

## Biochanin A의 미백 효과에 관한 연구

박성하<sup>†</sup> · 김아현 · 박병준 · 김진준

한국콜마(주) 소재연구소

(2013년 6월 25일 접수, 2013년 7월 12일 수정, 2013년 10월 11일 채택)

### Whitening Effect of Biochanin A

Sung Ha Park<sup>†</sup>, A Hyun Kim, Byoung Jun Park, and Jin Jun Kim

Bio Materials R&D center, Kolmar Korea, CBTP, Future Convergent Tch Center, Room 406, 685-3,  
Yangcheong-ri, Ochang-eup, Cheongwon-gun, Chungbuk

(Received June 25, 2013; Revised July 12, 2013; Accepted October 11, 2013)

**요약:** 본 연구는 미백 소재 개발을 위하여 강진향(*Dalbergia odorifera* T. Chen) 추출물에서 분리한 활성물질인 biochanin A의 멜라닌 생성에 연관된 효과를 알아보았다. Biochanin A는 B16F1 melanoma 세포에서 농도 의존적으로 멜라닌 양을 억제하였으며, 멜라닌 생합성 저해 효과는 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 멜라닌 생성 억제가 48%로 나타났다. Western blot을 이용하여 microphthalmia associated transcription factor (MITF), Tyrosinase, Trp-1와 Trp-2의 발현을 억제함을 확인하였다. 따라서 biochanin A는 미백 효능을 갖는 화장품 소재로서의 개발 가능성이 클 것으로 기대된다.

**Abstract:** To develop a new whitening agent for cosmetics, we investigated the inhibitory effects of biochanin A on melanogenesis. The biochanin A is an active component in the extracts of *Dalbergia odorifera* T. Chen. It reduced melanin contents of B16F1 melanoma cells in a dose-dependent manner and decreased to about 48% at a concentration 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It also inhibited the expression in microphthalmia associated transcription factor (MITF), Tyrosinase, Tyrosinase related protein 1 (Trp-1), and Tyrosinase related protein 2 (Trp-2) in melanocytes. The results suggested that biochanin A has considerable potential as a cosmetics ingredient with a whitening effect.

**Keywords:** Biochanin A, whitening, melanin, *Dalbergia odorifera* T.CHEN

## 1. 서 론

멜라닌은 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자이며 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있다[1]. 그러나 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미, 피부반점 등과 같은 과색소 현상을 유발한다[2,3]. 타이로시네로부터 형성되는 멜라닌 생합성은 타이로시네의 축적작용을 통해 일어나는 초기 반응으로 시작되며, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환시키는 작용을 하며, tyrosinase

related protein-1 (TRP-1)은 DHICA를 indole-5,6-quinone-2-carboxy acid로 전환시키는 DHICA oxidase 작용을 Tyrosinase related protein-2 (TRP-2)는 DOPAchome을 DHICA로 전환시키는 역할을 한다.

최근에는 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 등과 같은 단백질을 이용하여 melanin 합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다. Melanin은 몇 가지 세포 내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 첫째 cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) 경로, 둘째 nitric oxide에 의한 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 경로, 셋째 protein kinase C (PKC)의

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: A7023@kolmar.co.kr)

경로, 넷째 p38 MAP kinase 경로 등이 알려져 있다. 그 중 cAMP/PKA 경로가 melanin 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 melanin 세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화시키며, cAMP response element binding protein (CREB)을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다[4,5,6]. MITF는 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다[7].

Biochanin A는 레드클로버에 많이 존재하는 식물 에스트로젠 이소플라본류로 천식이나 만성 기관지염 등에 효과가 있다고 보고되어져 있으며[8], 미백 효능 또한 밝혀져 있다[9]. 그러나 biochanin A의 미백 효능은 *in vitro* 내 tyrosinase 억제 수준으로 보고되어 있다. 따라서 우리는 이번 연구에서 밝힌 강진향(*Dalbergia odorifera* T.CHEN) 추출물 내 미백 활성 물질이 biochanin A임을 밝히고 이를 가지고 biochanin A의 미백 메커니즘을 규명하여 미백 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 강진향(*D. odorifera* T.)은 국내 한약재전문 사이트인 한약시장에서 구입하였고 biochanin A는 중국 Chendu Biopurify Phytochemicals Ltd에서 구입하였다. Neutral red (Sigma, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo scientific, USA), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), Antibiotic-Antimycotic (100X) (Gibco, USA) 제품을 사용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2,  $\beta$ -actin은 Santacruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 microplate reader (Bio-rad, USA), 회전식감압농축기(EYELA, Japan), HPLC (Shimadzu, Japan), Prep-HPLC (Shimadzu, Japan), NMR (Bruker, Germany)을 사용하였다.

### 2.2. 시료 추출물의 제조

건조되어 분쇄된 강진향 2,300 g에 20 배의 95% 에탄올을 가하여 상온에서 72 h 동안 3회 반복 추출하였다. 추출액을 380 mesh 및 여과지로 여과하고 회전식 감압농축기로 농축한 후 일부만 취하여 동결건조기로

건조하여 95% 에탄올 추출 건조물을 얻었다.

### 2.3. 유효성분 분리 및 정제

Acetone-Hexane을 Eluent 용매로 사용하여 활성에 효과가 있는 분획을 실리카겔(Silica gel 60; 0.063~0.200 mm, Merck) 컬럼, Prep-HPLC를 이용하여 활성 물질을 얻었다.

### 2.4. 미백효과 평가

#### 2.4.1. 세포배양

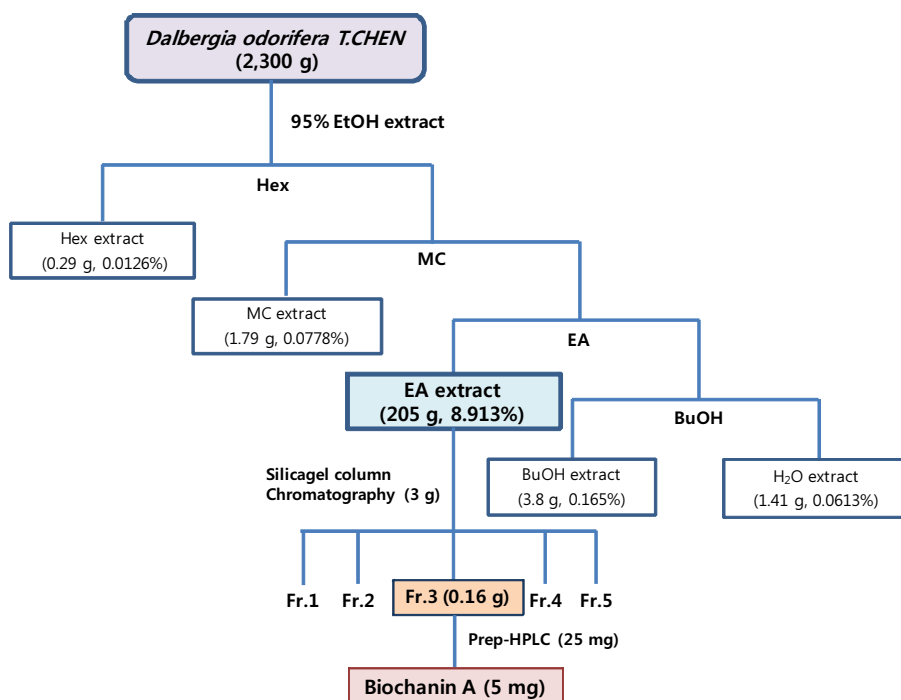
ATCC에서 구매한 mouse melanoma (B16F1) 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 배양기에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

#### 2.4.2. 세포독성측정

본 실험에서 mouse melanoma 세포에 대한 시료의 유효농도를 결정하기 위해 세포독성측정(NRU assay)을 진행하였다. B16F1 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 배양기에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한다. 배양된 mouse melanoma 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cell/wells로 접종하고 24 h 배양한다. 동일 배지로 교체한 후 시료를 농도별로 희석하여 처리한 후 72 h 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. 5 mg/mL neutral red 용액과 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 혼합하여 세포에 200  $\mu$ L씩 처리한 후 2 h 배양한다. 1% CaCl<sub>2</sub> & 1% formaldehyde 용액 넣은 후 1 min 교반하고, 1% Acetic acid & 50% EtOH 용액을 넣은 후 15 min 교반한 후 microplate reader (Bio-rad, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4.3. 멜라닌 정량

B16F1 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 배양기에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한 후 6 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/wells로 접종하고 세포가 바닥에 80% 이상 자랄 때까지 배양한다. 200 nM  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)가



**Figure 1.** Isolation procedure of active compound of *D. odorifera* T.CHEN.

있는 배지조건에 시료를 농도별로 처리한 후 72 h 배양하였다. 양성대조군으로는 알부틴을 사용하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 trypsination하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1,000 rpm으로 5 min 원심분리 한 다음 상등액을 제거하여 pellet을 얻었다. 이 pellet은 70 °C에서 1 h 동안 건조한 후 10% DMSO가 함유한 1 M NaOH 용액 400  $\mu$ L 넣어 멜라닌을 용해시킨 후, microplate reader (Bio-rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4.4. Western Blot Analysis

시료를 72 h 동안 처리한 B16F1 melanoma 세포를 PRO-PREP protein extraction solution (Intron biotechnology, Korea)으로 용해하고 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 8% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5% skim milk가 함유된 tris 완충용액으로 1 h blocking 한 후, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF,  $\beta$ -actin 1차, 2차 항체와 각각 반응시켰다. 반응 후 Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA)를 이용하여 1 ~ 3 min 반응시킨 후 X-ray film으로 현상하였다.

### 3. 결과 및 고찰

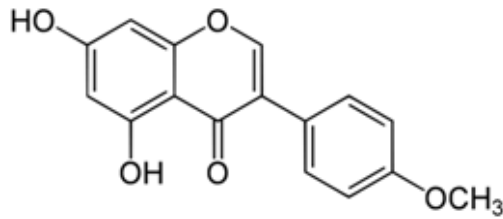
#### 3.1. 강진향 추출물의 유효성분 정제

농축액은 용매의 극성차이를 이용하여 n-Hexane (Hex), Methylene chloride (MC), Ethyl acetate (EA), n-Butyl alcohol (BuOH) 및 물(H<sub>2</sub>O)층으로 나누고 분리된 용매층은 회전식 감압농축기로 농축하였고, 이 농축된 시료는 동결건조기로 건조하여 n-Hexane층 0.29 g (0.013%), Methylene chloride층 1.79 g (0.078%), Ethyl acetate층 205 g (8.913%), n-Butyl alcohol층 3.8 g (0.165%) 및 물층 1.41 g (0.061%) 분획 건조물을 획득하였다(Figure 1).

위의 다섯 가지 분획물 중 미백 효능평가에서 가장 우수한 EA 분획물을 실리카겔 컬럼을 이용하여 구성 성분 분리 진행하여, 5개의 분획(Fr.1~5)으로 나누었다.

이 중 미백 효능이 가장 높았던 Fr.3의 single compound의 구조 동정을 위해 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR을 측정하였다.

<sup>13</sup>C NMR에 의해서 이 물질의 탄소 개수는 16개로 확인되었다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼의  $\delta$  182.3에 나타난 신호는 Ketone기가 존재함을 나타내었고,  $\delta$  166.2 ~ 106.5에 나타난 신호는 Benzene ring을 가지고 있음을



**Figure 2.** Chemical structure of Biochanin A isolated from *D. odorifera* T.CHEN.

나타내었다.

특히, 스펙트럼  $\delta$  131.5와 115.0의 유난히 큰 peak 은 서로 Symmetry한 위치의 탄소가 겹쳐 나온 현상으로 peak 하나 당 2개의 탄소를 나타냄을 알 수 있었다.

$^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  3.827은  $\text{CH}_3$  (Methyl group) 또는  $\text{OCH}_3$  (Methoxy group)의 수소를 나타냈으며,  $\delta$  8.08 ~ 6.97는 Benzene ring,  $\delta$  6.35 - 6.23은 이중결합의 수소를 나타내었다( $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz)  $\delta$  : 3.827 (3H, s), 6.228 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.348 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.982 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.472 (2H, d, J=8.8 Hz), 8.081 (1H, s),  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)  $\delta$  : 182.312, 166.160, 164.045, 161.405, 159.885, 155.127, 131.497, 124.726, 124.663, 115.040, 106.451, 100.314, 94.961, 55.893).

기준에 밝혀진 강진향(*D. odorifera* T.)의 구성 성분들 중 NMR 분석 data를 비교한 결과, 우리가 분리한 single compound는 O-methylated isoflavone인 Biochanin-A (5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-chromen-4-one, CAS number : 491-80-5)으로 확인되었다(Figure 2).

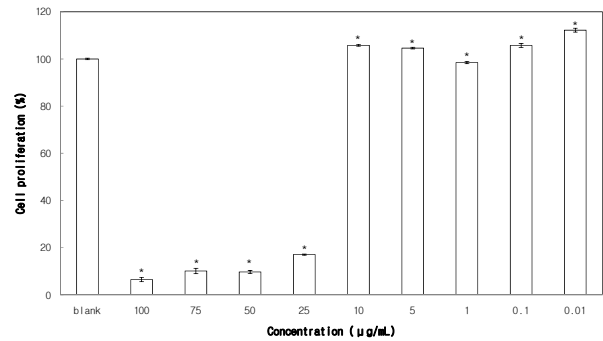
### 3.2. 미백 효과

#### 3.2.1. 세포독성결과

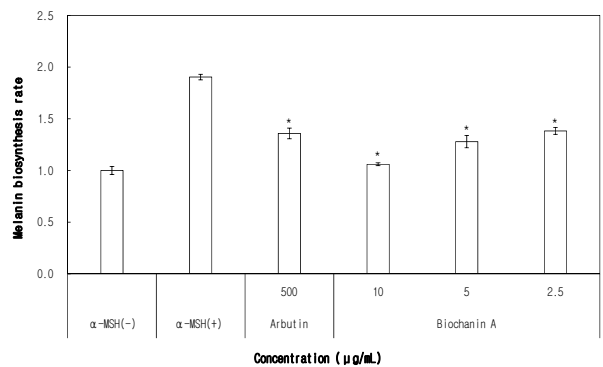
Biochanin A의 세포 독성측정과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 NRU assay를 시행하였다. B16F1 melanoma 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다(Figure 3).

#### 3.2.2. 멜라닌 생성 억제 효과

Biochanin A의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B16F1 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제 효과를 측정하였다. Biochanin A를 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌



**Figure 3.** Cell viability of biochanin A on B16F1 melanoma cells by NRU assay. The cells were treated various concentrations of samples. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.01$  compared with control.

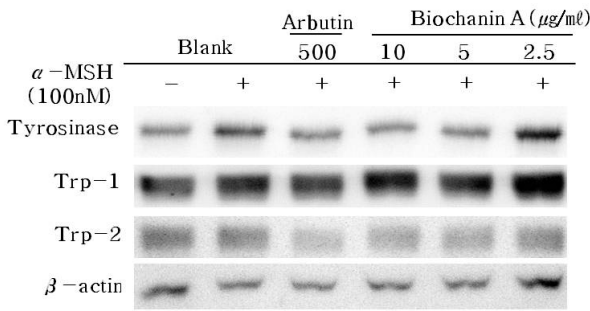


**Figure 4.** Inhibition melanin synthesis of biochanin A on B16F1 melanoma cells. Treated cells were lysed with 1 N NaOH & 10% DMSO and the absorbance was measured at 405 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. \* $p < 0.01$  compared with control.

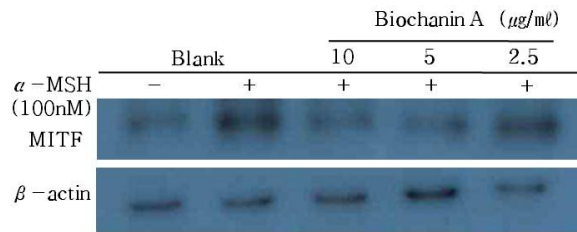
양을 측정한 결과 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Figure 4). 최고 농도인 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 48% 멜라닌 합성이 저해되었고, 양성대조군으로 사용한 arbutin은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 약 32%로 억제되었다.

#### 3.2.3. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 단백질 발현 저해 효과

Biochanin A의 멜라닌 합성 억제 효과가 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 합성효소의 발현억제와 멜라닌 형성에 중요한 transcription factor인 MITF의 발현에 관련된 효과인지 알아보기 위해 western blotting을 수행하였다. 그 결과 biochanin A는 Tyrosinase와 TRP-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, tran-



**Figure 5.** The effect of biochanin A on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein expression in melanoma cells. The cells were treated with various concentration of biochanin A (10, 5, 2.5 µg/mL).



**Figure 6.** The effect of biochanin A on MITF protein expression in melanoma cells. The cells were treated with various concentration of biochanin A (10, 5, 2.5 µg/mL).

scription factor인 MITF의 발현도 농도를 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figures 5, 6).

Melanin 생합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있고 melanin은 몇 가지 세포 내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 그중 cAMP/PKA 경로가 melanin 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 melanin세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화 시키며, CREB을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다. 따라서 실험 결과 biochanin A는 MITF 발현 억제를 통하여 Tyrosinase, TRP-2의 단백질 발현이 감소되고, 더 나아가 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 강진향의 미백 활성성분으로 밝혀진 biochanin A에 대한 미백 효과를 알아봄으로서 미백

화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. B16 melanoma에서 biochanin A는 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제하였으며, 멜라닌 생성 저해 기전을 알아보기 위해 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현양을 western blotting으로 알아본 결과 Tyrosinase, TRP-2, MITF의 발현이 모두 억제됨을 확인할 수 있었다. 이는 멜라닌 합성 조절 전사 인자인 MITF의 발현이 억제되어 Tyrosinase, TRP-2의 발현도 억제되었던 것으로 판단된다. 따라서 biochanin A는 미백용도의 기능성 원료로의 가능성을 가지고 있는 것으로 사료되며 향후 인체실험을 진행함으로써 피부에서의 안전성 및 피부 미백 효능 평가를 진행할 예정이다.

#### 감사의 글

본 연구는 지식경제부 월드 클래스 300 R&D 지원 사업(한국콜마, 국내 자생식물 대량 정제 기술을 이용한 기능성 한방화장품 개발, No. 10043192) 연구비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

#### Reference

1. H. J. Mu, The effects of polydatin isolated from polygonum cuspidatum on melanogenesis and wrinkle formation, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(4), 327 (2011).
2. J. S. Chen, C. Wei, and M. R. Marxhal, Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agr. Food Chem.*, **58**, 79 (1991).
3. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota, and V. J. Hering, The inherent cytotoxicity of melanin precursors, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1221**, 272 (1994).
4. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigm. Cell Res.*, **13**, 60 (2000).
5. C. P. Sassone, Coupling gene expression to cAMP signalling: Role of CREB and CREM, *Int. J. Biochem. Cell B.*, **30**, 27 (1998).
6. B. Saha, Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to

- CREB, *Pigm. Cell Res.*, **29**, 595 (2006).
7. E. Y. Hwang, A Study on the depigmenting effect of carthamus tinctorius seed, cyperus rotundus and schizonepeta tenuifolia extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(1), 76 (2012).
  8. W. C. Ko, Biochanin A, a phytoestrogenic isoflavone with selective inhibition of phosphodiesterase 4, suppresses ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, 13 (2011).
  9. V. C. Lin, *In vitro* and *in vivo* melanogenesis inhibition by biochanin a from *Trifolium pratense*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(5), 914 (2011).