

GOVP1200723305

최 종
연구보고서

GA 0664-07009

**미활용 식물자원을
이용한 미백효능평가 및 소재개발**

**Examination and Development of
a Whitening Material Using a Korean Wild Plant**

연구기관
한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미활용 식물자원을 이용한 미백효능 평가 및 소재개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
총괄연구책임자 : 최 상 윤
세부연구책임자 : 김 영 찬
연 구 원 : 김 성 수
연 구 원 : 이 영 철
연 구 원 : 노 정 해
연 구 원 : 홍 희 도
연 구 원 : 공 연 희
연 구 원 : 조 연 옥

요 약 문

I. 제 목

미활용 식물자원을 이용한 미백효능 평가 및 소재개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

동양권에는 흰 피부를 아름다움의 중요한 요소로 여기고 있다. 최근 중국 등의 소득 수준 향상과 더불어 피부미용을 비롯한 미용 산업에 대한 수요가 급증하고 있으며 우리나라에서도 이미 10 여 년 전부터 미백을 비롯한 미용시장의 규모는 급격히 증가하고 있다. 그러나 동양권의 미백시장은 오히려 원료 제조 기술력을 앞세운 서구에 의해 지배되고 있는 실정이다.

최근에는 천연자원에 대한 관심의 확산에 따라 천연 유래 원료를 이용한 화장품에 대한 수요가 증대되고 있으며 이에 따라 주로 한의학적 문헌 및 원리에 의거한 한약재를 사용한 기능성 미백 화장품이 시판되고 있으나 그 재료가 한정되어 있으며 과학적 활성 검증 또한 부족한 실정이다. 따라서 과학적 토대에 의해 미백활성이 검증된 새로운 식물자원의 도출 및 제시가 필요하다. 따라서 이미 미백작용을 갖는다고 알려져 있는 기존의 식물자원을 제외한 뛰어나고 새로운 식물자원을 이용한 화장품 원료의 개발은 외국회사에 대항하여 국내 천연 화장품 원료 산업 및 이와 연관된 농가의 소득원 제고에 크게 기여할 것으로 예측된다.

본 연구에서는 미활용 되고 있는 국내자생식물자원 중 1차 활성추정을 통해 도깨비 부채 (*Rodgersia podophylla*), 쇠고비 (*Cyrtomium fortunei* J Smith), 도깨비 고비 (*Cyrtomium falcatum*)를 선발하여 이의 미백활성을 구체적으로 평가하고 활성성분을 구명하며 이를 이용한 최적의 미백활성소재를 도출하고자 하였다.

이의 결과는 미활용 국내 식물자원에 새로운 부가가치를 창출하여 국민의 보건 향상 및 농가의 소득증대에 기여할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 시료의 조제

도깨비 부채 (*Rodgersia podophylla*), 쇠고비 (*Cyrtomium fortunei* J Smith), 도깨비 고비 (*Cyrtomium falcatum*)는 지상부와 뿌리로 나누어 열풍건조한 후 초음파를 이용하여 상온에서 메탄올과 증류수로 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압농축하여 정제 및 활성측정용 시료로 사용하였다.

2. 미백활성 측정

가. Tyrosinase 활성억제도

각각의 시료가 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다.

나. UV-차단효과

피부색소 과생성의 주요한 원인인 자외선 영역에서의 흡수 능력을 확인하여 피부도포시 자외선 차단효과를 기대할 수 있는지 확인하였다.

다. 멜라닌 생성세포에 미치는 영향

마우스 유래의 멜라닌 생성세포인 melan-a 세포주를 이용하여 각각의 시료 도포시 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 검정하여 세포독성 및 미백활성을 확인하였다.

라. 단백질 발현에 미치는 영향 검정

미백활성기전을 확인하기 위해 멜라닌 생성세포에서 도깨비 부채 정제물 및 활

성성분을 처리한 후 tyrosinase 및 dopachrome tautomerase 발현량을 western immunoblotting을 이용하여 정량하였다.

마. UV-B로 유도된 brown guinea pig의 색소침착에 미치는 영향

Brown guinea pig의 등 부분에 UV-B로 유도한 색소 과침착된 피부에 도깨비 부채 정제물 및 활성성분을 6주간 도포하고 피부색의 회복정도를 관찰하였다.

3. 유효성분의 분석

도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비 고비의 문헌상 검색된 함유성분 및 식물체에 널리 함유되어있는 미백활성성분 7종을 HPLC를 이용하여 시료내 함량을 정량하였다.

4. 활성단일성분의 분리 및 동정

가장 우수한 미백활성을 보인 자생식물인 도깨비 부채 뿌리 추출물을 분획하고 컬럼 크로마토그래피 및 재결정을 통하여 활성 추적법으로 미백활성단일물질을 정제, 분리하고 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR(HMQC, HMBC, COSY), Mass 분석등을 통하여 구조를 동정하였다. 또한 동정된 미백성분의 미백시료내 함량을 HPLC, GC를 통해 정량하였다.

5. 활성성분 유도체의 미백활성탐색

도출된 미백활성성분과 화학적 구조가 유사한 유도체의 미백활성을 탐색하여 구조와 효능의 상관관계 검정 및 우수 유도체의 발굴을 시도하였다.

6. 시제품의 제조

연구결과 우수한 미백활성 및 낮은 독성을 보인 도깨비 부채 뿌리 추출물을 최적의 미백소재로 선정하여 이를 이용한 미백로션 및 미백크림 시제품을 제조하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 시료의 조제

2005 년 충북에서 도깨비 부채 (*Rodgersia podophylla*), 쇠고비 (*Cyrtomium fortunei* J Smith), 도깨비 고비 (*Cyrtomium falcatum*)를 채취하여 증류수로 세척 후 뿌리와 잎, 줄기 (지상부) 부분으로 나누어 열풍건조 하였다. 건조된 시료를 마쇄한 후 메탄올과 증류수 용매를 사용하여 상온에서 초음파 추출 하였다. 얻어진 추출액은 여과하고 완전 농축시켜 메탄올 추출물과 물 추출물을 제조하고 메탄올 추출물은 추가로 에틸아세테이트 가용성 분획물과 물 가용성 분획물로 나누어 시료를 제조하였다.

2. 미백활성 측정

가. Tyrosinase 활성억제도

멜라닌 생성 초기과정인 tyrosine 및 dopa의 산화에 주요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정한 결과 부위별로는 지상부보다 뿌리에서 높은 억제활성을 나타내는 경향을 보였으며 추출용매별로는 메탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 억제활성을 나타냈다. 3 종의 자생식물 중 도깨비 부채 뿌리와 쇠고비 뿌리의 메탄올 추출물이 200 ppm에서 각각 37.3% 와 34.1%의 tyrosinase 억제활성을 나타내어 우수한 자원으로 판단되었으며 도깨비고비는 비교적 낮은 활성이나 특이적으로 잎과 뿌리가 비슷한 tyrosinase 억제활성을 나타냈다. 또한 우수한 억제활성을 나타낸 메탄올 추출물을 다시 에틸아세테이트 가용성 분획과 물 가용성 분획으로 나누어 활성을 측정한 결과 에틸아세테이트 분획이 높은 활성을 보여 tyrosinase 억제활성성분은 극성이 상대적으로 낮은 에틸아세테이트 분획물에 주로 존재하는 것으로 판단되었다.

나. UV-차단효과

피부흑화의 주요요인인 UV의 흡수여부를 검정하고자 200-500 nm 영역의 흡수도를 측정한 결과 도깨비 부채 뿌리와 쇠고비 뿌리의 메탄올 추출물과 이의 에

틸아세테이트 분획물이 일광화상 및 지연형 색소침착을 일으키는 UV-B 영역의 자외선을 특징적으로 흡수하는 것을 확인하였다. 또한, 도깨비 고비의 뿌리 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획물도 UV-B 영역의 자외선을 흡수 하였다. 따라서 이들 시료는 피부에 도포시 UV-B 영역의 자외선을 차단하여 일광화상 및 지연형 색소침착을 막는 효과를 기대할 수 있다고 판단되었다.

다. 멜라닌 생성세포에 미치는 영향

자생식물시료가 마우스 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포주에서 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 각각의 시료를 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml의 농도로 3 일간 처리한 결과 도깨비 부채의 뿌리 메탄올 추출물은 100 ppm에서 큰 세포독성 없이 37.5%의 멜라닌 생성을 억제하였으며 쇠고기 뿌리 메탄올 추출물 역시 100 ppm에서 큰 세포독성 없이 28.2%의 억제 활성을 나타냈다. 잎 부분의 메탄올 추출물은 뿌리에 비해 낮은 활성을 나타내었으며 도깨비 고비 잎이 100 ppm에서 세포생존율 대비 약 11%의 멜라닌 생성 감소활성을 보였다. 한편, 물 추출물은 활성이 없거나 크지 않았다. 우수한 활성을 나타낸 도깨비 부채 뿌리 및 쇠고기 뿌리 등의 메탄올 추출물을 물에 녹여 에틸아세테이트 분획물과 물분획물로 나누어 활성을 측정한 결과 물 분획물은 활성을 나타내지 않았고 에틸아세테이트 분획물은 메탄올 추출물에 비하여 고농도에서 독성이 증가하는 경향을 나타냈으나 세포생존율 대비 멜라닌 생성억제활성을 나타내어 활성물질들이 에틸아세테이트 분획에 전이 되는 것으로 확인하였다.

라. 단백질 발현에 미치는 영향 검증

멜라닌 생성세포 내에서 멜라닌 생합성과정에 주요한 역할을 하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 western immunoblotting을 실시하였다. 세포실험 결과 세포독성이 적고 멜라닌 생성억제 활성이 우수한 것으로 도출된 도깨비 부채 메탄올 추출물 등을 melan-a세포에 3 일간 처리 후 SDS-polyacrylamide gel로 분리하고 antibody를 이용하여 ECL detection 하여 정량한 결과 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물을 10 ppm, 100 ppm 농도로 처리한 군에서 tyrosinase 발현량을 유의적으로 감소시켰으며 TRP-2에 대한 영향은 없었다.

따라서 도깨비 부채 메탄올 추출물은 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제할 뿐만 아니라 tyrosinase 발현을 감소시켜 멜라닌 생합성의 과정에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

마. UV-B로 유도된 brown guinea pig의 색소침착에 미치는 영향

선발된 미백원료의 생체상의 활성을 알아보기 위해 갈색 기니아 피그를 사용하여 색소침착정도를 측정하였다. 갈색 기니아 피그의 등 부분 피부에 UV-B를 조사하여 색소침착을 유도한 후 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물 등을 1 일 1 회씩 도포하고 피부색의 변화를 관찰하였다. 도포 4 주 후 부터 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물을 1% 와 3% 처리한 군에서 농도 의존적으로 피부의 색의 완화효과가 관찰되었으며 3% 처리한 군에서 6 주 후의 ΔL 값은 1.7 이었다. 또한 모든 실험기간동안 피부발적 및 자극성은 관찰되지 않았다.

3. 유효성분의 분석

도깨비 부채의 성분으로 알려져 있는 bergenin과 식물계에 존재하는 미백활성성분으로 보고되어 있는 물질 중 gallic acid, bergenin, esculetin, caffeic acid, myricetin, cinnamic acid, quercetin 등의 7 종을 선별하여 각각의 자생식물시료내의 그 존재여부를 HPLC를 이용하여 확인하고 정량하였다. 7 종의 성분은 주로 자생식물시료의 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획물에 존재함을 알 수 있었고 물 추출물에는 거의 존재하지 않았다. 자생식물 중에서는 도깨비 부채와 쇠고비에, 부위로는 잎보다는 뿌리부분에 많이 존재하였다. 도깨비 부채 뿌리는 bergenin이 메탄올 추출물에서는 0.87% 에틸아세테이트 분획물에서는 3.01% 함유되어 있었으며 gallic acid, myricetin, cinnamic acid 등이 존재하였다. 잎 부위의 성분은 유사한 경향을 보였으나 함량면에서 상대적으로 적은량이 검출되었다. 쇠고비는 뿌리에서는 caffeic acid, 잎에서는 esculetin 등이 검출되었고 도깨비고비 잎에서는 caffeic acid, myricetin, cinnamic acid 등이 소량 존재 하였다. 또한 추출용매별로는 메탄올과 이의 에틸아세테이트 분획물에서 높은 함량을 보였다.

4. 활성단일성분의 분리 및 동정

효소억제, UV 흡수 및 세포상 활성 및 독성측정에서 가장 우수한 자원으로 선 발된 도깨비 부채 뿌리 메탄을 추출물을 앞의 분획결과에 따라 활성이 없는 물 가용성 분획물을 제거하고 에틸아세테이트 가용성 분획물을 대상으로 활성추적 방법을 사용하여 활성물질을 분리하였다. 3 차에 걸친 컬럼 크로마토그래피와 각 단계의 활성추적을 통하여 3 종의 물질을 분리하였고 분리된 물질의 구조동정을 위하여 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC, COSY, Mass 등을 측정하여 분석 하였다. 물질 1은 $^1\text{H-NMR}$ 결과 5 ~ 6 ppm 사이에 탄소이중결합의 수소 peak 들과 1.6 와 2.2 ppm 부근의 탄소단일결합 수소가 관찰되었으며 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 는 10 개의 주요탄소 peak이 나타났다. 이들 수소와 탄소의 결합관계를 HMQC 로 확인하고 Mass로 분석하여 동정한 결과 물질 1은 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 분자량 168 를 갖 는 geranic acid인 것으로 동정되었다. 또한 물질 2는 $^1\text{H-NMR}$ 결과 7 ppm 부근 의 벤젠링에 위치한 수소와 5 ppm 부근의 벤젠링의 hydroxyl기로 추정되는 peak와 3.3 ~ 4.2 ppm 사이의 hydropyran 수소가 관찰 되었으며 165 ppm을 비 롯한 14개의 주요 peak가 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 관찰되었고 Mass 측정결과를 종합하여 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9$ 분자량 328을 갖는 bergenin인 것으로 판별 되었다. 한편, 물질 3 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC, COSY, Mass 분석을 하였으나 구조동정에 어려움 있었다.

도깨비 부채 뿌리로부터 활성추적법으로 분리되어 구명된 geranic acid의 메탄을 추출물 및 에틸아세테이트 분획내 함량을 GC로 분석한 결과는 각각 0.52% 및 3.2%로 나타났으 며 분리된 단일성분 2 종의 멜라닌 생성세포에서의 활성을 검정한 결과 geranic acid는 100 ppm에서 약 8%의 세포독성(감소)을 보였으나 34%의 멜라닌 생성을 억제 하였으며 bergenin도 약 9%의 세포독성을 보였고 멜라닌은 26% 감소시켰다. 또 한 tyrosinase 활성억제도 측정에서 geranic acid는 100 uM에서 65%, 1 mM에서 98% 의 억제활성을 나타냈으며 bergenin은 유의적인 활성을 나타내지 않았다. 더욱 우수한 미백활성을 보인 geranic acid가 멜라닌 생성세포에서 tyrosinase발현에 미치는 영향을 검정하기 위해 western immunoblotting 한 결과 100 ppm 농도에서 tyrosinase 발 현량을 감소시켰으며 TRP-2 발현량에 대한 영향은 없었다. 또한 UV-B로 유도 된 brown guinea pig 피부 색소침착에 대하여 3% 농도 6 주 적용시 피부발적이

나 이상 징후 없이 피부의 색소침착을 완화시켰다.

5. 활성성분 유도체의 미백활성탐색

구조-활성간 상관관계 검정 및 우수물질 도출을 위하여 geranic acid와 화학적 구조가 유사한 유도체인 β -citronellol, citronellic acid, geraniol의 미백활성을 탐색한 결과 4 종의 화합물 중 geranic acid 가 1 mM과 100 uM에서 각각 97.4%와 65.1%의 tyrosinase 저해활성을 나타내어 가장 우수하였고 geraniol, citronellic acid 는 1 mM에서 각각 35.4%와 55.6%의 억제활성을 나타내었다. 한편 β -citronellol은 1 mM 농도에서 UV흡수를 나타내어 정확한 저해율을 구할 수 없었으나 100 uM에서 29.5%의 활성억제능을 보였다. 또한 멜라닌 생성 세포주에 미치는 영향을 측정된 결과 geranic acid 는 500 uM 농도에서 큰 세포사멸 없이 세포생존을 대비 약 26%의 멜라닌 생성량을 감소시켰으며 geraniol은 고농도에서 약간의 멜라닌 생성억제 활성을 보였으나 세포사멸을 일으켰다. 한편 citronellic acid 는 세포독성은 적었으나 유의적인 멜라닌 생성억제활성은 나타나지 않았으며 citronellol은 50 uM 이상의 농도에서 세포사멸을 일으켰다.

6. 시제품의 제조

건조된 도깨비 부채 뿌리를 초음파 추출하고 감압농축 후 진공에서 완전 건조하여 메탄올 추출물을 제조하였고 이를 3% 농도로 wax(밀랍, 호호과유), 보습제(glycerin, propylene glycol), 고급알콜, 지방산(stearic acid), 계면활성제등을 mixer로 배합하여 제조된 로션 및 크림 base에 첨가하여 도깨비부채 미백로션 및 미백크림을 제조하였다.

7. 연구개발 활용에 관한 건의

본 연구는 미활용 되고 있는 국내자생식물인 도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비 고비의 미백활성을 *in vitro* 및 *in vivo*에서 탐색하여 검정하였고 그 기전 및 활성성분을 구명하였다. 이러한 결과는 이들 식물자원이 미백원료로써 활용될 수 있는 근거를 제공할 수 있으며 새로운 부가가치를 부여하고 향후 농가의 새로운 수입원으로 도출 될 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구 결과는 현재 2 건의 학술발표

및 2 건의 학술지 게재 (SCI 1 편)를 통해 홍보 및 성과확산 노력을 기울이고 있으며 1 편의 SCI급 논문을 추가로 제출하고 게재허가를 기다리고 있다. 또한 국내특허출원(도깨비 부채, 쇠고비 또는 도깨비 고비 추출물을 유효성분으로 하는 미백 조성물)을 통해 기술에 대한 독점성을 확보하고자 하였고 향후 이를 이용한 최적의 화장제품개발에 대한 노력 및 협의를 지속적으로 추진하고자 한다.

SUMMARY

1. Preparation of the Samples

In the year 2005, samples of *Rodgersia podophylla*, *Cyrtomium fortunei* J Smith, and *Cyrtomium falcatum* were collected in Chungcheongbuk-do. They were washed and treated using a heating dry method after the roots and leaves were separated from each other. The ground and the dried samples were processed for ultrasonic extraction, with methanol and distilled water taken as solvents under room temperature conditions. The extracts gained were then filtered and concentrated to form methanol extract and water extract. The methanol extract was isolated again into ethyl acetate (EA) available fraction and water available fraction.

2. Measurement of the Depigmenting Activity

A. Tyrosinase Activity Inhibition Rate

The measurement results of the effects on the tyrosinase enzyme activity that assume a significant role in the melanin biosynthesis process suggested there were trends of higher inhibitory activity in roots than in leaves, with respect to parts, and in methanol extract than in water extract, with respect to extract solvents. Among the three native plants, the methanol extracts from the roots of *Rodgersia podophylla* and *Cyrtomium fortunei* J Smith were identified as promising resources, as they exhibited tyrosinase activity inhibition levels of 37.3% and 34.1%, respectively, under 200 ppm conditions. In addition, when the methanol extracts exhibiting good activity inhibition results were isolated again into EA available fraction and water available fraction, the EA fraction revealed a higher activity measurement result.

B. UV Shielding Effect

As UV absorption is a major cause of sun tanning, UV absorption rates in the range of 200 - 500 nm were measured. The methanol extracts and EA fractions there of from the three native plants were confirmed to have absorbed UV-B radiation responsible for sunburn and delayed tanning (DT). Therefore, the shielding effect of UV-B radiation, the consequent prevention of sunburn and delayed tanning effects are expected with the application of these samples to the skin.

C. Effects on Melanocyte

To measure the effects of each sample on cell survival rates and the content of melanin biosynthesis in the melanocytes, each sample was processed over three days, with the methanol extract of *Rodgersia podophylla* exhibiting a 37.5% inhibitory effect on melanin biosynthesis in 100 ppm, with a minimum level of cytotoxicity, and the methanol extract of *Cyrtomium fortunei* J Smith revealing a 28.2% inhibitory activity under the same conditions, also with a minimum level of cytotoxicity. EA fraction and water fraction of the methanol extracts were also measured. No activities were found with the water fractions. In case of the EA fractions, however, cytotoxicities were found to have increased relative to those of the methanol extracts in high concentration conditions, with melanin biosynthesis inhibitory activities shown in comparison with cell viabilities.

D. Probation of Effects on Protein Expression

As the methanol extract from the *Rodgersia podophylla* was found to exhibit relatively low cytotoxicity and good melanocyte inhibitory activities, it was applied to melan-a cell for three days, and was then was sent for a western blot analysis. This significantly reduced the tyrosinase expression rates, in the groups of 10 ppm and 100 ppm process conditions, in methanol

extract from the roots of *Rodgersia podophylla*. There was found to be no effect on TRP-2. Therefore, the methanol extract from the roots of *Rodgersia podophylla* is concluded to have had a direct effect on the inhibition of tyrosinase activity, and is deemed to reduce the expressions affecting melanin biosynthesis.

E. Depigmenting effects on brown guinea pig skin

The whitening effect of methanol extract of *Rodgersia podophylla* was examined under a UV B-induced hyperpigmentation model in brown guinea pigs. Methanol extract of *Rodgersia podophylla* was topically applied to the UV-stimulated hyperpigmented dorsal skin areas ones a day for 6 weeks. A visible decrease in hyperpigmentation was observed 4 weeks after the treatment with methanol extract of *Rodgersia podophylla*, when compared to vehicle group. Furthermore, visible edema was not observed at any sites where the dorsal skin was treated with methanol extract of *Rodgersia podophylla* during all experimental days.

3. Analysis of the Active Ingredients

Through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis, the presence of begenin, known to be one ingredient of *Rodgersia podophylla*, and seven other selected substances, which are reported to have whitening activity ingredients, were confirmed. Theses ingredients were confirmed to exist primarily in the methanol extracts and in their ethyl acetate (EA) fractions of the native plant samples. In particular, the ingredients were found to be more prevalent in *Rodgersia podophylla* and *Cyrtomium fortunei* J Smith among the three native plant samples, and more prevalent in the root than in the leave parts of the samples taken.

4. Isolation and Identification of a Single Active Ingredient

In measuring enzyme inhibition, UV absorption, and cytotoxicity, the *Rodgersia podophylla* root was found to be the best resource, with the methanol extract of its active substance separated by the conducting of an activity tracking method. Through fractionation and through three occasions of open columns and activities in each stage, three substances were isolated. As a result of the NMR analysis for structure identification, substance Number 1 was identified as geranic acid, and substance Number 2 as begenin. There were, however, some difficulties in identifying substance Number 3.

5. Depigmenting Activity of Active Ingredient Derivatives

To examine the structure-activity correlation and to derive a promising substance, the inhibitory activities of β -citronellol as a geranic acid derivative, citronellic acid, and tyrosinase of geraniol were screened. Among the four compounds, geranic acid exhibited the best inhibitory activity levels at 97.4% and 65.1%, in conditions of 1 mM and 100 μ M, respectively. The measurement results of the effect on the melanocyte cell line suggested that geranic acid reduced 26% of the quantity of melanin, in comparison with the cell survival rate under 500 μ M conditions, without a great deal of cell destruction occurring. Geraniol expressed melanogenesis inhibitory activity in high concentration conditions, but it manifested cytotoxicity.

6. Production of the Prototype Products

A prototype was produced by mixing 3% density methanol extract from *Rodgersia podophylla* and lotion and cream bases with wax, moisturizer, high quality alcohol, fatty acid, and a surface active agent.

CONTENTS

Summary	11
Contents	15
Chap. 1. Outline of research project	20
1. Objective	20
2. Significance	20
1) Technological angle	20
2) Economical angle	21
3) Social angle	21
Chap. 2. Present state	22
1. State of Technological Development	22
2. Position of this Research	23
Chap. 3. Methods and Results of Project	25
1. Preparation of the Samples	25
1) Native Plants	25
2) Extraction and Preparation	26
2. Measurement of Depigmenting Activities	31
1) Tyrosinase Inhibitory Activities	31
2) Effects on Cell Viabilities and Melanin Production	34
3) UV Shielding Effect	40
3. Discovery and Analysis of Active Ingredients	45
1) Quantitative analysis	45
2) Isolation and Identification of a Active Ingredient	49
3) Contents in Samples	66

4. <i>In Vivo</i> Tests and Mechanism of Depigmenting Activities	67
1) Selection of Active Materials	67
2) Western immunoblotting analysis	68
3) Depigmenting Activities on UV-induced Hyperpigmentation in Brown Guinea Pig Skin	71
5. Depigmenting Activity of Active Ingredient Derivatives and Production of the Prototype Products	74
1) Discovery of Active Ingredient Derivatives	74
2) Prototype Products	76
3) Comparing with existing natural cosmetics	77
 Chap. 4. Attainment and Contribution	 78
 Chap. 5. Achievements and Proposal for Application	 81
 Chap. 6. Information from Abroad Related to This Project	 83
 Chap. 7. References	 84

목 차

요약문	2
Summary	11
Contents	15
목차	17
제 1 장. 연구개발과제의 개요	20
제 1 절. 연구개발목적	20
제 2 절. 연구개발의 필요성	20
1. 기술적 측면	20
2. 경제, 산업적 측면	21
3. 사회, 문화적 측면	21
제 2 장. 국내외 기술현황	22
제 1 절. 관련기술개발현황	22
제 2 절. 기술개발위치	23
제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과	25
제 1 절. 실험시료의 조제	25
1. 자생식물재료	25
2. 시료의 유효성분 추출 및 제조	26
제 2 절. 제조된 시료의 색소조절관련 활성측정	31
1. 타이로시네이즈 활성억제도 측정	31
2. 멜라닌 생성세포에서의 멜라닌 생성억제활성	34

3. 자외선 차단효과 측정	40
제 3 절. 미백활성성분의 탐색 및 정량	45
1. 유효성분의 HPLC 정량	45
2. 미백활성성분의 분리 및 구명	49
3. 시료에 함유된 활성성분의 정량	66
제 4 절. 선발된 우수미백시료의 기전점검 및 동물실험	67
1. 타이로시네이즈 활성저해도 및 멜라닌 생성세포에서의 활성비교를 통한 우수자원의 선발	67
2. 멜라닌 생합성관련 단백질 발현량 측정	68
3. 자외선으로 유도된 브라운 기니아 피그의 피부색소 침착에 대한 미백효과검정	71
제 5 절. 활성성분의 유도체 활성탐색 및 시제품의 제조	74
1. 활성성분의 유도체 활성탐색	74
2. 시제품의 제조	76
3. 경쟁제품과의 비교검토	77
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야의 기여도	78
1. 연차별 연구개발 목표와 내용	78
가. 1차년도	78
나. 2차년도	78
다. 종합	78
2. 연구개발목표의 달성도 및 관련분야 기여도	79
가. 선별된 식물자원의 시료제조 및 미백활성세부검정	79
나. 분리분석을 통한 활성성분의 탐색	79
다. 최적의 추출조건 확립 및 미백원료의 제조	80
라. 활성성분 유도체의 멜라닌 생성억제활성 검정	80
마. 시제품의 제조	80
제 5 장. 연구결과의 활용계획	81

1. 학술분야	81
2. 개발원료의 활용분야	81
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	83
제 7 장. 참고문헌	84

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

본 연구는 미백활성이 알려지지 않은 국내자생식물자원의 미백활성을 탐색하고 과학적으로 검증하며 그 유효성분의 도출 및 기전연구를 통해 새로운 미백자원으로써의 기반을 구축하고 부가가치를 창출하고자 하였고 이를 통해 최근 크게 증대되고 있는 천연화장원료에 대한 요구도를 충족시키고 농민의 새로운 소득원 개발에 기여하는 토대를 마련하고자 하였다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

동양권에는 흰 피부를 아름다움의 중요한 요소로 여기고 있다. 최근 중국 등의 소득 수준 향상과 더불어 피부미용을 비롯한 미용 산업에 대한 수요가 급증하고 있으며 우리나라에서도 이미 10 여 년 전부터 미백을 비롯한 미용시장의 규모는 급격히 증가하고 있다. 그러나 동양권의 미백시장은 오히려 원료 제조 기술력을 앞세운 서구에 의해 지배되고 있는 실정이다.

최근에는 천연 유래 원료를 이용한 화장품에 대한 관심이 증대되고 있으며 이에 따라 주로 한의학적 문헌 및 원리에 의거한 한약재를 사용한 기능성 미백 화장품이 시판되고 있으나 그 재료가 한정되어 있으며 과학적 활성 검증 또한 부족한 실정이다. 따라서 과학적 토대에 의해 미백활성이 검증된 새로운 식물자원의 도출 및 제시가 필요하다. 따라서 이미 미백작용을 갖는다고 알려져 있는 기존의 식물자원을 제외한 뛰어나고 새로운 식물자원을 이용한 화장품 원료의 개발은 외국회사에 대항하여 국내 천연 화장품 원료 산업 및 이와 연관된 농가의 소득원 제고에 크게 기여할 것으로 예측된다.

2. 경제·산업적 측면

국내 화장품 시장의 규모는 3 조원 규모이며 그 중 미백화장품의 시장규모는 1000 억 정도이다. 이는 1997년의 100 억 정도의 시장 규모에서 약 10 배 성장한 수치이며 사회적 요구와 소득의 향상으로 앞으로도 무한한 성장 잠재력을 가지고 있는 것으로 추정된다. 따라서 서양 및 일본의 공세에 맞서 국내 시장을 점유하기 위해서는 국가적, 사회적인 연구와 투자가 요구된다. 또한 최근 천연자원을 이용한 화장품의 수요가 폭발적으로 증가하고 있어 이에 부응하는 새로운 자원의 도출 및 이의 과학적 연구가 시급하다. 따라서 국내 화장품 미백시장의 확대에 따른 수요증대와 외국 업체의 공략에 대비하여 국내 식물 자원을 이용한 미백원료의 개발은 큰 의의를 가진다.

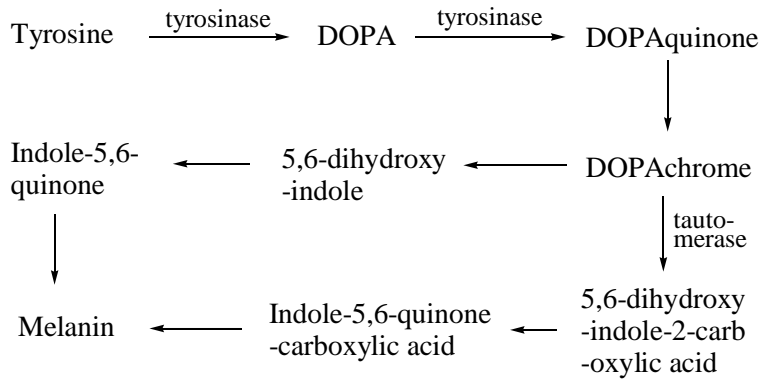
3. 사회·문화적 측면

국내 자생 식물자원을 이용한 미백원료의 개발은 우리 고유의 것을 이용한다는 점에서 문화적인 가치가 있으며 외국기업에 대항한 고유원료개발로 이어질 수 있다. 사회적으로는 우리의 식물자원에 새로운 고부가 가치를 부여한다는 점에서 큰 의의를 가진다.

제 2 장. 국내외 기술현황

제 1 절. 관련기술개발 현황

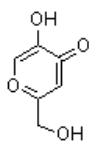
멜라닌은 자외선 등으로 인한 피부의 손상에 대항하여 생성되며 피부를 보호하는 작용을 한다. 멜라닌의 생합성 과정은 tyrosinase에 의한 tyrosine의 산화로 시작되어 DOPA와 DOPAchrome 등이 생성된 후 DHICA와 DHI를 거쳐 이루어지며 현재까지 DHI-eumelanin, DHICA-eumelanin, pheomelanin등의 3종이 생성되는 것으로 알려져 있다. 피부의 흑화는 피부세포내에 존재하는 멜라닌 생성세포(melanocyte)에서 생성된 멜라닌이 각질형성세포(keratinocyte)로 전달되어 피부 표피층에 축적되어 일어나게 된다.



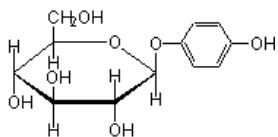
Melanin 생합성 과정

피부의 멜라닌 색소 과침착은 기미, 주근깨, 검은반점 등을 일으키는 요인이 되며 이러한 피부의 흑화를 예방 및 개선하기 위하여 kojic acid, arbutin, vitamin C 유도체 등이 미백제로 개발되어졌으나 kojic acid의 경우는 *in vitro*상의 tyrosinase 억제효과에 비해 세포상이나 *in vivo*상의 멜라닌 생성억제효과가 미비한 실정이며 또한 장기 사용시 간암을 유발할 수 있다는 보고가 최근에 되어

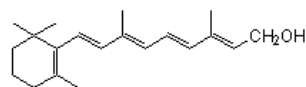
졌다. 또한 arbutin 은 hydroquinone계열이 갖는 세포독성의 문제점이 있으며 vitamin C 역시 화학적 안정성에 대한 문제가 있어 장기 보관이 어려운 문제점이 있다. 따라서 이에 대한 우수한 대체 미백제의 개발이 시급한 실정이다.



kojic acid



albutin



retinol

미백활성물질의 부작용 등이 발표되어짐에 따라 그 대체 원료로 여러 천연물 추출물을 이용한 기능성 미백화장품에 대한 연구가 활발히 진행되어져 상백피나 행인, 천화분 추출물 등이 미백원료로써 사용되고 있으나 그 효능이나 독성에 대한 확실한 검증이 충분치 못하고 아직까지 임상적 효과가 만족스럽지 못하여 새로운 대체 원료의 개발이 필요하다. 최근 국내뿐만 아니라 중국 등의 소득수준 향상과 미용에 대한 관심증대에 따라 기능성 미백화장료의 시장이 날로 증대되고 있으며 이의 선점을 위해 유럽, 일본 등의 막대한 투자가 이어지고 있다. 우리나라에서도 몇몇 대기업의 연구부문 투자가 이루어지고 있으나 소수의 기업에 국한되고 있는 실정이며 국내 화장품 업계에서는 주로 동의보감 등 한방적 지식, 이론에 의거한 이미지 위주의 화장품 시판에 주력하고 있어 외국기업에 대항하여 보다 과학적이고 체계적인 연구를 통한 실질적 효과를 나타낼 수 있는 원료의 개량이 필요하다.

제 2 절. 기술개발 위치

최근의 화장품 산업의 추세는 천연물을 이용하는 것의 비율이 급격히 늘어나고 있으며 따라서 경쟁력 있는 미백활성 식물 추출물 및 그 성분 에 대한 연구는 무한한 가능성을 가진다. 아울러, 멜라닌 생성 억제 활성이 뛰어나고 세포독성이

적은 단일물질을 도출한다면 이를 기반으로 향후 무한한 미백원료시장의 선도를 위한 기반을 구축할 수 있다. 본 연구는 아직까지 멜라닌 생성억제 활성이 알려지지 않은 새로운 국내자생식물을 미백의 원료로써 새로운 가치를 부여하고 이를 화장료 원료로 도출코자 하는 것으로 활성 1 차 검색을 통하여 선발된 기존에 알려지지 않은 자생식물인 도깨비 부채(*Rodgersia podophylla*), 쇠고비(*Cyrtomium fortunei* J Smith), 도깨비 고비(*Cyrtomium falcatum*), 3 종을 후보군으로 압축하여 연구를 실시하였다. 문헌조사 결과 도깨비 부채는 주요성분으로 bergenin을 함유하고 있는 것으로 보고되어 있으며 그 활성에 대한 연구는 미비하였으며 또한 쇠고비와 도깨비 고비도 아직까지 그 성분 및 활성에 대한 연구가 미비한 미개척 식물자원으로 신규성에서 높은 가치를 가지고 있었다.

제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절. 실험시료의 조제

1. 자생식물재료

본 연구에서 사용된 자생식물시료는 도깨비 부채(*Rodgersia podophylla*), 쇠고비(*Cyrtomium fortunei* J. Smith), 도깨비 고비(*Cyrtomium falcatum*)로써 2005년 6월에 충청북도에서 각각 10 kg씩 채취된 것을 증류수로 세척 후 뿌리와 잎+줄기(지상부) 부분으로 나누고 50℃에서 36 시간 열풍건조 하여 자생식물시료를 제조하였다. 본 연구에서 사용된 자생식물의 사진은 Fig. 1에 나타내었고 건조 후의 부위별 수율은 Table. 1과 같다.



Fig. 1 Photograph of three kind of plant samples used in this study

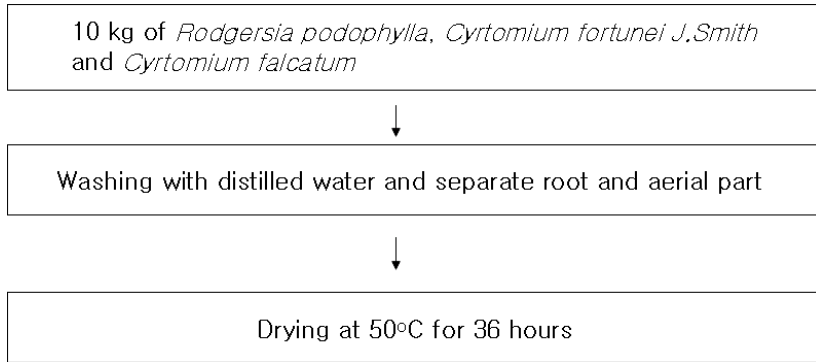


Fig. 2 Production of dried plant materials

Table 1. Weights of dried products obtained from 10 kg of Fresh plants

	Roots (g)	Leaves (g)	Total (g)
<i>Rodgersia podophylla</i>	679.8	59.5	739.3
<i>Cyrtomium fortunei</i> J. Smith	534.6	225.5	760.1
<i>Cyrtomium falcatum</i>	86.8	192.6	279.4

2. 시료의 유효성분 추출 및 제조

시료의 추출은 건조시료를 마쇄한 후 메탄올과 증류수 용매를 사용하여 상온에서 1 시간 씩 3 회 반복하여 초음파 추출 하였다. 얻어진 추출액은 여과지로 여과하고 상등액을 취하여 회전 감압 농축기를 이용하여 완전 농축시켜 메탄올 추출물과 물 추출물을 제조하였다. 이후 메탄올 추출물은 추가로 에틸아세테이트 가용성 분획과 물 가용성 분획으로 나누었으며 제조된 각각의 시료의 추출수율

은 Table 2 와 Table 3 에 나타내었다.

Table 2. Yields of Plant Extracts

Samples		Yields (Methanol extract)	Yields (Water extract)
<i>Rodgersia</i>	Roots	8.6%	10.2%
<i>podophylla</i>	Leaves	10.5%	19.7%
<i>Cyrtomium</i>	Roots	1.9%	7.8%
<i>fortunei J Smith</i>	Leaves	8.5%	10.3%
<i>Cyrtomium</i>	Roots	6.8%	11.1%
<i>falcatum</i>	Leaves	6.5%	9.5%

Each value represents the % in drying materials

Table 3. Yields of Each Fraction of Methanol Extract

Samples		Yields (EA fraction)	Yields (Water fraction)
<i>Rodgersia</i>	Roots	2.2%	0.5%
<i>podophylla</i>	Leaves	3.2%	1.5%
<i>Cyrtomium</i>	Roots	0.1%	1.3%
<i>fortunei J Smith</i>	Leaves	0.6%	1.1%
<i>Cyrtomium</i>	Roots	0.4%	1.1%
<i>falcatum</i>	Leaves	0.2%	5.7%

Each value represents the % in drying materials

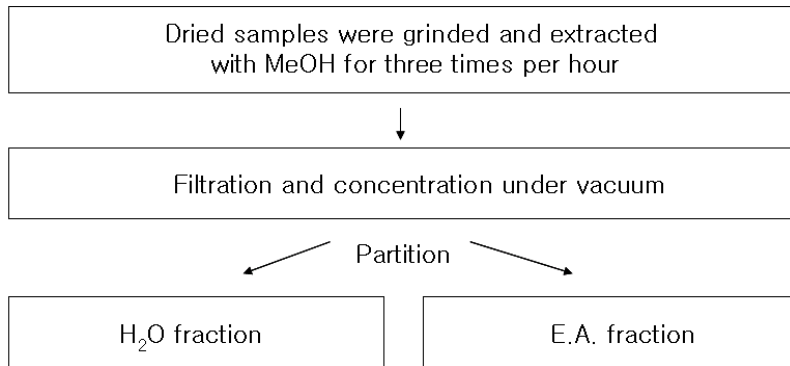


Fig. 3 Production of MeOH extract materials

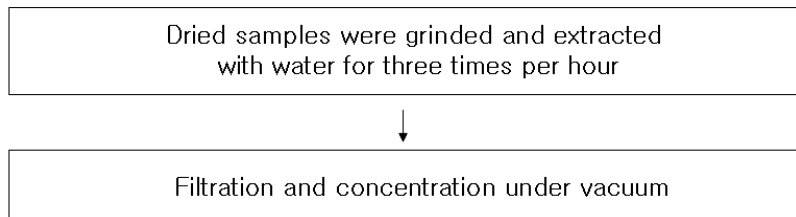


Fig. 4 Production of water extract materials

각 자생식물의 추출시료를 TLC (진개용매: Methylene chloride/Methanol=9/1) 하여 1차적으로 도깨비 부채의 성분으로 알려져 있는 bergenin과 식물계에 존재하는 미백활성성분으로 보고되어 있는 물질 중 caffeic acid, quercetin, fisetin과의 Rf 값을 비교한 결과 이들 물질과 일치하거나 유사한 계열로 추정되는 Rf 값이 유사한 물질의 spot들이 주로 MeOH 추출물과 이의 EA분획물에 존재함을 알 수 있었고 물 추출물에는 거의 존재하지 않았다. 자생식물 중에서는 도깨비 부채와 쇠고비에, 부위로는 잎보다는 뿌리쪽에 많이 존재하였다 (Fig. 5)



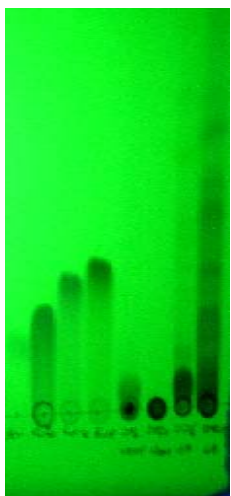
A B C D E F G H

Rodgersia podophylla (RP)
MeOH extracts and E.A. fraction



A B C D I J K L

Rodgersia podophylla (RP)
water extracts and water fraction



A B C D M N O P

Cyrtomium fortunei J Smith (CS)
MeOH extracts and E.A. fraction



A B C D Q R S T

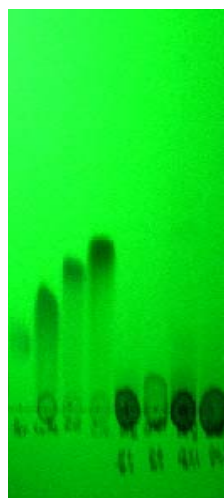
Cyrtomium fortunei J Smith (CS)
water extracts and water fraction



A B C D U V W X

Cyrtomium falcatum (CF)

MeOH extracts and E.A. fraction



A B C D Y Z * **

Cyrtomium falcatum (CF)

MeOH extracts and E.A. fraction

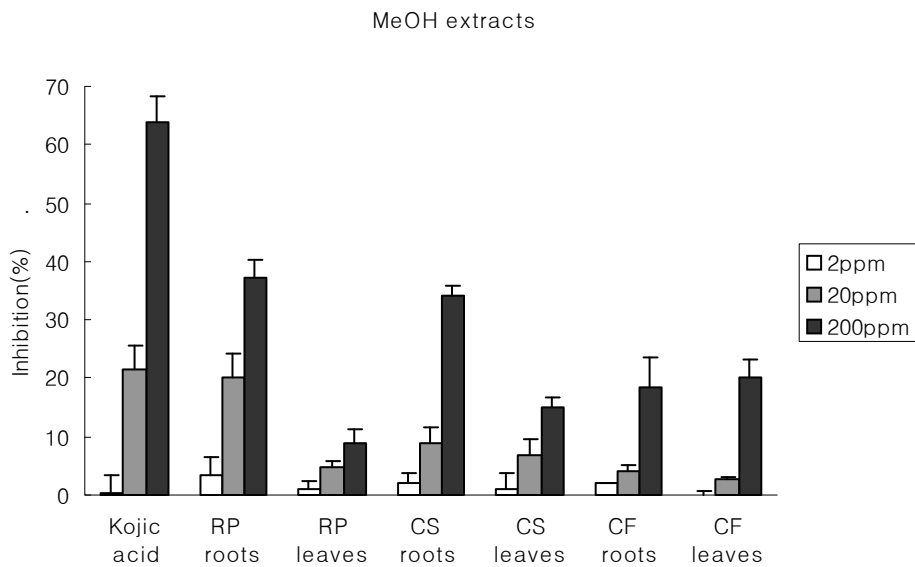
Fig. 5 TLC of Each Plant Sample

A: bergenin, B: Caffeic acid, C: fisetin D: quercetin, E: RP leaves(MeOH ex.), F: RP roots(MeOH ex.), G: RP leaves(E.A. fr.), H: RP roots(E.A. fr.), I: RP leaves(water ex.), J: RP roots(water ex.), K: RP leaves(water fr.), L: RP roots(water fr.), M: CS leaves(MeOH ex.), N: CS roots(MeOH ex.), O: CS leaves(E.A. fr.), P: CS roots(E.A. fr.), Q: CS leaves(water ex.), R: CS roots(water ex.), S: CS leaves(water fr.), T: CS roots(water fr.), U: CF leaves(MeOH ex.), V: CF roots(MeOH ex.), W: CF leaves(E.A. fr.), X: CF roots(E.A. fr.), Y: CF leaves(water ex.), Z: CF roots(water ex.), *: CF leaves(water fr.), **: CF roots(water fr.)

제 2 절. 제조된 시료의 색소조절관련 활성측정

1. Tyrosinase 활성 억제도 측정

멜라닌 생성 초기과정에 주요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 기질로 8.0 mM L-dopa (67 mM phosphate buffer, pH 6.8 에 녹임) 120 μ l 와 메탄올 40 μ l에 녹인 여러 농도의 검색시료를 96-well microplate에 넣고 섞은 후 mushroom tyrosinase (125 U/ml, 67 mM phosphate buffer, pH 6.8 에 녹임) 40 μ l를 가하고 20분 후에 생성된 dopachrome의 양을 492 nm에서의 흡수도를 측정하여 저해도를 계산하였다. 저해도는 $(\text{Control OD}_{492} - \text{Sample OD}_{492}) / \text{Control OD}_{492}$ 로 계산하였으며 각 자생식물시료의 메탄올 추출물과 물 추출물의 tyrosinase 억제활성 저해도는 Fig. 6 과 같다.



Water extracts

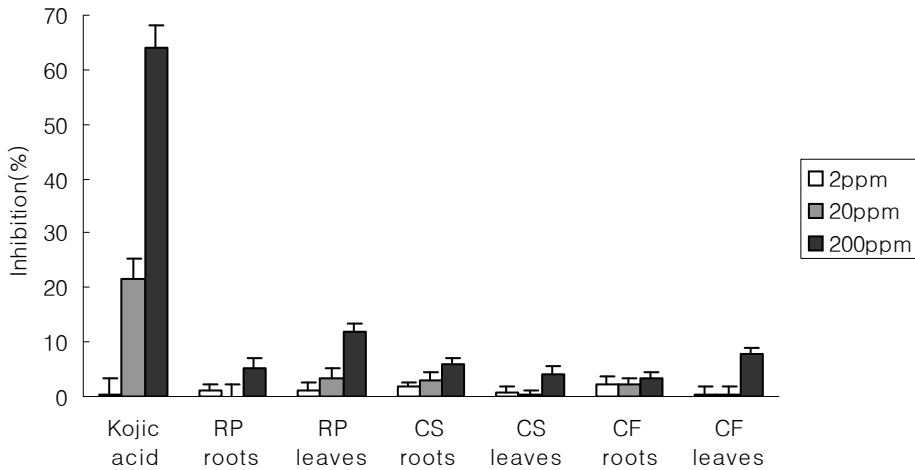
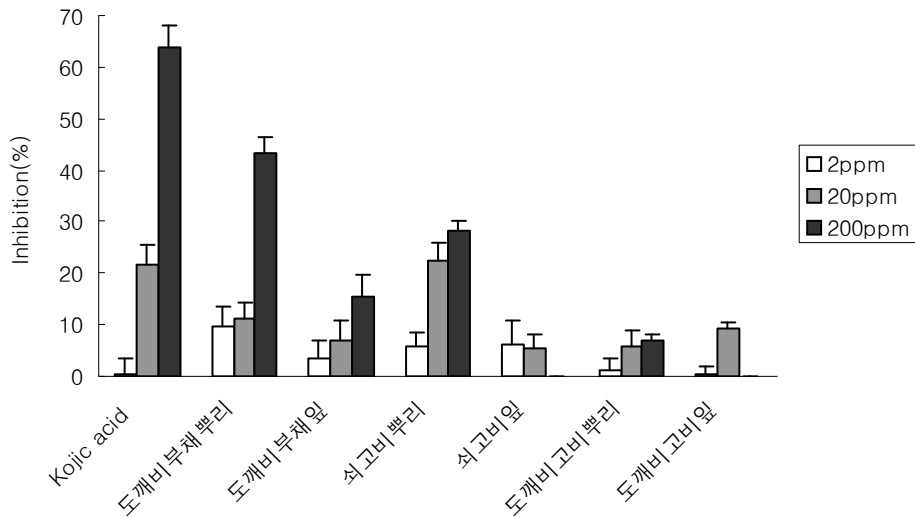


Fig. 6 Tyrosinase inhibitory effects of MeOH/H₂O extract

RP: *Rodgersia podophylla*, CS: *Cyrtomium fortunei* J Smith, CF: *Cyrtomium falcatum*. Kojic acid was used as positive control.

3 종의 자생식물 중 전체적으로 도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비고비의 순으로 높은 tyrosinase 억제활성을 나타냈으며 잎부분보다는 뿌리부분의 억제효과가 뛰어난 경향을 나타냈다. 또한 메탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 활성을 보여 이의 결과를 종합할 때 도깨비 부채 뿌리와 쇠고비 뿌리의 메탄올 추출물이 tyrosinase 억제활성 면에서 우수한 자원으로 판단된다. 한편 도깨비고비는 비교적 약한 활성이나 특이적으로 잎과 뿌리가 비슷한 tyrosinase 억제활성을 나타냈다.

물 추출물보다 우수한 억제활성을 나타낸 메탄올 추출물을 다시 에틸아세테이트 가용성 분획과 물 가용성 분획으로 나누어 활성을 측정 한 결과 에틸아세테이트 분획이 높은 활성을 보여 활성성분은 극성이 상대적으로 낮은 에틸아세테이트 분획물에 주로 존재하는 것으로 판단된다 (Fig. 7).



* Inhibitions of CS leaves and CF leaves at 200 ppm were not able to measure due to absorption of the samples.

Water fraction of MeOH extracts

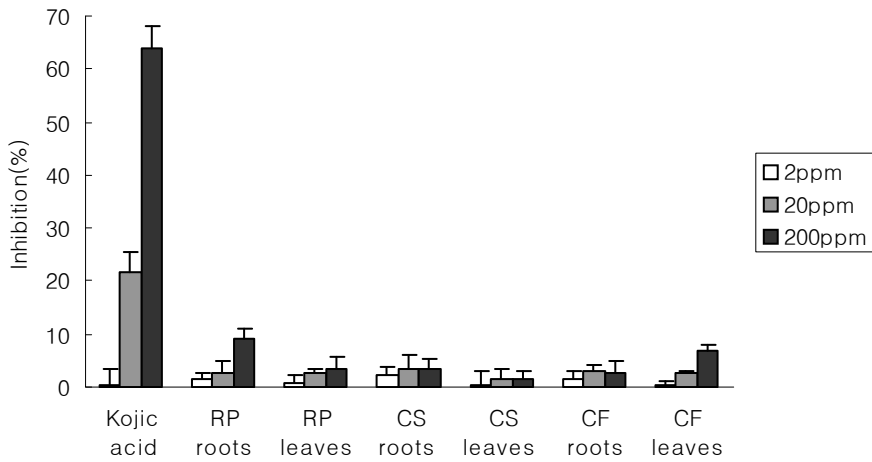


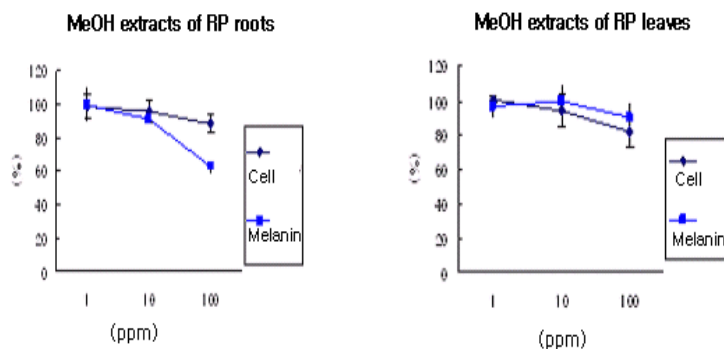
Fig. 7 Tyrosinase inhibitory effects of EA/H₂O fraction of MeOH extracts.

RP: *Rodgersia podophylla*, CS: *Cyrtomium fortunei* J Smith, CF: *Cyrtomium*

falcatum. Kojic acid was used as positive control.

2. 멜라닌 생성세포에서의 멜라닌 생성억제활성

피부의 색은 주로 멜라닌에 의하여 결정되며 멜라닌의 생성은 피부의 표피와 진피사이에 존재하는 멜라닌 생성세포에서 이루어진다. 제조된 각각의 자생식물 시료가 마우스 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포주에서 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 10% FBS (fetal bovine serum) 과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate 이 함유된 RPMI 1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 EtOH / 3차 증류수 = 6 / 4 용액에 녹인 각각의 시료를 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml의 농도로 3 일간 처리한 결과 도깨비 부채의 뿌리 메탄올 추출물은 100 ppm에서 큰 세포 독성 없이 37.5%의 멜라닌 생성을 억제하였으며 쇠고기 뿌리 메탄올 추출물도 100 ppm에서 큰 세포독성 없이 28.2%의 억제활성을 나타냈다 (Fig. 8). 잎 부분의 메탄올 추출물은 뿌리에 비해 낮은 활성을 나타내었으며 도깨비 고비 잎이 100 ppm에서 세포생존을 대비 약 11%의 멜라닌 생성 감소활성을 보였다. 한편, 자생식물 3 종 모두 물 추출물은 활성이 없거나 크지 않았다.



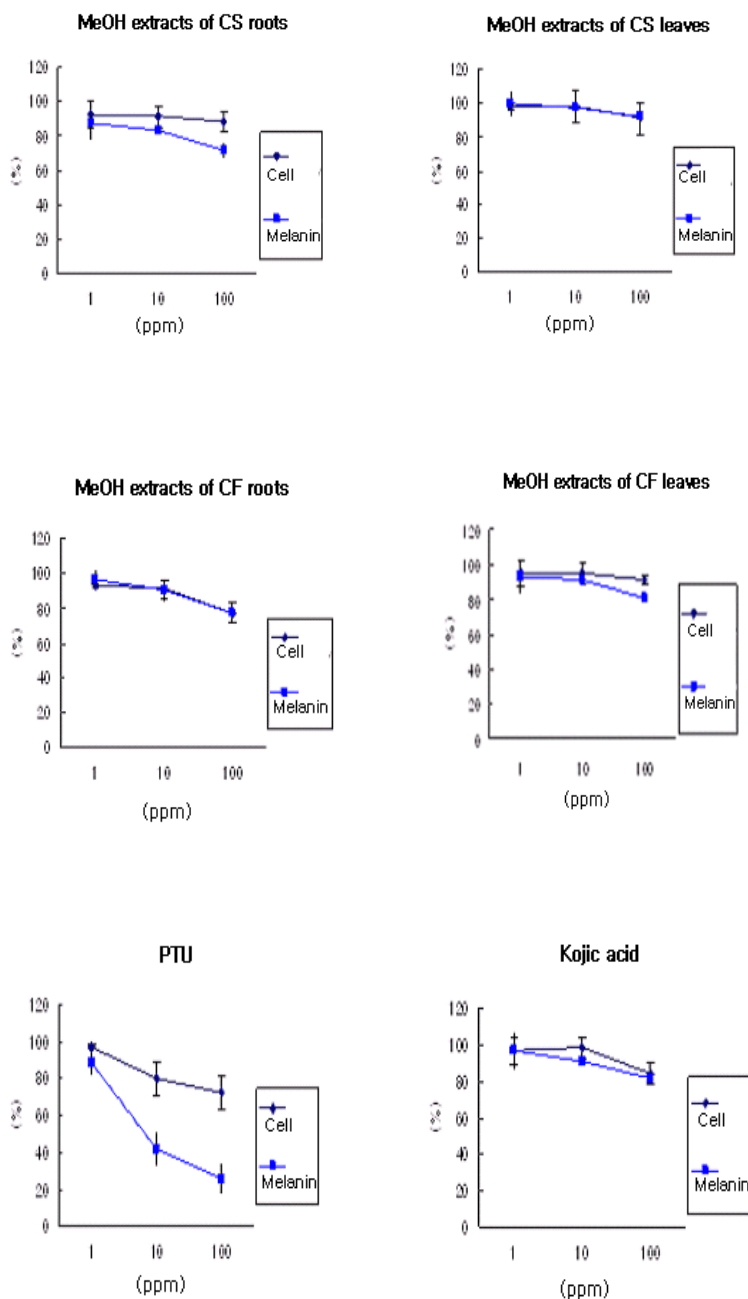


Fig. 8. Effects of MeOH extracts of each sample on cell growth and melanin production of melan-a cells

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%. RP: *Rodgersia podophylla*, CS: *Cyrtomium fortunei* J Smith, CF: *Cyrtomium falcatum*. Pheylthio urea (PTU) and kojic acid were used as positive control.

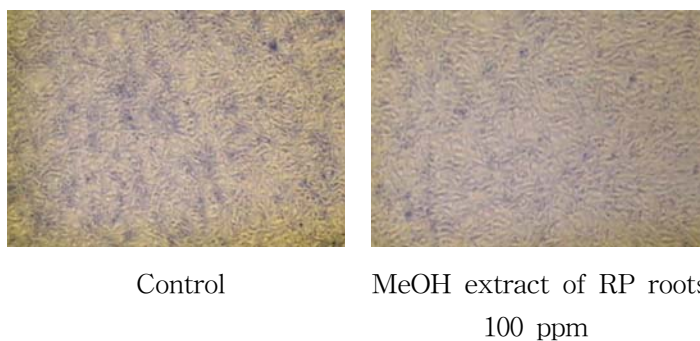
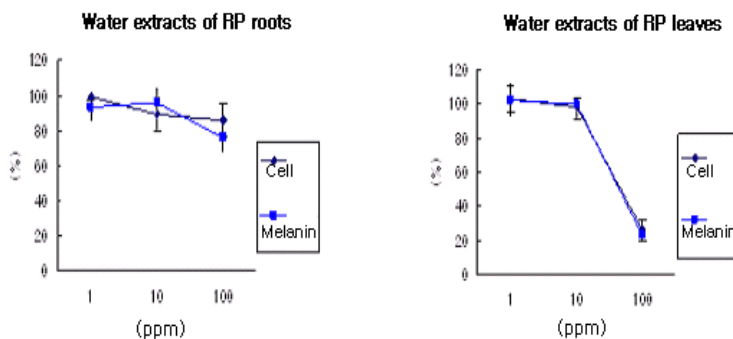


Fig. 9. Photograph of melan-a cells in 100 ppm concentration of *Rodgersia podophylla* MeOH extract. The samples were treated for three days.



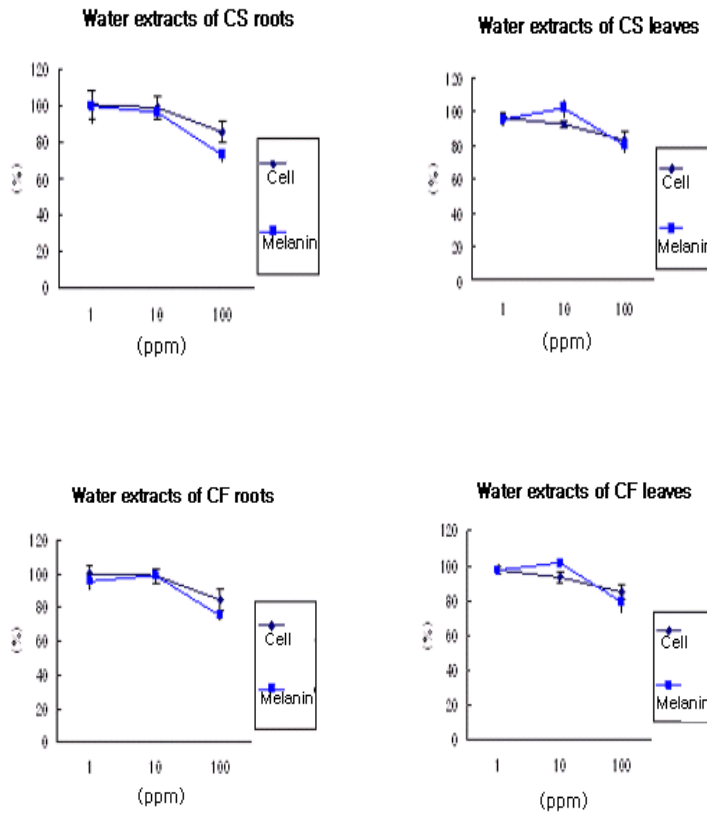


Fig. 10. Effects of Water Extracts of Each Sample on Cell Growth and Melanin Production of Melan-a Cells

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

우수한 활성을 나타낸 MeOH 추출물을 증류수에 녹여 E.A.분획물과 물분획물로 나누어 활성을 측정된 결과 물 분획물은 활성을 나타내지 않았고 E.A.분획물은 MeOH 추출물에 비하여 고농도에서 독성이 증가하는 경향을 나타냈으나 MeOH 추출물에서 우수한 활성을 보였던 도깨비 부채 뿌리나 쇠고기 뿌리등의 멜라닌 억제 활성이 E.A.분획물에서 나타나는 것으로 보아 활성물질들은 E.A.분획물로 전이 되는 것으로 판단된다.

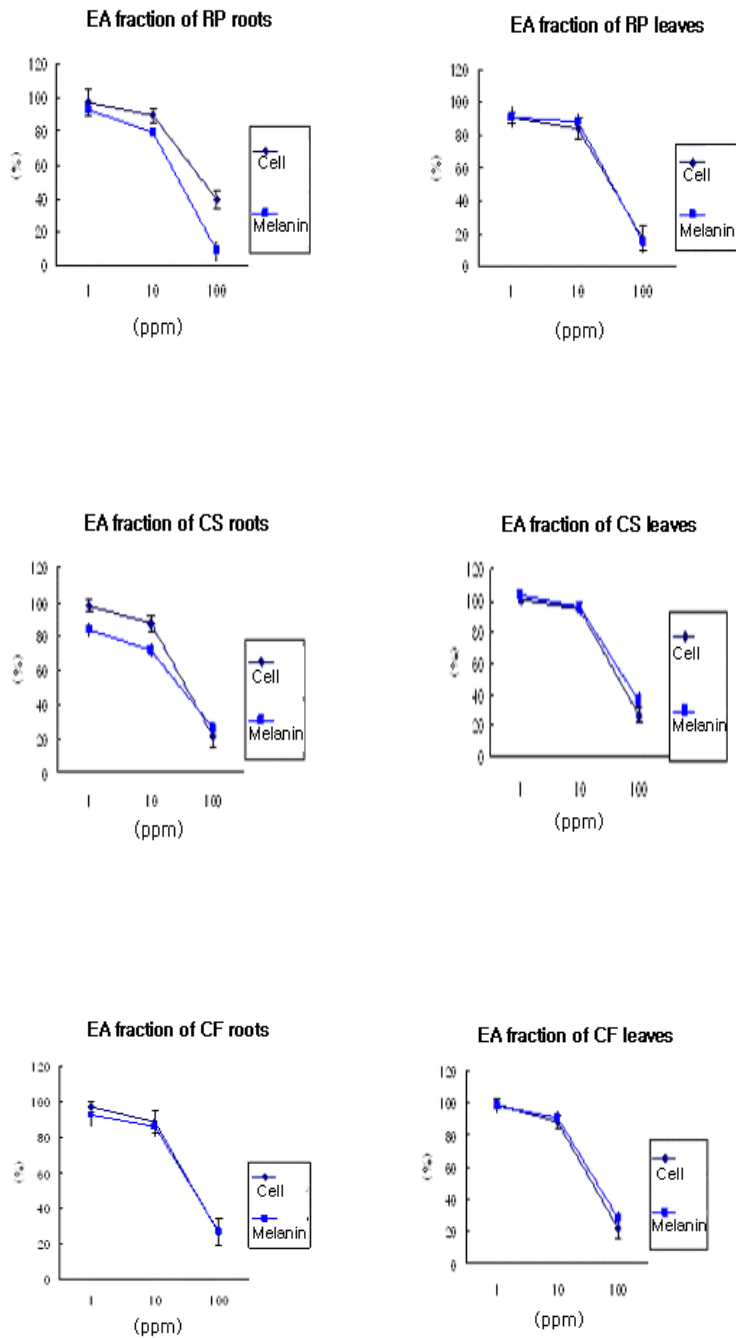
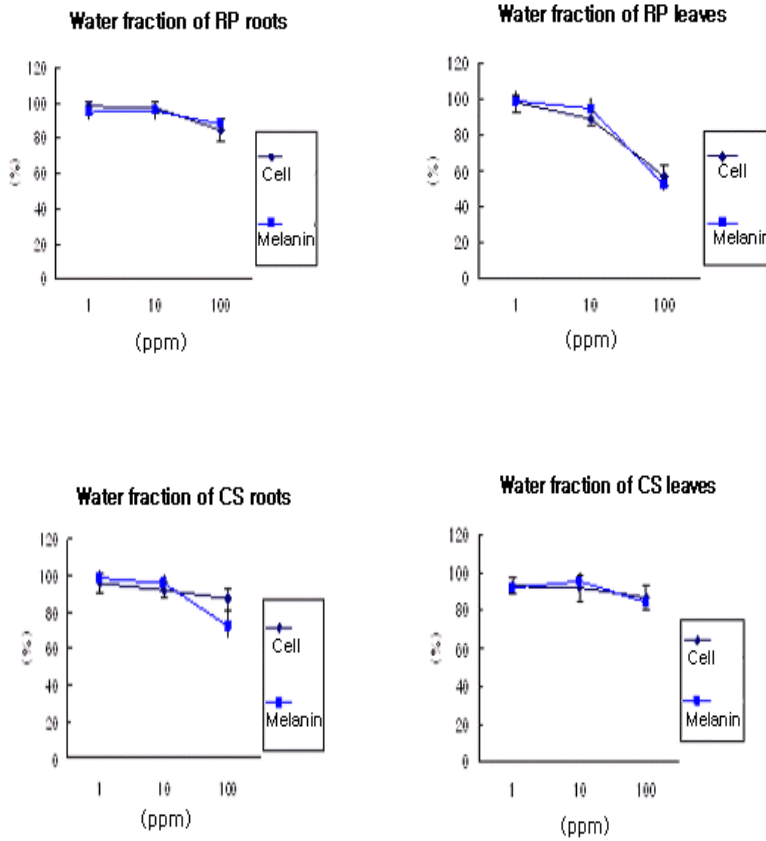


Fig. 11. Effects of EA Fractions of MeOH Extracts on Cell Growth and

Melanin Production of Melan-a Cells

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%



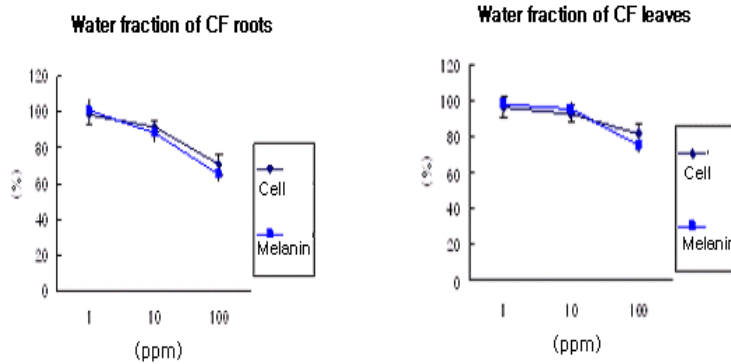
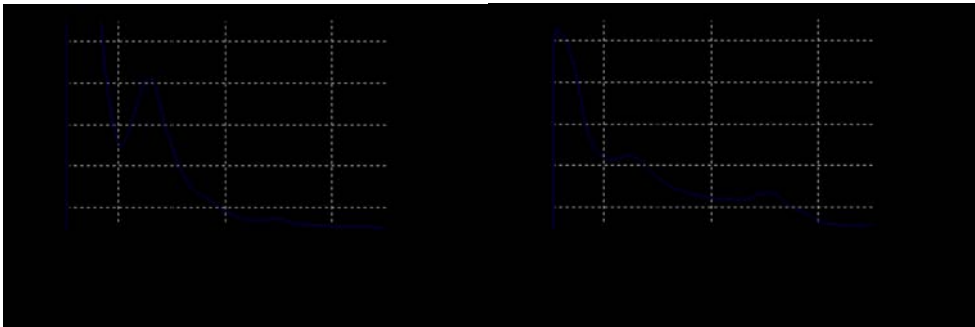


Fig. 12. Effects of Water Fractions of MeOH Extracts on Cell Growth and Melanin Production of Melan-a Cells

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%

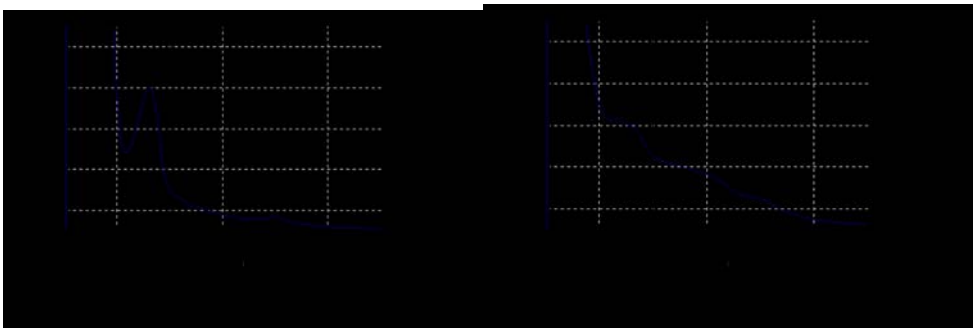
3. 자외선 차단효과 측정

자외선 영역 중 UV-A (350-370 nm) 는 파장이 길어 피부 진피층까지 침투 할 수 있으며 유리를 통과할 수 있는 자외선 영역으로 즉시형 색소침착을 일으킨다. 반면 UV-B 영역은 UV-A에 비해 파장이 짧아 피부 깊숙이 침투하지 않지만 에너지가 높아 일광화상을 유발시키며 노출 후 72 시간 이후부터 색소침착이 나타나는 지연형 색소침착을 일으킨다. 200-500 nm 영역의 흡수도를 측정한 결과 도깨비 부채 뿌리와 쇠고기 뿌리의 MeOH 추출물과 이의 EA분획물이 UV-B 영역의 자외선을 특징적으로 흡수하는 것을 확인하였다. 따라서 이들 시료는 피부에 도포시 UV-B 영역의 자외선을 차단하여 일광화상 및 지연형 색소침착을 막는 효과를 기대할 수 있다.



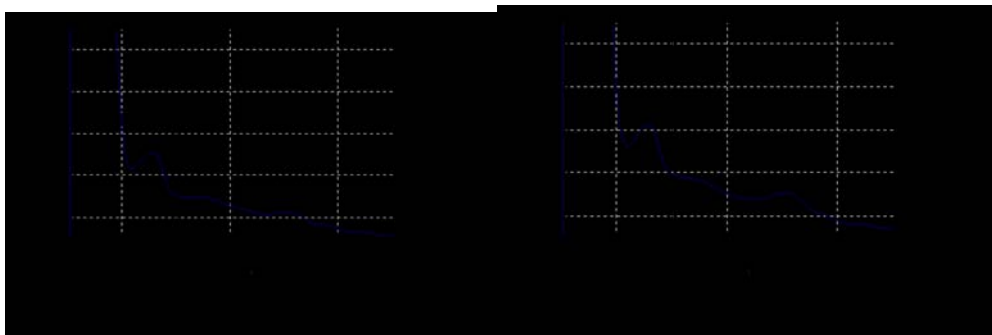
RP roots (MeOH ex, 50 ppm)

RP leaves (MeOH ex, 50 ppm)



CS roots (MeOH ex, 50 ppm)

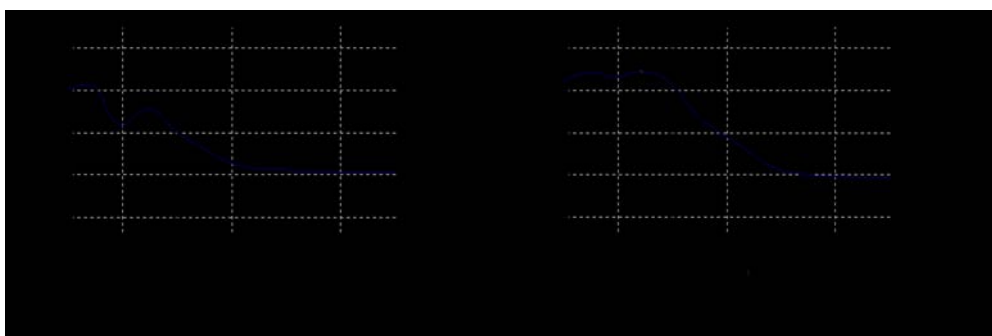
CS leaves (MeOH ex, 50 ppm)



CF root (MeOH ex, 50 ppm)

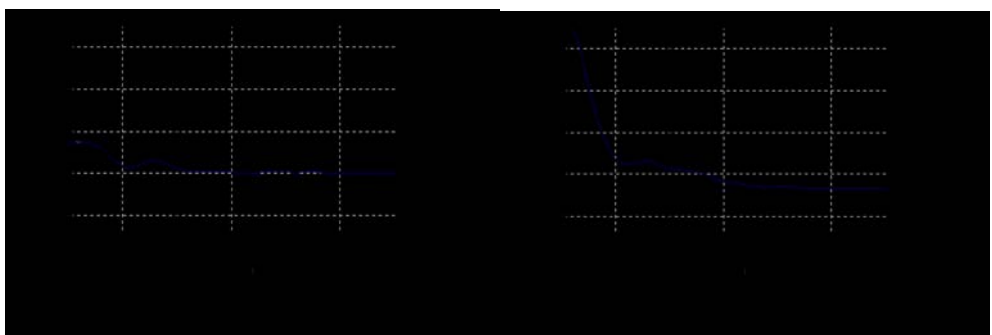
CF leaves (MeOH ex, 50 ppm)

Fig. 13. UV-absorption of MeOH extracts at UV-A and UV-B region



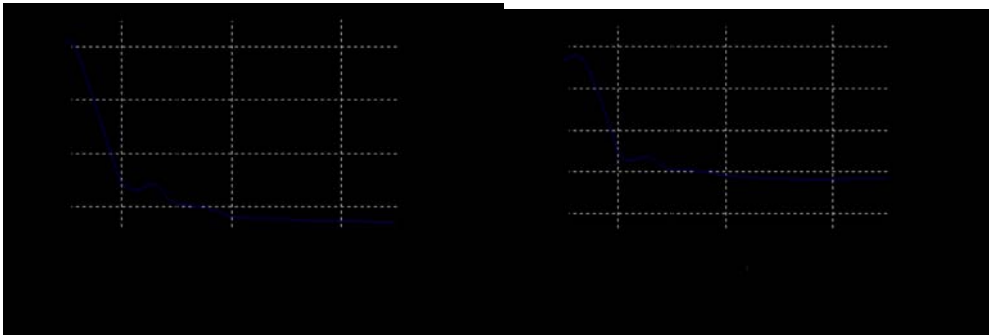
RP roots (water ex, 100 ppm)

RP leaves (water ex, 100 ppm)



CS roots (water ex, 100 ppm)

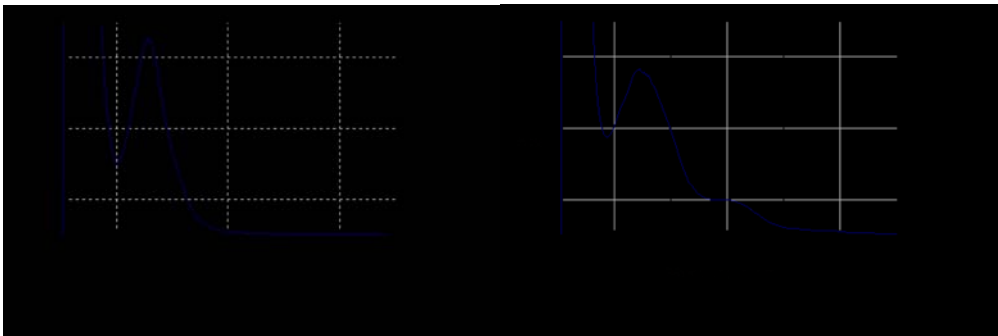
CS leaves (water ex, 100 ppm)



CF roots (water ex, 100 ppm)

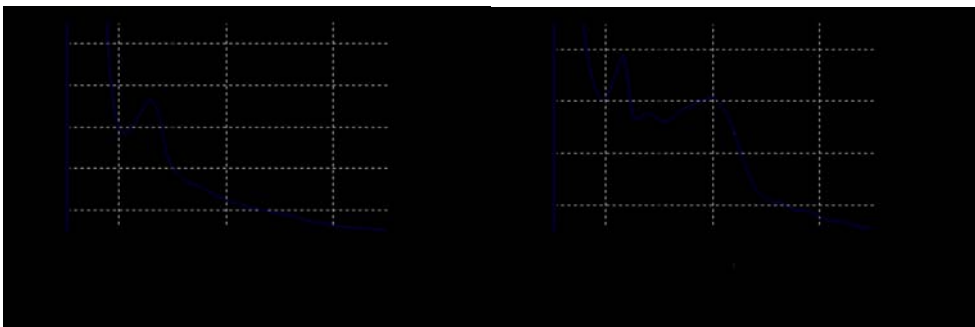
CF leaves (water ex, 100 ppm)

Fig. 14. UV-absorption of water extracts at UV-A and UV-B region



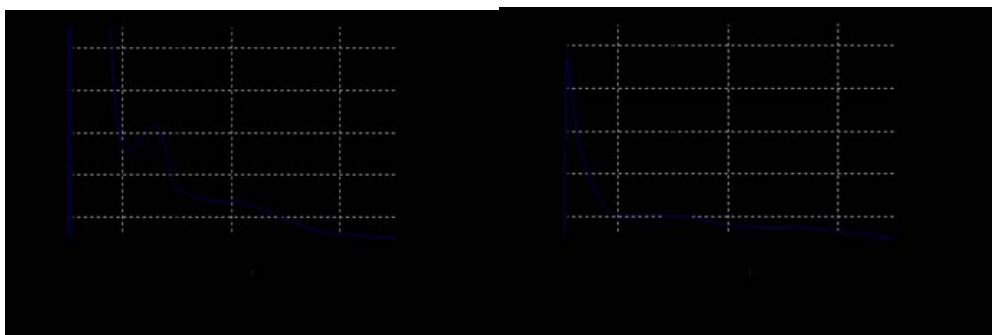
RP roots (E.A. fr, 50 ppm)

RP leaves (E.A. fr, 50 ppm)



CS roots (E.A. fr, 50 ppm)

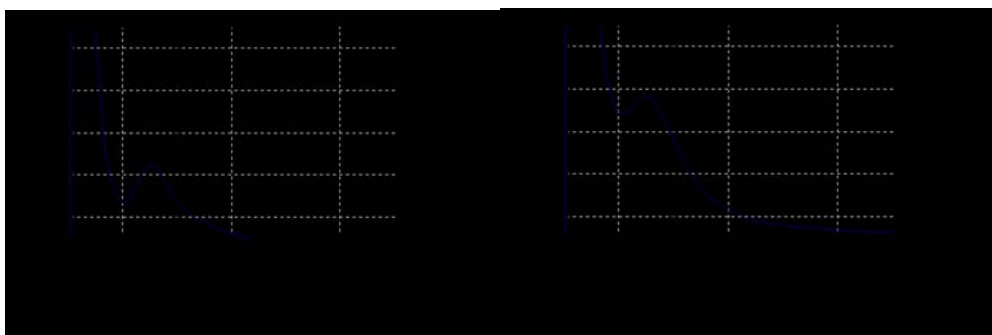
CS leaves (E.A. fr, 50 ppm)



CF roots (E.A. fr, 50 ppm)

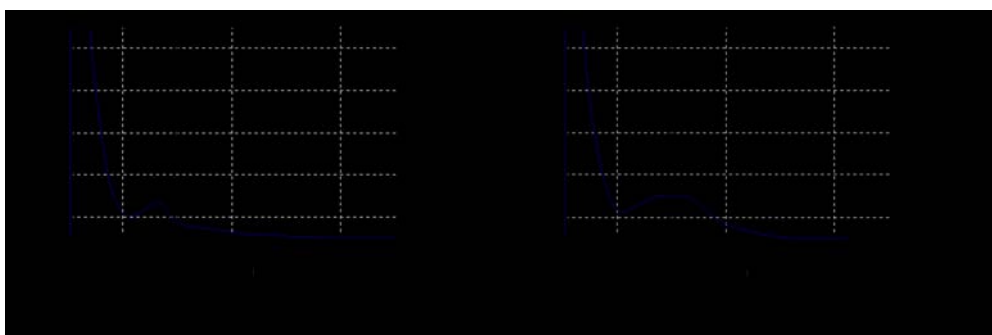
CF leaves (E.A. fr, 50 ppm)

Fig. 15. UV-absorption of E.A. fraction of MeOH extract at UV-A and UV-B region



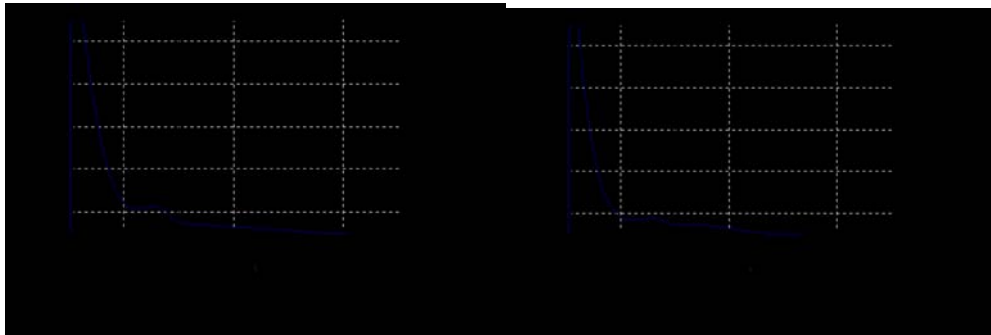
RP roots (water fr, 50 ppm)

RP leaves (water fr, 50 ppm)



CS roots (water fr, 50 ppm)

CS leaves (water fr, 50 ppm)



CF roots (water fr, 50 ppm)

CF leaves (water fr, 50 ppm)

Fig. 16. UV-absorption of water fraction of MeOH extract at UV-A and UV-B region

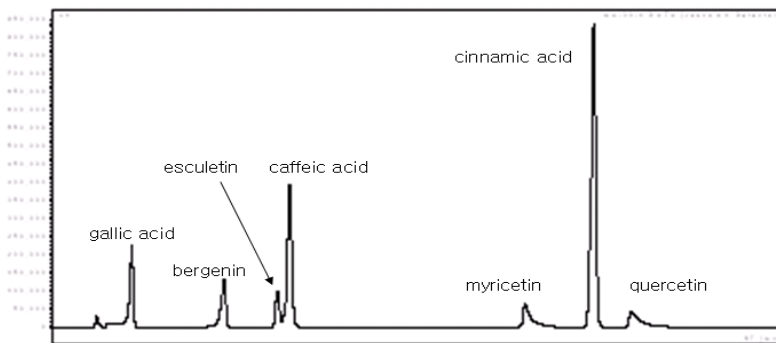
선발된 3 종 자생식물의 tyrosinase 활성에 미치는 영향, 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향, 자외선 차단효과 등을 측정한 결과 도깨비 부채 뿌리의 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 모든 부분에서 우수한 활성을 보여 가장 우수한 자원으로 판단되며 쇠고기 뿌리 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 역시 높은 활성을 보였다. 한편 잎부분은 전체적으로 활성이 낮았으나 도깨비 고비잎의 메탄올 추출물은 효소와 세포상, UV-차단활성에서 약간의 미백활성을 보였다.

제 3 절. 미백성분의 탐색 및 정량

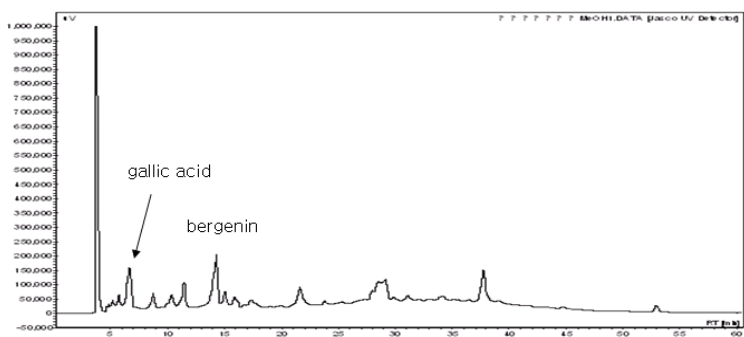
1. 유효성분의 HPLC 정량

각 자생식물의 추출시료를 도깨비 부채의 성분으로 알려져 있는 bergenin과 식물계에 존재하는 미백활성성분으로 보고되어 있는 물질 중 gallic acid, bergenin, esculetin, caffeic acid, myricetin, cinnamic acid, quercetin 등의 7 종을 선별하여 존재여부를 HPLC를 이용하여 확인하고 정량하였다.

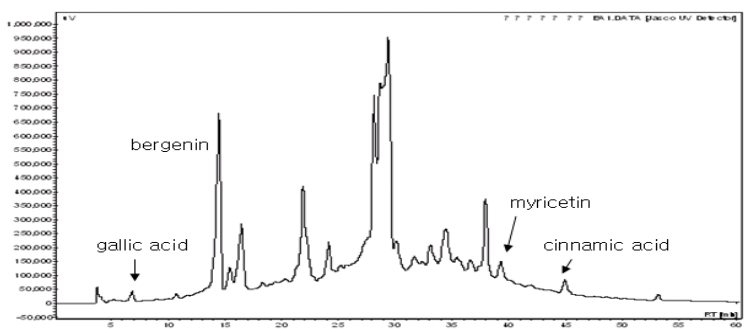
시료액은 완전 농축된 추출물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 um syringe filter (Millipore)로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다. HPLC는 Jasco Co. (Japan)의 분석용 liquid chromatography를 사용하였다. Column은 dondpack C18 (4 um, 300 × 3.9 mm)을 사용하였고 이동상은 2% acetic acid가 함유된 증류수와 0.5% acetic acid가 함유된 50% acetonitrile을 gradient를 주어 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. Column의 온도는 40℃로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. 모든 시료는 3 회 반복 실험하여 평균치를 산출 하였다. 기준물질인 gallic acid, bergenin, esculletin, caffeic acid, myricetin, cinnamic acid, quercetin 등을 메탄올에 녹여 ODS-H80 reverse phase column을 사용하여 위의 재료 및 방법에 기술된 조건으로 용출시켰을 때 각각 5.8, 13.4, 18.2, 19.2, 38.5, 43.9, 47.3 분에서 검출되었다 (Fig. 17). 도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비 고비의 메탄올 추출물, 물 추출물, 에틸아세테이트 분획물을 정량한 결과는 Table 4. 와 같다. 이들 물질은 주로 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획물에 존재함을 알 수 있었고 물 추출물에는 거의 존재하지 않았다. 자생식물 중에서는 도깨비 부채와 쇠고비에, 부위로는 잎보다는 뿌리부분에 많이 존재하였다. 도깨비 부채 뿌리는 bergenin가 다량 함유되어 있었으며 gallic acid, myricetin, cinnamic acid 등이 존재하였다. 잎부위의 성분은 유사한 경향을 보였으나 함량면에서 상대적으로 적은량이 검출되었다. 쇠고비는 뿌리에서는 caffeic acid, 잎에서는 esculletin 등이 검출되었고 도깨비고비 잎에서는 caffeic acid, myricetin, cinnamic acid등이 소량 존재 하였다. 또한 추출용매별로는 메탄올과 이의 에틸아세테이트 분획물에서 높은 함량을 보였다.



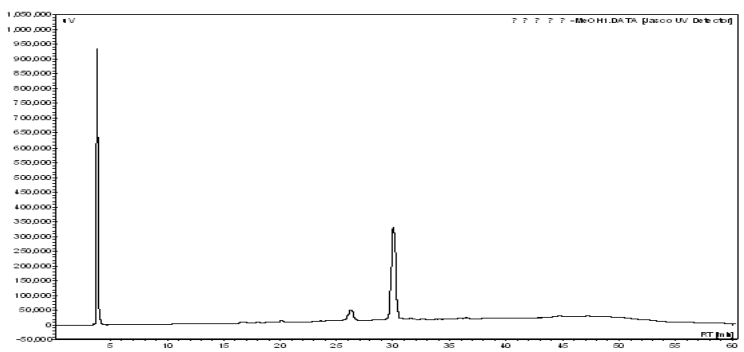
standards



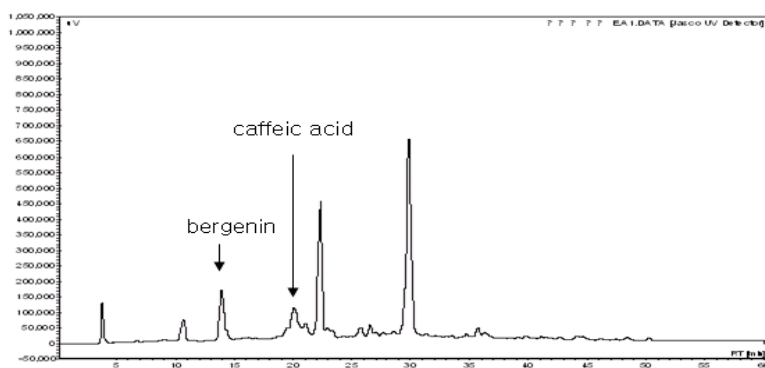
Rodgersia podophylla roots (MeOH ex)



Rodgersia podophylla roots (E.A. fr)



Cyrtomium fort unei J smith (MeOH ex)



Cyrtomium fortunei J. Smith (E.A. fr)

Fig. 17. HPLC chromatogram of representative samples

Table 4. Comparison of contents in various samples of three plants (%)

Samples		gallic acid	bergenin	esculetin	caffeic acid	myricetin	cinnamic acid	quercetin
<i>Rodgersia podophylla</i> (roots)	EA fraction	0.07	3.01	-	-	0.57	0.03	-
	MeOH extract	0.36	0.87	-	-	-	-	-
	Water extract	0.01	0.09	-	-	-	-	-
<i>Rodgersia podophylla</i> (leaves)	EA fraction	0.22	1.39	-	-	0.60	0.02	-
	MeOH extract	0.29	0.04	-	-	-	-	-
	Water extract	0.02	-	-	-	-	-	-

Cyrtomium fortunei J smith (roots)	EA fraction	-	0.72	-	0.28	-	-	-
	MeOH extract	-	-	-	0.01	-	-	-
	Water extract	-	-	-	-	-	-	-
Cyrtomium fortunei J smith (leaves)	EA fraction	-	-	0.97	-	-	0.08	0.27
	MeOH extract	-	-	0.07	-	-	-	-
	Water extract	-	-	-	-	-	-	-
Cyrtomium falcatum (roots)	EA fraction	-	-	-	0.14	-	0.05	-
	MeOH extract	-	-	-	0.02	-	-	-
	Water extract	-	-	-	-	-	-	-
Cyrtomium falcatum (leaves)	EA fraction	-	-	-	0.04	0.20	0.04	-
	MeOH extract	-	-	-	0.03	-	0.01	-
	Water extract	-	-	-	-	-	-	-

2. 미백활성성분의 분리 및 구명

가장 우수한 자원으로 선발된 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물을 앞의 분획결과에 따라 활성이 없는 물가용성 분획물을 제거하고 에틸아세테이트 가용성 분획물을 대상으로 활성추적방법을 사용하여 활성물질을 분리, 구명코자 하였다. 본 연구에서 수행한 분리, 정제 과정의 모식도는 Fig. 18 과 같다.

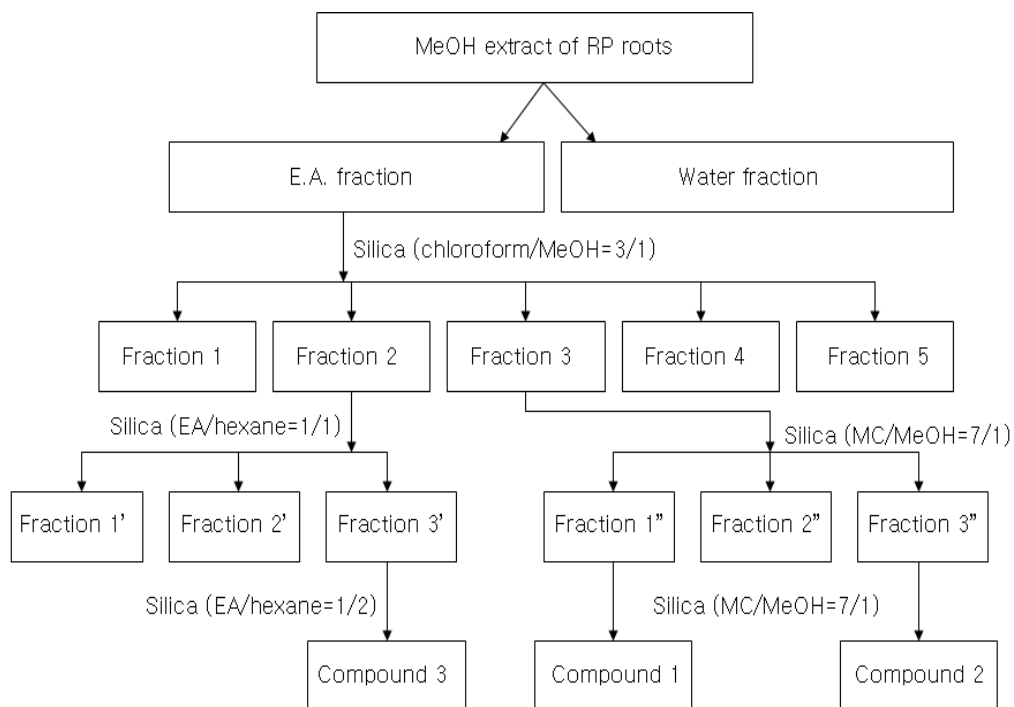


Fig. 18 Isolation process of compound 1, 2 and 3 in roots of *Rodgersia podophylla*

먼저 도깨비 부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물 2 g을 silica gel을 이용하여 chloroform /MeOH = 3/1 용매로 1차 정제하여 1차 정제물 1-5 를 얻었다. 1차 정제물의 멜라닌 생성세포에서의 활성을 측정한 결과는 Fig. 19와 같다.

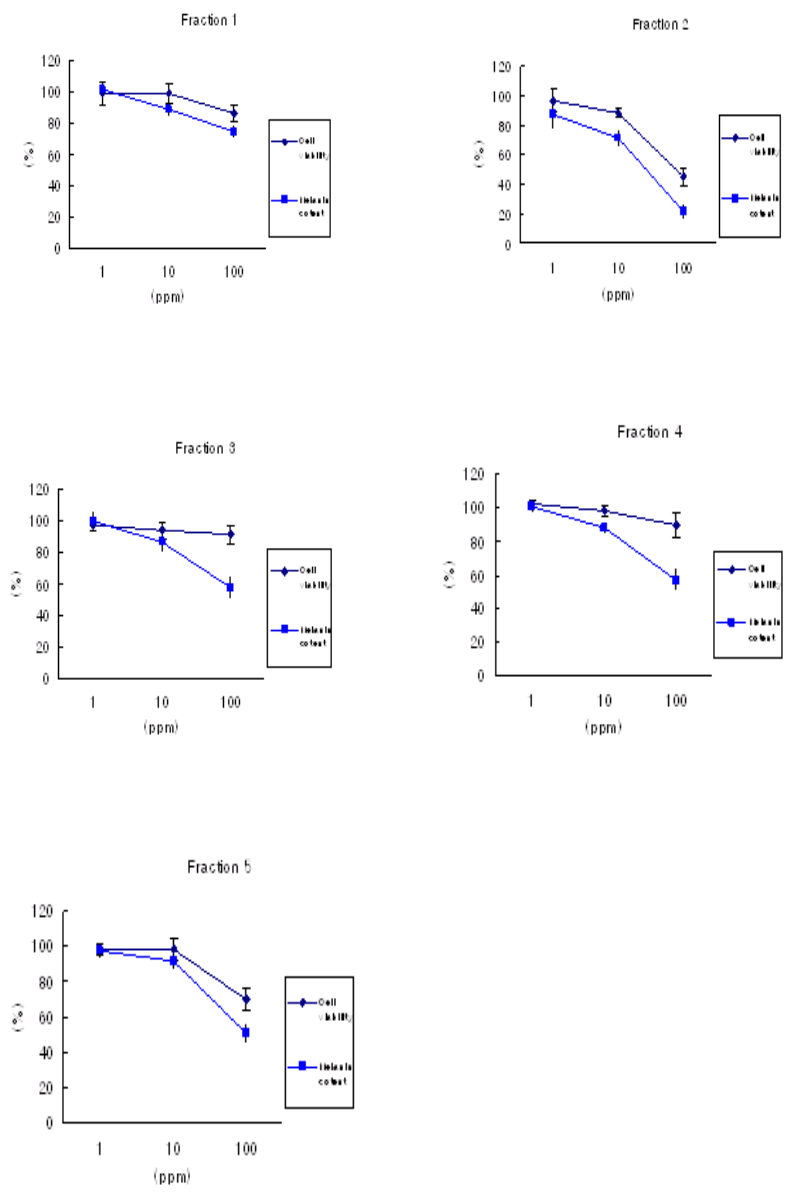


Fig. 19. Effects of Each Fraction on Cell Growth and Melanin Production of Melan-a Cells

1 차 정제물 1-5의 멜라닌 생성세포에서의 활성을 측정한 결과 우수한 활성을 나타내는 정제물 2 와 3 을 다시 2 차 정제 하였다 정제물 3 을 다시 methylene chloride/MeOH=7/1 용매를 사용하여 silica 컬럼하고 얻어진 3 개의 2 차 정제물 중 1"을 재컬럼하여 10 mg의 compound 1 을 분리하였으며 3"을 재컬럼하여 120 mg의 compound 2를 얻었다. 또한 1차 정제물 2를 silica gel을 이용하여 E.A./hexane=1/1, E.A./hexane=1/2로 2회 크로마토그래피하여 5 mg의 compound 3를 얻었다.

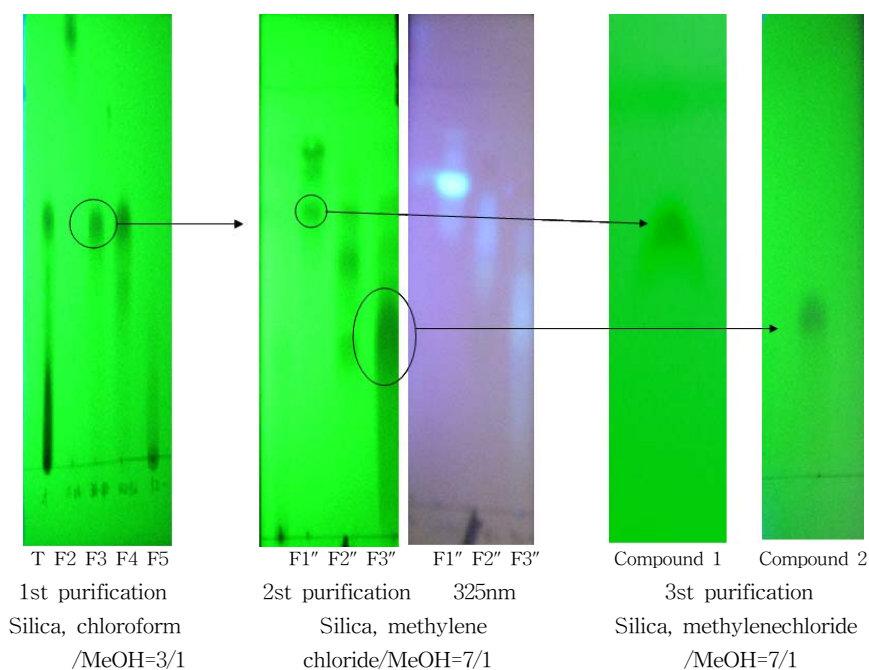


Fig. 20 TLC of isolation process of compound 1 and 2

T: E.A. fraction extract of *Rodgersia podophylla* roots. F: purified material

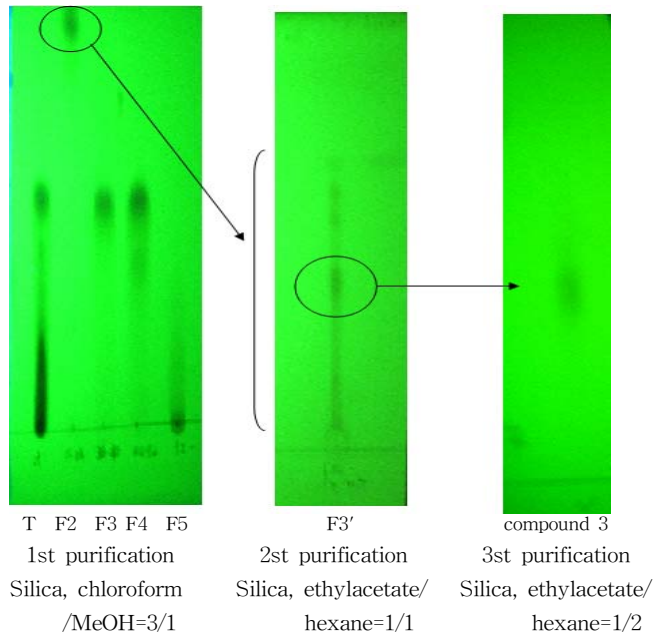


Fig. 21 TLC of Isolation process of compound 3

T: E.A. fraction extract of *Rodgersia podophylla* roots. F: purified material

분리된 3 종 단일물질의 멜라닌 생성세포에서의 활성은 다음과 같다. Compound 1 은 100 ppm에서 8%의 세포독성(감소)를 보였으나 34%의 멜라닌 생성을 억제 하였으며 compound 2는 9%의 세포독성으로 멜라닌을 26% 감소시켰다. Compound 3 역시 농도 의존적으로 세포생존을 대비 멜라닌 생성량을 감소시켰다.

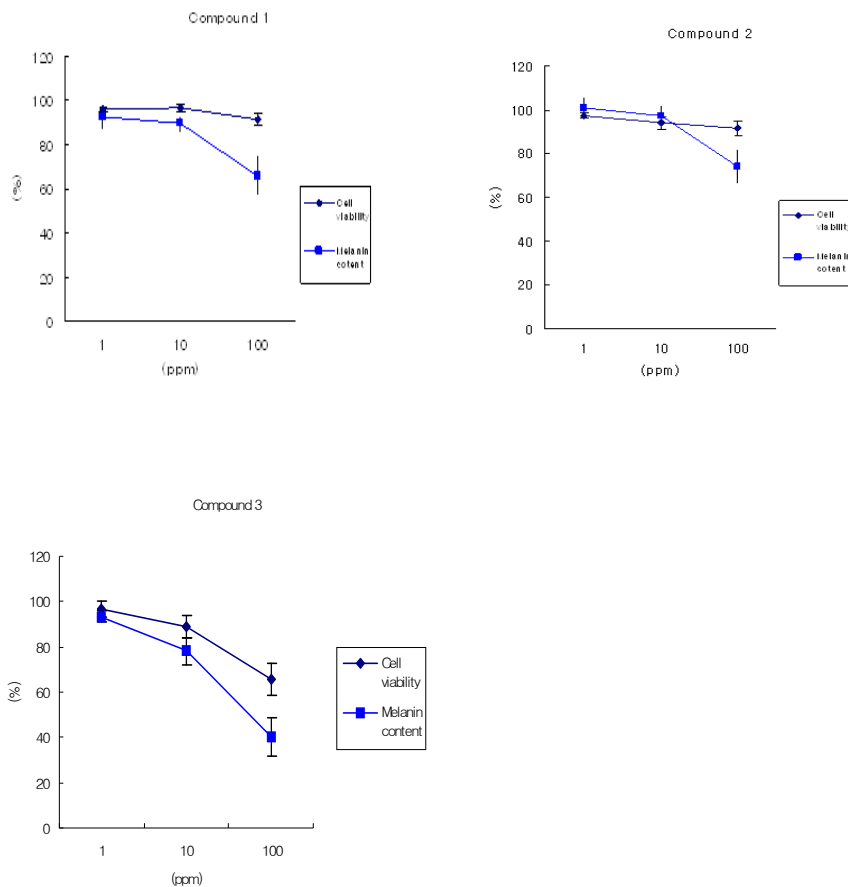


Fig. 22. Effects of Each Compound on Cell Growth and Melanin Production of Melan-a Cells

분리된 3종 물질의 구조동정을 위하여 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMQC, COSY, HMBC, Mass 등을 측정하였다. 사용된 기기는 NMR은 500 MHz의 FT-NMR Spectrometer를 이용하여 CD_3OD 및 CDCl_3 에 녹여 측정하였고 Mass는 FAB-mass 및 EI-mass를 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

Pulse Sequence: gHMOC
Solvent: CD3OD
Temp: 25.0 C / 298.1 K
Operator: vmr1
INOVA-500 "kobs1"

Relax. delay 2.000 sec
Acq. time 0.205 sec
Width 5095.3 Hz
2D Width 21361.8 Hz
128 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE F1, 499.681888 MHz
DECOUPLE C13, 125.6570218 MHz
Power 36 dB
on during acquisition
off during delay
V49_pfgw modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.094 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.011 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 41 hr, 11 min, 20 sec

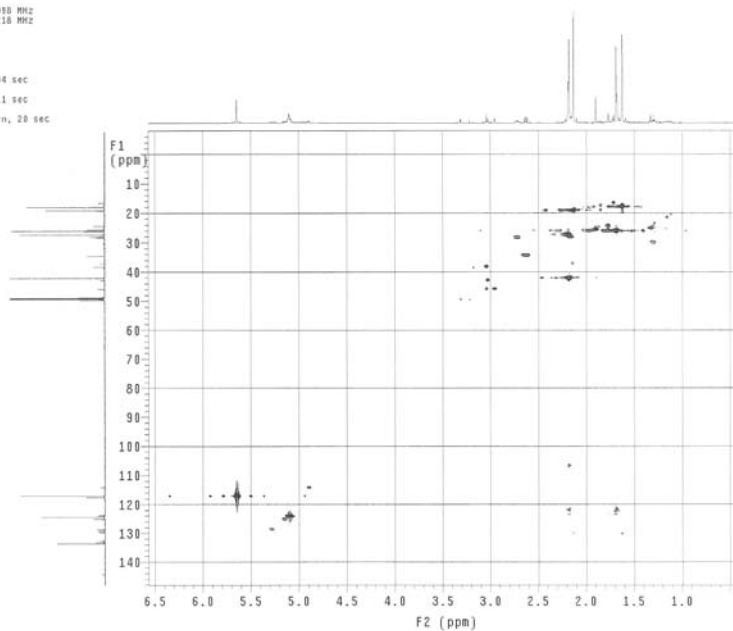


Fig. 25. HMQC data of compound 1 (CD₃OD)

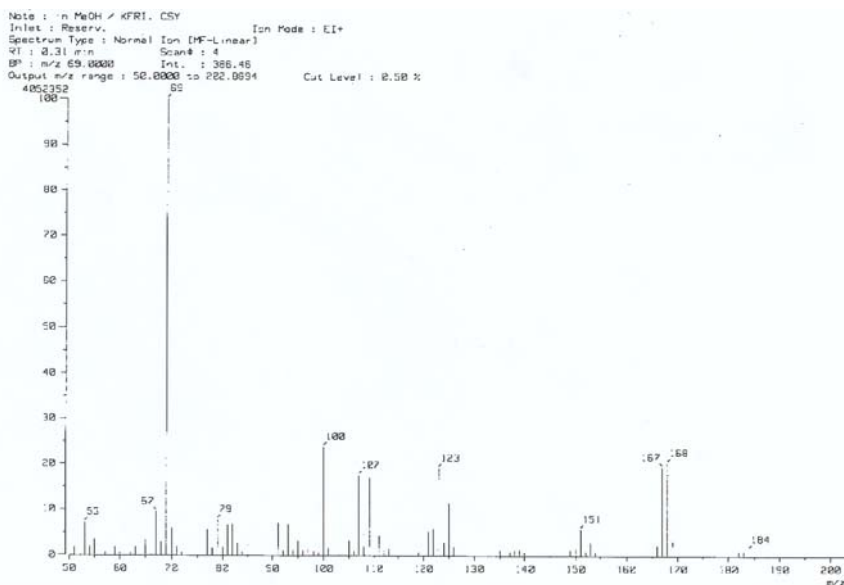


Fig. 26. Mass data of compound 1 (EI positive mode)

Compound 1은 $^1\text{H-NMR}$ 결과 5 ~ 6 ppm 사이에 탄소이중결합의 수소 peak들과 1.6 와 2.2 ppm 부근의 탄소단일결합 수소가 관찰되었으며 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 10 개의 주요탄소 peak이 나타났다. 이들 수소와 탄소의 결합관계를 HMQC로 확인하고 Mass로 분석하여 동정한 결과 compound 1은 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 분자량 168를 갖는 geranic acid인 것으로 동정되었다.

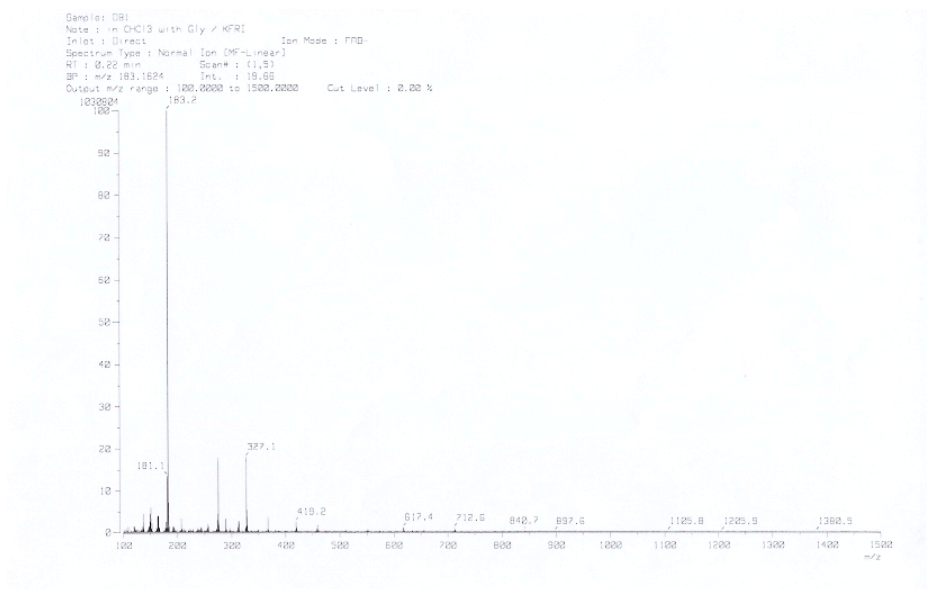
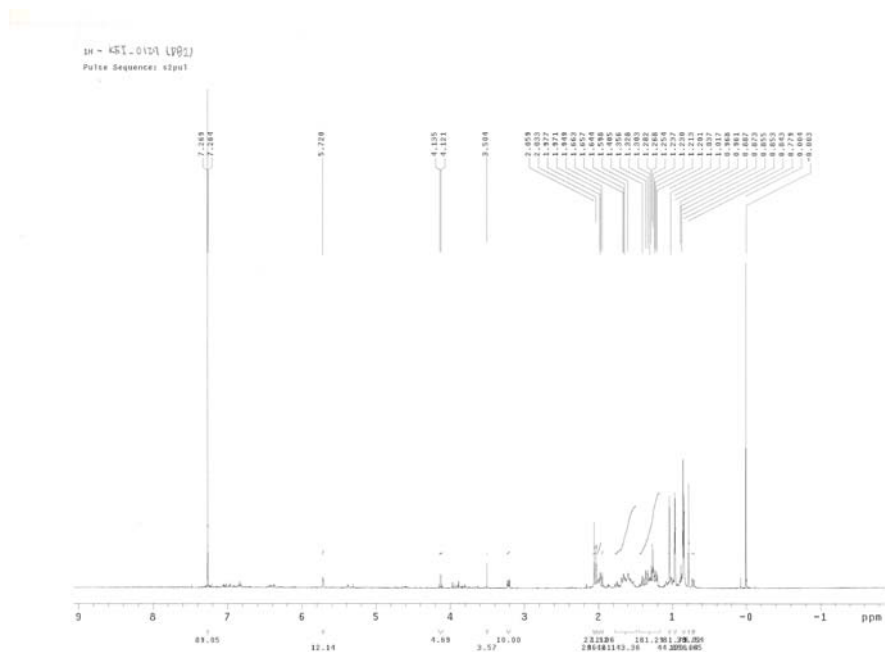


Fig. 29. Mass data of compound 2 (FAB mode)

Compound 2는 $^1\text{H-NMR}$ 결과 7 ppm 부근의 벤젠링에 위치한 수소와 5 ppm 부근의 벤젠링의 hydroxyl기로 추정되는 peak와 3.3 ~ 4.2 ppm 사이의 hydropyran 수소가 관찰 되었으며 165 ppm을 비롯한 14 개의 주요 peak가 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 관찰되었고 Mass 측정결과를 종합하여 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9$ 분자량 328을 갖는 bergenin인 것으로 판별 되었다.

한편, compound 3는 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC, COSY, Mass 분석을 하였으나 구조동정에 어려움 있었다.



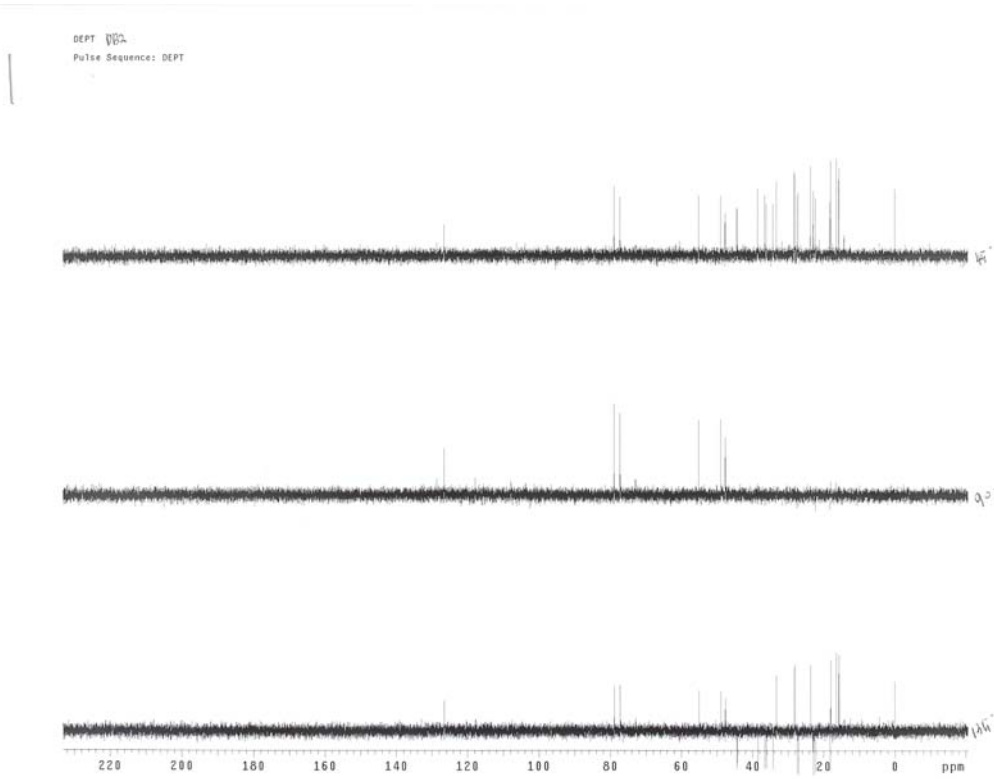


Fig. 32. DEPT data of compound 3 (45, 90, 135)

```
gHMOC 441.0171 [D62]
Pulse Sequence: gHMOC
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Operator: vmecl
INOVA-500 "kobe1"

Relax. delay 2.000 sec
Acq. time 0.187 sec
Width 542.0 Hz
2D Width 21361.8 Hz
84 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.7420473 MHz
DECOUPLE C13, 125.9696320 MHz
Power 38 dB
on during acquisition
off during delay
MAG_prgm modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.086 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.011 sec
FF size 2848 x 2048
Total time 10 hr, 14 min, 21 sec
```

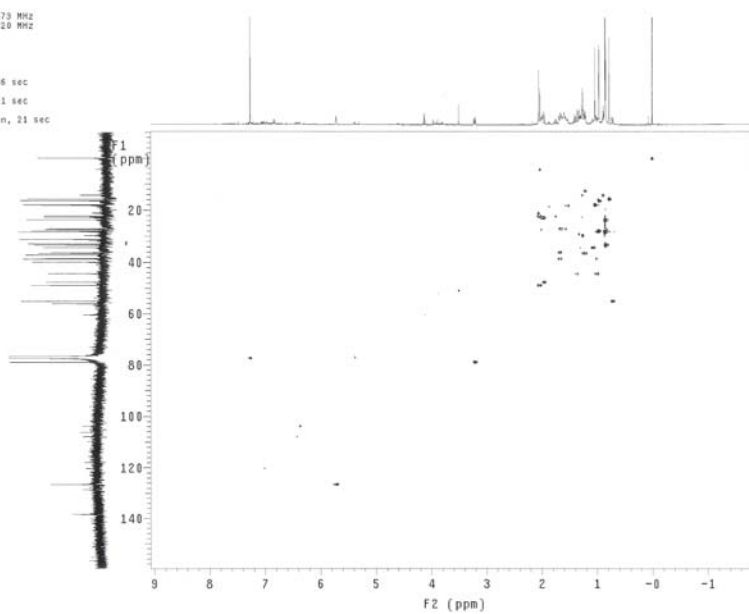


Fig. 33. HMQC data of compound 3 (CDCl_3)

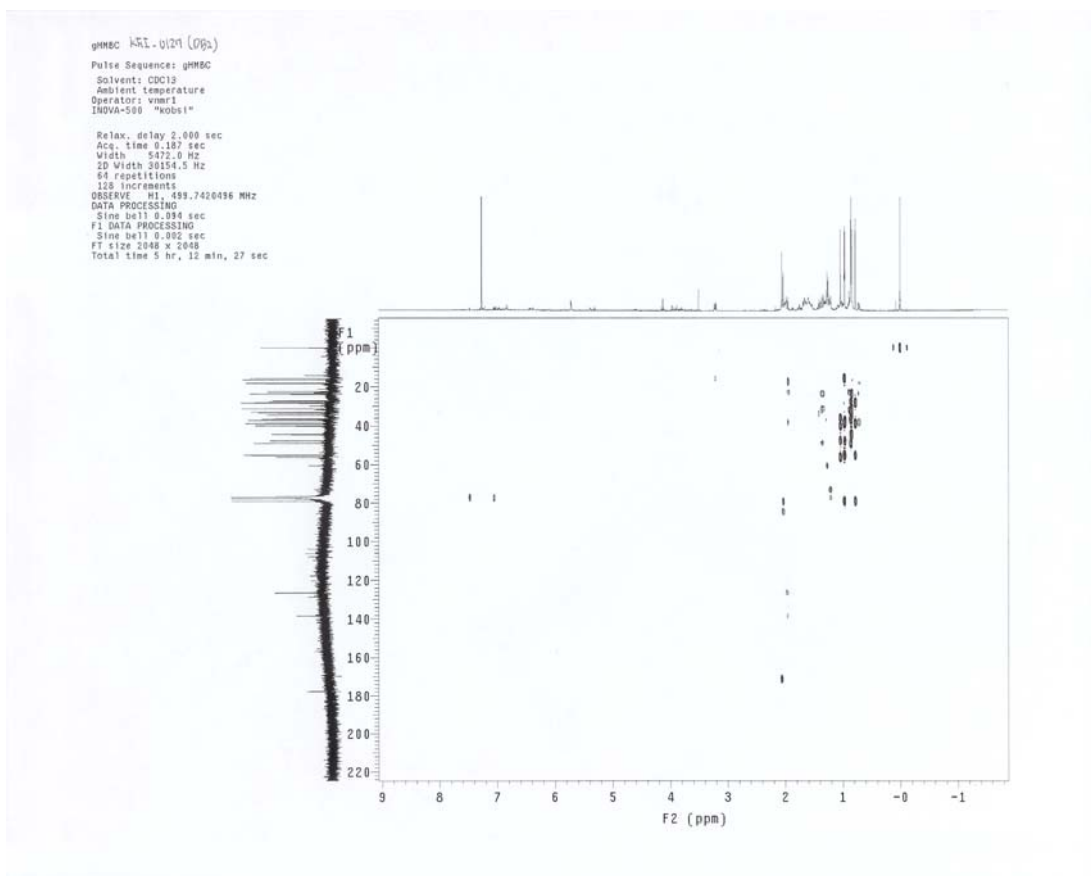


Fig. 34. HMBC data of compound 3 (CDCl₃)


```
gCOSY W1
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Operator: vmer1
INOVA-500 "kobs1"

Relax. delay 2.000 sec
Acq. time 0.207 sec
Width 5472.0 Hz
2D Width 5472.0 Hz
64 repetitions
128 increments
OBSERVE F1, 499.7420474 MHz
DATA PROCESSING
Sf, sine bell 0.094 sec
F1 DATA PROCESSING
Sf, sine bell 0.023 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr., 4 min., 19 sec
```

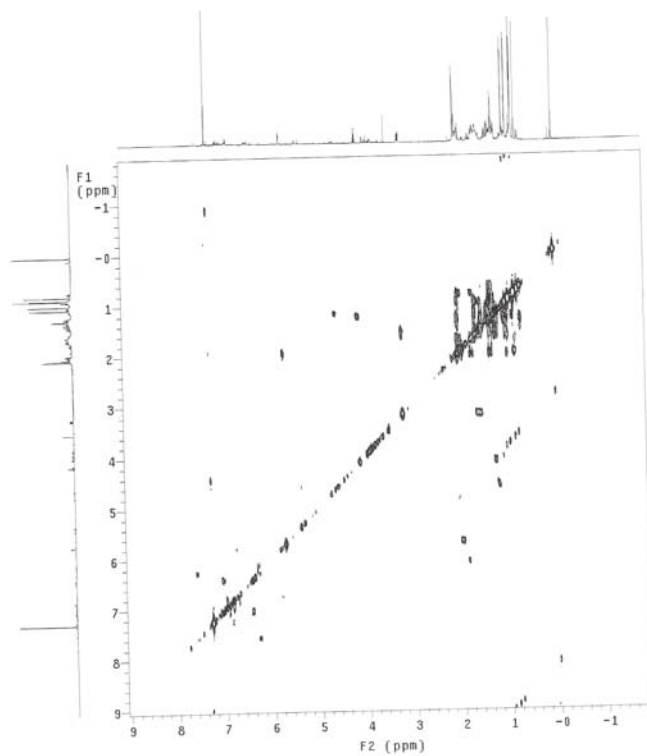


Fig. 34. COSY data of compound 3 (CDCl₃)

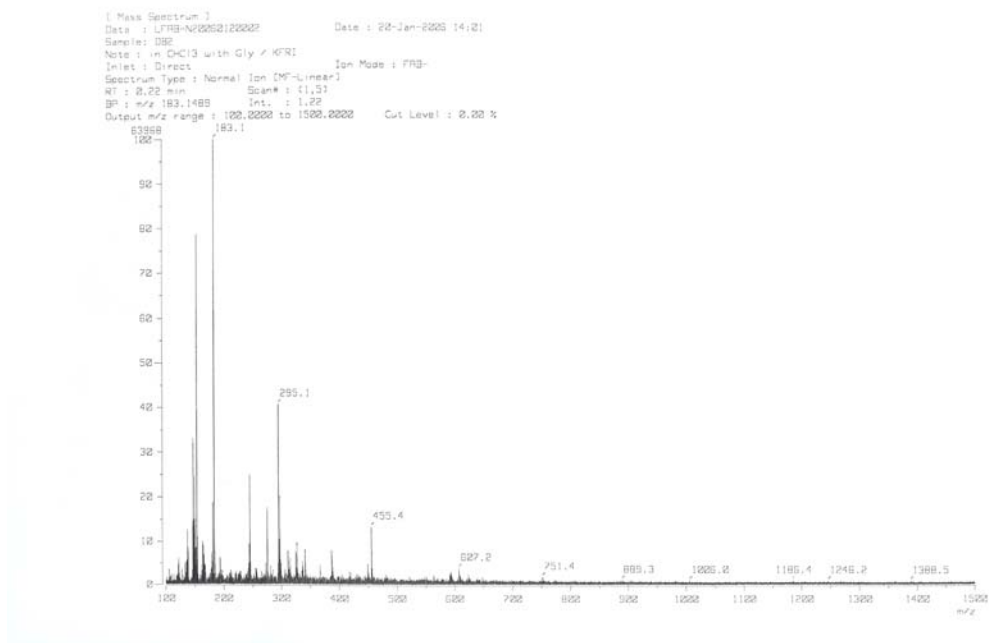


Fig. 35. Mass data of compound 3 (FAB mode)

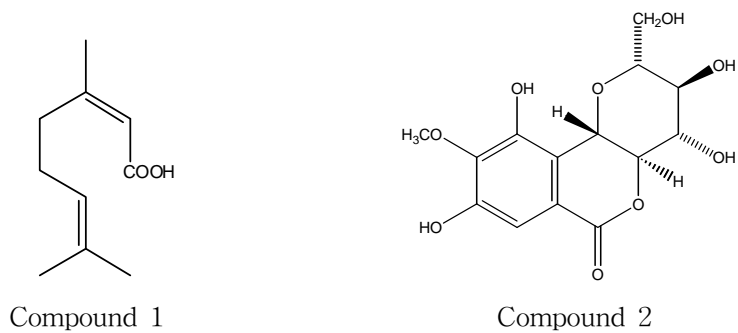
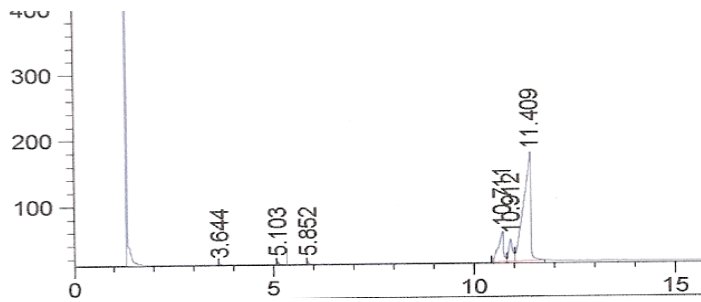


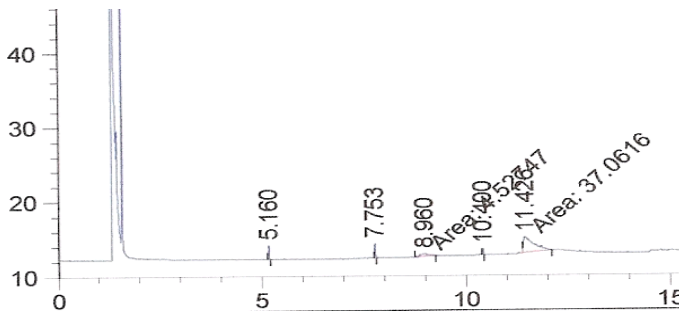
Fig. 36. Chemical structures of compound 1 and compound 2

3. 시료에 함유된 활성성분의 정량

도깨비 부채 뿌리로부터 활성추적법으로 분리되어 구명된 geranic acid 의 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획내 함량을 GC로 분석한 결과는 Fig. 37과 같다. GC 분석조건은 oven: 60 도/2 min, 290 도/10 min, column: HP-5MS, 29 cm/min, gas: He 으로 분석하였다. 분석결과 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획내 함량은 각각 0.52% 및 3.2%로 나타났다.



Geranic acid



E.A. fraction extract of *Rodgersia podophylla* roots

Fig. 37. GC chromatogram of each sample

Table 4. Geranic acid contents in *Rodgersia podophylla*(RP) roots extracts

Samples	Geranic acid contents (%)
MeOH extract	0.52 %
E.A. Fraction of MeOH extracts	3.20%

제 4 절. 선발된 우수미백시료의 기전검정 및 동물실험

1. Tyrosinase 활성저해도 및 멜라닌 생성세포에서의 활성비교를 통한 우수자원 선발

위의 결과를 종합하여 볼 때 여러 자생식물 시료중에서는 도깨비 부채 뿌리의 메탄올 추출물이 높은 tyrosinase 활성저해효과, 자외선 차단 효과를 나타냄과 동시에 멜라닌 생성세포에서 낮은 세포독성으로 멜라닌 생성량을 유의적 감소시켜 가장 우수한 자원으로 판단되어지며 활성추적법으로 분리되어 구명된 성분중에서는 geranic acid가 bergenin 보다 멜라닌 생성세포에서의 멜라닌 생성억제 효과가 우수하였다. 또한 tyrosinase 활성억제도를 측정된 결과 geranic acid가 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하였으며 bergenin은 유의적인 억제활성을 나타내지 않았다 (Fig. 38).

따라서 도깨비 부채 뿌리의 메탄올 추출물과 geranic acid를 우수한 미백자원으로 선발하였고 이를 대상으로 멜라닌 생합성과정의 단백질 발현에 미치는 영향 및 *in vivo*에서의 미백활성을 측정하였다.

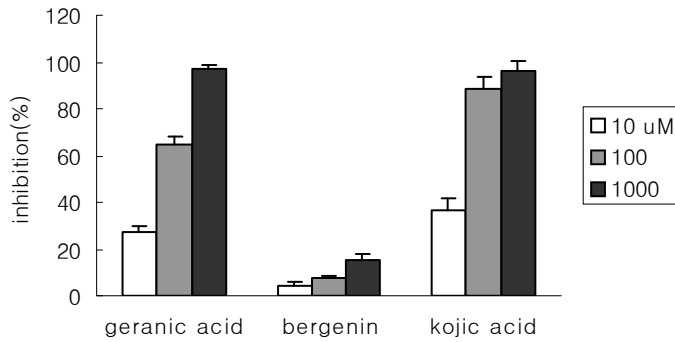


Fig. 38. Tyrosinase inhibitory effects of geranic acid and bergenin

2. 멜라닌 생합성 관련 단백질 발현량 측정

멜라닌 생성세포 내에서 멜라닌 생합성과정에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 western immunoblotting을 실시하였다. 세포실험 결과 세포독성이 적고 멜라닌 생성억제 활성이 우수한 것으로 도출된 도깨비 부채 메탄올 추출물 및 활성성분인 geranic acid를 세포에 3일간 처리 후 lysis buffer로 단백질을 추출하여 50 ug을 분석에 사용하였다. 8% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 분리 후 primary antibody (tyrosinase 1/250) 와 antigoat secondary antibody (1/13000) 조건으로 ECL detection 한 결과는 다음과 같다 (Fig. 39).

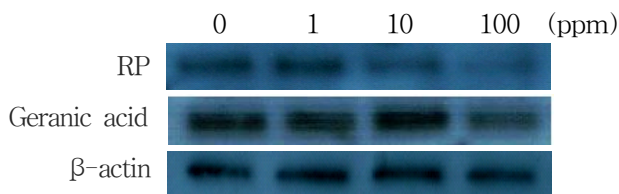


Fig. 39. Effects on intracellular level of tyrosinase in melan-a cells (3 days after)

RP: MeOH extract of *Rodgersia podophylla* roots

또한 멜라닌 생합성과정에서 dopachrome의 dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로의 전환에 관여하는 TRP-2의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 도깨비 부채 메탄올 추출물 및 활성성분인 geranic acid를 세포에 3일간 처리 후 lysis buffer로 단백질을 추출하여 그 중 50 ug을 8% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 primary antibody (TRP-2 1/300) 와 antigoat secondary antibody (1/15000) 조건으로 ECL detection 한 결과는 다음과 같다 (Fig. 40).

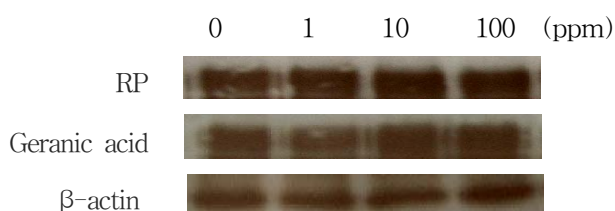


Fig. 40. Effects on intracellular level of TRP-2 in melan-a cells
(3 days after)

RP: MeOH extract of *Rodgersia podophylla* roots

도깨비 부채 메탄올 추출물 및 활성성분인 geranic acid를 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm의 농도로 3일간 처리 한 결과 100 ppm농도에서 두 가지 시료 모두 멜라닌 생합성과정의 초기에 관여하는 tyrosinase 발현량을 유의적으로 감소시켰으며 TRP-2 (Dopachrome tauomerase)의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 도깨비 부채 메탄올 추출물 및 geranic acid는 tyrosinase활성을 직접적으로 억제할 뿐만 아니라 tyrosinase 발현을 억제함으로써 멜라닌 생합성의 과정에 영향을 미쳐 미백활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

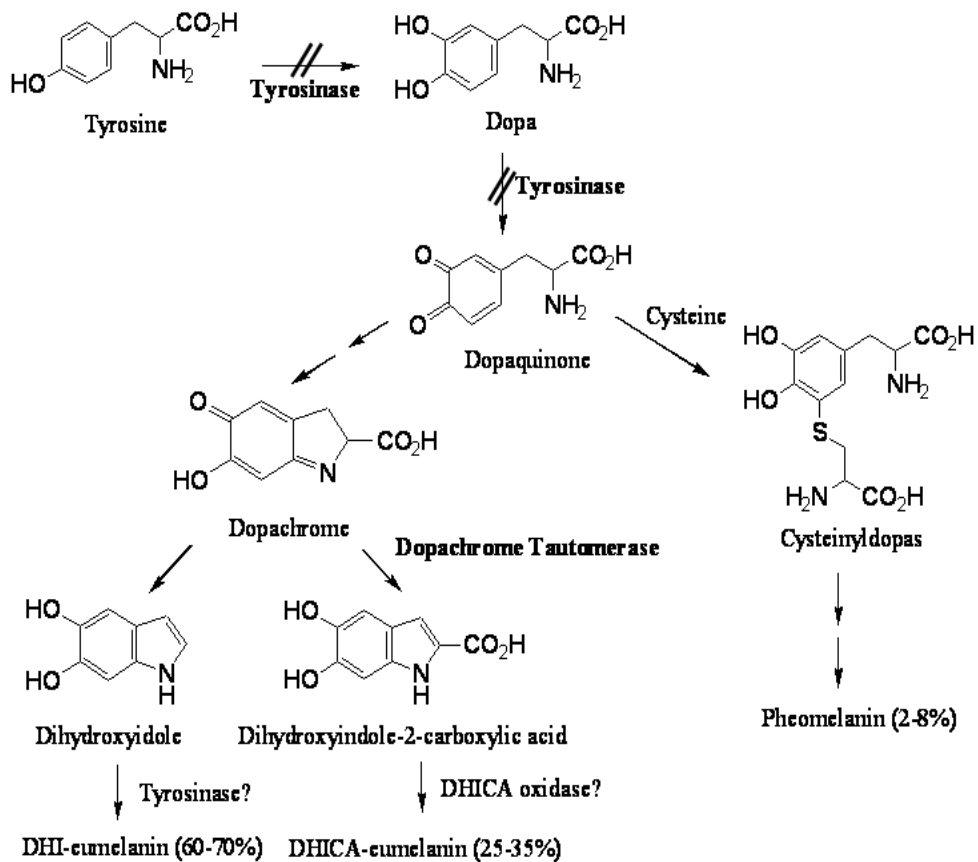


Fig. 41. Inhibitory role of RP and geranic acid in melanin biosynthesis pathway

RP: MeOH extract of *Rodgersia podophylla* roots

3. 자외선(B 영역)으로 유도된 brown guinea pig의 피부색소침착에 대한 미백효과 검증

선발된 미백원료인 도깨비 부채 뿌리의 메탄올 추출물과 geranic acid의 *in vivo* 상의 활성을 알아보기 위해 brown guinea pig를 사용하여 피부색소침착에 대한 활성을 측정하였다. (주)오리엔트바이오로부터 450 g 내외의 brown guinea pig 암컷을 구입하여 등 부분을 제모 후 일주일 간격으로 3 회 500 mJ의 UV-B를 조사하여 색소침착을 유도하였다. 마지막 UV 조사를 한 1 일 후 부터 세척 후 색소침착이 유도된 피부부위에 도깨비 부채 뿌리 메탄올 추출물 및 geranic acid를 70% 에탄올에 녹여 1 일 1 회씩 도포하고 피부색의 변화 및 자극성 여부를 관찰하였다. 도포 6 주후의 피부사진은 Fig. 42와 같다.



Brown guinea pig (before shaving)



After shaving



Exposed to UV-B radiation



Fig. 42. Representative photographs showing the depigmenting effect of each sample (six weeks after).

RP: MeOH extract of *Rodgersia podophylla* roots

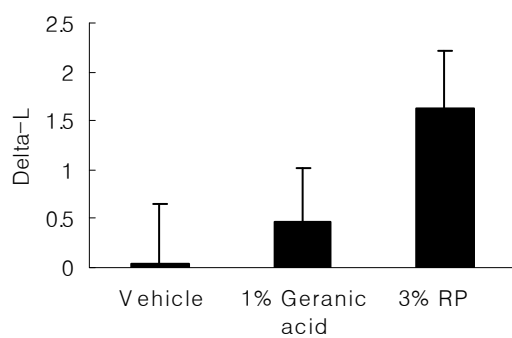


Fig. 43. The degree of pigmentation decrease (ΔL -value) before and six weeks after daily topical application of each sample

실험결과 3% 농도로 도깨비 부채 메탄올 추출물을 매일 도포한 피부영역에서 4주후부터 도포 하지 않은 부분 대비 뚜렷한 피부색의 완화가 나타났으며 1% geranic acid를 도포한 부분에서도 색의 완화가 관측됐다. 또한 실험 6주간 피부의 발적 및 자극반응은 모든 군에서 관찰되지 않았다.

제 5 절. 활성성분의 유도체 활성탐색 및 시제품의 제조

1. 활성성분의 유도체 활성탐색

활성성분으로 도출된 geranic acid와 구조가 유사한 유도체의 미백활성을 탐색하여 구조와 활성과의 상관관계 및 더욱 우수한 미백활성을 나타내는 물질의 도출여부를 확인하였다. 본 연구에서 활성을 검정한 geranic acid유도체는 β -citronellol, citronellic acid, geraniol 이며 그 구조는 Fig. 45과 같다.

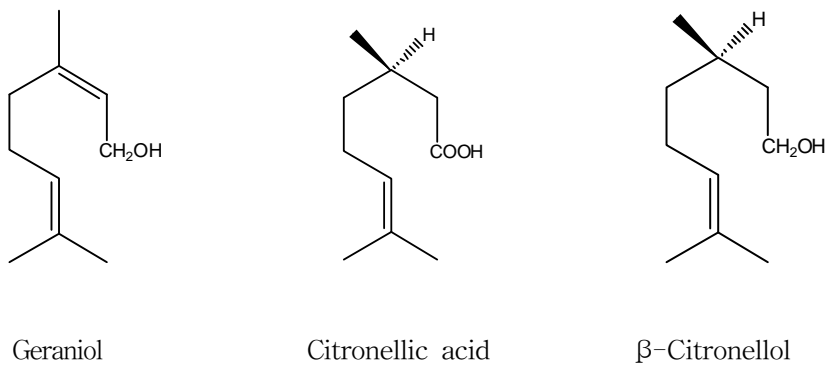


Fig. 45. Chemical structures of geranic acid derivatives

이들 유도체들의 타이로시네이즈 활성을 측정한 결과는 Fig. 47에 나타내었다. 4 종의 화합물 중 geranic acid 가 1 mM과 100 uM에서 각각 97.4%와 65.1%의 저해활성을 나타내어 가장 우수하였고 geraniol, citronellic acid 는 1 mM에서 각각 35.4% 와 55.6%의 억제활성을 나타내었다. 한편 β -citronellol은 1 mM 농도에서 UV흡수를 나타내어 정확한 저해율을 구할 수 없었으나 100 uM에서 29.5%의 활성억제활성을 보였다.

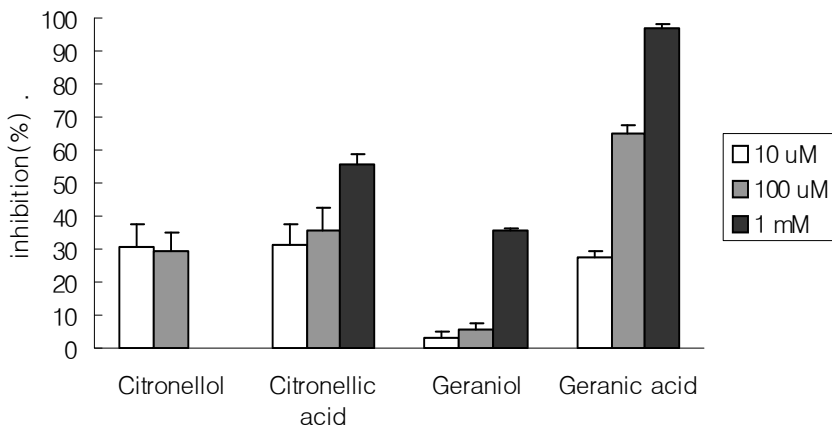


Fig. 46. Tyrosinase inhibitory effects of geranic acid derivatives

The inhibitory effect of citronellol at 1 mM was not able to measured due to absorption of the compound

또한 멜라닌 생성 세포주에 미치는 영향을 측정한 결과 geranic acid 는 500 uM 농도에서 큰 세포사멸 없이 세포생존을 대비 약 25%의 멜라닌 생성량을 감소시켰으며 geraniol은 고농도에서 약간의 멜라닌 생성억제 활성을 보였으나 세포사멸을 일으켰다. 한편 citronellic acid 는 세포독성은 적었으나 유의적인 멜라닌 생성억제활성은 나타나지 않았으며 citronellol은 50 uM 이상의 농도에서 세포사멸을 일으켰다 (Table 5).

Table 5. Effects on melanin production and cell viability in melan-a cells

Samples	Concentrations (uM)	Cell viability (%)	Melanin content (%)
Citronellol	5	97.2 ± 4.1	96.6 ± 3.2
	50	91.4 ± 2.6	87.1 ± 3.0
	500	47.0 ± 8.7	34.8 ± 7.5
Citronellic acid	5	98.2 ± 1.2	99.2 ± 2.8
	50	98.2 ± 4.3	96.1 ± 3.1
	500	90.6 ± 4.7	84.2 ± 9.3
Geraniol	5	99.6 ± 2.6	98.8 ± 5.1
	50	90.8 ± 2.6	91.5 ± 3.9
	500	61.4 ± 5.5	34.9 ± 4.3
Geranic acid	5	96.2 ± 0.9	92.7 ± 5.9
	50	96.7 ± 1.6	89.6 ± 4.4
	500	91.7 ± 3.4	66.1 ± 6.7

3 days after. Viability and melanin content of solvent (vehicle) treated cells was set to 100%. Each value represents the mean ± S.E. of three experiments.

2. 시제품의 제조

도깨비 부채 뿌리 메탄을 추출물을 제조하여 진공에서 solvent를 완전히 제거한 후 이를 3%와 1% 농도로 Wax(밀랍, 호호과유), 보습제(glycerin, propylene glycol), 고급알콜, 지방산(stearic acid), 계면활성제등을 mixer로 배합하여 제조된 로션 및 크림 base에 첨가하여 도깨비 부채 미백로션 및 도깨비 부채 미백크림을 제조하였다. (Fig. 47)



lotion(1%)



cream(3%)

Fig. 47. *Rodgersia podophylla* skin whitening lotion and cream

3. 경쟁제품과의 비교검토

천연한방자원을 이용한 화장품으로는 널리 알려져 있는 상백피, 산삼배양근, 녹두, 살구씨, 천화분등을 이용하여 (주)태평양의 '설화수', (주)한국화장품의 '산심', (주)LG생활건강의 수려한 등이 다양하게 출시되어 있다. 그러나 본 연구에서 도출된 도깨비 부채, 도깨비 고비, 쇠고비를 이용한 제품은 없어 신규천연자원으로써의 희소성을 가지며 미백활성측면에서도 기존의 한방자원인 녹두와 상백피, 살구씨와 비교하였을 때 더욱 우수한 활성을 나타내어 한방화장품의 문제점인 낮은 기능성 측면을 좀 더 보완할 수 있는 천연화장품을 개발하는데 유용하게 활용될 수 있다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

가. 1 차년도

- 1) 연구목표: 선별된 식물자원의 미백활성 검정 및 그 활성성분의 탐색
- 2) 연구내용 및 평가의 착안점
 - 가) 선별된 식물자원의 확보 및 실험시료제조
 - 나) 선별된 식물자원의 미백활성 세부 검정
 - 다) 분리, 분석을 통한 그 활성성분의 탐색

나. 2 차년도

- 1) 연구목표: 유도체의 활성검정 및 활성성분 고함유 미백원료, 시제품의 제조
- 2) 연구내용 및 평가의 착안점
 - 가) 도출된 활성성분의 최적의 추출조건 확립
 - 나) 활성성분 고함유 미백원료의 제조
 - 다) 활성성분 유도체의 멜라닌 생성억제 활성검정
 - 라) 시제품의 제조

다. 종합

- 1) 연구목표: 미백활성이 알려지지 않은 국내식물자원의 미백활성 검정 및 그 유효성분 규명을 통한 새로운 미백원료로써의 기반을 구축하고 확립된 추출방법을 이용하여 미백원료를 제조하고 화장품의 원료로 제시
- 2) 연구내용 및 평가의 착안점
 - 가) 선별된 식물자원의 활성검정 및 활성물질 탐색
 - 나) 활성물질 고함유 미백원료 및 시제품 제조
 - 다) 활성성분 유도체의 멜라닌 생성억제 활성검정

2. 연구개발목표의 달성도 및 관련분야 기여도

가. 선별된 식물자원의 시료제조 및 미백활성 세부 검증

도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비고비를 채취하여 추출 후 분획물을 제조하고 미백 관련 활성을 측정 하였다. 먼저 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하여 도깨비 부채의 뿌리 및 쇠고비 뿌리 메탄올 추출물 및 E.A. 분획물의 우수한 활성을 확인하였고 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량을 측정한 결과 역시 이들 시료들이 세포생존율 대비 멜라닌 생성량을 줄이는 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 도깨비 부채의 뿌리 및 쇠고비 뿌리 메탄올 추출물 및 E.A. 분획물은 뛰어난 자외선 차단효과를 보였다.

특히 E.A. 분획물 보다 낮은 세포독성을 보인 메탄올 추출물에 대하여 멜라닌 생합성과정에 주요하게 관여하는 단백질 발현에 미치는 영향을 검증하여 멜라닌 생성세포내에서의 tyrosinase 발현량을 감소시킴을 밝혀 멜라닌 생합성 저해기작을 추정하였고 추가적으로 brown guinea pig를 이용하여 *in vivo*상의 미백활성을 확인하였다.

이상의 결과는 활용되지 않는 미개척 국내 자생식물의 새로운 가치를 도출하고 그 활성을 체계적으로 검증하였다는 점에서 큰 의의를 가지며 관련 산업의 활성화와 농가의 새로운 수입원 확대에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

나. 분리, 분석을 통한 활성성분의 탐색

자생식물 3 종의 gallic acid, esculetin, caffeic acid, myricetin, cinnamic acid, quercetin 등의 미백활성물질을 함유여부 및 함량을 정량하여 비교하였고 미백활성 측정결과 우수자원으로 도출된 도깨비 부채 뿌리로부터 활성추적법을 이용하여 3 종의 단일성분을 분리하여 그중 2 종을 구조동정 하여 bergenin 과 geranic acid임을 확인하였고 그 함량을 정량하였다. 또한 이들 성분의 tyrosinase 활성억제도, 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향, 단백질 발현량에 미치는 영향, *in vivo*에서의 미백활성을 측정하여 검증하였다.

본 연구의 대상인 도깨비 부채, 쇠고비, 도깨비 고비의 자생식물 3 종은 아직까

지 관련연구가 미비한 식물자원으로 이에 대한 성분과 관련된 자료를 제공하여 기초적 연구기반 조성 및 이를 이용한 소재화 연구에 도움이 되리라 판단된다.

다. 최적의 추출조건 확립 및 미백원료의 제조

우수자원으로 도출된 도깨비 부채 뿌리는 상온에서 초음파 추출하였으며 메탄올을 사용하는 것이 활성이 높은 원료를 얻을 수 있었다. 얻어진 추출물은 감압농축 후 진공에서 용매를 완전히 제거하여 도깨비 부채 미백원료를 제조하였다.

라. 활성성분 유도체의 멜라닌 생성억제 활성검정

도출된 성분과 화학적 구조가 유사한 β -citronellol, citronellic acid, geraniol의 미백활성을 탐색하여 비교한 결과 COOH 작용기를 가진 geranic acid와 citronellic acid 가 우수한 tyrosinase 활성억제도를 나타냈으며 멜라닌 생성세포에서 세포독성 또한 낮았다. 한편 멜라닌 생성량은 2 번과 3 번 탄소사이에 이중결합을 가진 geranic acid와 geraniol이 저해활성을 나타냈다. Geranic acid 보다 우수한 미백활성물질은 도출되지 않았으나 이의 결과를 바탕으로 우수활성 물질 도출을 위한 지속적 연구가 필요한 것으로 판단된다.

마. 시제품의 제조

제조된 도깨비 부채 미백 원료를 크림 및 로션 베이스와 혼합하여 시제품을 제조하였다. 미활용 자생식물을 이용한 미백소재는 기존의 오래된 천연한방소재에 비하여 새로운 고기능성 원료로서 차별성을 가질 수 있으며 향후 팩 등을 비롯한 여러 형태의 제품개발에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

1. 학술분야

본 연구에서는 연구가 미진하여 미활용 되고 있는 국내자생식물의 멜라닌 색소 억제 활성을 과학적이고 체계적으로 검정하고 활성성분을 도출하여 새로운 가치를 창출하고 농가의 소득원으로 활용할 수 있는 기반을 마련하고자 하였다. 연구결과의 성과확산을 위한 노력으로 적극적인 학술활동을 수행하여 현재까지 국내 논문 1 편 및 SCI급 국제논문 1 편을 게재하였으며 SCI급 국제논문 1 편을 추가로 제출하여 게재승인을 기다리고 있다. 또한 2 건의 국내 학회발표를 통해 연구결과를 홍보하고자 하였으며 연구종료일까지의 성과는 다음과 같다.

가. 논문게재

- 1) 도깨비 부채 뿌리 추출물의 멜라닌 생성억제효과, 최상윤, 강난주, 김호철, 한국약용작물학회지 14(1); 27-30, 2006
- 2) Potent Inhibitory Effects of Resveratrol Derivatives on Progression of Prostate Cancer Cells, Kyung Mi Yoo, Sanghee Kim, Bo Kyung Moon, Sung Soo Kim, Kyung Tack Kim, Sun Yeou Kim and Sang Yoon Choi, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 339: 238-241, 2006
- 3) Inhibition of melanogenesis by root of *Cyrtomium fortunei* J. Smith extract, Sang Yoon Choi, *Fitoterapia*. submitted.

나. 학술발표

- 1) Potent Inhibitory Effects of N-Aryl-S-Alkylthiocarbamate Derivatives on Melanin Production. 대한약학회. 2005
- 2) Inhibitory Effects of Resveratrol Derivatives on Progression of Prostate Cancer Cells. 한국식품과학회. 2005

2. 개발원료의 활용분야

연구종료일 현재 연구결과 관련기술의 선점 및 보호를 위하여 국내특허출원(도

깨비 부채, 쇠고비 또는 도깨비 고비 추출물을 유효성분으로 하는 미백 조성물)을 완료 하였고 원료에 대한 기술이전을 추진중에 있으며 원료의 신규성 및 독창성을 기반으로 향후 상품화를 지속적으로 유도하고자 한다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

동양권의 미백시장규모는 매년 급성장하고 있으며 지역적인 고유의 시장임에도 불구하고 기술력을 앞세운 서구 선진국의 진출에 의하여 시장이 잠식되고 있다. 실제로 독일의 레티팜, 프랑스 시슬리, 크리스찬 디올, 랑콤 등에서 미백용도의 화장품을 출시하고 있으며 일본의 SK-II, 시세이도에서도 미백화장품이 출시되어 국내 미백시장을 크게 위협하고 있다. 따라서 새로운 미백자원에 대한 연구는 치열하게 진행되고 있으며 신소재를 발굴하는 것은 미백시장을 선점하기 위한 필수적인 요소로써 매우 큰 가치로 자리 매김 하고 있다.

제 7 장. 참고문헌

식품의약품안전청 식품원재료 데이터 베이스 (<http://koriz.com>)

Ahn, D.K. 1998. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. Kyo-Hak Publishing Co. Seoul.

Alaluf S, Heath A, Carter N, Atkins D, Mahalinggam H, Barrett K, Kolb R and Smit N. Variation in Melanin Content and Composition in Type V and VI photoexposed and photoprotected Human Skin: The Dominant Role of DHI. *Pigment Cell Res* 2001; 14: 337-347.

Aroca P, Solano F, C Jose, Borrón G, Lozano JA. A new spectrophotometric assay for dopachrome tautomerase. *J Biochem Biophys Method* 1990; 21: 35-46.

Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K and Hearing VJ. Melanin Biosynthesis Patterns following Hormonal Stimulation. *J Biol Chem* 1993; 268: 25650-25655.

Bae KH. 2001. The Medicinal Plants of Korea. Kyohak-sa press: Seoul, pp. 298-299.

Barber J, Townsend D, David P, Olds MS, King RA. Dopachrome oxidoreductase: A new enzyme in the pigment pathway. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 145-149.

Barber J, Townsend D, Olds DP and King RA. Decreased dopachrome

oxidoreductase activity in yellow mice. *J Hered* 1985; 76: 59-60.

Baurin E, Arnoult T, Scior QT, Bernard D. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharm* 82: 155-158.

Bennett D, Cooper P, Hart I. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 1987; 39: 414-418.

Bologna J, Orlow S. Pigmentary Disorders; Melanocyte Biology. pp43-52. 2001.

Cabanes, J., Chazara, S., Garcia, C.F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(12): 982-985.

Chen JS, Wei C, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1897-1901.

Choi SY, Kim S, Hwang JS, Lee BG, Kim H, Kim SY. 2004. Benzylamide derivative compound attenuates the ultraviolet B-induced hyperpigmentation in the brownish guinea pig skin. *Biochem Pharmacol* 67: 707-715.

Choi SY, Kim S, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Kim A, Kim SY. 2002. (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, nitrogen analog of stilbene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem Pharm Bull* 50: 450-452.

Chun, H.J., Mun, Y.J., Kim, J.H., Kim, K.I., Jeon, B.H., Woo, W.H. 2000. Effect of the Aqueous Extract of *Epimedium Koreanum* Nakai on Melanin Formation in B16 Mouse Melanoma Cell Line. *Yakhak Hoeji*. 44(5): 455-462.

Chun, H.J., Ahn, B.Y., Han, J.H., Woo, W.H. 2001. Inhibitory Effects of Crude Poly- saccharide of Water Extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura* on Melanin Biosynthesis. *Yakhak Hoeji*. 45(6): 701-707.

Chun, H.J., Jeong, S.I., Kim, I.K. 2001. Effects of Ethylacetate Extract from *Ulmus davidiana var. japonica* on Melanogenesis. *Yakhak Hoeji*. 45(6): 724-729.

Chun, H.J., Choi E. Y., Yoon, S.C., Nam H.W., Back S.H., Woo W.H. 2001. Inhibitory Effects of Ethanol Extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on Melanin Biosynthesis. *Yakhak Hoeji*. 45(3): 269-275.

Choi SY, Kim S, Kim H, Suk K, Hwang JS, Lee BG, Kim A, Kim SY. (4-Meohoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a Nitrogen Analog of Stilbene as a Potent Inhibitor of Melanin Production. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 450-452.

Clarot I, Credat D, Battu S, Cardot PJ. Chromatographic study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with beta-cyclodextrin as mobile phase moifier. *J. Chromatogr. A*. 2000; 903(1-2): 67-76.

Ernest VC, Cecil K, Heino H, Hansruedi G, Chie S, Victoria V, Vincent JHJ and Thomas PD. Inhibitors of Mammalian Melanocyte Tyrosinase: *In Vitro* Comarisons of Alkyl Esters of Gentisic Acid with Other Putative Inhibitors.

Biochem Pharmacol 1999; 57: 663-672.

Fang J, Han Q, Johnson JK, Christensen BM and Li J. Functional expression and characterization of *Aedes aegypti* Dopachrome conversion enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 287-293.

Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT and Chaudhry F. Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell culture by yohimbine. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 268-276.

Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W and Virador VM. Effects of Wine Phenolics and Sorghum Tannins on Tyrosinase Activity and Growth of Melanoma Cells. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1620-1624.

Hideya A, Atsuko R, Akira H, Masahiro O and Masamitsu I. Linoleic acid and α -linoleic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 375-381.

Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985; 45: 1474-1478.

Ikeda T, Tsutsumi T. Function and skin depigmental activity of crude drugs. *J Fragrance* 1990; 6: 59-66.

Imokawa G, Kawai M, Mishima Y, Motegi I. Differential analysis of experimental hypermelanogenesis induced by UVB, PUVA and allergic dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch Dermatol Res* 1986; 278: 352-362.

Iozumi K, Hoganson GE, Pemella R, Everett MA, Fuller BB. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 806-811.

Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR and Kim YS. Oxyresveratrol and Hydrostilbene Compounds : Inhibitory Effect on Tyrosinase and Mechanism of Action. *J Biol Chem* 2002; 277: 16340-16344.

Korner A, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 1982; 217: 1163-1165.

Lamoreux ML, Wakamatsu K and Ito S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res* 2001; 14: 23-31.

Ludger K, Albert MK, Tracy S. The sodium hydroxide erosion assay: a revision of alkali resistance test. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 382-387.

Maeda K, Fukuda M. *In vivo* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 1991; 42: 361-368.

Martinez J, Solano F, Garcia J, Jara J, Lozano J. α -MSH and other melanogenic activators mediate opposite effects on tyrosinase and dopachrome tautomerase in B16/F10 mouse melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 435-439.

Matsuda, H., Higashino, M., Nakai, Y., Munekazu, I., Kubo, M., Lang, F. 1996. Inhibitory Effects of Some Arctostaphylos Plants on Melanin Biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 19(1): 153-156.

No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY.1999. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci* **65**: 241-246.

Nordlund, Boissy, Hearing, King, Ortonne. The pigmentary system. Oxford university press. pp406. 1998.

Oka M, Ogita K, Ando H, Horikawa T, Hayashibe K, Saito N, Kikkawa U and Ichihashi M. Deletion of specific protein kinase C subspecies in human melanoma cells. *J Cell Physiol* 1996; 167: 406-412.

Orsini F, Pelizzoni F, Bellini B, Miglierini G. Synthesis of biologically active polyphenolic glycosides. *Carbohydr Res* 1997; 301: 95-109.

Paramonov, B.A., Turkovskii, I.I., Potokin, I.L., Yuriova, N.A., Chebotarev, V.Y. 2002. Photoprotective activity of melanin preparations in human skin exposed to UV irradiation: dependence on previous photoexposure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 134(4): 366-369.

Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res* **20**: 921-934.

Pawelek JM. After dopachrome? *Pigment Cell Res* 1991; 4: 53-62.

Pettit G, John W Lippert III, Herald D. A pinacol rearrangement/oxidation synthetic route to hydroxyphenstatin. *J Org Chem* 2000; 6.3.

Pettit G, Singh S, Boyd M, Hamel E, Pettit R, Schmidt J, Hogan F.

Antineoplastic Agents 291. Isolation and synthesis of combretastatin A-4, A-5 and A-6. *J Med Chem* 1995; 38: 1666-1672.

Poma A, Bianchini S, Miranoa M. Inhibition of L-tyrosine-induced micronuclei production by phenylthiourea in human melanoma cells. *Mutation Res* 1999; 446: 143-148.

Riley P. Melanogenesis and Melanoma. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 548-552.

Schempp CM, Winghofer B, Muller K, Schulte-Monting J, Mannel M, Schopf E, Simon JC. 2003. Effect of oral administration of hypericum perforatum extract (St. John'swort) on skin erythema and pigmentation induced by UVB, UVA, visible light and solar simulated radiation. *Phytother Res* 17: 141-146.

Schroder, J. Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 20-24.

Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR and Kim YS. Oxyresveratrol as Potent Inhibitor on Dopa Oxidase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 801-803.

Shono S, Toda K. The effect of fatty acids on tyrosinase activity. In : Seiji M (ed) *Pigment Cell*. University of Tokyo Press. Tokyo. pp263-268. 1981.

Steel KP, Davidson DR and Jackson IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (C-kit ligand) is a survival factor. *Development* 1992; 115: 1111-1119.

Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 2-9.

Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G and Hearing VJ. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1221(3): 272-278.

Wright S. Dietary supplementation with n-6 essential fatty acids in atopic eczema. *J Dermatol Treat* 1990; 1: 47-49.

Yoneta, A., Yamashita, T., Jin H.Y., Kondo, S., Jimbow, K. 2004. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res.* 14(5): 387-394.

Yen CT, Yen GC. Effects of Phenolic Acid on Human Phenolsulfotransferases in Relation To Their Antioxidant Activity. *J. Agric Food Chem.* 2003; 51: 1474-1479.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.