에 의한 활성산소 소거활성 평가는 Noro 등의 방법을 변형하여 수행하였다[7]. 활성산소에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, USA)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다.

0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma, USA), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15 % bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 20 min 동안 반응시킨 후에 6 mM CuCl<sub>2</sub> (Sigma, USA)를 넣어 반응을 정지시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣었으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 소거율은 DPPH 라디칼 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였다.

## 2.5. 미백효과평가

### 2.5.1. 세포배양

Mouse melanoma cell line B16/F10 melanoma 세포는 ATCC에서 구입하여 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 DMEM 배지는 10 % FBS, 1 % penicillin streptomycin 을 혼합하여 사용하였고, 배양기에서 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### 2.5.2. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 세포 생존에 미치는 영향

본 실험에서 B16 melanoma 세포에 대한 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다[8]. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 포마잔으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 포마잔의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

B16 melanoma 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well로 96-well plates에 분주한 세포에 농도별로 시료를 처리하여 배양기에서 37 °C, 5 %, CO<sub>2</sub> 조건으로 72 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 20  $\mu$ L을 첨가하고 4 h 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 200  $\mu$ L dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)을 첨가하여 microplate reader (Bio-Rad, Model 550)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

### 2.5.3. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 멜라닌 생성 억제 효과

Melanin 함량 측정은 Yasunobu 방법을 변형하여 사용하였다[9]. B16 melanoma 세포를 24-well plates에  $4 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 배양한 후  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)와 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)가 있는 배지조건에 시료를 농도별로 처리하고 배양기에서 72 h 동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 양성 대조군으로는 알부틴을 사용하였다. Trypsinization으로 얻은 pellet에 10 % DMSO와 1 N

NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시키고, microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.5.4. 세포 내 Tyrosinase 활성 측정

세포 내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelek와 Pomerantz 방법을 변형하여 사용하였다[10,11]. 세포 내 tyrosinase 활성 분석은 세포 내에 존재하는 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPAquinone의 비색법에 의해 측정하였다. B16 melanoma 세포를 6-well plates에  $5 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 배양기에서 5 h 동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 72 h 동안 배양 후 trypsinization으로 얻은 pellet을 Triton X-100이 포함된 PBS 용액으로 용해시켰다. 동량의 단백질 각각에 10 mM L-DOPA가 첨가된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합한 후, 37 °C 항온기에서 20 min 동안 배양시키고, microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

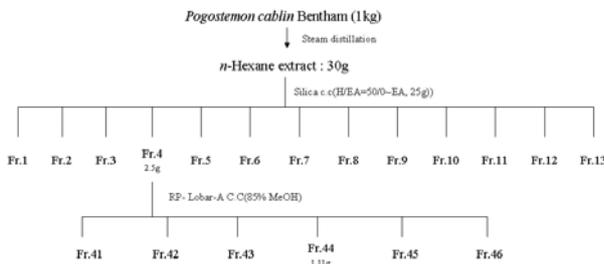
### 2.5.5. Western blot Analysis

시료를 72 h 동안 처리한 B16 melanoma 세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 7.5 % SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5 % skim milk가 함유된 tris 완충용액에서 1 h blocking 과정을 거친 후, tyrosinase (sc-7833), TRP-1 (sc-10443), TRP-2 (sc-10452),  $\beta$ -actin (sc-47778) 항체와 각각 반응시켰다. Horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 항체를 가하고 enhanced chemiluminescent (ECL, Amersham, UK) kit을 사용하여 1 ~ 3 min 동안 반응시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

### 2.5.6. 피부안전성 시험

광곽향 추출물에 대한 피부 안전성 즉, 피부 반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 인체 첩포 시험을 실시하였다.

평소 피부 질환 및 알러지가 없는 10명의 피험자를 대상으로 실시하였으며, 연령분포는 22 ~ 35세, 평균 27세였다. 우선, 첩포 부위인 전박을 70 % 에탄올로 세척한 후, 시험물질이 적용된 finn chamber를 시험부위에 첩포 하였



**Figure 1.** Isolation procedure of active compound of *Pogostemon cablin* Bentham.

다. 첩포는 48 h 동안 도포하며, 첩포를 제거한 후에는 피부 marker로 시험부위를 표시하고 30 min, 24 h, 48 h에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) 가이드라인에서 제시한 판정기준에 따랐으며, 피부반응도의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{피부반응도}(\%) = \frac{\sum (\text{가중치} \times \text{반응인원수})}{4(\text{최대가중치}) \times n (\text{전체인원수})} \times 100 \times 0.5$$

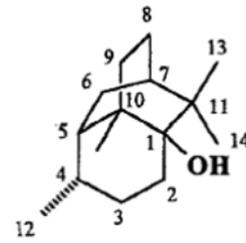
## 2.6. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 광곽향 추출물의 유효성분 정제

세절한 광곽향 1 kg을 3차 증류수 6 L에 넣은 후 약 100 °C, 24 h 동안 추출하여 정유 성분을 포함한 증류수를 얻어 *n*-hexane 800 mL을 가하여 분획을 하여 *n*-hexane 층을 획득한 후 감압 농축하여 정유 성분 약 30 g을 얻었다. *n*-hexane 분획물 25 g을 *n*-hexane-EtOAc (50 : 1에서 0 : 100까지의 농도구배)의 유출 용매로 SiO<sub>2</sub> gel column chromatography를 실시하여 13개의 분획(Fr.1 ~ Fr.13)으로 나누었다. 이중 멜라닌 생성 억제 활성을 평가하여 그 활성이 가장 높은 Fr.4 분획물을 확인하였다. 이 Fr.4분획 2.5 g을 RP Lobar-A column (85 % 메탄올)로 정제하여 6개의 분획(Fr.41 ~ Fr.46)으로 나누었다(Figure 1). 그 중 활성이 가장 우수한 정유 상태의 Fr.44 화합물 약 1.11 g을 얻었다. 이를 기기분석을 실시하였다. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz)  $\delta$  : 1.07 (3H, s), 1.08 (3H,



**Figure 2.** Chemical structure of a patchouli alcohol isolated from *Pogostemon cablin* Bentham.

**Table 1.** Anti-oxidative Activity of *Pogostemon cablin* Bentham Extracts (PCE) and Patchouli Alcohol

Material	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	DPPH assay	NBT assay
PCE	24.20 $\pm$ 2.85	118 $\pm$ 0.43
Patchouli alcohol	3.14 $\pm$ 0.12	49 $\pm$ 3.24
L-Ascorbic acid <sup>a)</sup>	4.40 $\pm$ 0.29	64 $\pm$ 1.38

<sup>a)</sup>Standard antioxidant.

s), 0.85 (3H, s), 0.80 (3H, d, *J* = 6.8Hz), <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz)  $\delta$  : 75.8, 32.9, 28.8, 28.3, 43.8, 24.5, 39.3, 24.8, 29.0, 37.8, 40.3, 27.0, 24.5, 20.8, 18.8, GC-MS *m/z* : 222 [M]<sup>+</sup> 데이터를 확인한 결과 patchouli alcohol로 동정되었다(Figure 2)[12].

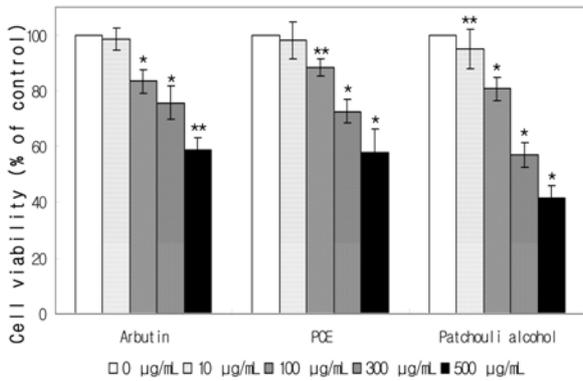
### 3.2. 항산화효과

#### 3.2.1. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 자유라디칼 소거효과

광곽향 추출물과 활성성분인 patchouli alcohol의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성대조군으로는 항산화 효과가 알려진 ascorbic acid를 이용하여 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 free radical을 50 % 소거할 수 있는 농도 (IC<sub>50</sub>)가 광곽향 추출물은 24.20  $\pm$  2.85 μg/mL, patchouli alcohol은 3.14  $\pm$  0.12 μg/mL, ascorbic acid는 4.40  $\pm$  0.29 μg/mL로 광곽향 추출물은 ascorbic acid에 비해 낮은 소거 효과를 보였지만 patchouli alcohol은 ascorbic acid 보다 1.4배 소거효과를 나타내었다(Table 1).

#### 3.2.2. 광곽향 추출물 및 Patchouli Alcohol의 활성산소 소거효과

Superoxide anion radical 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를



**Figure 3.** Cell viability of *Pogostemon cablin* Bentham extract (PCE) and patchouli alcohol on B16/F10 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of samples for 72 h. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.1$  compared with control.

이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 이용하였으며, IC<sub>50</sub>의 농도는 광곽향 추출물은 118 ± 0.43 µg/mL, patchouli alcohol은 49 ± 3.24 µg/mL, ascorbic acid은 64 ± 1.38 µg/mL로 측정되었다(Table 1). 광곽향 추출물은 ascorbic acid보다 약한 효과를 보였지만 patchouli alcohol은 ascorbic acid와 유사한 reactive oxygen 소거효과를 나타내었다.

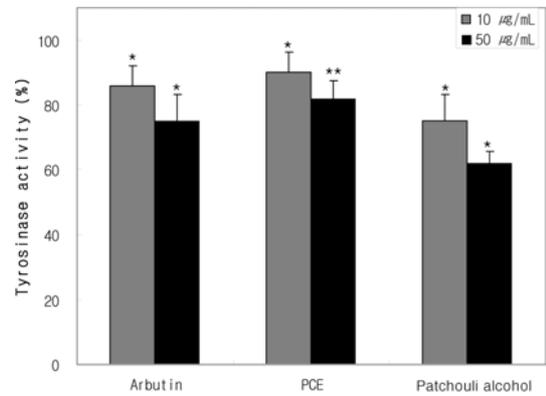
### 3.3. 미백효과

#### 3.3.1. 광곽향 추출물과 Patchouli Alcohol의 세포 생존에 미치는 영향

광곽향 추출물과 patchouli alcohol의 세포 독성측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 100 µg/mL 이하의 농도로 처리 시 광곽향 추출물은 세포생존율이 90 % 이상, patchouli alcohol은 80 % 이상으로 나타났지만, 100 µg/mL 이상의 농도로 각각 처리 시 광곽향 추출물과 patchouli alcohol 처리군들은 세포독성으로 인해 급격히 생존율이 저하되었다(Figure 3).

#### 3.3.2. 광곽향 추출물과 Patchouli Alcohol의 세포 내 Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절단계에 관여하는 효소이



**Figure 4.** Effects of *Pogostemon cablin* Bentham extracts (PCE) and patchouli alcohol on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. B16/F10 melanoma cells were treated with arbutin, PCE and patchouli alcohol for 72 h at 10, 50 µg/mL, respectively. The lysates of the cells containing tyrosinase were incubated with DOPA for 30 min. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.1$  compared with control.

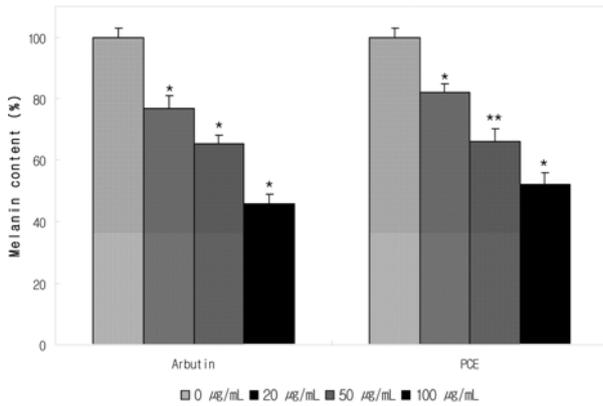
다. 광곽향 추출물과 patchouli alcohol을 각각 50 µg/mL 농도로 처리한 실험군에서 18 %, 38 % 가량의 세포 내 tyrosinase 활성 저해 효과가 있는 것으로 나타났다 (Figure 4).

#### 3.3.3. 광곽향 추출물 멜라닌 생성 억제 효과

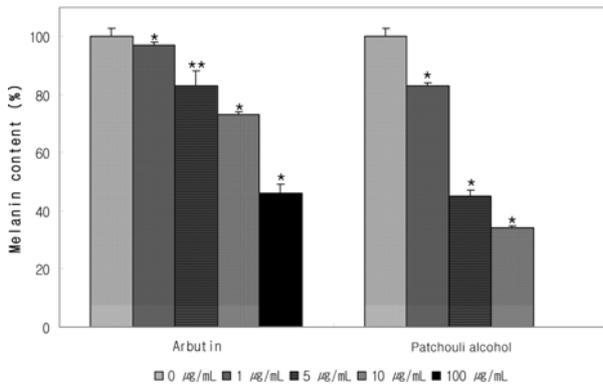
광곽향 추출물과 patchouli alcohol이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 양을 측정하였다. 광곽향 추출물을 0, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정할 결과, 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Figure 5). 또한 Patchouli alcohol을 0, 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정할 결과, 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Figure 6).

#### 3.3.4. Patchouli Alcohol의 Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 단백질 발현 저해 효과

Patchouli alcohol의 멜라닌 생성 저해효과가 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 합성효소의 발현억제와 관련된 영향인지 알아보기 위하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과 patchouli alcohol은 tyrosinase, TRP-2의 발현을 저해하는 것으로 나타났다 (Figure 7). 따라서 patchouli alcohol은 멜라닌 생합성 경로에서 초기에 관여하는 tyrosinase와 TRP-2 발현량을



**Figure 5.** Inhibitory effect of *Pogostemon cablin* Benthham extracts (PCE) on melanin production in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of samples for 72 h, melanin contents were measured at 405 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.1$  compared with control.

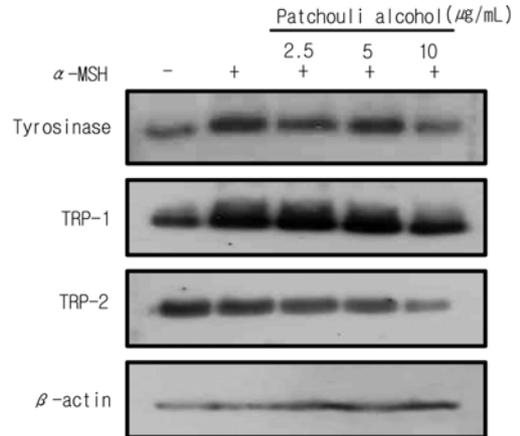


**Figure 6.** Inhibitory effect of patchouli alcohol on melanin production in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of samples for 72 h, melanin contents were measured at 405 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.1$  compared with control.

감소시킴으로써 멜라닌 생성량을 감소시키는 것으로 판단되며, 멜라닌 형성세포의 멜라닌 생성에 관여하는 세포 신호 전달이나 유전자 수준에서도 조절되는 것을 의미하며 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

### 3.4. 피부자극 평가

피험자 10명에 대하여 실시한 인체 첩포 시험의 검사 결과에 근거하여 48 h 및 72 h 동안 평균 반응도를 비교하였으며, 이를 기준으로 하여 그 결과를 판정한 결과, 광곽향 추출물 1 %에 대한 피부반응도는 0으로 대조군



**Figure 7.** The effect of patchouli alcohol on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of patchouli alcohol (2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72 h.

과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다. 이는 세포독성과 같이 종합해 볼 때, 독성이 거의 존재하지 않는 안전한 소재임을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 광곽향 추출물과 그의 활성물질인 patchouli alcohol의 항산화 효과와 B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성 저해 효능 평가를 통하여 미백효과에 대한 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. 광곽향 추출물의 DPPH와 superoxide anion radical 소거 효과는 농도 의존적으로 증가하여, 각각  $IC_{50}$  값이  $24.2 \pm 2.85 \mu\text{g/mL}$ ,  $118 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$ 로 항산화 효과를 나타내었으며, 특히 활성물질인 patchouli alcohol은 각각  $IC_{50}$  값이  $3.14 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ,  $49 \pm 3.24 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 우수한 항산화 효과를 보여주었다. B16 melanoma 세포에서는 광곽향 추출물과 patchouli alcohol 모두 농도 의존적으로 멜라닌 생합성이 감소하였으며, 세포 내 tyrosinase의 활성화에 대해서는 patchouli alcohol이 알부틴보다 높은 저해율을 나타냈다. 또한 patchouli alcohol의 멜라닌 생합성 저해 기전을 검정하기 위하여 tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2의 단백질 발현량을 Western blot을 이용하여 측정된 결과 tyrosinase 및 TRP-2의 단백질 발현량이 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 광곽향 추출물의 유효 성분인 patchouli alcohol은 멜라닌 생합성의 초기에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성화 및 발현을 억제함으로

써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 사료된다. 또한 멜라닌 생성에 관련된 세포신호전달 경로를 저해함으로써 tyrosinase 및 TRP-2 등의 멜라닌 생성에 필요한 효소경로를 저해하는 것으로 보이므로, 미백용도의 기능성 원료로서 큰 기능을 가지고 있는 것으로 판단된다. 향후 이 소재에 대한 추가적인 실험으로는 인체실험을 진행함으로써 피부에서의 안정성을 검증할 예정이며, 안정성 외에 광곽향 추출물 함유 제품에 대한 피부 미백효능 평가도 진행될 예정이다.

## 참 고 문 헌

1. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged sword, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
2. A. J. Kanwar, S. Dhar, and S. Kaur, Treatment of melasma with potent topical corticosteroids, *Dermatology*, **188**, 170 (1994).
3. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141 (1987).
4. T. Kobayashi, K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia-Borrón, and V. J. Hearing, Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis, *EMBO J.*, **13**, 5818 (1994).
5. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
6. H. W. Kim, S. J. Cho, B. Y. Kim, S. I. Cho, and Y. K. Kim, *Pogostemon cablin* as ROS scavenger in oxidant-induced cell death of human neuroglioma cells, *Evid Based Complement Alternat. Med.*, **1**(7), 1/9 (2008).
7. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **3984** (1983).
8. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65** (1983).
9. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS*, **6th**, 69 (2003).
10. J. Pawelk, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
11. S. H. Pomerantz, Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2351 (1963).
12. S. P. Bhatia, C. S. Letizia, and A. M. Api, Fragrance material review on patchouli alcohol, *Food chem. Toxicol.*, **46**, S255 (2008).