

한약재 복합 추출물이 항산화 및 항노화에 미치는 영향

황재규¹, 윤종국¹, 한길환¹, 도은주¹, 이진상¹, 이은주², 김종부², 김미려^{1,3*}

1 : (재)대구테크노파크 한방산업지원센터, 2 : (주)엔유씨전자

3 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Anti-oxidation and Anti-aging Effect of Mixed Extract from Korean Medicinal Herbs

Jaegyung Hwang¹, Jong-Kuk Yun¹, Kil-Hwan Han¹, Eunju Do¹, Jin-Sang Lee¹,
Eun-Ju Lee², Jong-Boo Kim², Mi Ryeo Kim^{1,3*}

1 : Daegu Technopark Oriental Medicine Industry Support Center, Daegu, Korea,

2 : NUC Electronics Co., Ltd., Daegu, Korea,

3 : Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Korea

ABSTRACT

Objectives : The present study was designed to investigate effects of mixed extract from Korean medicinal herbs (MIX) on oxidation/reduction reaction-related and aging-related enzyme *in vitro*.

Methods : We performed MTT assay, collagenase inhibition assay, elastase inhibition assay, tyrosinase inhibition assay, DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity and xanthine oxidase inhibition assay.

Results : Recently, many studies have reported that elastin is also involved in inhibiting or repairing wrinkle formation, although collagen is a major factor in the skin wrinkle formation. The MIX showed 97% inhibition of collagenase activity, and 64% inhibition of elastase activity at 1 mg/ml concentration of MIX, next only to positive control, which indicate good efficacy for anti-wrinkle ingredient. Also its treatment showed 34% inhibition of tyrosinase activity, to relate whitening effect, at the same dose of MIX. Antioxidant activities were determined by DPPH radical scavenging, xanthine oxidase (XO) inhibiting activity and SOD-like activity. Also these scavenging, XO-inhibiting and SOD-like activities were measured in 91%, 80%, and 63% inhibition, respectively, at a treated dose of 1 mg/ml, compare to control.

Conclusions : These results suggest that possibility of mixed Korean medicinal herbs as a functional ingredient for anti-wrinkle and whitening, anti-oxidation and anti-aging cosmetic formula.

Key words : Anti-aging, anti-oxidation, collagenase, elastase, tyrosinase

서 론

피부노화는 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 시간 의존적인 내인적 노화와 주위환경, 특히 자외선 노출로 인해 발생하는 외인적 노화로 나눌 수 있다. 한편 에스트로젠은 자연노화의 주요한 원인으로 진피에 있는 섬유아세포를 자극하여 콜라겐 합성을 촉진시키며, 콜라겐 대사에 관여해 콜라겐 분해효소인 콜라게나제의 발현을 조절하여 콜라겐 분해를 억제한다. 나이가 들어감에 따라 에스트로젠의 생성이 중지되어 내분비성 노화가 촉진 된다¹⁾. 또한 기질 단백질의 결핍은 광노화에 있어 중요한 인자중 하나이다. 자외선에 의해 세포 사

이를 채우는 성분인 교원질과 탄력질의 합성이 감소하게 되면 다양한 기질 단백질 분해 효소의 발현이 증가 하게 된다. 그러므로 피부 노화의 주원인인 콜라겐과 엘라스틴 분해효소인 collagenase와 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다²⁾. 엘라스틴은 진피층의 3-4% 정도를 차지하며 콜라겐은 진피 층의 90% 이상으로 구성되어 있으며 피부의 탄력에 영향을 준다. 콜라겐과 엘라스틴은 섬유아세포의 작용에 의해 합성되며 collagenase와 elastase에 의해 분해된다. 진피 층은 피부의 물리 화학적인 성질을 결정하여 모세혈관과 표피에 영양을 공급해주는 중요한 역할을 하므로 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다³⁾.

*교신저자 : 김미려 (재)대구테크노파크 한방산업지원센터, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실.
· Tel : +82-53-770-2241. · Fax : +82-53-770-2241. · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr.
· 접수 : 2011년 2월 16일 · 수정 : 2011년 3월 7일 · 채택 : 2011년 3월 10일

자외선 노출로 인해 피부는 항산화효소와 글루타치온, 비타민 C, 비타민 E 및 유비퀴놀과 같은 항산화제의 감소로 과잉의 유해한 활성산소 종(ROS; Reactive oxygen species)을 생성한다. 자외선으로 생성된 활성산소 종은 실질적으로 피부의 효소 및 비효소적 항산화 방어체계를 손상시키며 산화적 스트레스는 지질과 산화, 단백질산화, 피부의 염증반응 유발, 피부면역기능 억제, 세포성분의 손상을 야기시키고 광노화를 촉진시킨다. 광노화를 유발시키는 활성산소종은 멜라닌 생성을 촉진시키고 주름을 유발시키는 원인 물질로 받아들여지고 있다^{4,5)}. 따라서 피부 세포를 보호할 수 있는 항산화제, 피부를 구성하는 물질인 콜라겐을 분해하는 단백질 분해효소인 MMPs (matrix-metalloproteinases)의 생합성을 억제할 수 있는 물질을 사용하여 피부노화를 완화할 수 있는 천연소재 개발에 대한 관심과 연구가 많이 진행되고 있다.

기능성화장품 고시 품목으로 미백 기능성화장품의 경우 tyrosinase 활성억제 물질로는 누룩곰팡이의 secondary metabolite인 kojic acid, 우바우르시의 arbutin,甘草에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin과 hydroquinones, catechols 등이 있으며⁶⁾, 자외선차단 고시품목으로는 글리세릴파마, 벤조페논-3, 에틸헥실디메틸파마바가 있으며, 주름개선 고시 품목으로는 레티놀(retinol), 레티놀팔미테이트, 아데노신(adenosine), 폴리에톡실레이티드 레티아마이드 가 있다. 최근 화장품 분야에서 유기합성 소재가 천연물 소재로 대체되고 있다. 미백소재로서 닥나무, 菊花, 桑白皮, 半夏, 天門冬, 桑黃버섯, 魚腥草, 麥門冬 등이 연구되었고, 자외선 차단소재로는 大黃 추출물, 방선균 추출물, 알로에, 우뭇가사리 등이 연구되었으며, 주름개선 소재로서는 알로에, 綠茶, 甘草, 山査子, 종가시나무, 로열젤리, 레몬 등이 연구되었다^{7,8)}.

본 연구에서 사용되는 소재인 牡丹皮(Moutan Radicis Cortex)는 牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andrews, *Paeonia moutan* Sims.)의 근피로 한방에서는 해열, 소염, 진통제 등으로 사용하고 있으며 항염증효과와 항산화 효과에 대한 연구가 보고되고 있다⁹⁾. 芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall)은 한방에서 진통, 진정작용, 항근작용, 항혈전 작용이 있어 치료약재로 사용되어왔고 芍藥추출물 성분 중 paeoniflorin은 항산화 효과가 있으며 최근 *in vitro* 연구에서 콜라겐합성을 증가시키는 효과가 있음이 밝혀졌다. 甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 본초로서 단맛 성분인 glycyrrhizin을 6-14% 함유하고 있으며, 그 안전성이 입증되어 거의 모든 한약의 구성성분으로 쓰여지고 있다. 甘草의 주성분인 glycyrrhizin은 사포닌 계통으로 바이러스질환, 만성간염 및 알레르기에 효과가 입증되었고 미량의 flavonoid는 항균과 항산화 효과가 보고되고 있다¹⁰⁾. 肉桂(Cinnamon Bark)는 녹나무과(Lauraceae)의 식물로 계피나무 *Cinnamomum cassia* Blume 또는 그 밖의 동속 근연 식물의 수피를 그대로 또는 주피를 다소 제거한 것을 약용으로 쓰이고 있으며 위장운동을 촉진하며 혈액순환을 촉진시켜 몸을 따뜻하게 하며 장내의 이상발효를 억제하는 방부효과도 있다. 또한 한방처방용 약으로 감기약, 진통진경약, 보건강장약, 부인약 등에 배합된다¹¹⁾. 魚腥草(*Houttuynia cordata* Thunb)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로 수종, 매독, 방광염, 자궁염 및 중풍 등 광범위한 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 항암¹²⁾, 항균¹³⁾ 및 항산화¹⁴⁾ 효

과 등이 보고되고 있다. 이처럼 단일 소재의 효과에 대한 연구는 많이 이루어져 있지만 복합추출물에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 한약재 복합추출물인 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 복합추출물을 이용하여 항산화 효과, 주름개선 및 미백 효과를 연구하여 기능성 한방화장품 원료로서의 사용 가능성을 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 실험에 사용한 牡丹皮(중국산), 芍藥(국산), 甘草(중국산), 肉桂(베트남산), 魚腥草(국산)는 대원한약국(대구)에서 구입하여 4℃ 냉장실에 보관하면서 사용하였다. 시료의 추출은 50% 에탄올 추출로 다음과 같이 추출하였다. 각각의 시료는 50% 에탄올에 침지하여 50℃에서 48시간 방치하여 추출하였다. 각 추출물을 원심 분리하여 상층액을 취하는 과정을 3회 반복하였으며, 상층액을 감압 농축하여 동결건조 후 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 분말을 같은 비율로 혼합한 복합물을 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 가용성 고형분 함량 및 추출 수율 측정

가용성 고형분 함량은 추출한 추출액을 굴절당도계(ATAGO Pocket Refractometer, Japan)를 사용하여 측정하였다. 각 시료의 추출수율의 측정은 추출에 사용한 시료의 건조 한약재에 대한 추출액의 총 가용성 고형분 함량의 백분비로 하였다.

3. 세포배양 및 시약

NIH3T3는 마우스의 섬유아세포주로 한국세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL)과 gentamicin (50 mg/ml)을 첨가한 배지를 사용하여 37℃, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, collagenase, elastase 시약은 Sigma Chemical Co.,에서 구입하여 실험에 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

세포를 96-well plate에 8 X 10⁴ cells/ml로 분주하여 안정화시킨 후 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 복합추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양 하고 배지를 제거한 후 MTT 용액(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 0.5 mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 CO₂배양기에서 반응시키면 불용성의 결정이 생성되게 된다. 이렇게 생성된 불용성 결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 완전히 녹인 다음, microplate reader를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다¹⁵⁾. 이렇게 측정된 값을 이용하여 세포독성을 확인하였다.

5. Collagenase 저해활성 측정

피부 노화 억제 효과를 확인하기 위하여 collagenase저해 활성 측정은 아래와 같이 측정하였다¹⁶⁾. 즉 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-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, ethylacetate 1.5 ml를 첨가하여 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

6. Elastase 저해 활성 측정

피부 주름 개선효과를 확인하기 위하여 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정함으로써 porcine pancreas elastase 저해 활성을 조사하였다¹⁷⁾. 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 시험관에 취하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase, pancreatic solution (Type I: From Porcine Pancreas 유래, 0.6 units/ml)용액 0.05 ml를 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide(1mg/ml)을 0.1 ml를 첨가하여 30분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

7. Tyrosinase 저해 활성 측정

피부 미백 효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 저해활성을 다음과 같이 측정하였다¹⁸⁾. 즉 시험관에 pH 6.8의 1/15M sodium phosphate buffer 0.5 ml에 10 mM L-DOPA을 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml를 넣은 혼합액에 110 Unit/ml mushroom tyrosinase 0.2 ml를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시키고 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

8. 전자공여 (DPPH) 활성 측정

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정 하였다¹⁹⁾. 즉 농도 별로 제조한 각 추출물 시료 1 ml에 0.4 mM DPPH 용액 0.5 ml를 가하고, 10초간 vortex mixing 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

9. SOD-like 활성 측정

각 시료 0.2 ml에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl] aminomethane + 10 mM EDTA) 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하고 25°C

에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다²⁰⁾.

10. Xanthine oxidase 저해활성 측정

시료용액 0.1 ml와 pH 7.5의 0.1 M potassium phosphate buffer 0.6 ml에 2 mM xanthine을 녹인 기질액 0.2 ml를 첨가하고 0.2 unit/ml xanthine oxidase 0.1 ml를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다²¹⁾. Xanthin oxidase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

11. 통계 처리

본 연구에서는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험한 결과를 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, p값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의 하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

1. 가용성 고형분 함량 및 추출 수율

생약류 5종에 대한 50% 에탄올 추출물의 가용성 고형분 함량 및 추출 수율은 Table 1과 같다. 추출 수율은 경제적인 측면에서 매우 중요한 요인으로, 5종의 한약재 중 牡丹皮와 甘草가 각각 22.0%와 22.1%로 높은 편이었으며, 芍藥은 19.4%, 魚腥草와 肉桂는 각각 8.6%와 6.6%의 순으로 낮은 수율을 나타내었다.

Table 1. Soluble solid contents and extracted yields of medicinal herbs

| Scientific name | Herbal name | Soluble solid content [§] | Yield ^{§ §} |
|------------------------------|-------------|------------------------------------|----------------------|
| <i>Paeonia moutan</i> | 牡丹皮 | 25 | 22.0 |
| <i>Paeonia lactiflora</i> | 芍藥 | 25 | 19.4 |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> | 甘草 | 23 | 22.1 |
| <i>Cinnamomum cassia</i> | 肉桂 | 5 | 6.6 |
| <i>Houttuynia cordata</i> | 魚腥草 | 12.1 | 8.6 |

§ °Brix

§ § % (w/w, dry base)

2. 세포 생존력 측정확인

牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물의 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물을 0.1, 0.5, 1, 5 mg/ml의 농도로 배지에 첨가한 후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. NIH3T3 마우스 섬유아세포에 대한 복합추출물의 세포 독성을 측정한 결과 50% 에탄올 추출물 1 mg/ml의 농도에서 100%에 가까운 세포 생존율을 나타내었으며, 5 mg/ml의 농도에서도 91%에 가까운 세

포 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 세포독성 실험결과를 바탕으로 이후 실험에서는 복합추출물의 농도를 독성을 갖지 않는 최대 농도를 설정하여 주름 개선 효능 평가를 실시하였다.

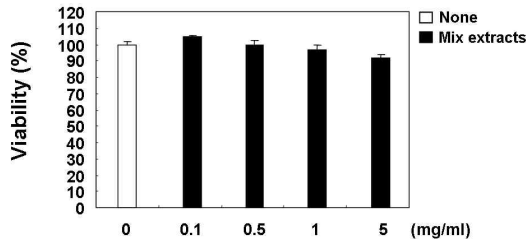


Figure 1. Effect of mixed medicinal herbal extracts on cell viabilities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

3. Collagenase 저해활성 측정

세포외기질의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로 피부, 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하며 피부건고성, 결합조직결합력, 세포접착성, 세포 분화유도 등의 기능을 가지고 있다. 콜라겐은 진피 층의 90% 이상으로 구성되어 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하여 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부진피조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의한 것이라 할 수 있다. 콜라겐 분해에 따른 감소는 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인으로 나타난다²²⁾. 50% 에탄올 복합추출물의 collagenase 저해활성을 확인해 보았다. 그 결과 50% 에탄올 복합추출물은 1 mg/ml 농도에서 97% 이상의 collagenase 저해 활성 효과를 나타내었으며, 5 mg/ml 농도에서는 100%에 가까운 collagenase 저해 활성 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다. 특히 1 mg/ml 농도에서 collagenase 저해활성에서 대조군으로 사용된 녹차 추출물 유래의 단일 물질인 epigallocatechin gallate (EGCG)와 유사한 높은 저해활성을 나타내어 50% 에탄올 복합추출물의 저해활성이 높은 것으로 나타났으며 collagen의 분해를 막아 피부의 주름을 개선할 것으로 사료된다(Fig. 2).

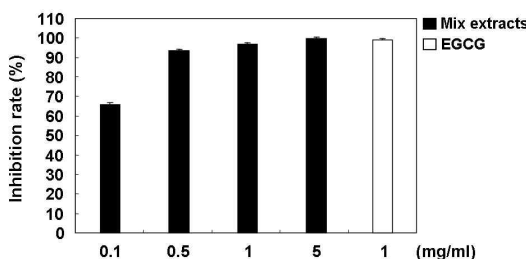


Figure 2. Effect of mixed medicinal herbal extracts on collagenase activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

4. Elastase 저해활성 측정

Elastin은 피부 세포외기질 (ECM; Extracellular matrix)을 구성하는 성분중의 하나이며, 피부 탄력성 저하와 주름 형성에 collagen의 감소뿐 아니라 피부탄력섬유의 구성 성분인 elastin 저하도 관여한다. Elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 경단백질인 엘라스틴을 분해할 수 있는 유일한 효소이며, 콜라겐과 엘라스틴 같은 결합조직을 지지하고 구성하는 모든 단백질들을 가수분해 한다²³⁾. 그러므로 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용이 있으며, urosolic acid 등이 elastase저해제로 이용되고 있다. 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물을 이용한 elastase 저해 활성을 측정한 결과 50% 에탄올 복합추출물은 1 mg/ml 농도에서 64% 이상의 저해 활성을 나타내며, 5 mg/ml 농도에서는 71%이상의 활성저해를 나타내었으며, 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다. 이상의 결과에서 50% 에탄올 복합추출물은 elastase 저해활성이 우수함을 알 수 있었다(Fig. 3).

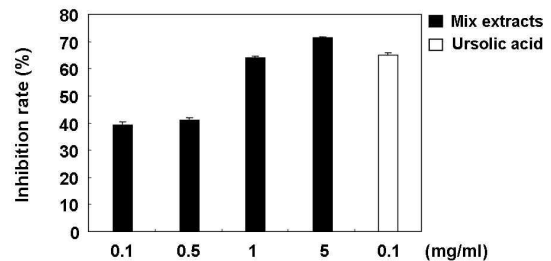


Figure 3. Effect of mixed medicinal herbal extracts on elastase activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

5. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌을 형성하는 연속적인 효소적 산화 반응에서 L-tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되고 다시 tyrosinase에 의해 dopaquinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 형성된다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-dopa로 변화하는 hydroxylase의 활성과 L-dopa를 dopaquinone으로 변환하는 dopa oxidase의 활성을 모두 가지고 있는 두 가지 단계의 반응을 촉진하는 key enzyme으로 작용 한다²⁴⁾. 그러므로 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서 멜라닌 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제 개발에 있어서 tyrosinase활성 저해 실험은 유용한 일차평가방법으로 인정되고 있다²⁵⁾. 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 1 mg/ml의 농도에서 34% 이상의 저해활성을 나타내었고, 5 mg/ml의 농도에서는 65% 이상의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 50% 에탄올 복합추출물은 양성대조군인 vitamin C와 비교하였을 때 저해 활성은 미약하였으나 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 저해활성이 나타났다. 이상의 결과로 50% 에탄올 복합추출물은 기존 미백제와 같은 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 활성이 있는 것으로 판단된다(Fig. 4).

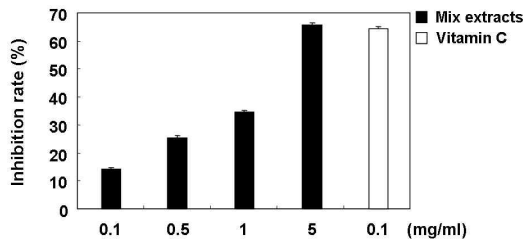


Figure 4. Effect of mixed medicinal herbal extracts on tyrosinase activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

6. 전자공여(DPPH) 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정화된 물질이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행되고 있음을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다. DPPH는 517nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517nm에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려있다²⁶⁾. 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물의 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 BHA (butylated hydroxyanisole)를 이용하여 50% 에탄올 복합추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 1 mg/ml의 농도에서 90% 이상의 저해활성을 나타내었고, 5 mg/ml의 농도에서는 95% 이상의 저해활성을 나타내었다. 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈고, 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 50% 에탄올 복합추출물 자체가 항산화 작용이 높고 피부에서 흔히 일어나는 활성산소에 대한 노화를 방지하는데 큰 도움이 될 것이다(Fig. 5).

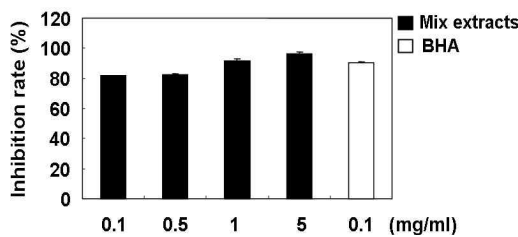


Figure 5. Effect of mixed medicinal herbal extracts on DPPH radical scavenging activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

7. SOD 유사 활성 측정

유해산소라 불리는 활성산소 (ROS ; Reactive oxygen species)는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과 산화 반응을 일으켜 체내에 과산화 지질을 축적하여 인체 기능을 저하시키고 색소침착, 노화 및 성인병 등의 여러 가지 질환을 유발 한다고 알려져 있다. SOD (Superoxide dismutase)는 생체 내에서 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 역할을 하여 산화방지와 노화 억제에 밀접한 관계가 있다. SOD 유사활성 측정을 위해 산화

효소인 pyrogallo과 함께 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물을 반응시켜 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 SOD 유사활성 소거작용을 나타내었고, 1 mg/ml의 농도에서 63% 이상의 저해 활성을 나타내었으며, 5 mg/ml의 농도에서는 67% 이상의 저해 활성을 나타내어 양성 대조군인 BHA와 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내었다. 따라서 50% 에탄올 복합추출물의 SOD 유사활성이 산화 방지는 물론 노화억제와도 밀접한 관계가 있음을 보여준다(Fig. 6).

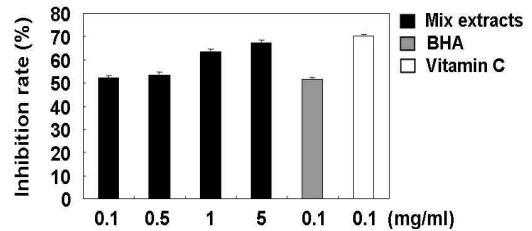


Figure 6. Effect of mixed medicinal herbal extracts on SOD-like activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

8. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase는 모든 purine의 terminal oxidation에서 rate-limiting enzyme으로 작용하며 superoxide radical이나 hydrogenperoxide와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소이다. Xanthine/ xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타나며 통풍 억제 및 free radical의 생성 억제를 통해 생화학적으로 중요한 의미를 갖는다. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 50% 에탄올 복합추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 50% 에탄올 복합추출물은 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타냈으며, 1 mg/ml의 농도에서 80%이상, 5 mg/ml의 농도에서는 86%이상의 소거 효과를 나타내었다. 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내어 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다(Fig. 7).

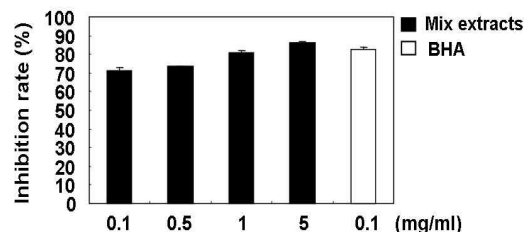


Figure 7. Effect of mixed medicinal herbal extracts on xanthine oxidase activities. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). Results are representatives of more than three independent experiments.

결론

최근 들어, 천연 한방소재를 이용한 기능성 한방화장품 개발이 지속적으로 증가하는 추세이며, 소재개발이 매우 활발하

게 진행되고 있다. 그에 따라 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 복합추출물의 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 NIH3T3 마우스의 섬유아세포에 대한 세포 생존율, 항산화효과 및 노화관련 효소에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NIH3T3 마우스 섬유아세포에 대한 복합추출물의 세포 독성을 MTT assay로 측정한 결과 1 mg/ml의 농도에서 100%에 가까운 세포 생존율을 나타내었으며, 5 mg/ml의 농도에서도 91% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. Collagenase 저해활성 실험은 피부의 지지역할을 하는 collagen 분해 역할을 하는 collagenase의 저해 활성을 측정함으로써 피부노화의 감소 정도를 측정하는 실험으로 피부노화에 있어서 효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있는 EGCG와 비교하여 1 mg/ml의 농도에서 collagenase 저해효과가 97%로 EGCG와 비슷한 collagenase 저해활성을 보여주었다.
3. Elastase 억제활성은 1 mg/ml 농도에서 64% 이상의 저해 활성을 나타내며 5 mg/ml 농도에서는 71% 이상의 활성저해를 나타내었으며, 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다.
4. Tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 1 mg/ml의 농도에서 34% 이상의 저해활성을 나타내었고, 5 mg/ml의 농도에서는 65% 이상의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 양성대조군인 vitamin C와 비교하였을 때 저해 활성은 미약하였으나 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다.
5. DPPH radical 소거율, xanthine oxidase 저해와 SOD-like 활성을 이용하여 항산화 효과를 측정한 결과 1 mg/ml의 농도에서 DPPH radical 소거율이 91%, xanthine oxidase 저해효과가 80%, 그리고 SOD-like 활성이 63%를 나타내었다. 농도 의존적으로 억제효과를 나타냈고 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내었다.

이상의 결과에서 牡丹皮, 芍藥, 甘草, 肉桂, 魚腥草 복합추출물의 화장품용 주름개선과 미백소재로서 가능성을 보여주었고, 세포독성이 없는 천연한방소재로서 주름개선효과 및 항산화 활성을 갖는 한방 화장품의 기능성 소재로서 이용 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역산업선도기술개발사업의 지원에 의해 수행된 연구과제(과제번호 : 70004130)의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis: Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol. Clin.* 1986; 4: 433-46.
2. Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. Inhibitory effect of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* 1999; 21: 71-82.
3. Chung JH. Photoaging in Asians. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2003; 21: 610-3.
4. Garrel C, Fontecave M. Nitric Oxide. *Chemistry and Biology Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* 1995: 21-35.
5. Hogg N. Pro-oxidant and antioxidant effects of nitric oxide. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* 1995: 37-49.
6. Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 100: 150-5.
7. Kim JY, Yang HJ, Lee KH, Jeon SM, Ahn YJ, Won BR, Park SN. Antioxidative and Antiaging Effects of Jeju Native Plant Extracts(II). *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2007; 33: 165-73.
8. Park JH, Shin YG, Baek SK, Lee UK, Chung H, Park YI. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji.* 1997; 41: 518-23.
9. Boo YC, Jeon CO. Antioxidants of Theae Folium and Moutan cortex. *J. Korean Agric. Chem. biotechnol.* 1993; 36: 326-31.
10. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of Licorice Root(*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J. Food Sci Technol.* 2006; 38: 584-8.
11. 生藥學研究會. 現代生藥學. 學窓社. 2003: 154.
12. Kim Sk, Ryu SY, Choi UK, Kim YS. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* 2001; 24: 518-21.
13. Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003; 32: 1053-8.
14. Lee YJ, Shin DH, Jang YS, Sin JH. Antioxidative effects of fractions from sequential ethanol extracts of *Houttuynia cordata*, Portulacaceae and sesame cake. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1993; 25: 683-6.
15. Hwang J, Lee S, Lee JT, Kwon TK, Kim DR, Kim H, Park HC, Suk K. Gangliosides induce autophagic cell death in astrocytes. *Br J Pharmacol.* 2010; 159: 586-603.
16. Wünsch E, Heindrich HG. Zur quantitativen

- bestimmung der collagenase. Hoppe-Seyler's Physiol Chem. 1963 ; 333 : 149-51.
17. Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med. 1988 ; 54 : 10-4.
 18. Yagi A, Kanbara T, Morinoby N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986 ; 3981 : 517-9.
 19. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 181 : 1199-200.
 20. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1975 ; 47 : 468-74.
 21. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase(type D) to oxidase(type O). J Biol Chem. 1969 ; 244(14) : 3855-63.
 22. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 ; 274 : 21491-4.
 23. Balo J, Banga I. The elastolytic activity of pancreatic extracts. J Biochem. 1950 ; 46 : 380-7.
 24. Park YJ, Sim SS. Effect of hot-water extract from *Laminaria japonicus* on production of melanine and inflammatory mediators. The Graduate School of Food & Drug Administration, Chung-Ang University. 2004.
 25. Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest. Dermatol. 1990 ; 75 : 122-7.
 26. Luciana L, Mensor FS, Menezes GG, Leitao AS, Reis TC, Santos D, Cintia SC, Suzana GL. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother. Res. 2001 ; 15 : 127-30.