

한국산 유근피를 이용한 미백활성 검색

이정아 · 김대경 · 정덕상

제주대학교 자연과학대학 화학과

요 약

한국산 유근피(Root bark of *Ulmus davidiana*)에서 분리된 물질의 미백활성을 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제, mushroom tyrosinase 활성 억제 실험을 통하여 확인하였다. 그 결과 유근피로부터 분리된 JUD-A와 JUD-B에서 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 저해 효과를 확인하였다.

주요어 : melanin contents, MTT, tyrosinase inhibition

I. 서 론

인간의 미에 대한 욕구는 과거에서부터 기인하지만 삶에 대한 여유를 갖고자 하는 현대인들에게 있어서 이 욕구는 필수적이라 할 수 있다. 국내에서는 화장품법이 분리되어 시행된 이후로 기능성 화장품에 대한 많은 관심과 함께 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히, 동양에서는 희고 고운 피부가 미의 상징으로 여겨져 기능성 미백화장품에 대한 연구가 집중되고 있고, 폭발적인 시장 성장을 하고 있다.¹⁾ 보건복지부령이 정하는 기능성화장품이란 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품 그리고 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품을 말한다. 화장품에서 요구되는 효능·효과 중

에서 미백은 주름방지나 육모·양모와 더불어 가장 중요한 효능·효과 중의 하나이다. 피부의 색소침착은 표피의 기저층에 있는 색소세포에 의해서 생성되는 멜라닌이 그 원인으로, 멜라닌 생성을 억제하는 약제는 미백 화장품의 유효성 원료로서 예부터 활발한 연구가 있었다. 한편, 최근에는 화장품 분야에 있어서도 화장품 혹은 의약부외품의 원료 공급원으로서 천연물이 주목되고 있다. 이와 더불어 식물 유래성분의 미백효과에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 기능성 미백화장품에서는 과다하게 생성되는 멜라닌 색소의 억제 및 자외선 차단을 통한 색소 침착 억제 그리고, 생성된 멜라닌 색소의 환원작용을 통하여 미백효과를 유도한다. 멜라닌 생성을 억제하는 물질로 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascorbic

acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, glucosamin, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다.²⁾ 우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜 기간 동안 질병치료와 예방의 목적으로 사용되어 온 한약재는 식물의 2차 대사산물이 가지는 생체에 대한 생리활성 효과를 이용하는 천연재료로서 경험적으로 선택·이용되면서 인체에 대한 안전성은 대체로 검증된 것들이라 할 수 있다. 이러한 점에서 한약재 자체를 기능성 식품의 소재로 가공·이용하는 방법이나, 함유된 생리 활성 물질을 추출하여 목적 지향적 기능성 식품용 첨가제로 이용하는 방법에 대한 연구가 수행될 필요가 있다.³⁾

본 실험에 사용한 유근피 (Root bark of *Ulmus davidiana* var, japonica)는 느릅나무과 (Ulmaceae)에 속하는 느릅나무 (*Ulmus davidiana* var, japonica)의 코르크층을 벗긴 수피 및 근피를 건조한 것으로 유백피, 백유피라고도 한다.⁴⁾

이의 성분으로는 catechin, catechin-5-O-apiofuranoside, mansonone C, G, 7-hydroxy cadalenal, 3-methoxy-7-hydroxy-cadalenal, friedelin, epifriedelanol, taraxerol 등이 보고되어 있다.⁵⁾

유근피는 한방에서 이뇨, 각종 염증, 위궤양, 암등의 질환의 치료에 사용되어 왔고 약리학적 작용으로 진통작용과 부종억제작용 그리고 백혈구 억제작용이 보고되어 있다.⁶⁾

유근피의 성분에 대해서는 이미 많이 보고되었으나, 본 실험에서는 한국산 유근피를 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 최종 멜라닌 합성 억제 효과와 MTT법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에 사용되는 한국산 유근피는 약재상에서 구입하여 사용하였다. 본실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., junsei Co., Hyman Co. 사의 제품을 사용하였다. Nomal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230~400 mesh ASTM, Merck), Reverse-phase column chromatography에는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC (Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄ 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 CD₃OD과 CDCl₃이 사용되었다.

실험 시 사용되는 B16F10 melanoma cell은 KCLB (Korean cell line bank)로부터 분양 받았고, HaCaT cell은 제주대학교 의과대학 생화학 실험실에서 협조를 얻어 100 units/ml penicillin-streptomycin 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번 새 배지로 교환하였으며, 4~7일에 한 번씩 계대 배양하였다. tyrosinase, 20tyrosin, 합성 멜라닌 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-gel)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Sigma (USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 유효성분의 분리

건조된 한국산 유근피 2kg을 80% 에탄올 3L에 침적하고, 실온에서 3개월간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이 80% 에탄올 추출물을 증류수 1L에 현탁하고 separatory funnel에서 *n*-Hexane과 EtOAc, *n*-Butanol, H₂O을 사용하여 순차적으로 용매 분획하여 *n*-Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H₂O층을 얻었다. 용매분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 *n*-Hexane층 (0.2810g)을 normal-phase column chromatography (6×20, Kieselgel 60)에서 *n*-Hexane/EtOAc/MeOH (7/3/0.1)의 전개용매로 전개시켜 6개의 분획을 얻었다. 또한 EtOAc층을 reverse-phase column chromatography (3×15, Silica gel C₁₈-Reversed phase)로 분리하였다. 용출용매는 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 순차적으로 사용하여 6개의 분획을 얻을 수 있었다.

얻어진 6개의 분획 중에서 0% (0.3565g) 메탄올 분획을 normal-phase column chromatography (6×20 cm, Kieselgel 60)에서 CHCl₃/EtOAc/MeOH/H₂O = 4/3/3/0.1의 전개용매로 전개시켜 3개의 분획을 얻을 수 있었다.

3. Tyrosinase 활성도 실험

Tyrosinase 저해 활성 측정은 dopachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다.⁷⁾ 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 450 μl, 시험시료 25 μl, mushroom tyrosinase (1500 U/ml~2000 U/ml)액 25 μl, 1 mM tyrosinase액 30 μl를 섞어서 37 °C에서

15 min 반응시켰다. 그리고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포의 Viability 측정(MTT Assay)

세포의 증식과 독성에 대한 평가는 Mosmann의 방법을 변형한 MTT 정량법을 이용하여 측정하였다.⁸⁾ B16F10 cell과 HaCaT cell (5 × 10⁴ cells/ml)을 각각 96 well plate에 200 μl 넣고 cell을 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 전배양(overnight)시켰고, 부착된 cell에 시료를 처리한 후 4일간 다시 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배양된 세포에 MTT (50 mg/ml) 시약을 처리(0.1 mg)하여 4h 동안 항온기에 두어 formazan을 형성시키고, 형성된 formazan은 DMSO로 녹인 후 540 nm에서 흡광도 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다.

5. 멜라닌 양 측정

시료의 멜라닌 생성 억제 정도는 B16F10 melanoma cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 Gordon PR 방법을 수정하여 측정하였다.⁹⁾ B16F10 melanoma cells (1.0 × 10⁵ cells/ml)을 culture plate에 전종(3 ml)하여 전 배양하고, 4일간 시료를 처리한 후 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. Plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 세포 수를 2.0 × 10⁵ cells/ml로 조정하고 1 N NaOH 200 μl를 넣고 95 °C에서 5 mn간 멜라닌을 녹인 후에 450 nm에서 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다. 합성 멜라닌을 이용하여 standard solution을 만들고 시료와 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정하였다. 멜라닌

농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 유근피 성분에 대한 분리

<JUD-A, JUD-B의 분리 및 구조 확인>

유근피(2 kg)를 80% 에탄올로 추출한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 각각 *n*-hexane층, EtOAc층, *n*-butanol층 그리고 H₂O층으로 분리하였다. 이 용매 분획층 중 *n*-Hexane층을 가지고 normal-phase column chromatography (Hexane/EtOAc/MeOH=7/3/0.1)로 분리한 결과 6개의 분획을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 분획들 중 단일 물질이라 여겨지는 JUD-A와 JUD-B 두 개의 분획을 NMR기기로 확인 하였다.

시료 JUD-A의 ¹H-NMR spectrum에서는 5.3631 ppm의 multiplet 신호에서 vinyl proton의 존재를 알 수 있었다. 그리고 2.7784 ppm의 triplet 신호에서 두개의 이중결합 사이에 위치한 메틸렌기가 존재함을 알 수 있었으며, 1.2638 ppm의 큰 신호에서 CH₂기가 다수 존재함을 알 수 있었다.

시료 JUD-A의 ¹³C-NMR spectrum에서는 127~131 ppm에 존재하는 4개의 신호에서 이중결합이 2개 존재함을 알 수 있었다. 이 사실과 ¹H-NMR spectrum의 분석결과를 종합하여 CH=CHCH₂CH=CH가 이 물질에 1개 존재하며 다른 형태의 이중결합은 존재하지 않음을 알 수 있었다. 또한 180.329 ppm의 위

치로 보아서 유기산 형태인 RCOOH의 탄소 가 존재함을 예측 할 수 있었다.

이상의 분석에서 JUD-A는 9, 12-octadecadienoic acid (linoleic acid)로 예측을 하고, 시중에 판매중인 linoleic acid의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum과 비교하였다. 그 결과 JUD-A는 linoleic acid 라고 예측할 수 있었다.

JUD-B의 NMR data를 확인한 결과, 원하는 순도에는 못 미치지만 거의 순수하게 분리된 것으로 보여진다. ¹H-NMR data를 확인한 결과 앞에서 분리한 linoleic acid의 ¹H-NMR data와 거의 유사하였다. JUD-B의 분획물이 linoleic acid와 다른 부분은 3~5 ppm 부근에 peak가 나타난다는 점이다. 이 부분의 peak로 보아 이 분획물은 linoleic acid에 당이 결합되어 있는 형태일 것이라 예상되어 진다.

<JUD-C, JUD-D의 분리 및 동정>

앞에서 분리한 용매분획층들 중에서 ethyl acetate층을 가지고 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 사용하여 역상실리카 겔 column chromatography로 분리한 결과 6개의 분획을 얻을 수 있었다. 이 중 0% MeOH 분획을 이용하여 순상실리카겔 column chromatography (CHCl₃/EtOAc/MeOH/H₂O = 4/3/3/0.1)로 JUD-C와 JUD-D를 얻었다. 이 두 분획물의 경우 TLC와 NMR data를 확인한 결과 거의 순수하게 분리된 것으로 보여지기는 하지만, 좀 더 깨끗하게 분리할 필요가 있다고 보여지며, 구조 분석 또한 필요할 것으로 보여진다.

2. Tyrosinase의 저해 효과

Tyrosinase inhibition 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군과, enzyme과 sample이 들어있는 반응시료액의 흡광도 차이를 백분율을 이용하여 표현되며 수치가 높을수록 tyrosinase inhibition 효과가 우수한 경우이다. 이 실험에서는 tyrosinase 저해효과가 좋다고 알려진 arbutin과 유근피의 에탄올 추출물, 그리고 이들로부터 분리한 JUD-A, B, C와 D의 tyrosinase 저해효과를 살펴보았다. 실험결과 JUD-B의 tyrosinase 저해효과가 77.18%로 좋은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Tyrosinase inhibitory activity of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C and D of root bark of *Ulmus davidiana*

Fraction	Inhibition of tyrosinase activity (%)
Arbutin	47.915
EtOH	-22.43
JUD-A	-6.52
JUD-B	77.18
JUD-C	-8.54
JUD-D	-21.265

3. UV에 대한 세포의 viability 측정

Melanin contents 측정을 하기에 앞서 이들 melanoma 세포에 대한 유근피 분획물들의 독성을 확인하기 위하여 B16F10 cells ($5.0 \times 10^4 / \text{ml}$)을 처리한 후 MTT를 처리하여 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인해 보았다. Arbutin과 비교하여 보았을 때 분획물들은 Arbutin보다 세포 생존률이 더 높은 것

을 확인할 수 있었다. (Figure 1.)

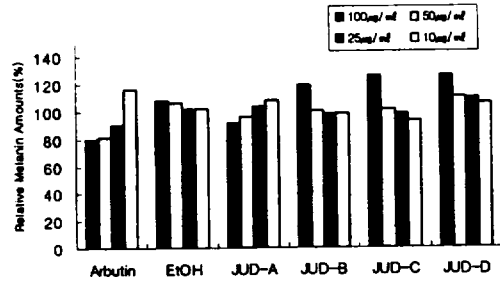


Figure 1. Cell viability using B16F10 melanoma of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of *Ulmus davidiana*

4. Melanin contents 측정

세포 수준에서의 실험 시료의 멜라닌 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16F10 cell에 시료를 처리 3일 후 최종 생성된 멜라닌 양을 측정하였다. 최종적으로 생성되는 멜라닌의 양이 적을수록 미백활성이 있다고 판단되어진다. 이 실험에 사용된 시료들 역시 위의 tyrosinase 저해 효과에 사용했던 시료들을 농도별로 사용하여 실험하였다. 그 결과 JUD-A와 JUD-B에서 Arbutin과 거의 비슷한 경향을 나타내고 있는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 2.)

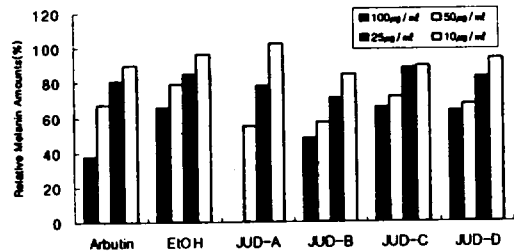


Figure 2. Inhibitory activity of melanin synthesis of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of *Ulmus davidiana* on B16F10 melanoma cell

IV. 결 론

유근피에서 분리된 물질을 가지고 미백효과를 확인하였다. Tyrosinase저해 활성을 확인한 결과 JUD-B의 저해 활성이 77.18%로 Arbutin (47.975%)과 비교하여 더 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 멜라닌의 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16F10 cell에 시료를 처리 3일 후 최종 생성된 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 JUD-A와 JUD-B에서 억제효과가 있음을 확인할 수 있었다. 마지막으로 melanoma 세포에 대한 유근피 분획물들의 독성을 확인하기 위하여 B16F10 cells을 처리한 후 MTT를 처리하여 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인해 보았다. 그 결과 멜라닌 양을 측정하여 억제효과가 있음을 확인한 JUD-A와 JUD-B의 경우 세포 독성이 거의 없다는 것을 알 수 있었다.

유근피에서 분리한 물질들의 구조를 확인해 본 결과 JUD-A의 NMR data는 문헌상의 data들과 비교해 볼 때 linoleic acid임을 예측할 수 있었다. 그러나 NMR data의 peak가 같은 위치에 나타났다고 하여 같은 물질이라고 말할 수는 없으므로 JUD-A를 고순도로 확보하여 명확한 구조 동정이 필요하다고 여겨지며, NMR data를 이용한 구조분석 이외에 다른 분석도 더 필요하다고 보여진다.

JUD-B의 경우는 NMR data를 확인하여 볼 때 순수한 물질이라고 보여지며, 앞에서 분리한 linoleic acid의 NMR data와 비교하여 볼 때 3~5ppm에서의 peak만 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. JUD-B의 경우 구조상의 차이로 인하여 linoleic acid와는 다르게 tyrosinase 저해효과 및 melanin

contens에서 좋은 활성을 나타내는 것으로 확인 되었다. 그러므로 향후 JUD-B 물질을 고순도로 확보하여, 더욱 명확한 구조동정과정이 필요할 것으로 보여지며, 미백효과에 대한 또 다른 활성실험을 확인하는 작업이 진행되어야 할 것이다.

JUD-C와 JUD-C의 경우에도 TLC와 NMR상으로는 단일물질이라고 보여지기는 하지만 이 두 물질에 대한 구조동정과정이 더 필요할 것으로 보여지며, 이 두 물질에 대한 활성 data를 더 확보해야 할 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

1. 이현호, 최근 미백화장품의 개발동향, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 23, 43 (1997).
2. S. Ando, O. Ando, Y. Suemoto, and Y. Mishima, Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.*, 100, 15(1993) ; G. Imokawa and Y. Mishima, Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melanoma, *Cancer Res.*, 42, 1994 (1982). ; M. Masuda, T. Tejima, and T. Suzuki, Skin lighteners, *Cosmetics & Toiletries*, 111, 65. (1996).
3. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자)추출물의 항산화효과 및 항균활성효과 농업생명과학연구 37(4) : 69~75. (2003)
4. 보건사회부, 대한약전의 생약규격집(한약), pp215(1987) ; 신 민교, 원색임상분초학,

- pp165, 영림사 (1984)
5. Son, B. W., Park, J. H., and zee, O. P., Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*, *Arch Pharm Res.*, 12, 219 (1989) ; Chen, F. C., Lin, Y. M., Chen, A. H., *phytochemistry*, 11, 1190 (1972) ; Kim, S. H., Hwang, K T. and Park, J. C., Isolation of flavonoids and detemination of rutin from the leaves of *ulmus parviflora*, *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 229 (1992)
 6. Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, J S., A study on efficacy of *Ulmi cortex.*, *Kor. J. Pharmacogn*, 21, 217 (1990)
 7. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay *J. Immun. Methods*, 65, 55(1983)
 8. K. Meada and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of whitening cosmetic components in human melanocyte. *j. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 361 (1991).
 9. P.R. Cordon, C. P. Mansur, and B. A, Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinicyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.*, 2, 566 (1989)