

홍화씨추출물의 피부 주름개선 효과(I)

김 미 진·김 자 영·최 상 원*·홍 진 태**·윤 경 섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소, *대구가톨릭대학교 식품영양학과, **충북대학교 약학과

Anti-wrinkle Effect of Safflower (*Carthamus tinctorius*) Seed Extract (I)

Mi Jin Kim, Ja Young Kim, Sang-Won Choi*, Jin Tae Hong**, and Kyung-Sup Yoon[†]

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 805-5, Gyesan-li, Yeongdong-eup, Yeongdong-gun, Chungbuk 370-802, Korea

*Department of Food Science and Nutrition, Catholic University, Taegu 712-702, Korea

**Department of Pharmacy, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

요약: 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 한방에서 어혈, 통경 및 고지혈증 치료제로서 그리고 홍화씨는 진정 및 보혈 등의 약용 소재로 이미 널리 이용되고 있으며, 화장품 원료로서 홍화추출물과 홍화씨유가 사용되고 있다. 본 실험에서는 홍화씨 유박(oil cake)으로부터 식물성유사여성호르몬(phytoestrogen) 거동의 세로토닌(serotonin)유도체를 함유한 정제분말을 제조하여 화장품 원료로서의 적용 가능성을 실험하였다. 홍화씨추출물을 식물성유사여성호르몬으로 알려진 레스베라트롤(resveratrol)과 제니스테인(genistein) 및 기능성 주름개선제로 알려진 레티놀(retinol)과 우르소릭에씨드(ursolic acid)와 함께 항주름 효과와 관련한 항산화 효과, 엘라스타제 활성저해 효과, 섬유아세포 활성촉진 효과 및 콜라겐 생성촉진 효과에 대하여 비교 실험하였다. 실험 결과, 세로토닌유도체를 함유한 홍화씨추출물은 피부에 자극없이 항산화 효과, 엘라스타제 활성저해 효과, 섬유아세포로 활성촉진 효과 및 콜라겐 생성촉진 효과가 우수하여 주름개선용 기능성 화장품 원료로 기대되고 있다. 피부의 주름을 개선할 수 있는 가능성이 원료로 기대되었다.

Abstract: Anti-wrinkle Effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (CTSE) was evaluated by determination of the anti-oxidation, collagen synthesis and elastase inhibition in normal human fibroblast. CTSE showed anti-oxidation and collagen synthesis ability as much as or greater than other phytoestrogenic compounds such as genistein or resveratrol. Consistent with collagen synthesis promotion, CTSE also showed inhibitory effect on elastase activity. In the human skin irritation test, 0.2% CTSE did not show any adverse effect. These results demonstrate that CTSE can be useful as an anti-wrinkle cosmetic ingredient.

Keywords: anti-wrinkle effect, safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract, anti-oxidation, collagen synthesis, elastase inhibition

1. 서 론

피부노화는 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 자연노화(intrinsic aging, 내인성노화)와 주위환경, 특히 자외선에 의한 광노화(photoaging)로 나눌 수 있다. 자연노화의 주 원인으로는 에스트로겐의 결핍을 들 수 있다. 에스트로겐은 진피에 있는 섬유아세포를 자극하여 콜라겐 합성을 촉진시키며, 콜라겐의 대사에 관여하여 콜라겐 분해 효소인 콜라게나제의 발현을 조절하여 콜라겐의 분해를 억제한다. 불행히도 나이가 들어감에 따라 에스트로겐

의 생성이 중지되어 내분비성 노화가 촉진된다. 내분비성 노화는 피부노화의 일종으로 폐경기에 나타나는 생리적인 피부노화이다.

홍화(紅花, 영명: Safflower, 생약명: *Carthamus tinctorius* L.)는 국화과(Compositae)에 속하는 일년생 초목으로서 원산지는 아프카니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이다 [1]. 홍화씨는 한국, 중국 및 일본 등지에서 진정 및 보혈 등의 약용으로 사용되어 왔으며[2], 미국 및 인도에서는 식용유 원료로서 재배되고 있다[3]. 홍화씨유에는 리놀레산을 비롯한 다량의 불포화지방산과 토코페롤을 함유하고 있으며[4,5], 홍화 유박은 세로토닌유도체, 리그난 및 플라보노이드와 같은 항산화성 및 항고혈압성 페놀화합

† 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@netian.com)

물을 함유하고 있어 기능성식품 신소재로서 주목을 받고 있다[6-8].

홍화씨의 세로토닌유도체는 항산화 작용[6,7]뿐만 아니라 항염증 작용[9], 세포증식 효과[10] 및 티로시나제(tyrosinase) 저해제로서 미백효과[11]가 있음이 보고된 바 있다. 또한 홍화씨의 세로토닌유도체, 리그난 및 플라보노이드는 에스트로겐 유사활성을 지니고 있는 피토에스트로젠 성분으로서 기존의 피토에스트로젠 화합물로 알려진 17 β -estradiol(E₂) 및 제니스테인 성분과 유사하게 뼈 형성을 촉진함으로써 갱년기 여성의 골다공증을 예방할 수 있음을 세포 및 동물 실험을 통하여 밝힌 바가 있다[12]. 여성호르몬은 진피층의 피부 섬유아세포, 모세혈관의 기능을 담당하는 세포의 빠른 재생과 이들의 균형을 유지하는데 영향을 미치므로 홍화씨추출물도 이와 같은 효능을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 홍화씨에 함유되어 있는 항산화성 세로토닌유도체를 여성호르몬 대체 성분으로 활용하기 위해 홍화씨로부터 두 가지 세로토닌유도체를 함유한 정제분말을 제조함과 동시에 그들의 항산화 효과, 엘라스타제 활성저해 효과, 섬유아세포 활성촉진 효과 및 콜라겐 생성촉진 효과를 기존의 잘 알려진 성분들과 비교하여 효능을 평가하여 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 사용된 홍화씨는 경북 의성에서 생산된 국산 홍화씨로서 먼저 250°C에서 5분간 볶은 후 분쇄기로 조분쇄한 것을 추출용 시료로 사용하였다. 홍화씨 추출물의 성분 분석을 위한 표준품은 대구가톨릭대학교로부터 입수하였다.

세포주는 사람 섬유아세포(normal human fibroblast)를 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Omega사의 것을, 배양용 배지(DMEM)는 Jeil Biotech-services Inc.의 것을 사용하였다.

비교 실험 재료로서 식물성호르몬으로 알려진 레즈베라트롤(resveratrol-80, polygonum cuspidatum root extract, 순도 80% 이상, 바이오스펙트럼), 제니스테인(genistein-90, soy isoflavone, 순도 90% 이상, 바이오스펙트럼), 우르소릭에씨드(ursolic acid, 90%, Sabinsa Co.), 올레아놀릭에씨드(oleanolic acid, Sigma), 비타민-C(시약급), BHT (butylated hydroxytoluene, Sigma), 레티놀(trans-retinol, Sigma) 등을 사용하였다.

2.2. 홍화씨추출물의 제조 및 분석

2.2.1. 홍화씨추출물의 제조

건조 홍화씨 100 g을 250°C에서 5~10분간 볶은 후, 100 메시로 분쇄한 다음 여기에 100% 노르말-헥산을 가하여 열탕에서 2회 반복 추출하여 기름을 제거하였다. 여기서 얻어진 홍화씨 탈지 유박에 70% 에탄올용액을 가하여 열탕에서 2회 반복 추출한 후 여과농축하여 농축된 에탄올 추출물을 얻었다. 이 추출액에 효소를 처리한 후 전부를 20% 에탄올용액으로 미리 평형화시켜 놓은 Diaion HP-20 칼럼에 충전시킨 후 같은 용액으로 불순물이 제거될 때까지 시료를 용리시켰다. 다음 60% 에탄올용액으로 용출시킨 후 증발건조기(rotary evaporator)로 40°C 이하에서 감압농축하여 세로토닌유도체, 리그난 및 플라보노이드와 같은 페놀화합물을 함유한 홍화씨추출물 정제분말을 얻었다.

2.2.2. HPLC를 이용한 홍화씨추출물 중의 세로토닌유도체 함량분석

홍화씨추출물 50 mg을 메탄올 50 mL를 넣고 초음파로 분산시킨 다음 메탄올을 넣어 정확히 100 mL로 한 후 0.45 μ m 여과막을 이용, 여과하여 20 μ L를 고속액체크로마토그래피(HPLC) 분석을 행하였다.

HPLC 분석 조건으로 크로마토그래피는 Dionex사 Summit HPLC를, 칼럼은 YMC-Pack Pro C18 (5 μ m, 4.6 ID.×250 mm), 검출기는 자외부흡광광도계로 측정과장은 280, 310 및 340 nm로 하였다. 유속은 1.0 mL/min이며 이동상은 용매 A (0.03% 인산을 함유한 20% 메탄올용액)과 용매 B (80% 메탄올용액) 기율기용리로하여 Table 1 조건에 따라 실시하였다.

2.3. 항산화효과 측정

2.3.1. 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 시험은 안정한 자유라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma)을 사용하는 방법으로[13] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL에 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 2 mL로 하여 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 홍화씨추출물, 대두추출물인 제니스테인, 합성 산화방지제인 BHT 및 대표적 항산화제인 비타민-C를 선정하였다.

대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼소거율은 다음의 식 (1)에 따라 계산하였다.

Table 1. Gradient Elution Condition for HPLC Analysis

Min	Solvent A	Solvent B
4	100	0
8	80	20
12	80	20
16	60	40
25	60	40
35	40	60
40	40	60
45	20	80
50	20	80
55	0	100
60	0	100

Solvent A : 0.03% H₃PO₄ in 20% methanol

Solvent B : 80% methanol

자유라디칼소거율(%) =

$$100 - \frac{\text{시료의 흡광도 값} - \text{대조군의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100 \quad (1)$$

2.3.2. 활성산소 소거효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거활성 평가는 Noro 등의 방법[14]을 활용하여 xanthine/xanthine oxidase (Sigma) 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (Sigma), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, BSA (bovine serum albumin, Sigma), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25°C에서 10분간 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25°C에서 20분간 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂ (Sigma)를 넣어 반응을 정지시키고 UV-VIS spectrophotometer로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험은 자유라디칼소거시험에서와 같이 홍화씨추출물, 제니스테인 및 BHT에 대하여 실시하였다.

대조군은 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 활성산소소거율은 다음의 식 (2)에 따라 계산하였다.

활성산소소거율(%) =

$$100 - \frac{\text{시료의 흡광도 값} - \text{대조군의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100 \quad (2)$$

2.4. 사람 섬유아세포 증식효과 측정

피부의 주름개선 효과를 검증하는 섬유아세포의 증식 효과를 보기 위하여 사람 섬유아세포를 이용한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 시험법을 수행하였다.

사람의 섬유아세포(human normal fibroblast)를 96 well-plate에 1×10⁴ cells/well 씩 분주하여 10% 우태아혈청/DMEM 배지로 24시간 배양시킨 다음, 새로운 serum-

free 배지와 적정 농도 범위에서 단계적으로 희석한 시료를 가하고, 다시 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후, MTT 용액(1 mg/mL) 10 μL씩을 각 well에 첨가한 뒤 4시간 동안 추가 배양하고, 용액을 버린 후, 다시 각 well 당 DMSO (dimethy sulfoxide, Sigma) 용액 100 μL씩을 가하여 교반한 후 ELISA reader (EL800, BIO-TEK Instruments, Inc.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. 시험은 홍화씨추출물과 홍화씨추출물과 같은 식물성 유사호르몬인 호장근에서 유래된 레즈베라트롤, 제니스테인 및 우르소릭에씨드에 대하여 실시하였다.

대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식 (3)에 따라 계산하였다.

세포증식율(%) =

$$100 - \frac{\text{시료의 흡광도 값} - \text{대조군의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100 \quad (3)$$

2.5. 콜라겐량 측정

피부의 주름개선 효과를 검증하는 콜라겐 합성효과를 보기 위하여 사람 섬유아세포를 96 well-plate에 1×10⁴ cells/well 씩 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 24시간 배양시킨 다음, 새로운 serum-free 배지와 적정 농도 범위에서 단계적으로 희석한 시료를 가하고, 다시 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 가지고 Procollagen Type I C-peptide EIA kit (Takara Bio Inc., MK101)를 이용하여 콜라겐량을 측정하였다. 콜라겐 측정 키트에 포함된 표준용액을 희석한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 농도곡선을 작성하였으며, 각 배지에 포함된 총 단백질의 양으로 보정하여 콜라겐 발현량을 산정하였다. 홍화씨추출물과 제니스테인, 레티놀 및 우르소릭에씨드를 비교 시료로 실시하였다.

2.6. 엘라스타제 활성 저해효과 측정

엘라스타제(porcine pancreatic elastase; PPE, Sigma, Type IV)에 의해 합성 펩티드 기질(N-succinyl-(ala)₃-p-nitroanilide, Sigma)의 가수분해에 근거한 실험법으로 광과장 405 nm에서의 p-nitroanilide의 방출량을 엘라스타제의 활성값으로 하였다[16]. 먼저 0.2 M Tris-Cl (pH 8.0, Sigma), 농도별로 희석한 시료, 8.8 mM 기질액을 넣고 25°C에서 10분간 전처리하였다. PPE (10 μg/mL)를 넣고 25°C 항온수조에서 20분간 반응시키고, 냉침법으로 반응을 정지시켰다. p-Nitroanilide의 방출량을 ELISA reader를 이용하여 과장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 홍화씨추출물과 제니스테인, 올레아놀릭에씨드 및 우르소릭에씨드를 비교 시료로 실시하였다.

대조군은 시료를 처리하지 않고 설정한 후 흡광도를

Table 2. Evaluation Criteria for Marking of Human Patch Test

Response	Grade	Interpretation criteria
-	0	No response
±	0.5	Doubtful reaction
+	1	Weak (non-vesicular) reaction
++	2	Strong (oedematous or vesicular) reaction
+++	3	Strong, infiltrated erythema and accompanying vesiculae or superficial

측정하였다. 효소의 활성 저해효과는 다음의 식 (4)에 따라 계산하였다.

$$\text{엘라스타제활성저해율(\%)} = 100 - \frac{\text{시료의 흡광도 값} - \text{대조군의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100 \quad (4)$$

2.7. 인체첨포시험

홍화씨추출물에 대한 피부안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 Haye's chamber에 홍화씨추출물 0.2%의 농도로 제조된 영양크림과 홍화씨추출물이 함유되지 않은 대조군 20 μL씩을 채워 인체 첨포시험을 실시하였다.

피험자로 20세 이상 45세 이하의 건강한 성인 남녀 30명을 선정하였고, 첨포시험은 등의 정중선을 피해 양측 등에 부착하였으며 48시간 동안 부착하고 48시간이 지난 후 첩포를 제거하였다. 약 60분간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 첩포 부착 후 96시간이 경과한 후 판독을 시행하였다. 판정기준을 Table 2에 나타내었다.

첩포 부착 후 48시간과 96시간에 판독한 결과의 피부반응도를 다음의 식 (5)에 따라 계산하였다.

$$\text{피부반응도(\%)} = \frac{\sum(\text{가중치}) \times (\text{반응인원수})}{\text{최대가중치} \times \text{전체인원수}} \times 100 \quad (5)$$

상기 계산식에 의해 계산되는 피부반응도를 미리 정한 다음의 Table 3의 판정기준에 준거하여 각 시료의 반응도를 판정하였다.

3. 결 과

3.1. 홍화씨추출물 중의 세로토닌유도체 함량

홍화씨추출물 중의 세로토닌유도체인 *N*-페룰로일세로토닌(*N*-feruloylserotonin)과 *N*-쿠마로일세로토닌(*N*-(*p*-coumaroyl)serotonin)의 함량은 각각 4.04%와 4.80%로 분석되었다. 세로토닌유도체의 화학구조는 Figure 1에 화학

Table 3. Evaluation Criteria of Skin Reactions

Avg. reaction	Evaluation criteria
0.0 ~ 0.9	No irritation
1.0 ~ 2.9	Weak irritation
3.0 ~ 4.9	Medium irritation
> 5.0	Strong irritation

Table 4. Chemical Characteristics of Serotonin Derivatives

Serotonin derivative	MW	λ _{max} (nm)	log ε
<i>N</i> -Feruloylserotonin	352	284, 304	4.54
<i>N</i> -(<i>p</i> -Coumaroyl)serotonin	322	283, 310	4.54

MW : molecular weight

λ_{max} : maximum wave length

ε : molar extinction coefficient

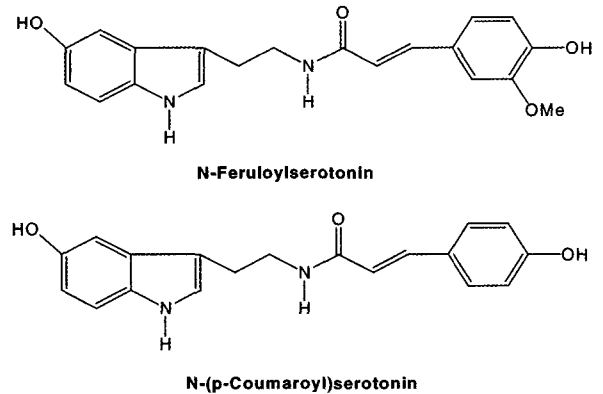


Figure 1. Chemical structures of serotonin derivatives.

적 특징은 Table 4와 같다.

세로토닌유도체인 *N*-페룰로일세로토닌과 *N*-쿠마로일세로토닌의 HPLC 크로마토그램을 Figures 2~4에 나타내었다.

홍화씨추출물에는 세로토닌유도체(약 10.88%) 외에 리그난유도체(약 21.68%)와 플라보노이드유도체(약 8.11%)가 함유되어 있으며, HPLC로 분석된 함량을 Table 5에 나타내었고, 주성분 외에는 주로 전분유도체로 구성되어 있다. Table 5에서 각 성분은 추출 조건에 따라 함량에 차이를 보였다.

3.2. 항산화효과

홍화씨추출물의 항산화효과와 그 정도를 알아보기 위해 식물성유사호르몬으로 알려진 제니스테인과 기존의 항산화제인 BHT 및 대표적 항산화제인 비타민-C를 각각 3회씩 실험된 평균 결과를 소거율 50%를 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도인 IC₅₀ 값으로 Table 6에 나타내었다.

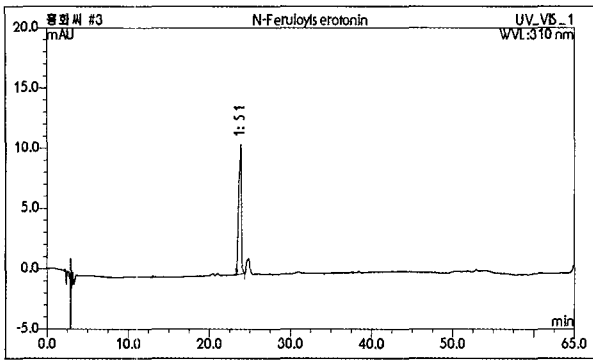


Figure 2. HPLC chromatogram of standard *N*-Feruloylserotonin.

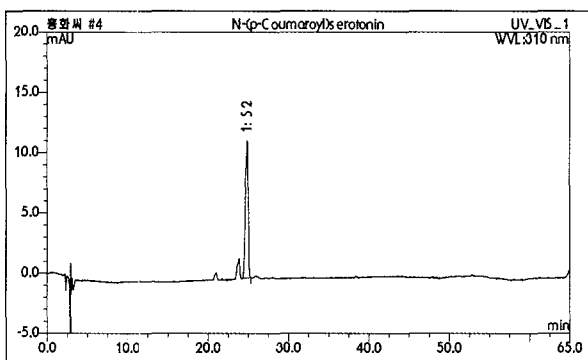


Figure 3. HPLC chromatogram of standard *N*-(*p*-Coumaroyl)serotonin.

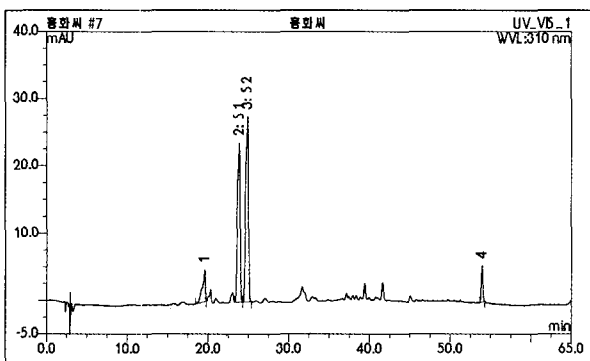


Figure 4. HPLC chromatogram of *N*-Feruloylserotonin and *N*-(*p*-Coumaroyl)serotonin in CTSE.

실험 결과, 라유리디칼소거술에서 홍화씨추출물은 널리 알려진 식물성유사여성호르몬으로서 대두추출물인 제니스테인에 비하여 월등히 높은 활성을 보여주었으며, 항산화제로 알려진 BHT의 활성보다 더 우수함을 보였다. 활성 산소중소거술에서도 역시 홍화씨추출물(1.038 mg/mL)은 제니스테인(2.214 mg/mL)과 BHT (1.0 mg/mL)보다 우수

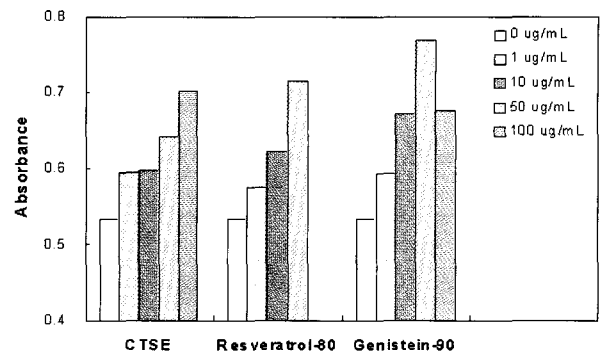


Figure 5. Growth promoting activity effect of phytoestrogens (CTSE, resveratrol-80, genistein-90) for normal human fibroblast cell.

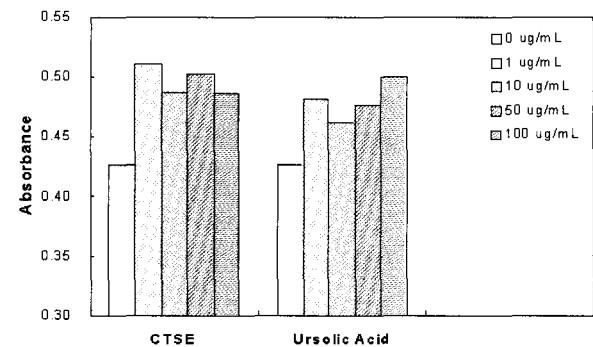


Figure 6. Growth promoting activity effect of CTSE and ursolic acid for normal human fibroblast cell.

한 효과를 보였다.

3.3. 사람 섬유아세포 증식 효과

실험 시료들이 섬유아세포에 미치는 세포증식 촉진효과 또는 직접적인 세포독성을 확인하기 위하여 사람 섬유아세포에서 MTT 시험법을 실시하여 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 예상했던 바와 같이 식물성유사호르몬 모두 세포의 증식을 촉진하였다. 그러나, 레즈베라트롤의 경우 100 μ g/mL 처리 시, 세포에 독성이 나타남을 알 수 있었으며, 세포증식에는 효과가 좋게 나타난 제니스테인도 역시 100 μ g/mL 이상 처리 할 경우, 세포증식이 다소 줄어들음을 보였다. 그와 반대로 홍화씨추출물은 비교적 농도 의존적으로 세포증식이 촉진됨을 보여주었다. Figure 6에서 우르소릭에씨의 세포증식 효과는 홍화씨추출물과 유사한 정도로 나타났다.

Table 7의 실험자료는 대조군의 세포활성 촉진 효과를 100%로 한 결과이다.

Table 5. Quantity(%) of Major Components from CTSE

	Major components	Quantity (%)
Serotonin derivatives	<i>N</i> -Feruloylserotonin	4.04
	<i>N</i> -(<i>p</i> -Coumaroyl)serotonin	4.80
	<i>N</i> -Feruloylserotonin glucoside	2.04
Lignan derivatives	8'-Hydroxyartigenin	2.34
	Matairesinol glucoside	19.34
Flavonoid derivatives	Acacetin	8.11
	7- <i>O</i> - <i>b</i> - <i>D</i> -gucuronide	

Table 6. Comparison of Anti-oxidative Activity

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)	
	Free radical scavenging activity	Reactive oxygen scavenging activity
CTSE	43.8	1,038
Genistein-90	> 1,000	2,214
BHT	388.9	1,000
Vitamin-C	3.3	

IC₅₀ : half scavenging concentration

Table 7. Comparison of Growth-promoting Activity for Normal Human Fibroblast Cell

Conc. (μg/mL)	Growth-promoting activity(%)		
	CTSE	Resveratrol-80	Genistein-90
0	100	100	100
1	111.45	107.69	111.26
10	112.01	116.51	125.89
50	120.26	134.15	144.28
100	131.71	61.35	126.64

3.4. 콜라겐 생성촉진 효과

Procollagen 합성에 미치는 홍화씨추출물의 작용을 알아보기 위해 콜라겐 생성촉진에 효과가 있는 것으로 알려진 레티놀을 양성 대조군으로 하여 사람 섬유아세포에서 시험을 실시하였다. Figure 7에서와 같이 콜라겐 생성에 영향을 준다고 알려진 레티놀 및 제니스테인과 유사한 정도의 콜라겐 생성촉진 효과를 보였다. Table 8에서와 같이 우르소릭에씨드는 홍화씨추출에 비하여 약 50~100배의 농도에서 유사한 효과를 보였다. 홍화씨추출물의 경우, 추출물 내 유효성분의 함량을 고려할 때 아주 우수한 procollagen 생성촉진 효과가 있음을 보여 주었다.

3.5. 엘라스타제 활성저해 효과

홍화씨추출물, 우르소릭에씨드, 제니스테인 및 올레아놀릭에씨드에 대한 엘라스타제 효소의 활성을 저해하는 정

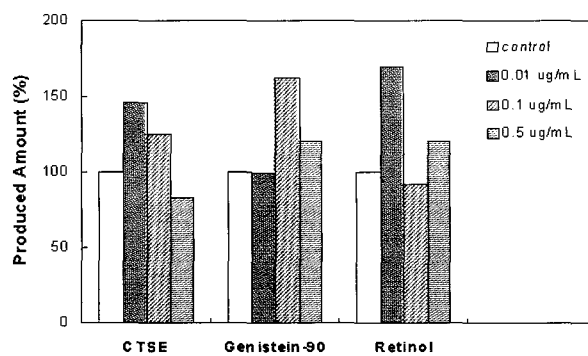


Figure 7. Procollagen synthesis effect.

Table 8. Comparison of Procollagen Synthesis Effect

Conc. (μg/mL)	Produced amount(%)			
	CTSE	Genistein-90	Retinol	Ursolic acid
0	100	100	100	100
0.01	145.4	99.56	169.24	
0.1	124.75	162.15	91.48	
0.5	83.03	120.01	119.72	
1				144.16
5				163.06
10				174.1

도를 Figure 8에 나타내었다. 우르소릭에씨드의 경우 IC₅₀이 50.8 μg/mL로 가장 양호하였고, 홍화씨추출물은 265 μg/mL로 나타났다. 제니스테인은 농도 0.5 mg/mL에서 단지 31.56%의 저해율을 보였고, 올레아놀릭에씨드는 1.0 mg/mL의 농도에서 40.68%의 저해율을 보였다.

3.6. 피부일차자극시험

피험자 30명에 대하여 실시한 첩포시험의 검사 결과에 근거하여 계산된 피부 반응도를 Table 9에 나타내었다. 시험 결과, 0.2% 홍화씨추출물을 함유한 영양크림은 반응도 0.28로 Table 3의 피부 반응도 판정기준에 의하면 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다.

4. 고 찰

홍화씨 유박으로부터 추출물된 홍화씨추출물의 화장품 원료로서 피부의 주름개선 가능성을 평가하였다. 홍화씨추출물은 세로토닌유도체, 리그난유도체 및 플라보노이드 유도체가 함유되어 있으며, 세로토닌유도체 2종은 각각 4.0% 이상으로 지표물질로 정할 수 있을 것으로 보였다.

항산화효과의 실험에서 홍화씨추출물은 자유라디칼소거 및 활성산소소거 효과가 비교군인 제니스테인과 BHT보다 자유라디칼소거능은 각각 8~20배 이상 우수하였고,

Table 9. Skin Irritation Index (SII) of CTSE

Sample	48 hs				96 hs				SII		
	±	+	++	+++	±	+	++	+++	48 hs	96 hs	Avg.
Cream (0.2% CTSE)	·	·	·	·	1	·	·	·	0	0.56	0.28
Placebo	·	·	·	·	·	·	·	·	0	0	0

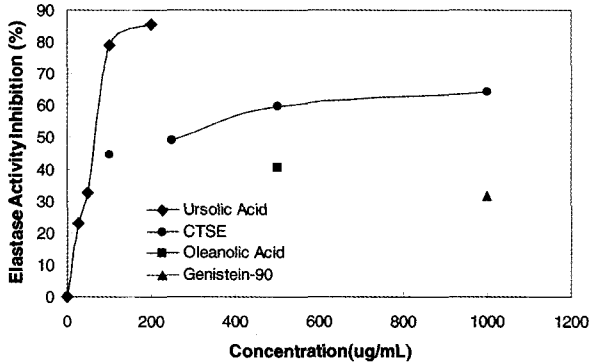


Figure 8. Elastase activity inhibition effect.

활성산소소거능은 제니스테인보다 2배 정도 우수하였다. 따라서 이 결과는 홍화씨추출물이 기존의 항산화물질보다 우수한 항산화력을 보이는 것을 입증하였는데 이는 기존의 Zhang 등의 보고와 일치한다[6]. 피부세포의 산화는 노화 및 주름의 주요 원인으로 항산화 효과가 뛰어난 홍화씨추출물은 피부산화방지의 효과가 있다는 것을 반증한다. 더구나 섬유아세포의 증식을 독성없이 100 µg/mL의 농도까지 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였는데 이는 비교군으로서 식물성유사여성호르몬인 레즈베라트롤과 제니스테인과 유사한 정도로 평가되나 레즈베라트롤과 제니스테인의 경우는 처리농도를 100 µg/mL까지 증가시키면 세포증식이 감소되는데 반하여 홍화씨추출물은 증식효과가 이 농도에서도 유지된다는 점은 이 물질의 효능 평가시 농도 선택의 폭을 증진시킬 수 있는 장점이 있다고 보겠다.

홍화씨추출물의 콜라겐 생성촉진 효과는 비교군인 레티놀이나 우르소릭에씨드보다 양호하였다. 제니스테인은 특히 콜라겐 생성촉진 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이는 섬유아세포증식능과 유사한 결과로서 세포의 증식이 일어나지 않은 상태에서 콜라겐 합성이 증가한다는 것은 홍화씨추출물 자체의 콜라겐 합성촉진이 가능함을 나타내고 있다. 콜라겐 합성에 관여하는 유전자 발현 등에 직접적으로 영향을 주는 것으로 판단되는데 실제로 콜라겐 합성에 관여하는 전사인자인 AP-1의 활성이 홍화씨추출물에 의하여 증가하는 것을 확인한 바 있다.

엘라스틴의 분해를 촉진하는 엘라스타제 효소의 활성을 저해하는 실험에서, 홍화씨추출물은 비교군인 제니스

테인과 올레아놀릭에씨드보다 우수한 저해효과를 보였다. 이는 콜라겐합성은 증가시키면서 엘라스틴 등을 분해하는 효소를 억제하는 이중효과를 나타냄으로써 피부노화 및 주름제거의 효과가 탁월할 수 있음을 제시한다.

또한 홍화씨추출물은 인체 첩포시험에서와 같이 무자극으로 판정되어, 피부에 안전하게 사용될 수 있으며, 상기의 실험 결과로부터 주름개선제로서의 가능성을 보였다. 추후 콜라게나제(MMP-1) 생성억제 효과나 엘라스틴 생성촉진 효과를 평가하는 실험이 추가로 진행되고 그 기전연구를 추가하면 더 구체적인 효과기전을 알 수 있을 것이며, 이와 같은 *in vitro* 효력 평가 외에 중요한 인체 유효성 평가 등이 요구되는 바이다.

화장품 업계에 우리들의 신소재가 필요한 시대에 홍화씨추출물은 천연물질의 추출물로 안전성, 유효성이 뛰어난 원료로서의 개발 가능성이 높으며, 피부 노화를 방지하는 물질로서 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. 이창복, 대한식물도감 (1980).
2. 한대석, 생약학 (1995).
3. 안덕균, 육창수, 현대본초학 (1975).
4. 박인규, 김봉제, 동의보감 (1989).
5. A. R. Khan, *Thesis*, 18, 81-87 (1929).
6. H. L. Zhang, A. Nagatsu, and J. Sakakibara, Novel antioxidants from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake, *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 874-876 (1996).
7. H. L. Zhang, A. Nagatsu, T. Watanabe, J. Sakakibara, and H. Okuyama, Anti-oxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 1910-1914 (1997).
8. A. Sakamura, Y. Terayama, S. Kawakatsu, A. Ichihara, and H. Saito, Conjugated serotonins and phenolic constituents in safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.), *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2951-2954 (1980).
9. S. Kawashima, M. Hayashi, T. Takii, H. Kimura, H. L. Zhang, A. Nagatsu, J. Sakakibara, K. Murata, Y. Oomoto, and K. Onozaki, Serotonin derivative,

- N*-(ρ -coumaroyl)serotonin, inhibits the production of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes, *J. Interfer. Cytokin. Res.*, **18**, 423-428 (1998).
10. T. Takii, M. Hayashi, H. Hiroyuki, T. Chiba, S. Kawashima, H. L. Zhang, A. Nagatsu, J. Sakakibara, and K. Onozaki, Serotonin derivative, *N*-(p -coumaroyl)serotonin, isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake augments the proliferation of normal human and mouse fibroblasts in synergy with basic fibroblast growth factor (β -FGF) or epidermal growth factor (EGF), *J. Biochem.*, **125**, 910-915 (1999).
 11. 이광현, 홍화씨로부터 추출된 세로토닌계 화합물 및 이를 함유하는 조성물, 한국공개특허 출원번호 10-2002-0008315 (2002).
 12. H. J. Kim, Y. C. Bae, S. W. Choi, S. H. Cho, R. W. Park, Y. S. Choi, and W. J. Lee, Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats, *Calcified Tissue International*, **71**, 88-94 (2002).
 13. Y. Fugita, I. Urea, Y. Morimoto, M. Nakajima, C. Hatano, and T. Okuda, Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation, *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129-135 (1988).
 14. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984-3987 (1983).
 15. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
 16. A. E. K. James, D. W. Timothy, and L. Gorden, Inhibition of human leucocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitors, *Biochemistry*, **35**, 9090-9096 (1996).