

도화(桃花, *Prunus persica* Flos)의 미백 및 주름개선 효과

이진영¹ · 안봉전^{2*}

¹호서대학교 한방화장품과학과, ²대구한의대학교 화장품약리학과

Whitening and Anti-wrinkle Effects of *Prunus persica* Flos

Jin-Young Lee¹ and Bong-Jeun An^{2*}

¹Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam, 336-795, Korea

²Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Received June 21, 2010; Accepted July 21, 2010.

The solvent extracts of *Prunus persica* Flos were investigated for the activities of whitening and anti-wrinkle effects to apply as a functional ingredient for cosmetic products. The tyrosinase inhibitory effect, which is related to skin-whitening, was 54.0, 58.3% in *P. persica* Flos (PPW, PPE) at 1,000 ppm. In addition, the ethanol extract of *P. persica* Flos (PPE) showed a potent tyrosinase inhibitory activity in the test using melanoma cell lines resulting in 40.0% inhibition at 100ppm. Furthermore, the aqueous acetone extract from the flower of *P. persica* Flos was found to inhibit elastase, which was more effective than ascorbic acid at 1,000 ppm. The inhibition of melanin synthesis by *P. persica* Flos extract (PPE) was about 56.5% at 100 ppm concentration. When compared to other extraction methods, the ethanol extract showed more potent whitening activity. For anti-wrinkle effect, the elastase inhibition activity of *P. persica* Flos extract (PPA) was 57.0% and higher than that of ascorbic acid at 1,000 ppm. The collagenase inhibition activity of *P. persica* Flos extract (PPA) was about 48.0% at 1,000 ppm. Collagen synthesis in fibroblast cell by *P. persica* Flos extracts (PPA) was about 41.0% at 100 ppm and its acetone extract was the best showing anti-wrinkle activities. All these findings suggested that *P. persica* Flos has a great potential as a cosmeceutical ingredient with a whitening and anti-wrinkle effect.

Key words: anti-wrinkle, *Prunus persica* Flos, whitening

인간의 피부는 시간이 지남에 따라 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화 (intrinsic aging)와 외적으로는 각종 오염물질과 자외선에 의한 광노화(photo aging)에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다[Gilchrest, 1990; Bernstein 등, 1994]. 피부를 구성하는 세포에서는 내인성 노화나 광노화에 의해 세포활성이 떨어지고, 신호전달체계가 불완전해지면서 피부조직을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 생합성이 증가하고, 콜라겐의 생합성이 감소하여 주름살이 생기고, 탄력이 감소하고, 피부후화를 초래하는 멜라닌 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다[Pentland 등, 1995; Mauviel 등, 1994]. 따라서 피부

세포를 증식시키거나, 피부를 구성하는 기준물질을 증가시킴으로서 피부를 두껍게 할 수 있는 물질, 피부를 구성하는 기질 물질인 콜라겐을 분해하는 MMPs의 생합성을 억제할 수 있는 물질, 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 물질 등이 주름, 탄력 상실, 피부후화 등의 피부 증상을 완화시키는 것으로 밝혀져 있다[Park 등, 2004].

도화(桃花, *Prunus persica* Flos)는 복사꽃이라 하여, 복숭아 나무를 복사나무라고도 부른다. 도화의 성분은 정확히 밝혀지지 않았으나, 복숭아에는 단백질, 지질, 당질, 회분, 칼슘, 인, 철분, 나트륨, 칼륨, 비타민 A, B1, B2, C, E 등이 있어, 미용에 신경 쓰는 여성들에게 좋다[Seo 와 Lee, 2000]. 고려도경(高麗圖經)이라는 한방서적에서는 “성질이 고르고 맛이 쓰며 독이 없고, 석립(石淋)을 깨트리고, 대·소변을 이롭게 하며, 세 가지 벌레를 내리고 주(疰)와 악귀(惡鬼)를 죽이고 얼굴빛을 아름답게 한다”하여 대장에 발생하는 병이나 얼굴에 나타나는 부스럼 등에 사용했다는 기록이 있다[Seo, 2005]. 또한 건포, 습진에 복숭아 잎과 함께 달여 목욕물에 넣기도 하고 외용하기도 했다[Heo, 1994]

도화에는 flavonoids 유래의 kaempferol와 그 배당체,

*Corresponding author
Phone: +82-53-819-1429; Fax: +82-53-819-1429
E-mail: anbj@dhu.ac.kr

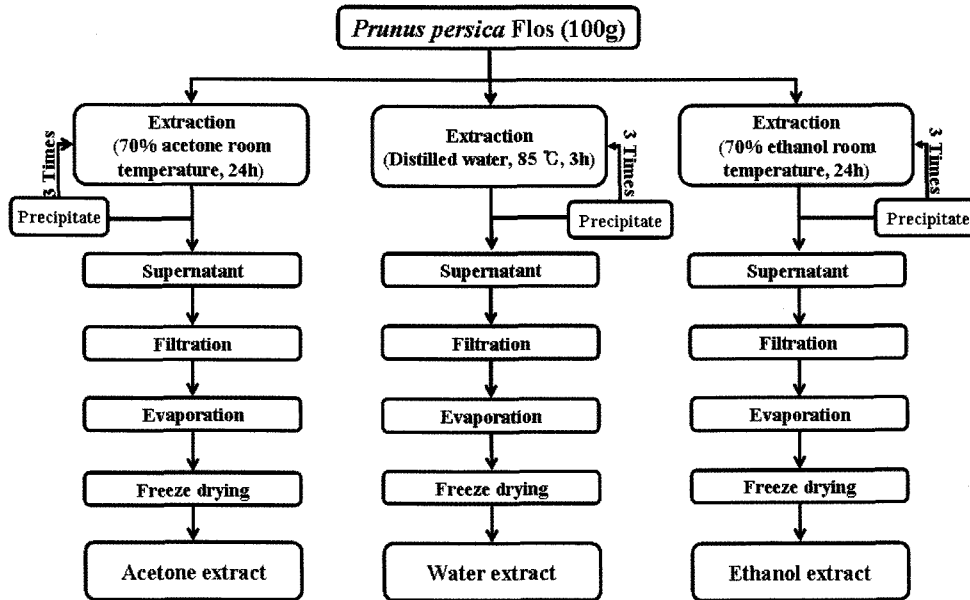


Fig. 1. The procedure for extraction from *Prunus persica* Flos.

albamyricetin 등의 성분들이 함유되어 있으며[Kim 등, 1991], kaempferol의 경우 지질과산화와 콜레스테롤 억제 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나[Hur 등, 1998; Lee 등, 2004], 도화의 화장품으로서의 활용에 관한 내용은 보고된 바 없어, 본 연구에서는 미백 및 주름개선 억제 물질을 탐색하는 중 민간에서 미백이나 염증치료에 널리 사용되어진 도화(桃花)를 이용해 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용한 도화(桃花, *Prunus persica* Flos)는 4월 초순에 경북 경산에서 채집하여 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였다.

시료 제조. 시료의 추출은 Fig. 1과 같이 추출하였다. 일반적인 추출법으로 열수 및 에탄올 추출을 하였으며, 그 외 물과 에탄올에서 추출되지 않는 성분을 추출하기 위하여 아세톤 추출을 하였다. 열수 추출물의 경우 시료 100 g에 증류수 10배 양을 가하여 85°C에서 3시간 환류병각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였으며, 에탄올 및 아세톤 추출물의 경우 70% 에탄올과 아세톤을 시료 중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물들은 원심분리 및 여과, 농축 후 동결 건조하여 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기. 미백 및 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine(L-DOPA), porcine pancreas elastase(PPE), N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 콜라겐 생합성 측정에 사용된 시약은

procollagen type I C-peptide EIA kit(Takara-Bio Inc. Japan)을 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정에 사용된 melanoma 세포인 B16F10과 fibroblast 세포인 CCRF S-180 II는 Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정 시약은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co.(Grand Island, USA) 및 Haemocytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

미백 효과 측정

Tyrosinase 저해활성 측정. Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[1986]의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Melanoma cell(B16F10)에서의 tyrosinase 저해활성 측정. Melanoma(B16F10) 세포를 각 culture dish에 가득 키운 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride)를 100 μL 첨가한 후 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고, 세포를 수집하여 ultra sonication 하였

다. 이를 1시간 동안 방치한 후 12,500 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 효소용액으로 사용하였다. 이를 67 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 120 μ L와 시료용액 40 μ L를 96-well plate에 넣은 후, 67 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 효소용액 40 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Melanoma cell(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정. 피부 멜라노마 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등[1985]의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm culture dish에 2×10^6 cell/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 정확한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% TCA로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol(1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Melanin 생합성 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

주름개선 효과 측정

Elastase 저해활성 측정. Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등[1988]의 방법에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(2.5U/mL)용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Collagenase 저해활성 측정. Collagenase 저해활성 측정은 Wnsch 등[1963]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase(0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Collagen 생합성량 측정. Collagen 생합성량 측정은 procollagen type I C-peptide(PCIP) EIA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 DMEM으로 계대 배양된 섬유아세포를 사용하여 24well에 2×10^5 개로 분주하여, 24시간 후에 시료용액을 농도별로 넣은 후 무혈청 배양액으로 교환하여 24시간 처리하고, 세포배양액을 채취한 뒤 각 well에서 세포 배양액을 PCIP collagen assay kit를 이용하여 collagen 생합성량을 측정하였다. 먼저 1차 collagen 항체가 균일하게 도포된 96-well plate에 채취한 세포 배양액 20 μ L를 넣고, 항원-항체 반응을 37°C 항온조에서 광차단하여 3시간 반응시킨 후 인산완충액으로 4회 washing 한 다음 발색단이 결합된 2차 콜라겐 항체를 kit에 넣고 다시 15분간 반응 시켰다. 15분 후 발색유발 물질을 넣어 실온에서 15분간 발색을 유발시키고, 다시 1 M의 황산을 넣어 발색을 중지시킨 후 이를 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정. 세포 생존을 측정하는 Carmichael 등의 방법[1987]에 따라 측정하였다. 세포주 melanoma(B16F10), fibroblast(CCRF S-180 II) cell을 96 well plate에 $0.6 \sim 8 \times 10^3$ cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:Ethanol(1:1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존을 측정하는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

통계처리. 통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA:analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT:Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

미백 효과 측정 결과

Tyrosinase 저해활성 확인. Tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 중요한 효소로 작용한다[Hearing 와 Jimenez, 1987]. 이렇게 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 도화 열수 및 에

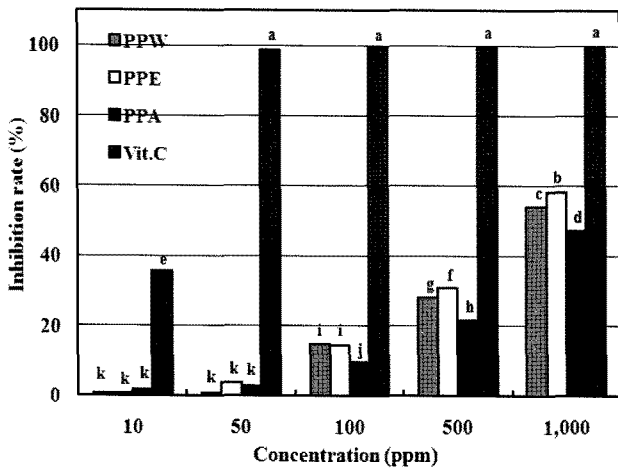


Fig. 2. Inhibition rate of *Prunus persica* Flos extracts on tyrosinase.

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ Vit. C: ascorbic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

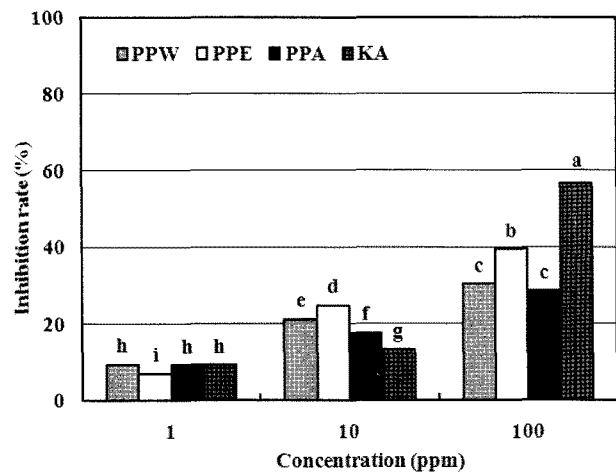


Fig. 4. Inhibition rate of *Prunus persica* Flos extracts on melanoma cell(B16F10) originated tyrosinase.

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ KA: kojic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

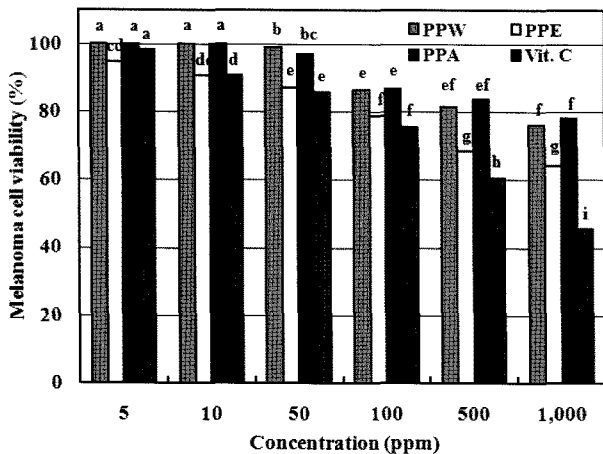


Fig. 3. Cell viability of *Prunus persica* Flos extracts on melanoma cell(B16F10).

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ Vit. C: ascorbic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

탄을 추출물 1,000 ppm에서 각각 54.0, 58.3%의 저해활성을 나타내었으며, 도화 아세톤 추출물의 경우 1,000 ppm에서 47.3%의 저해활성을 나타내어 도화 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성이 가장 높았다. Lee 등[2001]의 제주산 식물을 이용한 tyrosinase 억제 활성을 측정된 결과 1,000 ppm의 농도에서 10.0% 미만의 효과가 나타났으며, Jung 등[1995]의 토사자, 숙지황, 오기피 추출물 1,000 ppm에서 30.0% 미만의 저해능을 나타낸 결과와, An 등[2005]의 진달래꽃 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 열수 및 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 각각 24.0, 48.0%의 저해를 나타낸 결과와 비교하여 도화 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

Melanoma cell(B16F10)에서의 tyrosinase 저해활성 확인. 도화 추출물의 melanoma 세포에서의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. Tyrosinase는 Cu^{2+} 와 결합한 효소로 동식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성 과정에서 속도를 제한하는 등 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다 [Hearing, 1987]. 이러한 멜라닌 생합성에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase에 대한 영향을 측정된 결과, 도화 열수, 에탄올 및 아세톤 추출물 100 ppm에서 각각 30.4, 40.0, 28.6%를 나타내어 도화 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성이 가장 우수하였다. 또한 대조물질인 kojic acid는 10 ppm에서 13.2%의 저해효과를 보인 반면, 도화 열수 및 에탄올 추출물 10 ppm에서는 21.2, 24.8%를 나타내어 kojic acid 보다 높은 저해율을 나타내었다. 이는 Choi 등[2006]의 도깨비 뿌리 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 12.3%의 저해효과를 나타낸 결과보다 도화 추출물의 저해효과가 높았으며, Chun 등[2002]의 Quercetin이 멜라닌 세포(Melan-a)의 tyrosinase 활성도를 측정된 결과와, Choi 등[2003]의 산수유 메탄올 추출물이 B16F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향에서 tyrosinase 활성도를 측정된 결과보다도 도화 추출물의 melanoma 세포에서의 tyrosinase 저해활성이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

Melanoma cell(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 확인. 도화 추출물을 천연 미백제로 사용하기 위하여 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성을 측정된 결과 Fig. 5와 같이 나타내었다. 도화 열수 및 아세톤 추출물의 경우 100 ppm에서 41.0, 29.0%의 멜라닌 저해 효과를 나타내었으며, 도화 에탄올 추출물의 경우 100 ppm에서 56.5%의 효과를 나타내어 멜라닌 저해 효과가 높은 것으로 나타났으며, Fig. 6에서 보듯이 control에 비해 농도가 높아질수록 melanoma 세포의 색이 얼어짐을

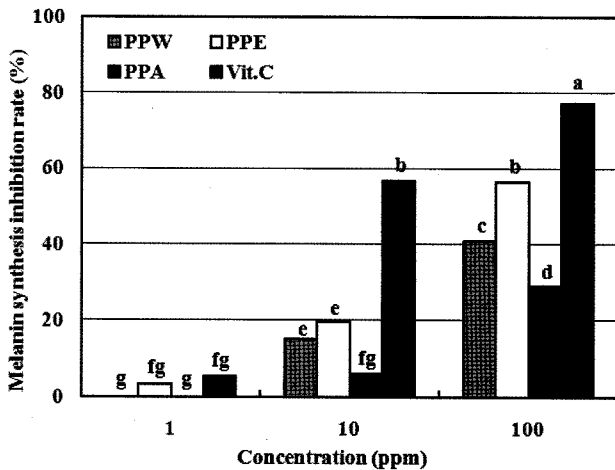


Fig. 5. Inhibition melanin synthesis of *Prunus persica* Flos extracts on melanoma cell(B16F10).
 ■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ Vit. C: ascorbic acid
 Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

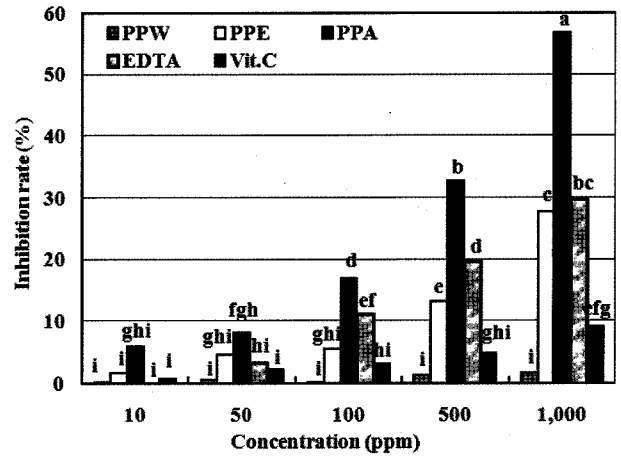


Fig. 7. Inhibition rate of *Prunus persica* Flos extracts on elastase.
 ■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
 ■ Vit. C: ascorbic acid
 Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

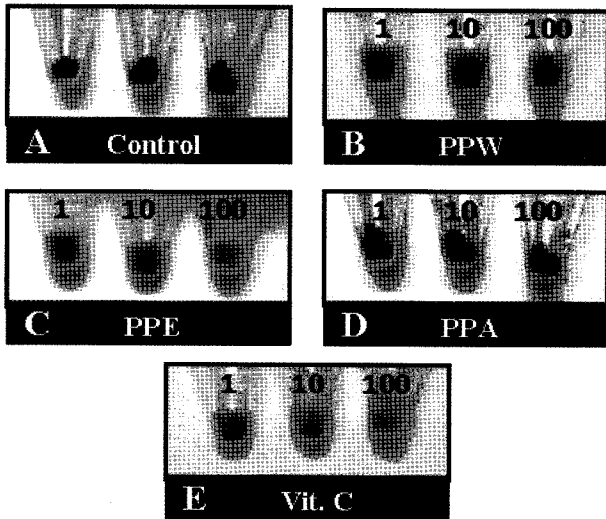


Fig. 6. B16F10 melanoma cell pellets treated of *Prunus persica* Flos extracts.
 A: control
 B: melanin synthesis of *Prunus persica* Flos extracted with water
 C: melanin synthesis of *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 D: melanin synthesis of *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 E: ascorbic acid

확인할 수 있었다. 이는 Kwak 등[2004]의 치자 열매 추출물의 B16F10 melanoma 세포의 melanin 억제효과가 10 mg/mL에서 열수 추출물의 경우 36.3%, 에탄올 추출물의 경우 55.9%로 나타나 도화 추출물의 멜라닌 억제효과가 우수함을 알 수 있었고, Li 등[2003]의 토후박으로 부터 멜라닌 생합성을 측정된 결과, 200 µg/mL의 농도에서 64.3%의 저해효과와 비교하여, 도화 추출물의 멜라닌 저해 효과가 우수함을 확인할 수 있었으며, 우수한 천연 미백제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

주름개선 효과 측정 결과

Elastase 저해활성 확인. 인체의 중성구 과립구내에 존재하는 elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소이며, 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내며, ursolic acid 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다[Tsuji 등, 2001]. 이러한 주름 생성과 관련된 elastase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 7과 같이 나타내었다. 도화 열수 추출물 1,000 ppm의 경우 10.0% 이하의 낮은 활성을 나타낸 반면, 도화 에탄올 및 아세톤 추출물 1,000 ppm의 경우 28.0, 57.0%의 elastase 저해활성을 나타내었다. 특히 도화 아세톤 추출물의 경우 동일 농도의 대조군인 vitamin C 와 EDTA 보다 elastase 저해활성이 높은 것으로 나타났다. Kwak 등[2005]의 각종 약용 식물로부터 elastase 저해활성을 측정된 결과, 대부분이 1 mg/mL의 농도에서 30.0% 미만의 저해활성을 나타내었으며, Kim 등[2004]의 홍화씨 추출물과 식물성 유사 호르몬으로 알려진 ursolic acid, genistein, oleanolic acid에 대한 elastase 저해활성 측정 결과 ursolic acid의 경우 IC₅₀이 50.8 µg/mL로 나타났고, 홍화씨 추출물은 2658 µg/mL으로 나타났으며, genistein 및 ursolic acid는 각각 0.5 mg/mL에서 31.7%, 1 mg/mL에서 40.7%의 저해율을 나타내어, 도화 추출물이 식물성 유사 호르몬과 유사한 elastase 저해활성을 나타내었다.

Collagenase 저해활성 확인. 세포 외 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다[EI-Domyati 등, 2001; Giacomoni 와 Rein, 2001]. 또한 collagen은 트립신 등의 단백

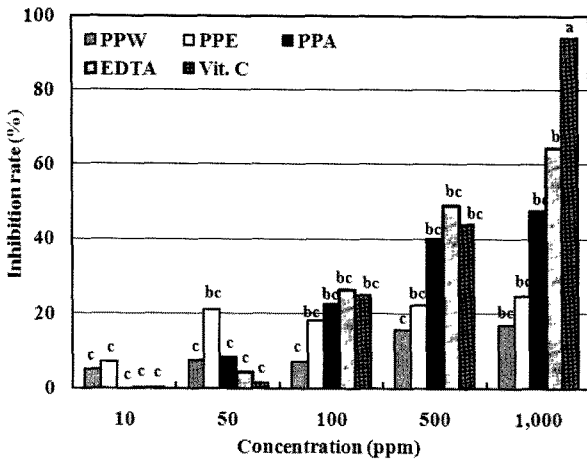


Fig. 8. Inhibition rate of *Prunus persica* Flos extracts on collagenase.

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ▨ EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
 ■ Vit. C: ascorbic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

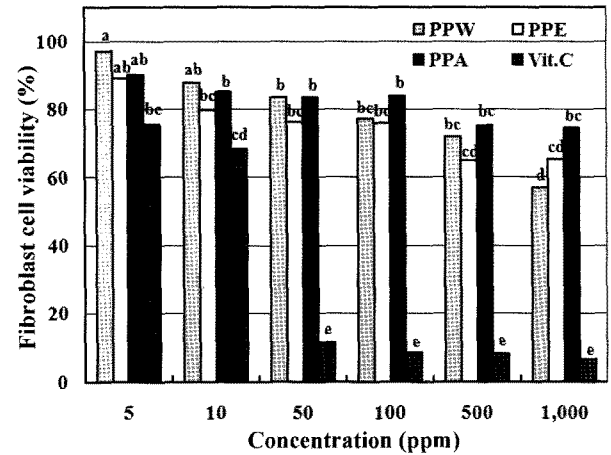


Fig. 9. Cell viability of *Prunus persica* Flos extracts on fibroblast cell (CCRF S-180 II).

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ Vit. C: ascorbic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다는 보고가 있어 [Demina 와 Lysenko, 1996; Grant 와 Album, 1959], 도화 추출물의 collagenase 저해 활성을 Fig. 8 과 같이 측정하였다. 도화 열수 및 에탄올 추출물의 경우 1,000 ppm에서 17.0, 25.0%의 collagenase 저해 활성을 나타낸 반면, 도화 아세톤 추출물의 경우 48.0%의 저해활성을 나타내 vitamin C 와 EDTA 500 ppm에서의 저해효과와 유사한 결과를 보였다. 이는 피부 내에서 collagenase의 활성을 억제함으로써 collagen의 분해를 막아 주름생성을 억제할 것으로 사료된다. Lee 등[2004]의 유백피 추출물의 collagenase 저해활성 측정결과, 100 ppm에서 27.6%를 나타내었으며, Barrantes 등[2003]의 알로에 추출물의 경우 37.1%를 나타내어, 도화 아세톤 추출물과 유사한 효과를 나타내었다.

도화 추출물에 의한 fibroblast cell (CCRF S-180)의 생존율 확인. 도화 추출물에 의한 fibroblast 세포의 생존율을 확인한 결과 Fig. 9와 같이 도화 열수 에탄올 및 아세톤 추출물의 경우 100 ppm 이하에서 20.0% 이하의 세포독성을 나타내었으며, vitamin C의 경우 같은 농도에서 fibroblast 세포에 91.0%의 세포독성을 나타내었다. 세포독성 결과로부터 collagen 생합성 시료용액의 농도를 도화 추출물은 100 ppm 이하로 측정하였으며, vitamin C의 경우 세포독성이 미비한 10 ppm 이하의 농도로 결정하여 collagen 생합성량을 측정하였다.

Collagen 생합성량 확인. 콜라겐은 대부분 피부의 진피층에 존재하며, 피부 전체 건조중량의 약 70~80%를 차지하고 있어, 세포외 기질의 대부분을 차지하면서 피부를 지지하는 역할을 한다. 그러나 자연 노화에 따른 세포 활성의 감소와 같은 내적 요인에 의해 콜라겐의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 태양 광선에 의한 활성 산소종의 증가와 같은 외적 요인에 의해 분해가 가속화되어 피부 기

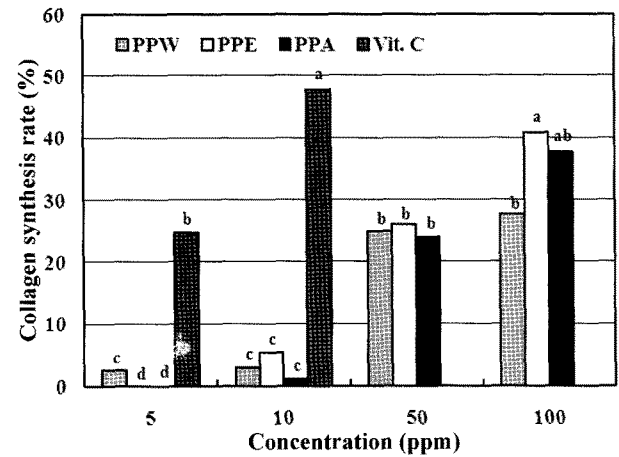


Fig. 10. Collagen synthesis of *Prunus persica* Flos extracts on fibroblast (CCRF S-180 II).

■ PPW: *Prunus persica* Flos extracted with water
 □ PPE: *Prunus persica* Flos extracted with ethanol
 ■ PPA: *Prunus persica* Flos extracted with acetone
 ■ Vit. C: ascorbic acid

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

질이 파괴되면서 주름이 생성된다. 본 연구에서는 콜라겐 생합성 증가를 확인할 수 있는 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay를 이용하여 elastase와 collagenase에서 효과를 보인 도화 추출물의 collagen 생합성량을 Fig. 10과 같이 나타내었다. 도화 열수 및 에탄올 추출물의 collagen 생합성량은 100ppm에서 27.7, 37.7%의 효과를 나타내었으며, 도화 아세톤 추출물의 경우 100 ppm에서 41.0%의 collagen 생합성 촉진 효과를 나타내어, 도화 아세톤 추출물의 collagen 생합성 촉진 효과가 가장 우수하였다. 이는 10 ppm의 vitamin C의 collagen

생합성 촉진효과가 47.0%에 비해 다소 낮은 효과를 보였으나, 천연 주름억제제로서의 가능성을 확인할 수 있었으며, Lee 등 [2004]의 유백피 추출물의 collagen 생합성량을 측정된 결과 200 ppm에서 유백피 추출물의 경우 44.4%, 대조약인 doxycycline의 경우 56.1%의 효과를 나타내어, 도화 추출물의 효과가 높음을 알 수 있었다.

초 록

도화를 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 미백 및 주름개선 효과를 검증한 후 화장품 소재로서의 가능성을 검증하였다. 미백효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 도화 열수 및 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 각각 54.0, 58.3%의 저해활성을 나타내었으며, 멜라노마 세포에서의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 도화 에탄올 추출물 100 ppm에서 40.0%의 저해활성을 나타내었다. 또한 멜라노마 세포에서의 멜라닌 생합성 저해율을 확인한 결과 도화 에탄올 추출물 100 ppm에서 56.5%의 효과를 나타내어 도화 에탄올 추출물의 미백효과가 가장 우수하였다. 주름개선 효과 측정으로 elastase 저해활성을 측정된 결과 도화 아세톤 추출물 1,000 ppm에서 57.0%의 저해활성을 나타내었으며, collagenase 저해활성을 측정된 결과 도화 아세톤 1,000 ppm에서 48.0%의 저해활성을 나타내었다. 또한 섬유아세포를 이용한 collagen 생합성량을 측정된 결과 도화 아세톤 추출물 100 ppm에서 41.0%의 촉진 효과를 나타내어 도화 아세톤 추출물의 주름개선 효과가 가장 우수하였다. 이상의 결과로 미루어 보아 도화 추출물의 미백 및 주름개선 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

Key words: anti-wrinkle, *Prunus persica* Flos, whitening

참고문헌

- An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Choi GH, and Park TS (2005) Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 280-284.
- Barrantes E, and Guinea M (2003) Inhibition of collagenase and metallo- proteinases by aloins and aloe gel. *Life Sci* **72**, 843-850.
- Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, and Uitto J (1994) Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol* **103**, 182-186.
- Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, and Walker JM (1988) Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med* **54**, 10-14.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
- Choi SY, Kang NJ, and Kim HC (2006) Inhibitory effect of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J Medicinal Crop Sci* **14**, 27-30.
- Choi WY, Chun HJ, Lee JH, and Baek SH (2003) Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. *Kor J Pharmacogn* **34**, 70-74.
- Chun HJ, Choi WH, Baek SH, and Woo WH (2002) Effect of Quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. *Kor J Pharmacogn* **33**, 245-251.
- Demina NS, and Lysenko SV (1996) Collagenolytic enzymes synthesized by microorganisms. *Mikrobiologija* **65**, 293-304.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, and Uitto J (2001) Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histo- pathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* **11**, 398-405.
- Giacomoni PU, and Rein G (2001) Factors of skin ageing share common mechanisms. *Biogerontology* **2**, 219-229.
- Gilchrest BA (1990) Skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* **2**, 79-82.
- Grant NH, and Alburn HE (1959) Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*. *Arch Biochem Biophys* **82**, 245-255.
- Han J, Kim HJ, Lee SS, and Lee IS (1999) Inhibitive effects of meju extracts made with a single inoculum of the fungi isolated from the traditional meju on the human leukemia cell line. *Korean J Mycology* **27**, 312-317.
- Hearing VJ Jr (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol* **142**, 154-165.
- Hearing VJ, and Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* **19**, 1141.
- Heo J (1994) Donguibogam. Daejoongseokwan Press, pp. 173, 301, 1386. Seoul, Korea.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, and Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* **45**, 1474-1478.
- Hur JM, Lee JH, Choi JW, Hwang GW, Chung SK, Kim MS, and Park JC (1998) Effect of methanol extract and kaempferol glycosides from *armoracia rusticana* on the formation of lipid peroxide in bromo benzene-treated rats in vitro. *Kor J Pharmacogn* **29**, 231-236.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, and Han DS (1995). Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol* **27**, 891-896.
- Kim IH etc (1991) New medicines botany. pp. 279. Hakchangsa Press, Seoul, Korea.
- Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, and Yoon KS (2004) Anti-wrinkle effect of safflower(*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J Soc Cosmet Scientistis Korea* **30**, 15-22.
- Kim SH, Cha EJ, and Hwang YJ (2004) Studies on antitumor activity and antimicrobial activity of *Coriolus Versicolor* (Fr.) *Qual and Ganoderma Lucidum* (Fr.) Karst. *Korean J Human Ecology* **7**, 49-58.
- Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, and Han YH (2004) Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Korean J Biotechnol Bioeng* **19**, 437-440.
- Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, and Lee JS (2005) Screening and

- extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* **13**, 213-216.
- Lee HJ, Lee EO, Lee YH, Kim KH, Lee JH, Baek NI, Ra JC, and Kim SH (2004) Anti-tumor activity of Korean oldenlandiae Herba and Radix. *Kor J Pharmacogn* **35**, 110-115.
- Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, and Riu KZ (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor J Pharmacogn* **32**, 175-180.
- Lee SS, Mun SH, Lee HJ, Choe DH, and Jo MH (2004) Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis* var. platyphyllum. *Mokchae Konghak* **32**, 17-27.
- Lee TW, Kim SN, Jee UK, and Hwang SJ (2004) Anti-wrinkle effect of pressure sensitive adhesive hydrogel patches containing Ulmi cortex extract. *J Kor Pharm Sci* **34**, 193-199.
- Li G, Ju HK, Chang HW, Jahng YD, Lee SH, and Son JK (2003) Melanin biosynthesis inhibitors from the bark of *Machilus thunbergii*. *Biol Pharm Bull* **26**, 1039-1041.
- Mauviel A, Halcin C, Vasiloudes P, Parks WC, Kurkinen M, and Uitto J (1994) Uncoordinate regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinases genes by prostaglandin E2: selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture. *J cell Biochem* **54**, 465-472.
- Park SK, Kim SN, Lee JC, Kim HS, Kim YJ, Lee BG, and Chang IS (2004) Anti-aging effect on skin with Jaenum-Dan(JED). *Kor J Herbology* **19**, 67-76.
- Pentland AP, Shapiro SD, and Welgus HG (1995) Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2 synthesis. *J Invest Dermatol* **104**, 52-57.
- Seo G (2005) Koryeodokyung. Seohaemoonjib press, pp. 276. Gyeonggi-do, Korea.
- Seo MH, and Lee YM (2000) The we tree to find easily(3). pp. 146-147. hyeonamsa Press, Seoul, Korea.
- Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, and Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol* **74**, 283-290.
- Wunsch E, and Heindrich HG (1963) Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol Chem* **333**, 149-151.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **3981**, 517-519.