

만병초 추출물의 항산화활성과 보습효과 측정

박정옥·임규남·박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, 그린코스메틱연구개발센터
(2010년 6월 8일 접수, 2010년 6월 11일 수정, 2010년 6월 15일 채택)

Antioxidant Activity of *Rhododendron brachycarpum* D. Don Extracts and Its Skin Hydration Effect Measure

Jung Ok Park, Gyu Nam Lim, and Su Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Research Center for Development of Green Cosmetic, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology, 172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received June 8, 2010; Revised June 11, 2010; Accepted June 15, 2010)

요약: 본 연구에서는 만병초 추출물의 항산화 작용과 tyrosinase, elastase 저해 효과, 만병초 추출물 중 ethyl acetate 분획 함유 크림을 제조하고 이를 피부에 도포한 후 피부 수분 보유량, 경표피 수분 손실량을 측정하였다. 만병초 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 ethyl acetate 분획에서 1.83 µg/mL로 나타났다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 만병초 추출물의 총 항산화능(OSC₅₀)은 50 % EtOH extract 분획에서 0.064 µg/mL로 ethyl acetate와 aglycone 분획보다 더 큰 활성을 나타내었다. 만병초 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였는데 1 ~ 10 µg/mL의 농도에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다. 미백 효과 측정으로는 각각 tyrosinase의 활성 저해 효과(IC₅₀)를 측정하였는데 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획에서 각각 70.5 µg/mL, 122.40 µg/mL로 나타났으며 elastase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획이 각각 51.40 µg/mL, 20.73 µg/mL로 나타났다. 만병초 추출물 ethyl acetate 분획 함유 크림을 팔에 도포한 후 180 min 동안 30 min 간격으로 수분 보유량을 측정한 결과 placebo 크림에 비하여 만병초 추출물 함유 크림의 수분 보유량을 1 ~ 4 % 정도 증가시켰다. 또한 180 min 동안 측정한 경표피 수분 손실량은 7.7 g/m²h으로 무도포(10.2 g/m²h)한 부분과 placebo 크림(8.9 g/m²h)과 비교했을 때 더 적은 수분 손실량을 나타내었다. 이상의 결과들은 만병초 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다. 또한 만병초의 tyrosinase, elastase 저해활성, 만병초 추출물 함유 크림의 인체 시험의 결과로부터 항산화, 항노화의 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase and elastase of *Rhododendron brachycarpum* D. Don extracts were investigated. And the moisturizing effect of cream containing *R. brachycarpum* D. Don extract were investigated by clinical trial. The ethyl acetate fraction of *R. brachycarpum* D. Don extract (1.83 µg/mL) showed the most prominent the free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of *R. brachycarpum* D. Don extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The 50 % extract fraction (0.064 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *R. brachycarpum* D. Don on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *R. brachycarpum* D. Don extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 10 µg/mL). The inhibitory effects (IC₅₀) of *R. brachycarpum* D. Don extracts on tyrosinase were determined

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

with ethyl acetate fraction of *R. brachycarpum* D. Don extract (70.5 $\mu\text{g/mL}$) and aglycone fraction of extract (122.40 $\mu\text{g/mL}$). The inhibitory effects (IC_{50}) on elastase were determined with ethyl acetate of *R. brachycarpum* D. Don extract (43.50 $\mu\text{g/mL}$) and aglycone fraction of extract (20.73 $\mu\text{g/mL}$). The cream containing the ethyl acetate fraction of *R. brachycarpum* D. Don extracts was formulated for skin hydration effect and transepidermal water loss (TEWL). The cream containing *R. brachycarpum* D. Don extract was applied to the right lower arm. After 180 min, the water contents in skin were increased by 1 ~ 4 % than the placebo cream. And TEWL of parts was decreased as 7.7 $\text{g/m}^2\text{h}$ (experimental cream) and 8.9 $\text{g/m}^2\text{h}$ (placebo cream) respectively. These results indicate that extract/fractions of *R. brachycarpum* D. Don can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging $^1\text{O}_2$ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. And inhibitory activity on tyrosinase of the aglycone fraction could be applicable to new functional cosmetics for whitening and anti-wrinkle products. Also the increase of skin hydration of the cream containing extract could be applicable to new functional cosmetics for antiaging.

Keywords: *Rhododendron brachycarpum*., antioxidative activity, whitening, skin hydration, cosmetics

1. 서 론

피부는 항상 산소와 접촉하고 있기 때문에 태양 자외선에 노출됨으로써 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 계속 받게 된다. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 이들 활성산소종 중에서 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부 노화를 가속화시킨다[1-7].

특히 광노화는 태양광선에 노출되는 신체 부위에서 자외선에 의해 야기될 수 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 ROS가 생성되며 이어서 항산화 방어체계는 붕괴된다. 결과적으로 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분들은 활성산소에 의해 손상을 받게 된다. 이러한 ROS의 생성은 생체 내 존재하는 광증감제 분자에 의해 이루어진다. 광증감반응은 Type I 혹은 Type II 형태로 일어나며, Type I 반응의 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, 반면에 Type II 반응은 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, 그리고 $^1\text{O}_2$ 을 포함하는 ROS를 생성시킨다. 이러한 ROS는 생체 내에서 superoxide dismutase (SOD), catalase 혹은 Fe(II) 등의 촉매 작용으로 상호 전환이 가능하다[8-12].

사람 피부세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체

구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사한다. $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[13-17].

만병초(*Rhododendron brachycarpum* D. Don)는 진달래과 식물로 별칭으로는 천상초(天上草), 똑갈나무, 풍엽, 석암엽 등 여러 이름으로 불리고 있다. 중국에서는 칠리향(七里香) 또는 향수(香樹)라는 이름으로 불리며, 우리나라에는 태백산, 울릉도, 한라산, 지리산, 오대산, 소백산, 설악산 등 해발 700 m가 넘는 곳에서 자란다. 이 만병초는 민간에서는 위, 장의 민무늬근 경련에 의해 생기는 요배산통(腰背痠痛), 동통, 관절통, 신장의 기능이 약해져 생기는 신허요통(腎虛腰痛), 음위, 월경불순, 불임증 등의 치료, 신경통, 고혈압, 강장제, 이뇨제로 효과가 있다고 알려져 있다[18]. 또한 만병초 잎의 성분으로 flavonoids 중 quercetin, avicularin, quercitrin, hyperin이 분리가 보고되었다[19].

그러나 만병초 추출물을 이용한 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에

대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 화장품 원료로서 사용 가능한 만병초를 구입하여 만병초 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, tyrosinase와 elastase 활성 저해 효과를 측정하였다. 또한 다른 몇 가지 항산화제들을 대조군으로 하여 만병초의 항산화능과 성분의 변화를 비교 평가하고, ROS에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다. 또한 만병초 추출물을 화장품에 이용할 목적으로 ethyl acetate 분획 추출물 함유 크림을 이용한 인체 시험에서 분획물 함유 크림의 수분과 수분 손실량을 확인하였다. 이것으로 만병초 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold 사(Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Itek사(Korea) 제품을 사용하였다.

(+)- α -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals사(Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, trizma base, HCl 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), octanol 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid), elastase (4.5 mg protein/mL, 6.5 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol, arbutin, apigenin, quercetin, kaempferol, ori-

entin, vitexin은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 피부 보습 효능 평가를 위해 CK electronic사(Germany) 제품의 Coneometer CM820, Tewameter TM210를 사용하였다. 실험에 사용한 만병초 재료는 2010년 2월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 만병초의 분획 및 추출

건조된 만병초 100 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 만병초 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 피부노화의 원인 물질로 알려져 있는 물질이다. 따라서 DPPH를 이용하여 만병초 추출물에 대한 free radical의 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, $\mu g/mL$)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 ROS ($O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ 그리고 H_2O_2)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있는데 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 만병초 추출물을 넣었다. 여기에 25 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μ L를 가한 후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2 와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50} , μ g/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내

에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 만병초 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 만병초 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 32 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에서 전체 반응 속도를 결정하는데 작용하는 핵심효소는 tyrosinase다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , μ g/mL)로 표기하였다.

2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름 생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μL에 측정시료용액 7.5 μL와 buffer 92.5 μL를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μL 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수용상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300 μL를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

2.7. 만병초 추출물 함유 크림의 피부 도포에 의한 보습 효능

만병초 추출물을 함유한 크림의 보습 효능 평가를 위해 추출물 중 ethyl acetate 분획 0.2 %를 함유하는 크림을 제조하고(Table 1), 이를 20대 피시험자 14명을 선정하여 항온항습조건(온도 : 25 ± 2 °C, 상대습도: 43 ± 2 %)에서 평가를 실시하였다. 추출물 함유 크림을 팔 안쪽에 도포한 후, 수분보유량과 경표피 수분 손실량을 각각 30 min, 60 min 간격으로 180 min 동안 측정하였다. 수분보유량과 경표피 수분 손실량의 측정은 Corneometer CM820, Tewameter TM210을 사용하였다. 측정된 capacitance value는 0 ~ 120 사이의 arbitrary capacitance unit (A.U.)으로 전환하였으며, 경표피 수분 손실량은 g/m²h로 표기하였다. 평가를 실시하기 전에 피시험자들에게 주의 사항을 숙지시켰으며, 시험 동의를 받았다.

2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 만병초 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개

Table 1. A Formula of Cream *R. brachycarpum* D. Don. Extract

Component	Content(%)	
	Placebo	Experimental
DW	Up to 100	Up to 100
Glycerine	7	7
1,3-BG	5.2	5
Xanthan gum (Keltrol-F)	0.1	0.1
TEA	0.2	0.2
Methyl-paraben	0.1	0.1
Ceto-stearyl alcohol (Lanette-O)	2	2
Stearic acid	1	1
Glyceryl-stearate/PEG-100 stearate (Alracel #165)	1.5	1.5
Bees wax	1	1
Glyceryl monostearate (GMS-205)	1	1
Squalane (Pripure R 3759)	8	8
Caprylic capric tri-glyceride	5	5
Paraffin wax	2.5	2.5
Dimethicone (Si-200/100 CS)	0.3	0.3
<i>R. brachycarpum</i> , D. Don extract (EtOAc fraction)	-	0.2

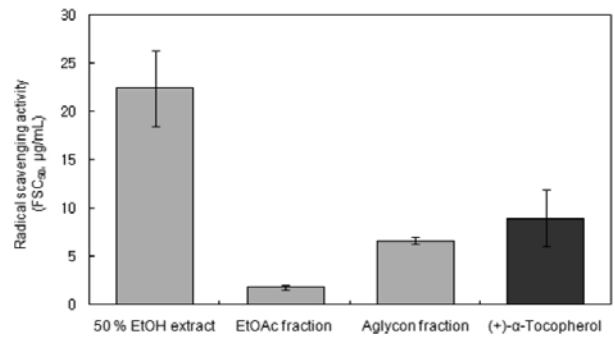


Figure 1. Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *R. brachycarpum* D. Don and references.

시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)-α-Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킴으로써 세포막을 보호한다. 이 때 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

만병초(*R. brachycarpum* D. Don) 추출물과 비교물질인 (+)-α-tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 만병초 추출물의 50 %

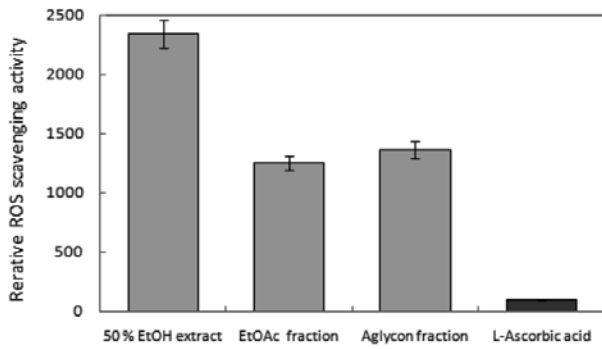


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *R. brachyarpum* D. Don extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

extract 분획의 FSC₅₀은 22.43 µg/mL, ethyl acetate 분획인 경우 1.83 µg/mL, aglycone 분획은 6.67 µg/mL으로 나타났다. 비교 물질로 사용한 (+)-α-tocopherol은 free radical 소거활성이 8.98 µg/mL이다. Ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 (+)-α-tocopherol과 비교했을 때 free radical 소거활성이 뛰어남을 알 수 있다.

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 만병초 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)을 Figure 2에 나타내었다. 만병초 추출물의 50 % extract 분획의 활성산소 소거활성은 0.064 µg/mL, ethyl acetate 분획은 0.12 µg/mL이고 aglycone 분획은 0.11 µg/mL으로 나타났다. 이 추출물들은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)의 소거활성보다 큼을 알 수 있다.

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

만병초 추출물을 비롯한 몇 가지 항산화제들의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 Figures 3, 4에 나타내었다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 만병초의 50 % extract 분획의 경우 1, 2, 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 39.7, 40.7, 53.7, 79.5 min, ethyl acetate 분획의 경우 36.5, 51.7, 75.4, 171.8 min, aglycone 분획의 경우 41.2, 48.3, 83.8, 137.9 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를

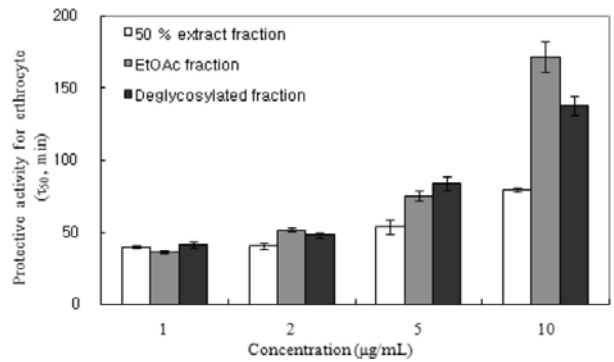


Figure 3. Cell protective effects of *R. brachyarpum* D. Don extracts against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 32.0 ± 1.0 min).

나타내었다. 10 µg/mL에서 이 추출물들은 비교물질로

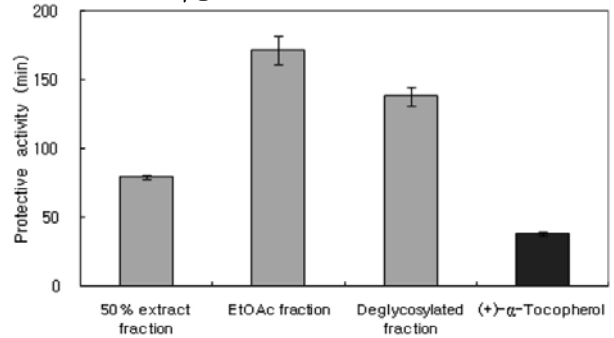


Figure 4. The effect of extracts and fractions from *R. brachyarpum* D. Don and references at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

사용한 (+)-α-tocopherol보다 세포 보호 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

3.3. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정에서, tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA), DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 dihydroxyindole (DHI)로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다.

만병초 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획의 경우에 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 각각 70.5 µg/mL, 49.97 µg/mL으로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다(Figure 5). 따라서 ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료된다.

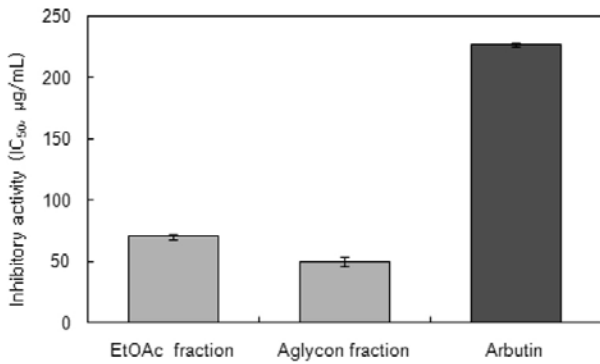


Figure 5. The effect of extracts and fractions from *R. brachycarpum* D. Don and reference on tyrosinase.

Table 2. Inhibitory Activity of Extracts from *R. brachycarpum* D. Don and References Compound on Elastase

Compounds	Inhibition (IC ₅₀ , µg/mL)
<i>R. brachycarpum</i> extract (EtOAc fraction)	51.4 ± 8.66
<i>R. brachycarpum</i> extract (aglycone fraction)	20.73 ± 2.57
Oleanolic acid	15.9 ± 1.03

3.4. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되어 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로는 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

만병초 추출물에서 ethyl acetate 분획은 51.4 µg/mL, aglycone 분획은 20.73 µg/mL에서 elastase 저해활성 (IC₅₀)을 나타내었다(Table 2). 따라서 만병초 추출물의 aglycone 분획이 ethyl acetate 분획보다 저해활성이 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

3.5. 만병초 추출물 함유 크림의 피부 도포에 의한 보습 효능

3.5.1. 수분보유량

피부 보습 평가를 위해 만병초 추출물 중 ethyl acetate 분획 0.2 %를 함유하는 크림을 제조하였다(Table 1). 추출물 함유 크림을 팔 안쪽에 도포한 후, 수분보유량을 180 min 동안 30 min 간격으로 측정하였다. Figure 6은

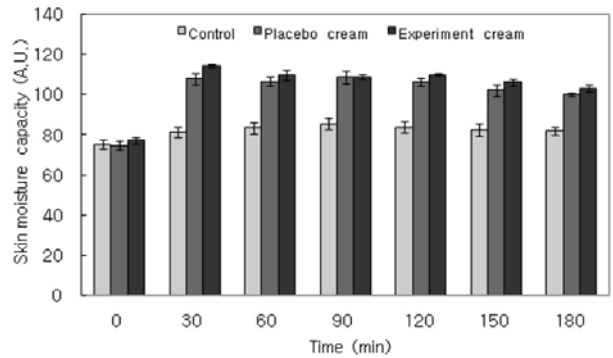


Figure 6. Representation of skin hydration by Corneometer CM820 measurement. The measurement was tried out at normal room condition with 14 volunteers during 180 min. The zero point is before the use of cream containing *R. brachycarpum* D. Don extract.

추출물 함유 30 min 전부터 30 min 간격으로 180 min 동안

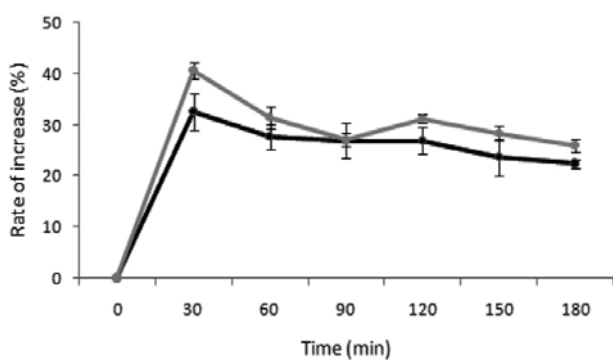


Figure 7. Rate of increase in skin moisture content.

안 측정된 결과이다. 그 결과, 무도포(control)한 부분과 placebo 크림에 비하여 만병초 추출물 함유 크림의 수분 보유량이 더 증가함을 알 수 있고 특히 placebo 크림에 비교하여 만병초 함유 크림의 경우 수분 보유량 증가율 (1 ~ 4 %)이 더 크음을 알 수 있었다.

3.5.2. 경표피 수분 손실량

경표피 수분 손실량은 만병초 추출물 함유 크림 도포 후 60 min 간격으로 180 min 동안 측정하였다(Figure 8). 그 결과 180 min이 지난 후 무도포한 부분의 수분 손실량은 10.2 g/m²h, placebo 크림은 8.9 g/m²h, 만병초 추출물 함유 크림은 7.7 g/m²h으로 만병초 추출물을 함유한 크림이 경표피 수분 손실량을 유의적으로 감소시킬 수 있었다.

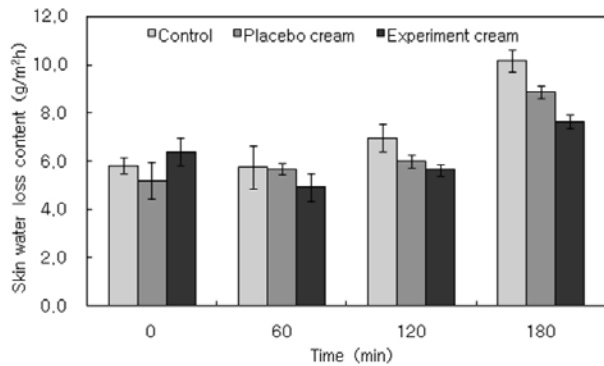


Figure 8. Representation of TEWL by Tewameter (TM 300) measurement. The zero is before application cream containing *R. brachycarpum* D. Don ethyl acetate fraction.

4. 결 론

1) 만병초 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % extract 분획 22.43 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획 1.83 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 aglycone의 경우 6.67 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

2) 만병초 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 50 % extract 분획 0.064 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획 0.12 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획은 0.11 $\mu\text{g/mL}$ 로 큰 활성을 나타냈다.

3) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 만병초 추출물은 농도 범위(1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$)에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다.

4) 만병초 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 각각 70.50 $\mu\text{g/mL}$, 49.97 $\mu\text{g/mL}$ 으로 우수한 저해 활성을 나타냈다.

5) 만병초 추출물의 elastase 저해 활성(IC₅₀)은 ethyl acetate 분획에서 51.4 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획에서는 20.73 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다.

6) 만병초 추출물의 ethyl acetate 분획 함유 크림을 도포한 후 180 min 동안 피부 수분 보유량을 측정한 결과 만병초 추출물의 ethyl acetate 분획 함유 크림이 placebo 크림에 비하여 1 ~ 4 %의 증가율을 보였다. 또한 경표피 수분 손실량은 무도포한 부분의 수분 손실량은 10.2 $\text{g/m}^2\text{h}$, 만병초 추출물 크림은 7.7 $\text{g/m}^2\text{h}$ 으로, 만병초 추출물 함유 크림이 경표피 수분 손실량을 감소시킴을 알 수 있었다.

이상의 결과로서 만병초 추출물의 항산화능에 있어서 큰 항산화 활성을 나타내고, 미백 관련된 tyrosinase 효소 활성을 저해함으로써 만병초 추출물의 화장품 응용 가능

성이 큼을 시사한다. 또한 만병초 추출물 ethyl acetate 분획 함유 크림의 경표피 수분 보유량이 뛰어난 것을 알 수 있었고 나아가 항노화 화장품 원료로서 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(과제 고유번호 : A092055).

참 고 문 헌

1. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann J. Path.*, **107**, 397 (1982).
2. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
3. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85. Academic press, New York (1976).
4. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
8. B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettner, Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: An electron paramagnetic resonance study, *Photochem. Photobiol.*, **59**, 1 (1994).
9. B. A. Jurkiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buettner, Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
10. J. P. Thomas and A. W. Girotti, Photogeneration of singlet oxygen by membrane bound hematoporphyrin

- derivative, *Photochem. Photobiol.*, **47**, 79S (1988).
11. C. S. Foote, Definition of Type I and Type II Photosensitized oxidation, *Photochem. Dermatol.*, **102**, 671 (1994).
 12. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639 (1997).
 13. J. W. Choi, S. I. Kim, S. M. Jeon, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 14. H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of antioxidant potential of extract/fractions of *Equisetum arense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
 15. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum arense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
 16. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative potencies of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).
 17. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 18. K. S. Byun, Y. W. Lee, H. J. Jin, M. K. Lee, H. Y. Lee, K. J. Lee, M. Y. Heo, C. Y. Yu, and J. H. Lee, Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **13**(4), 199 (2005).
 19. J. S. Choi, H. S. Young, J. C. Park, J. H. Chio, and W. S. Woo, Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*, *Arch. Pharm. Res.*, **9**(4), 233 (1986).
 20. A. Swiderski, P. Muras, and H. Koloczek, Flavonoid composition in frost-resistant *Rhododendron* cultivars grown in Poland, *Scientia Horticulturae*, **100**, 139 (2004).
 21. S. J. Park, H. M. Kim, K. S. Han, G. S. Seong, M. R. Shin, Y. J. Mun, and W. H. Woo, Inhibitory effects of the ethanol extract of *Lavandula vera* on sebum synthesis, *J. Traditional Korean Medicine*, **15**(1), 77 (2006).
 22. H. J. Yang and S. N. Park, Antioxidative and anti-aging effects of *Platycarya strobilacea* extract and clinical trial, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(4), 257 (2008).