

제주산 조록나무(*Distylium race mosum*) 추출물의 Tyrosinase 억제 활성 및 멜라닌 생성억제 효과

김대경 · 부희정 · 이선주 · 정덕상

제주대학교 자연과학대학 화학과

요 약

제주에서 자생하는 조록나무의 조추출물로부터 미백효과, 멜라닌 생성억제 효과를 검색해보았다. 이중 멜라닌 생성억제 효과에서 좋은 활성결과를 확인할 수 있어, 용매분획을 실시하였고, 그중 에틸아세테이트층과 부탄올 층에서 좋은 활성 결과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 좀더 세부적인 분리를 실시하여 활성을 나타내는 물질에 대하여 검색 해 보았다.

주요어 : *Distylium racemosum*. Tyrosinase, melanase

I. 서 론

오늘날 화장품시장은 종전의 스킨로션이나 크림같이 일반적인 기능을 하기보다 더 진보된 기능을 가진 화장품이 일반화 되어있다. 이러한 기능들을 살펴보면 피부의 미백(whitening), 주름개선, 자외선 차단 등이 있는데 이러한 기능성을 함유하고 있는 화장품을 기능성화장품이라 한다. 이러한 효과를 보다 인간의 피부에 적합하고 부작용이 없게 하기위해 합성에 의한 화장품원료를 생산하기보다, 피부의 거부반응을 일으키지 않고 앞서 말한 기능성을 부여하기 위해 천연자원에서 추출한 유용 생리활성 물질에 대하여 많이 연구되고 있다.^{1,2)}

산업의 발달로 인한 환경오염으로 인해

오존층의 파괴가 일어나고 이로 인한 자외선 양의 증가로 피부에 화상, 발진, 기미, 색소침착 피부노화 심지어는 이러한 증상들로 인해 암까지 유발하는 원인이 되고 있다.^{3,4)}

기미와 주근깨 같은 과색소 침착은 표피 내의 멜라닌 생성 및 분포가 증가되면서 나타나는 질환이다. 멜라닌은 멜라닌생성세포(melanocyte) 내의 독특한 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 만들어지며, melanosome에는 멜라닌 생합성효소로 있는 tyrosinase 효소에 의해 도파와 도파퀴논으로 전환되고 이후 tyrosinase 관련 단백질인 TRP-1(5,6-dihydroxy-1-indole-2-carboxylic acid oxidase)과 TRP-2(dopachrome tautomerase)의 작용과 자동산화과정을 통해 멜라닌이 형성된다. 생성된 멜라닌은 표피를 구성하고

있는 각질세포로 전이되어 피부색이 표현되므로 melanocyte는 표피세포 kerationcyte와 밀접한 세포간 정보망을 구성하고 있다.⁵⁾

최근 천연물을 이용한 신물질 탐색 연구가 진행되면서부터 천연물이 함유한 여러 유용물질에 대하여 다방면으로 적용하려는 연구 또한 증대되고 있다. 이러한 연구결과로 얻어진 천연물로부터 얻어진 생리활성 물질들은 극히 미량으로 존재하는 고가의 것으로써 우리의 실생활에 적지 않게 이용되고 있는 추세이다. 본 연구는 이러한 천연물을 이용하여 기능성 화장품에 적용할 수 있는 물질 탐색에 주력하고자 하는데 목적이 있다.

본 연구에 사용된 조록나무(*Distylium racemosum* Sieb. et Zucc.)는 조록나무과(*Hamamelidaceae*)의 상록교목으로 주로 가구나 건축재 조각 등에 사용되어져 왔다. 성분으로서는 조록나무 잎에 충영(蟲癭)을 가진 잎들은 tannin성분이 함유되어 있다고 알려져 있으나 현재까지 자세한 성분연구의 보고는 없다.

본 연구는 제주 자생식물 중 하나인 조록나무로부터 기능성화장품에 적합한 유효성분물질을 찾기 위하여 조록나무에서 tyrosinase 활성 억제 실험과 melan-a cell을 이용하여 최종 멜라닌 생성물 억제 효과 및 Viability 측정실험을 하여 그 효과를 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에 사용된 조록나무는 2006년 4월

제주시 영평동 계곡에서 채집한 것을 음건 세절한 것을 사용하였다.

그리고 시료 추출로 사용된 용매들은 Merk Co., DAE JUNG Chemical & Metrials Co., LTD 사의 제품을 사용하였다. EtOAc 층을 분리하기 위해 사용되었던 column 충전제로는 Amersham Bioscience AB 사의 Sepadex™ LH20을 사용하였다.

미백 활성 측정 시 사용한 L-tyrosine은 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였고, 대조군으로 사용된 알부틴 역시 동일회사에서 구입한 것을 사용하였다.

멜라닌 생성억제 측정 시 사용된 Trypsin-EDTA는 GIBCO Co.에서 구입하여 사용하였고, 대조군으로 사용된 알부틴은 Sigma-Aldrich사에서 구입한 것을 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 유효성분의 분리

음건 세절한 조록나무 잎 580 g에 80% MeOH 20 L를 가하여 실온에서 3개월 동안 침출하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 얻은 메탄올 추출물 42.622 g을 7g씩 증류수 1 L에 현탁하고, 분액깔대기를 사용하여 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH을 순차적으로 사용하여 용매분획을 하여 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH층 및 H₂O층을 얻었다. 이중 활성이 좋았던 EtOAc층을 column에 cellite를 충전시킨 후 Hexane을 전개액으로 하여 통과 용출시킨 후 얻어진 EtOAc층(3.905 g)을 가지고 Normal-phase column chromatography (3.5×20, Sephadex-LH 20)를 chloroform/EtOAc (3/8)의 전개용매로 전개시켜 11개의 세부 분획층을 얻었다.

3. 미백효과

Tyrosinase 저해활성은 dophachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다. sample 25 μ l을 취하여 pH 6.8로 맞춰준 0.1 M Phosphate buffer 420 μ l과 효소인 tyrosinase 20 μ l (75~100 unit/mL)를 넣고 기질인 0.6mM L-tyrosine 30 μ l을 섞은 액에 넣어 37 $^{\circ}$ C 10분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 값을 같은 방법으로 실험을 진행 시킨 대조군인 알부틴의 측정값과 비교하였다.

4. 멜라닌 생성 억제효과

조록나무 추출물의 멜라닌 생성 억제 정도를 melan-a cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성억제 정도를 측정하였다.

mellan-a cell (1.0×10^5 Cells/well)에 전 배양하고 24시간 후 3일간 매일 시험 시료가 들어있는 새 배지로 교환하여 37 $^{\circ}$ C 10%에서 배양 시킨다. 마지막으로 PBS로 washing 후 1N NaOH를 첨가해 세포를 완전히 녹인 후 450 nm에서 흡광도를 측정 하였다.²⁾

5. 세포의 viability 측정(MTT assay)

melan-a cell을 24 well plate (1×10^5 Cells/well)에 전 배양하고 24시간 후 3일간 매일 시험 시료가 들어있는 새 배지로 교환하여 37 $^{\circ}$ C 10%에서 배양시킨다. 5일째 되는 날 배양된 세포에 MTT (50 mg/mL) 처리하여 세포의 viability를 측정한다.²⁾

III. 결과 및 고찰

1. Tyrosinase inhibitory activity

시료의 미백효과를 검증하기 위하여 우선 용매분획층인 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH, H₂O를 우선적으로 검색하였고 그 중 EtOAc 층이 다른 분획층보다 월등히 활성 억제정도가 뛰어나고 그 값은 대조군인 알부틴과 비슷할 정도로 억제정도를 보여주었다. 이러한 결과로 EtOAc층을 세부 분리하였고 그 결과 얻어진 분획층 11개에 대해서도 같은 실험을 진행한 결과 Fr.9, 10, 11이 가장 좋은 억제율(90% 이상)을 보였으며 Fr. 1, 2, 3을 제외한 나머지 분획층에서 전반적으로 대조군보다 월등한 억제 정도를 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

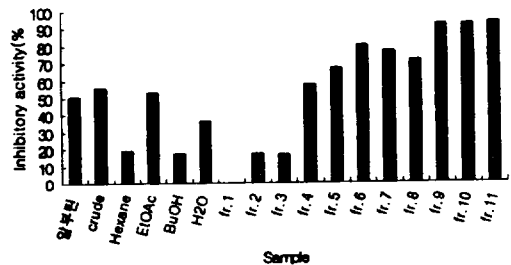


Fig. 1 Tyrosinase inhibitory activities of several extracts of *Distylium racemosum*

2. Melanin 생성억제 효과

Melan-a cell에 조록나무의 추출물과 분획층을 처리하고 세포 생성 억제 효과를 측정 한 결과 tyrosinase inhibitory activity에서 가장 좋았던 EtOAc층에서 가장 억제정도가 좋았고 에틸아세테이트층의 세부 분획층 1,

2, 3에 대해서도 검색해본 결과 EtOAc층보다 억제 정도가 많이 떨어졌지만 각각 10%, 20%, 45% 정도의 억제율을 보여주고 있었다(Fig. 2)

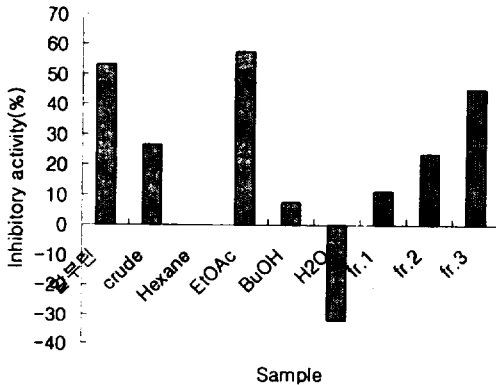


Fig. 2 Inhibitory activity of melanin synthesis of several fraction of *Distylium racemosum* on melan-a cell

또한 MTT assay에서 볼 때 실험결과치가 가장 좋았던 EtOAc층의 cell 생존률이 60% 정도로 대조군인 알부틴에서 보다 더 좋은 결과를 나타내었다(Fig. 3).

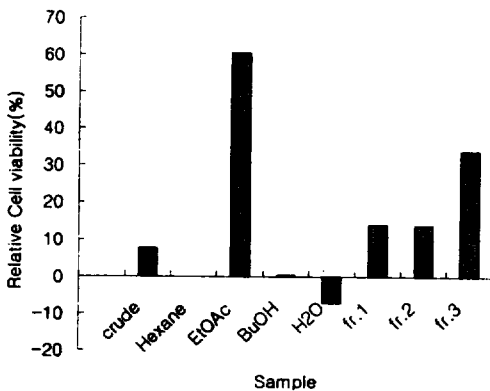


Fig. 3 Cell viability using melan-a cell of several fractions of *Distylium racemosum*

IV. 결 론

제주산 조록나무를 추출한 추출물과 용매 분획층에 대하여 tyrosinase inhibitory activity와 멜라닌 증식 억제효과를 측정해 보았다. 먼저 tyrosinase 활성 억제 정도에 대하여 검색해 본 결과 EtOAc층에서 월등히 다른 분획층에 비해 뛰어났고, 대조군인 알부틴과의 비교에서도 조금 더 우수한 억제율을 보여주었다. 이 EtOAc층을 분리하여 나온 11개의 분획에 대하여 활성을 측정한 결과 fr.1, 2, 3을 제외한 나머지 분획에서 좋은 결과를 보여주었고 대조군인 알부틴과 비슷하거나 더 뛰어난 결과를 나타내었다.

멜라닌 생성 억제 효과에서 볼 때 역시 조록나무의 분획물중 EtOAc층이 가장 억제 정도가 좋았음을 알 수 있었고 MTT assay에서 확인한 결과 생존률도 60%에 이르러 다른 분획과 비교하여 보았을 때 월등한 효과를 보여줌을 확인할 수 있었다. 즉, EtOAc층을 분리하여 나온 11개의 분획 중 8개의 분획은 미백에 대한 활성정도가 좋고, 그에 따른 세포독성 측정결과에서도 독성이 적어 피부트러블을 최소화할 수 있는 가능성이 있다고 판단되어 지며, 이에 따른 결과로 기능성 화장품으로서 조성물로 이용이 가능하다고 보여 진다.

그러므로 향후 이 분획물질들을 가지고 분리 정제과정을 수행하여 활성물질을 분리·정제 하여 미백효과를 검증하는 작업이 진행되어야 할 것이다.

그 외에 조록나무를 이용한 다른 생리활성을 확인하는 작업도 동시에 필요할 것으로 보여 진다.

참 고 문 헌

1. Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama, Inducation of melanogenesis su-ppression : cellular pharmacology and mode of differential action, *Pidment Cell Res.*, 1, 367 (1988)
2. H. Matubara, Inhibitory effect of liche n metabolites and their synthetic analogues on melanin bio-synthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells, *Natural product Sciences.*, 4, 3(1998)
3. B. A. Gilchest, S. Zhai, M. S. Eller, D. B. Yarosh, and R. M. Yaa, Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enxyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation, *J. Invest. Dermatol.*, 101, 666 (1993)
4. V. J. Hearing, Mammalian monophemol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reaction catalyzed, *Methods in Enzymology*, 142, 154 (1987)
5. H. J. Bu, K. Z. Riu, and S. J. Lee, Anti-melanogenesis Effect of *Canavalia lineata* Extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.*, vol.30(4) 485-489 (2004)
6. N. H. Lee, S. J. Lee, D. S. Jung, H. J. Bu, H. C. Yang, K. Z. Riu , Screening of the Tyrosinase Inhibition and Hyaluronidase Inhibition Activities, and Radical Scevenging Effects Using Plants in CheJu, *Kor. J. Phamacogn.*, 32(3): 175~180 (2001)