

피부노화 억제활성을 갖는 천연 추출물의 탐색

신 지 영
충청대학

Screening of Natural Products that have Activities against Skin-Aging

Ji-Young Shin

Department of Food and Science, Chung Cheong College, Chung-Buk 363-792, Korea

Abstract

To screen antioxidative and whitening effects of some medicinal plants, 70% ethanol extracts were tested for their electron donating abilities to DPPH(α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) and inhibitory activities against lipid peroxidation, and tyrosinase inhibition in vitro. The electron donating activities of 70% ethanol extracts at the concentration of 100 μ g/ml were in the order of *Forsythiae fructus* > Polyporaceae > *Glycyrrhizae radix* > *Schizandrae fructus* > *Ramulus mori* > *Carthami semen*. The order was *Forsythiae fructus* > *Carthami semen* > *Schizandrae fructus* > *Polyporaceae* > *Glycyrrhizae radix* when tested at 10 μ g/ml, indicating that the activities depend on the concentration. The electron donating activities of *Forsythiae fructus* and *Carthami semen* at the concentration of 1 μ g/ml were 37% and 31% respectively. Lipid peroxidation inhibitory activities were in the order of *Artemisia messerschimidtiana* > *Glycyrrhizae radix* > *Rehmaniae radix* > *Ramulus mori*. Tyrosinase inhibitory activities were in the order of *Ramulus mori* > *Artemisia messerschimidtiana* > *Oyster mushroom*. The results suggest that *Forsythiae fructus*, *Artemisia messerschimidtiana* and *Ramulus mori* could be used as materials for anti-skin aging functional cosmetics.

Key words: DPPH, anti-skin aging, lipid peroxidation.

서 론

피부는 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다. 자외선의 영향으로 피부에 활성산소가 생성되고 이에 따라 생성된 활성 산소종은 피부 세포를 손상시키며 손상받은 세포는 식세포에 의해 제거된다. 자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이는 즉 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 멜라닌 생성이 증가된 결과이다. 자외선에 의한 피부의 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 나타난다¹⁾.

사람의 색소세포에서 생성되는 멜라닌은 eumela-

nin 과 pheomelanin으로 대별된다. Melanin 생합성은 먼저 tyrosine을 기질로 하여 L-3,4-dihydroxy-phenylalanine이 생성되고 이를 다시 L-dopaquinone으로 전이시키는 연속된 효소적 산화(hydroxylation and oxidation)가 진행된 후 각 생성물의 중합반응 등에 의해 이루어진다^{2,3,4)}. 또한 자외선의 유해작용으로 각종 활성산소 및 산화성 free radical이 관여한다⁵⁾. 피부는 자외선에 노출되면 활성산소를 생성하고 이는 피부 내 광증감 반응에 의해 좌우된다. 광증감 반응은 type I, 혹은 type II 반응 형태로 일어난다^{6,7)}. Type I 반응 생성물은 라디칼 혹은 라디칼이온이고, Type II 반응은 1O_2 및 $O_2^{\cdot -}$ 을 포함하는 활성 산소종을

* Corresponding author : Ji-Young Shin

생성시킨다. SOD(superoxide dismutase)는 $O_2^{\cdot -}$ 을 H_2O_2 로 전환시키며 H_2O_2 는 쉽게 세포막을 통과할 수 있다. 또한 $O_2^{\cdot -}$ 은 Fe(III)와 Cu(II)를 환원시킬 수 있고 환원된 Fe(II)와 Cu(I)는 H_2O_2 를 환원시켜 $\cdot OH$ 를 생성시킨다. 이 $\cdot OH$ 는 세포의 손상에 치명적인 활성 산소종의 하나로 알려져 있다^{8,9)}. 1O_2 는 자외선 조사시 광증감제 분자로부터 바닥상태 산소로의 에너지 전달에 의해 발생된다. 피부는 생체 내 광증감제(예, 포르피린, 리보플라빈 등)뿐만 아니라 화장품, 약물, 약품 그리고 산업적 방출물에 포함된 수 많은 외부 광증감제에 노출되어 있다. 멜라닌 생성을 감소시키기 위해서는 피부의 산화적 스트레스를 감소시킬 필요가 있다. 그리고 멜라닌 생성 반응 자체가 안정한 화합물인 tyrosine에서 출발하는 효소, 비효소적 산화 반응임을 감안할 때^{10,11)} 항산화제를 사용하면 멜라닌 생성을 억제할 수 있을 것으로 본다. 지금까지는 미백제 개발이 주로 tyrosinase 저해 활성에 관심을 두었으나 최근에는 tyrosinase 저해활성의 활성억제 뿐만 아니라 자동산화 반응의 활성억제도 부각되고 있다. 따라서 본 실험에서는 tyrosinase의 활성억제 저해활성 뿐만 아니라 자동산화 반응도 억제하는 즉 항산화 및 미백효과에 관여하는 천연 추출물을 검색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 생약재

실험에 사용한 홍화씨, 연고, 감초, 오미자 등의 약용식물류는 건조물 상태의 재료를 시중에서 구입하여 사용하였다.

2. 시약

Mushroom tyrosinase 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), trichloroacetic acid, thiobarbituric acid는 Sigma사 제품을 사용하였으며, 추출용매는 EP급을 사용하였다.

3. 시료추출

약용식물들은 70% 에탄올을 넣고 80°C에서 2시간 씩 3회 추출하여 진공 농축하여 시료로 사용하였다.

4. 전자 공여 작용(Electron Donating Ability)

DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)용액에 대한 전자 공여효과로 환원력을 측정하였다. 생약 추출물에 $4 \times 10^{-4}M$ DPPH용액(absolute ethanol용액)을 동량 혼합한 후 Vortex Mixer로 10초간 진탕하고 30

분 방치 후 ELISA reader(Spectra Max 340, U.S.)로 520nm에서 측정하여 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Electron donating ability (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

5. 지질과산화 억제작용

Mitsuda방법¹²⁾을 이용해 기질용액(linoleic acid)을 조제한 후 기질용액 20ml에 0.1M phosphate buffer 19.2ml 및 1% 추출 시료 용액 0.8ml을 넣고 40°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응액 2ml에 35% TCA 1ml 및 0.75% TBA 2ml을 혼합하여 95°C에서 40분간 발색 반응시켰다. 실온 냉각한 후 초산 1ml와 클로로포름 2ml을 첨가하고 세차게 흔든 다음 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액을 ELISA reader 532 nm에서 측정하여 다음과 같은 방법으로 지질과산화 억제율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

6. Tyrosinase 활성 억제작용

효소 활성 저해능 측정은 35°C 수조에서 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2ml, 5mM L-DOPA solution 0.2ml 및 추출시료용액 0.5ml의 혼합액에 tyrosinase (250unit/ml) 0.1ml를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475nm에서 ELISA reader로 측정할 후 위와 같은 방법으로 억제율을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 전자공여 효과

DPPH 분자내 질소는 쉽게 전자를 받아들임으로써 본래의 짙은 자색을 잃어버리는 성질을 갖는다. 이러한 전자 공여 작용은 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 된다. 이런 활성 free radical은 인체 내에서 각종 질병과 노화를 일으키므로 식물 추출물 등에서 이들과 반응함으로써 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 분리할 필요성이 있다. 본 실험결과 DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)에 대한 식물추출물의 전자 공여 효과는 Table 1과 같다. 추출물

Table 1. Electron donating ability(EDA) of 70% ethanol extract of medicinal plants *in vitro*

Name	Korea name	EDA(%)	
		10 μ g/ml	100 μ g/ml
<i>Polyporaceae</i>	운지	26	83
<i>Glycyrrhizae radix</i>	감초	26	80
<i>Ginseng radix alba</i>	인삼	16	26
<i>Puerariae radix</i>	갈근	-	46
<i>Schizandrae fructus</i>	오미자	37	76
<i>Forsythiae fructus</i>	연교	75	92
<i>Carthami semen</i>	홍화씨	55	72
<i>Atractylodis rhizoma alba</i>	창출	11	39
<i>Ramulus mori</i>	상지	16	73
<i>Artemisia messerschmidtiana</i>	약쑥	20	33
<i>Oyster mushroom</i>	느타리버섯	-	2

Table 2. Electron donating ability(EDA) of 70% ethanol extract of *Forsythiae fructus* and *Carthami semen* depending on the concentration *in vitro*

Concentration(μ g/ml)	EDA(%)	
	A ¹	B ²
1	37	31
5	70	43
10	89	55
20	94	55
50	92	76
100	94	72

¹ Forsythiae fructus, ² Carthami semen.

의 농도 10 μ g/ml의 경우 연교>홍화씨>오미자>운지, 감초 순으로 나타났으며 추출물의 농도 100 μ g/ml에서는 연교 > 운지 > 감초 > 오미자 > 상지 > 홍화씨 순

으로 나타났다. 연교, 홍화씨는 10 μ g/ml 농도에서도 높은 전자 공여 효과를 나타냈으며 100 μ g/ml 농도에서는 운지, 감초, 상지가 높은 전자 공여 효과를 나타냄으로서 전자공여효과에 있어 추출물 농도에 따라 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 추출물 중에 공존하는 물질의 영향이거나 전자공여 활성 물질의 농도에 따른 화학적 성질변화에 기인한 것으로 사료된다.

Table 1에서 추출물농도 10 μ g/ml에서 연교의 경우 75%, 홍화씨의 경우 55%로서 강한 전자공여능을 나타내므로 농도를 더 세분하여 전자공여능을 측정해 본 결과 Table 2와 같았다. 연교와 홍화씨는 1 μ g/ml 농도에서 전자공여능이 각각 37%, 31%로서 매우 낮은 농도에서도 강한 전자공여능을 나타냈다.

홍화는 국화과에 속하는 1년 생으로 색조화장품에 사용되며 홍화씨는 아테롬성 경화예방에 효능이 있다고 한다¹³⁾. 연교는 물푸레나무과에 속하는 열매로 향

Table 3. Inhibition effect of medicinal plants against lipid peroxidation *in vitro*

Name	Korea name	Inhibition effect(%)	
		10 μ g/ml	100 μ g/ml
Oyster mushroom	느타리버섯	32	0
<i>Ramulus mori</i>	상지	23	38
<i>Rehmannia glutinosa</i>	홍경천	42	38
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	7	-
<i>Glycyrrhizae radix</i>	감초	51	55
<i>Artemisia messerschmidtiana</i>	약쑥	74	73
BHT		61	-
Vitamin E acetate		38	-

균, 해독, 소화, 이노제 등의 효능이 있으며 수렴작용 및 황색포도상구균에 대한 항균작용이 있다고 알려져 있다¹⁴⁾. 오미자는 간 기능개선 효과 및 정신적 기능개선이 있다고 한다¹⁵⁾.

2. 지질과산화 억제효과

70% 에탄올 추출물의 지질과산화 억제효과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 10 µg/ml의 농도에서 썩 > 감초 > 생지황 > 느타리버섯 순으로 썩이 높은 지질과산화 억제효과를 나타내었다. 100 µg/ml의 농도에서는 썩 > 감초 > 생지황, 상지 순으로서 DPPH에 대한 전자공여 효과에서와는 달리 지질과산화 억제효과의 순서가 농도와 대체로 무관하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 BHT는 10 µg/ml에서 61%의 억제를 나타냈고 100 µg/ml에서는 효과가 전혀 나타나지 않고 오히려 지질과산화를 촉진하는 결과를 나타냈는데 그 원인을 확실치 않다. 썩은 지혈 향균 및 복통에 효과가 있다고 한다¹⁴⁾.

3. Tyrosinase 활성 억제효과

70% 에탄올 추출물의 tyrosinase 활성 억제효과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 10 µg/ml 농도에서는 상지 > 썩 > 느타리버섯 > 홍경천 > 생지황 순으로 나타났고 100 µg/ml 농도에서는 상지 > 썩 > 느타리버섯 > 홍경천 > 오미자 순으로서 상지가 농도에 상관없이 tyrosinase 활성 억제효과가 가장 크다는 것을 알 수 있었다. 정 등¹⁰⁾의 결과에서는 갈근은 59% 억제효과를 나타냈으며, 오미자는 21% 억제효과를 보이는 등 본 실험과는 차이가 있음을 알 수 있었으며 이는 실험 방법 간의 차이라고 볼 수 있다. 상지는 부종, 항염, 갈증 해소 효과가 있다고 한다¹⁶⁾. 일반적으로 뽕나무에서

약용으로 많이 사용되고 있는 뿌리부분은 연구가 많이 되어져 있지만 목피부분인 상지는 아직 많은 연구가 이뤄지지 않고 있는 것 같다.

여성의 기미 또는 노인성 홍반을 일으키는 피부의 멜라닌 생성 과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합반응이다. 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 하며, 이 효소의 작용으로 생성되는 중간체인 DOPA Chrome을 거쳐 멜라닌 색소로 산화 중합하게 된다. 따라서 tyrosinase 효소활성이 저해되거나 그 중간체들의 산화반응이 억제됨으로써 멜라닌 색소가 감소될 것으로 보인다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때 항산화 활성이 강하게 나타나는 연교와 썩, 그리고 tyrosinase 활성억제효과가 크게 나타난 상지 등은 melanin 생합성을 억제할 수 있는 화장품 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

항산화 및 미백효과가 있는 생약재를 탐색하기 위해 생약재 70% 에탄올 추출물의 전자공여효과, 지질과산화 억제효과 및 tyrosinase 억제효과를 검색하였다. 70% 에탄올 추출물의 전자공여 효과는 10 µg/ml의 농도에서는 연교 > 홍화씨 > 오미자 > 운지, 감초 순으로 나타났고 100 µg/ml의 농도에서는 연교 > 운지 > 감초 > 오미자 > 상지 > 홍화씨 순으로서 연교의 전자공여효과가 가장크게 나타났다. 또한 1 µg/ml에서 연교는 37%, 홍화씨는 31% 정도로서 매우 낮은 농도에서도 상당한 전자공여효과를 나타냈다.

지질과산화 억제효과는 썩 > 감초 > 생지황 > 상지 순으로서 썩이 가장 높은 항산화 효과를 나타내었고 tyrosinase 활성의 저해효과는 상지 > 썩 > 느타리버섯

Table 4. Inhibition effect of medicinal plants against tyrosinase activity in vitro

Name	Korea name	Inhibition effect(%)	
		10 µg/ml	100 µg/ml
<i>Ramulus mori</i>	상지	43	74
Oyster mushroom	느타리버섯	20	40
<i>Rehmannia glutinosa</i>	홍경천	18	19
<i>Artemisia messerschmidtiana</i>	약썩	26	48
<i>Ginseng radix alba</i>	인삼	10	13
<i>Puerariae radix</i>	갈근	12	10
<i>Schizandrae fructus</i>	오미자	14	20
<i>Forsythia fructus</i>	연교	14	19
<i>Carthami semen</i>	홍화씨	14	18
<i>Atractylodis rhizoma alba</i>	창출	12	14

순으로서 상지가 가장 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다. 위의 결과는 연교, 쑥 그리고 상지 등이 피부노화 억제 기능성 화장품의 소재로 이용될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. 박수남 : 천연물의 피부세포에 미치는 영향, *대한화장품학회지*, 25(2) 77~127(1999).
2. Iyengau, R. and McEvily, A. J. : Antibrowning agents alternatives to the use of Sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 3(3), 60(1992).
3. 김봉인, 장문정, 김명숙, 류지원, 김조용 : 피부과학, 형설출판사, p.72~74(1999).
4. Pawelek, J. W. and Kórner, A. M. : The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.*, 70, 136(1982).
5. Yu, T. C. and Sinhuber, R. O. : Removal of interfering pigments in determining malon aldehyde by the 2-thiobabituric acid reaction, *Food Technol.*, 115 (1962).
6. Foote, C. S. and Ching T. Y. : Chemistry of singlet oxygen. XXI. Kinetics of bilirubin photooxygenation. *J. Am. Chem Soc.* 97(21), 6209(1975).
7. Foote, C. S. : Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 54 (5), 659(1991).
8. Darr, D. and Fridovich, I. : Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 102, 671~675 (1994).
9. Boyer, R. F. and Cleary, C. J. : Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate mediated ferritin iron release, *Free Rad. Biol. Med.*, 3, 389~395(1987).
10. 정승원, 이남경, 김석중, 한대석 : Tyrosinase 활성을 저해하는 식물체의 탐색, *한국식품개발연구원*, 27(6) 891~896(1995).
11. Eric, D. W. : Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes, *Bio. Toxicology*, 127~151(1987).
12. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K. : Antioxidative action of indol X Compounds during the antioxidation of linolic acid. *Eiyo to Shokuro*, 19, 210~214(1966).
13. 박종희, 이정규 : 상용 약용 식물도감, 신일상사, p.344~345(2000).
14. 한대석 : 생약학, 동명사, p. 286~287(1988).
15. 생약학교재편찬위원회 : 생약학, 동명사 p. 109~322 (2000).
16. 김영륙, 신길영, 김재성, 배원식 : 동의보감, 남산당, p. 1217(1988).

(2001년 11월 4일 접수)