



추출조건에 따른 도깨비부채 뿌리의 멜라닌 억제효과

최상윤^{1†} · 김호철²

Extraction Conditions Affect Melanin Inhibitory Activity in *Rodgersia podophylla* Root

Sang Yoon Choi^{1†} and Ho Cheol Kim²

ABSTRACT

Received: 2020 May 26
1st Revised: 2020 June 15
2nd Revised: 2020 June 22
3rd Revised: 2020 June 24
Accepted: 2020 June 24

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: The inhibitory effect of *Rodgersia podophylla* root extract on melanin production has been reported, however, the study on the optimal extraction conditions that increase melanin inhibitory activity has not yet been performed.

Methods and Results: In this study, we compared the melanin inhibitory activity of *R. podophylla* root extract obtained through different preprocessing and extraction methods. The melanin inhibitory activity was examined using Melan-A melanocytes. The results indicated that the inhibitory activity of *R. podophylla* roots collected in August was higher than that of the roots collected in May and November. Additionally, non-dried *R. podophylla* roots exhibited higher activity than dried roots, and the stirring extract was more active than the ultrasonic extract.

Conclusions: Collection of *R. podophylla* root when the temperature is high, without drying, and stirring extraction are considered to be the optimal extraction conditions for increased melanin inhibitory effect.

Key Words: *Rodgersia podophylla*, Melanin, Extraction, Melan-A, Tyrosinase

서 언

자외선 등의 외부자극이 일어나면 피부에서는 이에 대항하여 멜라닌을 생합성하여 손상을 억제한다 (No *et al.*, 1999; Costin and Hearing, 2007; Dheeraj *et al.*, 2017). 멜라닌은 피부내의 기저층에 주로 존재하는 멜라닌 생성세포 (melanocyte)에서 생성되며 각질형성세포 (keratinocyte)로 전달되어 피부 표피층에 축적되어 피부색의 변화를 일으킨다 (Slominski *et al.*, 2004; D'Mello *et al.*, 2016). 멜라닌은 피부를 보호하는 역할을 하나 멜라닌의 과잉생성은 피부흑화와 피부색소질환인 기미, 주근깨, 검은 반점 등을 일으킨다 (Miyamura *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010; Pillaiyar *et al.*, 2017). 이러한 문제를 해결하기 위하여 현재까지 알부틴, 코지산, 나이아신 아마이드, 유용성 감초추출물 등의 피부미백 소재가 개발되어졌으나 사회적 요구의 증대로 새로운 피부미백 소재에 대한 필요성이 증가되고 있다 (Inoue *et al.*, 2013;

Saeedi *et al.*, 2019).

도깨비부채 (*Rodgersia podophylla*)는 장미목 범의귀과에 속하는 여러해살이풀로써 우리나라의 경기, 경북, 강원 등의 산속에 자생한다 (Kim *et al.*, 2002). 도깨비부채에 대한 생리활성 연구로는 지상부의 간 보호 (Chin *et al.*, 2004) 및 항염증 효과 (Chin *et al.*, 2006)가 보고된 바 있을 뿐 연구가 미진하다가 최근 들어 잎과 뿌리 추출물의 항균, 항산화 및 항당뇨 효과가 (Pyo *et al.*, 2020), 잎 추출물의 항염증 및 암세포 억제활성 (Kim *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020)이 보고되었다. 도깨비부채의 성분에 대한 연구로는 지상부에서 quercetin 3-O- α -L-(5"-O-acetyl)-arabinofuranoside를 비롯한 몇몇 flavonol glycosides, bergenin 유도체 등이 보고된 바 있으나 (Chin *et al.*, 2004; Chin and Kim, 2006) 뿌리의 성분에 대한 연구보고는 미비한 실정이다.

도깨비부채 뿌리의 피부미백효과가 최초로 발견하여 보고한 바 있으나 (Choi *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007), 피부미백

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-219-9307 (E-mail) sychoi@kfri.re.kr

¹한국식품연구원 책임연구원 / Researcher, KFRI, Wanju 55365, Korea.

²경희대학교 한의과대학 교수 / Professor, Kyung Hee University, College of Korean Medicine, Seoul 02447, Korea.

활성을 높이기 위한 추출조건에 대한 연구는 진행된 바 없어 본 연구에서는 채취 시기, 전처리 및 추출방법에 따른 멜라닌 억제활성을 비교 검증하여 높은 활성을 나타내는 추출물 제조를 위한 최적의 추출조건을 설정하여 피부미백소재로서의 활용성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용한 도깨비부채 (*Rodgersia podophylla*)는 경기도 일대에서 채취된 것을 경희대학교 한의과대학 본초학 교실 김호철 교수 연구팀으로부터 검증 및 제공받아 사용하였다. 도깨비부채의 뿌리를 분리하여 증류수로 세척한 후 비건조 시료는 바로 파쇄하고 95% 에탄올을 사용하여 교반 및 초음파 추출하였으며, 건조시료는 50°C에서 열풍건조 후 파쇄하고 95% 에탄올을 사용하여 교반 및 초음파 추출하였다. 교반추출은 overhead stirrer (EYELA Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 상온에서 1 시간씩 3 회 반복 추출하였으며 초음파 추출은 ultrasonicator (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)를 사용하여 상온에서 1 시간씩 3 회 반복 추출하였다. 추출액은 여과 후 감압 농축하여 -20°C에 보관하면서 실험시료로 사용하였다.

2. 세포배양 및 시료처리

마우스 유래의 멜라닌 생성세포인 Melan-A 세포는 cancer research사 (London, England)로부터 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Melan-A 세포 (1×10^5 개)를 24 well plate에 접종하고 24 시간동안 배양한 후 각각의 농도로 용매 (propylene glycol : EtOH : H₂O = 5 : 3 : 2)에 녹인 10 μ l의 도깨비부채 시료를 1 일 1 회 새로운 배지와 함께 3 일간 처리하였다.

3. 세포생존율 측정

마지막 처리 24 시간 후에 배지를 제거하고 세포를 phosphate buffer saline (PBS)로 세척하였다. 10% 에탄올에 녹인 0.1% crystal violet 200 μ l를 첨가하고 5 분간 상온에서 배양하여 살아있는 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 증류수로 2 번 세척하고 1 ml의 에탄올을 첨가하여 10 분간 교반한 뒤 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 멜라닌 생성량의 측정

마지막 처리 24 시간 후에 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척 하였다. 각 well 당 1 ml의 1 N NaOH를 가하고 교반하여 멜라닌을 녹인 후 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Tyrosinase 활성억제도 측정

Phosphate buffer (67 mM, pH 6.8)에 녹인 8.0 mM levodopa (L-Dopa) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 120 μ l와 여러 농도로 메탄올에 녹인 도깨비부채 시료 40 μ l를 96-well plate에 넣어 섞은 후 phosphate buffer (67 mM, pH 6.8)에 녹인 125 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액 40 μ l를 첨가하여 37°C에서 30 분간 배양한 후 생성된 dopachrome의 양을 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다.

6. 세포내 단백질 발현량 측정

도깨비부채 시료를 Melan-A 세포에 3 일간 처리 후 lysis buffer로 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질 50 μ g을 8% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 후 tyrosinase 및 TRP-2 primary antibody와 anti-goat secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 배양 후 enhanced chemiluminescence (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 검출하였다.

7. 통계방법

각 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차 (means $\pm$ SD)로 표시하였으며 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA, Tukey Multiple Comparison으로 분석하였고 p -value < 0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

1. 추출조건에 따른 Melan-A 세포에서의 멜라닌생성량 변화

건조하지 않은 도깨비부채 (*Rodgersia podophylla*) 뿌리와 열풍 건조된 도깨비부채 뿌리를 파쇄 후 동일한 양의 에탄올을 가하고 각각 교반 추출 및 초음파 추출하여 도깨비부채 뿌리 추출물을 제조하였다. 제조된 도깨비부채 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 Melan-A 세포를 이용하여 측정된 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

건조 여부에 따른 멜라닌 억제활성을 비교하여 보면 초음파 추출 방법으로 추출한 건조하지 않은 도깨비부채 뿌리 시료가

100 ppm 에서 세포독성 없이 18.3%의 멜라닌 생성을 억제하여 열풍 건조한 시료의 3.3% 보다 높은 멜라닌 억제 활성을 나타내었다. 또한 교반추출 방법으로 추출한 도깨비부채 뿌리 시료 역시 건조하지 않은 시료가 열풍 건조한 시료보다 높은 멜라닌 억제활성을 나타내어 건조하지 않고 추출하는 것이 멜라닌 억제 활성이 높은 추출물을 제조하는데 유리한 것으로 판단된다.

또한 교반 추출 방법과 초음파 추출 방법을 사용하여 도깨비부채 뿌리 시료를 추출하였을 때 건조하지 않은 시료와 열풍건조 시료 모두에서 교반 추출 시료가 높은 멜라닌 억제 활성을 나타낼 뿐만 아니라 추출 수율도 초음파 추출 (1.1%) 보다 교반 추출 (2.1%)이 높았다. 따라서 도깨비부채 뿌리 추출물 제조시에는 초음파 추출보다는 교반 추출하는 것이 멜라

닌 억제 활성 및 수득을 측면에서 유리한 것으로 판단된다.

Kim 과 Lee (2015)는 melanoma 세포인 B16F10 cell에서 미선나무 70% 에탄올 추출물의 멜라닌 억제활성이 추출 전 초음파 처리에 의해 유의적인 큰 변화가 없다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구와는 추출온도 및 처리시간 등의 추출조건이 다르고 도깨비부채 뿌리와 미선나무 함유성분의 초음파 처리후의 특성이 상이하여 나타나는 차이라 추측된다.

2. 채취시기에 따른 Melan-A 세포에서의 멜라닌생성량 변화

채취시기에 따른 멜라닌 억제 활성의 차이를 알아보기 위해 5월, 8월, 11월에 채취된 도깨비부채 뿌리를 건조하지 않고 교반하여 추출물을 제조한 후 멜라닌 억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 측정 결과 8월에 채취된 도깨비부채

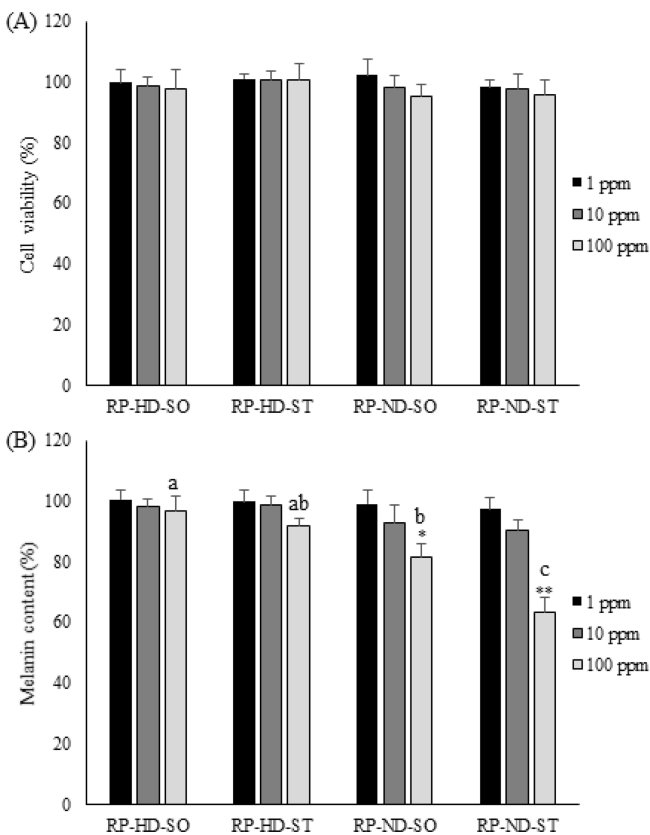


Fig. 1. Effects of *Rodgersia podophylla* root extracts on cell viability and melanin production in Melan-A cells. (A); effect on cell viability. (B); effect on melanin production. RP-HD-SO; *Rodgersia podophylla* root extracted using ultrasonic after hot air drying, RP-HD-ST; *Rodgersia podophylla* root extracted using stirring after hot air drying, RP-ND-SO; non-drying *Rodgersia podophylla* root extracted using ultrasonic, RP-ND-ST; non-drying *Rodgersia podophylla* root extracted using stirring. Data represent the mean of triplicate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with untreated group. ^{a-c}Mean values with different superscripts are significantly different among the groups ($p < 0.05$).

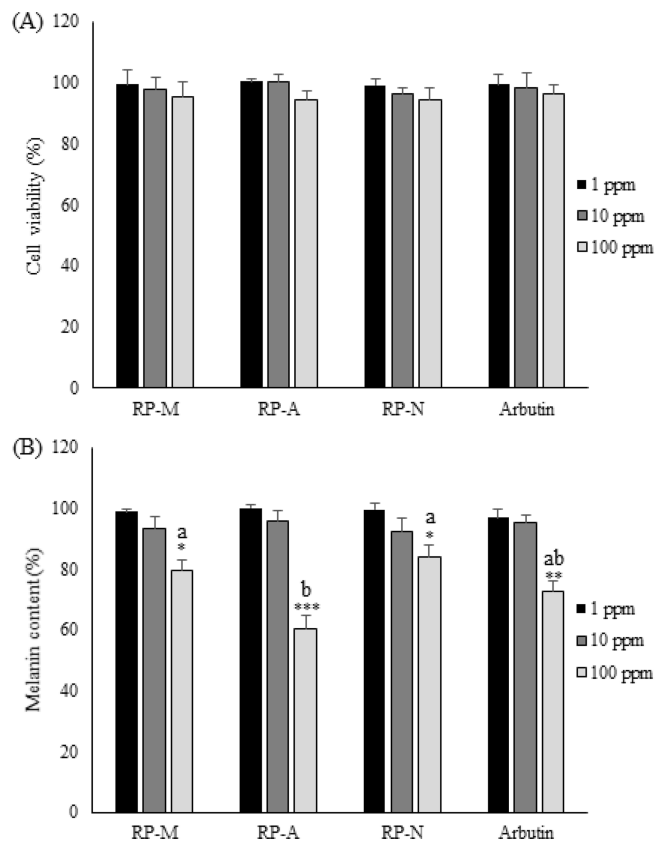


Fig. 2. Cell viability and melanin inhibition of non-drying *Rodgersia podophylla* root stirring extracts by collection time. (A); effects on cell viability. (B); effect on melanin production. RP-M; *Rodgersia podophylla* root extract corrected in May, RP-A; *Rodgersia podophylla* root extract corrected in August, RP-N; *Rodgersia podophylla* root extract corrected in November. Arbutin was used as positive control. Data represent the mean of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with untreated group. ^{a-b}Mean values with different superscripts are significantly different among the groups ($p < 0.05$).

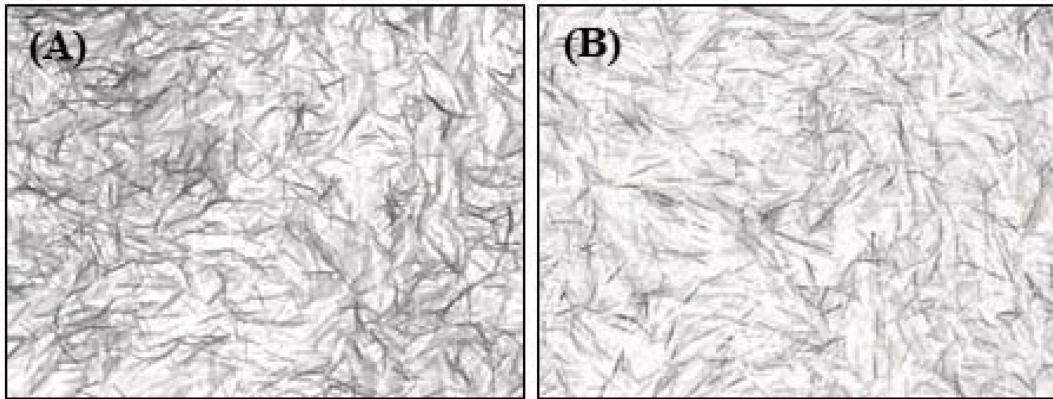


Fig. 3. Melan-A cells image after 3 days treatment with *Rodgersia podophylla* root extract corrected in August (magnification 200 ×). (A); untreated cells, (B); 100 ppm of RP-A (*Rodgersia podophylla* root extract corrected in August) treated cells.

뿌리 추출물이 가장 높은 멜라닌 억제 활성을 나타내었으며 3 일간 처리 후의 Melan-A 세포사진은 Fig. 3에 나타내었다. 특히 8월에 채취된 도깨비부채 뿌리 추출물을 100 ppm으로 처리 시 39.6%의 멜라닌 억제 활성을 나타내었고 이는 알부틴의 27.5%와 비교할 때 통계적으로는 유의하지 않았으나 높은 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 볼 때, 도깨비부채 뿌리 추출물 제조 시에는 8월과 같은 기온이 높은 여름에 채취하여 추출하는 것이 멜라닌 억제활성이 높을 것으로 판단된다.

3. 도깨비부채 뿌리 추출물이 tyrosinase 활성 및 발현량에 미치는 영향

Melan-A 세포에서 가장 우수한 멜라닌 억제활성을 나타낸 도깨비부채 뿌리를 8월에 채취하여 건조하지 않고 교반 추출한 시료가 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정한 결과 100 ppm 농도에서 37.8%의 활성억제를 나타내었고, 동일 농도에서 Melan-A 세포내의 tyrosinase 발현량을 효과적으로 감소시켰다 (Fig. 4).

따라서 본 연구에서 제조된 도깨비부채 뿌리 추출물은 멜라닌 생합성 과정의 초기에 주요한 역할을 하는 tyrosinase (Lai *et al.*, 2018)의 활성 및 발현량을 억제함으로써 생성되는 멜라닌의 양을 감소시키는 것으로 확인하였다.

이러한 결과를 종합하여 보면, 본 연구에서 제조된 도깨비부채 뿌리 추출물은 Melan-A 세포에 100 ppm 농도로 처리 시 39.6%의 멜라닌 억제 활성을 나타내어 이전 연구 (Choi *et al.*, 2006)에서 보고된 도깨비부채 뿌리 추출물의 24.6% 이하에도 멜라닌 생성 억제효과가 더욱 개선되었고 tyrosinase 억제효과 역시 높았다.

따라서 도깨비부채 뿌리를 8월에 채취하여 건조하지 않고 교반 추출하는 것이 멜라닌 억제 활성 증가에 긍정적인 조건일 것으로 사료되며 향후 활성성분 규명 및 추출조건에 대한 함량변화에 대한 추가연구를 진행할 예정이다.

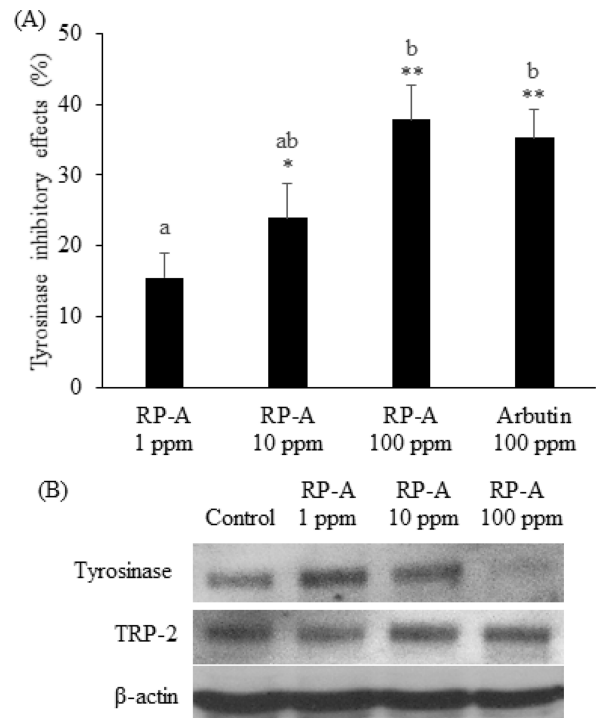


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory effect *Rodgersia podophylla* root extract corrected in August (RP-A). (A); inhibitory effect on tyrosinase activity, (B); inhibitory effect on intracellular tyrosinase level in Melan-A cells. Data represent the mean of triplicate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with untreated group. ^{a-b}Mean values with different superscripts are significantly different among the groups ($p < 0.05$).

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 주요연구개발사업(과제번호: E0186701-03)과 보건 의료기술진흥사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Chin YW and Kim JW.** (2006). Three new flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 54:234-236.
- Chin YW, Lim SW, Kim YC, Choi SZ, Lee KR and Kim JW.** (2004). Hepatoprotective flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. Planta Medica. 70:576-577.
- Chin YW, Park EY, Seo SY, Yoon KD, Ahn MJ, Suh YG, Kim SG and Kim JW.** (2006). A novel iNOS and COX-2 inhibitor from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 16:4600-4602.
- Choi SY, Kang NJ and Kim HC.** (2006). Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:27-30.
- Choi W, Miyamura Y, Wolber R, Smuda C, Reinhold W, Liu H Kolbe L and Hearing VJ.** (2010). Regulation of human skin pigmentation *in situ* by repetitive UV exposure: Molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. Journal of Investigative Dermatology. 130:1685-1696.
- Costin GE and Hearing VJ.** (2007). Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. The FASEB Journal. 21:976-994.
- Dheeraj M, Shikha C, Parveen K, Vivek V, Kumar D, Deepika T, Khushboo C, Sandeep KM and Dilip S.** (2017). Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism. Advances in Experimental Medicine and Biology. 996:71-87.
- D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC and Askarian-Amiri ME.** (2016). Signaling pathways in melanogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 17:1144. <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/7/1144> (cited by 2020 March 12).
- Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K and Akamatsu H.** (2013). Analysis of the effects of hydroquinone and arbutin on the differentiation of melanocytes. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 36:1722-1730.
- Kim H, Kim JD, Son HJ, Park GH, Eo HJ and Jeong JB.** (2019). Anti-cancer activity of the leave extracts of *Rodgersia podophylla* through β -catenin proteasomal degradation in human cancer cells. Korean Journal of Plant Resources. 32:442-447.
- Kim HN, Kim JD, Park SB, Son HJ, Park GH, Eo HJ, Kim HS and Jeong JB.** (2020). Anti-inflammatory activity of the extracts from *Rodgersia podophylla* leaves through activation of Nrf2/HO-1 pathway, and inhibition of NF- κ B and MAPKs pathway in mouse macrophage cells. Inflammation Research. 69:233-244.
- Kim NY and Lee HY.** (2015). Effect of antioxidant and skin whitening of ethanol extracts from ultrasonic pretreated *abeliophyllum distichum* nakai. The Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:155-160.
- Kim YS, Lim DO, Oh HK and Shin HT.** (2002). Vascular plants of Taebaksan, Hambaesan, Geumdaebong(peak) and maebongsan in the Baekkdudaegan. Korean Journal of Environment and Ecology. 15:293-318.
- Kong YH, Lee PJ and Choi SY.** (2007). Action of *Rodgersia podophylla* root extracts on melanin biosynthesis in skin. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:434-436.
- Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M and Dijkstra BW.** (2018). Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. Chemistry-A European Journal. 24:47-55.
- Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, Ito S, Smuda C, Passeron T, Choi W, Batzer J, Yamaguchi Y, Beer JZ and Hearing VJ.** (2006). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. Pigment Cell Research. 20:2-13.
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T and Chung HY.** (1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Sciences. 65:241-246.
- Pillaiyar T, Manickam M and Jung SH.** (2017). Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. Cell Signalling. 40:99-115.
- Pyo SJ, Lee YJ, Kang DG, Son HJ, Park GH, Park JY and Sohn HY.** (2020). Antimicrobial, antioxidant, and anti-diabetic activities of *Rodgersia podophylla*. Journal of Life Science. 30:298-303.
- Saeedi M, Eslamifar M and Khezri K.** (2019). Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. Biomedicine & Pharmacotherapy. 110:582-593.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J.** (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiological Reviews. 84:1155-1228.