

알부틴과 유용성감초 추출물 혼합물에 의한 미백활성 연구

장혜인[†]

세명대학교 화장품뷰티생명공학부
(2019년 6월 9일 접수: 2019년 6월 27일 수정: 2019년 6월 28일 채택)

Study for Whitening Activity of Mixture of Arbutin and Oil Soluble Licorice Extract

Hye In Jang[†]

*Department. of Oriental Medical and Herbal Cosmetic Sciences, Semyung University
65, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea 27136
(Received June 9, 2019; Revised June 27, 2019; Accepted June 28, 2019)*

요 약 : 본 연구의 목적은 arbutine과 유용성감초추출물 혼합물의 미백 효과를 조사하는 것이다. B16 melanoma 세포에서 알부틴 및 유용성 감초 추출물의 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성 억제 효과를 시험관내에서 평가하여 미백 효과를 측정 하였다. B16 흑색 종 세포를 이용한 MTT 분석은 혼합물 (알부틴과 유용성감초추출물)이 세포독성이 없음을 확인하였다. 유용성 감초 추출물과 알부틴은 모두 mushroom tyrosinase 활성이 농도 의존적 효과를 보였다. 혼합물은 다양한 농도 (유용성감초추출물 : 알부틴 = 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2, 1 : 2.5, 1 : 5)에서 B16 melanoma 세포에서 40-51 %의 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하였다. 또한, 시험한 모든 혼합물은 B16 melanoma cell의 멜라닌 함량을 50 % 이상 감소시켰다. 이러한 결과는 알부틴과 유용성감초추출물 혼합사용 시 미백 활성에 효과적임을 시사하는 바이다.

주제어 : 알부틴, 유용성감초추출물, 혼합물, 미백 효과, 타이로시나제 억제

Abstract :The aim of this study was to investigate whitening effect of combination between arbutin and oil soluble licorice extract. Inhibitory effects of arbutin and oil soluble licorice extract against tyrosinase activity and melanogenesis in B16 melanoma cells were assessed in vitro to determine whitening effect.

MTT assay with B16 melanoma cells showed that mixture (arbutin and oil soluble) was not each concentration. Both oil soluble licorice extract and arbutin induced dose-dependent inhibition of mushroom tyrosinase activity.

Various concentrations (oil soluble extract : arbutin = 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:5) of mixtures also significantly inhibited tyrosinase activity in B16 melanoma cells by 40-51%. In addition, the mixtures reduced the melanin contents of B16 melanoma cells by more than 50% at each concentration.

[†]Corresponding author
(E-mail: inijjang7@naver.com)

These results suggest that mixtures of arbutin and oil soluble licorice extract are very effective whitening ingredients.

Keywords : Abutin, Oil-soluble licorice Extract, Mixture, Whitening effect, Tyrosinase inhibitor

1. 서론

인간의 아름다워지고자 하는 욕망과 함께 지속적으로 발전해온 화장품은 2000년 7월부터 ‘화장품법’의 시행을 시작으로 2001년 10월 ‘기능성 화장품 등의 심사에 관한 규정’이 제정되면서 피부 보습, 피부 보호의 개념을 피부 개선 등의 효능, 효과를 중심으로 하는 기능성 화장품에 대한 관심이 점점 더 커지기 시작했다. 미백 화장품은 전통적으로 하얀 얼굴을 선호하는 한국인의 선호도와 동안 열풍 등으로 미백화장품에 대한 관심이 눈부시게 발전하고 있다. 미백화장품과 미백에 대한 관심 증가에 따라 미백원료에 대한 수요도 증가하고 있다. 수많은 원료 중 Table 1과 같이 안전성이 확보된 원료를 중심으로 식품의약품안전처 관할 하에 기능성 미백성분으로 고시하고 있다.

이중 미백제로 가장 많이 사용되는 알부틴은 비정상적인 색소축적에 의한 기미, 주근깨, 점 등의 생성을 억제하고 광노화에 의한 피부 병변들 중 과다 멜라닌 생성성을 저해시켜 준다. 알부틴은 멜라닌 생성속의 속도 결정 단계인 초기 반응에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성을 억제하는데 대표적인 물질이다. 특히 알부틴은 tyrosinase의 기질인

tyrosin과의 구조적인 유사성으로 효소에 대한 경쟁적인 저해제이다[1].

감초는 쌍떡잎 식물 장미목 콩과의 다년생 초본식물로, 한국을 비롯하여 중국과 일본 등지에서 한약 재료로 널리 이용되고 있는 약용식물이다 [2]. 자연 상태의 licorice는 여러 가지 flavonoid로 구성되는데 그 중 설탕의 50배 이상의 단맛을 내는 부분이 glycyrrhizin이다[3]. Glycyrrhizin외에도 hispaglabridin A, hispaglabridin B, glabridin, 4-O-methylglabridin, isoprenylchalcone derivative, isoliquiritigenin, formononetin 등이 있으며 이 중 가장 많은 양을 차지하는 것은 glabridin이다[4]. 또한 glabridin은 피부에 중요한 영향을 미치는 hydrophobic한 물질 중의 하나로 강력한 tyrosinase 활성 억제 작용과 melanin 생성 억제 작용을 가지고 있어 피부 미백에도 탁월한 효과를 가지고 있으며, tyrosinase의 50% 억제 수준에서는 하이드로퀴논의 약 16배 효능을 나타내고 있다[5].

Glabridin을 함유하는 유용성감초추출물은 미백을 목적으로 한 다양한 종류의 화장품에 범용되고 있다. 이 밖에 항균 및 항산화효과, 염증 억제[6], 노화방지 등에도 탁월한 효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다.

Table 1. Ingredients and content of whitening products

No	Ingredients	Content
1	Broussonetia Extracts	2%
2	Arbutin	2~5%
3	Oil Soluble Licorice	0.05%
4	Ethyl Ascobyl Ether	1~2%
5	Magnesium Ascorbyl Phosphate	3%
6	Ascorbyl Glucoside	2%
7	alpha-bisabolol	0.5%
8	Niacinamide	2~5%
9	Ascorbyl Tetra Isopalmitate	2%

자료 : 식품의약품안전처

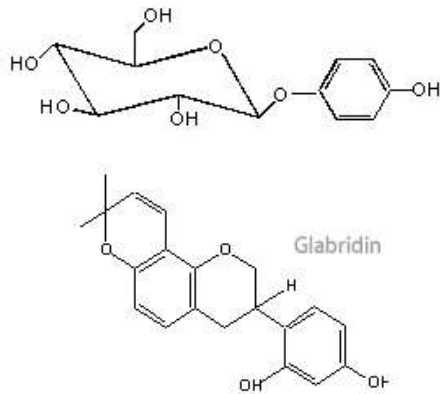


Fig. 1. Structures of Arbutin and Glabridin

식품의약품안전처고시에 의하면 유용성 감초 추출물은 glabridin을 35 - 40% w/v를 함유하며 이것이 지표물질이다.(Fig. 1) Glabridin은 배양세포와 모르모토의 피부를 통해 glabridin이 멜라닌의 생성과 염증의 발생을 억제하는 효과를 조사한 결과 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성 효소(tyrosinase)의 활성을 억제하는 사실이 드러났으며, DNA합성에 미치는 영향은 전혀 인식되지 않았다. 모르모토에 중파장 자외선(UVB)을 조사하여 유도되는 색소침착증과 홍반현상은 glabridin을 함유하는 제재를 국소적으로 발라준 경우 억제되는 결과를 보여준다[5].

멜라닌은 피부가 자외선에 노출되면 멜라노사이트의 tyrosin이 tyrosinase라고 하는 enzyme에 의해 산화되어 생성되는데 여기에는 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포내 조절인자, tyrosinase, dopachrom tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소와 구리, 아연, 철 등의 금속이온 및 인터페론(IFN), 프로스타그란딘(PG), Cyclooxygenase (COX)등과 같은 mediator가 관여 하는 것으로 알려져 있다[1,7-8].

최근 미백소재의 탐색을 위해 다양한 식물 추출물 및 새로운 합성 소재의 적용에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다. 비고시 소재를 개발하여 기능성화장품으로 출시하는 경우 새로운 차별화된 마케팅 포인트로 적용될 뿐 아니라 새로운 연구기전을 위한 다양한 방법 등의 시도로 인해 매우 큰 장점이 있다. 하지만 비고시소재의 개발에 있어서

생각보다 많은 시간과 비용이 투입된다는 커다란 제약조건이 있어 모든 회사들이 소재 개발을 하는데는 어려움이 따른다. 이윤희[9] 등의 연구에 의해 이미 고시 성분들의 혼합에 의해 미백의 효능이 상승될 수 있음을 확인하였지만 본 연구에서는 가장 보편적으로 사용되고 있는 알부틴과 유용성감초추출물을 혼합한 후 그 비율에 따라 효능, 효과가 변화되는 모습을 실험에 의한 결과를 제시하여 새로운 소재 개발에 소요되는 시간과 비용을 절약할 수 있는 연구 결과를 제공하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

2.1.1. 시료

Mushroom tyrosinase, L-Tyrosin (Sigma, USA), Dulbecco's modifide Eagle's medium (DMEM), antibiotic-antimycotic solution (100X), trypsin-EDTA (10X), fetal bovine serum (FBS) 및 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)는 WelGENE Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 96well plate (Nunc, USA), Pipet (Gilson, USA), white tip (Axygen Scientific, Inc, CA), yellow tip (Axygen Scientific, Inc, CA), blue tip(Axygen Scientific, Inc, CA), 1N NaOH (sigma) 및 3,4-dihydroxyphenylalanine (sigma) 에서 구입하였다. 알부틴은 Bioland (Korea), 유용성 감초 추출물은 Maruzen (Japan)에서 구입하였다.

2.1.2. 세포주

B16 mouse melanoma cell 은 한국세포주은행 (The Korean Cell Bank)에서 구입하여 사용하였다.

2.1.3. 기기

ELISA Reader system(power wave, Bio-tek INC, USA), CO₂ Incubator (UP50H, Forma scientific Co., USA), Clean bench (SH-120S., 한솔SM, KOREA), Inverted—microscope (TS-100F, Nikon, Japan), Water bath (BS-10. 제이오텍, KOREA)

2.2. 실험방법

2.2.1. 세포배양

B16 mouse melanoma 세포(이하 'B16 세포'로 표기)는 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/mL 페니실린(penicillin), 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 배양온도 37°C와 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

2.2.2. 세포 생존력 측정

세포의 생존율을 알아보기 위해서 세포독성 확인 실험[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay]을 실행하였다. Cell은 well당 5×10³개로 counting하여 96 well plate에 접종하고 24시간 배양하였고 이후 배지를 제거하고, 농도별로 처리된 배지로 교체하여 3일 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS로 세척하였다. 이렇게 준비된 cell에 2.0 mg/L MTT solution 50 μ l 씩 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 incubation 하고, MTT solution을 제거하고 D-PBS로 세척한 다음, 생성된 formazan crystal에 DMSO를 200 μ l 씩 넣어 15분간 용해시키고 ELISA reader를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다[10].

2.2.3. Mushroom tyrosinase 활성 억제 실험

Tyrosinase는 인체내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분이 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 시험은 시험관내에서 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 방법이다. 멜라닌 생성과정에서 tyrosinase는 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 걸쳐 DOPAquinone으로 산화되는 과정의 전체 반응 속도를 결정하는 핵심효소로 작용한다[11,12].

시료를 농도별로 96 well plate에 20 μ l 씩 분주한 다음 각 well에 1mM L-tyrosin을 20 μ l 씩을 분주한다. 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.8)을 150 μ l 씩 넣어주고 1600 unit/ml mushroom tyrosinase를 10 μ l 씩 넣고, 37°C에서 20분간 incubation한다. 450nm에서 Absorbance를 측정한다.

티로시나아제의 효소 활성의 측정은 L-tyrosine

과 L-DOPA에 의해서 이루어진다. L-tyrosine을 기질로 사용하여 dopachrome을 생성하는 촉매 반응 속도와 L-DOPA를 기질로 사용하여 dopachrome을 생성하는 촉매 반응 속도를 각각 구할 수 있다. DOPA chrome의 검출은 분광학적인 방법으로 측정이 가능하며 480 nm의 흡광도 변화를 측정함으로써 반응 속도를 측정할 수 있다. dopachrome의 몰흡광계수가 3600 M⁻¹cm⁻¹이므로 이 값을 대입하면 흡광도의 변화에 따른 tyrosine 및 dopa의 농도 변화를 정량적으로 가늠할 수 있다. 대부분의 티로시나아제는 L-DOPA를 기질로 활용하여 melanin을 생성하는 속도가 더 빠르다고 알려져 있다.[13] 기질인 L-tyrosine과 mushroom tyrosinase 그리고 시료를 함께 반응시킨 후 티로신으로부터 생성된 도파크롬의 optical density (이하 O.D)값을 측정한다. O.D값을 통해 시료가 mushroom tyrosinase의 활성을 억제하는지 판별한다. OD값은 mushroom tyrosinase의 활성이 높을수록 흡광도의 수치가 높게 나타나는 반면, mushroom tyrosinase의 활성을 억제하는 시료가 첨가될 경우, 흡광도 수치가 낮게 나타난다. 평가방법은 시료에 의해 tyrosinase activity inhibition 수치가 클수록 tyrosinase 억제제로서 효과적이라고 판별한다.

Tyrosinase activity inhibition (%) =

$$\left[1 - \frac{D - D_A}{C - C_A} \right] \times 100$$

D: 실험군 흡광도

D_A: 실험군 blank 흡광도

C: 대조군 흡광도

C_A: 대조군 blank 흡광도

2.2.4. B16 세포에서 tyrosinase 활성 억제 실험

멜라닌 생성과정 중 DOPA에서 DOPA quinone으로 전환될 때 참여하는 tyrosinase 활성 억제 정도를 cell lysate를 이용해 측정하는 방법으로 실험법은 다음과 같다. B16 세포를 배양용 60 mm dish (TPP, Switzerland)를 사용하여 각 well당 5×10⁴ 개 씩 분주한다. 16시간 배양 후 세포가 부착되면 각 시료를 농도별로 처리하여 3일 동안 배양한 후 3일 후 Phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 씻어 준 다음 cell scraper로 세포를 수확한 후 세포분쇄용액을 넣고 세포를 분쇄한 후 상층액만 모은다. 단백질 정량을

실시하여 동량의 단백질을 96well에 넣어준다. 1 mM L-DOPA가 든 반응액을 넣고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨다. (L-DOPA가 없는 반응액을 넣어준 샘플은 blank 값으로 L-DOPA반응 값에서 빼준다) 분광광도계로 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

Tyrosinase activity inhibition (%) =

$$\left[1 - \frac{D - D_A}{C - C_A} \right] \times 100$$

D: 실험군 흡광도

D_A: 실험군 blank 흡광도

C: 대조군 흡광도

C_A: 대조군 blank 흡광도

평가방법은 시료에 의해 tyrosinase활성이 감소할수록 피부 색소 억제제로서 효과적으로 작용한다고 판별한다.

2.2.5. B16 세포에서 melanin 생성 억제 효과 실험

B16 세포에서 배양 시 시료 처리에 의한 멜라닌 생성의 억제 정도를 측정하는 방법으로 실험 방법은 다음과 같다.

B16 세포를 배양용 60 mm dish를 사용하여 각 well당 5X10⁴ 개 씩 분주하였다. 16시간 배양 후 세포가 부착되면 각 시료를 농도별로 처리하고 3일 동안 배양한다. 3일 후 PBS로 두 번 씻어 준 후 cell scraper로 세포를 수확하여 5X10⁵ 씩 1.5 ml tube에 분주한 후 이를 원심분리하고 세포 침전물을 만든다. 침전물의 색깔을 육안으로 확인하고 이 침전물에 1 N NaOH 200 μl를 넣고 10분간 끓여 멜라닌을 유리시킨 후 이것을 96well에 옮겨 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

평가방법은 시료에 의해 멜라닌 양이 감소할수록 피부 색소 억제제로서 효과적으로 작용한다고 판별 한다.

2.3. 통계처리

모든 자료는 평균±표준편차의 형태로 표시하였고, 차이의 유의성은 student's t-test를 이용하여 검증하였다. 통계적 유의성은 p<.05 수준으로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존력 측정

세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포독성 확인 실험인 MTT assay를 수행하였다. 알부틴과 유용성감초추출물은 이미 고시 원료로 안전성이 입증된 원료이긴 하지만 혼합물의 경우 혼합비에 따라 어떠한 양상을 보이는지 확인하였다. 먼저 알부틴과 유용성감초추출물을 각각 0~1000 μl/ml 의 다양한 농도로 조제하여 B16 세포에 처리한 결과 control대비 알부틴은 1000 μl/ml에서 약간의 세포 독성이, 유용성감초추출물은 100 μl/ml의 농도에서 세포 독성을 보임을 알 수 있었다.(Fig. 2 (a) (b)) 이는 각 성분의 고시 농도와도 관계있는 것으로 사료되는 바이다.

혼합물은 유용성감초추출물의 세포독성으로 세포독성이 전혀 나타나지 않은 20 μl/ml을 고정시키고 알부틴을 20 μl/ml (1:1), 30 μl/ml (1:1.5), 40 μl/ml (1:2), 50 μl/ml (1:2.5), 100 μl/ml (1:5)의 비율로 증량하여 실험하였다. 모든 혼합물에서 세포 독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.(Fig. 2 (c))

3.2. Mushroom tyrosinase 활성 억제 실험 결과

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분이 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. Tyrosine을 DOPA로 전환하는 tyrosin hydroxylase활성과 DOPA를 DOPA-quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 가지고 있다[14]. 이 시험은 시험관내에서 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 방법으로 mushroom tyrosinase와 기질인 L-tyrosin을 혼합한 반응액에 시료들을 넣고, 450 nm에서의 흡광도를 측정한 값이다. Mushroom tyrosinase의 활성이 높을수록 흡광도의 수치가 높게 나타난다. 반면, mushroom tyrosinase의 활성을 억제하는 시료가 첨가될 경우, 450 nm에서의 흡광도 수치가 낮게 나타난다.

먼저 알부틴과 유용성감초추출물의 mushroom tyrosinase의 활성 억제를 살펴본 결과 알부틴은 20 μl/ml에서 11%, 30 μl/ml에서 17%, 40μl/ml에서 27%, 50μl/ml에서 38%, 100 μl/ml에서 41%의 mushroom tyrosinase활성 억제력을 보여준다. 유용성감초추출물의 경우엔 20

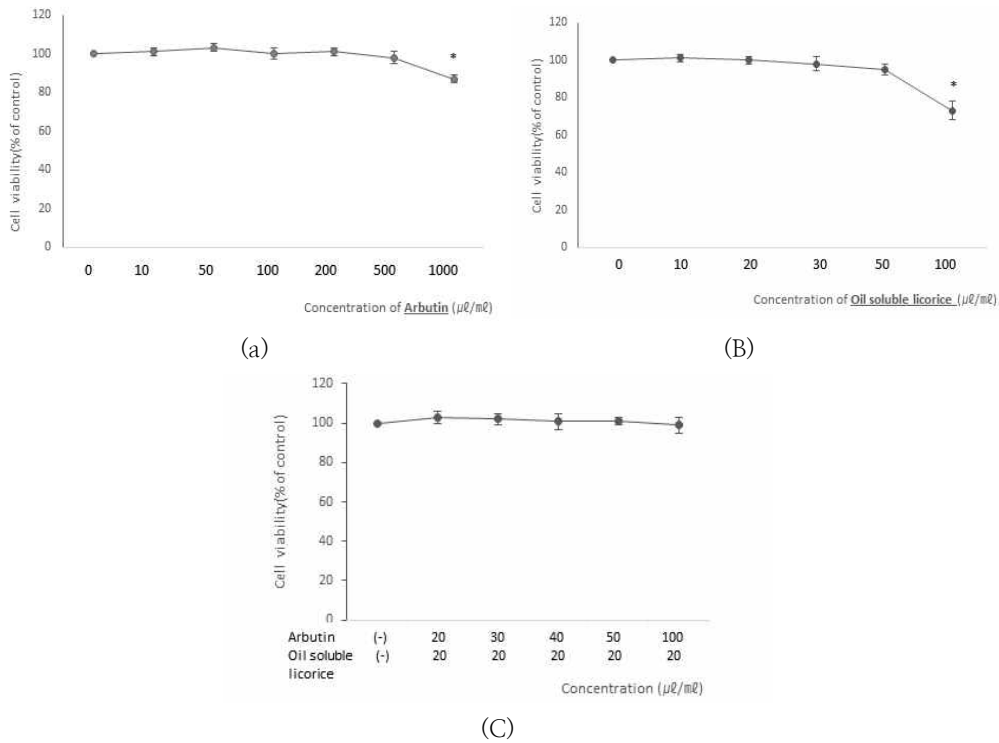


Fig. 2. Effect of Arbutin(a), Oil soluble licorice(b) and mixture(c) on the viability of B16 melanoma cells by MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, * : $p < .05$).

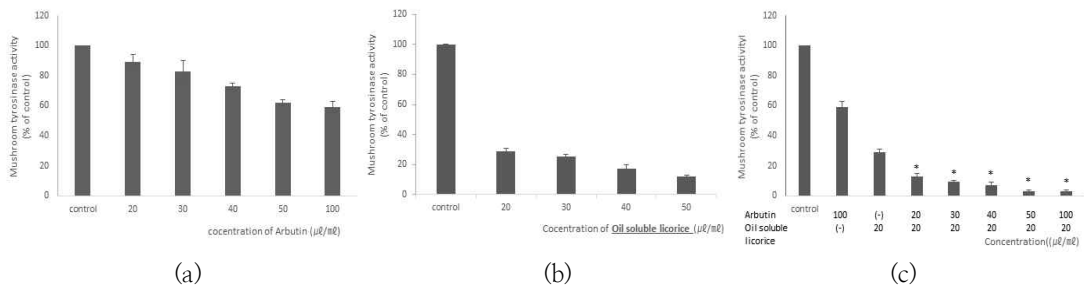


Fig. 3. Inhibitory effects of Arbutin(a), Oli soluble licorice(b) and Mixture(c) on the activity of mushroom tyrosinase. Data are displayed as the average \pm SD of triplicate experiments. 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ arbutin and 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ oil soluble licorice showed 59%, 39% inhibition of mushroom tyrosinase. * $p < .05$: Compared with 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ arbutin and 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ oil soluble licorice.

$\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 71%, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 75%, 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 85%, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 88%의 tyrosinase 활성 억제력을 보여 알부틴에 비해 mushroom tyrosinase

활성 억제력이 매우 좋은 것으로 나타났다.(Fig. 3 (a) (b))

1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:5의 비율로 혼합한

혼합물의 mushroom tyrosinase 활성 억제율은 각각 87%, 91%, 93%, 94%로 나타나 활성 억제 효과가 각 소재의 단독 사용 대비 매우 우수하게 나타남을 확인할 수 있었다.(Fig. 3 (c)) 알부틴 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도에서 11%, 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도에서 71%의 mushroom tyrosinase 활성 억제율을 보이나 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 과 알부틴을 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 를 혼합한 경우 알부틴 단독 사용 시보다 그 효과가 매우 우수하였으며, 유용성감초추출물 단독 사용 대비 20%이상의 효능이 좋아지는 것을 확인할 수 있었다. 모든 혼합물은 알부틴 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 과 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 과 비교하였을 때 유의차 있는 효능이 있음을 확인하였다.(Fig. 3 (c))

Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA (3,4-dihydroxyphenyl alanine)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있으며, TRP-1은 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)를 indole-5,6-quinone-2-carboxyl acid 로 산화하고, TRP-2는 DOPA chrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다[15].

두 성분은 L-tyrosine을 기질로 사용하였을 경우 tyrosinase의 억제효과가 잘 나타나는 것으로 보아 melanogenesis의 tyrosinase-related step 중 가장 처음 단계인 L-tyrosine에서 L-DOPA로 진행되는 과정을 주로 억제하는 것으로 판단된다.

3.3. B16 melanoma세포에서 tyrosinase 활성 억제 실험 결과

B16 세포를 이용하여 시험물질의 tyrosinase 활성 억제 실험을 실시한 것으로 알부틴의 농도를 20, 30, 40, 50, 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 로 테스트 한 결과 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 8%, 30 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 9%, 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 17%, 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 20%, 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 26%의 tyrosinase의 활성 억제를 보여주어 tyrosinase 활성 억제에 효과가 있음을 알 수 있었다. 유용성감초추출물의 경우엔 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 30%, 30 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 38%, 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 36%, 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 51%의 활성 억제를 보여주었다.(Fig. 4(a) (b))

1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:5의 비율의 혼합물의 활성 억제율은 각각 40%, 37%, 41%, 51%로 나타났다. 알부틴을 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 고농도로 단독 사용 시보다보다 알부틴 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 와 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 혼합 시 tyrosinase의 활성억제율이 26%에서 40%로 상승되는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 4 (c))

3.4. B-16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과 실험 결과

B16 melanoma세포에서 배양 시 시료 처리에 의한 멜라닌 생성의 억제 정도를 측정하는 방법으로 B16 melanoma세포에 알부틴, 유용성감초추출물, 혼합물을 처리하고 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 관찰하였다.

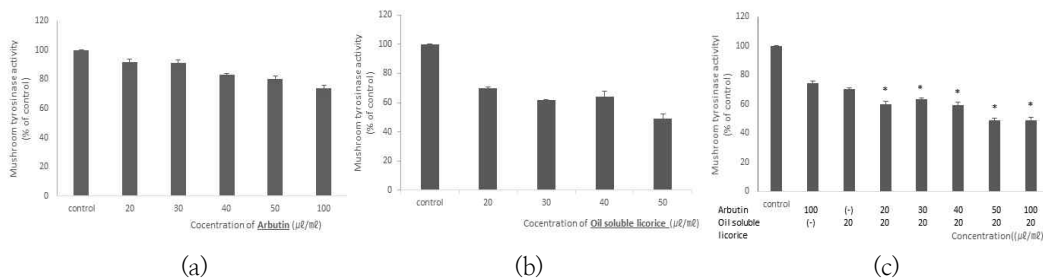


Fig. 4. Inhibitory effects of Arbutin(a), Oli soluble licorice(b) and Mixture(c) on the tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Data are displayed as the average \pm SD of triplicate experiments. 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ arbutin and 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ oil soluble licorice showed 74%, 70% inhibition of mushroom tyrosinase. * $p < .05$: Compared with 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ arbutin and 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ oil soluble licorice.

알부틴의 농도를 20, 30, 40, 50, 100 $\mu\text{l/ml}$ 로 테스트 한 결과 20 $\mu\text{l/ml}$ 에서 2%, 30 $\mu\text{l/ml}$ 에서 6%, 40 $\mu\text{l/ml}$ 에서 13%, 50 $\mu\text{l/ml}$ 에서 13%, 100 $\mu\text{l/ml}$ 에서 18%의 멜라닌 생성 억제력을 보여주었으며 유용성감초추출물의 경우엔 20 $\mu\text{l/ml}$ 에서 34%, 30 $\mu\text{l/ml}$ 에서 42%, 40 $\mu\text{l/ml}$ 에서 61%, 50 $\mu\text{l/ml}$ 에서 63%의 억제력을 보여주었다. 실험결과에서 보는 바와 같이 유용성감초추출물의 효과가 더 우수하였다.(Fig. 5 (a) (b))

1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:5의 비율의 혼합물의 멜라닌 생성 억제율은 각각 52%, 55%, 58%, 56%, 54%로 나타났다. 이 결과로 보았을 때 혼합물의 경우 알부틴, 유용성감초추출물을 단독 사용 시 보다는 그 효능 효과가 좋아지긴 했으나 알부틴의 농도가 증가하여도 멜라닌 생성 억제력은 tyrosinase 억제 효과와는 달리 크게 증가하지 않음을 확인할 수 있었다. 멜라닌 형성 억제 효과에 있어서는 유용성감초추출물의 효과가 매우 우수하기에 알부틴과의 혼합물에 있어서는 각각 20 $\mu\text{l/ml}$ 씩 1:1로 혼합한 혼합물 이외에는 크게 의미가 없는 것으로 보여지는 바이다.(Fig. 5 ©)

4. 결론

본 연구는 미백활성이 있는 것으로 알려진 물질 중 대중적으로 많이 사용되고 있는 알부틴과 유용성감초추출물의 혼합물로 시험을 진행하였다. 혼합물은 유용성감초추출물의 세포독성으로 세포 독성이 전혀 나타나지 않은 20 $\mu\text{l/ml}$ 을 고정시키

고 알부틴을 20 $\mu\text{l/ml}$ (1:1), 30 $\mu\text{l/ml}$ (1:1.5), 40 $\mu\text{l/ml}$ (1:2), 50 $\mu\text{l/ml}$ (1:2.5), 100 $\mu\text{l/ml}$ (1:5)의 비율로 증량하여 실험하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 알부틴은 0~1000 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서 세포 독성을 확인한 결과 control대비 1000 $\mu\text{l/ml}$ 에서 약간의 세포 독성이 나타남을 확인하였으며, 유용성감초추출물은 100 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서 세포 독성을 보였다. 혼합물에서는 세포독성이 나타나지 않았다.
2. Mushroom tyrosinase의 생성 억제를 확인하는 시험에서 알부틴, 유용성감초추출물이 모두 농도 의존적으로 멜라닌을 형성하는 tyrosinase을 모두 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 혼합물의 경우 알부틴과 유용성감초추출물의 단독 사용 시 보다 혼합비율에 따라 다르기는 하지만 억제율이 상승하는 것을 확인할 수 있었다.
3. B16 melanoma세포에서 tyrosinase 활성 억제 실험 결과 알부틴 보다는 유용성감초추출물의 효능이 좋음을 확인할 수 있었다. 알부틴을 100 $\mu\text{l/ml}$ 의 고농도로 사용 시 26%의 활성 억제를 보이거나 알부틴 20 $\mu\text{l/ml}$ 와 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l/ml}$ 을 1:1로 섞은 혼합물의 경우 51%의 활성 억제를 보여 2배 가까이 활성 억제율이 상승하였다. 하지만 유용성감초추출물의 경우 단독으로 50 $\mu\text{l/ml}$ 사용 시에도 B16 melanoma세포에서

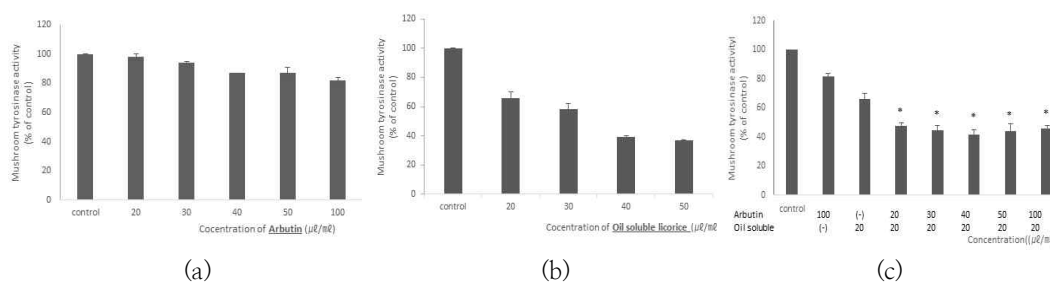


Fig. 5. Inhibitory effects of Arbutin(a), Oli soluble licorice extract(b) and Mixture(c) on the melanin synthesis in B16 melanoma cells. Data are displayed as the average \pm SD of triplicate experiments. 100 $\mu\text{l/ml}$ arbutin and 20 $\mu\text{l/ml}$ oil soluble licorice showed 74%, 70% inhibition of mushroom tyrosinase. * $p < 0.05$: Compared with 100 $\mu\text{l/ml}$ arbutin and 20 $\mu\text{l/ml}$ oil soluble licorice.

tyrosinase 활성 억제 효과가 51%로 알부틴을 각 농도별로 혼합하여도 활성 억제에는 큰 의미가 없어보이는 것을 확인하였다. 저농도의 혼합물에서 효능이 상승되는 것에는 의미가 있다고 보여지는 바이다. Mushroom tyrosinase 활성 억제와 비교하여 사용한 기질의 종류에 따라서 tyrosinase 활성 억제율이 달라짐을 확인할 수 있었다.

4. B-16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과 실험 결과 알부틴의 경우 20 $\mu\text{l/ml}$ ~ 100 $\mu\text{l/ml}$ 의 고농도로 처리하여도 억제율이 20% 미만이었으나 유용성감초추출물은 20 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서도 34%의 멜라닌 생성 억제 효과를 보여 유용성감초추출물의 효능이 알부틴 보다 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 혼합물에서는 알부틴 20 $\mu\text{l/ml}$ 와 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l/ml}$ 을 1:1로 섞은 혼합물의 경우 알부틴 20 $\mu\text{l/ml}$ 만 사용 시 2%, 유용성감초추출물 20 $\mu\text{l/ml}$ 만 사용 시 34%의 생성억제에서 52%로 효과가 좋아졌으나 그 이후 알부틴의 농도 증가에도 멜라닌 생성 억제율은 크게 증가하지 않음 또한 확인할 수 있었다.

이로서 알부틴과 유용성감초추출물은 이미 미백고시 성분으로 입증된 효과와 같이 멜라닌 생성에 영향을 주는 enzyme인 tyrosinase 활성 억제에 우수한 효능을 보여주는 것을 확인하였으며 비율에 따라 다르기는 하지만 혼합물의 경우 특히, mushroom tyrosinase 활성 억제에는 매우 효과가 있음을 실험으로 확인할 수 있었다. 하지만 B-16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제에서는 알부틴은 크게 효과가 없었으며 유용성감초추출물의 효과는 우수하였다. B-16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제 혼합물의 경우 1:1로 혼합한 경우 단독 사용 시 보다 그 효과가 좋아졌으나 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:5로 알부틴의 함량이 증가하여도 유용성감초추출물 단독 사용대비 멜라닌 생성 억제에는 크게 효과가 없음을 확인하였다.

추후 멜라닌 생성과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 microphthalmia-associated transcription factor(MITF), cAMP response element(CRE) 등[16]과 같은 인자들에 대해 혼합물이 어떤 영향을 미치는지에 대한 후속 연구

외에 임상 연구 등의 다양한 연구를 통해 미백에 실제적으로 효과가 있음을 확인하여 기존의 소재들을 재활용하는 차원에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 미백활성이 있는 것으로 알려진 물질 중 대중적으로 많이 사용되고 있는 알부틴과 유용성감초추출물의 혼합물로 시험을 진행하였다. 이 외에도 미백활성이 있는 물질이 다수 존재하기에 이 실험만으로 미백활성 물질을 혼합하여 사용함에 의해 모든 물질이 미백활성이 증가되는 것은 아니라고 생각한다. 좀 더 다양한 농도에서의 확인 뿐 아니라 알부틴과 유용성감초추출물 이외의 다른 시험 물질의 혼합에 의해서도 미백활성이 증가됨을 확인할 필요가 있으며 실제 임상실험을 통한 확인도 필요하다고 사료되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 2017학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

References

1. K. Maeda, M. Fukuda, "Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture", *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*, Vol. 276, No.2 pp. 765-774, (1996).
2. F. Toshio, S. Kazue, N. Taro, S. Hiroshi, "Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*", *Fitoterapia*, Vol. 74, No. 7 pp. 624-629, (2003).
3. H. H. Kirstein, H. S. Honoré, K. Marianne, P. G. Merete, "Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizic acid in pharmaceutical preparations", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 9, No.1 pp. 41-46, (1999).

4. J. Vaya, P. A. Belinky, M. Aviram, "Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 23, No.2 pp. 302-315, (1997).
5. T. Yokota, H. Nishio, Y. Kubota, M. Mizoguchi, "The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation", *Pigment Cell Research*, Vol. 11, No. 6 pp. 355-416, (1998).
6. S. Jun, G. Keiichi, N. Fumio, K. Shigeyuki, M. Kousaku, "Antifungal activity of plant extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*", *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 90, No. 4 442-446, (2000).
7. R. Saruno, F. Kato, T. Ikeno, "Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 43, No. 6 pp. 1337-1338, (1979).
8. J. H. Park, Y. G. Shin, U. K. Shin, S. K. Baek, S. K. Lee, M. H. Chung, Y. L. Park, "Tyrosinase inhibition activity of some herbal drug" *Yakhak Hoiji*, Vol. 41 No. 4 pp. 518-523, (1997).
9. Y. H. Lee, N. H. Lim, M. S. Jung, J. H. Kim, S. S. Shim, "Chemical Stability and Whitening Activity of Mixture of Functional Ingredients", *Journal of the society of cosmetic scientists of Korea*, Vol. 31, No. 4 pp. 295-304, (2005).
10. A. M. Sieuwerts, J. G. Klijn, H. A. Peters, J. A. Foekens, "The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival", *Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, Vol. 33, No. 7 pp. 813-836, (1995).
11. V. J. Hearing, "Bio chemical control of melanogenesis and melanoma organization", *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Vol. 4, No. 1 pp. 24-32, (1999).
12. S. J. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim, Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(9), pp. 1348-1350, (2003).
13. V. Jiří, D. Jiří, M. Bohuslav.. "A spectrophotometric assay for mammalian tyrosinase utilizing the formation of melanochrome from L-dopa." *Anal Biochem*, 146(2), pp. 405-410, (1985).
14. J. K. Son, "Isolation and structure determination of a new tetralone glucoside from the roots of *Juglans mandshurica*", *Arch. Pharm. Res*, Vol. 18, pp. 203-205, (1995).
15. W. Englaro, R. Rezzonico, M. Durand-Clément, D. Lallemand, J. P. Ortonne, R. Ballotti, "Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells", *J Biol Chem*, Vol. 270, No. 41 pp. 24315-24320, (1995).
16. K. U. Schallreuter, S. Kothari, B. Chavan, J. D. Spencer, "Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts", *Exp Dermatol*, Vol. 17, No. 5 pp. 395-404, (2008).