博士學位論文

산박하를 포함한 제주식물로부터 기능성화장품 원료 개발

濟州大學校 大學院

化 學 科

夫 喜 晶

2008年 2月

산박하를 포함한 제주식물로부터 기능성화장품 원료 개발

指導敎授 李 璿 柱

夫 喜 晶

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

夫喜晶의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

濟州大學校 大學院

2008年 2月

The Development of Cosmeceutical Ingredients from Jeju Plants Including *Rabdosia inflexa*

Hee-Jung Bu
(Supervised by Professor Sunjoo Lee)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2007 . 12 .

This dissertation has been examined and approved.

Committee Chairman, ...

Dissertation Committee, ...

Dissertation Committee, ...

Dissertation Committee, ...

Dissertation Committee, ...

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the potential application of six plants obtained in Jeju for developing cosmeceutical ingredients. Whitening, anti-wrinkle, anti-inflammation and anti-oxidation properties were examined with organic solvent extracts as well as purified single compounds from the plant species.

The results were followings;

1) Excisanin A, kamebakaurin, henryin isolated from both *Rabdosia inflexa* and *Isodon inflexus* var. *canescens* exhibited strong inhibition to melanin biosynthesis. Eexcisanin A and kamebakaurin inhibited melanin production induced by UVB through inhibitions of mRNA expression of MC1r, TRP-1, mitf and tyrosinase. Excisanin A inhibited the expression of c-kit mRNA, too. Excisanin A and kamebakaurin inhibited mitf, tyrosinase, TRP-1 protein expression as well. For the anti-inflammation activity, Excisanin A, kamebakaurin, henryin also exhibited strong inhibition of the production of nitric oxide, and inhibited the mRNA expression of iNOS, COX-2 and pro-inflammation cytokines such as TNF-α, IL-6 and IL-1β. Ethyl acetate extracts of both *R. inflexa* and *I. inflexus* var. *canescens* exhibited strong scavenging activities against superoxide radicals while they showed moderate scavenging activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

2) 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-gulcose (PGG) isolated from *Distylium racemosum* exhibited good inhibition effects on both tyrosinase activity and melanogenesis. The results were partly attributed to the inhibition of mRNA expression of genes related to melanin biosynthesis. PGG exhibited significant elastase inhibition activity and DPPH radical scavenging activity (IC_{50} 2.3 ㎍/mL).

3) The ethyl acetate fraction of the roots of *Boehmeria pannosa* inhibited the production of nitric oxide dose-dependently at low concentration. The EtOAc

extract of the roots of *B. pannosa* inhibited mRNA expression of COX-2 and iNOS. The butanol fraction showed significant elastase inhibition activity as 16.2 ㎍/mL of IC_{50}. The methanol extract exhibited 63.9% of inhibition at 100 ㎍/mL when the production of MMP-1 synthesis was measured after UVB irradiation. The EtOAc fraction and epicatechin isolated from it exhibited strong free radical scavenging activity showing 0.8 ㎍/mL and 0.4 ㎍/mL of $IC_{50,}$ respectively.

4) The hexane fraction of a *Cornus macrophylla* inhibited dose-dependently the production of nitric oxide. The MeOH extract, EtOAc fraction and BuOH fraction exhibited good elastase inhibition activities showing 13.1, 24.1, 25.1 ㎍/mL of $IC_{50,}$ respectively. Quercitrin isolated exhibited a good DPPH radical scavenging effect (5.5 ㎍/mL of IC_{50}). The EtOAc fraction, MeOH extract and quercitrin exhibited strong superoxide radical scavenging effects with 0.02, 1.6, ㎍/mL and 0.1 ng/mL of $IC_{50,}$ respectively.

5) EtOAc fraction and luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame* exhibited good elastase inhibtion effects measured with $IC_{50,}$ 12.2 and 18.1 ㎍/mL, respectively. The EtOAc fraction exhibited an inhibition effect of 61% at 100 ㎍/mL, when MMP-1 synthesis was measured after UVB irradiation. Luteolin inhibited the production of MMP-1 induced by UVB to 49% at 10 ㎍/mL. The luteolin also inhibited MMP-1 enzymatic activity to 39.7% at 10 ㎍/mL without irradiation. Luteolin exhibited good DPPH radical scavenging effect (IC_{50} 4.7 ㎍/mL).

The results indicated that the solvent extracts and compounds isolated from plants mentioned above had bioactivities such as whitening, anti-wrinkle, anti-inflammation and anti-oxidation. Therefore, they can be used as valuable cosmetic principles in the future.

목 차

ABSTRACT ····· i
목 차 ····· iii
LIST OF TABLES ····· xi
LIST OF FIGURES ····· xiii
ABBREVIATIONS ····· xix

Ⅰ. 서 론 ····· 1
1. 연구개발의 목적 및 필요성 ····· 1
2. 이론적 배경 ····· 2
2-1. 멜라닌과 미백효과 ····· 2
2-2. 염증반응 ····· 3
2-3. 활성산소 ····· 5
2-4. MMPs와 피부 노화 ····· 6
3. 분리에 사용한 시료 ····· 7

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 10
1. 시료 ····· 10
2. 시약 및 기기 ····· 10
3. 실험방법 ····· 11
3-1. 세포배양 ····· 11
3-2. 미백효과 측정 ····· 11
3-2-1. Tyrosinase 활성 억제 측정 . ····· 11
3-2-2. Melanin 생합성 저해율 측정 ····· 12
3-2-3. UVB 조사에 따른 melanin 생합성 저해율 측정 ····· 13
3-3. Nitric oxide 저해 활성 측정 ····· 13
3-4. 주름 생성 억제 효과 측정 ····· 13

3-4-1. Elastase 활성 억제 측정 ····· 13
3-4-2. MMP-1 합성 억제 측정 ····· 14
3-4-3. MMP-1 활성 억제 측정 ····· 15
3-5. 항산화 효과 측정 ····· 15
3-5-1. DPPH에 의한 라디칼 소거 측정 ····· 15
3-5-2. NO 소거 활성 측정 ····· 16
3-5-3. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정 ····· 16
3-6. 세포 생존율 및 세포 독성 측정 ····· 17
3-6-1. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 ····· 17
3-6-2. LDH release를 이용한 세포 독성 측정 ····· 17
3-7. RNA 분리 및 RT-PCR ····· 17
3-7-1. RNA 분리 ····· 17
3-7-2. UVB 조사한 melan-a 세포의 RT-PCR ····· 18
3-7-3. RAW 264.7 세포의 RT-PCR ····· 18
3-8. 전기영동 및 Western blot 분석 ····· 19
3-9. 추출물을 첨가한 화장품 안정성 측정 ····· 21
3-9-1. 산박하 및 털산박하 추출물을 첨가한 O/W emulsion 제조 방법 ·· 21
3-9-2. pH 측정 ····· 23
3-10. 유효성분을 함유한 추출물에서의 추출 및 분리 ····· 23
3-10-1. 산박하 추출 및 분리 ····· 23
3-10-2. 털산박하 추출 및 분리 ····· 25
3-10-3. 조록나무 추출 및 분리 ····· 26
3-10-4. 왕모시풀 뿌리 추출 및 분리 ····· 27
3-10-5. 곰의말채 추출 및 분리 ····· 29
3-10-6. 차풀 추출 및 분리 ····· 30

Ⅲ. 결 과 ····· 31
1. 산박하 추출물들의 활성 결과 ····· 31
1-1. 미백효과 ····· 31

1-1-1. 산박하 추출물들의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 31
1-1-1-1. 산박하 1차 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 31
1-1-1-2. 산박하 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 34
1-1-1-3. 산박하 디클로로메탄 분획물의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 36
1-1-1-4. 산박하 fr2 분획물의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 37
1-1-1-5. 산박하 fr2-2 분획물의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 38
1-1-1-6. 산박하 fr2-4-4 분획물의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 39
1-1-1-7. 산박하 fr3 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율 ····· 40
1-1-2. 분리한 단일물질들의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 41
1-1-3. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 미치는 산박하 추출물들의 억제 효과 ····· 41
1-1-3-1. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 미치는 디클로로메탄 분획물의 억제 효과 ····· 41
1-1-3-2. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 단일물질들이 미치는 효과 ····· 44
1-1-4. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 산박하 추출 물이 미치는 영향 ····· 46
1-1-4-1. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 디클로로메탄 분획물이 미치는 영향 ····· 46
1-1-4-2. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 산박 하 추출물에서 분리한 compound들이 미치는 영향 ····· 46
1-1-5. 산박하 추출물이 melanin 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 효과 ·· ····· 49
1-1-6. 산박하 추출물이 첨가된 화장품의 유효성 및 안정성 결과 ····· 51
1-1-6-1. 산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 멜라닌 생성 억제 효과 51
1-1-6-2. 산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 온도 안정성 확인 ····· 51
1-1-6-3. 산박하 추출물을 함유한 emulsion의 pH 측정 ····· 53
1-1-6-4. 산박하 추출물을 함유한 emulsion의 입자 확인 ····· 54
1-2. 항염증 효과 ····· 55

1-2-1. 산박하 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향 ····· 55
1-2-1-1. 산박하 용매 분획물이 NO 생성 억제 활성 ····· 55
1-2-1-2. 산박하 추출물에서 분리한 compound들의 NO 생성 억제 활성 ····· 57
1-2-2. 산박하 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향 ····· 57
1-2-3. 산박하 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향 ····· 57
1-2-4. 산박하 추출물이 pro-inflammation의 mRNA 발현에 미치는 영향 ····· 60
1-3. 항산화 효과 ····· 62
1-3-1. 산박하 추출물이 DPPH radical 소거 효과 ····· 62
1-3-2. 산박하 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 활성 ····· 62
1-3-3. 산박하 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과 · ····· 64
1-4. Compounds의 구조 동정 ····· 65
1-4-1. RIE-1의 구조 확인 ····· 65
1-4-2. RIE-2의 구조 확인 ····· 70
1-4-3. RIE-3의 구조 확인 ····· 76
2. 털산박하 추출물의 활성 결과 ····· 81
2-1. 미백효과 ····· 81
2-1-1. 털산박하 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 81
2-1-1-1. 털산박하 1차 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율 확인 ·· 81
2-1-1-2. 털산박하 에틸아세테이트 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 84
2-1-2. 털산박하 에틸아세테이트 분획물 및 단일물질의 melanin 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 효과 ····· 87
2-1-3. 털산박하 추출물이 첨가된 화장품의 유효성 및 안정성 결과 ····· 88
2-1-3-1. 털산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 멜라닌 생성 억제 효과 ····· 88
2-1-3-2. 털산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 온도 안정성 확인 ····· 88

2-1-3-3. 털산박하 추출물을 함유한 emulsion의 pH 측정 ····· 88
2-1-3-4. 털산박하 추출물을 함유한 emulsion의 입자 확인 ····· 91
2-2. 항염증 효과 ····· 92
2-2-1. 털산박하 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향 ····· 92
2-2-2. 털산박하 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향 ····· 94
2-2-3. 털산박하 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향 ····· 94
2-2-4. 털산박하 추출물이 pro-inflammation의 mRNA 발현에 미치는 영향 ····· 94
2-3. 항산화 효과 ····· 96
2-3-1. 털산박하 추출물의 DPPH radical 소거 효과 ····· 96
2-3-2. 털산박하 추출물의 Nitric oxide 생성 저해 효과 ····· 97
2-3-3. 털산박하 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과 ····· 97
2-4. IIE-1의 구조 동정 ····· 99
3. 조록나무 추출물의 활성 결과 ····· 101
3-1. 미백효과 ····· 101
3-1-1. 조록나무 추출물의 tyrosinase 억제 효과 ····· 101
3-1-1-1. 조록나무 추출물의 tyrosinase 억제 효과 ····· 101
3-1-1-2. 조록나무 잎 에틸아세테이트 분획 및 단일물질의 tyrosinase 억제 효과 ····· 101
3-1-2. 조록나무 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 측정 결과 ····· 104
3-1-2-1. 조록나무 메탄올 조추출물 및 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 104
3-1-2-2. 조록나무 잎 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 104
3-1-2-3. 조록나무 잎에서 분리한 PGG의 멜라닌 생합성 억제 효과 106
3-1-3. Melanin 생성에 관여하는 mRNA 발현에 PGG가 미치는 영향 ··· 108
3-2. 항주름 효과 ····· 109
3-2-1. 조록나무 추출물의 elastase 억제 효과 ····· 109

3-2-1-1. 조록나무 메탄올 추출물 및 분획물들의 elastase 억제 효과 109
3-2-1-2. 조록나무 에틸아세테이트 분획 및 PGG의 elastase 억제 효과 ····· 109
3-2-3. 조록나무 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과 ····· 111
3-3. 조록나무 추출물의 DPPH radical 소거 활성 ····· 112
3-4. DRE-1의 구조 동정 ····· 114
3-5. PGG의 NMR 데이터 ····· 114
4. 왕모시풀 뿌리 추출물의 활성 결과 ····· 116
4-1. 미백효과 ····· 116
4-1-1. 왕모시풀 뿌리 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 116
4-1-2. 왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과 ····· 116
4-2. 항염증 효과 ····· 119
4-2-1. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 효과 ····· 119
4-2-1-1. 왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물 및 용매 분획물들의 NO 억제 효과 ····· 119
4-2-1-2. 왕모시풀 뿌리 에틸아세이트의 분획물들과 epicatechin의 NO 억제 효과 ····· 119
4-2-2. 왕모시풀 뿌리 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향 ····· 125
4-2-3. 왕모시풀 뿌리 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향 ····· 125
4-2-4. 왕모시풀 뿌리 추출물이 pro-inflammation의 mRNA발현에 미치는 영향 ····· 125
4-3. 항주름 효과 ····· 127
4-3-1. 왕모시풀 뿌리 추출물의 elastase 억제 효과 ····· 127
4-3-2. 왕모시풀 뿌리 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과 129
4-4. 항산화 효과 ····· 130
4-4-1. 왕모시풀 뿌리 추출물이 DPPH radical 소거 효과 ····· 130
4-4-2. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 효과 ····· 132
4-4-3. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거

효과 ····· 132
4-5. BPE-1의 구조 동정 ····· 134
5. 곰의말채 추출물의 활성 결과 ····· 137
5-1. 항염증 효과 ····· 137
5-1-1. 곰의말채 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향 ····· 137
5-1-2. 곰의말채 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향 ····· 139
5-1-3. 곰의 말채 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향 ····· 139
5-1-4. 곰의말채 추출물이 pro-inflammation의 mRNA 발현에 미치는 영향 ····· 139
5-2. 항주름 효과 ····· 141
5-2-1. 곰의말채 추출물의 elastase 억제 효과 ····· 141
5-2-2. 곰의 말채 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과 ····· 141
5-3. 항산화 효과 ····· 144
5-3-1. 곰의말채 추출물의 DPPH radical 소거 효과 ····· 144
5-3-2. 곰의말채 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 효과 ····· 145
5-3-3. 곰의말채 추출물의 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과 ····· 146
5-4. CME-1의 구조 동정 ····· 147
6. 차풀 추출물의 활성 결과 ····· 150
6-1. 항주름 효과 ····· 150
6-1-1. 차풀 추출물의 elastase 억제 효과 ····· 150
6-1-2. 차풀 추출물의 MMP-1 합성 억제 및 활성 억제 효과 ····· 150
6-1-2-1. 차풀 추출물의 MMP-1 합성 억제 효과 ····· 150
6-1-2-2. Luteolin의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과 ····· 152
6-1-3. Luteolin이 MMP-1 mRAN 발현에 미치는 영향 ····· 153
6-2. 항산화 효과 ····· 154
6-2-1. 차풀 메탄올 조추출물 및 분획물들의 DPPPH radical 소거 효과 154
6-2-2. 차풀 에틸아세테이트 분획과 luteolin의 DPPH 라디칼 소거 효과 154
6-3. CMNE-1의 구조 동정 ····· 156

Ⅳ. 고 찰 ····· 159

Ⅴ. 요 약 ····· 170

Ⅵ. 참 고 문 헌 ····· 172

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes involved in melanin synthesis and the expected size of their PCR products ····· 20
Table 2. The primer sequences of the genes involved in inflammation and the expected size of their PCR products ····· 21
Table 3. Method and materials used in the preparation of emulsion ····· 22
Table 4. Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution ····· 24
Table 5. Effects of subfractions of CH_2Cl_2 extract of *Rabdosia inflexa* on he melanin content in Melan-a cells ····· 36
Table 6. Effects of fr2 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 37
Table 7. Results of thermal stability test of the emulsion containing an EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa* ····· 53
Table 8. pH measurement of emulsion containing EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa* ····· 53
Table 9. Antioxidant activities of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Rabdosia inflexa* ····· 63
Table 10. NMR spectroscopic data for RIE-1 ····· 67
Table 11. NMR spectroscopic data for RIE-2 ····· 72
Table 12. NMR spectroscopic data for RIE-3 ····· 77
Table 13. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells ····· 85
Table 14. Results of thermal stability test of the emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* ····· 90
Table 15. pH measurement of emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* ····· 90
Table 16. Antioxidant activities of the 80% MeOH extract and its subfractions of

Isodon inflexus var. *canescens* ····· 98
Table 17. NMR spectroscopic data for IIE-1 ····· 99
Table 18. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Distylium racemosum* on tyrosinase activity ····· 103
Table 19. Effects of PGG and subfractions of EtOAc extract of *Distylium racemosum* on tyrosinase activity ····· 103
Table 20. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Distylium racemosum* on elastase activity ····· 110
Table 21. Effects of extract of *Distylium racemosum* on MMP-1 activity and the production of MMP-1 by the UVB irradiated human dermal fibroblast ····· 112
Table 22. Effects of subfractions of EtOAc extract of the roots *Boehmeria Pannosa* on of elastase activity ····· 128
Table 23. Effects of extract of roots of *Boehmeria Pannosa* on MMP-1 activity and the production of MMP-1 by the UVB irradiated human dermal fibroblast ····· 129
Table 24. Antioxidant activities of 80% MeOH extract, its subfractions and epicatechin isolated from the roots of *Boehmeria Pannosa* ····· 133
Table 25. NMR spectroscopic data for BPE-1 ····· 135
Table 26. Antioxidant activities of 80% MeOH extract, its subfractions and quercitrin isolated from *Cornus macrophylla* ····· 145
Table 27. NMR spectroscopic data for CME-1 ····· 148
Table 28. The effect of *Cassia mimosoides* var. *nomame* on the production of MMP-1 of human dermal fibroblast irradiated with UVB ····· 151
Table 29. NMR spectroscopic data for CMNE-1 ····· 157

LIST OF FIGURES

Figure 1. Isolation procedures for *Rabdosia inflexa* ····· 25

Figure 2. Isolation procedures for *Isodon inflexus* var. *canescens* ····· 26

Figure 3. Isolation procedures for *Distylium racemosum* ····· 27

Figure 4. Isolation procedures for the roots of *Boehmeria Pannosa* ····· 28

Figure 5. Isolation procedures for *Cornus macrophylla* ····· 29

Figure 6. Isolation procedures for *Cassia mimosoides* var. *nomame* ····· 30

Figure 7. Effects of extracts of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 32

Figure 8. Effects of EtOAc fractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in B16F1 cells ····· 33

Figure 9. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 35

Figure 10. Effects of fr2-2 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 38

Figure 11. Effects of fr2-4-4 fraction of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. ····· 39

Figure 12. Effects of fr3 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 40

Figure 13. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a and B16 cells ····· 42

Figure 14. Effects of subfractions of *Rabdosia inflexa* CH_2Cl_2 extract on melanin concents in the Melan-a cells irradiated with UVB ····· 43

Figure 15. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the melanin content by the UVB irradiated melanocytes ····· 45

Figure 16. Effects of subfractions of CH_2Cl_2 extract of *Rabdosia inflexa* on mRNAs expression in the Melan-a cells irradiated with UVB ····· 47

Figure 17. Effects of isolated compounds and EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa* on mRNA expression in the UVB irradiated Melan-a cells ····· 48
Figure 18. Effects of *Rabdosia inflexa* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2, Mitf protein expression in Melan-a cells ····· 50
Figure 19. Effects of emulsion containing *Rabdosia inflexa* EtOAc extract on the melanin content in Melan-a cells ····· 52
Figure 20. Microscopic aspect of the emulsion containing EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa* ····· 54
Figure 21. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of *Rabdosia inflexa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ·· 56
Figure 22. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 58
Figure 23. Effects of isolated compounds, 80% MeOH extract and its subfractios of *Rabdosia inflexa* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 59
Figure 24. Effects of isolated compounds, 80% MeOH extract and its subfractios of *Rabdosia inflexa* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 61
Figure 25. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Rabdosia inflexa* ····· 63
Figure 26. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-1 ····· 68
Figure 27. ^{1}H-NMR spectrum of RIE-1 ····· 68
Figure 28. ^{13}C-NMR and DEPT spectrum of RIE-1 ····· 69
Figure 29. HMBC spectrum of RIE-1 ····· 70
Figure 30. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-2 ····· 73
Figure 31. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of RIE-2 ····· 74
Figure 32. COSY and HMBC spectrum of RIE-2 ····· 75
Figure 33. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-3 ····· 78
Figure 34. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of RIE-3 ····· 79

Figure 35. HMQC and HMBC spectrum of RIE-3. ····· 80
Figure 36. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells ····· 82
Figure 37. Effects of EtOAc fractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells ····· 83
Figure 38. Effects of subfractions of EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells ····· 86
Figure 39. Effects of isolated kamubakauin and EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2, Mitf proteins expression in Melan-a cells ····· 87
Figure 40. Effects of emulsion containing an EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells ····· 89
Figure 41. Microscopic aspect of the emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* ····· 91
Figure 42. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 93
Figure 43. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 95
Figure 44. Effects of isolated compounds 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ···· 95
Figure 45. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* ····· 96
Figure 46. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of IIE-2 ····· 100
Figure 47. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of leaves and branches of *Distylium racemosum* on the melanin content in Melan-a cells 105
Figure 48. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Distylium racemosum* on

the melanin content in Melan-a cells ····· 106
Figure 49. Effects of PGG isolated from leaves of *Distylium racemosum* on the melanin content in Melan-a cells ····· 107
Figure 50. Effects of PGG isolated from leaves of *Distylium racemosum* on mRNA expression in Melan-a cells ····· 108
Figure 51. Effects of PGG and subfractions of EtOAc extract of the leaves of *Distylium racemosum* on elastase activity ····· 110
Figure 52. The DPPH radical scavenging activity of PGG isolated from *Distylium racemosum* ····· 113
Figure 53. ^{1}H and ^{13}C spectrum of PGG ····· 115
Figure 54. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 117
Figure 55. Effects of subfractions of an EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the melanin content in Melan-a cells ····· 118
Figure 56. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 121
Figure 57. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 122
Figure 58. Effects of subfractions of EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 123
Figure 59. Effects of epicatechin isolated from the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ·· ····· 124
Figure 60. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 126

Figure 61. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the mRNA expression of pro- inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 126
Figure 62. Effects of the 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on elastase activity ····· 128
Figure 63. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* ····· 131
Figure 64. The DPPH radical scavenging activity of subfractions of EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa* ····· 131
Figure 65. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of BPE-1 ····· 136
Figure 66. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Cornus macrophylla* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. ····· 138
Figure 67. Effects of hexane fraction of *Cornus macrophylla* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 140
Figure 68. Effects of hexane fraction of *Cornus macrophylla* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ····· 140
Figure 69. Effects of *Cornus macrophylla* extract on elastase activity ····· 142
Figure 70. The effect of *Cornus macrophylla* on the production of MMP-1 of human dermal fibroblast irradiated with UVB ····· 143
Figure 71. The DPPH radical scavenging activity of 80% MeOH extract, its subfractions and subfractions of EtOAc extract of *Cornus macrophylla* ····· 144
Figure 72. 1H and 13C-NMR spectrum of CME-1 ····· 149
Figure 73. Effects of EtOAc extract and its subfractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame* on elastase activity ····· 151
Figure 74. The effect of luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame* on the production of MMP-1 by the UV-irradiated human dermal

fibroblast ····· 152
Figure 75. Effect of luteolin on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVB ····· 153
Figure 76. The DPPH radical scavenging activity of 80% MeOH extract and its subfractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame* ····· 155
Figure 77. The DPPH radical scavenging activity of subfractions of EtOAc extract of *Cassia mimosoides* var. *nomame*. ····· 155
Figure 78. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of CMNE-1 ····· 158

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 ·
제주대

ABBREVIATIONS

ACTH	Adrenocorticotropic hormone
AP-1	Activator protein-1
BHA	Butylated hydroxy anisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAT	Catalase
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
cNOS	Constitutive nitric oxide synthase
COX-2	Cyclooxygenase-1
COSY	Correlation spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOPA	Dihydroxy phenylalanine
EGCG	Epigallocatechin gallate
ET-1	Endothelin-1
FBS	Fetal bovine serum
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JNKs	c-Jun N-terminal kinases
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide

MC1r	Melanocortin-1 receptor
Mitf	Microphthalmia transcription factor
MMP	Matrix metalloprotease
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NMR	Nuclear magnetic resonance
NNGH	N-Isobutyl-N-[4-methoxyphenylsulfonyl]glycyl hydroxamic acid
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
POMC	Proopiomelanocortin
PVDF	Polyvinylidene difluoride
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Sodium nitroprusside
SOD	Superoxide dismutase
TBS	Tris-buffered saline
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloprotease
TLC	Thin-Layer Chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TPA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
TRP-1	Tyrosinase relative protein-1
TRP-2	Tyrosinase relative protein-2
α-MSH	α-Melanocyte stimulating hormone

Ⅰ. 서 론

1. 연구개발의 목적 및 필요성

인간이 미에 대한 욕구는 삶에 대한 여유를 갖고 자신의 개성을 중요시 하는 현대인들에게 있어서 필수적이라 할 수 있다. 산업사회가 발달하고 고령화 인구가 증가하면서 아름답고 건강하게 나이를 먹고자 하는 욕구가 늘게 되고 그것을 유지할 수 있는 유효성이 탁월한 화장품에 대한 연구 개발이 필수적이게 되었다. 뿐만 아니라 아름다움에 대한 다양한 의식변화로 미의 표현에 있어 다양하고 개성적인 변화들을 추구하고 있다. 화장품산업은 바이오산업 중에서도 의약품시장 다음으로 그 규모가 큰 경쟁력이 강한 산업으로, 기술 집약적이고 지속적인 개발 가능성이 가능한 고부가가치 창출 산업이다. 특히 화장품은 이미지를 강조하여 아름다움을 표현하는 특성을 갖고 있어 개인적인 기호에 따라 차별화와 고급화를 만족시킬 수 있고, 개성적인 미를 중요시하는 현대인들에게 있어 전문적이고 상징적인 만족감을 부여할 수 있다. 또한 화장품은 점차 생활에 있어서 남녀노소를 막론하고 생필품이면서 개성을 연출하고 미를 창조하는 용도로서 그 소비시장이 확대 증가되고 있다.

국내에서는 화장품법이 시행된 이후로 사회적인 변화와 소비자의 다양한 요구에 따라 기능성 화장품에 대한 많은 관심과 함께 연구 개발이 활발히 진행되고 있다. 즉, 과거의 화장품이 단순한 미를 가꾸고 보호를 위해 사용되어 왔다면, 현대의 화장품은 그러한 기본적인 필요성 외에 좀 더 만족감과 삶의 질을 풍요롭게 만들고 외부의 유해한 환경에 대해 피부를 보호하고 피부의 상태를 적극적으로 개선하고자 하는 목적으로 전환되고 있다[1].

실질적으로 국내에서 생산되는 기능성화장품의 연구현황을 보면 2005년에 1,957품목이 기능성화장품 승인을 받은 것으로 집계되었다. 이것은 전년도에 비해 50.8%가 증가된 것으로 이중 미백화장품이 789품목으로 40.3%를 차지하고 있고, 자외선 차단제품이 522품목으로 26.73%, 주름개선 제품이 499품목으로 25.5%를 차지하고 있다. 또한 여러 가지 기능이 복합적으로 작용하는 기능성 화장품 개발도 증가되고 있는 추세로 미백과 자외선 차단 기능이 혼합된 제품이 43품목, 미백과 주름개선 기능이

혼합된 제품이 92품목, 주름과 자외선 차단 기능이 혼합된 제품이 6개 품목, 세 가지 기능성 화장품 기능이 혼합된 제품이 6개로 통계되었다. 이러한 기능성 원료의 개발은 자연적인 것을 선호하는 현대인들의 기호에 맞춰 천연 원료에서부터 개발하는 것이 주를 이루고 있다[2,3]. 따라서 청정 이미지가 강하고 다양한 식물 종을 보유하고 있는 제주 지역에서의 기능성 화장품 원료의 개발은 이미지를 강하게 부각시키는 화장품 산업에서 중요한 원료로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 고부가가치 창출을 할 수 있는 원동력을 제공할 수 있다.

2. 이론적 배경

2-1. 멜라닌과 미백효과

동양인들은 희고 고운 피부에 대한 열망이 과거에서부터 미의 상징으로 여겨져 동양권에서는 미백화장품에 대한 관심과 함께 그에 대한 연구가 집중되어 왔다. 인간의 피부 색깔은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈 양과 같은 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 과색소 침착과 관련된 주요한 원인은 표피 내 멜라닌색소의 이상적 증가에 기인한다. 멜라닌은 표피층의 기저층에 있는 멜라닌형성세포(melanocyte)내의 멜라노좀(melanosome)에서 티로신(tyrosin)으로부터 생합성 되며 주변 각질형성세포(keratinocyte)로 전이되어 피부색을 나타낸다[4]. 멜라닌은 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 중요한 역할을 하지만[5,6] 비정상적으로 과잉 생산되는 경우는 기미나 주근깨 등의 미용상의 문제를 일으키고, 반대로 너무 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발된다. Melanocyte는 자외선, 피부의 염증반응, 호르몬 이상, 유전질환, 화학적 자극 등에 의해 활성화되고, 증식 및 분화하여 멜라닌 색소를 과다하게 만들어 결국 피부 색소 침착을 일으킨다. 특히 피부의 멜라닌 색소를 증가시키는 대표적인 인자인 자외선에 대한 자극은 최근 환경오염에 따른 오존층의 파괴와 여가 활동에 대한 욕구가 많아지면서 더욱 많아지게 되었다.

자외선은 피부에 침투되면서 비타민D가 합성되어 칼슘의 흡수를 도와 골격과 치아발육을 촉진하고, 비타민 A의 상승효과와 살균 소독 작용 등의 중요한 역할을 하

지만, 반대로 홍반, 색소 침착, 만성반응으로 나타나는 피부 노화, 피부암의 유발 등은 인체에 유해하거나 미용적인 문제를 야기한다. 이러한 자외선에 의한 피부의 변화는 주로 UVB에 의해 일어나는데, UVB에 의한 지연 색소침착은 멜라닌세포의 수와 멜라닌 합성이 증가되어 멜라닌화를 촉진하고[7-10], 멜라닌세포에서 각질형성세포로 멜라닌 색소의 이동이 증가되는 등의 과정을 통하여 나타난다[11-14]. 자외선에 의한 피부색소 증가에 대한 경로는 명확하게 밝혀지지는 않았지만 주로 각질형성세포(keratinocyte)에서 분비되는 인자들에 기인한다. 자극된 각질형성세포가 분비하는 인자들로는 endothelin-1(ET-1)[15-18], α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), adrenocorticotropic hormome(ACTH)[19,20], nitric oxide(NO)[21,22]등이 있다. ET-1인 경우 멜라닌 세포의 protein kinase C(PKC) 경로[23,24]와 cAMP 경로를 자극시켜 멜라닌색소형성을 증가시키고 α-MSH와 ACTH도 cAMP 경로를 통해 피부 색소형성을 촉진시킨다[25-34]. α-MSH 의 전구체인 proopiomelanocortin(POMC)도 α-MSH와 같이 멜라닌세포에 있는 melanocortin-1(MC-1) 수용체에 결합하여 cAMP 활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시키고, NO는 cGMP경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다[35-39].

기능성 미백화장품에서는 과다하게 생성되는 멜라닌 색소의 억제 및 자외선 차단을 통한 색소 침착이 억제되고, 생성된 멜라닌 색소의 환원작용을 통하여 미백효과를 유도한다. 멜라닌 생성을 억제하는 물질로는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 arbutin, lactic acid, glucosamine, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안전성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되는 것들이 많다[40-43]. 따라서 천연물 유래 미백제의 개발이 활발히 진행되고 있고 현재 화장료로 많이 사용되고 있다[44-48].

2-2. 염증반응

자외선에 의해 그 생성이 촉진되며 멜라닌합성을 활성화시키고 염증과 피부노화를 유도하는 물질 중에 하나인 nitric oxide(NO)는 대기오염물질이며 담배연기에 포함된 수많은 화학물질중의 하나로서 독성을 가진 매우 불안한 기체이며 고농도에는 세포의 기질적 손상을 초래하는 free radical의 하나이다. Nitric oxide synthase

(NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ 등 세종류의 동종 효소로 분류된다. 즉, Type I(neuronal NOS, nNOS)과 Type Ⅲ(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type Ⅱ인 inducible NOS(iNOS)이 있다[49-51]. 이러한 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 NO가 형성된다[52].

자극에 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성과 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것이 특징이다. NO는 매우 작으면서도 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사방으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[52]. 현재 NO에 대한 많은 연구 보고서들에 의해 생체에서 여러 가지 생리생화학적 현상의 messenger molecule로서 mediator, neurotransmitter 또는 regulator 등으로 다양하게 작용함이 밝혀지고 있다[53]. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[54,55].

염증이 발생하게 되면 그 후에 일반적으로 과색소형성이 일어나게 되는데, 자외선이나 세균감염 때 생긴 염증으로 얼굴색이 검게 변하고, 기미와 잡티가 생겨나기도 한다. 이 때 피부에 존재하는 세포인 림프구(lymphocyte), 대식세포(macrophage), 내피세포 (endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast)등 염증반응에 관여하는 세포들이 관여하게 되고[56] 이 세포들이 lipopolysaccharide(LPS), interferon-ɣ(INF-ɣ) 및 tumor necrosis factor-α(TNF-α)등의 자극제들에 노출되게 되면 iNOS의 발현이 증가되고 이로 인한 NO 생성이 증가되어 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 색소침착과 피부노화 등을 유도한다.

염증반응 시 생기는 아라키돈산 대사물과 히스타민과 같은 염증매개 물질들을 첨가한 멜라닌세포 배양 시 tyrosinase의 활성이 증가되고 멜라닌 세포의 성장과 증식이 촉진된다고 보고되어 있다[57-59]. 실질적으로 항염증제인 corticosteroid나 indomethacin을 피부에 도포하였을 때 자외선에 의한 홍반이 호전되고, 피부의 과색

소 침착이 억제된다는 보고가 있다[56,60].

또한 염증반응 시 생겨나는 염증매개 물질들과, cytokine들이 c-Jun의 활성화를 통해 AP-1 전사인자를 활성화시켜 진피내의 무코다당류와 결합섬유들을 분해하는 matrix metalloprotease(MMPs)의 발현을 촉진시키고, 이것의 저해제인 tissue inhibitor of matrix metalloproteases(TIMPs)의 합성을 억제한다고 알려져 있다[61-66].

2-3. 활성산소

자외선에 노출된 피부는 피부 색소침착, 염증 유발뿐만 아니라 피부노화가 가속화되는데 특히, 피부 노화를 일으키는 외적 요인 중 가장 큰 원인으로 작용한다. 자외선에 의한 노화는 장기간 태양광에 노출되는 얼굴, 손등, 목 등의 피부에서 관찰되는데 피부 각질층이 두꺼워지고, 피부의 구성요소들인 세포외 기질들이 변성되어 피부의 탄력을 잃게 되고, 깊은 주름이 형성된다. 자외선에 의한 피부노화 현상에 중요한 영향을 미치는 인자는 자외선에 의해 비정상적으로 생성량이 증가되는 활성산소종(ROS)과 자유 라디칼(free radical)의 작용이다[67].

피부에 호흡을 하는 호기성 생물체들은 끊임없이 산소 분자(O_2)를 세포 내로 받아들여 미토콘드리아와 마이크로좀 등의 세포 소기관의 대사 작용과 또는 외부 항원에 노출된 면역세포에 의해 그리고 외부적으로 방사선 또는 여러 화합물 등에 의해 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 생성한다. 이는 생체 내의 항산화 효소계인 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalase, CAT) 등의 방어 기구와 비타민, 플라보노이드 등의 비효소적인 항산화제에 의해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에 균형을 이루어 정상적인 세포 기능을 유지하고 있다[68].

그러나 자외선, 공해물질, 화학약품, 스트레스 등의 환경적 요인과 비정상적인 대사 작용으로 인하여 활성 산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 superoxide anion radical($O_2\bullet^-$)과 hydroxyl radical(·OH), 과산화수소(H_2O_2), hypochlorous acid(HOCl) 등의 활성산소를 생성하게 되어 세포에 유해 작용을 가하게 된다. 그로 인하여 지질 과산화, 단백질 산화, 세포간질 성분을 파괴시키는 단백질 분해효소의 활성화, 진피 내 탄력섬유와 결합섬유인 엘라

스틴과 콜라겐의 사슬 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 구성 성분들의 손상을 야기한다. 이러한 손상의 결과로 고혈압, 협심증, 당뇨병, 암과 같은 성인병과 기미, 주근깨, 주름, 아토피성 피부염과 같은 피부질환이 발생하게 된다[69]. 따라서 활성산소 억제제는 성인병와 피부질환 등의 치료, 개선 등에 폭넓게 이용되고, 화장품, 의약품 등의 분야에 있어서 이용 가능하다.

활성산소종에 의한 지질의 과산화를 막기 위해 항산화제를 오래전부터 이용하여 왔는데 주로 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT)이나 butylated hydroxyanisole(BHA)를 이용하였다. 그러나 이들 제제는 과량 섭취 시 급성 독성과 만성 독성을 보인다는 것[70]이 알려짐에 따라 점점 천연항산화제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 현재 보고된 대표적 항산화 물질로는 ascorbic acid, tocopherol과 같은 비타민류[71], caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀산류, catechine과 같은 탄닌류, quercetin, kaempferol과 같은 플라보노이드류[72], 카로티노이드류 같은 물질들이다.

2-4. MMPs와 피부 노화

피부의 탄력을 유지하는 조직을 파괴하여 주름을 만드는 MMPs는 자유 라디칼의 발현과 밀접한 관계를 갖는데[73,74] 자유 라디칼에 의해 MMPs는 그 생성이 촉진되고 발현량이 더욱 증가된다. 자연적인 노화 외에 자외선, 흡연, 정신적 스트레스와 같은 외부의 환경으로부터 쌓이는 산화적 스트레스로부터 생기는 자유라디칼을 소거하는 것은 노화방지를 위한 중요한 방법이 된다.

피부의 진피 내에는 결합섬유인 콜라겐과 탄성섬유인 엘라스틴이 있어 젊고 탄력적인 피부조직을 유지하는 역할을 수행하게 되는데, 자연적인 노화에 의해 그 생성량이 줄어들고 결합력도 약해져 점차 주름을 형성하게 된다. 그러나 이러한 자연적으로 생기는 노화가 아닌 현대사회의 다양한 변화에 맞춰 인간의 노화되는 정도는 환경유해물질과 같은 공해에 노출되면서 외적 자극에 의해 더욱 가속화 된다[75-77]. 특히 자외선은 노화의 중요 원인으로 여겨지고 있으며, 자외선에 의한 활성산소의 생성과 피부 내 성분들의 변성 등은 피부의 각질을 두껍게 하고, 지질을 과산화 시키며, 콜라겐과 엘라스틴 같은 세포외 기질을 변성시켜 피부의 탄력을 잃게 하고,

주름을 형성 시킨다[78,79].

피부 진피 내에는 세포외 기질 중에 70~80%로 가장 많은 비율을 차지하고 있는 교원섬유(collagen fiber)인 콜라겐 섬유가 존재한다. 콜라겐은 피부뿐만 아니라 인체 내의 대표적인 결합조직 단백질로서 뼈, 연골, 힘줄, 혈관벽 등에 위치하여 몸을 지탱, 보강, 결합을 담당한다. 섬유형태로 분자가 규칙적으로 구성되어 있고 분자량이 약 30만인 천연 고분자 물질이며 10만정도의 분자가 사슬이 세 가닥으로 엮여져 α-나선형 구조를 갖고 있다. 콜라게나제(collagenase)는 진피 내에 있는 결합섬유인 콜라겐에 특이적으로 작용하는 matrix metalloprotease-1(MMP-1)으로서, 이 효소의 활성이 지나치게 많아지면 콜라겐이 과도하게 분해되어 깊은 주름이 형성된다. 따라서 MMP-1의 활성을 억제할 수 있다면, 피부노화를 지연시킬 수 있는 효과를 얻을 수 있다[61].

진피 내에 또 다른 피부 탄력을 유지하는 엘라스틴은 탄력섬유로서 진피 내 세포외 기질의 약 2~4%를 차지한다. 교원섬유에 비해 짧고 가늘며 그물구조 형태를 가지고 있고, 직선으로 확장되는 성질이 있다. 탄력섬유(elastic fiber)는 연령이 30~40세가 지나면 탄력소(elastin)의 파괴로 피부 노화가 일어나게 된다. 엘라스타아제(elastase)는 엘라스틴에 특이적으로 작용하는 효소로서 이것의 과도한 활성을 억제시킬 수 있다면 피부노화의 중요한 결과를 초래하는 엘라스틴의 감소를 방지할 수 있게 되어 피부의 탄력을 유지하고 피부노화의 방지가 가능하게 된다[74]. 기존의 엘라스타제 저해작용을 갖는 물질의 탐색이 진행된 결과 ursolic acid 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다[80].

3. 분리에 사용한 시료

본 연구에서는 제주도에 자생하고 있는 식물들의 미백, 항염증, 항주름, 항산화 관련 실험들을 수행하여 그 중 산박하, 털산박하, 조록나무, 왕모시풀, 곰의말채, 차풀 등 6개의 식물을 선별하고 그로부터 유효성분을 분리하였다. 그리고 분리되어 구조가 규명된 7개의 단일물질들의 활성을 확인함으로써 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 제시하고자 하였다.

1) 산박하(*Rabdosia inflexa*)는 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로 원산지는 한국, 일본, 중국 등지에 분포하고 산지에서 흔히 자란다. 높이는 40~100 cm로 자라며 줄기는 곧게 서고 모가 나며, 가지가 많이 갈라지고 전체에 잔털이 난다. 잎은 마주나고 삼각 달걀모양이며 길이 3~6 cm, 나비 2~4 cm이고, 밑은 잎자루의 날개같이 되고 가장자리에 둔한 톱니가 있다. 꽃은 6~8월에 파란빛을 띤 자줏빛으로 피고 줄기 위에 취산꽃차례[聚揀花序]로 달린다. 꽃 지름 길이 8~10 mm이며, 전체가 커다란 꽃이삭이 된다. 꽃받침은 종 모양이며 털이 나고 5갈래로 갈라지는데, 갈래 조각은 좁은 삼각형이다. 화관은 입술 모양으로서 윗입술은 위를 향하며 5갈래로 갈라지고, 아랫입술은 밑동이 볼록 나온 모양이다. 4개의 수술 중 2개가 길고, 암술은 1개이며 암술대는 2갈래로 갈라진다. 열매는 작은 견과로서 꽃받침 속에 들어 있으며 9~10월에 익는다. 어린순은 나물로 식용한다.

2) 털산박하는 다년초로서 줄기는 높이 40~00 cm이고 사각이 지고 능선에 백모가 있다. 잎은 대생하고 삼각상란형이며 길이 3~6 cm, 폭 2~4 cm이고 둔거치가 있으며 뒷면에 털이 많다. 산박하와 비슷하지만 잎 뒷면에 털이 많은 것이 다르다.

3) 조록나무는 쌍떡잎식물 장미목 조록나무과의 상록교목으로 한국(제주, 완도), 일본에 주로 분포하고 있으며 산기슭 저지대에 서식한다. 높이는 약 20 m 정도 되며 잎에 커다란 벌레집(충영)이 많이 생긴다. 목재는 가구재, 건축재로 쓰이며, 관상용으로 많이 사용된다. 현재 연구된 결과로 methyl gallate, kaempferol, quercetin, quercitrin 등의 성분이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 동의보감에서 조록나무 잎을 문모수(蚊母樹) 라고 하며 그 효능은 해독 소종, 거어이습의 효력이 있으며 주로 나력의 치료에 사용되어 왔다고 전해지고 있다.

4) 왕모시풀은 온몸에 짧은 털이 있고 잎은 마주나며 잎자루가 길고 넓은 난형이다. 끝이 뾰족하고 가장자리에 규칙적인 톱니가 있다. 표면에는 짧은 털, 뒷면에는 부드러운털이 밀생하고 7-8월에 꽃은 연노색의 이삭화서로 잎 겨드랑이에 달린다. 껍질은 섬유용으로 사용된다.

5) 곰의말채는 말채나무는 층층나무과에 속하고 웅수목(熊水木)이라고 한다. 산기슭이나 숲 가장자리에서 자란다. 높이 15 m 이상이다. 나무껍질은 회갈색이며 불규칙하게 세로로 갈라진다. 잎은 길이 8~18 cm로 녹색이며 마주나고 타원형 또는 넓은 달걀 모양이다. 잎 앞면에는 누운 잔털이 나고 뒷면에는 희고 억센 털이 많이 난

다. 잎자루는 길이 1~3 cm로 털이 없다. 6~8월에 잔가지 끝에서 흰색의 네갈래꽃이 취산꽃차례로 빽빽이 모여 핀다. 꽃차례는 지름 8~14 cm이며 1개의 암술과 4개의 수술이 있다. 꽃자루는 길이 3~4 cm이며 털이 없다. 꽃잎은 넓은 바소꼴이다. 열매는 둥글고 지름 6 mm 정도이며 10월에 푸른빛이 도는 검은색으로 익는다. 종자는 둥글며 오목한 점이 많다. 정원수로 가꾸기도 하고 목재는 공예재료로 쓴다. 한국, 일본, 타이완, 중국 등지에 분포한다.

6) 차풀은 콩과식물로 냇가 근처의 양지에서 자란다. 줄기는 높이가 30~60 cm이고 자줏빛이 도는 갈색이며 꼬부라진 털이 있다. 잎은 어긋나고 잎자루가 3~8 cm이며 30~70개의 작은잎으로 구성된 깃꼴겹잎이다. 작은잎은 줄 모양의 타원형이고 길이가 8~12 mm, 폭이 2~3 mm이며 가장자리가 밋밋하다. 턱잎은 바늘 모양 또는 줄 모양의 바소꼴이며 끝이 뾰족하다. 꽃은 7~8월에 황색으로 피고 잎겨드랑이에 1~2개씩 달린다. 꽃받침조각은 5개이고 바소꼴이며 털이 있고 길이가 5~6 mm이다. 꽃잎은 5개이고 달걀을 거꾸로 세운 모양이다. 수술은 4개이고, 암술은 1개이며, 씨방에 짧은 털이 있다. 열매는 협과이고 편평한 타원 모양이며 겉에 털이 있고 길이가 3~4 cm이다. 종자는 윤기가 있고 검은 색이다. 잎이 달린 줄기를 말린 것과 볶은 종자를 차로 이용한다. 한방에서는 잎과 줄기를 산편두(山扁豆)라는 약재로 쓰는데, 습열로 인한 황달과 식중독으로 인한 토사곽란에 효과가 있고 종창, 옻나무 독, 폐결핵에도 사용한다. 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료

실험에 사용된 시료들은 2004년부터 2006년까지 제주도에 자생하고 있는 식물 중 100여종의 식물들을 제주도 각 지역에서 채집하였고 화학과 천연물실험실에서 동정하였다. 채집한 시료들은 실내에서 통풍건조한 후 잘게 파쇄하여 80% 메탄올에 1~3달 동안 담근 후 3회 교반 추출하였고, 감압 농축하여 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck Co(USA), Junsei Co(JAPAN), Hyman Co사의 제품을 사용하였다. 효소 실험에 사용된 효소들과 기질 그리고 항산화 실험에 사용된 시약들과 대조군들 및 세포 배양에 사용된 시약들은 Sigma(St. Louis. MO. USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 FBS와 배지는 GIBCO(USA) 제품을 사용하였다. 분리과정에서 사용된 normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F_{254}. 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질 확인을 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. 분리에 사용한 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Sunfile^{TM} Prep-C ODS 5 ㎛ 19×150 ㎜ column을 장착한 Waters Delta Prep-c(Preparative Liquid Chromatography) 을 사용하였다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR System, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정 시 용매로는 CD_3OD과 $CDCl_3$이 사용되었다.

3. 실험 방법

3-1. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 uints/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

마우스 멜라닌 생성 세포인 Melan-a 세포는 10% FBS과 100 uints/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된 RPMI 1640(GIBCO, USA) 배지를 사용하기 직전에 100 nM Phorbol-12-myristate-13-acetate(TPA)를 첨가하여 37 ℃, 10% CO_2 항온기에서 배양하였다.

마우스 멜라노마 세포인 B16F10 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 uints/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

인간 섬유아세포인 HS68(normal human skin fibroblast)는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 uints/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco´s Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

3-2. 미백효과 측정

3-2-1. Tyrosinase 활성 억제 측정

50 μL의 추출시료용액(1 mg/mL)을 100 units/mL mushroom tyrosinase (Sigma Chemical Co), 0.1 M potassium phosphate buffer에 섞은 후 10분간 37 ℃의 수조에 배양한 후 200 mM의 L-tyrosine(10μL)을 첨가해 섞은 후 다시 10분간

37 ℃에서 배양한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 배양 전의 흡광도의 차이로 억제되는 정도를 측정하였다. 활성저해를 계산하는 식은 다음과 같다.

Tyrosinase inhibition (%) = [(D-C)-(B-A)]/(D-C)x100
A와 B는 각각 시료를 가지는 용액의 배양 전과 후의 흡광도
C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액의 배양 전과 후의 흡광도

여러 농도에서 저해 정도를 측정한 후에 IC_{50}(50%의 활성을 저해하는 시료의 농도)값을 계산하였다.

3-2-2. Melanin 생합성 저해율 측정

Melan-a cell은 non-tumorigenic mouse melanocyte cell line으로서 정상 mouse melanocyte의 성질을 대부분 가지고 있으면서도 immortalization 되어 실험에 용이하게 사용할 수 있다. 따라서 시료 추출물의 멜라닌 생성 억제 정도를 melan-a cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다. Melan-a cells을 RPMI 배지를 이용하여 24 well plate에 1×10^5 cells/mL로 plating 한 후, 시료를 처리하여 37 ℃, 10% CO_2 항온기에서 3일간 배양하였다. Plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 1 N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다.

B16 세포는 DMEM 배지를 사용하여 6 well plate에 1×0^5 cells/mL로 plating 한 후, 시료를 처리하여 37 ℃, 5% CO_2 항온기에서 3일간 배양하였다.

합성 멜라닌을 이용하여 standard solution을 만들고 sample과 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

3-2-3. UVB 조사에 따른 melanin 생합성 저해율 측정

Melan-a cells을 RPMI 배지를 이용하여 24 well plate에 1×10^5 cells/mL로 plating 한 후, 시료를 처리하여 37 ℃, 10% CO_2 항온기에서 하루 동안 배양하였다. 다음 날부터 이틀 동안 UVB 10, 50 mJ/cm^2로 조사한 후 시료가 들어있는 새배지로 교환하고 하루 동안 더 배양한 후 plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 1 N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다.

합성 멜라닌을 이용하여 표준용액을 만들고 시료와 표준용액을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

3-3. Nitric oxide 저해 활성 측정

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess regent로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24well plate에 접종하고, 실험물질과 LPS(1 ㎍/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite($NaNO_2$)를 serial dilution하여 얻었다(1-100 μM).

3-4. 주름 생성 억제 효과 측정

3-4-1. Elastase 활성 억제 측정

Elastase의 억제 효과는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 엘라스타제

활성을 측정하기 위하여, 완충용액 (0.2 M Tris, pH 8.0) 60 μL 에 기질 용액 (8.8 mM) 20 μL, 시료를 넣어 섞고, 효소 용액 20(10 ㎍/mL) μL를 넣어 흔들어 섞어 25 ℃에서 15분간 반응시키고, *p*-니트로아닐린(*p*-nitroaniline)의 생성량을 파장 410 nm 에서 흡광도(B)를 측정하였다.

Elastase inhibition (%) = [1- {(B-C) / (A-D) }] x 100

엘라스타제 저해활성 IC_{50}은 엘라스타제의 활성을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도(㎍/mL)를 표시하였다.

3-4-2. MMP-1 합성 억제 측정

MMP-1 활성억제능의 측정은 ELISA 방법으로 측정하였다. 진피세포인 HS68 (normal human skin fibroblast) cell line을 6×10^4 cells/well 농도로 12 well plate에 전배양, 약 80% confluency에 도달할 때 원배지를 제거한 후, serum free DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)과 시료를 0.1 mg/μL이 되도록 함께 첨가하여 37 ℃, 5% CO_2, incubator에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응 후 UVB(35 mJ/cm^2) 를 조사하고 serum free DMEM을 첨가하여 48시간 배양한 후 상등액을 취하여 immuno-well plate에 glutaraldehyde를 100 μL(10 μL/mL D.W)씩 well에 분주하고 37 ℃, 1시간 반응시킨 후 증류수로 well plate를 세척하고 물기를 제거하였다. 상기의 배양 상등액을 100 μL 분주하고 37 ℃, 1시간 반응시킨 후 MMP-1 antibody(mouse)를 1 : 1,000으로 washing solution(0.5% Tween 20 in PBS)에 희석하여 100 μL씩 분주하고 37 ℃, 1시간 반응시켰다. Anti-mouse IgG peroxidase conjugated를 1 : 30,000으로 washing solution에 희석하여 37 ℃, 1시간 반응시킨 후 기질[TMB(Tetramethylbenzidine) 10 mg/μL DMSO, 3% H_2O_2, 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.1)]을 well당 200 μL 씩 넣어 15 분간 빛을 차단하여 반응시켰다. 1 M H_2SO_4 50 μL를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 micro plate reader(Model 550, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 MMP-1 억제활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

Inhibitory activity of MMP-1 secretion (%)

$$=[1-(As-Ab)/(As-Ab)]\times 100$$

Ac : 형광등 조사 대조구 medium의 흡광도

Ab : UVB를 조사하고 sample 처리하지 않은 medium의 흡광도

As : UVB를 조사하고 sample 처리한 medium의 흡광도

3-4-3. MMP-1 활성 억제 측정

Assay buffer(K1173)로 inhibitor를 1/200, 기질(P125-9090)을 assay buffer를 사용하여 1/25, MMP-1 enzyme을 assay buffer를 사용하여 1/40로 희석해 37 ℃를 유지 하여 반응시켰다. Assay buffer를 well plate에 blank 90 μL, control 70 μL, inhibitor NNGH(N-Isobutyl-N-[4-methoxyphenylsulfonyl]glycyl hydroxamic acid) 50 μL를 각각 넣고, 희석된 MMP-1 (15.3U)을 control, inhibitor NNGH, test inhibitor well에 20 μL씩 첨가하였다. 희석된 NNGH inhibitor를 NNGH well에만 20 μL 첨가하였다. Inhibitor와 enzyme의 반응을 위하여 37 ℃에서 30~60분 동안 plate를 배양하였다. 희석된 10 μL substrate(P125-9090)를 넣으면 반응이 시작되고, microplate reader의 412 nm에서 1분 간격으로 10~20분 동안 측정하여 억제율을 구하였다.

3-5. 항산화 효과 측정

3-5-1. DPPH에 의한 라디칼 소거 측정

시료의 항산화 활성은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 방법을 이용하였다. DPPH 시약을 EtOH을 용매로 0.3 mM 농도가 되게 한 후 이용액 450 μL에 여러 농도의 시료용액 5 μL를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 시킨 시료는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 라디칼 소거활성은(Inhibition activity, IC_{50})으로 표시하

며 IC_{50}은 DPPH radical이 50% 소거되는데 필요한 농도로 나타낸다. Free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity}\ (\%) = \frac{A-(B-C)}{A} \times 100$$

A는 시료가 포함되지 않은 DPPH의 흡광도이고, B는 DPPH와 시료 용액의 혼합액의 흡광도이며 C는 시료 자체의 흡광도 이다.

3-5-2. NO 소거 활성 측정

NO를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside(SNP)를 사용하여 시료의 NO 소거 활성을 검색하였다[81,82]. 10 mM SNP 용액 100 μL에 시료를 농도별로 첨가하고 25℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess 시약 [2.5%(v/v) phosporic acid에 1%(w/v) sulfanilamide와 0.1%(w/v) naphthylethylene-diamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 NO 소거 활성을 산출하였다. NO 소거 효능은 NO가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였다.

3-5-3. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고[83], superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법으로 560 nm에서 측정하였다[84]. 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer(pH 7.5) 100 μL에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT(Nitroblue Tetrazolium)를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였다.

3-6. 세포 생존율 및 세포 독성 측정

3-6-1. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

Melan-a cells을 RPMI 배지를 이용하여 24 well plate에 1×10^5 cells/mL로 plating 한 후, 시료를 처리하여 37 ℃, 10% CO_2 항온기에서 하루 동안 배양하였다. 다음 날부터 시료가 들어있는 새배지로 3일간 매일 교환하고 하루 동안 더 배양한 후 plate의 배지 제거 후 MTT(50 ㎎/mL) 시약을 처리(0.1 ㎎)하여 형성된 formazan을 DMSO에 녹인 후 540 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다.

3-6-2. LDH release를 이용한 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지에 시험 약물과 LPS (1 ㎍/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH(lactate dehydrogenase) 활성을 non-radioactive cytotoxicity assay kit(promega, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배지 50 μL와 reconstituted substrate mix를 50 μL를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μL의 stop solution을 넣어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

3-7. RNA 분리 및 RT-PCR

3-7-1. RNA 분리

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 total RNA 추출은 TRIzol(Invitrogen, USA)을 이용하여 분리하였다. 세포에 TRIzol을 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하였다. 상등액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 8 min)하여 RNA를 침전시키고 75%의

diethylpyrocarbonate(DEPC) 처리된 EtOH을 첨가한 후 원심분리(10,000 rpm, 5 min)하였으며, 상등액을 비워내고 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A_{260}/A_{280} nm의 비율이 1.6~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다.

3-7-2. UVB 조사한 mealan-a 세포의 RT-PCR

Melan-a cells을 RPMI 배지를 이용하여 60 mm plate에 4.5×10^5 cells/well로 plating 한 후, 시료를 처리하여 37 ℃, 10% CO_2 항온기에서 하루 동안 배양하였다. 다음 날부터 이틀 동안 UVB 10 mJ/cm^{2}와 50 mJ/cm^{2}로 조사한 후 시료가 들어있는 새배지로 교환하고 하루 동안 더 배양한 후 plate의 배지를 제거하고 TRIzol(Invitrogen, USA) 을 이용하여 RNA를 추출하였다. 1 μL의 total RNA를 oligo$(dT)_{18}$ primer, dNTP(0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70 ℃ 5 min, 4 ℃ 5 min, 37 ℃ 60 min, 그리고 70 ℃에서 10 min heating시켜 cDNA를 합성하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 primer들을 증폭시키기 위하여 2 μL cDNA, 10×buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 1 unit Taq polymerase(Promega, USA)를 증류수로 전체를 25 μL로 맞춘 후 94 ℃에서 45초간 denaturation, 55 ℃에서 45초간 annealing, 72 ℃에서 90초간 extension을 28 cycles 수행하여 amplification 하였다. 사용된 primer는 Table 1에 정리하였다.

3-7-3. RAW 264.7 세포의 RT-PCR

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 실험물질과 LPS(1 ㎍/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 배지를 깨끗이 제거한 후 TRIzol(Invitrogen, USA) 을 이용하여 RNA를 추출하였다. 1 μL의 total RNA를 oligo$(dT)_{18}$ primer, dNTP(0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70 ℃ 5 min, 4 ℃ 5 min, 37 ℃ 60 min, 그리고 70 ℃에서 10 min heating시켜 cDNA를 합성하였

다. Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 primer들을 증폭시키기 위하여 2 μL cDNA, 10×buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 1 unit Taq polymerase(Promega, USA)를 증류수로 전체를 25 μL로 맞춘 후 94 ℃에서 30초간 denaturation, 58 ℃에서 30초간 annealing, 72 ℃에서 40초간 extension을 30 cycles 수행하여 amplification 하였다. 사용된 primer는 Table 2에 정리하였다.

3-8. 전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 100 μL의 lysis buffer을 첨가하고, 30분 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA(Bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit(Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 30~50 μg의 단백질을 8~12% mini gel Poly Acrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane(Bio-Rad, USA)에 15V로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS(Tris-buffered saline) + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. 반응이 끝난 뒤에 1차 항체(1:500 - 1:2000)가 들어있는 5% skim milk에서 1시간(25 ^{o}C) 또는 24시간(4 ^{o}C)동안 반응시킨 후, TTBS로 3회 세척하고 2차 항체(1:10000)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 TTBS로 5회 세척하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

Table 1. The primer sequences of the genes involved in melanin synthesis and the expected size of their PCR products.

Gene	Primer sequences (5′-3′)	Fragment size(bp)
β-Actin	R : TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C F : TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	349
Tyrosinase	R : GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT F : TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC	477
TRP-1	R : GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC F : AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT	268
TRP-2	R : GTT GCT CTG CGG TTA GGA AG F : TGT GCA AGA TTG CCT GTC TC	380
Mitf	R : TGA TGA TCC GAT TCA CCA GA F : AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG	389
c-kit	R : ATC CCG ACT TTG TCA GAT GG F : CAC GTT TTT GAT GGT GAT GC	350
SCF	R : TGG AAT CTT TCT CGG GAC CT F : GGT GGC AAA TCT TCC AAA TG	398
SLF	R : GGC CTC TTC GGA GAT TCT TT F : CCT CTC GTC AAA ACC AAG GA	329
MC1-R	R : CCA GGA AGC AGA GAC TGG AC F : ACT CCA ATG CCA CCT CTC AC	357
MSH	R : GAC CTG CTC CAA GCC TAA TG F : GCT TGC AAA CTC GAC CTC TC	387

R : reverse F : forward

Table 2. The primer sequences of the genes involved in inflammation and the expected size of their PCR products.

Gene	Primer sequences (5′-3′)	Fragment size(bp)
β-Actin	R : TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C F : TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	603
iNOS	F : CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C R : GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G	496
COX-2	F : CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT R : ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT	696
TNF-α	F : TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG R : ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT	364
IL-6	F : GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG R : TGC TGG TGA CAA CCA CGG CC	308
IL-1β	F : CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC R : CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC	447

3-9. 추출물을 첨가한 화장품 안정성 측정

3-9-1. 산박하 및 털산박하 추출물을 첨가한 O/W emulsion 제조 방법

산박하와 털산박하 에틸아세테이트 추출물을 첨가한 O/W emulsion은 Table 3의 처방에 따라 제조하였다. 70 ℃까지 가온한 정제수에 A상에 있는 모든 원료를 넣어 용해시킨다. B상도 다른 용기에 약 70 ℃까지 가온하여 용해시킨 후 B상을 A상에 넣고 3500 rpm으로 5분간 Homo mixer로 혼합한다. C상을 미리 베이스화 하여 준비한 후에 A와 B가 섞인 곳에 C상을 투입한 후 3500 rpm으로 3분간 유화시킨다. 유화가 끝난 후 45 ℃까지 냉각한 후 미리 준비한 D상을 투입하고는 2500 rpm으로 2분간 잘 섞어준 후 30 ℃까지 냉각하고, 탈기한다. 단, 세포 실험에 사용된 에멀젼

제조 시에는 방부제로 사용된 Germall 115를 첨가하지 않고 실험에 사용하였다.

Table 3. Method and materials used in the preparation of emulsion.

구분	원료명	INCI Name	기능	함량
A	D.I.Water		용매, 수분공급효과	to 100
	EDTA-2Na		킬레이팅제, 변색방지	0.02
	Glycerine		보습제	6.0
	1.3BG	Butylenr Glycol	보습제	4.0
	TEA	Triethanolamine	중화제	0.2
	M.P	Methyl Paraben	방부제	0.2
B	Lanette O	Cetearyl Alcohol	보조안정화, 사용감	1.0
	Stearic Acid		보조안정화, 사용감	0.6
	Lily-70	Mineral Oil	에몰리엔트	8.0
	Squalane		에몰리엔트	2.0
	CEH	Cethylethyl Hexanoate	에몰리엔트	3.0
	P.P	Propyl Paraben	방부제	0.1
	Kalcohol 6870	Cetyl Alcohol	보조안정화, 사용감	0.5
	Tween 60	Polysorbate-60	주유화제	1.2
	Arlacel 83	Sorbitan sesquioleate	보조유화제	0.3
C	D.I Water			14.0
	Carbopol 941	Carbomer	점증제	0.14
D	Fragrance		부향효과	적량
	미용성분		진정, 수렴, 자극완화등	0.2
	Germall 115	Imidazolydinyl Urea	방부제	0.2

3-9-2. pH 측정

화장품의 pH 측정은 istek사의 pH meter를 이용하여 산박하와 털산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 에멀젼의 pH를 측정하였다. 측정하기 전 유리전극을 pH 용액으로 정확히 보정한 후 사용하였다.

3-10. 유효성분을 함유한 추출물에서의 추출 및 분리

3-10-1. 산박하 추출 및 분리

산박하 지상부 건조 분말 142 g을 80% 메탄올 15 L를 가하여 실온에서 두 달간 추출하였다. 추출한 시료를 감압여과 장치를 통하여 여액을 취하여 감압농축 하여 80% 메탄올 추출물 20 g을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하여 에틸아세테이트층 4.478 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 농축액을 셀라이트에 흡착시킨 후, 칼럼에 충진하여 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 메탄올로 순차적으로 용출하였다. 그중 멜라닌 생합성 억제 효능이 좋았던 메틸렌클로라이드 분획물 3.297 g을 순상 실리카겔 컬럼을 수행하였다. 이때 사용한 용리액으로는 순차적으로 클로로포름에서 100% 메탄올을 통과시켜 총 11개의 분획을 얻어내었고, 이 중 fr2 1.53 g을 다시 순상 컬럼($CHCl_3$:MeOH=10:1)을 통하여 6개의 분획을 얻었고, 그 중 fr2-2(0.854 g)을 다시 순상 컬럼($CHCl_3$:MeOH=15:1)을 통하여 7개의 분획을 얻었다. 분획 fr2-2-3은 다시 prep-HPLC를 실시하여 RIE-1(henryin, 5.2 mg)을 얻었다. fr2-2-4~fr2-2-6은 TLC상으로 같은 위치의 spot으로 나타나 하나로 합친 후 prep-HPLC를 수행하여 RIE-2(kamebakaurin, 18.5 mg)을 얻었다. fr2-4(234.3 mg)에서는 클로로포름:메탄올(9:1)을 전개용매로 사용하여 순상 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 총 5개의 분획을 얻었고, 이 분획중 2-4-4를 다시 순상 실리카겔 컬럼을 수행하여 10개의 분획을 얻었다. 10개의 분획 중 fr2-4-4-6~fr2-4-4-8의 TLC상으로 같은 위치의 spot으로 나타나 하나로 합친 후 prep-HPLC를 수행하여 RIE-3(excisanin A, 3.5 mg)을 얻었다. 한편 fr3(1.312 g)에

서는 클로로포름:메탄올(9:1)을 전개용매로 사용하여 순상 실리카겔 컬럼을 행하여 10개의 분획을 얻었고, 그중 fr3-5(223.4 mg)을 prep-HPLC를 수행하여 RIE-2 (kamebakaurin, 13.3 mg)을 얻었다. prep-HPLC에 사용한 분리 조건은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution.

Program order	Time	Flow	H_2O	Acetonitrile	Curve
1		1.00	95.0	5.0	
2	5.00	1.00	95.0	5.0	6
3	10.00	1.00	90.0	10.0	6
4	30.00	1.00	80.0	20.0	6
5	40.00	1.00	80.0	20.0	6
6	50.00	1.00	70.0	30.0	6
7	60.00	1.00	70.0	30.0	6
8	70.00	1.00	50.0	50.0	6
9	80.00	1.00	50.0	50.0	6
10	81.00	1.00	0.0	100.0	6
11	90.00	1.00	0.0	100.0	6
12	91.00	1.00	95.0	5.0	6
13	100.00	1.00	95.0	5.0	6

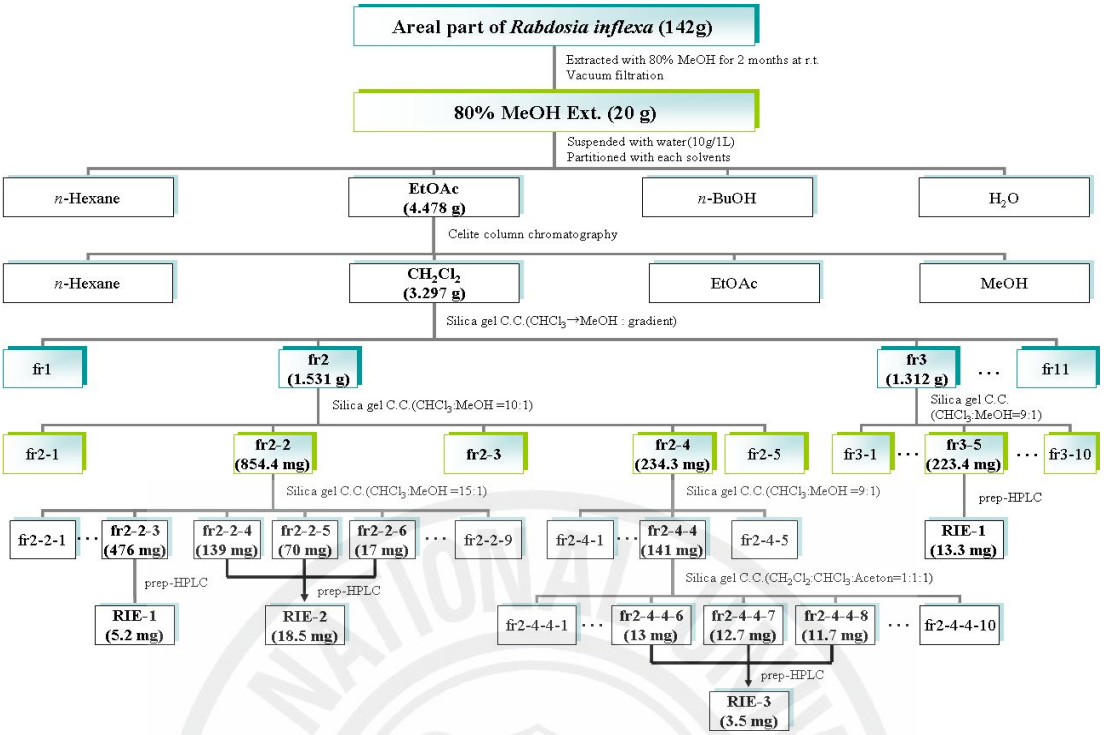


Figure 1. Isolation procedures for *Rabdosia inflexa*

3-10-2. 털산박하 추출 및 분리

털산박하 지상부 건조분말 181 g을 80% 메탄올 15 L를 가하여 실온에서 두 달간 추출하였다. 추출한 시료를 감압여과 장치를 통하여 여액을 취하여 감압농축 하여 80% 메탄올 추출물 20 g을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하여 에틸아세테이트층 3 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 농축액을 실리카겔 컬럼에 흡착시킨 후 헥산:에틸아세테이트(1:2) 용리액으로 용출하여 10개의 분획을 얻었다. 그 중 fr6 분획(200 mg)을 다시 순상 실리카겔 컬럼($CHCl_3$:MeOH=7:1)을 수행하여 다시 5개의 분획을 얻었고, 얻어진 분획 중 fr6-2(99 mg)을 가지고 다시 순상 실리카겔 컬럼($CHCl_3$:MeOH=9:1)을 수행하여 5개의 분획을 얻었다. 이 중 활성이 좋았던 fr6-2-3 분획(32 mg)을 prep-HPLC를 통하여 IIE-1(kamebakaurin, 4 mg)을 얻었다. prep-HPLC에 사용한 분리 조건은 Table 4에 나타내었다.

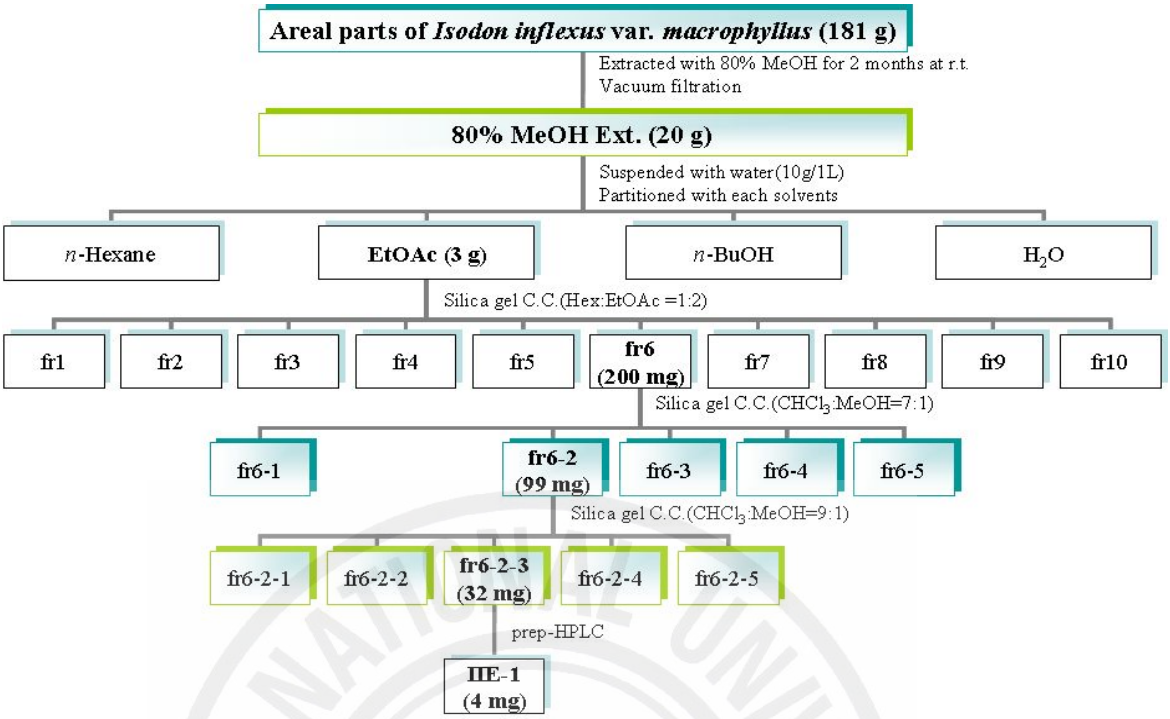


Figure 2. Isolation procedures for *Isodon inflexus* var. *canescens*

3-10-3. 조록나무 추출 및 분리

조록나무 잎 건조분말 580 g을 25 L 부피의 광구병(jar)에 넣고 20 L의 80% 메탄올을 가하여 실온에서 두 달간 추출하여 추출액을 수득한 후, 여과지(0.25 mm size)를 사용한 감압 여과를 2회 반복 실시하여 추출잔사를 제거하였다. 여과된 여과액을 회전감압농축기를 사용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 물이 조금 남은 상태에서 -75 ℃의 초저온 냉동고에 이틀 정도 냉동시킨 후 동결 건조하여 약 42.622 g의 80% 메탄올 추출물을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하여 에틸아세테이트층 5.001 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 농축액을 셀라이트에 흡착시킨 후, 칼럼에 충진하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 메탄올로 순차적으로 용출하였다. 용매분획 중 항산화 및 항주름 활성이 좋았던 에틸아세테이트

분획을 가지고 sephadex 컬럼을 수행하였다. 전개용매로는 메탄올로 사용하여 총 11개의 분획을 얻었다. 이 중 fr9(102 mg)을 prep-HPLC(ACN:H_2O=10:90→50:50)를 이용하여 DRE-1 (PGG, 42 mg)을 얻었다.

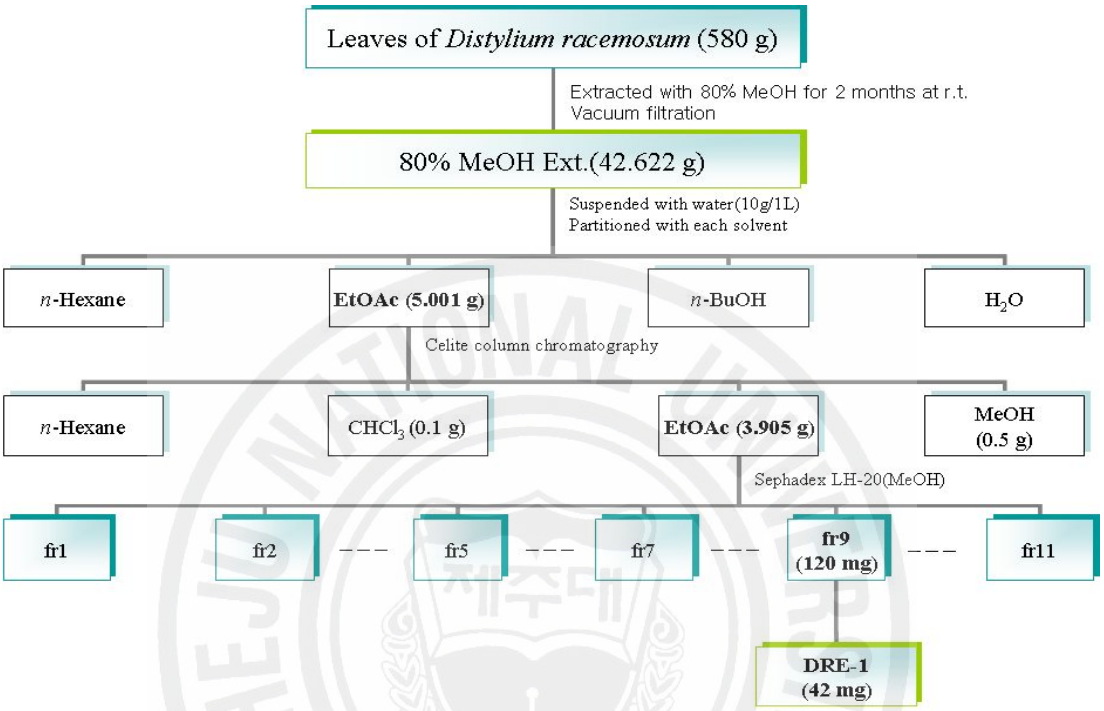


Figure 3. Isolation procedures for *Distylium racemosum*

3-10-4. 왕모시풀 뿌리 추출 및 분리

왕모시풀 뿌리 건조분말 485 g을 25 L 부피의 광구병(jar)에 넣고 20 L의 80% 메탄올을 가하여 실온에서 두 달간 추출하여 추출액을 수득한 후, 여과지(0.25 mm size)를 사용한 감압 여과를 2회 반복 실시하여 추출잔사를 제거하였다. 여과된 여과액을 회전감압농축기를 사용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 물이 조금 남은 상태에서 -75 ℃의 초저온 냉동고에 이틀정도 냉동시킨 후 동결 건조하여 약 43 g 의 80% 메탄올 추출물을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하

여 에틸아세테이트층 8.2 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 추출물중 5 g을 취하여 실리카겔 컬럼에 흡착시킨 후 순차적으로 용리액 $CHCl_3$ → MeOH)을 통과시켜 총 9개의 분획을 얻었다. 그 중 fr4(153 mg)을 순상 실리카겔컬럼에 흡착시킨 후 클로로포름:메탄올(3:1) 용매로 용출하여 4개의 분획을 얻었다. 분획 fr4-3(53 mg)을 클로로포름:메탄올(4:1)을 전개용매로 사용하여 순상 실리카겔 컬럼을 수행하여 다시 3개의 분획을 얻었다. 얻어진 분획 중 활성이 좋았던 fr4-3-3(40.8 mg)을 prep-HPLC를 이용하여 BPE-1(epicatechine, 20.2 mg)을 얻었다. prep-HPLC에 사용한 분리 조건은 Table 4에 나타내었다.

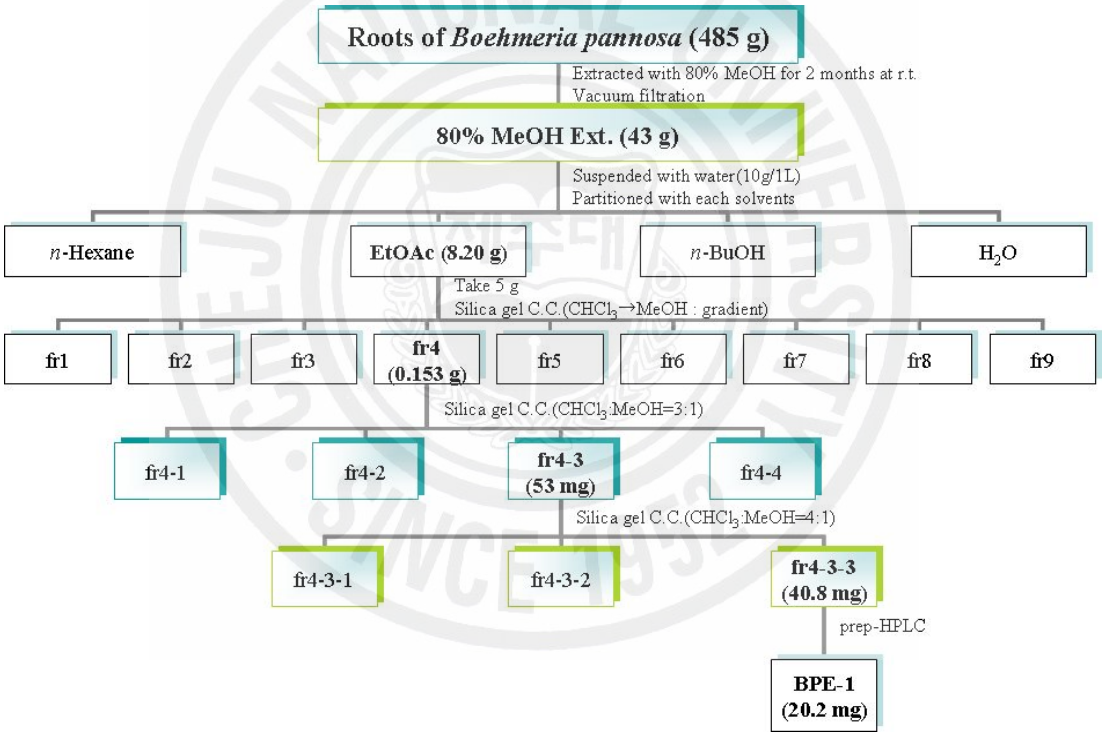


Figure 4. Isolation procedures for the roots of *Boehmeria Pannosa*

3-10-5. 곰의 말채 추출 및 분리

곰의 말채의 잎 건조분말 45 g을 25 L 부피의 광구병(jar)에 넣고 10 L의 80% 메탄올을 가하여 실온에서 두 달간 추출하여 추출액을 수득한 후, 여과지(0.25 mm size)를 사용한 감압 여과를 2회 반복 실시하여 추출잔사를 제거하였다. 여과된 여과액을 회전감압농축기를 사용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 물이 조금 남은 상태에서 -75℃의 초저온 냉동고에 이틀정도 냉동시킨 후 동결 건조하여 약 10 g 의 80% 메탄올 추출물을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하여 에틸아세테이트층 3.62 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 추출물 중 1 g을 취하여 역상 실리카겔 컬럼에 흡착시킨 후 60% 메탄올을 전개용매로 사용하여 2개의 분획을 얻은 후, 그 중 fr1 분획을 prep-HPLC를 이용하여 CME-1(quercitrin, 74.2 mg)을 얻었다. prep-HPLC에 사용한 분리 조건은 Table 4에 나타내었다.

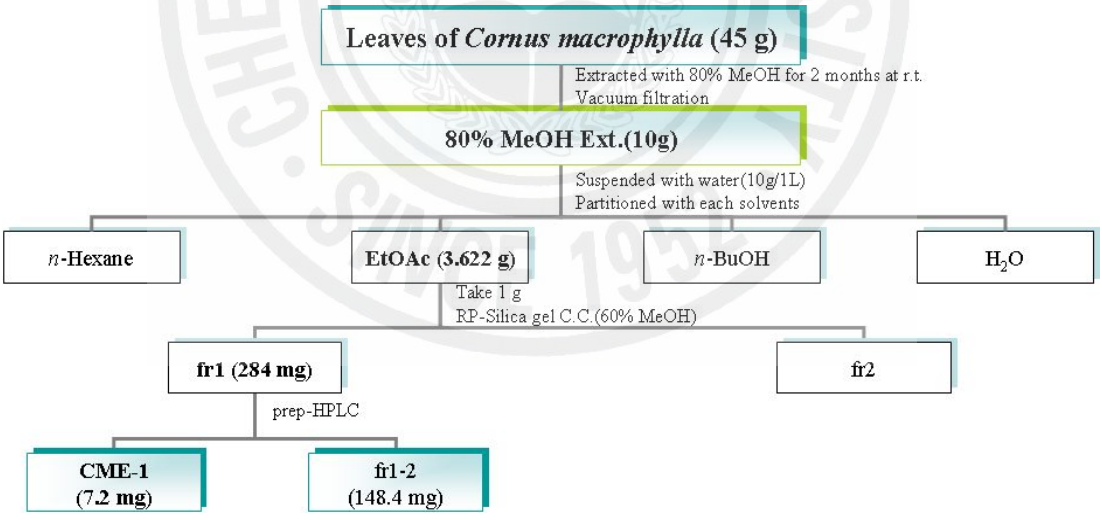


Figure 5. Isolation procedures for *Cornus macrophylla*

3-10-6. 차풀 추출 및 분리

차풀의 지상부 건조분말 62 g을 25 L 부피의 광구병(jar)에 넣고 10 L의 80% 메탄올을 가하여 실온에서 두 달간 추출하여 추출액을 수득한 후, 여과지(0.25 mm size)를 사용한 감압 여과를 2회 반복 실시하여 추출잔사를 제거하였다. 여과된 여과액을 회전감압농축기를 사용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 물이 조금 남은 상태에서 -75℃의 초저온 냉동고에 이틀정도 냉동시킨 후 동결 건조하여 약 10 g 의 80% 메탄올 추출물을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별깔대기에서 헥산으로 추출하여 헥산층을 제거한 후 에틸아세테이트로 다시 추출하여 에틸아세테이트층 1.5 g을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 추출물 1.5 g을 취하여 실리카겔 컬럼에 흡착시킨 후 헥산:에틸아세테이트:메탄올(1:6:0.3)을 전개용매로 사용하여 2개의 분획을 얻은 후, 그 중 fr1분획을 prep-HPLC를 이용하여 CMNE-1 (luteolin, 12.2 mg)을 얻었다. prep-HPLC에 사용한 분리 조건은 Table 4에 나타내었다.

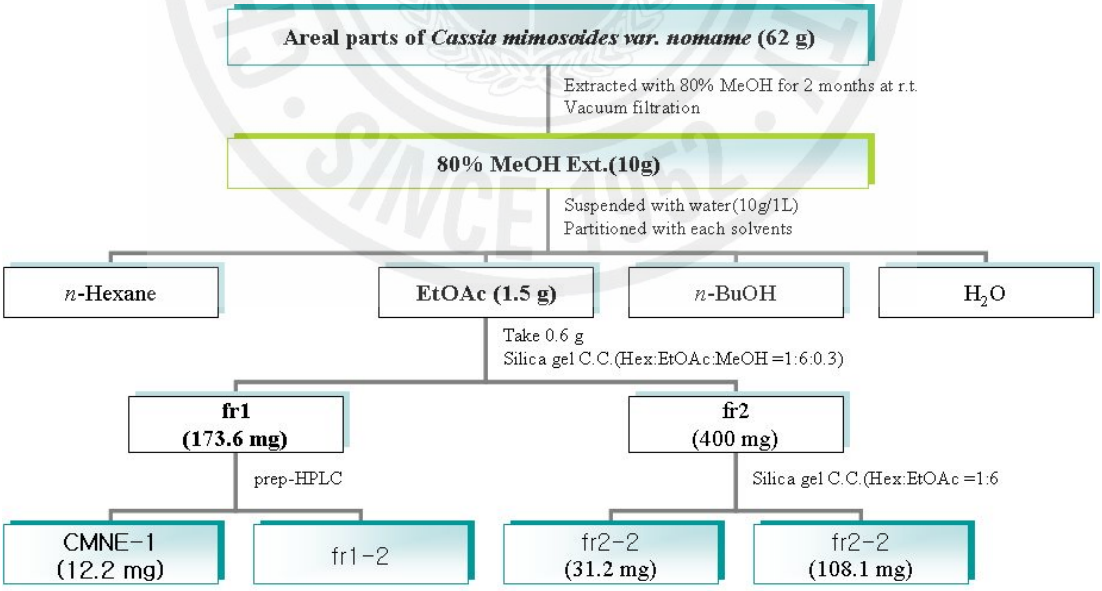


Figure 6. Isolation procedures for *Cassia mimosoides* var. *nomame*

Ⅲ. 결　　과

1. 산박하 추출물의 활성 결과

1-1. 미백효과

1-1-1. 산박하 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과

1-1-1-1. 산박하 1차 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율

산박하 추출물을 용매 분획하여 melan-a 세포에서의 멜라닌 생합성 저해율을 확인한 결과, 메탄올 조추출물에서는 처리농도(50 ㎍/mL)에서 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 않고 유효한 효능이 나온 반면, 분획층에서는 에틸아세테이트 분획물이 멜라닌 생합성 저해 효과(83.4%)가 가장 좋았다(Figure 7a). 그러나 처리농도(50 ㎍/mL)에서 세포 생존율이 낮게 나와 이러한 멜라닌 생합성 억제 효능이 세포 생존을 억제 하여 나온 결과인지를 확인하기 위하여 시료 농도를 낮추어 melan-a 세포와 B16세포의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다.

시료의 농도 10 ㎍/mL, 5 ㎍/mL로 처리한 결과 melan-a 세포에서는 멜라닌 생합성 억제 효과는 각각 82%와 66.3%로 지속되면서 MTT를 이용한 세포 증식에는 각각 10.2%와 6.1로 거의 영향을 미치지 않았고 대조군으로 사용된 arbutin(melanin content 50 ㎍/mL:48.3%, MTT 50 ㎍/mL:-3.7%)에 비해서도 좋은 효과를 나타내었다(Figure 7b).

B16F1 세포를 통한 멜라닌 생합성 억제 효과(10 ㎍/mL:76.1%, 5 ㎍/mL: 64.8%)에서도 세포 증식에는 영향을 미치지 않고(10 ㎍/mL:-1.1%, 5 ㎍/mL: -5.0%) 대조군인 arbutin(melanin content 500 ㎍/mL:37%, MTT 500 ㎍/mL: 6.5%)이나 hydroquinone(melanin content 1 ㎍/mL:65.8%, MTT 1 ㎍/mL: 7.4%) 비해 우수한 억제 효과를 나타내었다(Figure 8a). B16F10 세포를 이용한 에틸아세테이트 층의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과(10 ㎍/mL: 60.7%, 5 ㎍/mL:42.9%)도 다른 세

포와 마찬가지로 대조군으로 사용된 arbutin(melanin content 100 ㎍/mL:12.5%, MTT 1 ㎍/mL:4.3%)이나 hydroquinone(melanin content 0.5 ㎍/mL:39.2%, MTT 0.5 ㎍/mL:12.7%)에 비해 세포 증식에 영향을 미치지 않는 범위에서 좋은 효과를 나타내었다(Figure 8b).

a) b)

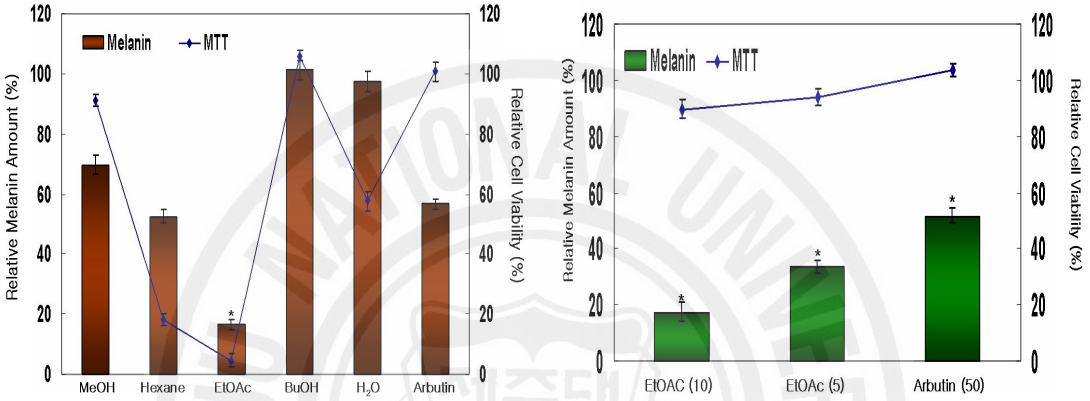


Figure 7. Effects of extracts of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. (a) Effects of 80% MeOH extract and subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Concentration of samples was 50 ㎍/mL. (b) Effects of EtOAc fractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Concentrations of samples were 10 ㎍/mL and 5 ㎍/mL. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Data were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

a) b)

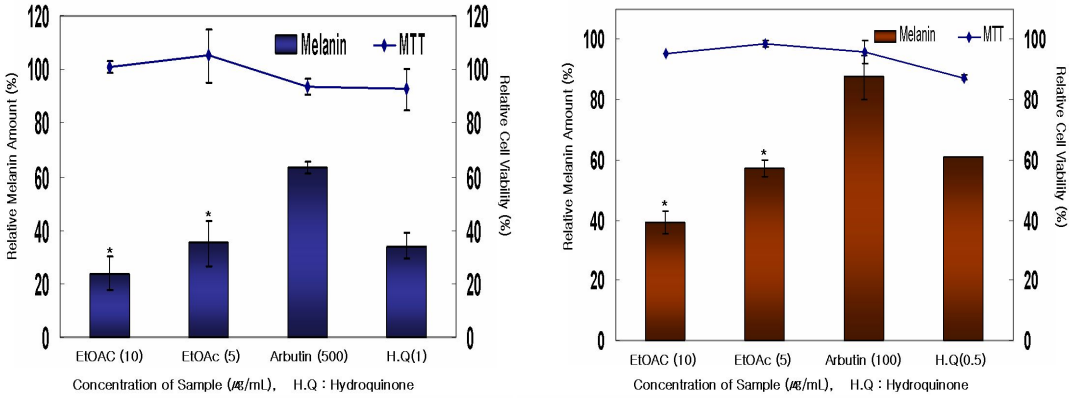
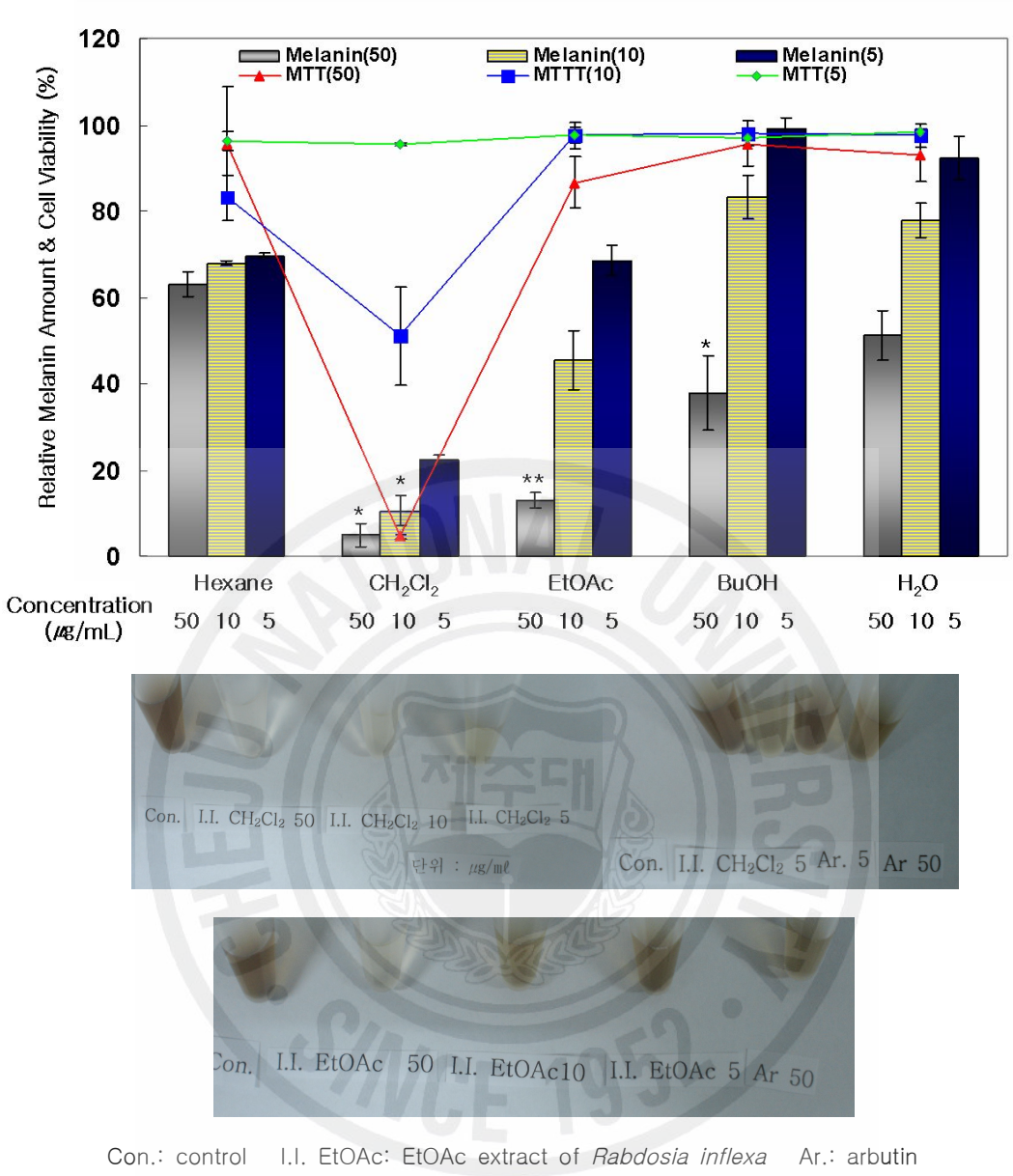


Figure 8. Effects of EtOAc fractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in B16F1 cells. (a) Results used B16F1 cells. (b) Results used B16F11 cells. B16 cells were cultured for 96h inducing melanogenesis. When 24h passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 2 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

1-1-1-2. 산박하 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생합성 저해율

Mouse 멜라닌형성세포 3종류에서 산박하 에틸아세테이트 분획물이 세포 증식에 영향을 미치지 않는 농도에서 멜라닌 생합성 억제 효과가 우수하게 측정되어 이 분획물을 셀라이트를 거쳐 우선 4개의 분획으로 나누어 melan-a 세포를 이용하여 분획들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하였다. 시료의 농도를 50 ㎍/mL으로 처리한 경우 디클로로메탄 용매 분획물이 가장 탁월한 멜라닌 생성 억제 효과(95.1%)를 보였으나, 처리 농도에서 세포 증식도 강하게 억제(95.4%)하여 그로 인한 멜라닌 억제 효과가 나타나고 있는 지를 확인하기 위하여 농도를 낮추어 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다. 시료의 처리 농도를 10 ㎍/mL으로 하였을 때 멜라닌 생합성 억제 효과(89.4%)는 여전히 우수하였으나, 이 농도에서도 세포 증식 억제(49%)를 나타내어, 세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않는 5 ㎍/mL에서의 멜라닌 생합성 억제 효과(77.5%, MTT 8.5%)를 확인 한 결과, 대조군인 arbutin(melanin content 50 ㎍/mL:48.9%, MTT 50 ㎍/mL:7.0%, melanin content 5 ㎍/mL:7.8, MTT 5 ㎍/mL:1.7) 보다 우수한 효과를 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 다른 분획층인 에틸아세테이트 층에서도 시료 처리 농도 50 ㎍/mL에서 세포 증식에 큰 영향을 미치지 않으면서(13.4%) 우수한 멜라닌 생성 억제 효과(87.1%)를 나타내었고, 10 ㎍/mL(54.6%), 5 ㎍/mL(31.5%) 처리 농도 에서도 대조군인 arbutin(50 ㎍/mL:48.9%, 10 ㎍/mL:22.1%, 5 ㎍/mL:7.8%) 보다 우수한 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인 할 수 있었다(Figure 9). 이러한 결과를 통하여 산박하 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 보이는 유효성분이 디클로로메탄 분획과 에틸아세테이트 분획에 집중되어 있을 것으로 예측할 수 있었다.



Con.: control I.I. EtOAc: EtOAc extract of *Rabdosia inflexa* Ar.: arbutin

Figure 9. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

1-1-1-3. 산박하 디클로로메탄 분획물의 멜라닌 생합성 저해율

산박하 에틸아세테이트 분획물을 셀라이트 한 분획 중 세포 생존에 영향을 미치지 않는 낮은 농도에서도 멜라닌 생합성 억제 효과가 우수한 디클로로메탄 분획을 클로로포름과 메탄올을 이용하여 메탄올의 함량을 0%~100% 증가 시키면서 순차적으로 얻어낸 용매 분획을 melan-a 세포를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정 하였다. Melan-a 세포에 시료를 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL 두 개의 농도로 처리하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 5 ㎍/mL의 농도에서는 fr3이 가장 좋은 억제 효과(80.0%)를 보였으나 약간의 세포 증식에 영향을 주었고(17.4%), 다음으로 fr4(63.1%)와 fr2가 좋은 효과(59.5%)를 나타내었다. 1 ㎍/mL의 처리 농도에서 역시 fr3이 가장 좋은 효과(38.3%)를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effects of subfractions of CH_2Cl_2 extract of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells.

Fractions	처리농도 5 ㎍/mL		처리농도 1 ㎍/mL	
	Melanin content (%)	MTT (%)	Melanin content (%)	MTT (%)
fr1	16.4 ± 3.5	1.0 ± 1.0	-1.1 ± 1.3	-2.8 ± 5.7
fr2	59.5 ± 1.3	3.3 ± 6.6	10.7 ± 13.4	-5.0 ± 0.3
fr3	80.0 ± 3.8	17.4 ± 18.4	38.3 ± 9.9	-3.5 ± 1.2
fr4	63.1 ± 2.8	6.8 ± 1.3	22.5 ± 0.9	-7.7 ± 2.5
fr5	33.4 ± 9.3	9.3 ± 2.6	5.7 ± 9.3	-1.9 ± 1.9
fr6	29.4 ± 22.9	11.0 ± 8.3	5.4 ± 5.4	1.6 ± 0.6
fr7	-3.1 ± 23.2	11.8 ± 9.1	7.7 ± 3.9	0.0 ± 0.0
fr8	22.5 ± 4.7	10.2 ± 6.8	18.3 ± 4.2	-2.7 ± 6.2
fr9	15.7 ± 4.0	4.0 ± 1.3	17.8 ± 4.5	1.0 ± 2.7
fr10	17 ± 2.5	6.3 ± 3.6	8.7 ± 8.3	3.3 ± 1.3
fr11	2.3 ± 2.7	15.2 ± 1.0	9.3 ± 14.8	10.1 ± 1.2
arbutin 50	38.4 ± 9.9	-1.9 ± 1.3		

The data expressed as means ± S.D. of three determinations.

1-1-1-4. 산박하 fr2 분획물의 멜라닌 생합성 저해율

클로로포름과 메탄올을 이용하여 순차적으로 분리한 분획중 fr2를 컬럼을 통해 얻어진 6개의 분획들의 melan-a 세포에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 각 분획을 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 시료 농도로 처리한 결과 5 ㎍/mL 처리 농도에서는 fr2-2(87.2%), fr2-3(86.8%), fr2-4(85.1%)가 거의 비슷한 수준의 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었으며, 1 ㎍/mL 처리 농도에서는 fr2-4 (57.5%)가 가장 우수한 효과를 나타내었으며, 이것은 arbutin 50 ㎍/mL(49.3%) 처리 농도에서 보다도 더 좋은 효과를 보였다(Table 6).

Table 6. Effects of fr2 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells.

Melan-a (㎍/mL)	Melanin contents(%)	MTT (%)
fr2-1 (5)	-43.4 ± 1.5	9.1 ± 0.7
fr2-2 (5)	87.2 ± 1.7	8.4 ± 3.2
fr2-3 (5)	86.8 ± 1.4	9.8 ± 1.2
fr2-4 (5)	85.1 ± 1.4	7.6 ± 1.8
fr2-5 (5)	17.4 ± 2.2	0.2 ± 2.7
fr2-6 (5)	3.9 ± 3.5	5.9 ± 4.7
fr2-1 (1)	-23.3 ± 2.0	9.4 ± 3.8
fr2-2 (1)	25.4 ± 5.5	7.7 ± 7.5
fr2-3 (1)	23.7 ± 2.7	8.7 ± 2.7
fr2-4 (1)	57.5 ± 3.1	6.9 ± 5.8
fr2-5 (1)	9.3 ± 4.0	9.4 ± 1.2
fr2-6 (1)	-0.1 ± 1.1	10.9 ± 4.0
Arbutin (50)	49.3 ± 3.3	3.1 ± 2.5
Arbutin (10)	24.9 ± 5.6	3 ± 7.5
Arbutin (5)	13.2 ± 6.5	2.3 ± 6.7

The data expressed as means ± S.D. of three determinations.

1-1-1-5. 산박하 fr2-2 분획물의 멜라닌 생합성 저해율

산박하 fr2를 6개의 분획으로 분리한 것 중 유효한 효능을 보이면서 양이 충분한 fr2-2를 컬럼을 통하여 분리한 9개의 분획들의 melan-a 세포에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과를 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 시료 농도로 제조하여 확인하였다. 시료의 처리 농도 1 ㎍/mL의 처리 농도에서 분획 fr2-2-6은 세포 증식에 전혀 영향을 미치지 않으면서 47.2%의 좋은 효과를 나타내었고, 이것은 대조군으로 사용된 arbutin(처리농도 50 ㎍/mL:38.4%)보다도 좋은 결과였으며, 분획 fr2-2-5(58.4%)와 fr2-2-4(71.6%)인 경우도 세포 증식에 거의 영향을 미치지 않으면서도 우수한 멜라닌 억제 효과를 유지하였다(Figure 10).

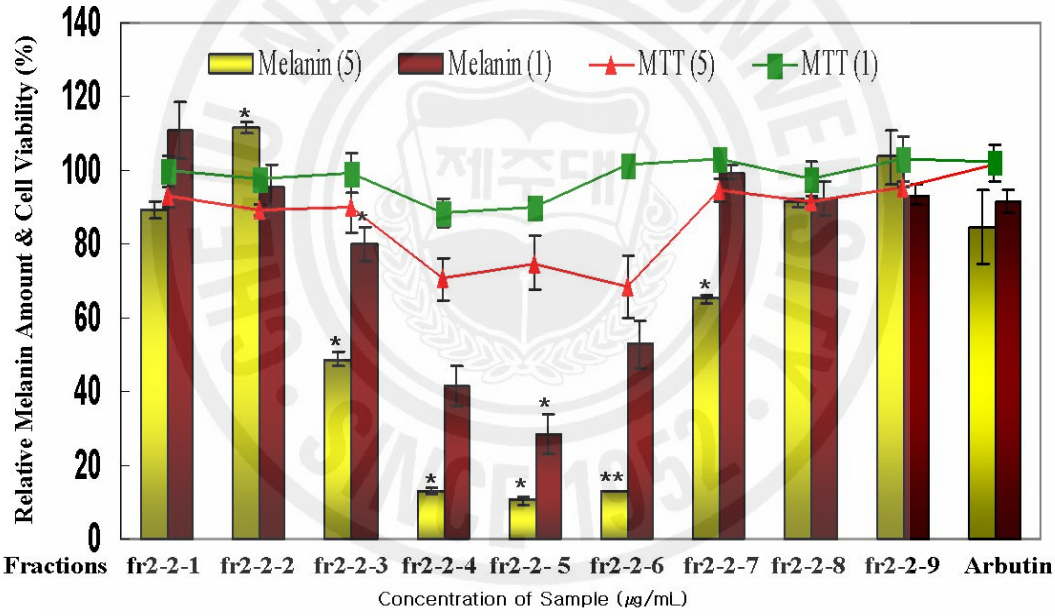


Figure 10. Effects of fr2-2 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

1-1-1-6. 산박하 fr2-4-4 분획물의 멜라닌 생합성 저해율

산박하 fr2-4의 5개의 분획 중 가장 양이 많은 fr2-4-4의 분획을 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 시료 농도로 제조하여 melan-a 세포에서의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 시료의 농도 5 ㎍/mL에서 85.5%의 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었고, 이것은 대조군으로 사용된 같은 농도의 arbutin 보다 약 8배의 좋은 효과를 보였으며, arbutin 50 ㎍/mL를 처리한 것(39.7%)보다도 2배 이상의 우수한 효과를 보였다. 시료 처리 농도 1 ㎍/mL에서는 대조군이 arbutin(10.7%) 보다 약 5배의 좋은 효과(51.6%)를 나타내었다(Figure 11).

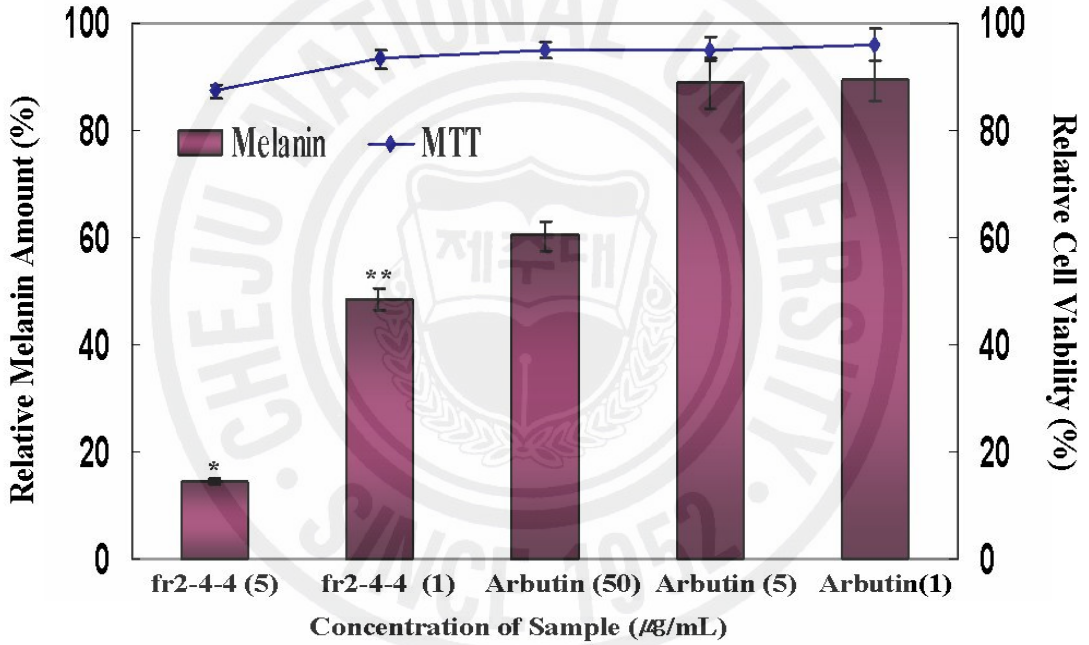


Figure 11. Effects of fr2-4-4 fraction of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 9 h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

1-1-1-7. 산박하 fr3 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율

클로로포름과 메탄올을 이용하여 순차적으로 분리한 분획중 fr3을 컬럼을 통과하여 얻은 10개의 분획의 melan-a 세포에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 세포에 처리하는 시료의 농도를 각각 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL로 제조하여 측정 한 결과 1 ㎍/mL의 시료의 농도에서 fr3-5가 세포의 증식에는 영향(-0.3%)이 없이 멜라닌 생합성 억제 효과 7(54.2%) 우수하게 지속되어 나타났다. 시료처리 농도 5 ㎍/mL에서 가장 좋은 효과를 보였던 fr3-7은 농도가 낮아지면서 세포 증식에는 영향을 주지 않으면서도 7(-1.6%) 대조군인 arbutin(처리 농도 50 ㎍/mL:36.4%) 보다 좋은 효과(45.3%)를 유지하였다(Figure 12).

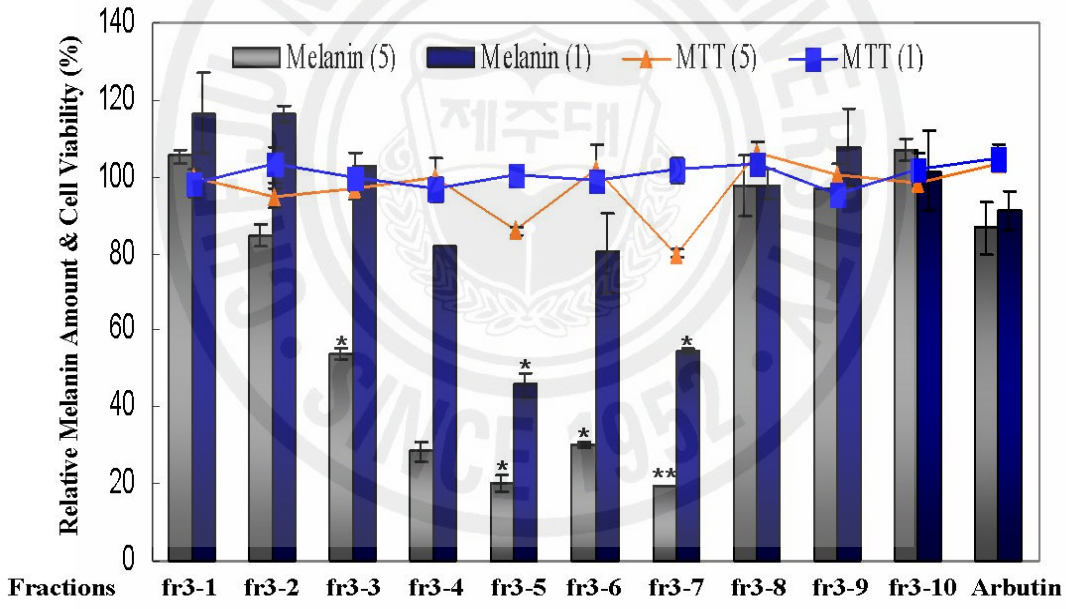


Figure 12. Effects of fr3 subfractions of *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

1-1-2. 분리한 단일물질들의 멜라닌 생합성 억제 효과

산박하 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 3개의 화합물들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 melan-a 세포와 B16 세포를 이용하여 확인하였다. Excisanin A와 kamebakaurin을 시료의 농도 1 ㎍/mL로 준비하여 mealn-a 세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 각각 67.9%와 57.2%의 억제 효과를 나타내었다(Figure 13a). B16F1 세포에서는 각각 26.9%와 39.9%의 억제 효과를 보였고, B16F10 세포에서는 각각 56.7%와 39.5%의 억제 효과를 보였다. 이 때 대조군으로 사용한 arbutin인 경우 100 ㎍/mL 처리 농도에서 melan-a 세포에서는 29.4%, B16F1 세포에서는 13.9%, B16F10 세포에서는 0.9%의 억제 효과를 보였다. 그리고 hydroquinone인 경우 0.5 ㎍/mL 처리 농도에서 각각의 세포에서 74.1%, 30.4%, 39.2%의 억제 효과를 나타내었다(Figure 13a).

분리한 화합물 henryin인 경우 시료 처리 농도를 2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL로 준비하여 melan-a 세포와 B16F10 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 저해 효과를 측정하였다. Melan-a 세포에서는 각 농도에서 64.5%, 44.%, 23.8%의 저해 효과를 나타내었고, B16F10 세포에서는 각각 44.8%, 24.7%, 8%의 저해 효과를 보였다. 이 때 대조군으로 사용한 arbutin인 경우 100 ㎍/mL의 처리 농도에서 melan-a 세포와 B16F10 세포에서 각각 31.6%, 18.8%의 억제 효과를 보였다(Figure 13b).

1-1-3. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 미치는 산박하 추출물들의 억제 효과

1-1-3-1. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 미치는 디클로로메탄 분획물의 억제 효과

자외선에 노출된 피부는 여러 가지 활성산소 및 그로 인한 2차적 자극 물질들에 의하여 멜라닌형성세포를 자극하여 멜라닌 색소의 과다 생성을 유도하게 된다. 따라서 자외선에 대한 방어능이 있는 물질은 피부 미백에 중요한 역할을 하게 된다. 산

박하 추출물이 이러한 자외선 자극에 대한 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 효과를 확인 한 결과 산박하 디클로로메탄 분획물의 일차적 분획물 중 활성이 좋은 fr2는 세포 증식 억제에 영향을 주지 않는 농도(5 ㎍/mL)에서 58.5%의 효과를 나타내었다. 또한 fr3 역시 같은 농도에서 55.3%의 억제 효능을 보여, 대조군으로 사용된 arbutin 100 ㎍/mL의 처리 농도에서 억제 효과(49.0%)보다 좋은 효능을 나타내었다 (Figure 14).

a) b)

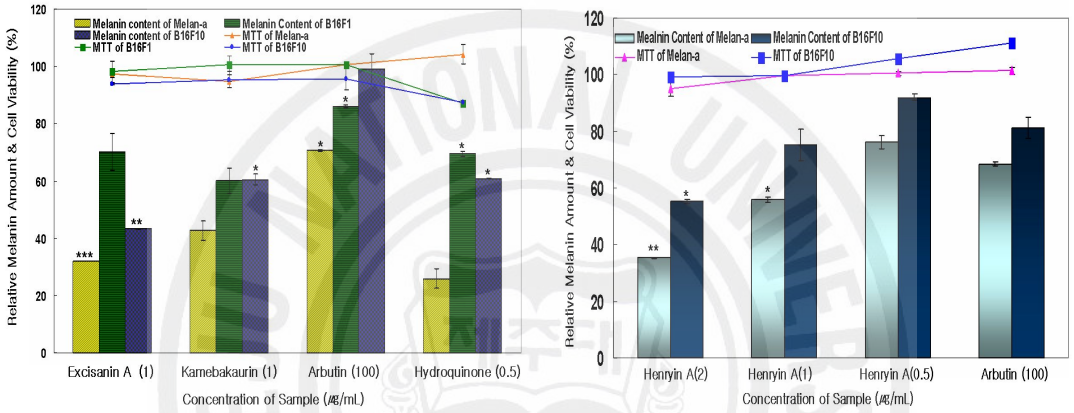


Figure 13. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the melanin content in Melan-a and B16 cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. For B16 cells, they were cultured for 96h inducing melanogenesis. When 24h passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 2 days.
Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. (a) Compounds were excisanin A and kamebakaurin. (b) Compound was henryin. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

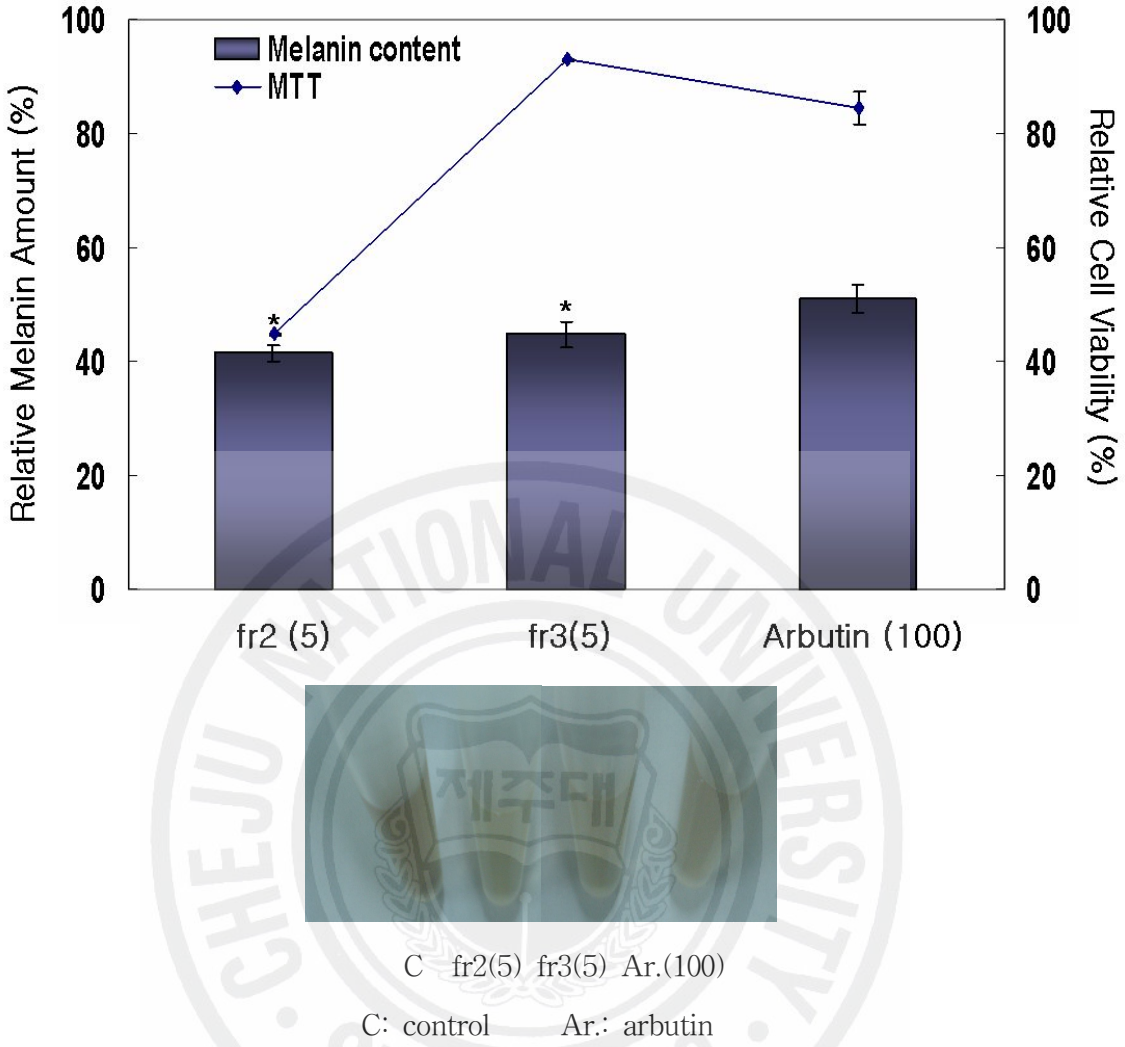


Figure 14. Effects of subfractions of *Rabdosia inflexa* CH_2Cl_2 extract on melanin concents in the Melan-a cells irradiated with UVB. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged. After another 24h passed, UVB (50 mJ/cm^2) was irradiated for 2 days. Then, samples were treated for one more day after media were exchanged. Melanin content was quantified by determining the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

1-1-3-2. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성에 단일물질들이 미치는 효과

산박하에서 추출한 단일물질들의 UVB 조사에 대한 멜라닌 생성 억제 효과를 melan-a 세포와 B16세포를 이용하여 측정한 결과 melan-a 세포에서의 자외선 조사에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과는 시료 처리 농도 1 ㎍/mL에서 excisanin A가 43.9%, kamebakaurin이 42.7%로 대조군으로 사용된 100 ㎍/mL의 arbutin(16.5%)보다 2배 이상의 좋은 효과를 나타내었다. B16F1 세포를 이용하여 UVB 조사에 대한 분리한 화합물들의 멜라닌 생합성 억제 효능을 확인한 결과 시료 처리 농도 1 ㎍/mL에서 excisanin A는 43.1%, kamebakaurin은 53.3%의 억제 효과를 나타내었으며 이것은 대조군으로 사용된 100 ㎍/mL의 arbutin(24.9%)보다 각각 약 1.7배와 2.1배의 좋은 효과를 나타내는 결과를 보였다. B16F10세포를 이용한 UVB 조사에 대한 분리한 화합물들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 시료 처리 농도 1 ㎍/mL에서 excisanin A는 60.0% kamebakaurin은 31.8%로 대조군으로 사용된 100 ㎍/mL의 arbutin(19.9%)보다 각각 약3배와 1.6배의 좋은 효과를 나타내었다. 세 가지 세포를 이용하여 산박하로부터 추출한 단일물질들의 UVB에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 모두 대조군보다 우수한 효과를 보여 UV자극에 대한 미백 소재로서도 가능성을 확인할 수 있었다(Figure 15a).

산박하에서 분리한 또 하나의 단일물질인 henryin 역시 UVB 조사에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과를 melan-a 세포와 B16F10 세포를 이용하여 확인하였다. Melan-a 세포에서 시료의 농도 2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL로 처리하였을 때 각각 70%, 57.7%, 53.9%의 억제 효과를 보였고, 이 때 사용한 대조군인 arbutin인 경우 100 ㎍/mL의 농도에서 49.4%의 억제 효과를 나타내었다. 그러나 UV 조사 전과는 다르게 2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 시료 농도에서 MTT를 통한 각각 세포증식 억제율이 35.7%, 12%로 확인되어 이 농도에서는 어느 정도 세포 증식을 억제하여 멜라닌 생성 억제에도 영향을 주고 있음을 확인하였다. B16F10 세포를 이용한 UV 조사에 대한 멜라닌 생합성 억제 효과는 시료의 농도 2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL에서 각각 14.2%, 8.7%로 대조군으로 사용된 100 ㎍/mL의 arbutin(8.4%) 보다는 좋은 효과를 나타내었다(Figure 15b).

a) b)

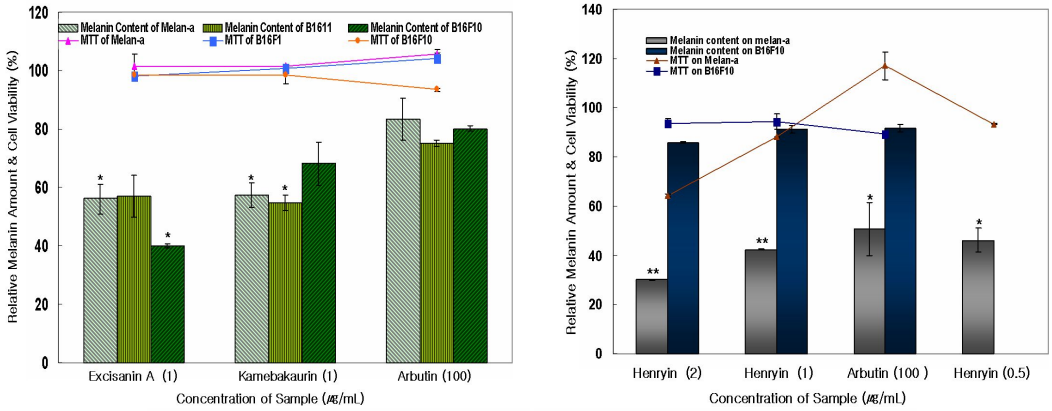


Figure 15. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the melanin content by the UVB irradiated melanocytes. The cells were cultured for 96h inducing melanogenesis. When 24h passed, media and samples were exchanged. After another 24h passed, UVB (10 mJ/cm^2) was irradiated for 2 days. Then, samples were treated for one more day after media were exchanged. Melanin content was quantified by determining the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control. (a) Compounds were excisanin A and kamebakaurin. (b) Compound was henryin.

1-1-4. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 산박하 추출물이 미치는 영향

1-1-4-1. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 디클로로메탄 분획물이 미치는 영향

자외선은 피부의 노화와 멜라닌 색소 과다 침착을 형성시키는 중요한 인자로서 자외선 조사에 대한 산박하 추출물의 멜라닌 색소 억제에 대한 mRNA 발현 억제 정도를 확인하여 미백 소재로서의 이용 가능성을 확인 하였다. 산박하 디크롤로메탄 분획물 중 멜라닌 생합성 억제 효능이 가장 우수하였던 fr2와 fr3의 멜라닌 저해 활성이 멜라닌 생성에 관여하는 주요 mRNA 감소에 기인한 것임을 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 측정 결과 자외선 조사 후 tyrosinase, TRP-1, mitf, MC1r, SCF의 발현양이 현저히 감소하였다(Figure 16).

1-1-4-2. UVB 자극 후 melanin 생합성 관련 mRNA 발현에 산박하 추출물에서 분리한 compound들이 미치는 영향

본 연구에서는 산박하로부터 분리한 단일물질들의 자외선에 의해 과발현되는 멜라닌 색소 생합성을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 Melan-a 세포에 UVB를 조사한 후 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현 억제 정도를 확인하였다. 측정 결과 에틸아세테이트 분획물은 mitf, tyrosinase를 강하게 억제하고, TRP-1과 MC1r도 억제하고 있음을 확인하였다. 단일물질인 excisanin A는 mitf, tyrosinase, c-kit을 강하게 그리고, TRP-1과 MC1r를 억제 하였으며, kamebakaurin은 excisanin A보다는 전체적으로 약하지만 mitf, tyrosinase, MC1r, TRP-1의 mRNA 발현을 억제시켰다(Figure 17).

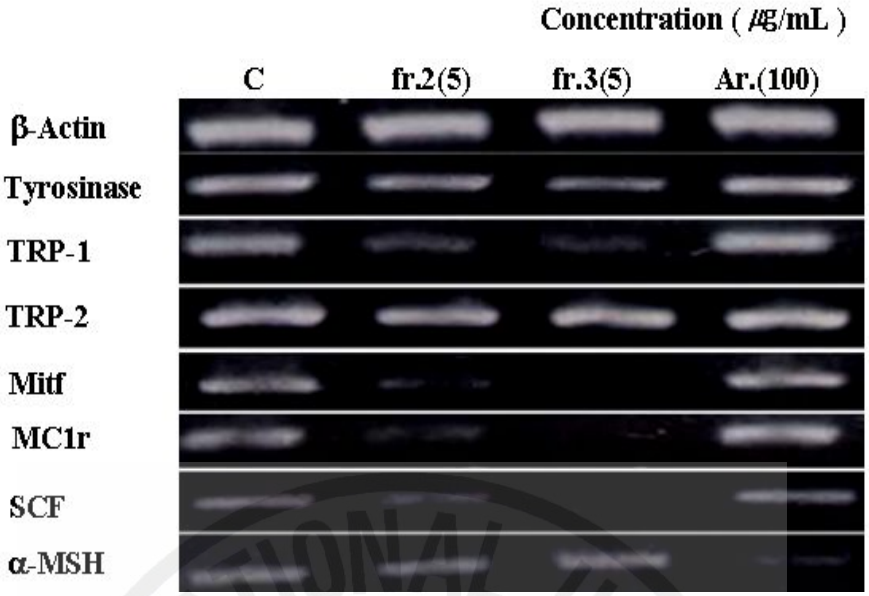


Figure 16. Effects of subfractions of CH_2Cl_2 extract of *Rabdosia inflexa* on mRNAs expression in the Melan-a cells irradiated with UVB. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged. After another 24h passed, UVB (50 mJ/cm^2) was irradiated for 2 days. Then, samples were treated for one more day after media were exchanged. Total RNA was subjected to RT-PCR experiment.

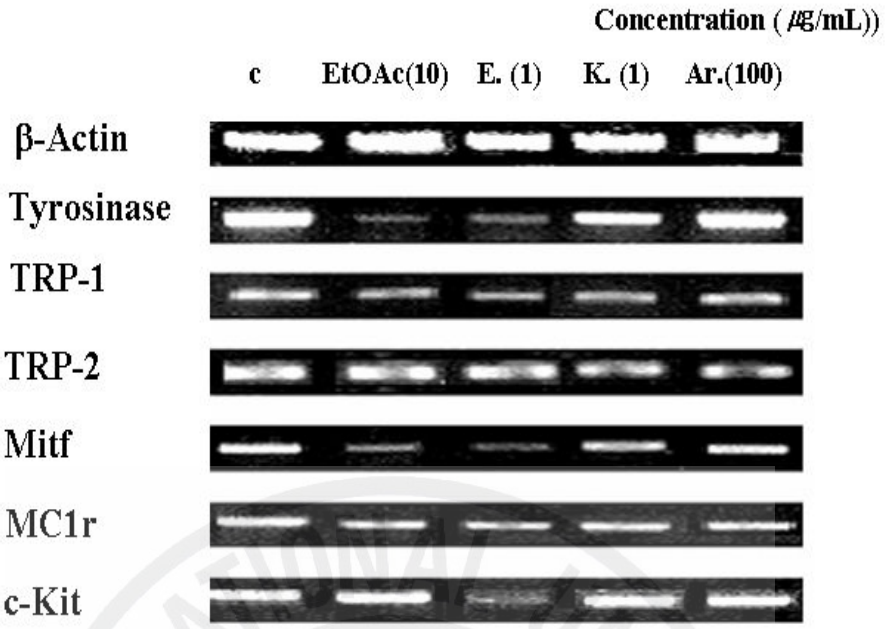


Figure 17. Effects of isolated compounds and EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa* on mRNA expression in the UVB irradiated Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged. After another 24h passed, UVB (10 mJ/cm^2) was irradiated for 2 days. Then, samples were treated for one more day after media were exchanged. Total RNA was subjected to RT-PCR experiment. E.: excisanin A K.: kamebakaurin. Ar.: arbutin.

1-1-5. 산박하 추출물이 melanin 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 효과

산박하 에틸아세테이트 분획물과 단일물질들의 세포에서 증식에 영향을 미치지 않는 농도에서 멜라닌 생합성 억제 효과가 단백질 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다. 멜라닌 생성에 주요한 효소로 알려진 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 그 상위 발현 인자인 mitf의 단백질 발현 억제 양상을 확인하였다. 그 결과 에틸아세테이트 분획물은 농도에 의존적으로 tyrosinase, TRP-1, mitf의 단백질 발현을 억제하였으며, 단일물질인 경우도 tyrosinase, TRP-1, mitf의 단백질 발현을 억제하고 있음을 확인하였다. 그러나 TRP-2의 단백질 발현에는 영향을 미치고 못하였다. Tyrosinase의 단백질 발현은 산박하 에틸아세테이트 분획물이 세포에 좋은 억제 효과를 보였고, 단일물질인 경우 excisanin A가 좋은 억제 효과를 나타내었다. TRP-1의 단백질 발현 억제 효과도 역시 산박하 에틸아세테이트 분획이 가장 좋게 나타났으며, 단일물질인 경우 kamebakaurin이 excisanin A보다 좀 더 좋은 억제 효과를 보였다. Mitf인 경우는 kamebakaurin이 가장 좋은 억제 효과를 나타내었다(Figure 18).

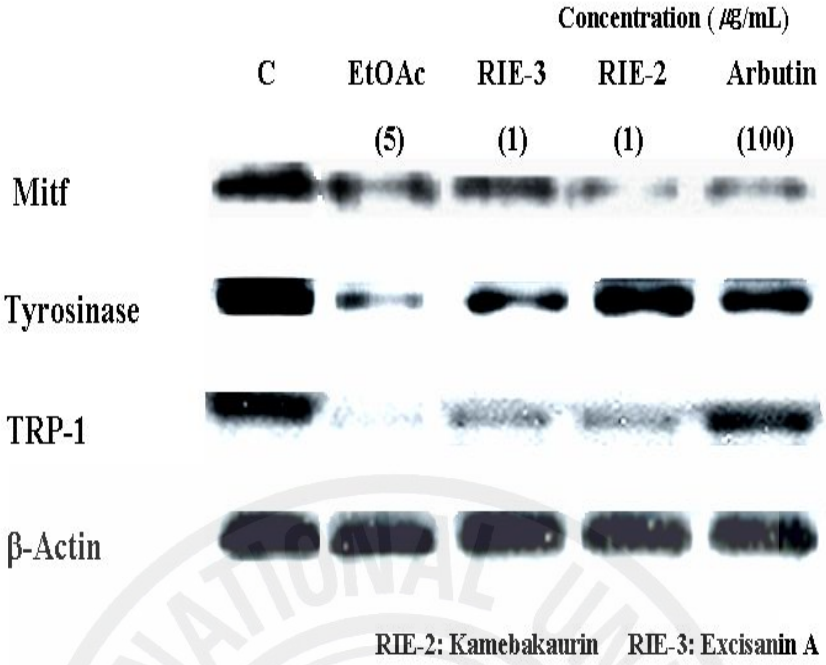


Figure 18. Effects of *Rabdosia inflexa* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2, Mitf protein expression in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. The numbers in parenthesis were concentration in ㎍/mL.

E.: excisanin A, K.: kamebakaurin, Ar.: arbutin

1-1-6. 산박하 추출물이 첨가된 화장품의 유효성 및 안정성 결과

1-1-6-1. 산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 멜라닌 생성 억제 효과

산박하 추출물이 화장품 내에서도 멜라닌 생성 억제 효능이 유지되는지를 확인하기 위하여 산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 에멀젼의 melan-a 세포에서의 멜라닌 생합성 억제 효과를 1000 ㎍/mL, 500 ㎍/mL, 200 ㎍/mL의 시료 농도로 준비하여 측정한 결과 각각 89.4%, 40.6%, 10.3%의 억제 효과를 나타내었다. 그러나 1000 ㎍/mL의 처리 농도에서는 세포 증식을 억제(32.2%)하고 있어 그로 인하여 더 좋은 억제 효과를 나타낸 것을 확인하였다(Figure 19).

1-1-6-2. 산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 온도 안정성 확인

화장품을 제조 하는 데 있어서 꼭 갖춰져야 할 요인 중 하나가 안정성이 유지할 수 있어야 한다는 것이다. 유효한 효능이 있다 하더라도 그 유효 성분의 활성이 제품을 제조하였을 때 유지되지 않는다면 제대로 기능을 수행할 수 없기 때문이다. 따라서 일반적 보존 시험과 특수·가혹 보존 시험에서 실시하는 안정성 시험법(0, 25, 40℃)을 활용하여 산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가하여 제조한 에멀젼을 -4, 25, 40, 60℃에 1주일간 보관하여 분리되는 정도를 확인하였다 [85].

산박하 에틸아세테이트 분획물을 0.2% 함유한 에멀젼을 제조한 후 각 온도별로 보관하여 상이 분리되는 여부와 변취되는 정도를 10일간 확인하였는데, 모든 온도에서 안정하게 유지되었다(Table 7).

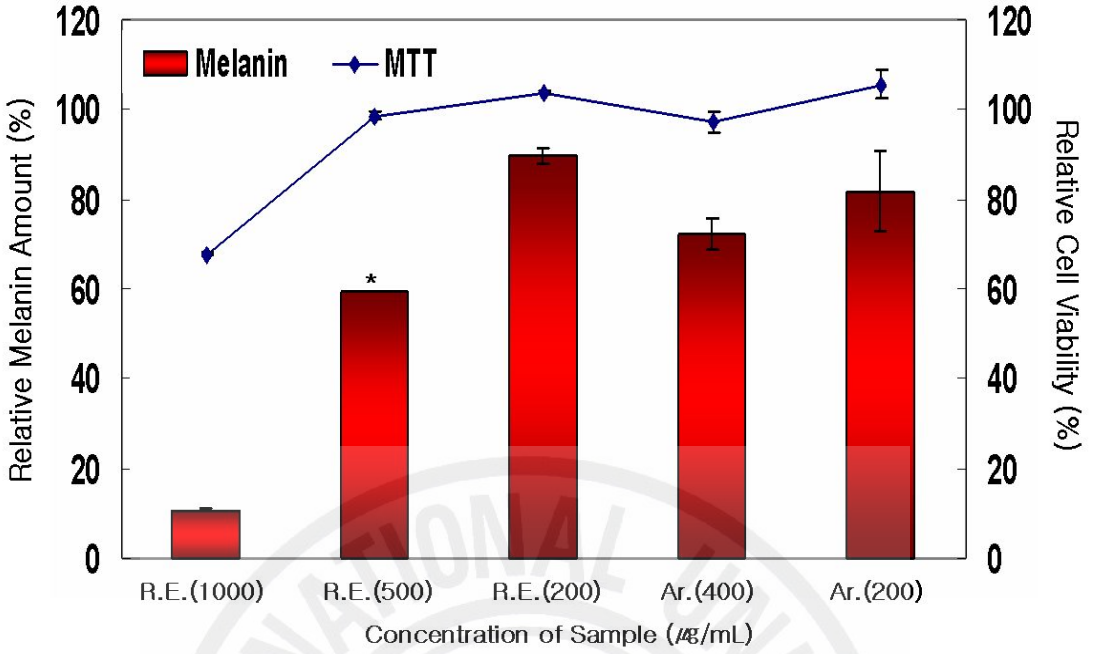


Figure 19. Effects of emulsion containing *Rabdosia inflexa* EtOAc extract on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. After 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 more days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control. R.E.: Emulsion containing *Rabdosia inflexa* EtOAc fraction, Ar.: Arbutin.

1-1-6-3. 산박하 추출물을 함유한 emulsion의 pH 측정

피부 표면은 약산성으로 세안을 하면서 일시적으로 중성 또는 약알칼리성에 이를 수 있는 pH 범위를 화장품을 통해 균형을 맞춰줄 수 있다. 알칼리성 피부는 미생물 번식이 용이하여 질병을 일으키기 쉽기 때문에 화장품의 pH는 피부표면의 pH 영역에 적절한 약산성 및 중성에 맞춰 제조되어야 한다.

산박하 에틸아세테이트 분획물을 0.2% 첨가한 에멀젼의 pH 측정 결과 6.4 ± 0.1을 나타내었다(Table 8).

Table 7. Results of thermal stability test of the emulsion containing an EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa*.

Day	-4℃	25℃	40℃	60℃
1	O	O	O	O
3	O	O	O	O
5	O	O	O	O
7	O	O	O	O
10	O	O	O	O

Table 8. pH measurement of emulsion containing EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa*.

Sample	Concentration (0.2%)
Base emulsion	7.2 ± 0.1
Emulsion containing EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa*	6.4 ± 0.1
Emulsion containing arbutin	7.2 ± 0.1

The data expressed as means ± S.D. of three determinations.

1-1-6-4. 산박하 추출물을 함유한 emulsion의 입자 확인

산박하 에틸아세테이트 추출물을 함유한 emulsion을 40℃에서 30일 동안 보관한 후 400배와 1,000배 배율로 관찰한 결과 입자의 분산 및 분리 없이 안정함을 확인하였다.

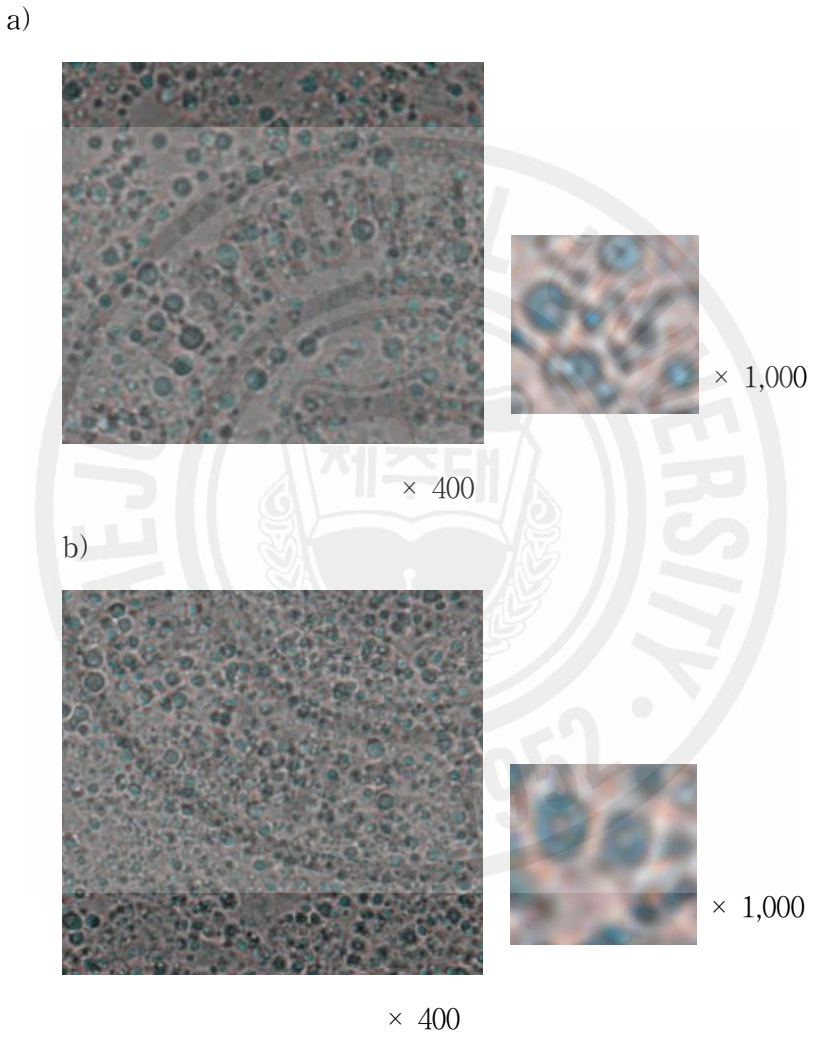


Figure 20. Microscopic aspect of the emulsion containing EtOAc fraction of *Rabdosia inflexa*. (a) immediately after the preparation (b) 1 month after the preparation

1-2. 항염증효과

1-2-1. 산박하 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향

1-2-1-1. 산박하 용매 분획물이 NO 생성 억제 활성

최근 자외선과 같은 외부 환경요인에 의해 과다 생성되어 과색소 생성 및 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성에 대한 산박하 추출물의 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS(1㎍/mL)와 산박하 분획물을 50 ㎍/mL의 농도로 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서 41.22 μM로 NO가 과량 생성되었으나, 산박하 헥산 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서 각각 NO 생성량이 3.04 μM, 2.49 μM로 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figure 21a). 하지만, 이 농도에서 LDH를 이용하여 세포 독성을 측정한 결과 헥산 분획층은 73.68%로 높게 나왔고 에틸아세테이트 분획층은 14.76%로 나와 NO 억제 효과가 세포 독성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 시료의 농도를 25 ㎍/mL로 하여 NO억제와 세포 독성을 확인하였다.

LPS 단독 처리군에서는 47.58 μM의 NO가 생성되었으며, 시료의 농도를 25 ㎍/mL로 처리한 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서는 각각 8.04 μM, 1.76μM로 헥산은 상위 농도보다는 세포 독성은 없어지고 NO 억제 효과는 약 2.6배 감소하였고, 에틸아세테이트 분획에서는 약 1.4배 증가하였다. 즉, 산박하 에틸아세테이트 분획물은 농도가 낮은 상태에서도 우수한 NO 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 21b).

a) b)

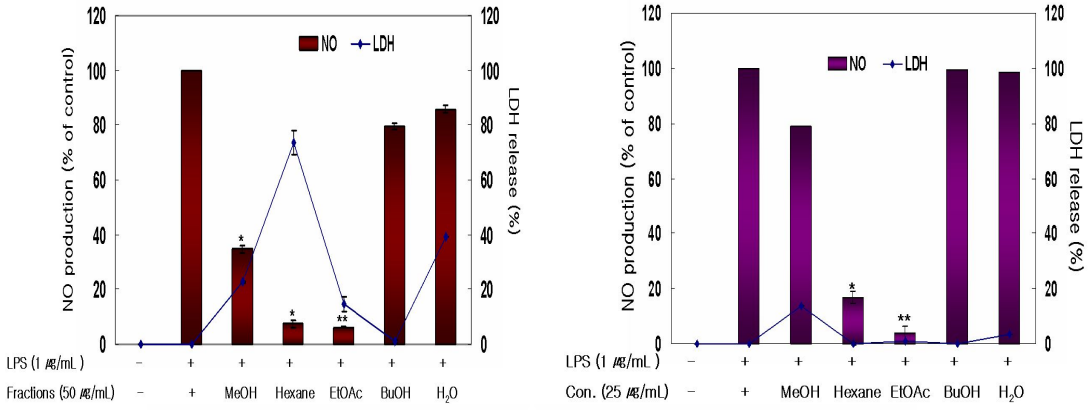


Figure 21. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of *Rabdosia inflexa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. Cytotoxicity was determined by using the LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone. (a) Concentration of samples was 50 ㎍/mL. (b) Concentration of samples was 25 ㎍/mL.

1-2-1-2. 산박하 추출물에서 분리한 compound들의 NO 생성 억제 활성

산박하에서 분리한 단일물질들의 NO 생성 억제 효과를 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)와 분리한 excisanin A와 kamebakaurin을 2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 농도로 처리하였다. LPS 단독처리군에서는 31.52 μM의 NO가 생성되었으며, 시료 처리농도 2 ㎍/mL에서는 excisanin A가 8.85 μM, kamebakaurin이 6.85 μM로 억제 효과를 나타내었으며, 1 ㎍/mL 처리 농도에서는 각각 16.67 μM와 17.64 μM로 농도에 의존적으로 NO 생성을 억제하였다(Figure 22a).

단일물질로 구조가 규명된 henryin의 NO 생성 억제 효과를 확인한 결과 LPS 단독으로 처리한 군에서는 31,76 μM의 NO가 생성되었고 시료의 처리 농도 5 ㎍/mL, 2.5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 농도에서 각각 0.67 μM, 3.04 μM, 8.13 μM의 NO 억제 효과를 나타내었다(Figure 22b).

1-2-2. 산박하 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 산박하 메탄올 조출물 및 분획물과 분리한 단일 물질들에 의한 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. LPS에 의하여 iNOS는 현저하게 증가하였으며, 산박하 분획물을 처리한 결과 에틸아세테이트 분획물이 mRNA 발현을 아주 강하게 억제하였다(Figure 23a). 그리고 산박하로부터 분리한 단일물질들의 iNOS 발현은 농도 의존적으로 억제하였다(Figure 23b and 23c).

1-2-3. 산박하 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 산박하 조출물 및 분획물과 분리한 단일 물질들에 의한 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 산박하 조추출물 및 분획물에서는 에틸아세테이트 분획물이 COX-2 mRNA 발현을 강하게 억제하였다(Figure 23a). 그리고 산박하로부터 분리한 단일 물질인 경우 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제하였고, 특히 excisanin A는

2 ㎍/mL 처리 농도에서 강하게 억제 효과를 보였다(Figure 23b and 23c).

a) b)

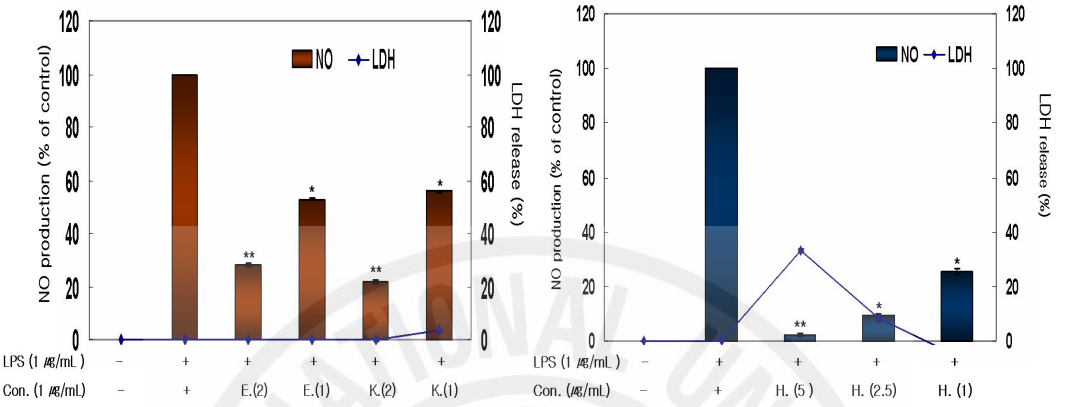
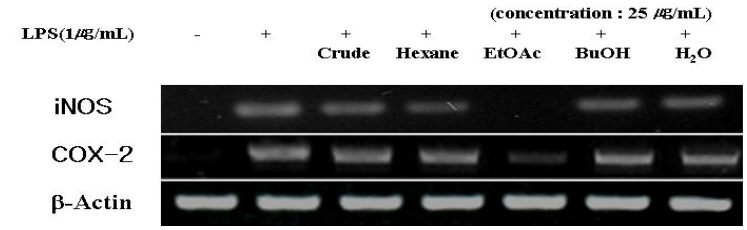
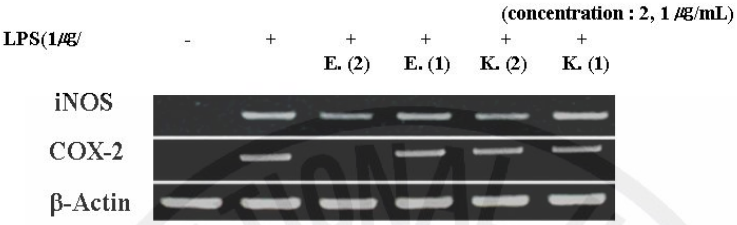


Figure 22. Effects of compounds isolated from *Rabdosia inflexa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of compounds for 24h. Cytotoxicity was determined using the LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone. E.: Excisanin A, K.: Kamebakaurin, H.: Henryin

a)



b)



c)

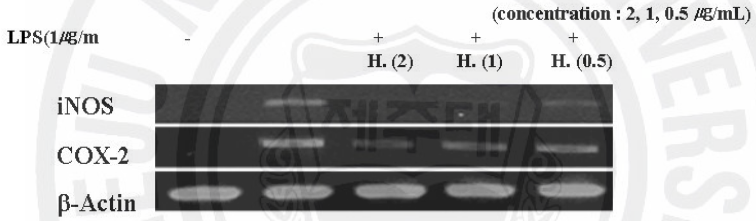


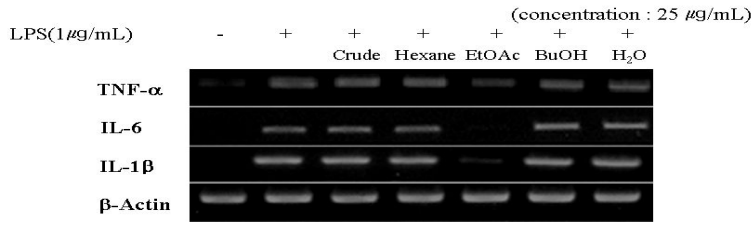
Figure 23. Effects of isolated compounds, 80% MeOH extract and its subfractions of *Rabdosia inflexa* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of samples (25 ㎍/mL) for 24h to determine iNOS but 6h for COX-2. Data for actin was shown as 24h stimulation even though data for 6h stimulation were collected. (b) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of excisanin A and kamebakaurin (2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL) for 6h. (c) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of henryin (2 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL) for 6h. The mRNA expression of iNOS and COX-2 was determined by RT-PCR experiment. E.: Excisanin A, K.: Kamebakaurin, H.: Henryin

1-2-4. 산박하 추출물이 pro-inflammation의 mRNA발현에 미치는 영향

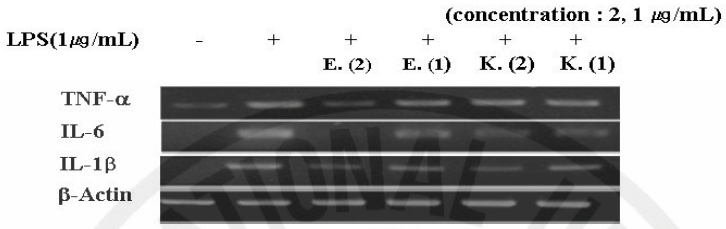
산박하 추출물의 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 LPS와 산박하 추출물을 함께 처리하여 RT-PCR을 시행하였다. TNF-α, IL-6, IL-1β 생성 억제에 대한 산박하 조추출물 및 용매분획물을 25 ㎍/mL 농도로 처리하였을 때 에틸아세테이트 분획물이 가장 좋은 억제 효과를 보였다. 특히 IL-6 mRNA 발현을 가장 강하게 억제 하였고, IL-1β가 다음으로 억제 되었다 (Figure 24a).

산박하 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 단일 물질인 경우 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제 시켰고, 특히 excisanin A가 kamebakaurin 보다 더 좋은 억제 효과를 나타내었으며 2 ㎍/mL 처리 농도에서 IL-6의 mRNA 발현을 강하게 억제시켰다(Figure 24b). 대조군으로 사용된 β-Actin의 양이 거의 같은 양을 나타내는 것으로 보아 시료들이 세포에 영향을 주어 감소하는 것이 아님을 보여주었다. 산박하로부터 분리한 또 다른 단일 물질인 henryin 역시 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제 시켰다(Figure 24c).

a)



b)



c)

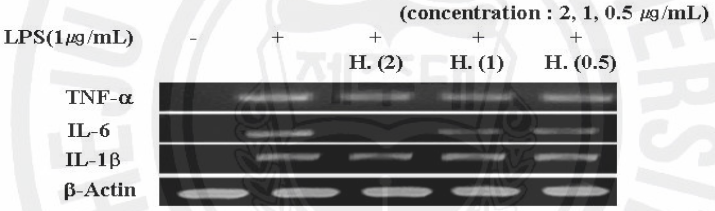


Figure 24. Effects of isolated compounds, 80% MeOH extract and its subfractios of *Rabdosia inflexa* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of MeOH extract and subfractions (25 μg/mL) for 18h. (b) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of compounds at the indicated concentrations for 6h. (c) RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of a compound at the indicated concentrations for 6h. The RNA extraction was carried out in a RNase-free environment and the mRNA expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β were determined by RT-PCR experiment. E.: Excisanin A, K.: Kamebakaurin, H.: Henryin

1-3. 항산화 효과

1-3-1. 산박하 추출물이 DPPH radical 소거 효과

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 화학적으로 안정화된 자유 라디칼을 갖고 있으며, 매우 안정한 보라색의 화합물로 515~520nm 부근의 파장에서 강한 광흡수를 갖는다. 이 화합물은 항산화활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되어 특이적인 색상이 탈색되고 안정해진 분자의 몰수에 비례하여 노란색으로 변하게 되기 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있다. 따라서 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물, 음료와 오일, 순수 페놀화합물 등의 많은 항산화 물질을 검색하는 효과적으로 이용된다.

산박하 메탄올 조추출물과 그 분획물들의 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과 IC_{50}값이 메탄올 조추출물은 28.31 ㎍/mL, 에틸아세테이트 분획물은 32.62 ㎍/mL, 부탄올 분획물은 33.28 ㎍/mL, H_2O 분획물은 54.58 ㎍/mL로 측정되었다(Figure 25).

1-3-2. 산박하 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 활성

라디칼을 갖고 있는 활성산소 중 하나이며 최근 멜라닌 과색소 유도와 염증 유발 등을 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Nitric oxide의 생성 억제 정도를 산박하 메탄올 조추출물 및 그 분획물들을 이용하여 측정하였다. NO 활성 억제 IC_{50}값은 산박하 에틸아세테이트 분획물이 165.2 ㎍/mL로 좋은 억제 효과를 보였고, 시료의 처리농도 500 ㎍/mL에서 헥산 분획물과 부탄올 분획물은 각각 35.9%, 25.3%의 억제 효과를 나타내었다(Table 9).

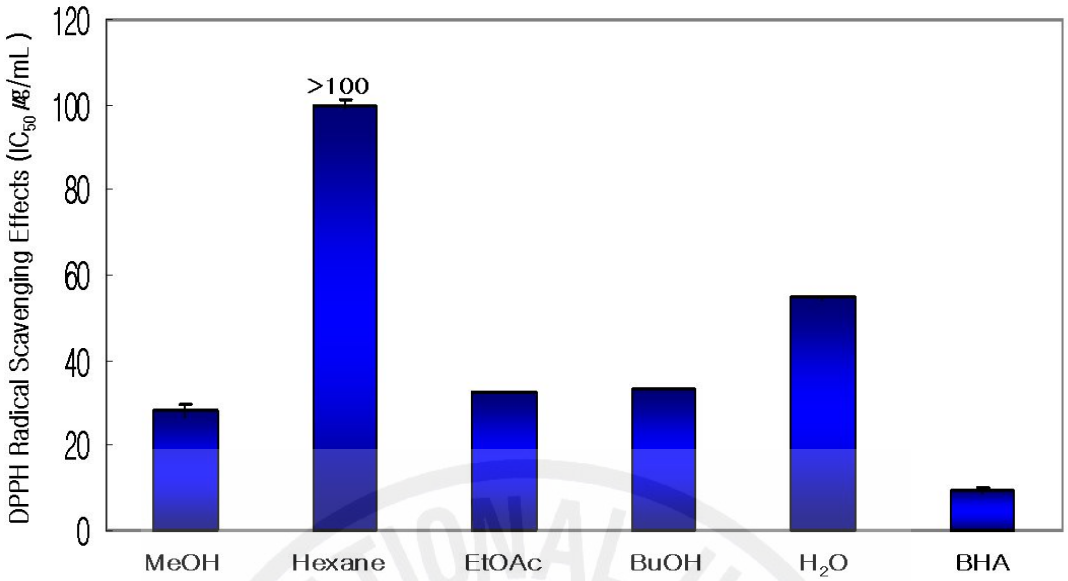


Figure 25. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Rabdosia inflexa*. The data expressed as means ± S.D. of three determinations.

Table 9. Antioxidant activities of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Rabdosia inflexa*.

Fractions	Nitric oxide Scavenging activity		Xanthine oxidase inhibition		
			Inhibition of uric acid generation	Inhibition of superoxide generation	
	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)	250 ㎍/mL (%)	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)
MeOH	N/D	N/D	7.8 ± 0.8	93.0 ± 0.4	7.7 ± 0.6
Hexane	35.9 ± 4.1	>500	33.0 ± 0.7	78.9 ± 7.5	131.5 ± 29.5
EtOAc	66.3 ± 1.0	165.2 ± 3.8	40.0 ± 3.8	94.6 ± 3.6	0.9 ± 0.9
BuOH	25.3 ± 0.7	>500	4.0 ± 1.9	85.7 ± 1.4	0.2 ± 0.0
H_2O	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Quercitin	92.7 ± 3.1	80.1 ± 7.8	N/D	N/D	N/D
Allopurinol	N/D	N/D	90.3 ± 4.5	90.9 ± 0.3	2.2 ± 0.8

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

1-3-3. 산박하 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과

Xanthine oxidase는 hypoxanthine를 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이산소로부터 발생하게 되는데, uric acid는 축적되면 고요산혈증과 통풍을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 superoxide는 유산소 호흡을 하는 생명체가 산소를 체내에 받아들여 생명활동을 유지할 때 생기는 최초의 활성산소로 강한 산화 작용을 한다. 이것은 superoxide dismutase(SOD)에 의해 과산화수소로 전환되며, 생성된 H_2O_2는 생체 조직을 산화시키거나 peroxidase나 catalase에 의하여 물 분자와 산소 분자로 전환된다[86].

산박하 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 xanthine oxidase 및 superoxide 억제 효과를 측정한 결과 xanthine oxidase 억제 효과는 시료 처리 농도 250 ㎍/mL에서 에틸아세테이트 분획물은 40.0%, 헥산 분획물은 33.0%, 메탄올 조추출물은 7.8%, 부탄올 분획물은 4.0% 순으로 나타나 그다지 좋은 억제 효과는 보이지 않았다.

Superoxide 소거 활성을 산박하 메탄올 조추출물과 그 용매 분획물을 사용하여 측정한 IC_{50}값 결과 부탄올 분획물이 0.2 ㎍/mL로 가장 좋은 효과를 보였고, 에틸아세테이트 분획물 역시 0.9 ㎍/mL로 우수한 소거 활성을 나타내었다. 또한 산박하 메탄올 조추출물도 7.7 ㎍/mL로 좋은 소거 활성을 보였고, 헥산 분획물은 131.5 ㎍/mL로 측정되었다(Table 9).

1-4. Compounds의 구조 동정

1-4-1. RIE-1의 구조 확인

RIE-1의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼과 HMBC를 측정하여 Table 10에 나타내었다. ^{1}H NMR 스펙트럼을 확인한 결과 두 개의 singlet인 메틸기의 피크(δ 0.88, δ 0.94)가 나타남을 확인하였고, 하나의 acetoxyl기와 세 개의 secondary hydroxyl기가 존재함을 예상할 수 있었고, 올레핀 수소 2개(δ 6.07, 5.38)가 존재함을 예상할 수 있었다. 이 두 개의 올레핀 수소가 각각 넓은 singlet 피크로 나타나는 것으로 보아 geminal로 존재함을 예상할 수 있었다. 또한 δ 3.31, δ 4.11, δ 4.91에서 수소 피크가 나오는 것으로 보아 탄소원자에 전기음성도가 큰 원자가 결합되어 있을 것이라 예상되어진다. ^{13}C NMR 스펙트럼으로부터 22개의 탄소가 존재함을 알 수 있었다. DEPT(distortionless enhancement by polarization transfer) 135°의 스펙트럼의 자료로부터 ^{13}C 스펙트럼에 나타난 20개의 탄소 중 4급 탄소가 6개, CH가 6개, CH_2가 7개, CH_3가 3개가 존재함을 알 수 있었다. 이중 δ 209.6은 카보닐기, δ 172.4은 acetyl기, δ 150과 δ 117.4은 올레핀 탄소에서 기인한 피크라 예상할 수 있었고, δ 82.8(C-1), δ 75.7(C-7), δ 77.3(C-14)의 화학적 이동 값으로 보아 탄소에 hydroxy기가 붙어있음을 예상할 수 있었다.

HMBC의 결과로부터 화학적 이동 δ 2.13의 수소($-CH_3$)로부터 δ 172.3 (C-21)과 상관관계를 나타나는 것으로 보아 acetyl기가 존재함을 예상할 수 있었고, 화학적 이동 δ 0.94의 수소(H-18)로부터 δ 40.8(C-3), δ 33.7(C-4), δ 53.3(C-5), δ 21.8(C-19)의 상관관계를 나타내는 것으로 보아 C-4번 위치에 2개의 메칠기(C-18, 19)가 결합되어 있음을 예상할 수 있었고, δ 1.61의 수소(H-9)로부터 δ 82.8(C-1), δ 62.3(C-8), δ 20.7(C-11), δ 31.1(C-12), δ 77.3 (C-14), δ 65.7(C-20)의 상관관계를 나타나는 것으로 보아 A, B 그리고 C고리가 결합되어 있음을 예상할 수 있었다. δ 4.52(H-20)와 C-1, C-5, C-9, C-10의 상관관계를 나타내었다. 이것은 C-20과 C-10이 결합되고 있으며, acetyl기가 C-20의 위치에 결합되고 있음을 예상할 수 있었다. 화학적 이동 δ 6.05의 수소(H-17)로부터 δ 209.6인 4차 탄소(C-15), 1개의 올레핀 탄소인 δ 150 (C-16), δ 47.7(C-13)이 상관관계를 나타내었고, δ 4.91(H-14)와 δ 209.6 (C-15),

δ 150(C-16)이 상관관계를 나타나는 것으로 보아 C와 D고리가 결합되어있음을 예상할 수 있었고 D고리에 카보닐 화합물이 존재함을 예상할 수 있었다(Fugure 26). 이상의 결과로 화합물 RIE-1은 henryin 임을 확인하였으며, 문헌치[87]와의 비교에서도 잘 일치하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

Table 10. NMR spectroscopic data for RIE-1 (in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[87] δ_C (ppm)	Dept	HMBC (H→C#)
1	3.31 (m)	82.8	81.5	CH	9, 20
2	1.76 (m), 1.64 (m)	32.3	31.6	CH_2	7
3	1.45 (m)	40.8	39.9	CH_2	2, 10
4		33.7	33.1	C	
5	1.02 (m)	53.3	52.2	CH	6, 7, 10, 18, 19, 20
6	2.15 (m), 1.29 (m)	30.5	30.2	CH_2	5, 9, 10
7	4.11 (dd, J = 4.4, 12.2Hz)	75.7	74.6	CH	8, 14
8		62.3	61.9	C	
9	1.61 (m)	57.2	56.3	CH	1, 8, 11, 12, 14, 20
10		46.7	45.9	C	
11	1.38 (m), 1.35 (m)	20.7	20.3	CH_2	9
12	1.95 (m), 1.94 (m)	31.1	30.8	CH_2	5, 9, 10
13	2.97 (m)	47.7	47.0	CH	8, 9, 12
14	4.91 (s)	77.3	76.0	CH	15, 16
15		209.6	208.7	C	
16		150	150.0	C	
17	6.07 (brs)	117.4	115.9	CH_2	13, 15, 16
	5.38 (brs)				13, 15
18	0.94 (s)	34	33.1	CH_3	3, 4, 5, 19
19	0.88 (s)	21.8	21.5	CH_3	3, 4, 5
20	4.52 (d, J = 13.6Hz)	65.7	64.8	CH_2	1, 5, 9, 10
	4.45 (d, J = 13.6Hz)				
OAc		172.3	170.5	C	
	2.13 (s)	21.4	21.5	CH_3	21

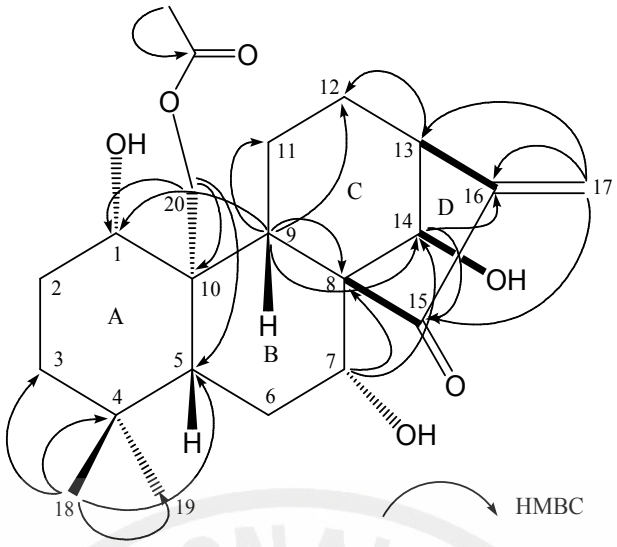


Figure 26. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-1.

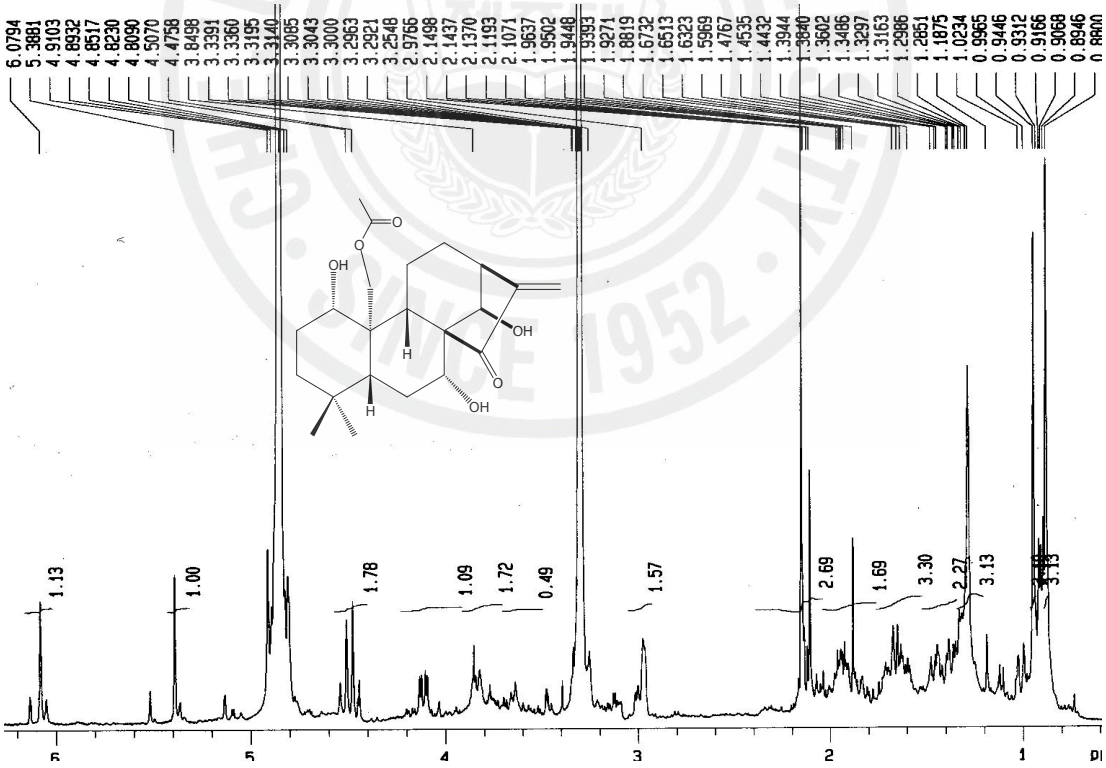


Figure 27. ^{1}H-NMR spectrum of RIE-1. (in CD_3OD)

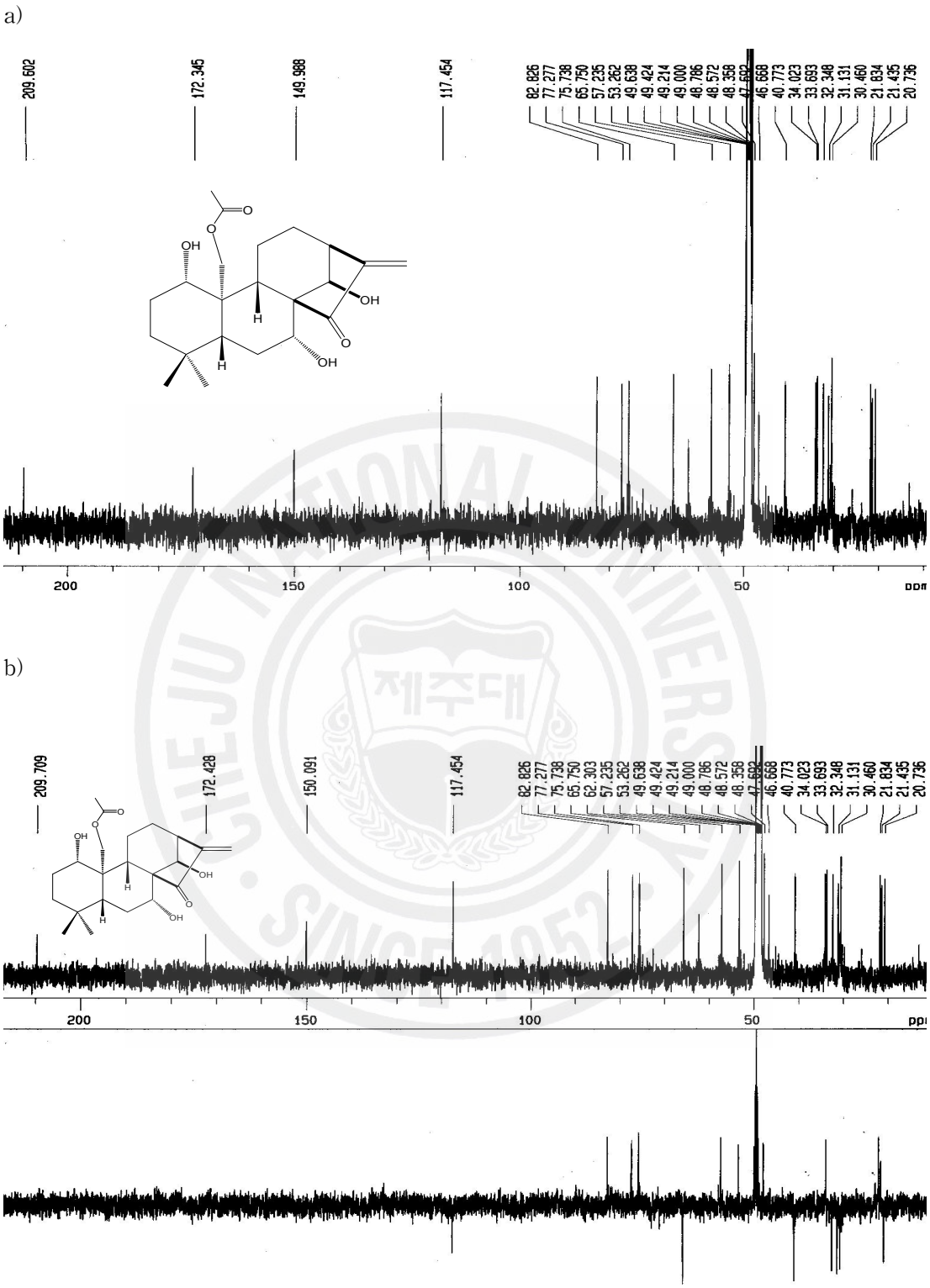


Figure 28. ^{13}C-NMR and DEPT spectrum of RIE-1. (in CD_3OD)

a) ^{13}C-NMR spectrum of RIE-1. b) DEPT spectrum of RIE-1.

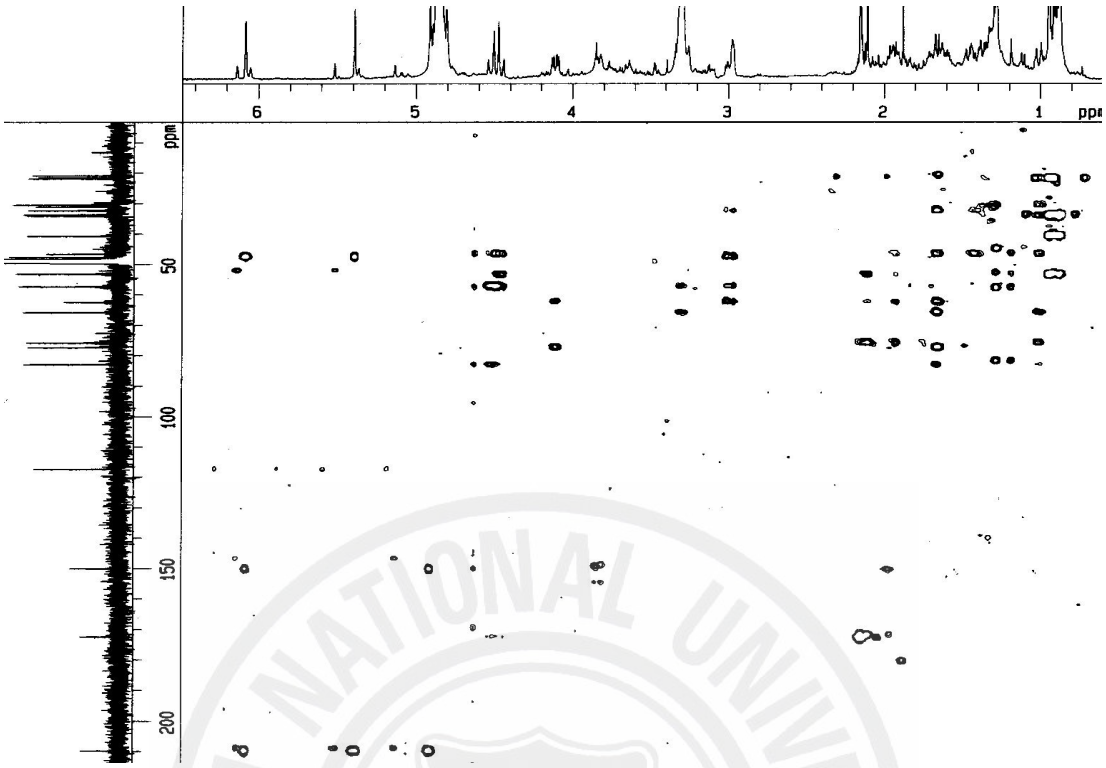


Figure 29. HMBC spectrum of RIE-1. (in CD_3OD)

1-4-2. RIE-2의 구조확인

RIE-2의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼과 HMBC를 측정하여 Table 11에 나타내었다. ^{1}H NMR 스펙트럼을 확인한 결과 두 개의 singlet인 메틸기의 피크(δ 0.85, δ 0.91)가 나타남을 확인하였고, 올레핀 수소 2개(δ 6.06, 5.36)가 존재함을 예상할 수 있었다. 이 두 개의 올레핀 수소가 각각 넓은 singlet 피크로 나타나는 것으로 보아 geminal로 존재함을 예상할 수 있었다. 또한 δ 3.43~δ 4.99에서 수소 피크가 나오는 것으로 보아 전기음성도가 큰 원자에 CH가 결합되어 있는 네 개의 secondary hydroxyl기가 존재함을 예상할 수 있었다. ^{13}C NMR 스펙트럼으로부터 20개의 탄소가 존재함을 알 수 있었다. DEPT 135°의 스펙트럼의 자료로부터 ^{13}C 스펙트럼에 나타난 20개의 탄소 중 4급 탄소가 5개, CH가 7개, CH_2가 6개, CH_3

가 2개가 존재함을 알 수 있었다. 이 중 δ 210.1은 카보닐기, δ 150.6과 δ 116.9은 올레핀 탄소에서 기인한 피크라 예상할 수 있었고, δ 82.2(C-1), δ 75.4(C-7), δ 77.3(C-14), δ 62.1(C-20)의 화학적 이동 값으로 보아 탄소에 hydroxy기가 붙어있음을 예상할 수 있었다.

HMBC의 결과로부터 화학적 이동 δ 0.91(H-18)과 δ 0.84(H-19)의 수소로부터 각각 δ 33.5(C-4), δ 52.9(C-5), δ 22.5(C-19)와 δ 39.5(C-5), δ 33.8(C-19)의 상관관계를 나타내는 것으로 보아 C-4번 위치에 2개의 메틸기(C-18, 19)가 결합되어 있음을 예상할 수 있었고, δ 1.63의 수소(H-9)로부터 δ 82.2(C-1), δ 62.4(C-8), δ 20.7(C-11), δ 31.7(C-12), δ 77.3(C-14)의 상관관계를 나타나는 것으로 보아 A, B 그리고 C고리가 결합되어 있음을 예상할 수 있었다. δ 4.38(H-20)와 δ 4.0(H-20′)은 C-1, C-9, C-10의 상관관계를 나타내었다. 이것은 C-20과 C-10이 결합되고 있음을 예상할 수 있다. 화학적 이동 δ 6.06의 수소(H-17)로부터 δ 210.1인 4차 탄소(C-15), 1개의 올레핀 탄소인 δ 150.6(C-16), δ 49.6(C-13)이 상관관계를 나타내었고, δ 4.99(H-14)와 δ 49.6(C-13), δ 210.1(C-15)이 상관관계를 나타나는 것으로 보아 C와 D고리가 결합되어있음을 예상할 수 있었고, D고리에 카보닐 화합물이 존재함을 예상할 수 있었다(Figure 30). 이상의 결과로 화합물 RIE-2은 kamebakaurin임을 확인하였으며, 문헌치[88]와의 비교에서도 잘 일치하였다.

Table 11. NMR spectroscopic data for RIE-2 (in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[88] δ_C (ppm)	Dept	HMBC (H→C#)
1	3.43 (dd, J = 4.64Hz, 10.24Hz)	82.2	81.3	CH	9, 20
2	2.75 (dd, J = 5.6, 15.5)	30.5	30.7	CH_2	5, 10, 20
	2.58 (ddt, J = 5.6Hz, 13.1Hz)				
3	1.47 (m)	39.5	39	CH_2	
4		33.5	32.9	C	
5	0.95 (m)	52.9	52.2	CH	6, 8, 10, 11
6	1.89 (m), 1.87 (m)	30.1	30.3	CH_2	5, 7, 8
7	4.21 (dd, J = 4.88Hz, 12.2Hz)	75.4	74.8	CH	8, 14
8		62.4	62.1	C	
9	1.63 (m)	57.3	56.8	CH	1, 8, 11, 12, 14
10		49.4	47.9	C	
11	1.30 (m)	21.7	21.5	CH_2	
12	1.52 (m)	31.7	31.5	CH	
13	2.99 (brs)	49.6	48.1	CH	
14	4.99 (s)	77.3	76.5	CH	13, 15
15		210.1	209.3	C	
16		150.6	150.8	C	
17	6.06 (s)	116.9	115.3	CH_2	13, 15, 16
	5.36 (s)				13, 15, 16
18	0.91 (s)	33.8	33.3	CH_3	4, 5, 19
19	0.85 (s)	22.5	22.3	CH_3	3, 18
20	4.38 (d, J = 12.2Hz)	62.1	61.9	CH_2	1, 9
	4.0 (d, J = 12.2Hz)				1, 9, 10

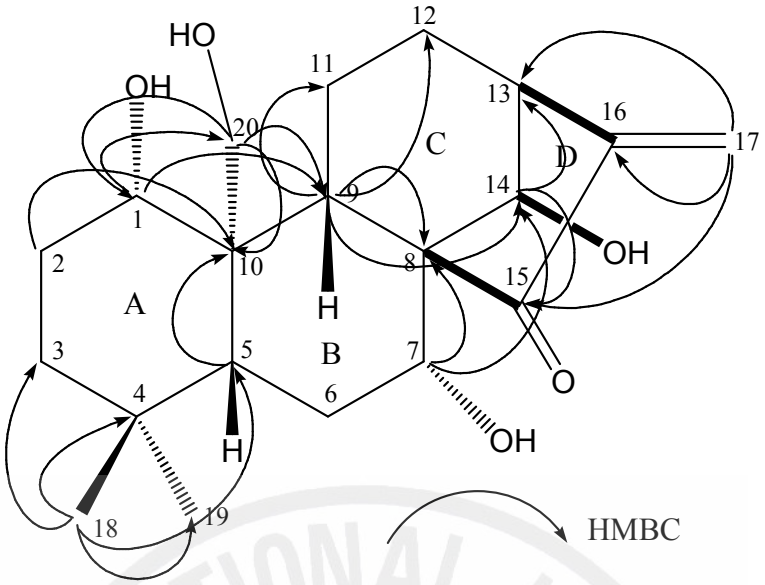


Figure 30. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-2.

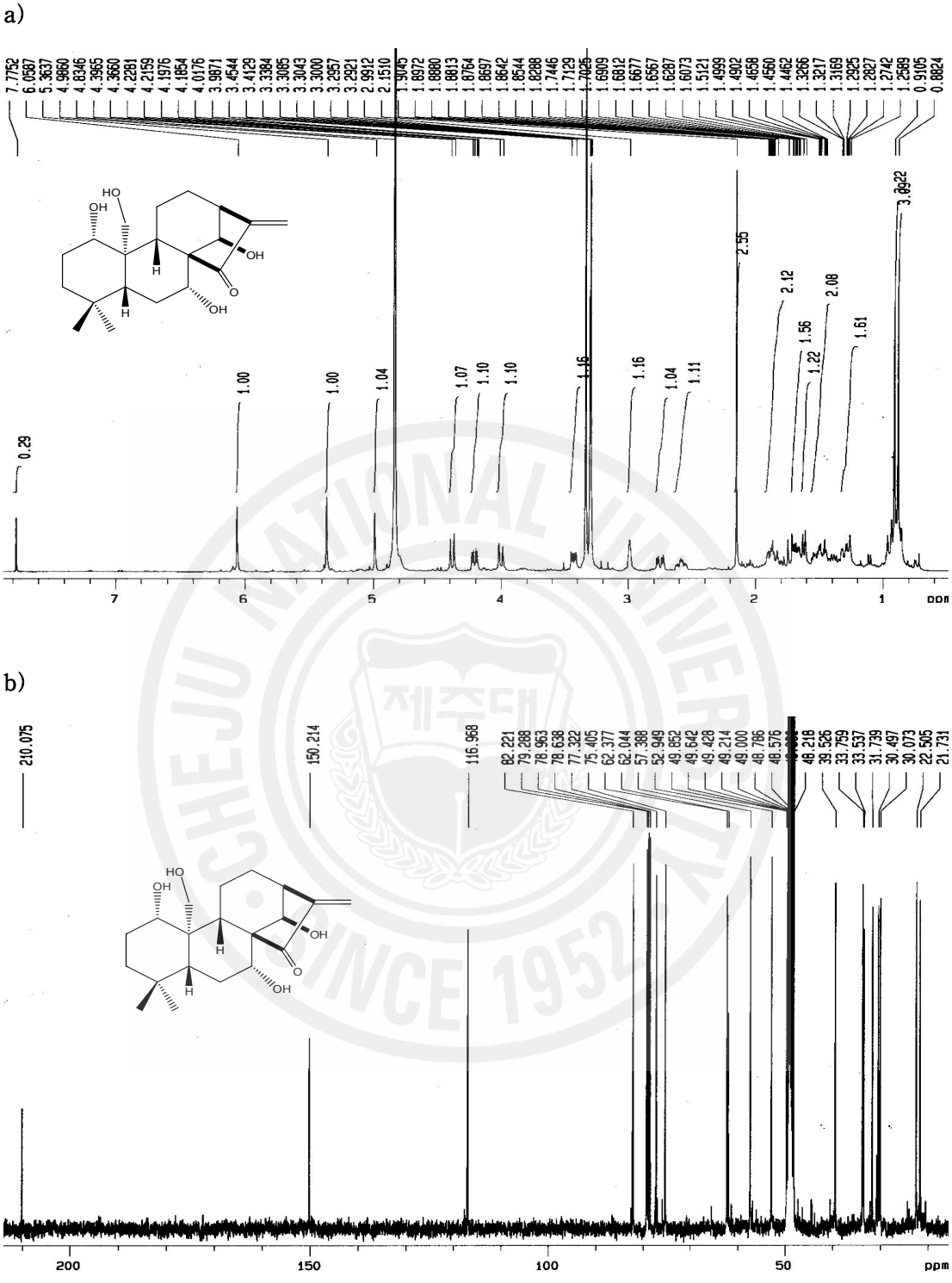


Figure 31. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of RIE-2. (in CD_3OD)

a) ^{1}H-NMR spectrum of RIE-2. b) ^{13}C-NMR spectrum of RIE-2.

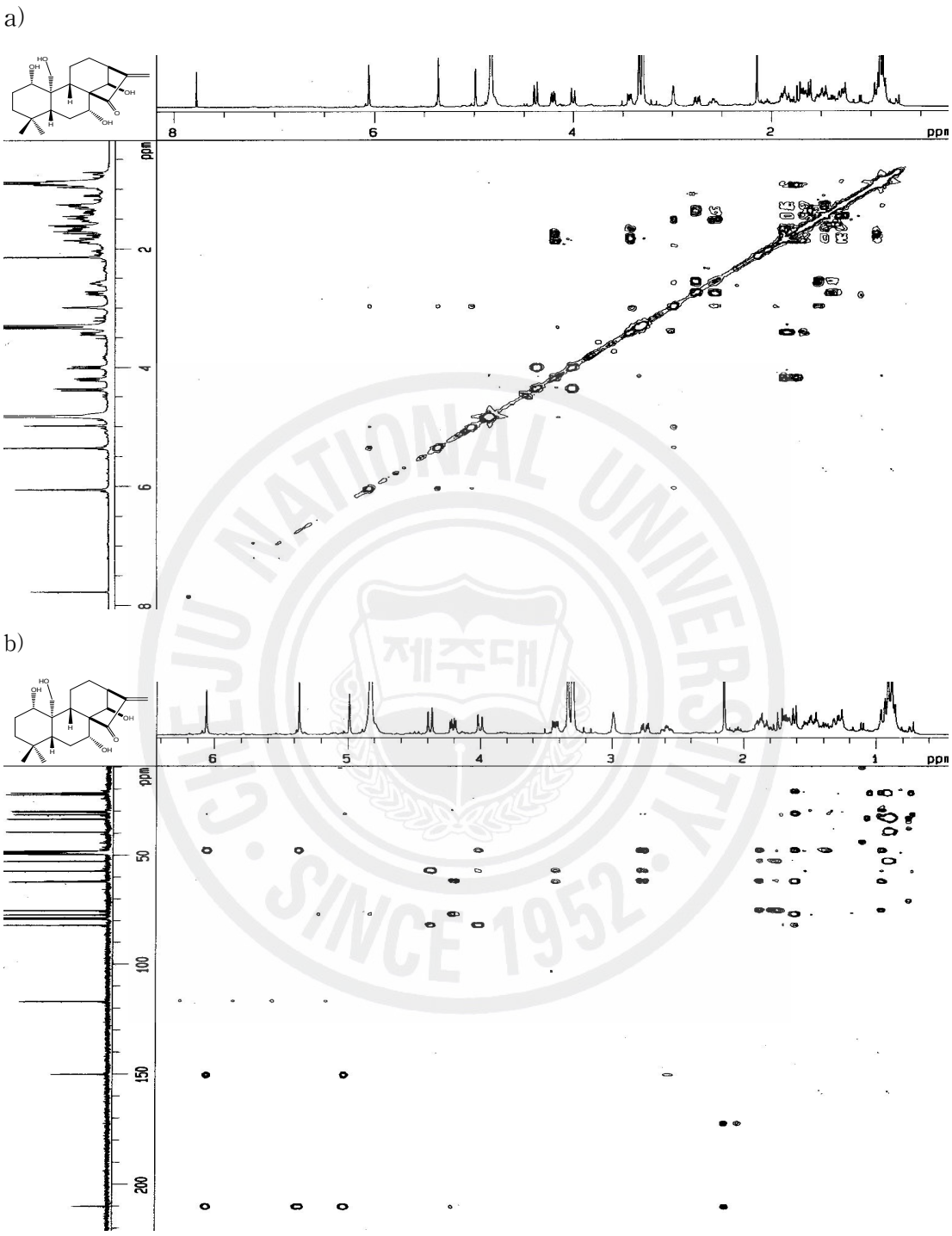


Figure 32. COSY and HMBC spectrum of RIE-2. (in CD_3OD)

a) COSY spectrum of RIE-2. b) HMBC spectrum of RIE-2.

1-4-3. RIE-3의 구조확인

RIE-3의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼과 HMBC를 측정하여 Table 12에 나타내었다. ^{1}H NMR 스펙트럼을 확인한 결과 terpene류의 특성피크인 세 개의 singlet인 메틸기의 피크(δ 0.88, δ 0.91, δ 1.36)가 나타남을 확인하였고, 올레핀 수소 2개(δ 6.05, 5.39)가 존재함을 예상할 수 있었다. 이 2개의 수소가 넓은 singlet 피크로 나타나는 것으로 보아 geminal로 존재함을 예상할 수 있었다. 화학적 이동 δ 3.16(H-1), δ 3.99(H-12), δ 4.14(H-7), δ 5.17 (H-14)에서 나타나는 signal들은 탄소원자에 hydroxyl기가 결합되어있음을 예상할 수 있었다. ^{13}C NMR 스펙트럼으로부터 20개의 탄소가 존재함을 알 수 있었다. DEPT 135°의 스펙트럼의 자료로부터 ^{13}C 스펙트럼에 나타난 20개의 탄소 중 4급 탄소가 5개, CH가 7개, CH_2가 5개, CH_3가 3개가 존재함을 알 수 있었다. 이 중 δ 210.3은 카보닐, δ 147.9과 δ 118.2은 올레핀 탄소, δ 72~δ 82은 산소원자가 결합한 형태의 탄소가 존재함을 예상할 수 있다(Table 12).

HMBC의 결과로부터 RIE-3의 구조를 예상할 수 있다. 화학적 이동 δ 1.36의 수소(H-20)로부터 δ 82.1(C-1), δ 52.9(C-5), δ 59.3(C-9), δ 44.9(C-10)과 상관관계를 나타내고, 화학적 이동 δ 0.91의 수소(H-18)로부터 δ 40.7(C-3), δ 34.1(C-4), δ 52.9(C-5), δ 21.8(C-19)의 상관관계를 나타내는 것으로 보아 C-4번 위치에 2개의 메칠기(C-18, 19)가 결합되어 있음을 예상할 수 있었고, δ 1.61의 수소(H-9)로부터 δ 82.1(C-1), δ 62.5(C-8), δ 44.9(C-10), δ 28.6 (C-11), δ 72.3(C-14), δ 13.5(C-20)의 상관관계를 나타나는 것으로 보아 A, B 그리고 C고리가 결합되어 있음을 예상할 수 있었다. 화학적 이동 δ 6.05의 수소(H-17)로부터 δ 210.3인 4차 탄소(C-15), 1개의 올레핀 탄소인 δ 147.9 (C-16), δ 55.6(C-13), δ 72.3(H-14)이 상관관계를 나타내었고, δ 5.17(H-14)와 δ 59.3(C-9), δ 73.9(C-12), δ 210.3(C-15), δ 147.9(C-16)이 상관관계를 나타나는 것으로 보아 C와 D고리가 결합되어있음을 예상할 수 있었고, D고리에 카보닐기와 이중결합이 존재함을 예상할 수 있었다(Figure 33). 이상의 결과로 화합물 RIE-3은 excisanin A임을 확인하였으며, 문헌치[89]와의 비교에서도 잘 일치하였다.

Table 12. NMR spectroscopic data for RIE-3 (in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[89] δ_C (ppm)	Dept	HMBC (H→C#)
1	3.16 (dd, J =4.4, 11Hz)	82.1	81.8	CH	9,10,20
2	1.73 (2H, m)	30.3	30.0	CH_2	
3	1.52 (2H, m)	40.7	40.3	CH_2	
4		34.1	33.8	C	
5	1.08 (m)	52.9	51.8	CH	9
6	1.91 (m), 1.77 (m)	29.7	29.3	CH_2	5,7,8,10
7	4.14 (dd, J = 4.16, 12.2Hz)	75.7	73.8	CH	6,8,14,15
8		62.5	62.1	C	
9	1.61 (d, J = 9.24Hz)	59.3	58.6	CH	1, 8, 10, 11, 14, 20
10		44.9	44.5	C	
11	3.07 (d, J = 16.6)	28.6	28.3	CH_2	8, 9, 10, 12, 13
12	3.99 (t, J = 4.4Hz)	73.9	72.0	CH	9, 13, 14, 15
13	3.00 (brd, J = 3.4Hz)	55.6	52.5	CH	8, 11, 12
14	5.17 (s)	72.3	75.3	CH	9, 12, 15, 16, 17
15		210.3	210.6	C	
16		147.9	147	C	
17	6.05 (brs)	118.2	118.5	CH_2	13, 14, 15, 16
	5.39 (brs)				13, 14, 15, 16
18	0.91 (s)	33.6	33.6	CH_3	3, 4, 5, 19
19	0.88 (s)	21.8	21.8	CH_3	4, 18
20	1.36 (s)	13.5	13.3	CH_3	1, 5, 9, 10

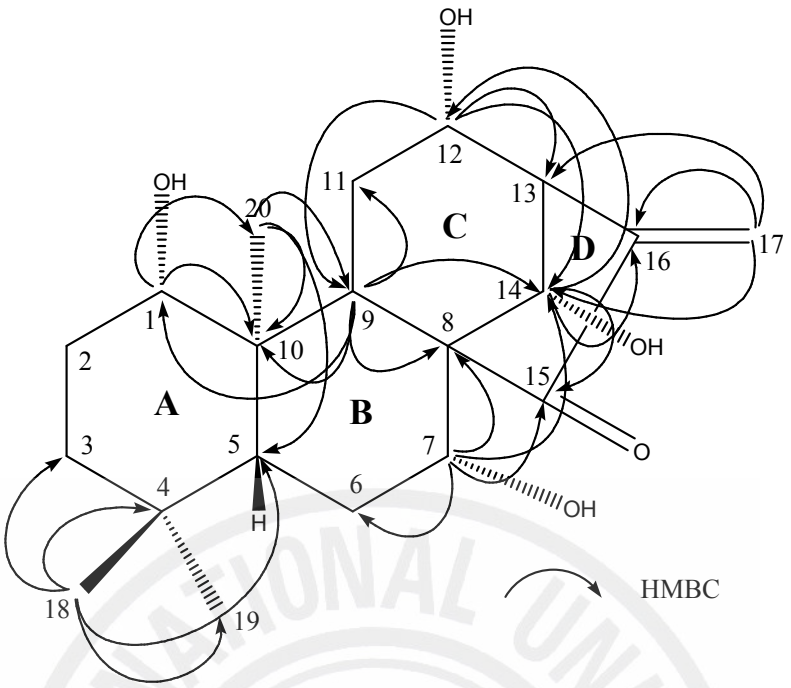


Figure 33. Selected key HMBC correlations (H → C) of RIE-3.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

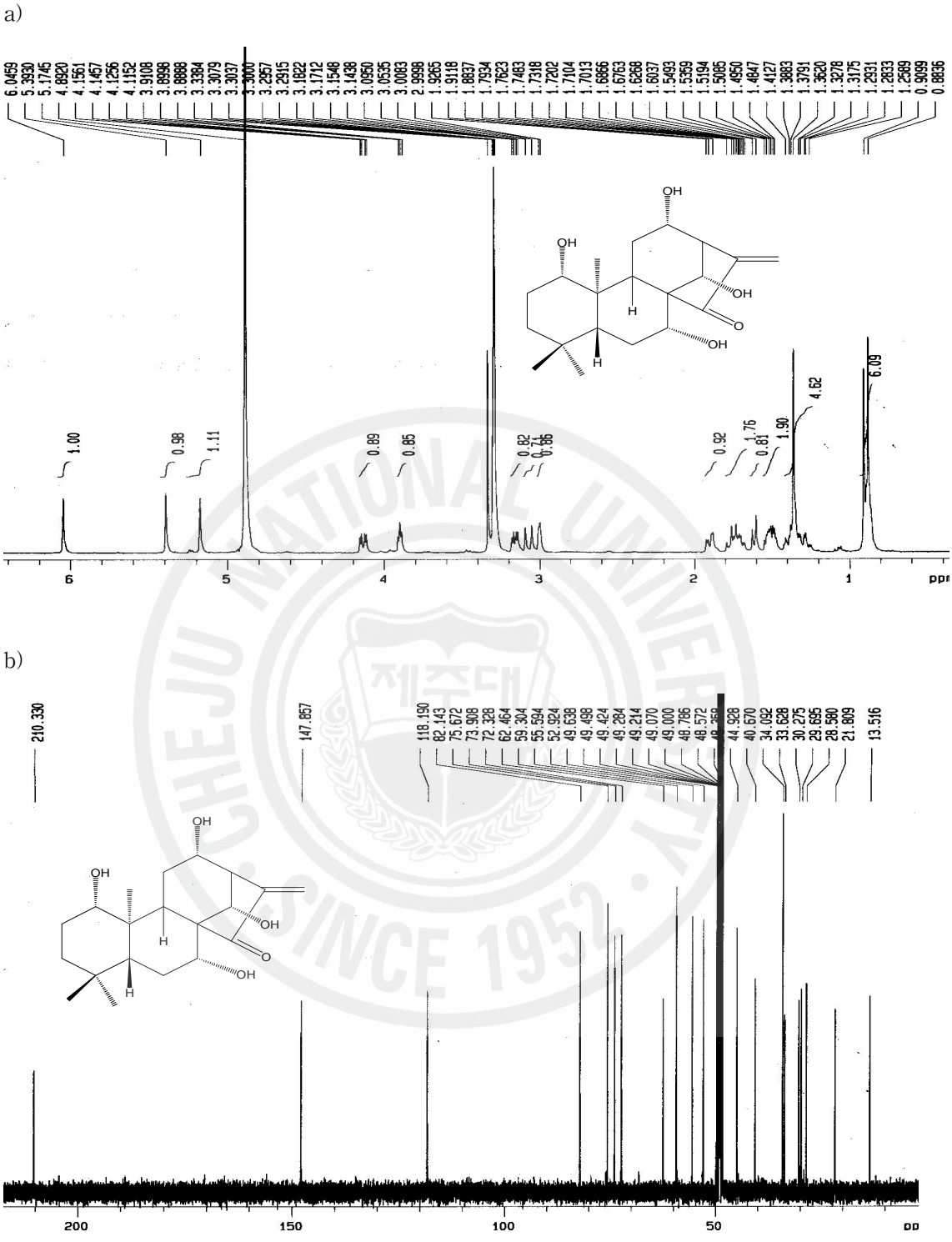


Figure 34. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of RIE-3. (in CD_3OD)

a) ^{1}H-NMR spectrum of RIE-3. b) ^{13}C-NMR spectrum of RIE-3.

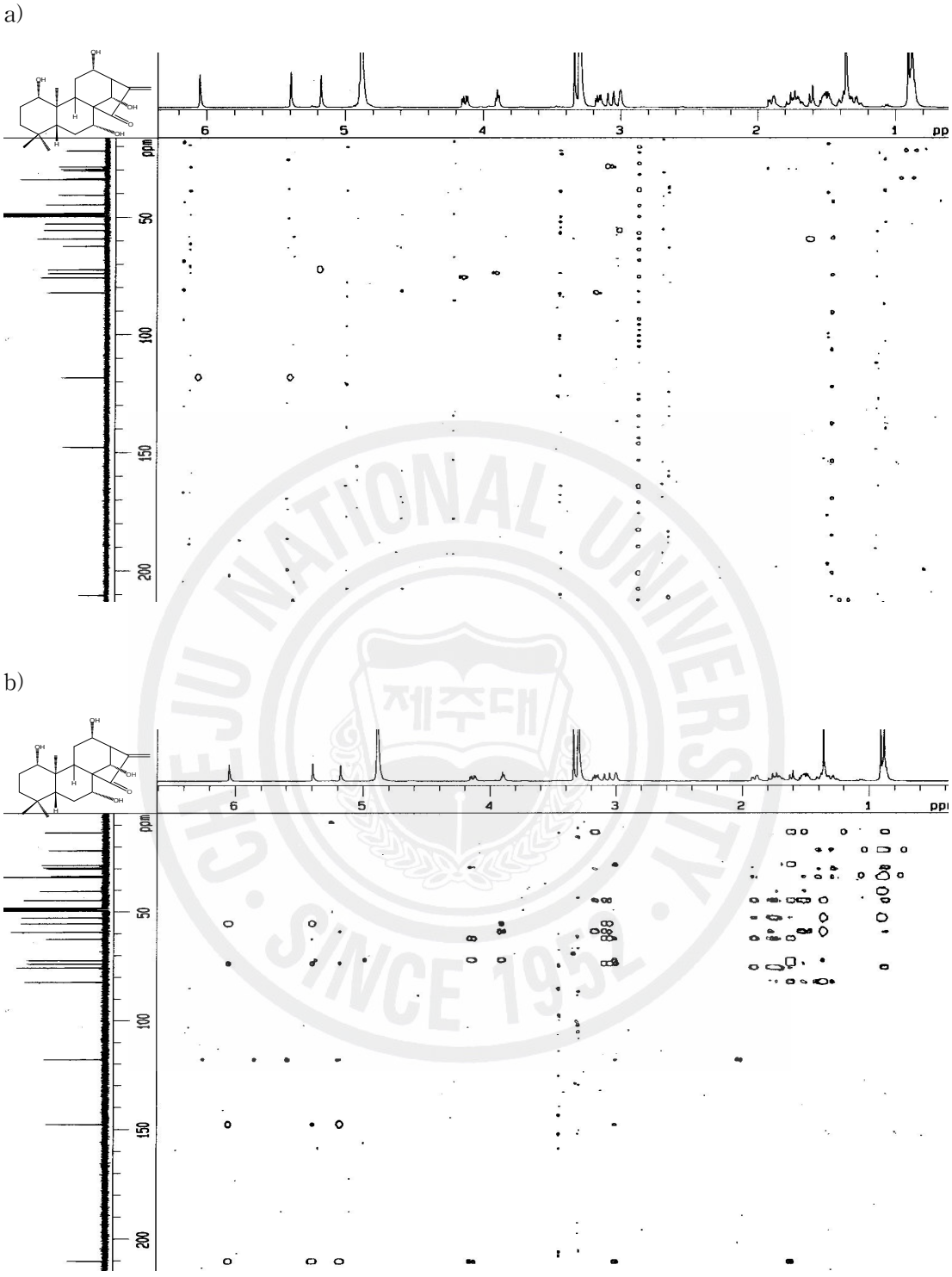


Figure 35. HMQC and HMBC spectrum of RIE-3. (in CD_3OD)

a) HMQC spectrum of RIE-3. b) HMBC spectrum of RIE-3.

2. 털산박하 추출물의 활성 결과

2-1. 미백효과

2-1-1. 털산박하 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과

2-1-1-1. 털산박하 1차 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 저해율 확인

Melan-a 세포를 이용하여 털산박하 조추출물 및 용매분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 조추출물에서는 처리농도(50 ㎍/mL)에서 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 않고(9.0%) 유효한 효능(58.3%)이 나온 반면, 분획층에서는 에틸아세테이트 분획층이 멜라닌 생합성 저해 효과가 가장 좋았으나(84.5%) 이 농도에서는 세포 생존율이 낮게(94.8%) 나왔다(Figure 36). 따라서 이로 인한 멜라닌 생합성 억제 결과인지를 확인하기 위하여 세포 증식에 영향을 주지 않는 농도로 시료를 처리하여 멜라닌 억제 효과를 확인하였다.

털산박하 에틸아세테이트 분획물을 세포 증식에 영향을 미치지 않는 농도로 준비하여 melan-a 세포를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 10㎍/mL의 시료 농도에서는 MTT값이 4.6%에서 멜라닌 억제 효과는 77.1%로 우수하게 나왔으며, 1 ㎍/mL의 시료 농도에서는 MTT값이 4.1%에서 63.5%로 대조군으로 사용된 50 ㎍/mL의 arbutin이 48.3% 억제 효과보다 더 좋은 효과를 보였다(Figure 37).

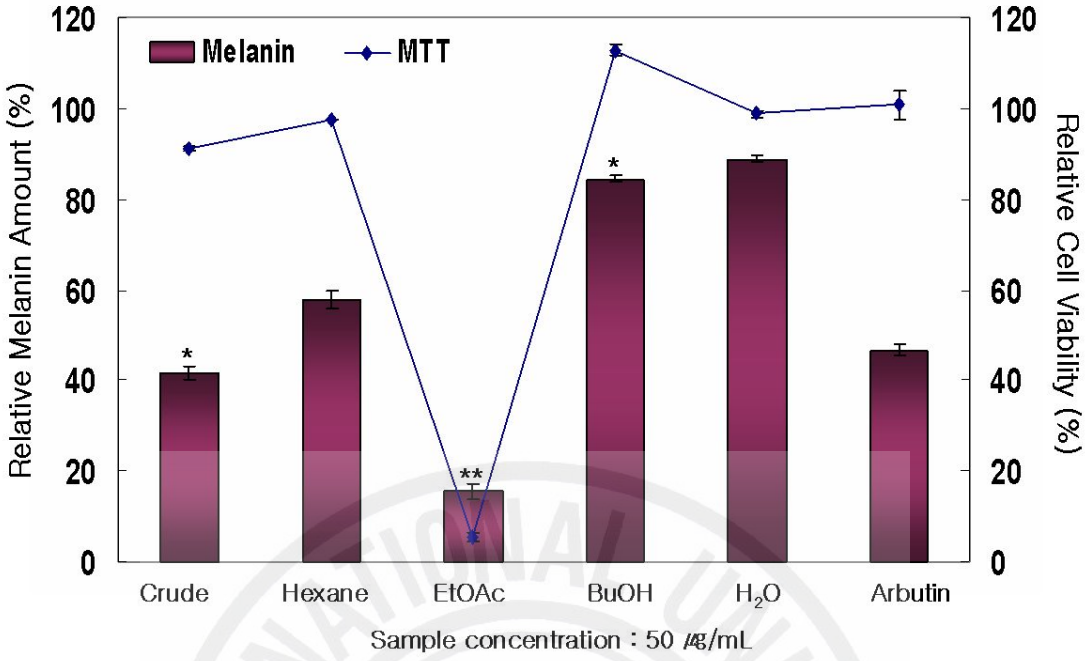
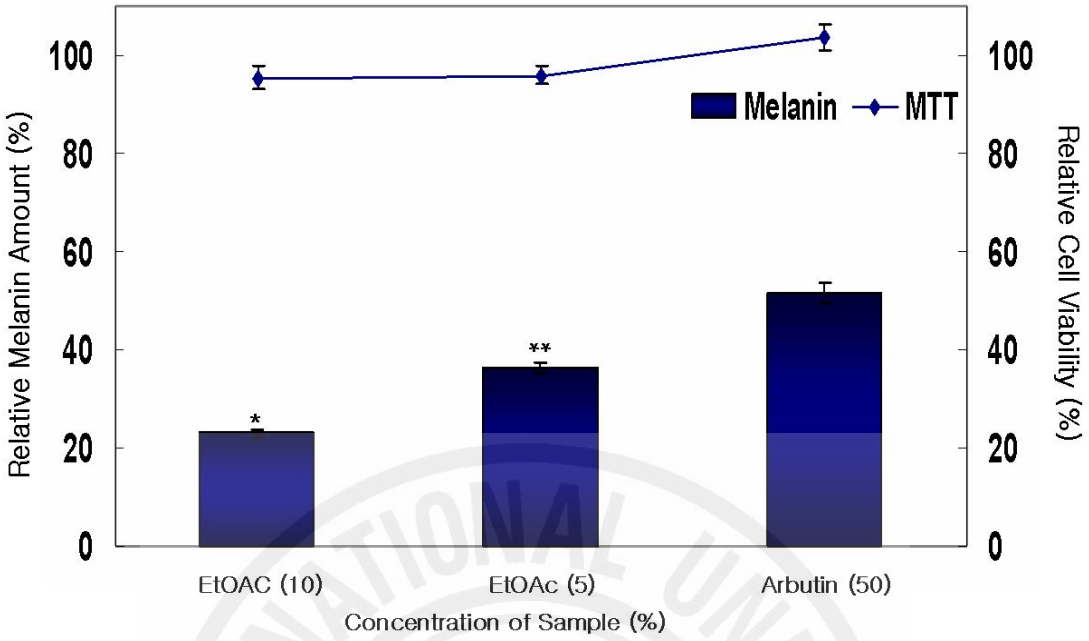


Figure 36. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.



C EtOAc(10) EtOAc(5) Ar(100) Ar(50) Ar(10) Ar(5)

(Ar : arbutin, ():concentration μg/mL)

Figure 37. Effects of EtOAc fractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

2-1-1-2. 털산박하 에틸아세테이트 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과

털산박하 1차 용매 분획 중 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 얻은 10개의 분획들을 melan-a 세포를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정 하였다. 분리한 10개 에틸아세테이트 분획물은 시료의 처리농도 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL로 처리하여 멜라닌 생성 억제와 세포 증식 억제를 확인하였다. 시료의 농도 1 ㎍/mL에서 전체적으로 세포 증식 억제에는 거의 영향을 미치지 않았고 fr6이 81%로 5 ㎍/mL 처리 농도와 유사한 효능으로 가장 좋은 멜라닌 생성 억제 효능을 나타내었다. 다음으로 fr8이 73.1%, fr5가 71.3%, fr7이 64%, fr4가 50.9%순으로 좋은 효능을 나타내었고, 같은 농도에서 대조군으로 사용된 arbutin은 10.3%로 fr4, fr5, fr6, fr7, fr8은 모두 5배 이상의 좋은 멜라닌 억제 효과를 보였다(Table 13, Figure 38).

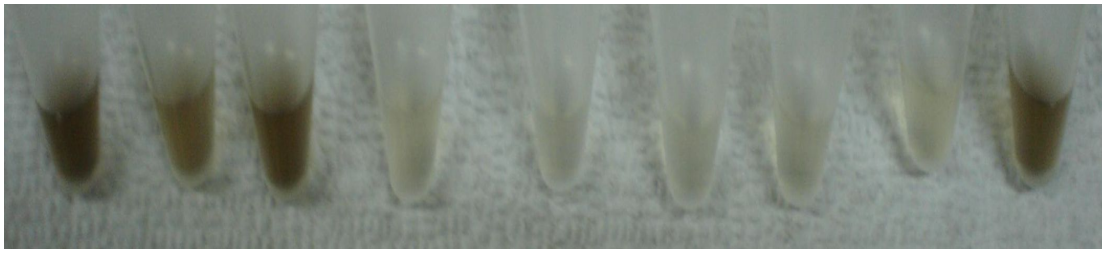
Table 13. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells.

Fractions	5 ㎍/mL		1 ㎍/mL	
	Melanin content (%)	MTT (%)	Melanin content (%)	MTT (%)
fr1	N/D	N/D	N/D	N/D
fr2	N/D	N/D	N/D	N/D
fr3	24.1 ± 1.3	4.8 ± 0.8	14.1 ± 5.8	1.9 ± 4
fr4	85.7 ± 2.7	22 ± 1.2	50.9 ± 4.3	5.4 ± 2.2
fr5	90.6 ± 1.8	28.4 ± 0.5	71.3 ± 2.3	8.3 ± 1.6
fr6	89 ± 0.8	20.5 ± 0.3	81 ± 0.9	7.2 ± 0.3
fr7	87 ± 3.0	26.3 ± 0.5	64 ± 4.2	7.2 ± 1.4
fr8	86 ± 1.0	24.1 ± 0.4	73.1 ± 1.9	8.4 ± 0.1
fr9	22.3 ± 0.6	4.5 ± 0.2	18.3 ± 0.8	4.2 ± 3.4
fr10	N/D	N/D	N/D	N/D
arbutin	17.2 ± 1.9	-2.3 ± 0.2	10.3 ± 4.1	-1.3 ± 2.3

The data expressed as means ± S.D. of three determinations.

N/D means not detectable.

a) (Concentration : 5 ㎍/mL)



C Ar50 fr3 fr4 fr5 fr6 fr7 fr8 fr9

b) (Concentration : 1㎍/mL)

C fr4 fr5 fr6 fr7 fr8

Figure 38. Effects of subfractions of EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. (a) Concentration of sample was 5 ㎍/mL. (b) Concentration of sample was 1 ㎍/mL.

2-1-2. 털산박하 에틸아세테이트 분획물 및 단일물질의 melanin 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 효과

털산박하 에틸아세테이트 분획물과 단일물질의 melan-a 세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과가 멜라닌 생성에 관여하는 여러 가지 효소 및 전사인자의 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다. 멜라닌 생성에 주요한 효소로 알려진 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 그 상위 발현 인자인 mitf의 단백질 발현 억제 양상을 확인하였다. 그 결과 에틸아세테이트 분획물과 단일물질인 kamebakaurin은 tyrosinase, TRP-1, mitf의 단백질 발현을 현저히 억제하고 있음을 확인하였다. 특히 TRP-1의 발현 억제 효과는 에틸아세테이트 분획물과 단일물질 모두 대조군으로 사용된 arbutin 보다 우수하게 나타났다. 그리고 kamebakaurin은 mitf의 발현 억제 효과도 arbutin 보다 더 강하게 나타났다(Figure 39).

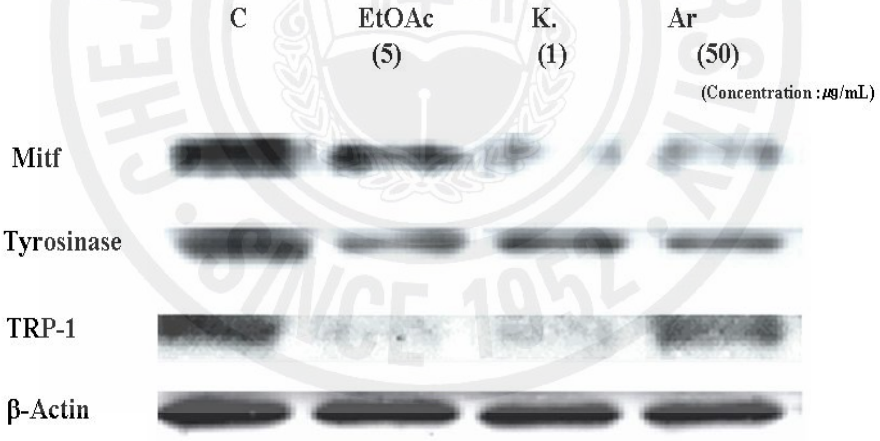


Figure 39. Effects of isolated kamubakauin and EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2, Mitf proteins expression in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. K.: Kamebakaurin, Ar: arbutin

2-1-3. 털산박하 추출물이 첨가된 화장품의 유효성 및 안정성 결과

2-1-3-1. 털산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 멜라닌 생성 억제 효과

털산박하 추출물이 첨가된 화장품에서도 멜라닌 생성 효과가 유지되는지 확인하기 위하여 털산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 에멀젼이 melan-a 세포에서의 멜라닌 생성에 미치는 효과를 측정하였다. 시료의 처리 농도 500 ㎍/mL, 400 ㎍/mL, 200 ㎍/mL로 세포에 처리한 후 멜라닌 생합성 억제 정도를 확인한 결과, 각각 79.7%, 63.9%, 49.5%의 좋은 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 40).

2-1-3-2. 털산박하 추출물을 첨가한 emulsion의 온도 안정성 확인

털산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가하여 제조한 에멀젼을 -4, 25, 40, 60 ℃에 10일간 보관하여 변취, 분리 정도를 확인하였다. 털산박하 에틸아세테이트 분획물을 0.2% 함유한 에멀젼을 제조한 후 각 온도별로 보관하여 상이 분리되는 여부와 변취되는 정도를 10일간 확인하였는데, 모든 온도에서 안정하게 유지되고 있음을 확인하였다(Table 14).

2-1-3-3. 털산박하 추출물을 함유한 emulsion의 pH 측정

털산박하 추출물을 함유한 에멀젼이 피부 약산성 pH 범위에 적합한 지 여부를 확인하기 위하여 털산박하 용매분획물 중 멜라닌 생성 억제 효능이 가장 좋은 에틸아세테이트 분획물을 첨가하여 에멀젼을 제조하였고, 그 pH를 측정하였다.
털산박하 에틸아세테이트 분획물을 0.2% 첨가한 에멀젼의 pH 측정 결과 7.2 ± 0.3으로 확인하였다(Table 15).

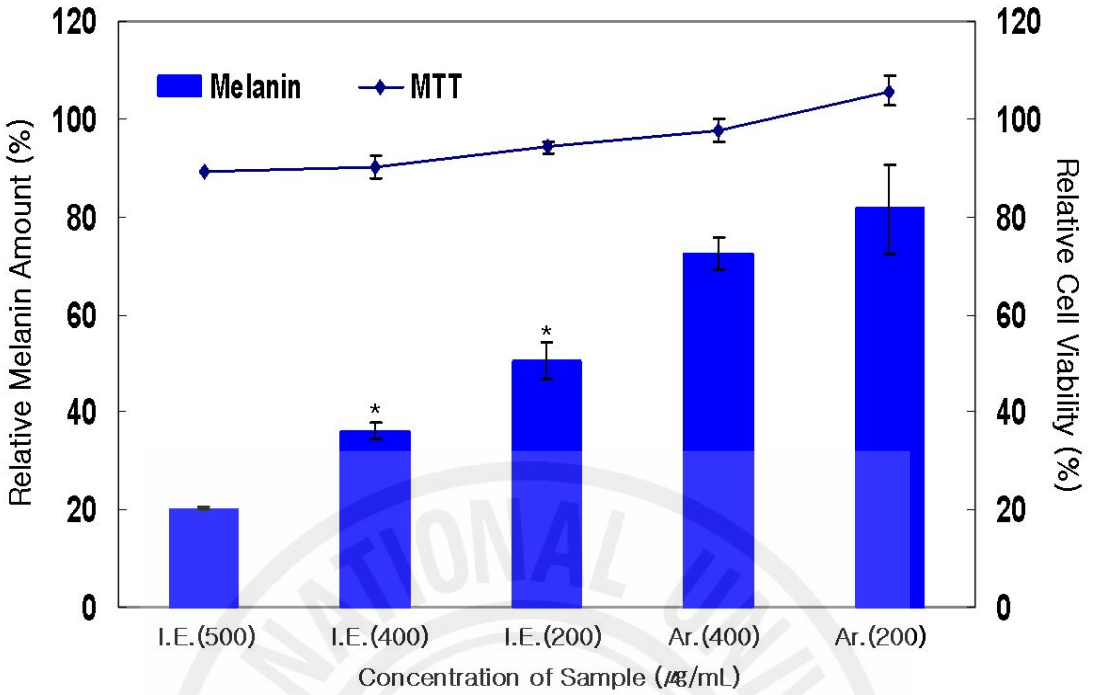


Figure 40. Effects of emulsion containing an EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control. I.E.: Emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus var. canescens* ; Ar.: Emulsion containing arbutin.

Table 14. Results of thermal stability test of the emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens*.

Day	-4℃	25℃	40℃	60℃
1	O	O	O	O
3	O	O	O	O
5	O	O	O	O
7	O	O	O	O
10	O	O	O	O

Table 15. pH measurement of emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens*.

Sample	Concentration (0.2%)
Base emulsion	7.2 ± 0.1
Emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens*.	7.2 ± 0.3
Emulsion containing arbutin	7.2 ± 0.1

2-1-3-4. 털산박하 추출물을 함유한 emulsion의 입자 확인

털산박하 에틸아세테이트 추출물을 함유한 emulsion을 40 ℃에서 30일 동안 보관한 후 400배와 1,000배 배율로 관찰한 결과 입자의 분산 및 분리 없이 안정함을 확인하였다(Figure 41).

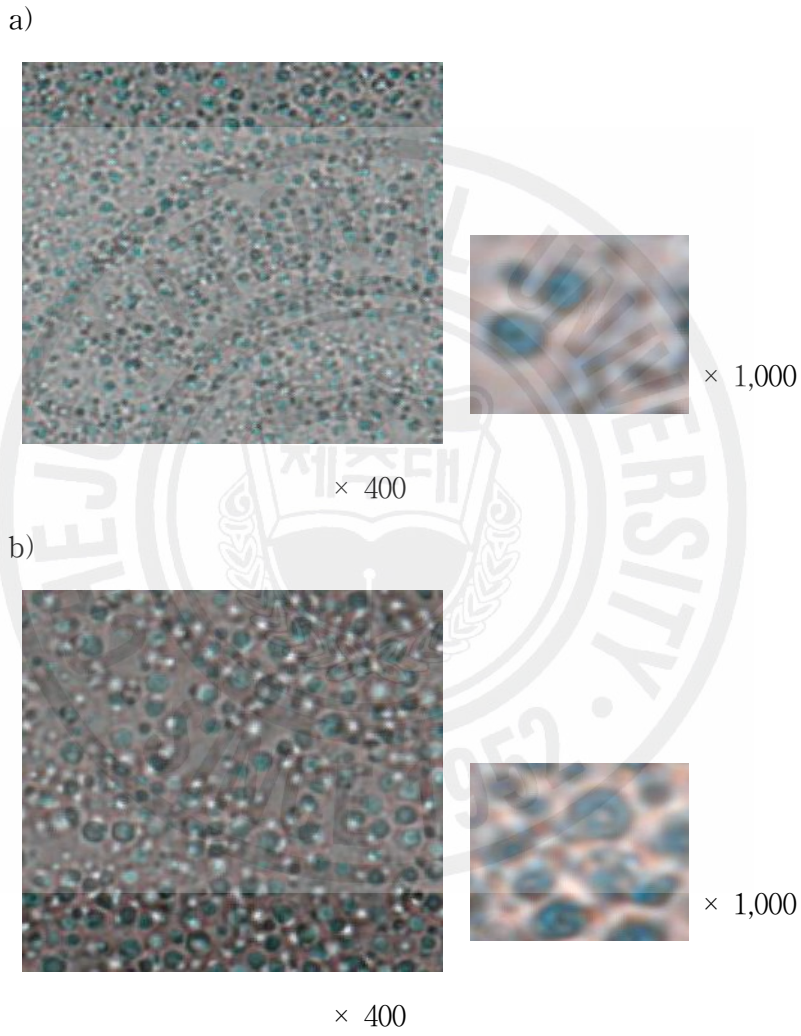


Figure 41. Microscopic aspect of the emulsion containing EtOAc fraction of *Isodon inflexus* var. *canescens*. (a) immediately after the preparation (b) 1 month after the preparation

2-2. 항염증 효과

2-2-1. 털산박하 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향

Nitric oxide(NO) 생성에 대한 털산박하 추출물의 효과를 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)와 털산박하 메탄올 조추출물과 분획물을 50 ㎍/mL의 농도로 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서 38.49 μM로 NO가 과량 생성되었으나, 털산박하 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 각각 NO 생성량이 2.67 μM, 2.31 μM로 현저히 감소하였다(Figure 42a). 이 농도에서 헥산 분획물(62.45%)과 물 분획물(32.67%)의 LDH를 이용한 세포 독성에서 높게 측정되어 NO 억제 효과가 세포 독성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 시료의 농도를 25 ㎍/mL로 하여 NO억제와 세포 독성을 확인하였다.

시료의 농도 25 ㎍/mL로 LPS(1 ㎍/mL)와 털산박하 조추출물 및 용매 분획물을 처리하였을 때 세포 독성은 LDH를 이용하여 측정하였을 때 나타나지 않았고, NO의 생성은 LPS 단독 처리군에서는 51.40 μM이 생성되었으며, 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서는 각각 6.49 μM, 2.85 μM로 에틸아세테이트 분획물은 NO 억제 효과가 여전히 우수하게 유지되었다(Figure 42b).

a) b)

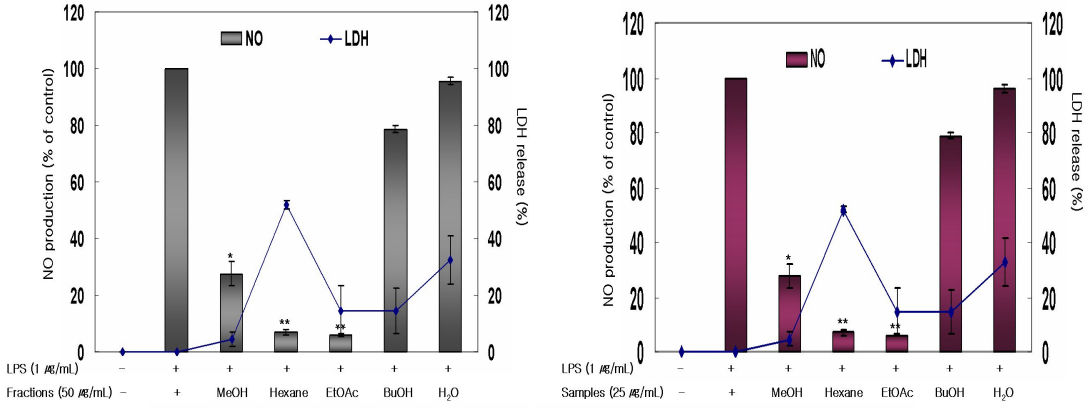


Figure 42. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. (a) Concentration of samples was 50 ㎍/mL. (b) Concentration of samples was 25 ㎍/mL. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone.

2-2-2. 털산박하 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포를 이용하여 털산박하 조추출물과 그 분획물의 iNOS mRNA 발현 억제 활성을 확인하였다. LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 털산박하 조출물과 그 분획물의 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. LPS에 의하여 iNOS는 현저하게 증가하였으며, 털산박하 분획물을 처리한 결과 에틸아세테이트 분획물이 mRNA 발현을 아주 강하게 억제하였다(Figure 43).

2-2-3. 털산박하 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 털산박하 조출물과 그 분획물을 25 ㎍/mL로 처리한 후 COX-2의 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 털산박하 조추출과 그 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 COX-2 mRNA 발현을 억제하였다(Figure 43).

2-2-4. 털산박하 추출물이 pro-inflammation의 mRNA발현에 미치는 영향

털산박하 추출물의 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 LPS와 털산박하 추출물을 함께 처리하여 RT-PCR을 시행하였다. TNF-α, IL-6, IL-1β 생성 억제에 대한 털산박하 메탄올 조추출물과 그 용매 분획물을 25 ㎍/mL 농도로 처리하였을 때 에틸아세테이트 분획물이 가장 좋은 억제 효과를 보였다. 특히 IL-6 mRNA 발현을 가장 강하게 억제 하였고, IL-1β가 다음으로 억제 되었다. β-Actin을 대조군으로 사용하였고 그 결과 시료들이 세포에 영향을 주어 감소하는 것이 아님을 보여주었다(Figure 44).

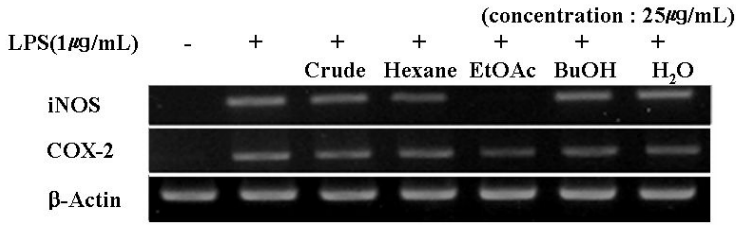


Figure 43. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of samples (25 ㎍/mL) for 24h to determine iNOS but 6h for COX-2. The mRNA expression of iNOS and COX-2 was determined by RT-PCR experiment. Data for actin was shown as 24h stimulation even though data for 6h stimulation were collected.

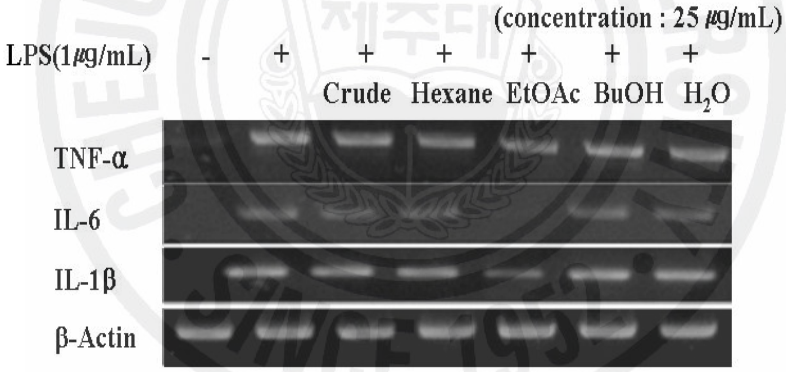


Figure 44. Effects of isolated compounds 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of samples (25 ㎍/mL) for 6h. The RNA extraction was carried out in a RNase-free environment and the mRNA expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β were determined by RT-PCR experiment.

2-3. 항산화 효과

2-3-1. 털산박하 추출물의 DPPH radical 소거 효과

털산박하 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 DPPH 라디칼 소거 활성을 통해 항산화 효과를 측정하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL에서 에틸아세테이트 분획물이 80.0%, 메탄올 조추출물이 74.8%, 부탄올 분획물이 54.9%, 물 분획물이 46.7%, 헥산 분획물이 14.1%의 억제 효과를 나타내었다. 이들의 IC_{50}값을 측정한 결과 에틸아세테이트 분획물이 26.6 ㎍/mL, 메탄올 조추출물이 34.4 ㎍/mL, 부탄올 분획물이 44.4 ㎍/mL, 물 분획물이 55.2 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 Vit.C(3.0 ㎍/mL)나 BHA(9.7 ㎍/mL) 보다는 낮은 소거 활성을 나타내었다(Figure 45).

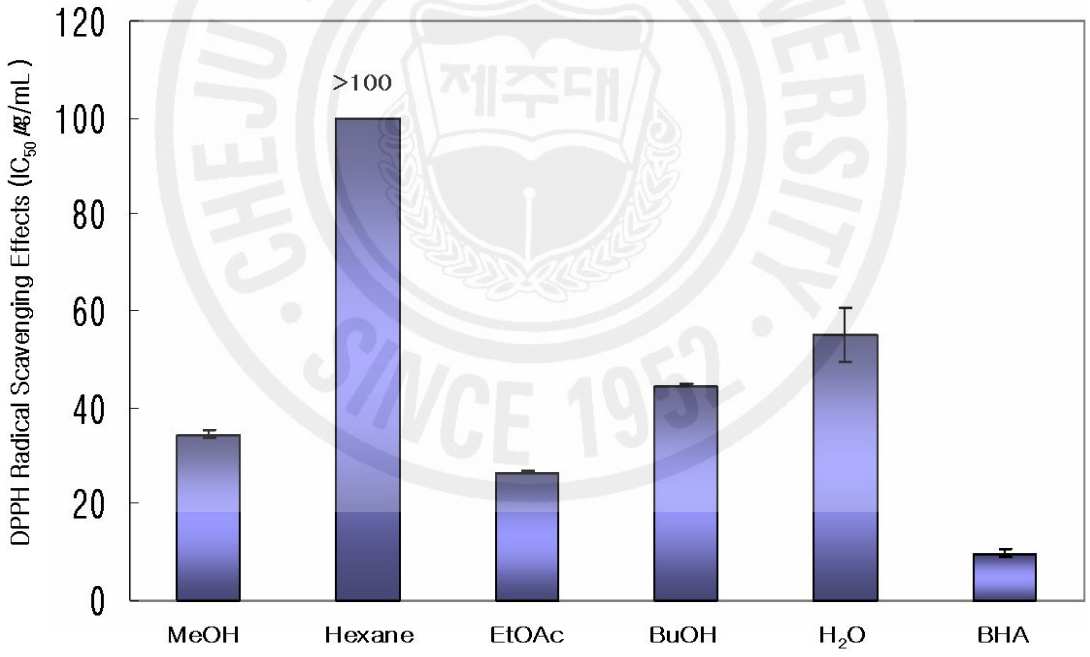


Figure 45. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens*.

The data were expressed as means ± S.D. of three determinations.

2-3-2. 털산박하 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 효과

털산박 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 NO 억제 효과를 시료의 농도 500 ㎍/mL와 IC_{50}을 이용하여 확인하였다. 시료의 처리 농도 500 ㎍/mL에서 털산박하 에틸아세테이트 분획물이 84.0%로 가장 좋은 억제 효과를 보였고, 헥산 분획물이 59.6%, 메탄올 조추출물이 56.5%, 물 분획물이 54.4%, 부탄올 분획물이 50.1%의 억제 효과를 나타내었다. 이들의 IC_{50}값을 측정한 결과 에틸아세테이트 분획물이 115.6 ㎍/mL로 역시 가장 우수한 억제 효과를 보였고, 메탄올 조추출물이 218.5 ㎍/mL, 헥산 분획물이 259.6 ㎍/mL, 물 분획물이 348.6 ㎍/mL, 부탄올 분획물이 501.5 ㎍/mL 순으로 효과를 나타내었다(Table 16).

2-3-3. 털산박하 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과

Xanthine oxidase 억제 효과를 털산박하 메탄올 조추출물 및 그 분획물을 250 ㎍/mL의 농도로 준비하여 활성을 확인한 결과 에틸아세테이트 분획물이 36.6%, 헥산 분획물이 15.3%, 메탄올 조추출물이 15.1%, 물 분획물이 2.0%, 부탄올 분획물이 0.01%로 측정되었다(Table 16).

Superoxide 소거 활성은 500 ㎍/mL의 농도와 IC_{50}값으로 확인 하였다. 500 ㎍/mL의 시료 농도에서 털산박하 에틸아세테이트 분획물이 100.7%로 월등한 소거 활성을 나타내었고, 메탄올 조추출물도 95.3%로 우수한 억제 효과를 보였으며 부탄올 분획물이 86.5%, 물 분획물이 84.5%, 헥산 분획물이 82.5% 순으로 소거 효과를 나타내었다. 이들의 IC_{50}값을 확인한 결과 에틸아세테이트 분획물이 1.20 ㎍/mL로 가장 좋은 억제 효과를 나타내었고, 메탄올 조추출물이 8.8 ㎍/mL, 물 분획물이 19.4 ㎍/mL, 부탄올 분획물이 29.9 ㎍/mL, 헥산 분획물이 259.7 ㎍/mL로 측정되었다(Table 16).

Table 16. Antioxidant activities of the 80% MeOH extract and its subfractions of *Isodon inflexus* var. *canescens*.

Fractions	Nitric oxide Scavenging activity		Xanthine oxidase inhibition		
			Inhibition of uric acid generation	Inhibition of superoxide generation	
	500 μg/mL (%)	IC_{50} (μg/mL)	250 μg/mL (%)	500 μg/mL (%)	IC_{50} (μg/mL)
MeOH	56.5 ± 4.2	218.5 ± 11.2	15.1 ± 7.5	95.3 ± 0.5	8.8 ± 17.5
Hexane	59.6 ± 0.8	259.6 ± 8.0	15.3 ± 4.0	82.5 ± 6.8	259.7 ± 92.6
EtOAc	84.0 ± 5.6	115.6 ± 6.1	36.6 ± 0.1	100.7 ± 4.6	1.2 ± 1.1
BuOH	50.1 ± 3.3	501.5 ± 80.9	0.01 ± 1.4	86.5 ± 0.6	29.9 ± 19.1
H_2O	54.4 ± 0.7	348.6 ± 25.0	2.0 ± 0.9	84.5 ± 1.8	19.4 ± 5.4
Quercitin	92.7 ± 3.1	80.1 ± 7.8	N/D	N/D	N/D
Allopurinol	N/D	N/D	90.3 ± 4.5	90.9 ± 0.3	2.2 ± 0.8

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments.

N/D means not detectable.

2-4. IIE-1의 구조 동정

IIE-1의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼을 측정, 비교 분석한 결과(Table 17) 산박하에서 분리되어진 kamebakaurin[88]과 일치하였다.

Table 17. NMR spectroscopic data for IIE-1(in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[88] δ_C (ppm)	Dept	HMBC (H→C#)
1	3.42 (dd, J = 4.76Hz, 10.4Hz)	82.5	81.3	CH	9, 20
2	2.78 (dd, J = 5.6, 15.5)	30.7	30.7	CH_2	5, 9, 20
	2.56 (ddt, J = 5.6Hz, 13.1Hz)				
3	1.51 (m)	39.8	39	CH_2	
4		33.7	32.9	C	
5	0.95 (m)	53.2	52.2	CH	7, 18
6	1.87 (m)	30.3	30.3	CH_2	5, 7, 8
7	4.19 (dd, J = 4.88Hz, 12.02Hz)	75.7	74.8	CH	8, 14
8		62.5	62.1	C	
9	1.63 (m)	57.7	56.8	CH	8, 11, 12, 14
10		49.1	47.9	C	
11	1.34 (m)	21.9	21.5	CH_2	
12	1.67 (m)	31.9	31.5	CH	
13	2.97 (brs)	49.7	48.1	CH	
14	5.05 (s)	77.5	76.5	CH	16
15		210.1	209.3	C	
16		150.6	150.8	C	
17	6.05 (s)	116.9	115.3	CH_2	13, 16
	5.37 (s)				13
18	0.92 (s)	33.8	33.3	CH_3	4, 5, 19
19	0.91 (s)	22.5	22.3	CH_3	3, 18
20	4.37 (d, J = 12.2Hz)	62.2	61.9	CH_2	1, 9
	4.02 (d, J = 12.2Hz)				1, 9

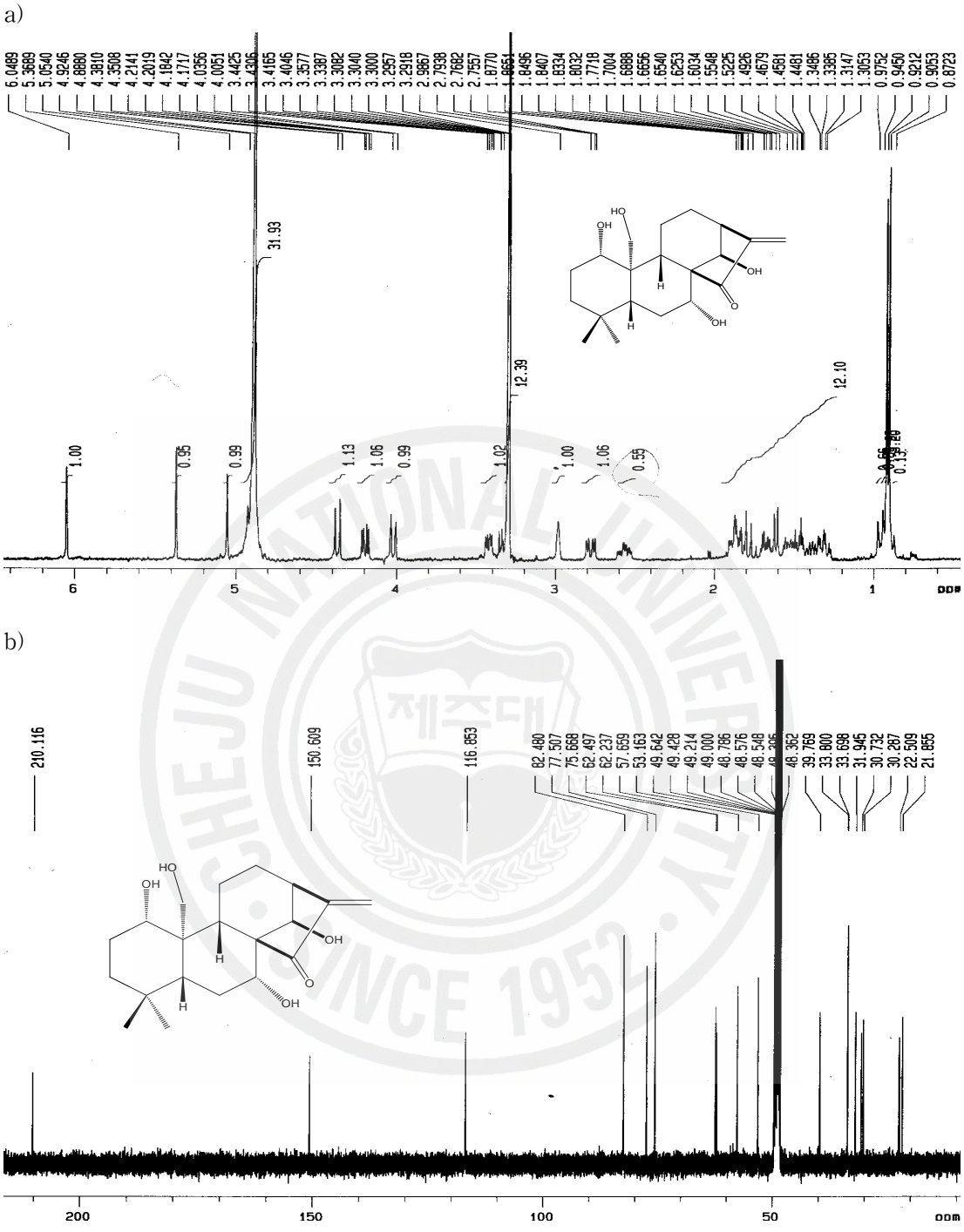


Figure 46. H and ^{13}C-NMR spectrum of IIE-2. (in CD_3OD)

a) ^{1}H NMR spectrum of IIE-1. b) ^{13}C NMR spectrum of IIE-1.

3. 조록나무 추출물의 활성 결과

3-1. 미백효과

3-1-1. 조록나무 추출물의 tyrosinase 억제 효과

3-1-1-1. 조록나무 추출물의 tyrosinase 억제 효과

피부의 색을 결정하는데 중요한 요인인 melanin 합성은 피부 표피 기저층에 있는 melanocyte내의 멜라노좀에서 아미노산의 하나인 tyrosine을 tyrosinase가 1차적으로 산화시켜 수산기가 첨가된 DOPA(dihydroxy phenylalanine)를 형성하며 이것은 다시 한 번 tyrosinase 효소에 의해 DOPA quinone으로 되면서 일련의 산화과정에 의해 멜라닌 색소를 형성하게 된다. 따라서 tyrosinase는 멜라닌 형성의 속도 결정 단계에 작용하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제시켜 멜라닌 생성량 증가를 감소시킴으로써 피부의 미백에 도움을 줄 수 있다.

조록나무 조추출물 및 용매 분획물을 잎과 줄기로 구분하여 tyrosinase 억제 효과를 측정하였다. 시료의 농도를 100 ㎍/mL로 준비하여 측정한 결과 조록나무 잎은 55.5%, 줄기는 40.8%의 저해 효과를 보였고, 각각을 용매 분획하여 억제 효과를 측정한 결과 잎의 에틸아세테이트 분획과 줄기의 에틸아세테이트 분획물이 각각 53.1%와 85.5%로 대조군으로 사용된 arbutin(50.4%)보다 좋은 효소 억제 효과를 나타내었다(Table 18).

3-1-1-2. 조록나무 잎 에틸아세테이트 분획 및 단일물질의 tyrosinase 억제 효과

조록나무 잎의 분획물 중에서 tyrosinase 억제 효과가 가장 좋은 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분을 분리하기 위하여 column chromatography를 사용하여 11개의 분획물을 얻어 효소 억제 활성을 측정하였다. 분획물 및 단일물질에서는 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 대조군으로 사용된 arbuin인 경우 50.4%의 억제 효과를 보였

고, fr11(93.0%), PGG(92.9%), fr9(92.2%), fr10(92.0%), fr6(80.1%), fr7(76.4%), fr8(71.5%), fr5(66.6%), fr4(57.5%), fr2(17.1%), fr3(16.8%), fr1(-23.9%)순으로 tyrosinase 억제 효과를 나타내었다. 그리고 분획물들과 단일물질의 IC_{50}값을 확인하였을 때 fr10(3.0 ㎍/mL), fr6(12.0 ㎍/mL), fr9(15.4 ㎍/mL), fr11(15.9 ㎍/mL), fr7(29.3 ㎍/mL), fr8(34.4 ㎍/mL), PGG(53.4 ㎍/mL)순으로 대조군으로 사용된 arbutin(112.1 ㎍/mL)보다 좋은 효과를 보였다(Table 19).

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

Table 18. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Distylium racemosum* on tyrosinase activity.

Sample		Tyrosinase 억제효과 100 ㎍/mL (%)	IC_{50}, ㎍/mL
조록나무 잎	Crude	55.5	95.2
	Hexan	19.0	>200
	EtOAc	53.1	115.6
	BuOH	17.4	>100
	H2O	36.0	>200
조록나무 줄기	Crude	40.8	113.3
	Hexan	19.0	>200
	EtOAc	85.5	28.3
	BuOH	37.9	>200
	H2O	11.7	>200
arbutin		50.4	112.1

Table 19. Effects of PGG and subfractions of EtOAc extract of *Distylium racemosum* on tyrosinase activity.

조록나무 잎 EtOAc층의 분획	Tyrosinase 억제효과 100 ㎍/mL (%)	IC_{50}, ㎍/mL
fr1	-23.9	N/D
fr2	17.1	N/D
fr3	16.8	N/D
fr4	57.5	N/D
fr5	66.6	N/D
fr6	80.1	12.0
fr7	76.4	29.3
fr8	71.5	34.4
fr9	92.2	15.4
fr10	92.0	3.0
fr11	93.0	15.9
PGG	92.9	53.4
arbutin	50.4	112.1

N/D means not detectable.

3-1-2. 조록나무 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 측정 결과

3-1-2-1. 조록나무 메탄올 조추출물 및 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과

Melan-a 세포를 이용하여 조록나무 잎과 줄기의 조추출물 및 용매 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 잎의 조추출물에서는 처리농도(50 ㎍/mL)에서 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 않고(7.6%) 유효한 효능(26.5%)이 나왔고, 줄기의 조추출물에서는 같은 농도에서 억제 효과를 보이지 않았다. 잎의 분획물에서는 대조군으로 사용된 arbutin(37.9%)에 비해 에틸아세테이트 분획층이 멜라닌 생합성 저해 효과가 가장 좋았으나(59.4%) 이 농도에서는 세포 생존율이 낮게(35.0%) 나왔으며, 줄기의 분획물 역시 에틸아세테이트 분획물이 멜라닌 생합성 억제 효과가 가장 좋게 나왔으나(74.2%) 세포 생존율(26.0%)이 낮게 측정되었다(Figure 47).

3-1-2-2 조록나무 잎 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생합성 억제 효과

조록나무 잎의 분획물 중에서 멜라닌 생합성 억제 효과가 가장 좋은 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분을 분리하기 위하여 column chromatography를 사용하여 11개의 분획물들을 얻어 melan-a 세포를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL에서 대조군으로 사용된 arbuin인 경우 30.4%의 억제 효과를 보였고, 분획물 중에는 fr3(65.9%)이 가장 좋은 억제 효과를 보였으나 세포 증식 억제 경향을 보였다(MTT:33.8%). Tyrosinase 효소 활성 억제 효과가 우수했던 fr9인 경우 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과(18.0%)는 낮지만 세포 증식(MTT:0.1%)에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(Figure 48).

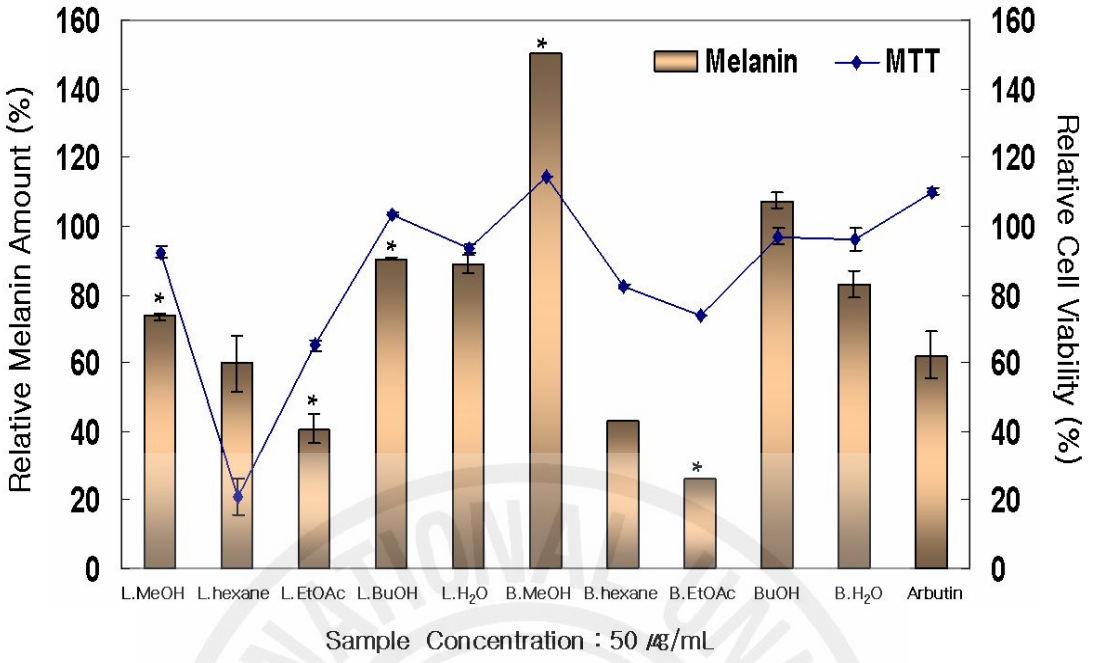


Figure 47. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of leaves and branches of *Distylium racemosum* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

L.: Leaves of *Distylium racemosum*, B.: Branches of *Distylium racemosum*,

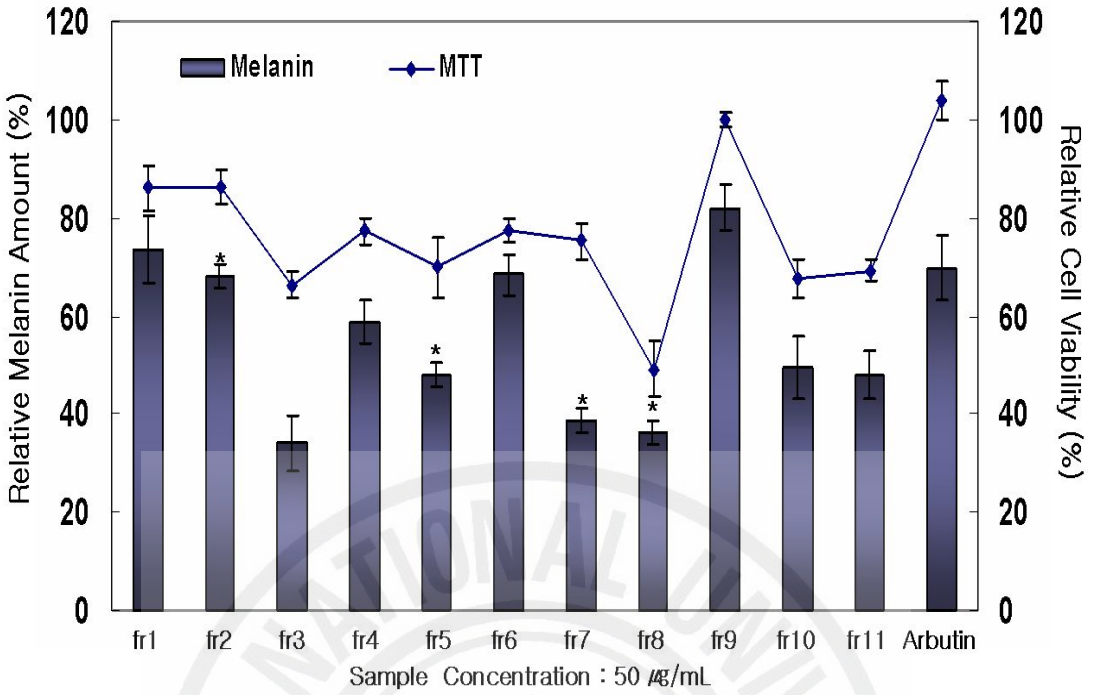


Figure 48. Effects of subfractions of EtOAc extract of *Distylium racemosum* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

3-1-2-3. 조록나무 잎에서 분리한 PGG의 멜라닌 생합성 억제 효과

조록나무 잎의 에틸아세테이트 분획 중 멜라닌 생합성 억제 효과는 비교적 낮게 측정 되었으나 세포 증식에 영향을 미치지 않는 fr9를 이용하여 단일 물질인 PGG를 분리하였고, 이 물질에 대한 melan-a 세포에서의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 분리한 단일물질인 PGG를 20 ㎍/mL, 10 ㎍/mL, 5㎍/mL의 농도로 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 20 ㎍/mL 농도에만 약간의 세포

증식 억제(11.5%)를 보이면서 억제 효과를 보였고(73.4%), 다른 농도에서는 세포에 영향을 미치지 않고 10 ㎍/mL 농도에서는 58.5%, 5 ㎍/mL에서는 20.5%로 대조군인 arbutin(20 ㎍/mL:48.9%, 10 ㎍/mL:22.1%, 5 ㎍/mL:11.7%)보다 농도 의존적으로 우수한 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었다(Figure 49).

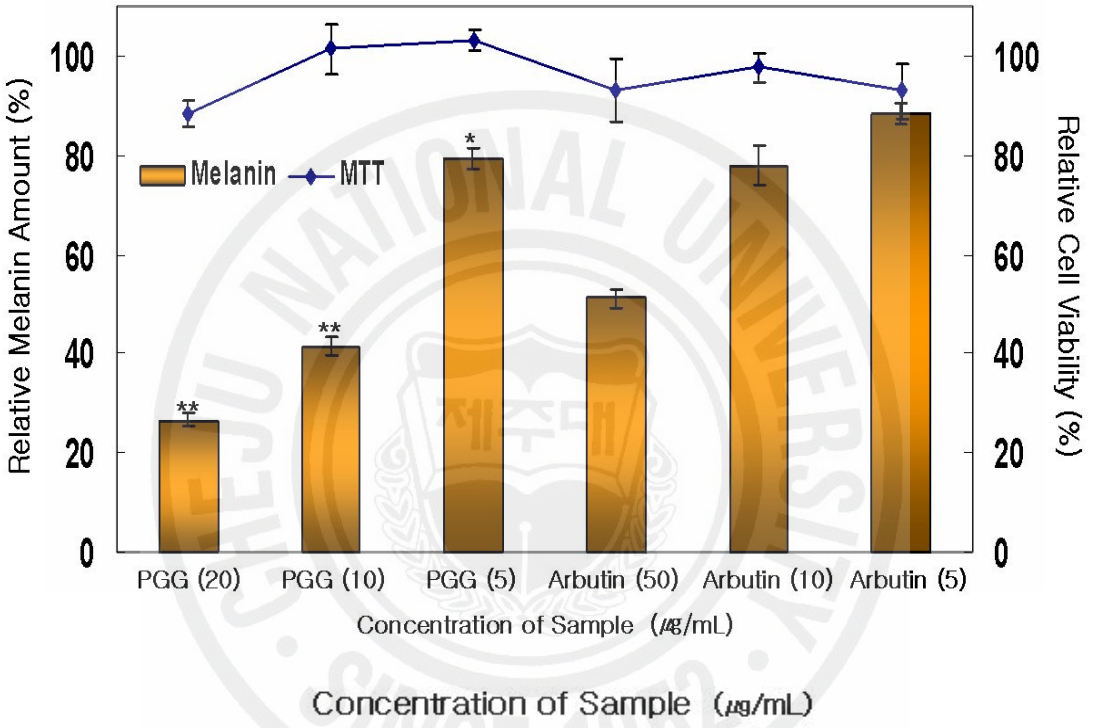


Figure 49. Effects of PGG isolated from leaves of *Distylium racemosum* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with control.

3-1-3. Melanin 생성에 관여하는 mRNA 발현에 PGG가 미치는 영향

조록나무 잎에서 분리한 PGG의 멜라닌 생합성 억제 효과가 멜라닌 생성에 관여하는 인자들의 mRNA 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. Melan-a 세포에 세포 증식에 영향을 미치지 않으면서 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타낸 10 ㎍/mL의 PGG를 처리한 후 멜라닌 생성에 중요한 몇 가지 유전자들의 mRNA 발현 억제를 측정한 결과 TRP-1, MC1r, α-MSH의 mRNA 발현을 억제하였다(Figure 50).

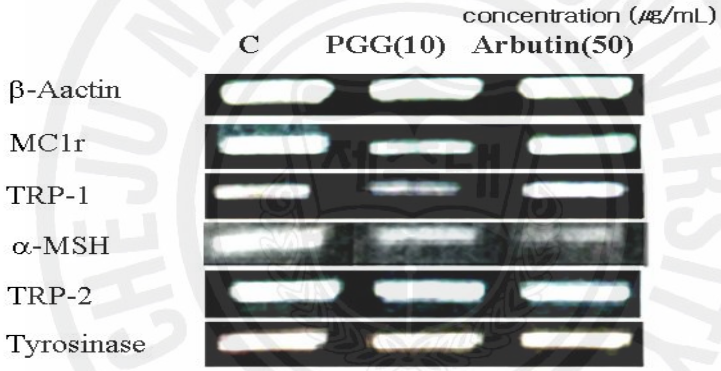


Figure 50. Effects of PGG isolated from leaves of *Distylium racemosum* on mRNA expression in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24 h passed, media and PGG were exchanged everyday for 3 days. Total RNA was subjected to RT-PCR experiment.

3-2. 항주름 효과

3-2-1. 조록나무 추출물의 elastase 억제 효과

3-2-1-1. 조록나무 메탄올 추출물 및 분획물들의 elastase 억제 효과

피부 진피 내에 위치하면서 피부의 탄력과 주름에 영향을 미치는 elastin은 elastase라는 효소에 의해 나이가 들면서 자연적으로 분해되어 감소하지만 자외선이나 활성산소와 같은 외부의 환경에 의해 이 효소의 발현이 더욱 증가되어 elastin의 분해를 가속화시켜 피부 노화를 증가시키게 된다. 따라서 조록나무 추출물이 elastase의 활성을 억제하여 피부 노화를 지연시킬 수 있는 지 확인하였다. 조록나무 잎과 줄기의 조추출물 및 용매 분획물들의 elastase 억제 효과를 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 측정한 결과 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(67.2%, IC_{50}:30.7 ㎍/mL)에 비해 잎의 조추출물에서 가장 좋은 효과(97.9%, IC_{50}:5.5 ㎍/mL)를 나타내었고, 줄기의 조추출물에서도 비슷한 우수한 효과(80.9%, IC_{50}:21.0 ㎍/mL)를 나타내었다. 분획물에서는 줄기의 부탄올(IC_{50}: 17.8 ㎍/mL), 물(IC_{50}:18.3 ㎍/mL) 분획에서 좋은 효과를 나타내었다(Table 20).

3-2-1-2. 조록나무 에틸아세테이트 분획 및 PGG의 elastase 억제 효과

조록나무 잎의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 11개의 분획들과 단일물질인 PGG의 elastase 억제 효과를 측정한 결과 시료의 농도 100 ㎍/mL에서는 PGG(95.5%), fr6(94.7%), fr7(91.1%), fr5(90.5%), fr8(88.5%), fr9(72.4%)가 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(70.0%)에 비해 좋은 효과를 나타내었다. 그리고 elastase를 50% 억제 하는 농도는 PGG(12.1 ㎍/mL), fr6(14.0 ㎍/mL), fr7(14.3 ㎍/mL)이 빈랑자(21.2 ㎍/mL)보다 낮은 농도에서 효과를 보였고, fr5(30.5 ㎍/mL), fr8(38.1 ㎍/mL)도 좋은 효과를 나타내었다(Figure 51).

Table 20. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Distylium racemosum* on elastase activity.

Sample		엘라스타제 억제효과(%) (100 ㎍/mL)	IC_{50}, ㎍/mL
조록나무 잎	Crude	87.9	5.5
	Hexan	-3.7	>100
	EtOAc	34.4	>100
	BuOH	42.0	>100
	H_2O	-27.2	>100
조록나무 줄기	Crude	80.9	21.0
	Hexan	64.6	74.8
	EtOAc	64.8	53.8
	BuOH	79.7	17.8
	H_2O	83.7	18.3
빈랑자		67.2	30.7

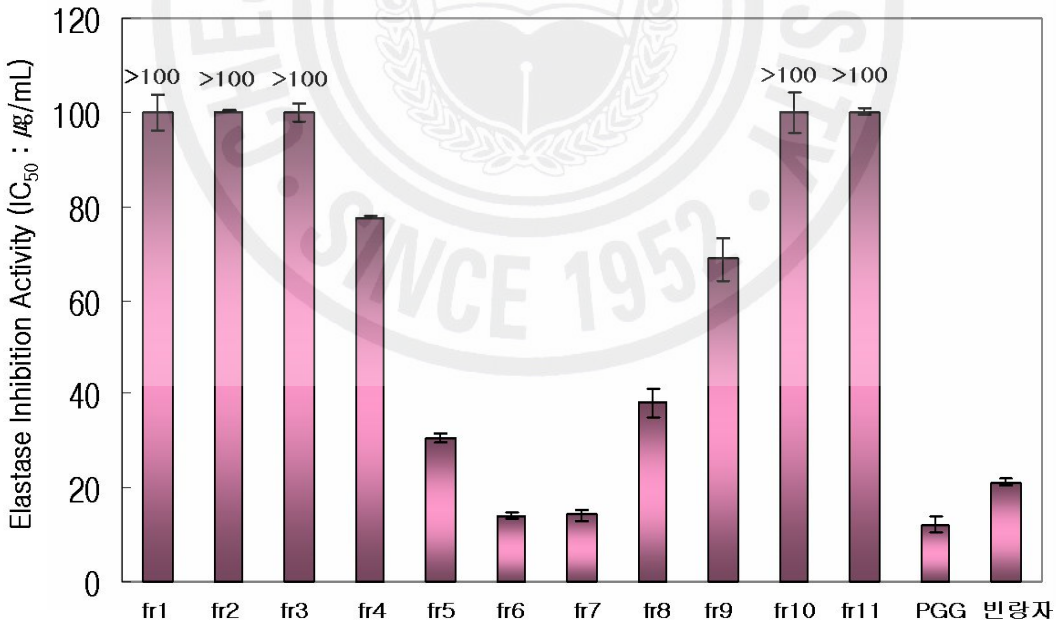


Figure 51. Effects of PGG and subfractions of EtOAc extract of the leaves of *Distylium racemosum* on elastase activity.

The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

3-2-3. 조록나무 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과

피부 내의 결합을 담당하면서 진피에서 많은 구성비를 차지하고 있는 콜라겐은 결합섬유로서 생성이 억제 되거나 분해되었을 때 피부는 탄력을 잃고 주름이 지게 된다. 이러한 콜라겐은 자연적으로 노화가 진행되면서 혹은 자외선과 같은 외부 자극에 의해서 다양한 기질 단백질 분해 효소(MMP)의 발현에 의해 분해되는데 이 효소들은 분해하는 단백질에 따라 그 종류가 다양하다. 특히 피부 진피 내에 있는 콜라겐 type I을 분해하는 효소를 collagenase(MMP-1) 라고 한다. 따라서 MMP-1의 생성 억제 및 활성 억제를 측정함으로써 항노화 소재로서 기능을 확인할 수 있다.

조록나무 전 부위 메탄올 조추출물과 잎의 메탄올 추출물의 MMP-1 효소 활성 억제 효과를 20 ㎍/mL의 시료 농도로 측정한 결과 조록나무 전체를 첨가한 것은 16%, 잎의 메탄올 추출물을 첨가한 것은 11.1%의 억제 효과를 나타내었다.

UV에 의해 유도되는 MMP-1 생성 억제 효과 측정법은 자외선 조사한 후에 생성되는 섬유아세포의 MMP 발현조절 기능을 평가할 수 있어 생체 내에서 콜라겐의 합성과 분해를 적절하게 조절할 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다. 조록나무 전 부위와 잎의 메탄올 조추출물을 이용하여 MMP-1의 발현 억제 효과를 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 측정한 결과 전 부위 메탄올 추출물은 29.4%의 억제 효과를 나타내었고, 잎의 메탄올 추출물은 18.2%로 측정되었다(Table 21).

Table 21. Effects of extract of *Distylium racemosum* on MMP-1 activity and the production of MMP-1 by the UVB irradiated human dermal fibroblast.

시료명	MMP-1생성억제효과(%) (100 ㎍/mL)	MTT(%) (100 ㎍/mL)	MMP-1활성억제효과(%) (20 ㎍/mL)
조록나무 상층부	29.4	0.3	16
조록나무 잎	18.2	0.4	11.1

3-3. 조록나무 추출물의 DPPH radical 소거 활성

조록나무 잎의 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 유효성분인 PGG의 DPPH 라디칼 소거 활성을 시료의 농도 50 ㎍/mL와 IC_{50}값에서 확인하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL에서 메탄올 추출물은 94.0%, 단일물질인 PGG는 96.2%의 소거 활성을 나타내었고, 이것은 대조군으로 사용된 Vit.C(93.4%) 보다 좋은 억제 효과를 나타내었다. 이들의 IC_{50}값을 확인한 결과 PGG는 2.3 ㎍/mL로 Vit.C(5.5 ㎍/mL) 보다 좋은 효과를 나타내었고, 메탄올 조추출물은 5.7 ㎍/mL로 Vit.C와 유사한 라디칼 소거 효과를 보였다(Figure 52).

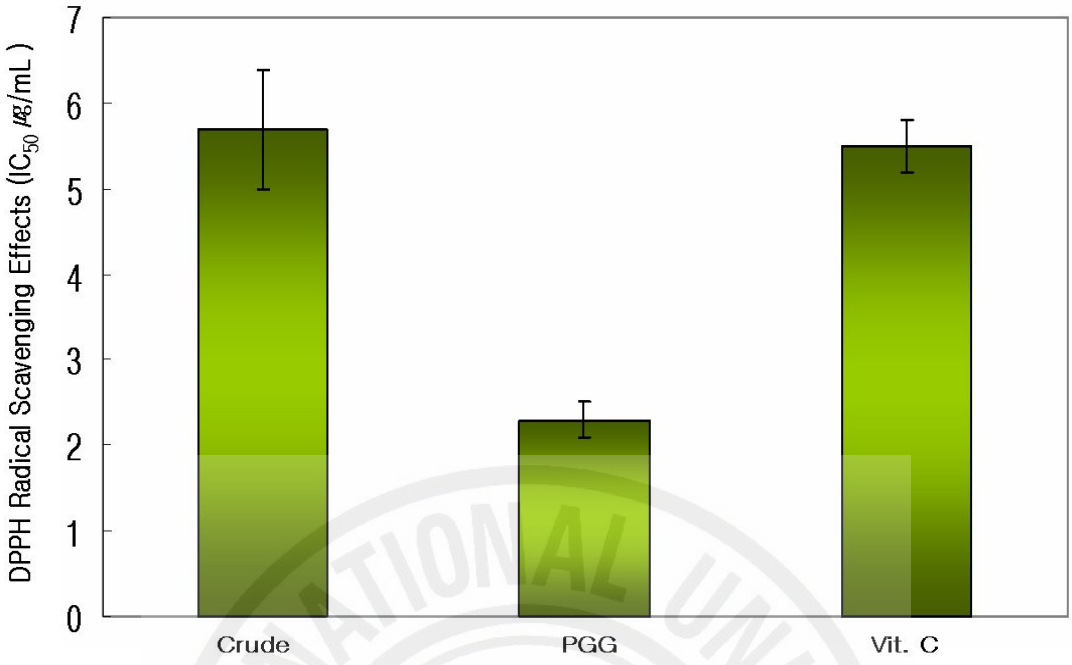


Figure 52. The DPPH radical scavenging activity of PGG isolated from *Distylium racemosum*.

The data were expressed as means ± S.D. of three determinations.

3-4. DRE-1의 구조 동정

화합물 DRE-1[90a)]의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼, DEPT를 측정하였다. ^{1}H NMR스펙트럼에서 7.10, 7.04, 6.97, 6.94, 6.89ppm에서 5개의 galloyl group에 기인하는 2H의 singlet이 나타났으며, aliphatic 영역에서 저자장 이동하여 4.38 ppm~6.23 ppm에서 6H에 해당하는 proton signal이 관찰되어 각각 글루코오스의 1,2,3,4,6번 탄소에 결합된 수소들이 gallic acid에 의해 에스테르화 되어있음을 알 수 있다. 또한 6.35 ppm에서 글루코오스의 anomeric proton에 기인하는 doublet이 관찰되었으며 그 coupling constant가 8.32Hz를 나타내는 것으로 보아 β-형태로 결합됨을 알 수 있다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 galloyl group의 탄소 signal들이 각각 5쌍씩 나타났으며, δ 93.8에서의 anomeric 탄소의 signal과 δ 74.4, δ 74.1, δ 72.2 , δ 69.8, δ 63.1의 전형적인 글루코오스의 탄소 signal도 관찰되었다. 따라서 이 화합물은 글루코오스에 5개의 galloyl group이 ester 결합한 가수분해형 tannin으로서 그 구조는 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucose임을 확인하였으며 문헌치[90b)]와의 비교에서도 잘 일치하였다(Figure 53).

3-5. PGG(1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl-*β*-D-glucose)의 NMR 데이터

^{1}H NMR (CD_3OD, 400MHz)

δ 7.10, 7.04, 6.97, 6.94, 6.89(each 2H, s, galloyl-H), 6.23(1H, d, J = 8.32Hz, Glc H-1), 5.89(1H, t, J = 9.76Hz, Glc H-3), 5.61(1H, t, J = 9.76, Glc H-4) 5.58(1H, dd, J = 9.76, 8.32, Glc H-2), 4.51(1H, m), 4.38(2H, m)

^{13}C NMR (CD_3OD, 100MHz)

δ 167.9, 167.3, 167, 166.9, 166.2(C=O), 146.6, 146.5, 146.4, 146.4, 146.2(galloyl C-3, 5), 140.8, 140.4, 140.3, 140.2, 140(galloyl C-4), 121.1, 120.4, 120.2, 120.2, 119.7(galloyl C-1), 110.6, 110.5, 110.4, 110.4, 110.3 (galloyl C-2, 6), 93.8(glucose C-1), 74.4(glucose C-5), 74.1(glucose C-3), 72.2(glucose C-2), 69.8(glucose C-4), 63.1(glucose C-6)

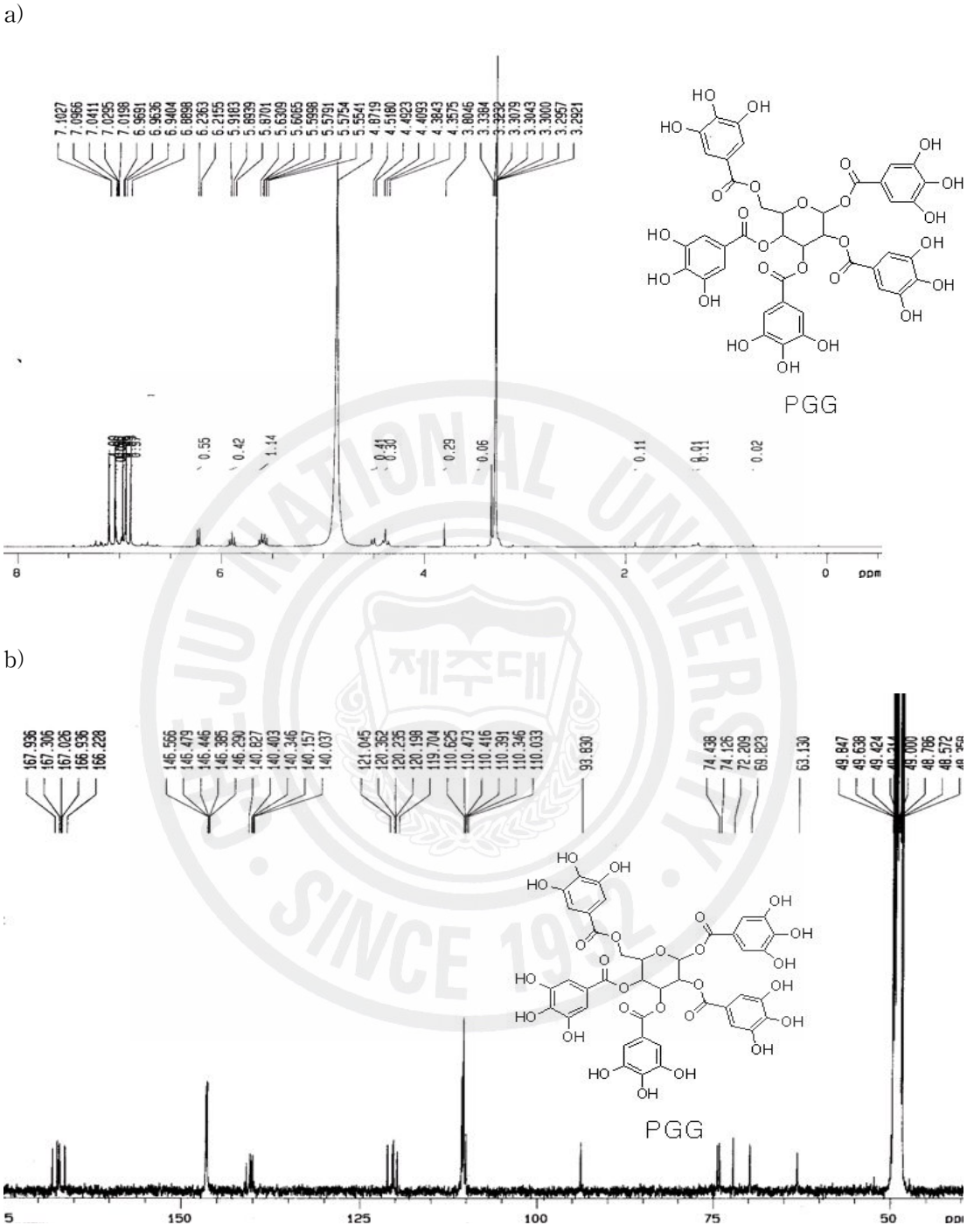


Figure 53. ^{1}H and ^{13}C spectrum of PGG.

a) ^{1}H spectrum of PGG. b) ^{13}C spectrum of PGG.

4. 왕모시풀 뿌리 추출물의 활성 결과

4-1. 미백효과

4-1-1. 왕모시풀 뿌리 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과

왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물 및 그 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하기 위하여 melan-a 세포에 준비된 시료를 처리하여 멜라닌 생합성 저해율과 MTT를 이용하여 세포 증식 억제 정도를 확인하였다. 시료의 처리 농도 50 ㎍/mL로 처리하였을 때 메탄올 조추출물은 세포 증식에 영향을 미치지 않으면서 30.4%의 억제 효과를 나타내었고, 그 분획물들 중에는 에틸아세테이트 분획이 21.9%의 억제 효과를 보였지만 대조군으로 사용된 arbutin(53.3%)보다는 낮은 억제 효과를 보였다(Figure 54).

4-1-2. 왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물들의 멜라닌 생합성 억제 효과

왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물로부터 얻은 9개의 분획물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 melan-a 세포에 시료의 농도 50 ㎍/mL, 10 ㎍/mL로 처리하여 확인하였다. 시료처리 농도 50 ㎍/mL로 처리하였을 때 fr3, fr2는 각각 97.0%, 94.2%의 높은 억제 효과를 보였으나 세포 증식 억제가 강하게 보였고 나머지 분획들도 좋은 멜라닌 억제 효과를 보였으나 세포 증식에 영향을 미쳤다. 시료의 농도 10 ㎍/mL로 처리한 경우는 fr2가 가장 좋은 멜라닌 억제 효과(53.2%)는 보였으나, 여전히 세포 증식에 영향을 미쳤고(44.4%) fr3 역시 멜라닌 억제 효과는 우수하였으나(46.4%), 세포에 약간의 영향은 미치는 결과(18.1%)를 보였다. 나머지 분획들은 같은 농도에서 세포에 거의 영향을 미치지 않으면서 fr5, fr6, fr8, fr4, fr1이 각각 17.3%, 15.3%, 13.2%, 13.8%, 12.7%로 대조군으로 사용된 arbutin(11.1%)과 비슷한 수준의 억제 효과를 나타내었다(Figure 55).

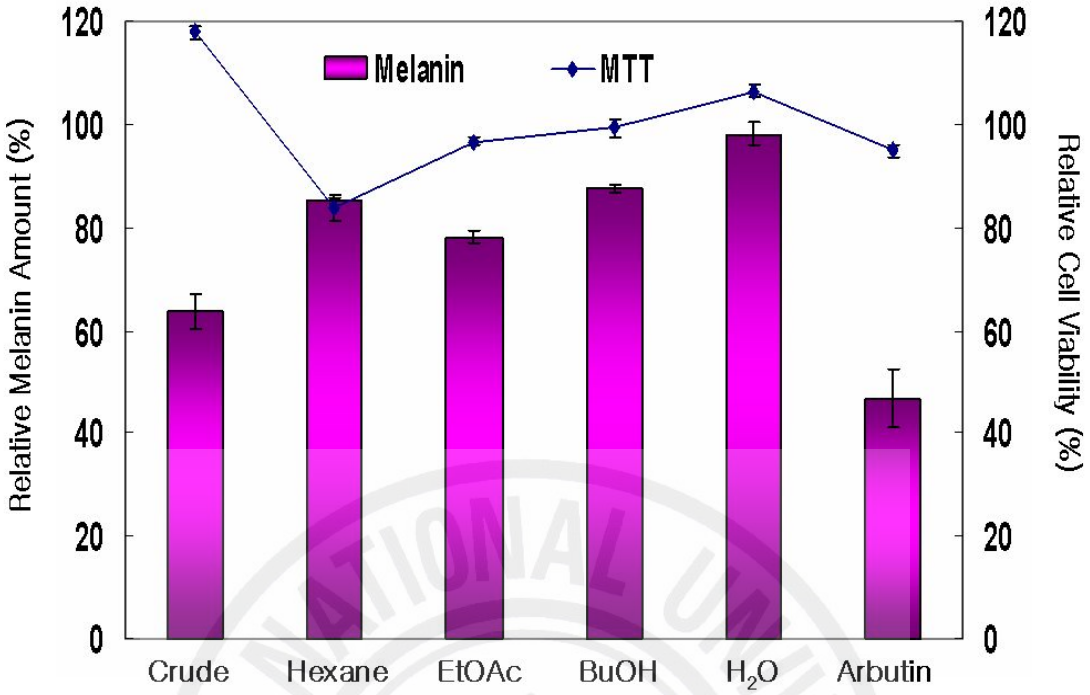


Figure 54. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments.

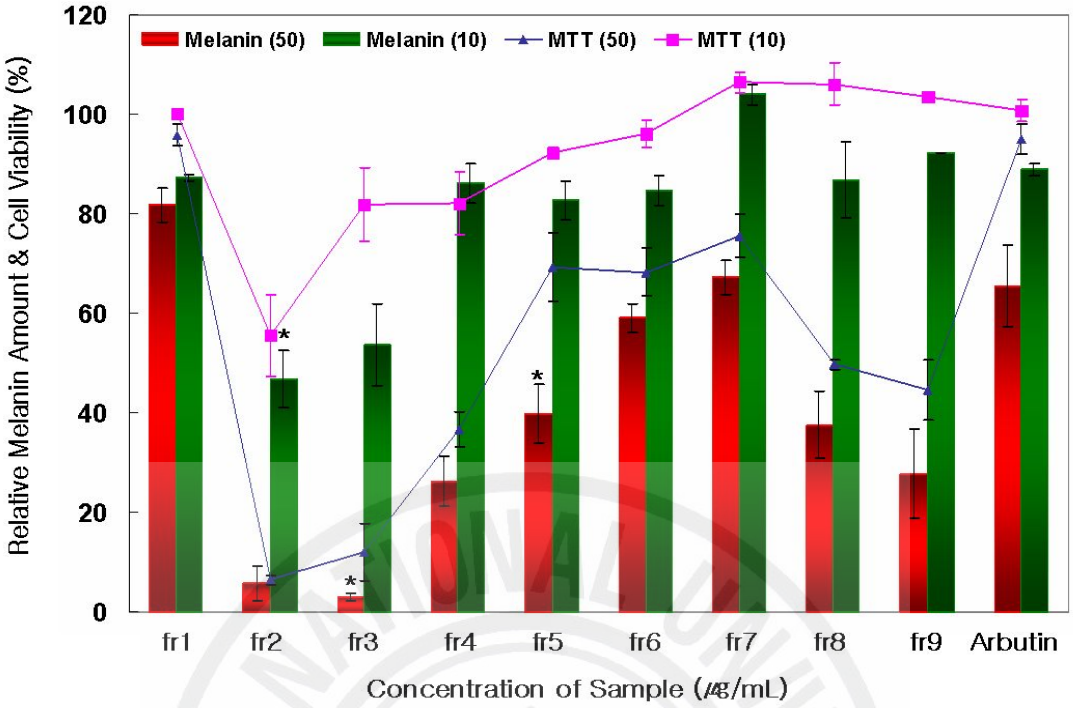


Figure 55. Effects of subfractions of an EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the melanin content in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 96h inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When 24h passed, media and samples were exchanged everyday for 3 days. Then, melanin content was quantified by measuring the absorption at 450 nm. Results were means ± S.D. from 3 separate experiments. *, $p<0.05$ compared with control.

4-2. 항염증 효과

4-2-1. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 효과

4-2-1-1. 왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물 및 용매 분획물들의 NO 억제 효과

RAW 264.7 세포를 이용하여 왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물 및 그 분획물들의 NO 생성 억제 효과를 측정하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL에서 NO 억제 활성을 측정하였을 때 물 분획물을 제외하고 메탄올 조추출물 및 모든 분획물에서 우수한 효과를 나타내었으나, LDH를 이용한 세포 독성을 확인한 결과 많은 세포 독성을 확인할 수 있었다(Figure 56). 따라서 시료의 농도를 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL로 처리하여 NO 억제 활성을 확인하였다. 시료의 농도 5 ㎍/mL에서 헥산 분획물은 LPS 단독으로 처리하였을 때의 NO가 41.6 μM으로 과량 생성된 것에 비해 시료 처리군은 세포 독성이 보이지 않으면서도 0.7 μM로 NO 생성량이 현저히 감소하였으며, 부탄올 분획물은 미약한 세포 독성과 함께 1.4 μM, 에틸아세테이트 분획물은 같은 농도에서 0.9 μM로 NO 생성량이 줄어든 결과를 나타냈다. 그러나 에틸아세테이트 분획물은 이 농도에서 세포 독성이 보여 이로 인한 NO 억제 효과인지 농도를 낮추어 시료를 처리하였다. 1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL의 시료 농도에서 LPS 단독 처리군의 NO는 각각 41.6 μM, 41.4 μM로 과량 생성되었으나, 에틸아세테이트 분획물은 각각 1.1 μM과 3.8 μM로 NO 생성량은 여전히 감소하였고 세포 독성은 나타나지 않았다(Figure 57).

4-2-1-2. 왕모시풀 뿌리 에틸아세이트의 분획물들과 epicatechin의 NO 억제 효과

왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물에서 얻은 9개의 분획들과 fr4로부터 분리한 epicatechin의 NO 억제 활성을 농도별로 측정하였다. LPS 단독처리군에서 NO는 43.2 μM로 과량 생성된 데 비하여 에틸아세테이트 분획물로부터 얻은 분획 중 fr5(0.7 μM), fr6(0.1 μM), fr7(0.7 μM), fr8 (0.5 μM), fr9(0.5 μM)인 경우 5 ㎍/mL 처리 농도에서 fr5(11.3%)와 fr9(15.1%)만 약간의 세포 독성을 보이고 다른 분획들은

세포 독성이 없는 상태에서 우수한 NO 억제 효과를 보였다. 시료의 농도 1 ㎍/mL에서는 LPS 단독 처리군이 42.1 μM로 과량의 NO 생성을 보인 반면 fr5(2.0 μM), fr6(1.0 μM), fr7(3.2 μM), fr8(1.8 μM), fr9(1.3 μM)는 여전히 NO 억제 효과가 우수하게 측정되었고, 세포 독성은 나타나지 않았다(Figure 58).

왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획 중 fr4로부터 분리한 단일 화합물인 epicatechin인 경우 200 ㎍/mL, 100 ㎍/mL, 50 ㎍/mL의 처리 농도에서 LPS 단독 처리군이 44.5 μM로 과량의 NO를 생성시켰으며, 시료 처리군은 각각 31.2 μM, 34.9 μM, 36.1 μM로 NO 생성이 감소하였다. LDH를 이용한 세포 독성은 각각 19.6%, 10.9%, 0.3%로 나타났다(Figure 59).

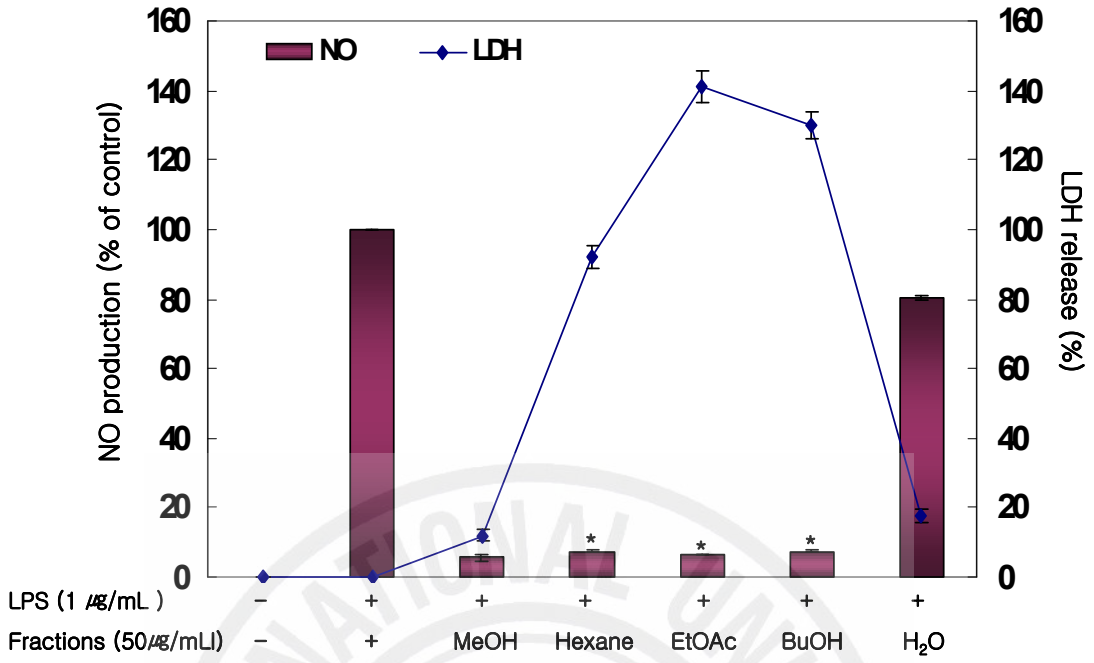


Figure 56. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. *, $p<0.05$ compared with LPS alone.

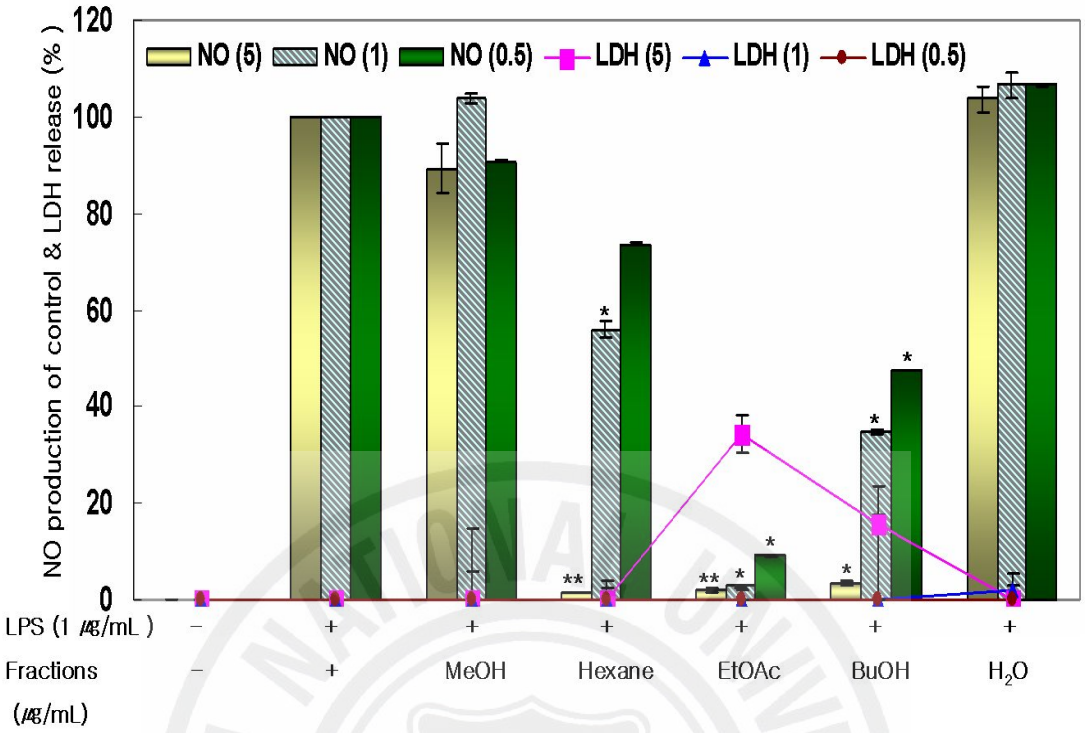


Figure 57. Effects of 80% MeOH extract and subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments.

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone.

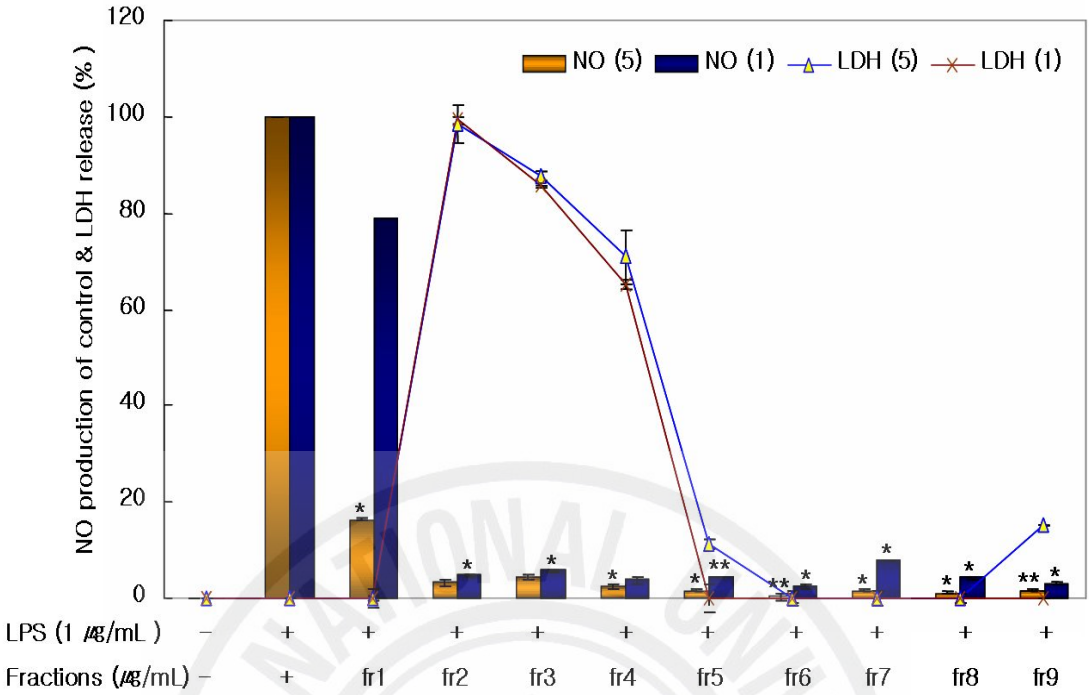


Figure 58. Effects of subfractions of EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments.

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone.

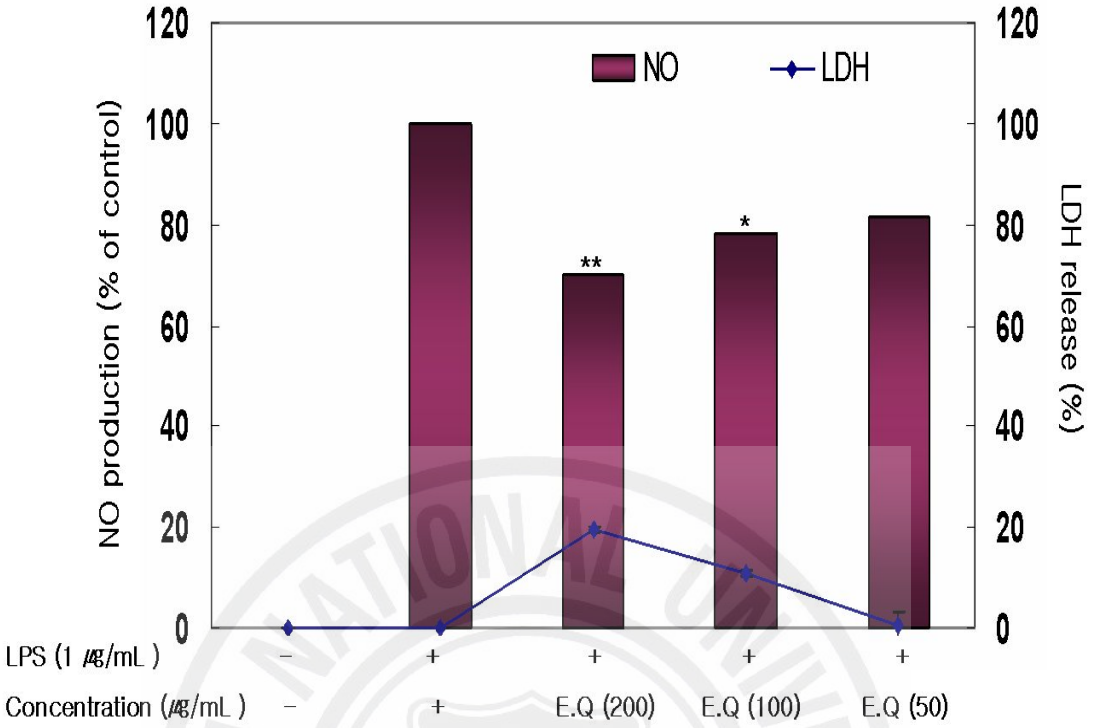


Figure 59. Effects of epicatechin isolated from the roots of *Boehmeria Pannosa* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of epicatechin for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments.

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone. E.Q.: epicatechin

4-2-2. 왕모시풀 뿌리 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

왕모시풀 뿌리 추출물의 NO 억제 효과가 iNOS 발현 억제에 의한 결과인지를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 왕모시풀 뿌리 조출물 및 분획물들에 의한 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물 및 그 분획물들을 1 ㎍/mL의 농도로 처리한 결과 에틸아세테이트 분획물이 mRNA 발현을 가장 강하게 억제하였고, 다음으로 부탄올 분획과 헥산 분획물, 메탄올 추출물이 순차적으로 mRNA 발현을 억제시켰다(Figure 60).

4-2-3. 왕모시풀 뿌리 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 왕모시풀 뿌리 메탄올 조출물 및 분획물들에 의한 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 왕모시풀 뿌리 조추출물 및 분획물에서는 에틸아세테이트 분획물이 COX-2 mRNA 발현을 강하게 억제하였고, 다음으로 부탄올 분획물과 헥산 분획물이 억제 효과를 나타내었다(Figure 60).

4-2-4. 왕모시풀 뿌리 추출물이 pro-inflammation의 mRNA발현에 미치는 영향

왕모시풀 뿌리 추출물의 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 LPS와 왕모시풀 뿌리 추출물을 함께 처리하여 RT-PCR을 시행하였다. TNF-α, IL-6, IL-1β 생성 억제에 대한 왕모시풀 뿌리 조추출물 및 용매 분획물을 1 ㎍/mL 농도로 처리하였을 때 TNF-α 에서만 에틸아세테이트 분획물이 억제 효과를 보였고 나머지에서는 큰 억제 효과가 보이지 않았다. β-Actin을 대조군으로 사용하였고 그 결과 시료들이 세포에 영향을 주어 감소하는 것이 아님을 보여주었다(Figure 61).

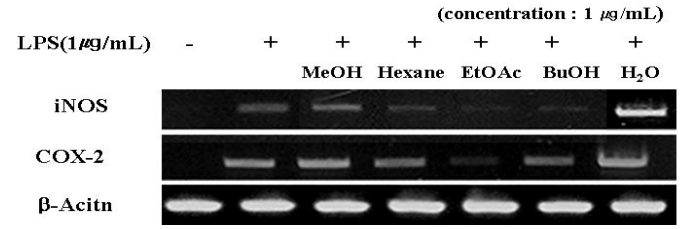


Figure 60. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of samples (1 ㎍/mL) for 6h. The mRNA expression of iNOS and COX-2 was determined by RT-PCR experiment.

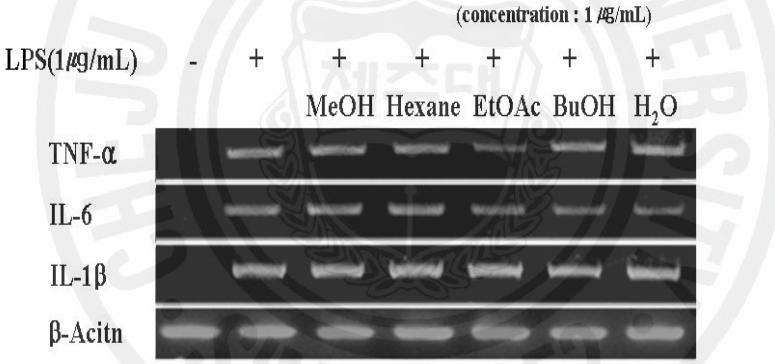


Figure 61. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions **of the roots of *Boehmeria Pannosa* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL) in the presence of samples (1 ㎍ /mL) for 6h. The RNA extraction was carried out in RNase-free environment and the mRNA expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β were determined by RT-PCR experiment.

4-3. 항주름 효과

4-3-1. 왕모시풀 뿌리 추출물의 elastase 억제 효과

피부 진피 내에 존재하면서 피부의 탄력을 유지하는데 중요한 역할을 하는 elastin을 분해하는 elastase는 나이가 들면서 그리고 자외선이나 활성산소와 같은 유해 환경에 의해 그 생성이 증가하게 되어 elastin을 과도하게 분해하여 주름형성에 중요한 원인을 제공한다. 따라서 왕모시풀 뿌리의 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 elastase 억제 활성을 측정함으로써 천연 항노화제로서의 이용 가능성을 확인하였다.

시료의 농도 100 ㎍/mL에서 메탄올 조추출물이 75.6%로 가장 좋은 억제 효과를 보였으며 이것은 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(73.9%)에 비해 좋은 효과를 나타내었다. 각각의 분획물 및 메탄올 조추출물의 IC_{50}값을 확인한 결과 부탄올 분획물이 16.2 ㎍/mL로 빈랑자 추출물(23.0 ㎍/mL)에 비해 우수한 억제 효과를 나타내었고, 메탄올 조추출물이 24.4 ㎍/mL로 대조군과 유사한 활성을 보였다(Figure 62).

왕모시풀 뿌리의 에틸아세테이트 분획물로부터 유효성분을 얻기 위하여 column chromatography를 통하여 분리한 9개의 분획에 대해 elastase 억제 효과를 확인하였다. 시료 처리 농도 100 ㎍/mL에서 74.2%로 가장 좋은 억제 효과를 보인 fr9를 5개의 농도로 준비하여 IC_{50}값을 확인한 결과 43.8 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(40.8 ㎍/mL)과 유사한 효과를 나타내었다(Table 22).

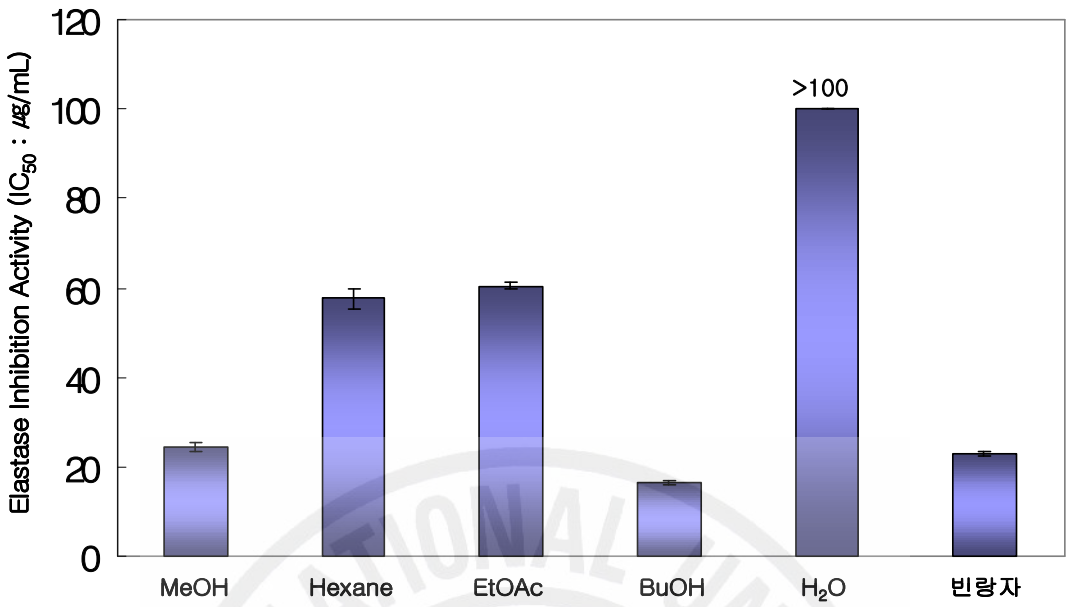


Figure 62 Effects of the 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa* on elastase activity.

The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

Table 22. Effects of subfractions of EtOAc extract of the roots *Boehmeria Pannosa* on of elastase activity.

Fractions	100 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)
fr1	5.3 ± 1.2	>100
fr2	-10.9 ± 2.3	>100
fr3	-12.5 ± 4.5	>100
fr4	-7.6 ± 2.6	>100
fr5	-13.9 ± 2.7	>100
fr6	4.3 ± 1.3	>100
fr7	18.2 ± 0.5	>100
fr8	42.6 ± 2.1	>100
fr9	74.2 ± 0.9	43.8 ± 1.8
빈랑자	66.6 ± 1.2	40.8 ± 1.7

The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

4-3-2. 왕모시풀 뿌리 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과

진피 내의 탄력섬유인 collagen을 분해하는 효소인 MMP-1의 활성 억제를 20 ㎍/mL에서 확인한 결과 27.1%의 효과를 확인할 수 있었다. UV 조사에 의해 유도된 MMP-1 생성 억제에 대한 왕모시풀 뿌리 메탄올 추출물의 효능을 측정한 결과 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 MTT를 이용한 세포증식 억제에는 영향을 미치지 않으면서 63.9%의 좋은 억제 효과를 보여 UV 자극에 대한 MMP-1생성을 억제하여 collagen 분해를 방어함으로써 주름 형성을 방어할 수 있는 항노화제로서의 가능성을 확인하였다(Table 23).

Table 23. Effects of extract of roots of *Boehmeria Pannosa* on MMP-1 activity and the production of MMP-1 by the UVB irradiated human dermal fibroblast.

Sample	MMP-1생성억제효과(%) (100 ㎍/mL)	MTT(%) (100 ㎍/mL)	MMP-1활성억제효과(%) (20 ㎍/mL)
왕모시풀 뿌리	63.9	0.5	27.1

4-4. 항산화 효과

4-4-1. 왕모시풀 뿌리 추출물이 DPPH radical 소거 효과

왕모시풀 뿌리의 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 DPPH radical 소거 활성을 통하여 항산화 효과를 측정하였다. IC_{50} 값은 에틸아세테이트 분획물이 가장 좋은 5.97 ㎍/mL로 측정되었고, 부탄올 분획물이 20.4 ㎍/mL, 조추출물이 24.05 ㎍/mL를 나타내었고, 이때 대조군인 BHA는 9.04 ㎍/mL로 에틸아세테이트 분획물이 유사한 활성을 나타내었다(Figure 63).

DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 좋은 왕모시풀 뿌리의 에틸아세테이트 분획물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 컬럼을 이용하여 9개의 분획을 얻어 이들의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL로 소거 활성을 측정한 후, 활성이 좋은 분획들은 5개의 농도로 준비하여 IC_{50}값을 구하였다. 분획들의 IC_{50}값은 fr6이 8.39 ㎍/mL로 가장 좋은 효과를 보였고, fr9가 8.41 ㎍/mL, fr5는 8.70 ㎍/mL으로 대조군으로 사용된 BHA(9.04 ㎍/mL)보다 우수한 효능을 보였다(Figure 64).

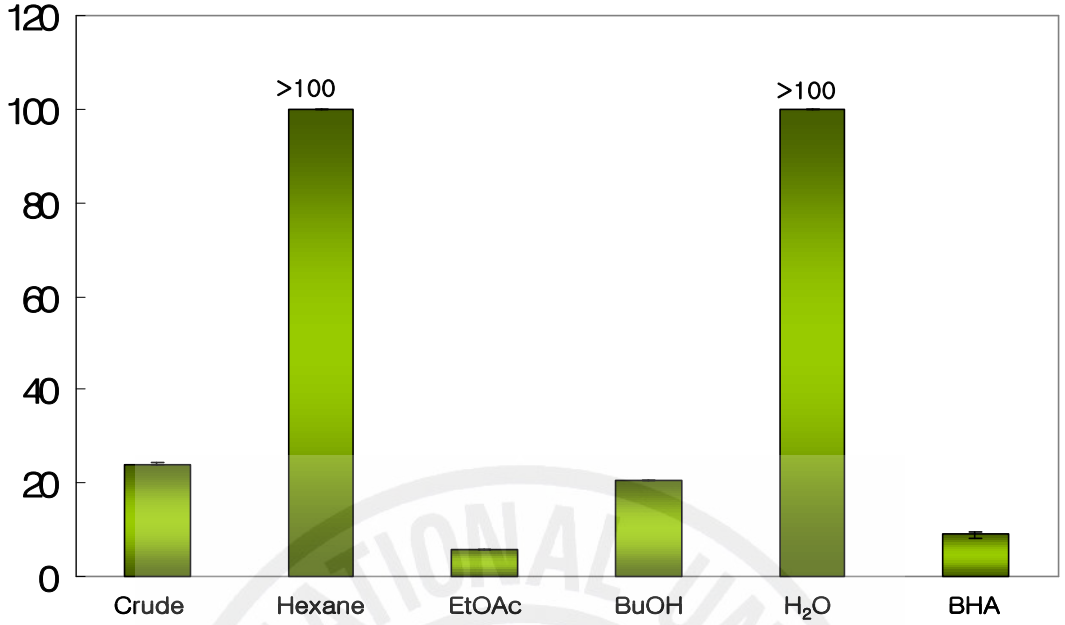


Figure 63. The DPPH radical scavenging activity of the 80% MeOH extract and its subfractions of the roots of *Boehmeria Pannosa*. The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

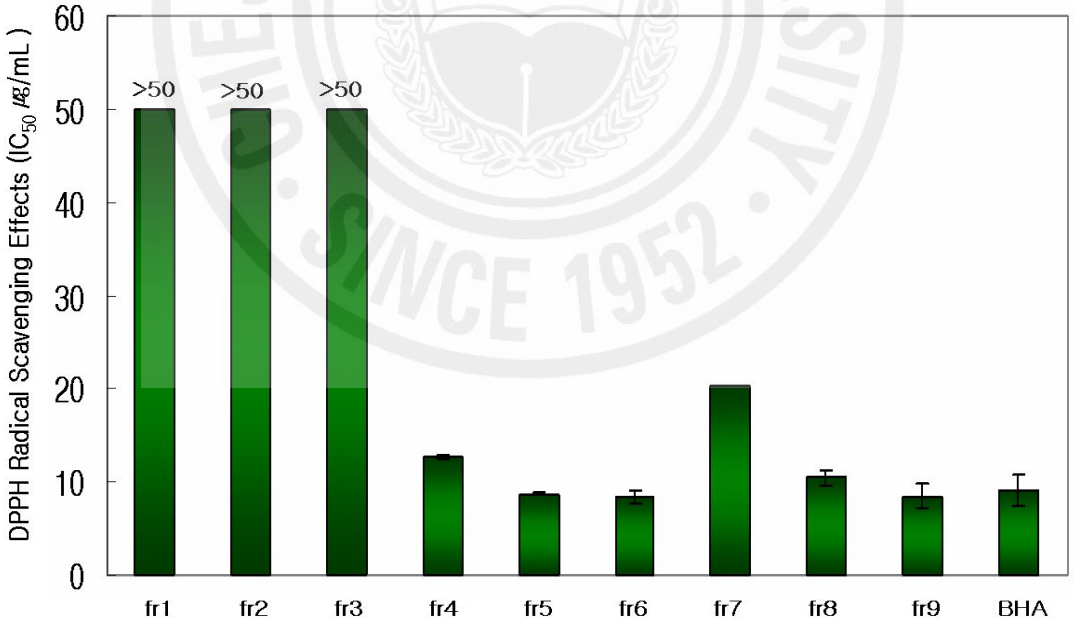


Figure 64. The DPPH radical scavenging activity of subfractions of EtOAc extract of the roots of *Boehmeria Pannosa*. The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

4-4-2. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 효과

왕모시풀 뿌리의 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 NO 억제 효과를 500 ㎍/mL의 시료 농도와 IC_{50}값으로 확인하였다. 시료의 농도 500 ㎍/mL에서 헥산 분획물은 70.3%, 에틸아세테이트 분획물은 51.8%, 부탄올 분획물은 41.9%, 물 분획물은 37.3%, 메탄올 조추출물은 34.9%의 억제 효과를 보였다. 각각의 분획물들과 메탄올 조추출물들을 5개의 농도로 측정한 후 IC_{50}값을 구하여 NO 억제 효과를 측정하였다. 헥산 분획물이 139.2 ㎍/mL로 가장 좋게 나왔으며, 다음으로 에틸아세테이트 분획물이 360.4 ㎍/mL로 측정되었다(Table 24).

왕모시풀 뿌리의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 단일 물질인 epicatechin인 경우 같은 처리 농도에서 NO 억제 효과는 35.1%로 우수한 효능은 나타나지 않았다(Table 24).

4-4-3. 왕모시풀 뿌리 추출물이 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과

Xanthine oxidase의 억제 효과는 250 ㎍/mL의 시료 농도와 IC_{50}값을 이용하여 확인하였다. 시료의 농도 250 ㎍/mL에서 에틸아세테이트 분획물이 62.76%로 가장 좋은 억제 효과를 보여 이 분획물을 5개의 농도로 준비하여 효소 억제 활성을 측정한 후 IC_{50}값을 구하였다. 왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값은 159.3 ㎍/mL로 좋은 효과를 나타내었다(Table 24). 왕모시풀 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 epicatechin인 경우 250 ㎍/mL 처리 농도에서 54.9%의 억제 효과를 보였고, IC_{50} 값은 190.6 ㎍/mL로 측정되었다.

Superoxide 라디칼 소거 활성은 500 ㎍/mL의 농도와 IC_{50}값으로 확인하였다. 시료 처리 농도 500 ㎍/mL에서 헥산 분획물이 90.4%로 가장 높게 측정되었고, 부탄올 분획물이 83.4%, 에틸아세테이트 분획물이 76.7%, 물 분획물이 74.0%, 메탄올 조추출이 72.3%순으로 억제 효과를 보였다. 각각을 5개의 농도로 준비하여 IC_{50}값을 구하여 억제 효과를 확인한 결과 높은 농도에서와는 다르게 에틸아세테이트 분획물이 0.8 ㎍/mL로 가장 좋은 효과를 보였다. 높은 농도에서 가장 좋은 효과를 보였던 헥

산 분획물은 98.4 ㎍/mL로 확인되었고, 부탄올 분획물은 33.0 ㎍/mL, 메탄올 조추출물은 153.2 ㎍/mL, 물 분획물은 193.6 ㎍/mL로 측정되었다.

왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 epicatechin의 superoxide 소거활성은 500 ㎍/mL 처리 농도에서 89.8%의 효과를 보였고, IC_{50}값은 0.4로 우수한 효과를 나타내었다(Table 24).

Table 24. Antioxidant activities of 80% MeOH extract, its subfractions and epicatechin isolated from the roots of *Boehmeria Pannosa*.

Fractions	Nitric oxide Scavenging activity		Xanthine oxidase inhibition			
			Inhibition of uric acid generation		Inhibition of superoxide generation	
	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)	250 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)
MeOH	34.9±3.6	>500	2.7±0.8	>250	72.3±0.3	153.2±2.1
Hexane	70.3±5.0	139.2±24.0	4.7±1.2	>250	90.4±0.7	98.4±0.5
EtOAc	51.8±1.1	360.4±17.9	62.8±0.1	159.3±1.3	76.7±0.1	0.8±0.7
BuOH	41.9±1.4	>500	21.5±0.8	>250	83.4±2.1	33.0±3.3
H_2O	37.3±1.0	>500	-8.6±0.6	>250	74.0±0.6	193.6±10.2
Epi-catechin	35.1±0.6	>500	54.9±1.1	190.6±15.0	89.8±1.6	0.4±0.03
Quercitin	92.7±3.1	80.1±7.8	N/D	N/D	N/D	N/D
Allopurinol	N/D	N/D	90.3±4.5	>250	90.9±0.3	2.2±0.8

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments.

N/D means not detectable.

4-5. BPE-1의 구조 동정

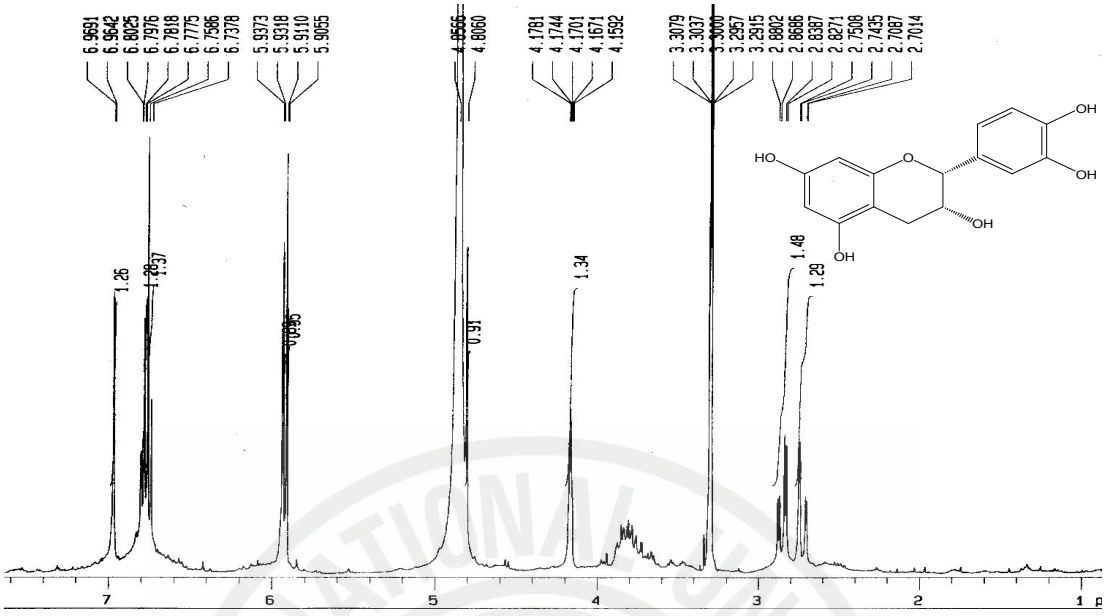
화합물 BPE-1의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼, DEPT, HMBC를 측정하여 Table 25에 나타내었다. ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼을 확인한 결과 화합물 BPE-1은 전형적인 플라보노이드 패턴을 보였다. Table 25에서 보면 1개의 메칠렌 수소(H-4)가 관측 되었고, 5개의 올레핀 수소가 관측되었는데 커플링 상수값으로 보아 올레핀 수소 5개 중 2개는 ortho커플링을 하고 있으며, 나머지 3개의 수소는 meta커플링을 하는 것으로 판단된다. 또한 ^{13}C스펙트럼으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. DEPT의 자료로부터 ^{13}C스펙트럼에 나타난 15개의 탄소 중 4급 탄소가 7개, CH가 7개, CH_2가 1개라는 것을 알 수 있었다. 4.82 ppm(H-2)에서 singlet 피크가 보이는데 이러한 현상은 2번과 3번 탄소에 붙어 있는 수소들이 *cis* 형태를 이루고 있기 때문이다. HMBC의 결과로부터 화합물 BPE-1의 구조를 예상할 수 있다. 4.82 ppm의 수소(H-2)로부터 δ 157.3인 4차탄소(C-9)와 δ 119.3인 탄소(C-2′)와 상관관계를 나타내는 것으로 보아 두 골격이 탄소 C2와 C1′이 연결되어 있음을 알 수 있었고, 2.86 ppm의 수소(H-4)로부터 δ 100.1(C-10)과 상관관계를 나타나는 것으로 보아 C-4와 C-10이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 화합물 BPE-1은 epicatechin임을 확인하였으며, 문헌치와[91]의 비교에서도 잘 일치하였다.

Table 25. NMR spectroscopic data for BPE-1 (in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	DEPT	HMBC (H→C#)
C2	4.82(s)	79.8	CH	4, 6′, 2′, 9
C3	4.18 (ddd, 3.79, 3.68, 1.48)	67.4	CH	9, 10, 1′
C4	2.86 (dd, 16.6, 4.64)	29.2	CH_2	10, 2, 3
	2.74 (dd, 16.6, 2.92)			
C5		158	C	
C6	5.92 (d, 2.2)	96.2	CH	5, 8, 10
C7		157.6	C	
C8	5.94 (d, 2.2)	95.9	CH	6, 7, 10
C9		157.3	C	
C10		100.1	C	
C1′		132.3	C	
C2′	6.76 (dd, 8.54, 1.96)	119.3	CH	1′, 6′, 4′
C3′	6.8 (d, 8.54)	115.8	CH	1′, 4′, 2
C4′		145.9	C	
C5′		145.7	C	
C6′	6.98 (d, 1.96)	115.3	CH	3, 2′, 4′

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

a)



b)

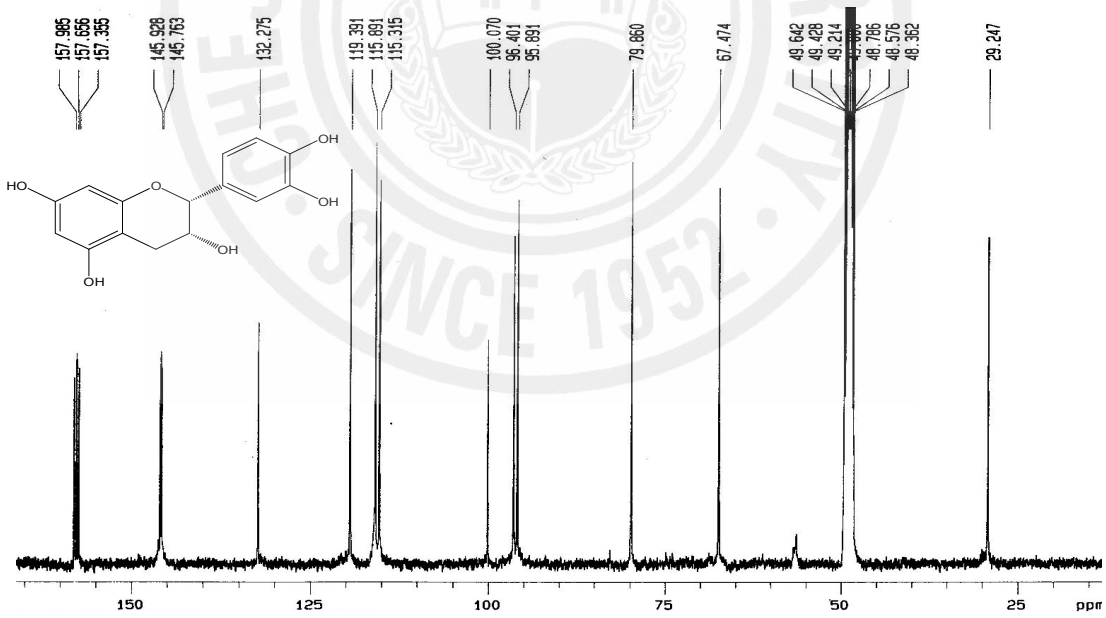


Figure 65. Figure 35. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of BPE-1. (in CD_3OD)

a) ^{1}H-NMR spectrum of BPE-1. b) ^{13}C-NMR spectrum of BPE-1.

5. 곰의말채 추출물의 활성 결과

5-1.항염증효과

5-1-1. 곰의말채 추출물이 Nitric oxide의 생성에 미치는 영향

곰의 말채 메탄올 조추출물 및 그 분획물들이 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성 억제 정도를 확인하였다. LPS 단독 처리군에서는 43.2 μM로 NO가 과량 생성되고, 시료의 농도 50 ㎍/mL에서 헥산 분획물이 4.31 μM로 NO 생성량이 현저히 감소하였으나 LDH를 통한 세포 독성 실험에서 37.2%의 독성을 나타내었다. 메탄올 조추출물은 같은 농도에서 29.0 μM, 에틸아세테이트 분획물은 26.5 μM의 NO 생성 억제 효과를 보였으며, 25 ㎍/mL 처리 농도에서는 헥산 분획물이 세포 독성이 없는 상태에서 8.1 μM로 NO 생성량이 감소하였으며, 메탄올 조추출물은 30.1 μM, 에틸아세테이트 분획물은 26.3 μM로 감소 효과를 나타내었다(Figure 66a).

NO 억제 효과가 가장 우수하게 나온 곰의말채 헥산 분획물을 농도별로 준비하여 3번에 걸친 반복실험을 통해 농도에 따른 NO 억제 효과를 측정하였다. 시료의 농도 50 ㎍/mL, 25 ㎍/mL, 5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL의 농도에서 3번에 걸친 NO 억제 효과를 측정한 결과 농도에 의존적으로 NO 생성을 억제하고 있음을 확인하였다(Figure 66b).

a) b)

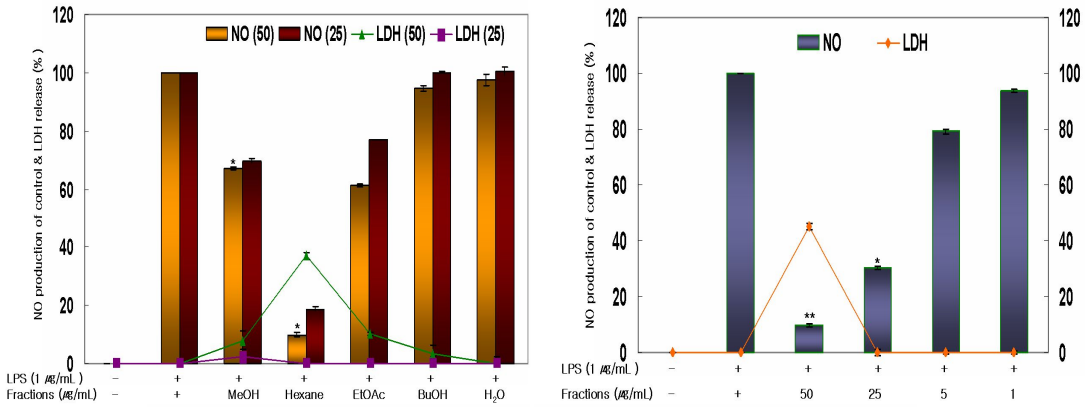


Figure 66. Effects of 80% MeOH extract and its subfractions of *Cornus macrophylla*on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of samples for 24h. (b) One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of hexane fraction for 24h. Cytotoxicity was determined using LDH release method. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ compared with LPS alone.

5-1-2. 곰의말채 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

곰의말채 추출물의 NO 억제 효과가 iNOS 발현 억제에 의한 결과인지를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 곰의말채 헥산 분획물을 농도별로 처리하여 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. LPS에 의해 iNOS는 발현이 증가하였고, 곰의말채 헥산 분획물을 25 ㎍/mL, 12.5 ㎍/mL, 6.25 ㎍/mL의 농도로 처리한 결과 특히, 25 ㎍/mL의 농도에서 mRNA 발현을 억제시켰다(Figure 67).

5-1-3. 곰의 말채 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS(1 ㎍/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 곰의말채 hexane 분획물에 의한 mRNA 발현 저해 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 곰의말채 헥산 분획물을 농도별로 처리하여 COX-2 mRNA 발현을 확인한 결과, 농도 의존적으로 억제하였다(Figure 67).

5-1-4. 곰의말채 추출물이 pro-inflammation의 mRNA발현에 미치는 영향

곰의말채 헥산 분획물의 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 LPS와 곰의말채 헥산 분획물을 농도별로 함께 처리하여 RT-PCR을 시행하였다. TNF-α, IL-6, IL-1β 생성 억제에 대한 곰의말채 헥산 분획물을 25 ㎍/mL, 12,5 ㎍/mL, 6.25 ㎍/mL 농도로 처리하였을 때 미약하게 농도 의존적으로 억제 효과를 나타내었다. β-Actin을 대조군으로 사용하였고, 그 결과 시료들이 세포에 영향을 주어 감소하는 것이 아님을 보여주었다(Figure 68).

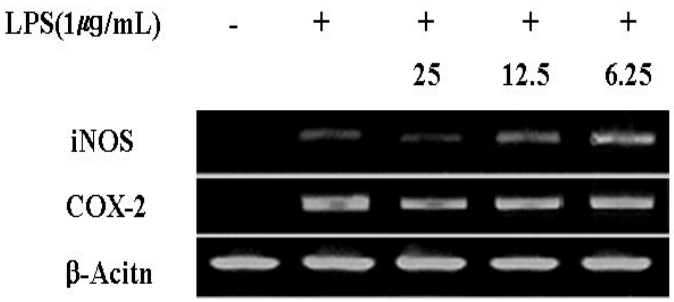


Figure 67. Effects of hexane fraction of *Cornus macrophylla* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of hexane fraction for 6h. The mRNA expression of iNOS and COX-2 was determined by RT-PCR experiment.

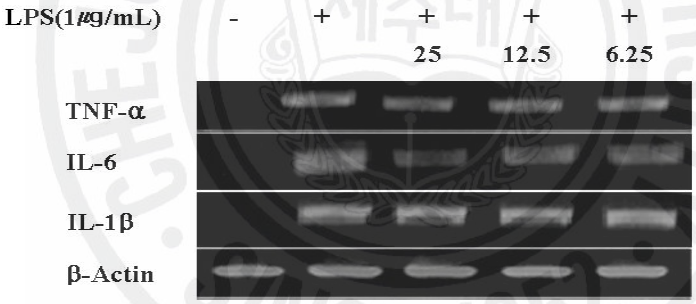


Figure 68. Effects of hexane fraction of *Cornus macrophylla* **on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** One group of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 ㎍/mL), while other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated concentration of hexane fraction for 6h. The RNA extraction was carried out in RNase-free environment and the mRNA expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β were determined by RT-PCR experiment.

5-2. 항주름 효과

5-2-1. 곰의말채 추출물의 elastase 억제 효과

곰의말채 메탄올 추출물 및 그 분획물과 에틸아세테이트 분획으로부터 얻은 CME-1과 fr1-2의 elastase 효소 활성 억제 효과를 통한 항주름 억제 효과를 측정하였다. 곰의말채 메탄올 추출물 및 그 분획물들의 효소 억제 효과는 메탄올 조추출물이 IC_{50}값 13.1 ㎍/mL로 우수한 억제 효과를 보였고, 에틸아세테이트 분획물이 24.1 ㎍/mL, 부탄올 분획물이 25.1 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(31 ㎍/mL)에 비해 우수한 억제 효과를 나타내었다(Figure 69a).

곰의말채 에틸아세테이트 분획으로부터 얻은 CME-1과 fr1-2의 elastase 억제 효과를 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 측정한 결과 quercitrin으로 구조가 밝혀진 CME-1인 경우 29%, fr1-2인 경우 30%로 대조군인 빈랑자 추출물(66%)에 비해 낮은 억제 효과를 나타내었다(Figure 69b).

5-2-2. 곰의 말채 추출물의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과

곰의말채 메탄올 조추출물이 collagen을 분해하는 효소인 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과를 측정한 결과 활성 억제는 20 ㎍/mL의 처리 농도에서 39.8%의 효과를 확인할 수 있었다. UV 조사에 의해 유도된 MMP-1 생성 억제에 대한 곰의말채 메탄올 추출물의 효능을 측정한 결과 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 MTT를 이용한 세포증식 억제에는 영향(0.7%)을 미치지 않으면서 27.1%의 억제 효과를 보여 어느 정도의 주름 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 70).

a) b)

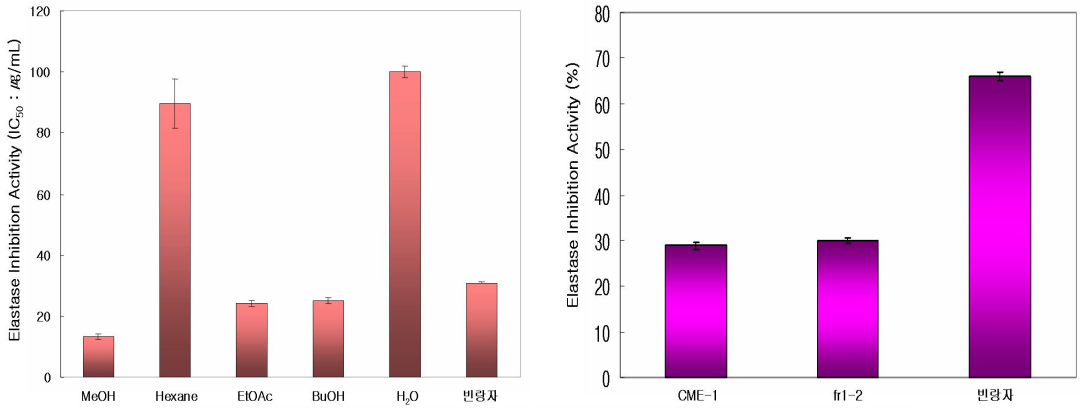


Figure 69. Effects of *Cornus macrophylla* extract on elastase activity. (a) Elastase inhibition effects of *Cornus macrophylla* 80% MeOH extract and subfractions. (b) Elastase inhibition effects of subfractions of EtOAc extract. CME-1 is quercitrin isolated from EtOAc extract. Concentration of samples was 100 ㎍/mL. The data were expressed as means ± S.D. calculated from three determinations.

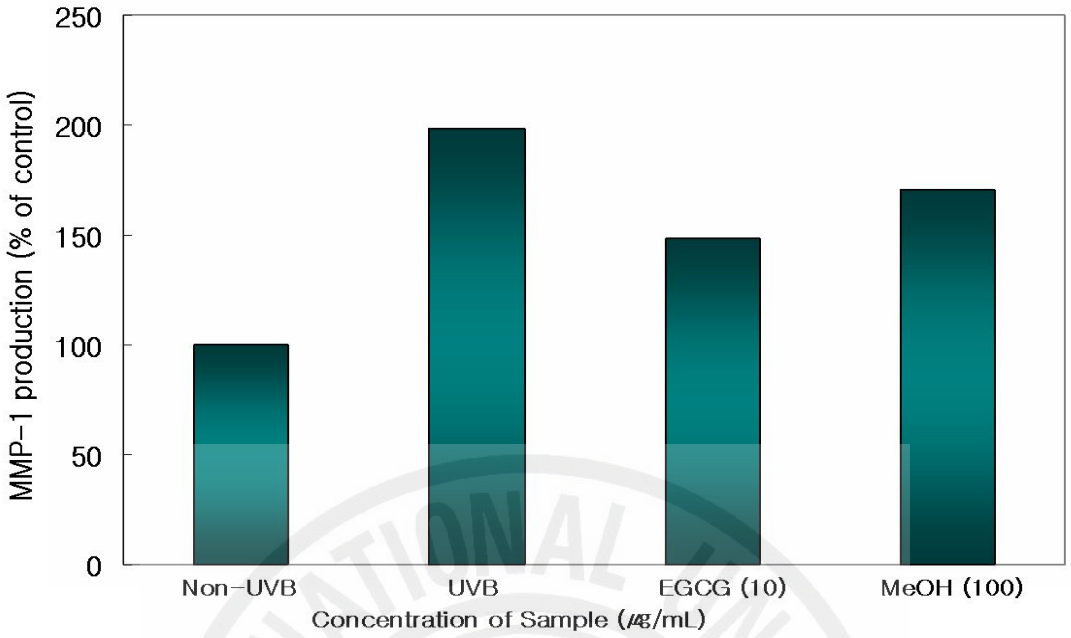


Figure 70. The effect of *Cornus macrophylla* on the production of MMP-1 of human dermal fibroblast irradiated with UVB. The human dermal fibroblast were treated with an extract of *Cornus macrophylla* for 20h. Cells were then irradiated with UVB (35 mJ/cm)^2 and cultured for 48h.

5-3. 항산화 효과

5-3-1. 곰의말채 추출물의 DPPH radical 소거 효과

곰의말채 메탄올 조추출물 및 그 분획물들과 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 CME-1과 fr1-2의 DPPH 라디칼 소거 측정하였다. 곰의말채 메탄올 조추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 IC_{50}값이 6.8 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(9.1 ㎍/mL)에 비해 좋은 효과를 보였다. 용매 분획물 중에는 에틸아세테이트 분획물이 6.2 ㎍/mL로 메탄올 조추출물 보다 좀 더 좋은 소거 활성을 나타내었고, 부탄올 분획물이 13.3 ㎍/mL로 측정하였다. 곰의말채 에틸아세테이트 분획물로부터 2개의 fraction을 얻고 그 중 fr1에서 분리한 CME-1과 fr1-2의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. Quercitrin으로 확인된 CME-1인 경우 IC_{50}값이 5.5 ㎍/mL, fr1-2는 3.6 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(11 ㎍/mL)에 비해 DPPH 라디칼 소거 활성이 우수하게 측정되었다(Figure 71).

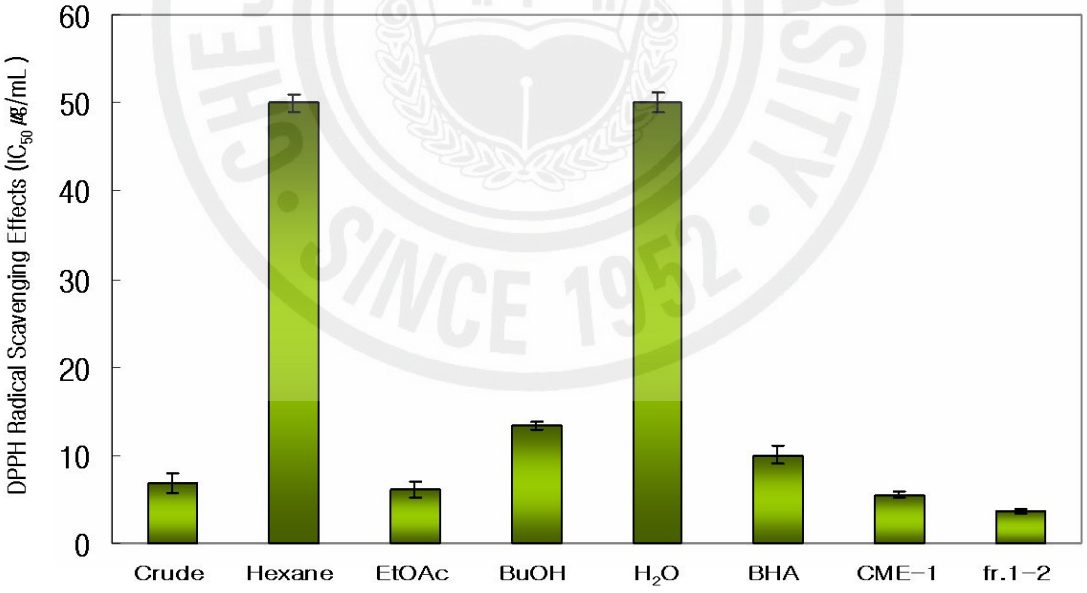


Figure 71. The DPPH radical scavenging activity of 80% MeOH extract, its subfractions and subfractions of EtOAc extract of *Cornus macrophylla*. The data were expressed as means ± S.D. in three determinations. CME-1 is quercitrin isolation from *Cornus macrophylla*.

5-3-2. 곰의말채 추출물이 Nitric oxide 생성 저해 효과

곰의말채 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 NO 생성 억제 효과를 측정하였다. 시료 처리 농도 500 ㎍/mL에서의 억제 효과를 3번에 걸쳐 측정한 결과, 메탄올 조추출물이 49.5%로 가장 좋은 억제 효과를 보였고, 에틸아세테이트 분획물이 47.1%, 부탄올 분획물이 29.2%, 물 분획물이 20.5%로 측정되었다. 그리고 곰의말채 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 quercitrin인 경우 500 ㎍/mL의 농도에서 63.2%, IC_{50} 값이 171.2 ㎍/mL로 확인되었다(Table 26).

Table 26. Antioxidant activities of 80% MeOH extract, its subfractions and quercitrin isolated from *Cornus macrophylla*.

Fractions	Nitric oxide Scavenging activity		Xanthine oxidase inhibition			
			Inhibition of uric acid generation		Inhibition of superoxide generation	
	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)	250 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)	500 ㎍/mL (%)	IC_{50} (㎍/mL)
MeOH	49.5±5.9	>500	36.2±4.3	>250	97.5±2.5	1.6±0.8
Hexane	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
EtOAc	47.1±0.0	>500	77.8±5.1	93.1±16.7	91.6±0.6	0.02±0.0
BuOH	29.1±4.6	>500	43.0±6.1	>250	82.0±0.7	4.4±0.7
H_2O	20.1±0.2	>500	9.0±2.0	>250	81.1±0.6	34.7±0.3
Quercitrin	63.2±0.2	>500	56.7±2.2	190.3±23.7	92.6±0.2	0.0001±0.03
Quercitin	92.7±3.1	171.2±8.4	N/D	N/D	N/D	N/D
Allopurinol	N/D	N/D	90.3±4.5	2.0±0.4	90.9±0.3	2.2±0.8

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

5-3-3. 곰의말채 추출물의 Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 효과

곰의말채 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 xanthine oxidase 억제 효과를 250 ㎍/mL의 농도와 IC_{50}값을 확인하였다. 시료의 처리 농도 250 ㎍/mL에서 에틸아세테이트 분획물이 77.8%로 좋은 억제 효과를 보였고, 5개의 농도로 준비하여 IC_{50}값을 구한 결과 에틸아세테이트 분획물이 93.1 ㎍/mL로 억제 효과를 나타내었다. 그리고 단일물질인 quercitrin인 경우 250 ㎍/mL의 농도에서 56.7%, IC_{50}값이 190.3 ㎍/mL로 확인되었다(Table 26).

Superoxide 소거 활성을 측정한 결과 시료의 처리 농도 500 ㎍/mL에서는 메탄올 조추출물이 97.5%로 가장 좋은 억제 효과를 나타내었으며, IC_{50}값은 에틸아세테이트 분획물이 0.02%로 가장 우수한 억제 효과를 보였다. 메탄올 조추출물은 1.58 ㎍/mL로 좋은 억제 효과를 나타내었으며, 부탄올 분획물은 4.4 ㎍/mL, 물 분획물은 34.7 ㎍/mL의 억제 효과를 보였다. 분리한 단일물질 quercitrin인 경우 500 ㎍/mL에서 92.6%의 억제 효과와 IC_{50}값이 0.0001 ㎍/mL로 월등한 활성 효과를 나타내었다 (Table 26).

5-4. CME-1의 구조 동정

화합물 CME-1의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼, DEPT측정하여 Table 27에 나타내었다. ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼을 확인한 결과 화합물 CME-1은 전형적인 플라보노이드 패턴을 보였다. ^{1}H NMR 스펙트럼에서 B ring의 H-2′은 H-6′이 meta coupling하여 그 시그널이 δ 7.32에서 doublet(J = 1.96Hz)으로 나타나고 있으며, H-5′과 H-6′은 서로 ortho coupling되어 J값이 8.32Hz로 동일하며 각각 δ 6.89, δ 7.29에서 doublet 피크로 나타나고 있다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 수산기가 결합되어 있지 않은 C-2′, 5′, 6′은 δ 116.3, δ 116.9, δ 122.8에서 피크를 보이고 수산기가 결합되어 있는 C-3′, 4′은 크게 down field되어 δ 146.4, δ 149.8에서 나타나고 있다. 또한, δ 6.18, δ 6.34에서 나타나는 피크는 서로 meta coupling되어 doublet(J = 2.2Hz)의 피크를 보이고 있으며, ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 99.8, δ 94.8은 C-6과 C-8의 피크이며 δ 163.1, δ 166은 C-5와 C-7의 피크로 이것은 플라보노이드의 A환의 5,7-di- hydroxylation의 전형적인 피크를 보여주고 있는 것이다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 C-2와 C-3은 δ 158.5, δ 136.2에서 나타나는 것으로 보아 이중결합을 가지고 있고 C-3에 수산기가 아닌 당이 결합되어 있을 것으로 예상되어 진다. Carbonyl 탄소인 C-4는 인접한 C-2, 3이 이중결합이고 C-3에 당이 결합한 영향으로 인하여 δ 179.6에서 나타나고 있다. 한편, ^{1}H NMR 스펙트럼에서 δ 3.34 ~ δ 4.22에서 당의 특성적인 피크를 보이고 있으며, δ 0.93에서 doublet으로 나타나는 methyl기 3개의 수소는 rhamnose의 전형적인 피크를 보여주고 있다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 당의 C-1″은 aglycon의 C-3과 결합하고 있어 당의 다른 탄소들보다 down field되어 δ 103.5에서 나타나고 C-2″, 3″, 4″, 5″은 δ 72, δ 72.1, δ 73.2, δ 71.9에 나타나고 있고 methyl기 탄소는 δ 17.6에서 당에 해당하는 signal이 나타나는 당은 rhamnose임을 알 수 있었다. δ 5.34의 doublet 피크는 C-3에 결합되어 있는 당의 anomeric 수소인 H-1′′으로 J값이 1.72Hz인 것으로 보아 α-L-rhamnose임을 알 수 있다. 이상의 결과로 화합물 CME-1은 quercetrin임을 확인하였으며, 문헌치[92]와의 비교에서도 잘 일치하였다.

Table 27. NMR spectroscopic data for CME-1 (in CD_3OD).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[92] δ_C (ppm)	Dept
C2		158.5	156.4	C
C3		136.2	134.4	C
C4		179.6	177.7	C
C5		163.1	161.2	C
C6	6.18 (d, J = 2.2Hz)	99.8	98.6	CH
C7		166	164	C
C8	6.34 (d, J = 2.2Hz)	94.8	93.5	CH
C9		159.3	157	C
C10		105.8	104.2	C
C1′		122.9	121	C
C2′	7.32 (d, J = 1.96Hz)	116.3	115.4	CH
C3′		146.4	145.1	C
C4′		149.8	148.3	C
C5′	6.89 (d, J = 8.32Hz)	116.9	115.8	CH
C6′	7.29 (dd, J = 1.96Hz, 8.32Hz)	122.8	121	CH
C1″	5.34 (d, J = 1.72Hz)	103.5	101.9	CH
C2″	3.75 (dd, J = 3.4Hz, 9.28Hz)	72	70.4	CH
C3″	4.22 (dd, J = 1.72Hz, 3.4Hz)	72.1	70.6	CH
C4″	3.34 (t, J = 4.64Hz)	73.2	71.5	CH
C5″	3.41 (m)	71.9	70.1	CH
C6″	0.93 (d, J = 6.12Hz)	17.6	17.3	CH_3

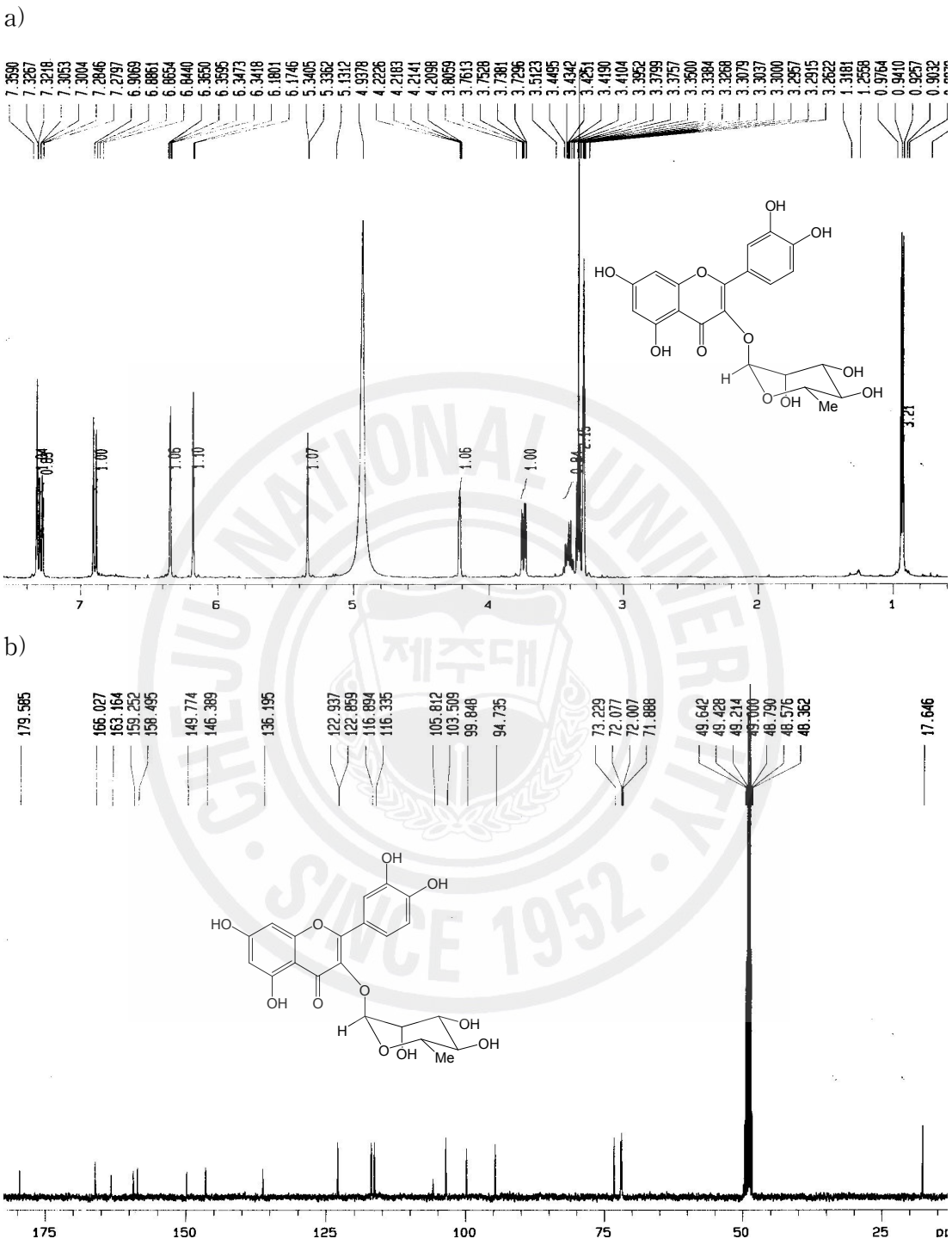


Figure 72. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of CME-1 (in CD_3OD).

a) ^{1}H-NMR spectrum of CME-1. b) ^{13}C-NMR spectrum of CME-1.

6. 차풀 추출물의 활성 결과

6-1. 항주름 효과

6-1-1. 차풀 추출물의 elastase 억제 효과

차풀 추출물의 주름 억제 효능을 확인하기 위하여 차풀 메탄올 조추출물 및 그 분획물들의 진피내의 탄력섬유를 분해하여 피부 주름을 형성하는 elastase 억제 효과를 확인하였다. 차풀 80% 메탄올 조추출물 및 그 분획물들을 여러 개의 농도로 준비하여 elstase 효소 억제 효과를 측정하여 IC_{50}값을 구하였다. 측정 결과 에틸아세테이트 분획물이 IC_{50}값이 12.2 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(31.5 ㎍/mL)에 비하여 우수한 효소 억제 효과를 나타내었다.

Elastase 효소 억제 효과가 우수한 에틸아세테이트 분획물을 컬럼을 이용하여 분리한 4개의 분획들의 효소 억제 효과를 측정하였다. 측정 결과 luteolin으로 구조가 확인된 CMNE-1의 IC_{50}값이 18.1 ㎍/mL, fr2-2가 28.1 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(31.5 ㎍/mL)보다 좋은 억제 효과를 보였으며, fr1-2가 32.3 ㎍/mL로 대조군과 유사한 효과를 보였고, fr2-1는 57 ㎍/mL의 억제 효과를 나타내었다 (Figure 73).

6-1-2. 차풀 추출물의 MMP-1 합성 억제 및 활성 억제 효과

6-1-2-1. 차풀 추출물의 MMP-1 합성 억제 효과

차풀의 주름 억제 효과를 진피 내의 결합 단백질인 콜라겐을 분해하는 MMP-1 생합성 억제 효과를 측정함으로써 확인하였다. 차풀 80% 메탄올 조추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MMP-1 생합성 억제 효과는 시료 농도 100 ㎍/mL에서 각각 9.8%, 61.1%로 확인되었다(Table 28).

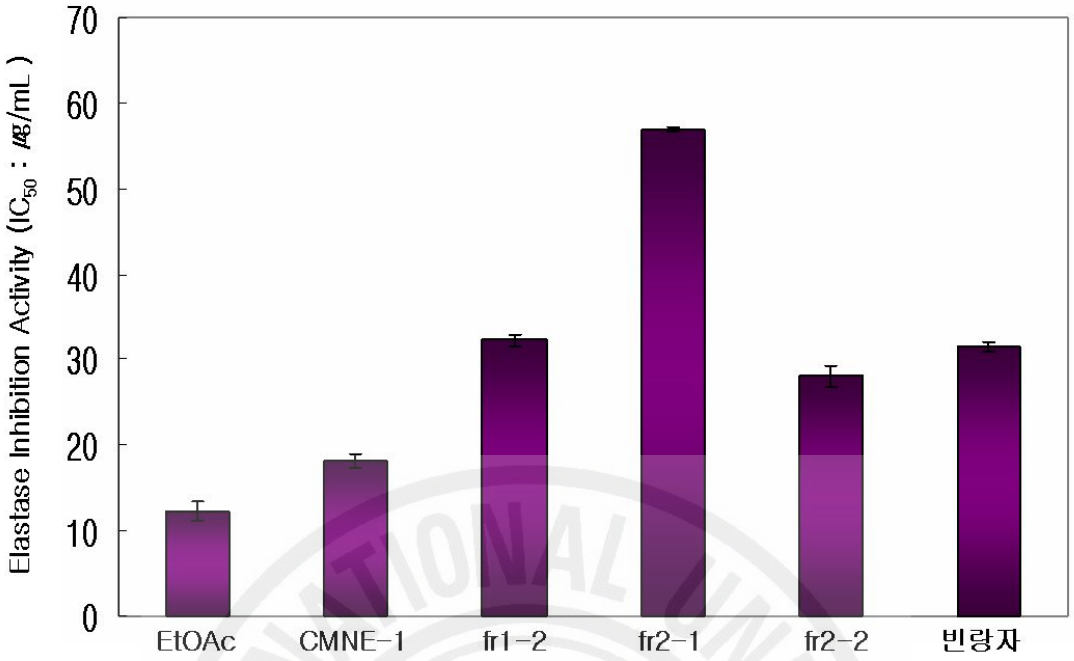


Figure 73. Effects of EtOAc extract and its subfractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame* on elastase activity. CMNE-1 is luteolin isolated from EtOAc extract of *Cassia mimosoides* var. *nomame*.
The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

Table 28. The effect of *Cassia mimosoides* var. *nomame* on the production of MMP-1 of human dermal fibroblast irradiated with UVB.

Samples	MMP-1 생성 억제효과(%) (100㎍/mL)
메탄올 추출물	9.8
에틸아세테이트 분획	61.1

6-1-2-2. Luteolin의 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제 효과

UVB 조사 시 Luteolin을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 UVB control에 비하여 MMP-1 생성이 억제 되었고, 10 μg/ml luteolin 처리에 의하여 MMP-1 생성은 49% 감소되었다. 그러나 이 효과는 EGCG(10 μg/ml)보다는 약하였다(Figure 74).

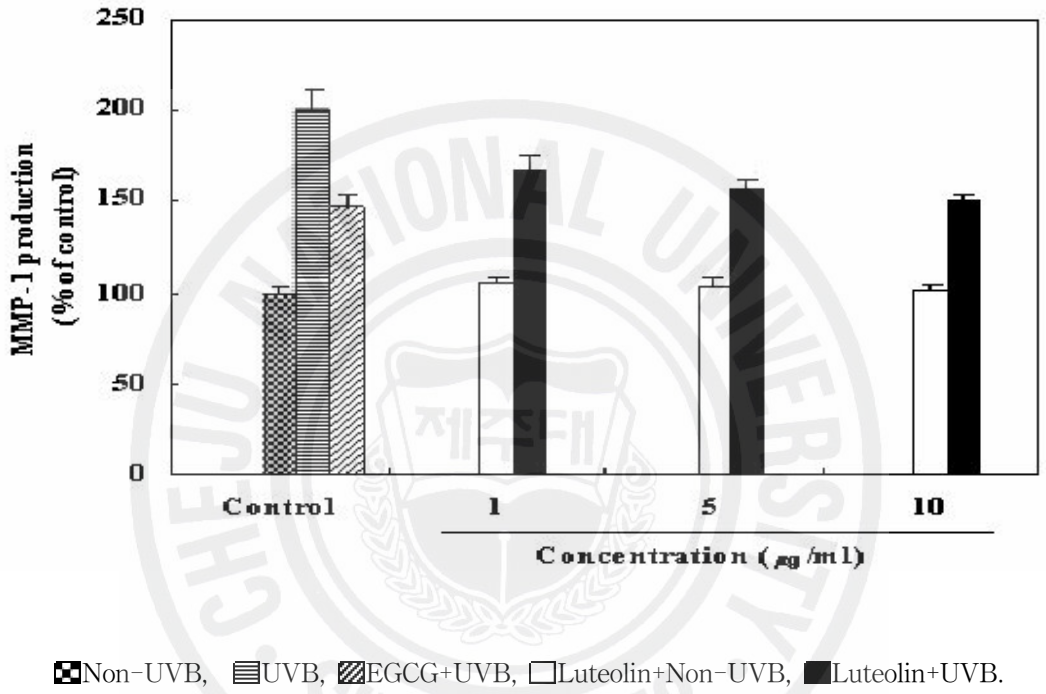


Figure 74. The effect of luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame* on the production of MMP-1 by the UV-irradiated human dermal fibroblast (lab data). The human dermal fibroblast were treated with an extract of *Cornus macrophylla* for 20h. The cells were then irradiated with UVB (35 $mJ/cm)^2$ and cultured for 48h more. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. Used EGCG (10 μg/mL) for positive control.

6-1-3. Luteolin이 MMP-1 mRAN 발현에 미치는 영향

UVB 조사에 의하여 조사 전에 비하여 MMP-1 mRNA level이 증가 되었고 luteolin 처리에 의하여 MMP-1 발현이 현저히 감소되었다(Figure 75).

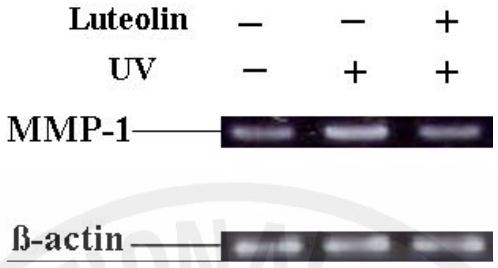


Figure 75. Effect of luteolin on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVB (lab data). After irradiated UVB, human dermal fibroblast were treated with various concentrations of luteolin for 48h. Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR experiment.

6-2. 항산화 효과

6-2-1. 차풀 메탄올 조추출물 및 분획물들의 DPPPH radical 소거 효과

차풀 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 차풀 80% 메탄올 조추출물 및 그 분획물들을 다양한 농도로 준비하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 실험 결과, 차풀 에틸아세테이트 분획물이 IC_{50}값이 9.1 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(9.0 ㎍/mL)와 유사한 좋은 활성을 나타내었다(Figure 76).

6-2-2. 차풀 에틸아세테이트 분획과 luteolin의 DPPH 라디칼 소거 효과

항산화 활성이 우수한 에틸아세테이트 분획물을 컬럼을 통하여 분리한 5개의 분획 중 실험양이 가능한 4개의 분획들의 항산화 효과를 DPPH 용액을 이용하여 측정한 결과 luteolin으로 구조가 확인된 CMNE-1이 4.7 ㎍/mL로 IC_{50}값이 가장 좋게 측정되었으며, fr1-2가 7.8 ㎍/mL, fr1-2가 29.1 ㎍/mL로 확인되었으며, CMNE-1과 fr1-2는 대조군인 BHA(11.2 ㎍/mL) 보다 우수한 결과를 나타내었다(Figure 77).

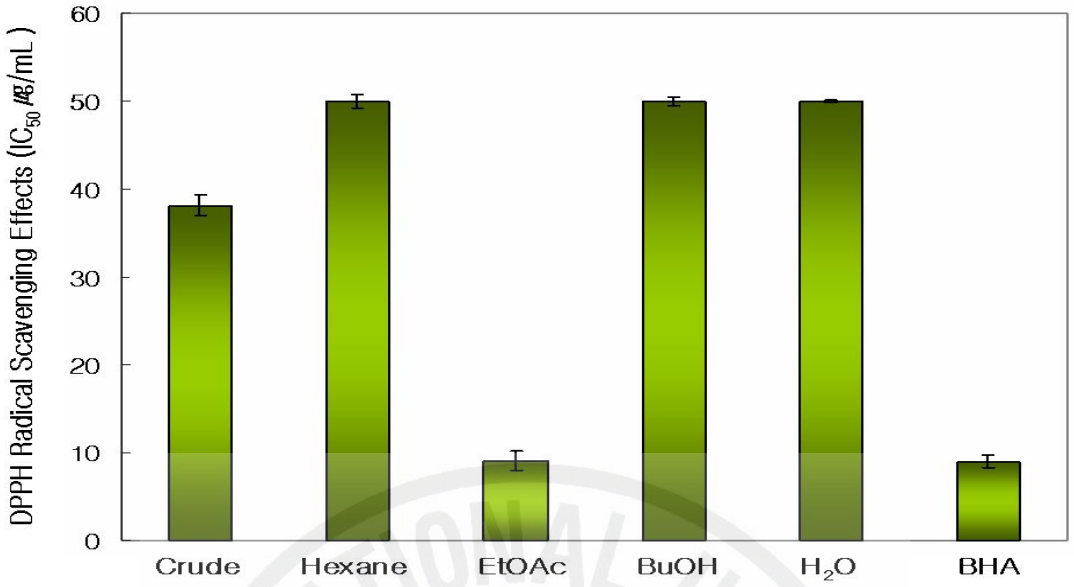


Figure 76. The DPPH radical scavenging activity of 80% MeOH extract and its subfractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame*. The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

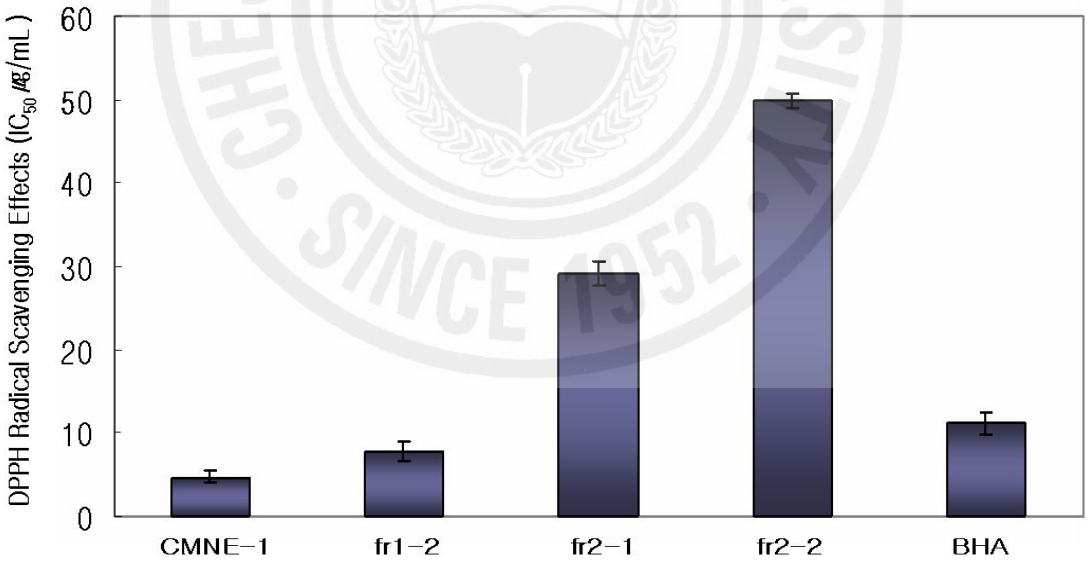


Figure 77. The DPPH radical scavenging activity of subfractions of EtOAc extract of *Cassia mimosoides* var. *nomame*. CMNE-1 is luteolin isolated from EtOAc fraction of *Cassia mimosoides* var. *nomame*. The data were expressed as means ± S.D. in three determinations.

6-3. CMNE-1의 구조 동정

화합물 CMNE-1의 구조를 확인하기 위하여 ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼, DEPT를 측정하여 Table 29에 나타내었다. ^{1}H, ^{13}C NMR 스펙트럼을 확인한 결과 화합물 CMNE-1은 전형적인 플라보노이드 패턴을 보였다. ^{1}H NMR 스펙트럼에서 A ring의 H-6, H-8이 meta coupling하여 그 시그널이 δ 6.18, 6.44에서 각각 1H의 doublet(J=2.2Hz)으로 5,7-dihydroxylation pattern을 나타냈으며, δ 6.67에서 H-3의 singlet의 올레핀 수소가 나타나고 있으며, B ring의 H-2′은 H-6′과 meta coupling되어 δ 7.39에서 doublet으로 나타나고 있다. 또한 H-5′과 H6′은 서로 ortho coupling되어 J값이 8.32Hz로 동일하며 각각 δ 6.88, δ 7.42에서 doublet 피크로 나타나고 있다. ^{13}C스펙트럼에서 C-2와 C-3이 δ 163.9, δ 102.8에서 나타나는 것으로 보아 이중결합이고 C-3이 치환되어 있지 않음을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4는 δ 181.6에서 피크를 보이고 있다. 또한 δ 93.8, δ 98.8은 C-6, C-8의 피크이며, 전형적인 플라보노이드 A ring의 피크를 보이고 있다. C-2′, C-5′, C-6′ 피크들은 δ 113.3, δ 116, δ 119에서 나타나며, 수산기가 결합되어 있는 C-3′과 C-4′는 downfield되어 δ 145.7, δ 149.7에서 나타나고 있다. 이상의 결과로 화합물 CMNE-1은 luteolin임을 확인하였으며, 문헌치[93]와의 비교에서도 잘 일치하였다.

Table 29. NMR spectroscopic data for CMNE-1(in DMSO-d_6).

C No.	δ_H (multi, J Hz)	δ_C (ppm)	ref.[93] δ_C (ppm)	Dept
C2		163.9	164.5	C
C3	6.67 (s)	102.8	103.3	CH
C4		181.6	181.2	C
C5		161.4	162.1	C
C6	6.18 (d, J = 2.2Hz)	98.8	99.2	CH
C7		164.2	164.7	C
C8	6.44 (d, J = 2.2Hz)	93.8	94.2	CH
C9		157.2	157.9	C
C10		103.6	104.2	C
C1′		121.4	122.1	C
C2′	7.39 (d, J = 2.2Hz)	113.3	113.8	CH
C3′		145.7	146.2	C
C4′		149.7	150.2	C
C5′	6.88 (d, J = 8.32Hz)	116	116.4	CH
C6′	7.42 (dd, J = 2.2Hz, 8.32Hz)	119	119.3	CH

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

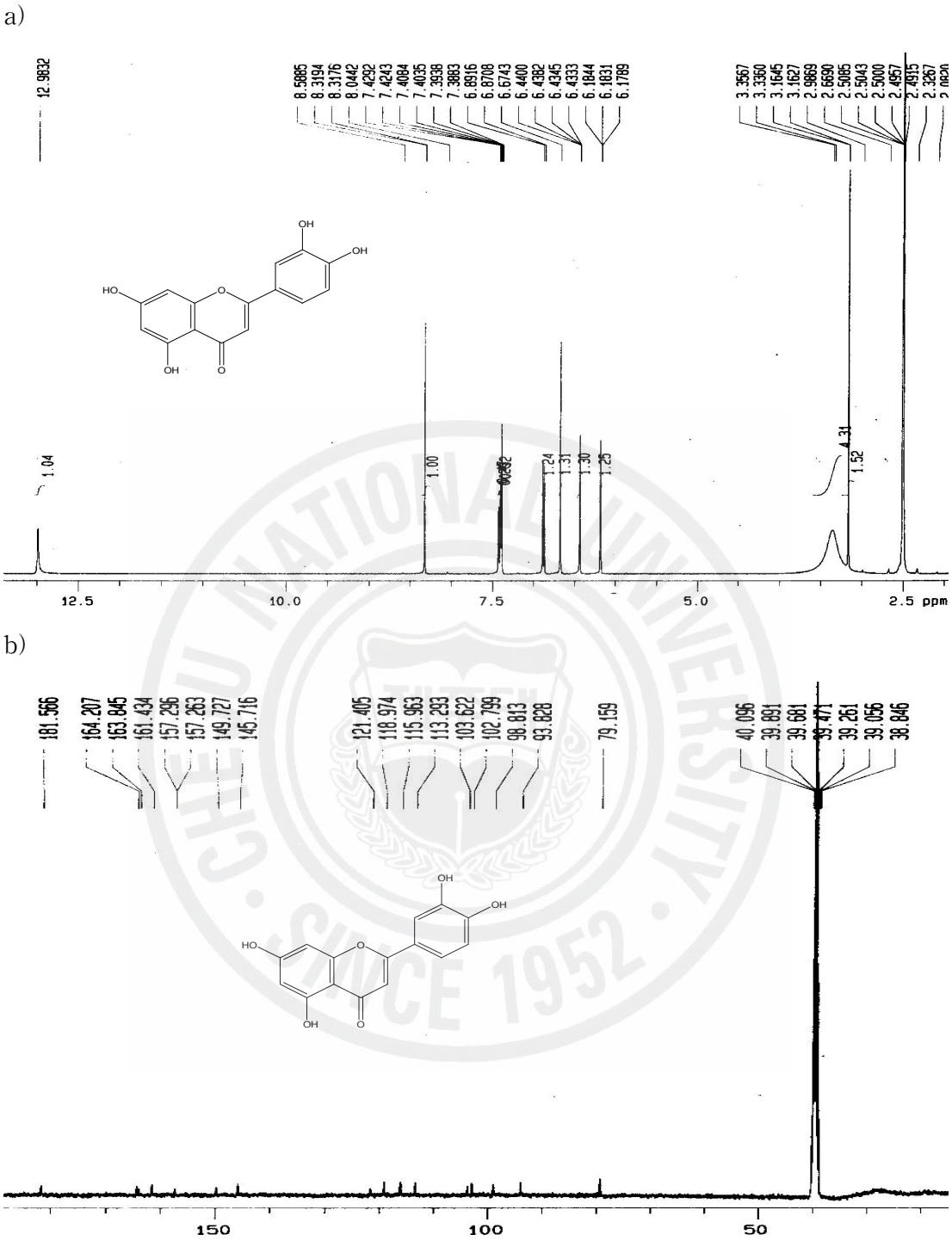


Figure 78. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectrum of CMNE-1. (in CD_3OD)

a) ^{1}H-NMR spectrum of CMNE-1. b) ^{13}C-NMR spectrum of CMNE-1.

Ⅳ. 고　　찰

제주도는 유네스코 세계문화유산에 등재될 정도로 세계적으로 깨끗한 자연환경을 보유하고 있는 청정지역이다. 따라서 제주도의 천연 자원을 이용하여 기능성 화장품 원료로 사용하는 것은 이미지를 중요시 하는 화장품 산업에서 큰 상징성을 제공할 수 있다. 본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 천연 식물들을 이용하여 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성에 대한 기본적인 생리 활성을 검색하였고, 그중 산박하, 털산박하, 조록나무, 왕모시풀 뿌리, 곰의말채, 차풀 등 6개의 식물을 선별하였다. 선별된 6개의 식물들로부터 유효성분을 분리·동정하였으며 미백, 항주름, 항산화, 항염 등의 효능을 확인하여 새로운 기능성 원료의 개발 가능성을 제시하였다.

1. 산박하 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

산박하 추출물을 이용하여 멜라닌 생합성 억제 효과 및 항산화 효과를 검색하였고, 그로부터 멜라닌 생합성 억제 효과가 있는 유효성분을 분리하여 멜라닌세포에서의 미백효과를 확인하였다. 또한 이 추출물이 대식세포를 이용한 항염증 효과를 확인함으로써 염증으로 인한 과색소 침착에 대한 미백제로서의 사용 가능성을 확인하였다.

산박하 추출물 및 그 분획물들을 이용하여 멜라닌세포를 이용한 미백효과를 확인한 결과 에틸아세테이트 분획물에서 melan-a 세포와 B16 세포에서 모두 우수한 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 UVB 조사로 인한 멜라닌 과생성 억제 효과를 측정한 결과 역시 에틸아세테이트 분획과 그로부터 분리한 fr2, fr3 그리고 단일물질인 excisanin A 및 kamebakaurin이 우수한 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. UVB 조사에 의한 멜라닌 생합성 억제 효과가 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현 억제를 통한 효능인지를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 확인한 결과 에틸아세테이트 분획인 경우 mitf, tyrosinase, MC1r의 mRNA 발현을 억제시켰다. 또한 에틸아세테이트 분획으로부터 용매 분획한 fr2, fr3인 경우 mitf, tyrosinase, TRP-1, MC1r, SCF의 mRNA 발현을 강하게 억제

시켰다. 단일물질인 excisanin A인 경우 mitf, tyrosinase, TRP-1, MC1r, c-kit mRNA 발현을 억제시켰고, kamebakaurin인 경우는 excisanin A 보다는 약하지만 mitf, tyrosinae, TRP-1, MC1r의 mRNA 발현을 억제시킴으로서 멜라닌 생성 억제 효능을 보였다. 그러나 전체적으로는 단일물질 보다 상위 분획물이 멜라닌 생성 관련 유전자들의 mRNA 발현을 더 강하게 억제시키고 있음을 확인하였다. 멜라닌 세포는 자외선에 의해 각질형성세포 등에서 분비되는 α-MSH와 같은 인자들에 의해 피부색소를 증가시키게 되는데[19,20], α-MSH는 멜라닌 세포막에 있는 MC1r에 결합하여 cAMP를 활성화시키게 되고, 이것은 다시 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자를 유도하는 mitf를 활성화시키게 되어 결국 멜라닌을 과다 생성시키게 한다[25-34]. 본 연구 결과에서 산박하 에틸아세테이트 분획물 및 그로부터 분획한 용매 분획물들이 MC1r의 mRNA 발현을 억제함으로써 cAMP의 활성을 약화시키고, mitf의 발현을 억제하였으며, 결국 tyrosinase, TRP-1 유전자의 mRNA 발현을 억제시킴으로써 멜라닌 과다 생성을 억제하고 있음을 확인하였다[94]. 또한 단일물질인 excisanin A는 멜라닌 세포막 수용체인 c-kit[95-98]의 mRNA 발현도 억제 시키고 있어 한 가지 경로가 아닌 여러 경로를 통해 UV에 의한 멜라닌 과생성 억제를 유도하고 있음을 확인하였다. 그리고 단일물질 보다 그 상층 분획에서 자외선 조사에 의한 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현을 더 강하게 억제하고 있다는 것은 본 연구에서 분리·동정한 단일물질 외에 여러 다른 물질들의 시너지 효과에 기인한 결과로 여겨진다. 산박하 에틸아세테이트 분획 및 단일물질들의 멜라닌 생합성 억제 효능을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 수행한 western blotting 결과에서도 에틸아세테이트 분획물인 경우 mitf, tyrosinase, TRP-1을 농도 의존적으로 억제하였고, 특히 TRP-1을 강하게 억제하여 멜라닌 생성 억제를 유도하고 있음을 확인하였다. 단일물질인 경우 mitf, tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현을 억제하였고, kamebakaurin인 경우 excisanin A과 에틸아세테이트 분획물 보다 mitf를 더 강하게 억제하였다. 산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 에멀젼을 이용한 melan-a 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정한 결과 역시 농도 의존적으로 유효한 결과를 얻을 수 있어 화장품 원료로 사용하였을 경우에서 활성 성분의 변화가 없을 것으로 판단되었다.

산박하 추출물의 항산화 효과 측정을 위한 실험 결과에서 DPPH radical 소거효능

은 메탄올 조추출물의 IC_{50}값이 28.3 ㎍/mL, 에틸아세테이트 분획물이 32.6 ㎍/mL 그리고 부탄올 분획물은 33.3 ㎍/mL로 대조군인 BHA(9.7 ㎍/mL)에 비해 낮은 효능을 나타내었다. 그러나 활성산소 중 인체의 대사과정에서 가장 먼저 발생하는 superoxide radical 소거 효능은 에틸아세테이트와 부탄올 분획물의 IC_{50}값이 0.9 ㎍/mL, 0.2 ㎍/mL로 대조군인 allopurinol(2.2 ㎍/mL)에 비해 우수한 억제 효능을 나타내었다.

산박하 추출물의 항염증 효능을 확인한 결과, 에틸아세테이트 분획물이 25 ㎍/mL의 농도에서 LPS 단독처리군이 47.6 μM의 NO가 생성된데 비해 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서는 각각 8.0 μM, 1.8 μM로 강한 NO 억제 효과를 나타내었다. 또한 단일물질인 excisanin A, kamebakaurin, henryin 역시 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰다. 이러한 NO 생성 억제 효과가 iNOS mRNA 발현 억제를 통한 것인지를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 역시 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제시켰다. 뿐만 아니라 COX-2와 염증관련 cytokine인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.

산박하 추출물로부터 미백, 항산화 및 항염 효과를 측정하여 그 유효성분을 분석한 결과 diterpenoid인 excisanin A, kamebakaurin, henryin과 같은 diterpenoid를 분리하였고, 이들 물질들은 산박하에서는 처음으로 분리한 물질이다. Diterpenoid를 이용한 세포독성과 항암, 항균 그리고 항염에 관한 연구 보고들은 있지만[99] 미백관련 연구는 보고된 적이 없고, excisanin A, kamebakaurin[100]인 경우는 항염 관련 연구 보고서가 발표되었으나, henryin은 항염에 관한 연구 역시 아직까지 보고된 적인 없어 학술적인 연구 가치가 있는 것으로 사료된다.

이러한 결과들로부터 산박하 에틸아세테이트 분획물 및 그로부터 분리한 단일물질들의 멜라닌 생합성 억제 효과 및 자외선에 의한 과색소 침착 억제제, 염증으로 유발된 색소 침착 및 노화 억제제 그리고 항산화제로서의 사용 가능성을 확인하였다.

2. 털산박하 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

털산박하는 산박하의 변종으로 활성 실험 결과에서도 산박하와 유사한 효능을 보였으며, 털산박하로부터 분리한 단일물질도 산박하에서 분리한 물질인 kamebakaurin으로 확인되었다.

털산박하 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과, 산박하에서와 같이 에틸아세테이트 분획물에서 가장 좋은 효능을 보였으며, 세포 증식에 영향을 미치지 않는 10 ㎍/mL, 5 ㎍/mL의 농도에서 각각 77.1%, 63.5%의 억제 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물로부터 얻은 10개의 분획 중 1 ㎍/mL의 시료 농도에서도 세포 증식에 영향을 미치지 않으면서도 81%의 멜라닌 생성 억제 효과를 나타낸 fr6 분획을 이용하여 단일물질인 kamebakaurin을 분리할 수 있었고, 그 효능을 확인하였다. 털산박하 에틸아세테이트 분획 및 단일물질인 kamebakaurin의 멜라닌 생합성 억제 효과를 멜라닌 생성 관련 단백질의 감소에 의한 것인지 확인 한 결과 농도 의존적으로 mitf, tyrosinase, TRP-1을 감소시켰다. 또한 털산박하 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 에멀젼을 제조하고 이것을 melan-a 세포에 처리하여 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하여 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인하였다. 실험 결과 500 ㎍/mL, 400 ㎍/mL, 200 ㎍/mL의 시료 농도에서 79.7%, 63.9%, 49.5%로 농도 의존적으로 대조군인 arbutin에 비해 우수한 멜라닌 억제 효과를 확인하였다.

털산박하 추출물의 항염 효과를 대식세포인 RAW 264.7을 이용하여 확인한 결과, 시료의 농도 25 ㎍/mL에서 NO의 생성은 LPS 단독 처리군에서 51.4 μM이 생성된데 비해 헥산, 에틸아세테이트 분획물에서는 각각 6.5 μM, 2.9 μM로 NO 억제 효과가 우수하게 나타났다. 이러한 NO 억제 효과가 대식세포에서 NO 활성에 관여하는 인자의 상관관계를 iNOS 발현 변화를 통하여 확인한 결과 에틸아세테이트 분획물이 iNOS mRNA 발현을 억제시켰다. 또한 대식세포에서 NO의 생성으로 인하여 활성화되는 COX-2의 mRNA 발현을 억제시키고 있음을 확인함으로써 COX-2의 활성화로부터 야기되는 염증의 심화 반응을 억제시킬 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라 염증 관련 cytokines인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 mRNA 발현 역시 억제시켜 털산박하 추출물이 염증 유발 인자들을 억제시킴으로써 염증으로 인해 발생하는 과색소침착 그리고 노화 억제제로서의 사용가능성을 확인하였다.

털산박하 항산화 효능 검증을 위하여 시행한 DPPH radical 소거 효과에서는 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 26.6 ㎍/mL, 메탄올 추출물이 34.4 ㎍/mL로 대조군인 BHA(9.7 ㎍/mL)보다 좋은 효과를 보이지는 않았다. 그러나 산박하와 마찬가지로 superoxide radical 소거 효과는 에틸아세테이트 분획물이 IC_{50}값이 1.2 ㎍/mL로 우수한 효과를 나타내었다.

이러한 결과들로부터 털산박 에틸아세테이트 분획물 역시 멜라닌 생합성 억제제 및 항염증 효과를 통한 과색소 형성 방지제, 항노화제 그리고 항산화제로서의 사용 가능성을 확인하였다.

3. 조록나무 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

조록나무 추출물과 그 분획물 및 단일물질인 PGG의 미백 효능을 확인하기 위하여 멜라닌 형성 과정에서 속도조절효소(rate-limiting enzyme)로 작용하는 tyrosinase 효소 억제 활성과 melan-a 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였고, 자외선에 의한 멜라닌 과생성 억제 효과를 조록나무 잎에서부터 분리한 단일물질인 PGG를 사용하여 확인하였다.

조록나무 잎과 줄기를 따로 추출하여 tyrosinase 효소 억제 효과를 측정한 결과 잎인 경우 메탄올 추출물의 IC_{50}값이 95.2 ㎍/mL, 에틸아세테이트 분획물이 115.6 ㎍/mL으로 나타났고, 줄기인 경우 에틸아세테이트 분획물이 28.3 ㎍/mL, 메탄올 추출물이 113.3 ㎍/mL로 대조군인 arbutin(112.1 ㎍/mL)에 비하여 우수하거나 유사한 억제효과를 보였다. 조록나무 잎의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 11개의 분획 및 단일물질인 PGG인 경우 fr6~fr11 분획이 모두 arbutin 보다 월등한 효소 억제 효과를 나타내었고, 단일물질인 PGG 역시 arbutin의 약 2배에 해당하는 효소 억제 효과를 확인할 수 있었다.

조록나무 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하였을 때, 50 ㎍/mL 처리 농도에서 에틸아세테이트 분획이 좋은 멜라닌 생성 억제 효과를 보였으나 이 농도에서는 세포 증식 억제도 보여 이로 인한 더 좋은 효과가 나타난 것으로 여겨졌다. 또한 조록나무 잎의 에틸아세테이트 분획으로부터 얻은 분획들에서도 멜라닌 생성 억제 효과를 확인할 수 있었지만, 역시 세포 증식에 영향을 미쳤다. 그러나 멜라닌 생

성 억제 효과는 비교적 낮지만 세포 증식에 영향을 미치지 않는 fr9로부터 분리한 단일물질인 PGG의 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정한 결과 20 ㎍/mL, 10 ㎍/mL, 5 ㎍/mL의 처리농도에서 각각 73.4%, 58.5%, 20.5%의 순차적 억제 효과를 나타내었다. PGG 멜라닌 생성 억제 효과가 멜라닌 생성 관련 mRNA 발현을 억제한 결과인지 확인하기 위하여 RT-PCR을 통하여 확인하였다. PGG 10 ㎍/mL을 melan-a 세포에 처리하여 유전자 발현을 확인한 결과 MSH, MC1r, TRP-1의 mRNA 발현을 억제하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과로 인하여 조록나무로부터 분리한 PGG의 멜라닌 생합성 억제 효과는 tyrosinse 효소 활성을 억제하는 결과를 확인할 수 있었지만 세포내에서는 이 효소 보다는 다른 멜라닌 자극 인자들을 더 억제함으로써 나타나는 결과임을 확인하였다.

조록나무 추출물과 그 분획물 및 PGG의 elastase 억제 효과를 통한 항주름제로서의 이용가능성을 확인한 결과 메탄올 추출물과 그 분획물에서는 줄기에서만 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 17.8 ㎍/mL, 물 분획물이 18.3 ㎍/mL, 메탄올 추출물이 21.0 ㎍/mL로 좋은 효소 억제 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 잎의 에틸아세테이트 분획으로부터 얻은 10개의 분획과 PGG의 elastase 억제 효과는 fr6, fr7의 IC_{50}값이 각각 14.0 ㎍/mL, 14.3 ㎍/mL로 빈랑자 추출물보다 우수한 결과를 보였으며 PGG인 경우 12.1 ㎍/mL로 월등한 효소 억제 효과를 나타내어 조록나무 추출물과 그로부터 분리한 PGG가 항주름제로서 사용 가능성을 확인하였다.

조록나무의 항산화 효능 측정은 DPPH radical 소거 효능을 측정함으로써 확인하였는데 조록나무 잎의 메탄올 추출물인 경우 IC_{50}값이 5.7 ㎍/mL, PGG는 2.3 ㎍/mL으로 대조군인 Vit.C(5.5 ㎍/mL)와 비교 시 비슷하거나 PGG는 약 2배에 해당하는 좋은 효과를 나타내었다.

이러한 결과들로부터 조록나무 추출물이 미백제 뿐만 아니라 주름개선 원료로서 사용 가능성을 확인할 수 있었고, 항산화 활성 역시 우수하여 항산화제로서 현재 미백제로 사용되는 Vit.C처럼 산화 방지를 통한 미백 효과 및 활성산소에 의한 노화 방지제로 부가적인 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

4. 왕모시풀 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

왕모시풀 뿌리의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하기 위하여 melan-a 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제 효능에서 에틸아세테이트 분획에서 얻은 9개의 분획들을 10 ㎍/mL로 처리하였을 때 fr2가 53.2%, fr3이 46.4%로 좋은 효과는 보였으나 세포 증직에 영향을 미쳤고, fr5, fr6, fr8, fr4, fr1이 세포 증식에 영향을 미치지 않으면서 각각 17.3%, 15.3%, 13.2%, 13.8%, 12.7%로 대조군으로 사용된 arbutin(11.1%)과 비슷한 수준의 억제 효과를 나타내었다.

왕모시풀 뿌리의 항염증 효과를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 이용한 NO 생성 억제 효과를 확인한 결과 LPS 단독으로 처리하였을 때의 NO가 41.6 μM으로 과량 생성된 것에 비해 시료의 농도 5 ㎍/mL에서 헥산 분획물은 0.7 μM로 NO 생성량이 현저히 감소하였으며, 부탄올 분획물은 미약한 세포 독성과 함께 1.4 μM, 에틸아세테이트 분획물은 0.9 μM로 NO 생성량이 줄어든 결과를 나타냈다. 왕모시풀 뿌리 에틸아세테이트 분획 중 fr4로부터 분리한 단일 화합물인 epicatechin인 경우 200 ㎍/mL, 100 ㎍/mL, 50 ㎍/mL의 처리 농도에서 LPS 단독 처리군이 44.5 μM로 과량의 NO를 생성시켰으며, 시료 처리군은 각각 31.2 μM, 34.9 μM, 36.1 μM로 NO 생성이 감소하였다. LDH를 이용한 세포 독성은 각각 19.6%, 10.9%, 0.3%로 측정되어 왕모시풀 뿌리 추출물의 NO 억제 효과는 분리한 epicatechin에 의한 효과보다는 에틸아세테이트 분획에 포함된 다른 유효성분에 의한 것임을 예측할 수 있었다. 왕모시풀 뿌리의 NO 억제에 대한 iNOS mRNA 발현 억제 정도를 확인한 결과 에틸아세테이트, 부탄올, 헥산 분획물이 iNOS mRNA 발현을 억제시키고 있어 왕모시풀 뿌리의 NO 억제 효과가 iNOS의 발현을 억제시킴으로써 나타난 결과임을 확인하였다. 또한 염증을 심화시키는 물질인 COX-2의 mRNA 발현 역시 에틸아세테이트, 부탄올, 헥산 분획물 순으로 억제하고 있었다. 염증관련 cytokines의 mRNA 발현 억제 효능은 TNF-α는 에틸아세테이트 분획이 억제하고 있음을 확인하였고, IL-6는 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물이 미약하게 억제 효과가 나타났다.

왕모시풀 뿌리의 항주름 효과는 elastase 억제 효과와 MMP-1 생성 억제 및 활성 억제를 확인하여 측정하였는데 우선, elastase 억제 효과를 확인한 결과 부탄올 분획물의 IC_{50}값이 16.2 ㎍/mL로 대조군인 빈랑자 추출물(23.0 ㎍/mL)보다 좋은 효과를

나타내었다. 에틸아세테이트 분획으로부터 얻은 9개의 분획 중에는 fr9의 IC_{50}값 43.8 ㎍/mL로 이때의 빈랑자 추출물의 활성값(40.8 ㎍/mL)과 유사한 효능을 보였다. MMP-1 생성 억제 효과는 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 MTT를 이용한 세포증식 억제(0.5%)에는 영향을 미치지 않으면서 63.9%의 좋은 억제 효과를 보여 UV 자극에 대한 MMP-1 생성을 억제하여 collagen 분해를 방어함으로써 주름 형성을 방어할 수 있는 항노화제로서의 가능성을 확인하였다.

왕모시풀 뿌리의 항산화 효과 측정을 위하여 DPPH radical 소거 활성을 확인하였는데 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 6.0 ㎍/mL로 대조군인 BHA(9.0 ㎍/mL)에 비해 우수한 소거 활성을 나타내었다. 또한 NO radical 소거능은 헥산, 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 각각 139.2 ㎍/mL, 360.4 ㎍/mL로 측정되었고, superoxide radical 소거 효능은 에틸아세테이트 분획물이 0.8 ㎍/mL, epicatechin이 0.4 ㎍/mL로 강한 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

이상의 결과로부터 왕모시풀 뿌리 추출물을 이용하여 염증으로 인한 과색소 침착 방지, elastase와 MMP-1 생성 억제를 통한 항주름 소재 및 활성산소 제거를 통해 멜라닌 세포에서의 멜라닌 생합성 억제 효능은 크게 우수하지 않지만 산화 과정으로부터 발생하는 과색소 침착 및 노화 방지제로서의 사용 가능성을 확인하였다.

5. 곰의말채 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

곰의말채 추출물의 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 유도된 NO 억제 활성 억제를 확인한 결과 곰의말채 분획 중 헥산 분획물이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과가 iNOS mRNA 발현 억제를 통한 것인지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 확인한 결과 세포 독성이 없는 25 ㎍/mL의 시료 농도에서 iNOS mRNA 발현을 억제시켰다. 또한 염증 매개체인 PGE_2의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 COX-2의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. TNF-α, IL-6, IL-1β과 같은 염증 관련 cytokines의 mRNA 발현에 대한 억제 효과는 약하지만 농도 의존적으로 억제하였다.

곰의말채 추출물의 항주름 효과를 위한 elastase 억제 효능 측정은 메탄올 조추출물, 에틸아세테이트 분획 및 부탄올 분획물의 각각 IC_{50}값이 13.1 ㎍/mL, 24.1 ㎍

/mL, 25.1 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 빈랑자 추출물(31 ㎍/mL)에 비해 우수한 억제 효과를 나타내었다. 그러나 에틸아세테이트로부터 분리한 quercitrin 및 분획물은 효소 활성이 낮게 측정되어 quercitrin이 아닌 다른 유효성분에 의한 효소 억제 활성이 나타났음을 예측할 수 있었다. 항주름 효과를 위한 또 하나의 활성 실험인 MMP-1 생성 및 활성 억제 실험에서 MMP-1 활성은 시료농도 20 ㎍/mL에서 39.8%, UV 조사에 의해 유도된 MMP-1 생성 억제 효과는 100 ㎍/mL에서 27.1%의 억제 효과를 나타내었다.

곰의말채 항산화 활성 측정을 위한 DPPH radical 소거 활성에서 메탄올 조추출물, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 IC_{50}값이 각각 6.8 ㎍/mL, 6.2 ㎍/mL, 13.3 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(9.1 ㎍/mL)에 비해 우수하거나 유사한 효과를 보였다. 그리고 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 quercitrin은 IC_{50}값이 5.5 ㎍/mL fr1-2는 3.6 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(11 ㎍/mL)에 비해 DPPH 라디칼 소거 활성이 우수하게 측정되었다. 활성산소 중의 하나인 superoxide radical 소거 활성에서도 에틸아세테이트 분획이 IC_{50}값 0.02 ㎍/mL으로 월등한 활성을 보였고, 메탄올 추출물과 부탄올 분획물도 각각 1.6 ㎍/mL, 4.4 ㎍/mL으로 좋은 소거 활성을 보였다. 그리고 quercitrin인 경우 0.1 ng/mL로 아주 우수한 효능을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 곰의말채 추출물과 그로부터 분리한 quercitrin은 항산화 활성이 우수하여 활성산소로 인한 색소 침착 및 노화 방지에 좋은 천연 원료로서 사용이 가능하며, 메탄올 추출물 자체로도 elastase 효소 억제 및 MMP-1 억제를 통한 항주름제로도 사용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 곰의말채 헥산 분획물은 항염 효과도 확인되어 염증으로 인한 과색소 침착 억제제 및 노화 억제제로서도 사용이 가능함을 확인하였다.

6. 차풀 추출물의 기능성 원료 사용 가능성 확인

차풀 추출물의 항주름 및 항산화 활성을 확인하여 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인하였다.

항주름 억제제로서의 활성을 확인하기 위하여 시행한 elastase 효소 억제 효과에서 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 12.2 ㎍/mL로 대조군(빈랑자 추출물: 31.5 ㎍

/mL)에 비해 두 배 이상의 좋은 억제 효과를 확인하였다. 그리고 그로부터 분리한 luteolin은 IC_{50}값이 18.1 ㎍/mL로 상위 분획보다는 낮지만 우수한 효소 억제 효과를 보였고, 분획물인 fr1-2는 32.3 ㎍/mL로 대조군과 유사한 효과를 보였다. 또한 MMP-1 합성 억제 효과는 100 ㎍/mL의 처리 농도에서 에틸아세테이트 분획이 61.1%의 좋은 억제 효과를 나타내었고, luteolin인 경우 10 μg/mL 농도에서 MMP-1 생성을 49% 감소시키고 MMP-1 효소 활성은 대조군에 비하여 39.7% 억제시키는 결과를 확인하였다. MMP-1 생성 억제 효과가 mRNA 발현 억제를 통한 결과인지 RT-PCR을 통해 확인한 결과 UVB 조사에 의하여 조사 전에 비하여 MMP-1 mRNA level이 증가 되었고 luteolin 처리에 의하여 MMP-1 발현이 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다.

차풀 추출물의 항산화 효과는 DPPH radical 소거 활성을 이용하여 확인하였는데, 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50}값이 9.1 ㎍/mL로 대조군으로 사용된 BHA(9.0 ㎍/mL)와 유사한 좋은 활성을 나타내었고, luteolin은 4.7 ㎍/mL로 IC_{50}값이 가장 좋게 확인되었다.

이상의 결과들로부터 차풀 추출물 및 luteolin은 항주름 효과와 항산화 효과가 있는 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

결론적으로 이상의 모든 연구 결과들로부터 본 연구를 통하여 추출물들의 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 활성을 확인한 6개의 식물들은 기능성 화장품 원료로서의 사용가능성을 제시한다. 즉, 산박하와 털산박하는 미백 및 항염증, 항산화 효과를 확인함으로써 미백 및 항노화 관련 화장품 원료로서의 사용가능성을 확인할 수 있었고, 조록나무는 미백, 항주름, 항산화 활성을 갖는 복합 기능성 원료로서 사용이 가능하다. 왕모시풀 뿌리와 곰의 말채는 항염, 항주름, 항산화 활성을 갖는 원료로서 그리고 차풀인 경우 항주름, 항산화 기능을 갖는 원료로서 활용 가치를 지니고 있다고 사료된다.

본 연구에서 밝힌 산박하로부터 분리한 3개의 단일물질들은 아직 미백과 관련된 연구가 진행된 것이 없고, 특히나 henryin인 경우 본 실험에서 효능이 확인된 항염에 관련된 연구 자료도 보고된 것이 없다. 따라서 산박하와 털산박하에 분리된 3개의 단일물질들은 미백제 및 항염증제로서 이용할 수 있는 가능성을 제시한다.

조록나무로부터 분리된 PGG인 경우도 아직 미백이나 주름개선에 관련된 연구 자료가 보고되어진 적이 없고 항산화 효과 역시 우수하여 미백제 및 elastase 억제 효능을 통한 주름개선제 그리고 항산화제로서의 이용 가능성을 제시한다.

나머지 식물에서 분리된 플라보노이들이 항산화에 대한 연구는 보고된 적이 있지만 luteolin의 항주름 연구에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없어 학술적으로도 의의가 있다고 사료된다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

Ⅴ. 요 약

본 연구는 제주도 각 지역에서 채집한 식물 중 6개의 식물을 선별하여 미백, 항주름, 항염증, 항산화 등의 실험을 통하여 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인하였다.

1) 각각의 식물들의 활성을 확인한 결과 산박하와 털산박하 에틸아세테이트 분획물 과 분리한 단일물질들인 excisanin A, kamebakaurin 및 henryin은 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하게 확인되었다. 뿐만 아니라 자외선 조사에 대한 멜라닌 과생성 억제 효능을 가졌으며 이러한 결과는 멜라닌 생성 유전자들의 mRNA 발현 억제 효과에 일부 기인하는 것을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 그리고 에틸아세테이트 분획물과 excisanin A, kamebakauin의 멜라닌 합성 관련 단백질 발현 억제 효과를 western blotting을 통하여 확인하였다. 분리한 3가지 단일물질들은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성억제 및 iNOS mRNA 발현 억제, COX-2 및 염증관련 cytokine의 mRNA 발현 억제를 확인함으로써 항염증 효과를 확인하였다.

2) 조록나무 추출물로부터 분리한 PGG의 미백에 관련한 활성 실험으로 tyrosinase 활성 억제, 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하여 우수한 효능을 확인하였고, 12,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucose(PGG)의 멜라닌 생합성 억제 효과가 멜라닌 생성에 관련된 유전자들의 mRNA 발현 억제를 통하여 일부 나타난 것임을 확인하였다. PGG는 elastase 활성 억제 효과가 IC_{50}값 12.1 ㎍/mL로 우수할 뿐만 아니라 DPPH radical 소거 활성 역시 IC_{50}값이 2.3 ㎍/mL로 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

3) 왕모시풀 뿌리의 RAW 264.7 세포를 이용한 항염 효과 측정에서 에틸아세테이트 분획물이 NO 억제 효과를 나타내었고, 이는 iNOS의 mRNA의 발현을 억제하여 나타난 결과였다. 또한 염증 관련 COX-2 mRNA 발현을 확인한 결과 에틸아세테이트, 부탄올, 헥산 분획물이 발현을 억제하였다. 왕모시풀 뿌리의 elastase 억제 효과는 부탄올 분획물의 IC_{50}값 16.2 ㎍/mL로 우수한 억제 효과를 보였고, MMP-1 생성 억제 효과는 시료의 농도 100 ㎍/mL에서 63.9%의 좋은 억제 효과를 나타내었다. 왕모시풀 뿌리의 항산화 효과는 에틸아세테이트 분획물의 DPPH radical 소거능이

IC_{50}값 5.97 ㎍/mL로 우수한 소거 활성을 나타내었고 superoxide radical 소거능은 에틸아세테이트 분획물이 IC_{50}값 0.8 ㎍/mL, epicatechin이 0.4 ㎍/mL로 강한 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

4) 곰의말채 추출물의 항염 효과는 헥산 분획물에서 나타났는데, NO 생성을 농도 의존적으로 억제시켰다. 곰의말채 추출물의 elastase 억제 효능 은 메탄올 조추출물, 에틸아세테이트 분획 및 부탄올 분획물이 각각 IC_{50}값 13.1 ㎍/mL, 24.1 ㎍/mL, 25.1 ㎍/mL로 우수한 억제 효과를 나타내었다. 곰의말채 항산화 활성 측정을 위한 DPPH radical 소거 활성에서 quercitrin은 IC_{50}값이 5.5 ㎍/mL로 라디칼 소거 활성이 우수하게 측정되었다. 활성산소 중의 하나인 superoxide radical 소거 활성에서도 에틸아세테이트 분획물과 메탄올 추출물 및 quercitrin이 각각 IC_{50}값 0.02 ㎍/mL, 1.6, ㎍/mL와 0.1 ng/mL로 좋은 소거 활성을 보였다.

5) 차풀 추출물의 항노화 효능 확인을 위한 elastase 효소 억제 효과에서 에틸아세테이트 분획물과 luteolin이 각각 IC_{50}값 12.2 ㎍/mL, 18.1 ㎍/mL로 대조군에 비해 우수한 효능을 보였다. 그리고 MMP-1 합성 억제 효과는 100 ㎍/mL의 시료 농도에서 에틸아세테이트 분획이 61.1%의 좋은 억제 효과를 나타내었고, luteolin인 경우 10 ㎍/mL 농도에서 MMP-1 생성을 49% 감소시키고 MMP-1 효소 활성은 대조군에 비하여 39.7% 억제시키었다. MMP-1 생성 억제 효과가 MMP-1 mRNA 발현 억제를 통한 결과인지 RT-PCR을 통해 확인한 결과 UVB 조사에 의하여 조사 전에 비하여 MMP-1 mRNA level을 증가 시키었고, luteolin은 MMP-1 발현을 감소시키었다. 차풀에서 분리한 luteolin의 DPPH radical 소거 활성은 IC_{50}값이 4.7 ㎍/mL로 우수하였다.

이러한 결과들은 본 연구에 사용된 식물들의 용매 분획물들과 분리한 단일물질들이 미백, 주름개선, 항염증 그리고 항산화와 같은 생리활성의 효과를 가지고 있음을 보여주었다. 깨끗하고 친환경적인 이미지를 가지는 제주도 재생식물들로부터 발굴된 이와 같은 기능성 물질 및 추출물들은 대부분의 원료를 수입에 의존하는 우리나라의 화장품 산업의 현실에서 청정 이미지를 강조할 수 있는 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 제시해준다.

Ⅵ. 참 고 문 헌

1. 하병조, 기능성화장품, 신광출판사, 2007.

2. 국내화장품 시장 동향, 한국보건산업진흥원, 바이오랜드, 2006, pp4-5.

3. 연도별 기능성 화장품 심사현황, 식품의약품안전청, 2006.

4. V. J. Hearing and T. M. Ekel, Mammalian tyrosinase, *Biochem. J.*, 1976,*157*, 549.

5. Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama., "Induction of melanogenesis suppression : cellular pharmacology and mode of differential action", *Pigment Cell Res.*, 1998, *1*, 367.

6 H. Matubara, "Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells", *Nateral Product Sciences*, 1998, *4*, 3.

7. Jimbow K, Fitzpatrick TB, Wick MM., Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. In : Goldsmith LA, eds. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, 2nd ed. New York : Oxford university press, 1991, 895-898.

8. 김진환, 박재경, 허층림, 이무형, "UVB 반복조사가 배양 인체 멜라닌세포의 형태학적 변화와 증식 및 멜라닌화에 미치는 영향", *대한피부과학회지,* 1994, *32*(6):1035-1045.

9. Virador V M, Muller J, Wu X et al., "Influence of α-melanocyte- stimulating hormone and of ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes", *FASEB J,* 2002, *16*: 105-107.

10. Seiberg M, Paine C, Sharlow E et al., "Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening", *J Invest Dermatol,* 2000, *115*: 162-167.

11. Paine C, Sharlow E, Liebel F, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M., "An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway", *J Invest Dermatol,* 2001,*116*: 578-595.

12. Sturm R A, Box N F, Ramsay M., "Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep", *Bioessays,* 1998, *20*: 712-721.
13. Hara M, Yaar M, Gilchrest B A., "Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity", *J Invest Dermatol*, 1995, *105*: 744-748.
14. Cerdan D, Redziniak G, Bourgeois C A, M onsigny M, Kieda C., "C32 human melanoma endogenous lectins: characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes", *Exp Cell Res.*, 1992, *203*: 164-173.
15. Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. "The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanism of mitogenesis and melanogenesis", *Pigment Cell Res.* 1997, *10*:218-28.
16. Yada Y, Higuchi K and Imokawa, G., "Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes", *J Biol Chem.,* 1991, *266*: 18352-7, .
17. Teraki E, Tajima S, Manaka I, Kawashima M, Miyagishi M and Imokawa G. "Role of endothelin-1 in hyperpigmentation in seborrheic keratosis", *Br J Dermatol,* 1996, *135*: 918-23.
18. Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J and Babcock G et al. "Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of humam melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation", *Cell Growth Differ,* 1998, *9*: 575-84.
19. Brilliant MH, Barsh GS, Anatomy of pigment cell genes acting at a cellular level. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentation System. Oxford University Press, 1998, 217-229.
20. Barsh GS., "Genetics of pigmentation: From fancy genes to complex traits", *Tredns Genet,* 1996, *12*:299-305.
21. Christine Rome´ro-Graillet, Edith Aberdam, Monique Cle´ment, et al. "Nitric Oxide Produced by Ultraviolet-irradiated Keratinocytes Stimulates Melanogenesis", *J Clin. Invest.* "1997" *99*(4): 635-642.

22. Joshi, M., J. Strandhoy, and W. L. White., "Nitric oxide synthase activity is up-regulated in melanoma cell lines: a potential mechanism for metastases formation", *Melanoma Res.* 1996, *6*: 121-126.

23. Kadons S. Manaka I. Kawashima M, Kobayashi T and Imokawa G.," The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpimentation mechamism of lentigo senilis", *J Invest Dermatol,* 2001, *116*:571-7.

24. Kang HY, Kang WH and Lee C., "Endothelin-B receptor-mediated Ca^{2+} signaling in humam melanocytes", *Pflugers Arch,* 1998 *435*: 350-6.

25. Siegrist W, Willard DH, Wilkison WO, Eberle AN, "Agouti protein inhibits growth of B16 melanoma cells in vitro by acting through melanocortin receptors", *Biochem Biochem Biophys Res Commun* 1996, *218*:171-175.

26. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux ML, "Hearing VJ, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin", *J Invest Dermatol,* 1997, *108*:838-842.

27. Pears JS, Jung RT, Bartlett W, Browning MC, Kenicer K, Thody AJ. "A case of skin hyperpigmentation due to α-MSH hypersecretion", *Br J Dermatol,* 1992, *126*:286-289.

28. Lerner AB, McGuire JS., "Effect of α and β melanocyte stimulating hormone on the skin colour of the man", *Nature.* 1961, *189*:176-179.

29. Levine N, Sheftel SN, Eytan T, Dorr RT, Hadley ME, Weinrach JC, Ertl GA, Toth K, McGee DL, Hruby VJ. "Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin", *J Am Med Assoc,* 1991, *226*:2730-2736.

30. Abdel-Malek Z, Swope V, Suzuki I, Akcali C, Harrige M, Boyce S, Urabe K, Hearing VJ. "Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides", *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, *92*:1789-1793.

31. Bertolotto C, Busca` R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne J-P, Ballotti

R., “Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: Pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia”, *Mol Cell Biol,* 1998, *18*:694-702.

32. Thody AJ, Graham A., “Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?” *Pigment Cell Res,* 1998, *11*:265-74.
33. G. Imokawa. “Autocrine and Paracrine Regulation of Melanocytes in Human Skin and in Pigmentary Disorders”, *Pigment Cell Res*., 2003, *17*:96-110.
34. R. Busca`, R. Ballotti “Cyclic AMP A Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation”, *Pigment Cell Res*., 2000, *13*:60-69.
35. Hunt G, Donatien PD, Lunec J, Todd C, Kyne S, Thody AJ. “Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH”, *Pigment Cell Res.,* 1994, *7*:217-221.
36. Wakamatsu K, Graham A, Cook D, Thody A., “Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of themelanocortin-1 receptor”, *Pigment Cell Res*., 1997, *10*: 288-297.
37. Sungbin Im, Moro O, Peng F, Medrano EE, Cnelius J, Babcokc G, Nordlund JJ, Abdel Malek ZA, “Activation of the cyclic AMP pathway by α-melanotropin mediated the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation”, *Cancer RES*., 1998, *58*:47-54.
38. Romero-Grailler C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Bailotti R. “Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis”, *J Clin Invest*., 1997, *99*:635-42.
39. Roser Busca and Robert Ballotti, “Cycle AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pimentation”, *Pigment Cell Res*., 2000, *13*:60-69.
40. H. Matubara, “Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthecic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells”, *Natural Product Sciences*, 1998, *4*, 3.
41. Maeda K., “Recent studies of melanogenesis and its control”, *Fragrance Journal*, 1997, 25(9), 10-18.

42. 박수남, 천연물의 피부 세포에 미치는 영향, *대한화장품학회지*, 1999, *25*(2).

43. Egawa, M., Sakamoto, T., Kumano, Y., "Whitening effect of vitamin C and its derivatives", *Fragrance Journal,* 1997, *25*(9):37-42.

44. Funasaka, Y., Ichihashi, M., Inoue, K., "Inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate on melanogenesis", *Fragrance Journal*, 1997, *25* (9), 19-27.

45. Tachibana, S., Tanaka, Y., "Inhibitory effect of ellagic acid on melanocenesis", *Fragrance Journal*, 1997, *25*(9), 37-42.

46. Sinomiya, T., Hikima, T., Sakamaki, T., "Application of alpha-hydroxy acid for lightening and whitening cosmetics", *Fragrance Journal*, 1997, *25*(9), 49-55.

47. 박수남, 피부노화와 항산화제, *대한화장품학회지*, 1997, *23*(1).

48. Koide, C., Senoo, M, Hoshino, I., "Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid-glabridin (oil soluble licorice estract) composite", *Fragrance Journal*, 1997, *25*(9), 43-48.

49. Nathan, C. "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells", *FASEB J.*, 1992, *6*:3051.

50. Bredt, D. S., and S. H. Snyder. "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule", *Annu. Rev. Riochem.*, 1994, *63*:175-195.

51. Nathan, C., and G. W. Xie. "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls", *Cell,* 1994, *78*:915-916.

52. Knowles, R. G. and Mocada, S. "Nitric oxide as a signal in blood vessels", *TIBS.*, 1992, *17*: 399.

52. Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y., and Ryu. J. H., "Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cell", *Yakhak Hoeji.*, 1998, *42*:5.

53. Kuo, P. C. and Schroeder, R. A. "The cmerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg", 1995, *221*(3):220-235.

54. Stuehr, H. H. J., Kwon, N. S., Weise, M., and Nathan, C., "Purification of the

cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein", *Rroc. Natl. Sci. USA,* 1991, *88*:7771.

55. Weisz, A., C Icatiello, I., and Esumi, H., "Regulation of the mouse inducible type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L- arginine", *Biochem. J.,* 1996, *316*: 209.
56. 한영숙, 항염증성 천연추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 아주대학교, 박사학위논문, 2002.
57. Tomita Y, Maeda K, Tagami H. "Mechnisms for hyperpigmentation in postinflammatory pigmentation, urticaira pigmentosa and sun burm", *Dermatological,* 1989, *1*:49-53.
58. Tomita Y, Maeda K, Tagami H. "Melanocyte-stimulating proprtties of aracidonic acid metabolites: possible role in post- inflammatory pigmentation", *Pigment Cell Res.*, 1992, *5*(5 Pt2):357-61.
59. Morelli JG, Youn JJ, et al., "Leukotriens C4 and C4 as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes", *J Invest Dermatol*., 1989, *3*: 719-22.
60. Takiwaki H, Shirai S, Kohno H, Soh H. "The degrees of UVB-induced erythma and pigmentation correlate linearly and are reduced in a parallel manner by topical anti-inflammatory agents", *J Invest Dermatol*, 1994, *103*:642-6.
61. Seiji Kondo, "The roles of cytokines in photoaging, *J Dermatological Science*", 2000, *23*, S30-36.
62. Na Lin, Chunfang Liu, Cheng Xiao, Hongwei Jia et al., "Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice", *Biochemical pharmacology.,* 2007, *73*:136-146.
63. Laure Rittie´, Gary J. Fisher, "UV-light-induced signal cacades and skin aging", *Ageing Research Review*, 2002, *1*:705-720.
64. Woessner Jr JF. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective

tissue remodelling", *FASEB J.*, 1991, *5*:2145-54.

65. Cawston TE. "Protein inhibitors of metalloproteinases. In: Barrett AJ, Salvesen G, editors. Proteinase inhibitors", Amsterdam: Elsevier Science Publishers., 1986, p.589-610.

66. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, et al. "Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimlated T lymphocytes: involvement of membrane- associated cytokines", *Arthritis Rheum.*, 1998, *41*: 1748-59.

67. Meinhard Wlaschek, Iliana Tantcheva-Poo ′ r, Lale Naderi, et al., "Solar UV irradiation and dermal photoaging", *J Photochemistry and Photobiology B: Biology,* 2001, *63*:41-51.

68 Jonas Nordberg and Ellas. S. J. Arne ` r, "Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and The Mammallan Thioredoxin System", *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, *31*(11):1287-1312.

69. Stich, H. F. "The beneficial an hazardous effects of simple phenolic compounds", *Mutat. Res.,* 1991, *259*:307-324.

70 Hudson, B. J. F., Food antioxidants ; Elsevier science., New York, 1990, pp.102-135.

71. Cook, N. C., Samman, S. "Flavonoids-chemistry, metabolism, cardio-protective effects, and dietary sources", *Nutr. Biochem.*, 1996, *7*: 66-76.

72. Y. Kawaguchi, et al. "The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type Ⅳ collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts", *Arch. Dermatol. Res.*, 1996, *288*, 39.

73. G. Rhie et al. "Aging and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vitro*", *J. Invest. Dermatol.*, 2001, *117*, 1212.

74. Imokawa, G. "The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle

formation; implication through selective inhibition of elastase activity", *Photochem. acd Phptobiol.*, 2001, *74*:283-287.

75. A. Oikarinen, "The aging of skin: chronoaging versus photoaging", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*, 1990, *7*, 3.
76. B. A. Gilchrest, "Skin aging and photoaging: an overview", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1989, *21*, 610.
77. A. M. Klingman and R. M. Laver, "Cutaneous aging: the differences between intrinsic aging and photoaging", *J. Cutan. Aging. Cosmet. Dermatol.*, 1988, *1*, 5.
78. S. K. Karin, B. Peter, W. Jutta, H. Gernot, et al, "Photoaging of the skin from phenotype to mechanims", *Experimen, Gerontool*, 2000, *35*, 307.
79. J. Y. Seo, H. R. Choi, et al, "The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen a 1(Ⅰ), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast", *Kor. J. Inves. Dermatol.*, 2001, *8*, 23.
80. 생리활성 정밀화학 기술개발 로드맵, 산업자원부, 서울, 2002, 229-322,
81. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR, "Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological", *Fluids Anal Biochem.*, 1982, *126*:131-136.
82. Marcocci L, Maguire JJ, et al, "The nitric oxide scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761", *Biochem Biophys Res Commun*,, 1994, *201*: 748-755.
83. Noro T, Miyase T. et al, "Inhibitories of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Dafne genkwa*", *Chemical Pharmaceutical bulletin*, 1983, *31*:3984-3987.
84. Cheng JZ, Kuo SC, Chan SC, et al, "Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*", *Biochem Biophys Acta.*, 1998, *1392*: 291-299.
85. 이진영, 도화를 활용한 주름개선, "미백 활성물질 분리 및 기능성 화장품 응용에 관한 연구" 대구한의대, 박사학위논문, 2007, p.88.
86. 손미예, 김성희, 남상해, 박석규, 성낙주, "국내산 녹차 및 후발효차 추출물의 항

산화 효과", *Journal Of Life Science*., 2004, *14*(6): 920-924.

87. Zhang, Hongjie.; Sun, Handong. "Diterpenoids from Rabdosia flexicaulis, Phytochemistry", 1961, *28*:3543-3546.

88. Takeda, Yoshio.; Ichhara, Teruyoshi.; Takaishi, Yoshihisa.; Fujita, Tetsuro. "Structural Elucidation of New Diterpernoids isolated from *Rabdosia umbrosa* var. *leucantha* f. *Kameba*", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1987, *11*, pp 1972-1999.

89. Sun, Han-dong.; Sun Xi-chang.; Lin, Zhon-wen.; Xu Yan-long.; Minami, Yoshinori.; Marunaka, Teruyoshi.; Fujita, Tetsuro. "Excisanin A and B, New Diterpenoids from *Rabdosia Excisa*", *Chemistry Letters*, 1981, 753-756.

90. a) 김대경, 부희정, 이선주, 정덕상, "제주산 조록나무를 이용한 생리활성 검색", 대한화학회 제 98회 총회 및 학술대회, 2006, II 29p 412포.

b) Yanjun Zhang., David L. DeWitt., Sorimuthu Murugesan., "Novel Lpid-Peroxidation and Cyclooxygenase Inhibitory Tannins from Picrorhiza kurroa Seeds", *Chemistry & Biodiversity*, 2004, *1*:426- 441.

91. Markham, K. R.; Ternai, B. "^{13}C NMR of flavonoids-II : Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones", *Tetrahedron*, 1976, 32, 2607-2612.

92. Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R. Geiger, H.; Marbry, T. J. "Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III : Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives", *Tetrahedron*, 1978, 34, 1389-1397.

93. Wagner, H.; Chari, V. M.; Sonenbichler, J. "^{13}C-NMR-spektren natürlich vorkommender flavonoide", *Tetrahedron Letters*, 1976, *17*, 1799-1802.

94. Celia Jime´nez-Cervantes, Mari´a Marti´nez-Esparza, et al, "Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation makers and possible involvement of microphthalmia transcription factor", *Journal of Cell Scienc*e, 2001, *114*(12):2335-2344.

95. Tomohisa Hirobe. "Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes",

Pigment Cell Res., 2004, *18*:2-12.

96. K. A. Giehl, et al., "Protein expression of melanocyte growth factors(bFGF, SCF)and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma", *Journal of Cutaneous Pathology*, 2007, *34*:7-14.
97. Reiko Kitamura, Katsuhiko Tsukamoto, et al, "Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M.", *J Pathol.*, 2004, *202*: 463-475.
98. Akira Hachiya, Akemi Kobayashi, "The Paracrin Role of Stem Cell Factor/c-kit Signaling in the Activition of Human Melanocytes in Ultraviolet-B-Induced Pigmentation", *The Journal of Investigative Dermatology.*, 2001, *116*(4):578-589.
99. Han-Dong Sun, Sheng-Xiong Huang and Quan-Bin Han. "Diterpenoids from Isodon species and their biological activities", *Natural Product Reports,* 2006, *23*:673-698.
100. Lee, Jeong-Hyung: Koo, Tae Hyeon et al., "Kaurane diterpene, kamebakaurin inhibits NF-κB by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-κB target genes", *J of Biological Chemistry*, 2002, *277*(21): 18411-18420.

감사의 글

화학과 대학원 생활을 시작하면서 많은 두려움과 긴장으로 걱정해왔던 시간이 주마등처럼 머릿속을 스쳐 지나갑니다. 화장품에 대한 공부를 하고 싶다는 생각만으로 무턱대고 시작한 시간들을 뒤돌아보며 최선을 다했었는지 아쉬움과 후회가 남지만 부족하나마 박사논문을 마무리하면서 기쁨의 맘이 함께 교차합니다. 마무리와 새로운 시작의 자리에서 이 논문을 완성하는데 많은 도움을 주신 모든 분들께 지면으로나마 감사의 마음을 전하고자 합니다.

우선 많이 부족하고 말썽 많은 저를 받아주시고 지금까지 자상한 지도를 해주신 이선주 교수님께 감사드립니다. 그리고 이 논문을 쓰기까지 많은 식물들을 제공해주시고 동정해주셨으며 항상 관심을 써주신 정덕상 교수님, 분리한 화합물의 구조를 분석해주시고 동정해주셨으며, 논문의 부족한 부분을 지적해주신 이남호 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한 항상 많은 격려와 관심으로 이끌어주신 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 김원형 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 그리고 부족한 저를 화학과에서의 공부를 결심하게 해주시고 언제나 관심과 힘을 북돋아주신 김봉애 교수님을 비롯해 가정과 모든 교수님들께도 감사의 마음을 전합니다.

생화학 실험실에서 큰딸, 작은딸로 학부생이면서도 열심히 실험을 도와준 주희, 수복이 그리고 지금 열심히 공부하고 있을 승우와 실험실 모든 식구들 너무 감사합니다. 분리에 대한 지식이 부족한 저에게 많은 도움과 자신감을 심어주고 논문 마무리 작업까지 물심양면 도움을 주신 종석오빠 너무 감사드리며, 처음 화학과 들어와서 많이 헤맬 때 도움을 주고 격려해준 충훈오빠, 상범오빠 고맙습니다. 박사 입학 동기생으로 이것저것 많은 도움을 준 태헌이, 바쁜 중에도 분리를 도와준 종헌이, 마지막 데이터 얻는데 도움을 준 미남 동생 민철이와 마음이 따뜻한 원종이, 언니 같이 항상 침착하고 자상한 혜자에게 너무너무 고맙다는 말을 전합니다.

마지막으로 부족한 저를 끝까지 믿어주신 부모님, 항상 힘들고 주저앉고 싶을 때마다 저에게 힘을 주시고 다시 설 수 있게 해주셨습니다. 정말 사랑합니다. 늘 건강하세요. 그리고 이것저것 챙겨준 가족들, 항상 믿어주고 격려해준 친구 현미와 종철이 에게도 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 지면에는 미쳐 다 쓰지 못했지만 끝까지 저를 격려해주시고 관심을 가져주신 많은 모든 분들께 감사의 마음을 전하면서 앞으로 더 열심히 생활하는 모습을 보여드리도록 노력하겠습니다. 감사합니다.