

## 미선나무의 저온 추출 공정에 의한 항주름 활성 증진

김남영\* · 이현용\*\*†

\*강원대학교 생물의소재공학과, \*\*서원대학교 식품공학과

### Enhancement of Anti-wrinkle Activities of *Abeliophyllum distichum* Nakai through Low Temperature Extraction Process

Nam Young Kim\* and Hyeon Yong Lee\*\*†

\*Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea.

**ABSTRACT** : Skin anti-wrinkle activities of the stems and leaves of *Abeliophyllum distichum* Nakai were evaluated by the extracts obtained from various extraction processes such as using hot water at 100 °C, 70% ethanol at 85 °C, and 70% ethanol with ultrasonication at 60 °C. The ultrasonicated extract showed 95.62% of the highest cell viability in addition of 0.3 mg/ml of the extracts into the normal human fibroblast cell, CCD-986sk. For antioxidant activities, the extracts using ultrasonicated extract showed the highest DPPH free radical scavenging as 80.27%, followed by 75.88% and 62.44% for the extracts using ethanol extract and water extract. The ultrasonicated extract also showed the highest elastase inhibition activity as 25.32%, compared to ethanol extract and water extract based method at 22.01% and 12.88%, respectively. MMP-1 production was most effectively decreased down to 2908.1 pg/ml with ultrasonicated extract while 6640.8 pg/ml with water extract and 3609.3 pg/ml with ethanol extract, in addition of 0.3 mg/ml. Collagen production was increased up to 154.7 ng/ml in addition of ultrasonicated extract, and followed by 121.4 ng/ml and 31.2 ng/ml for ethanol extract and water extract, respectively. These results indicate that the ethanol extract should have skin anti-wrinkling activities and can be improved by the ultrasonication process that high energy input elute more amounts of bioactive substances eluting more amounts of bioactive substances from the high energy input of ultrasonication.

**Key Words** : *Abeliophyllum distichum* Nakai, Antioxidant, Skin Anti-Wrinkle

## 서 언

현대사회는 과학기술이 발달되고, 삶의 질 향상으로 인하여 많은 사람들은 의식주에서 벗어나, 어떻게 하면 최대한 젊음을 유지하며 살 수 있을지에 대해 관심을 가지게 되었다. 그 중에서 우리나라는 개개인의 외모를 가꾸기 위한 소비가 나날이 급증하고 있으며, 이로 인해 화장품 산업도 나날이 발전하고 있다. 사람들은 젊고 아름답게 자신의 외모를 가꾸기 위하여 피부의 주름을 없애고, 탄력을 유지하고 싶어한다. 주름은 피부의 노화가 진행 됨에 따라 자연스럽게 생기지만, 태양광의 자외선에 의하여 발생하는 광노화로 인하여, 피부의 탄력

이 감소하고 주름이 증가하게 된다. 이 과정에서 발생하는 활성산소종이 지대한 영향을 끼치게 되는데, 활성산소는 피부 탄력을 유지하는데 도움이 되는 collagen 단백질 생성을 저해하는 역할을 한다 (Jang *et al.*, 2103). 활성산소로 인한 산화적 스트레스는 collagen 단백질을 분해하는 효소인 MMPs (Matrix metalloproteinase)의 생성량을 증가시켜, 결국 collagen의 저해로 인해 피부 탄력이 감소하여 주름이 증가하게 된다 (Pentland *et al.*, 1995). 그러므로, 항산화에 우수한 물질이 피부 주름 개선에 좋은 방안이 될 수 있다. 현재 그 중에서도 다양한 물질이 각광 받고 있으며, 천연물 소재가 합성소재 보다 피부에 주는 자극이 적어 다양한 천연물을 이용

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2015 April 22 / 1st Revised 2015 May 15 / 2nd Revised 2015 May 27 / 3rd Revised 2015 May 28 / 4th Revised 2015 May 30 / Accepted 2015 May 30

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 주름개선 소재의 연구가 계속해서 이루어지고 있다.

미선나무는 세계에서 우리나라에서만 자생하는 1속 1종의 희귀 수종이다. 물푸레나무과에 속하며 낙엽활엽관목인 미선나무는 현재 충청북도 진천, 괴산, 영동, 전라북도 부안에서 서식하고, 천연기념물로 지정되어 있을 정도로 희귀하다 (Lee *et al.*, 1990, 2014). 그러나 최근 대량 생산에 성공하여, 미선나무에 대한 연구활동이 활발해지고 있으며, 그것의 예로 미선나무 추출물을 유효성분으로 하는 화장품 조성물에 관한 특허가 있다 (Kwon *et al.*, 2014). 그러나 앞서 연구한 특허는 추출물의 농도로 인해 피부세포에 대한 독성 또한 확인하지 않아 효과가 있어도 쓰일 수 있는 것인지 알 수 없고, 항장활성에 대한 효과를 한 가지씩 보아 효능에 대한 검증역시 확실하지 않다. 이에 본 연구는 미선나무를 이용하여 주름개선항화 효과를 확인하였다. 연구 논문에서는 처음으로 확인하는 미선나무에 대한 피부주름개선 효과를 확인한 것이다.

본 연구에서는 생산의 증대로 인하여 각 종 생리활성에 대한 새로운 천연물 소재로 관심받기 시작한 미선나무의 가치를 확인하고자 하였다. 피부노화로 인한 주름개선의 소재로서 미선나무의 항산화 효과에 대한 선행 연구를 바탕으로, 종래의 추출방법인 열수 및 에탄올 추출물을 사용하여 미선나무의 주름개선 강화에 대한 효과를 비교하였다 (Park, 2011). 추가적으로, 단단한 미선나무의 특성상 추출 시 활성성분 용출의 어려움이 있을 것으로 판단하여 초음파 진동으로 인해 발생하여 에너지가 천연물에 작용해 충격을 주고 압력을 발생시켜 혼합 효과를 일으킨다고하는 연구 보고가 있다 (Park *et al.*, 2000). 초음파 추출을 실시하여 항산화 활성 또는 주름개선에 대한 효능증진을 보고한 천연물에 대한 기존의 연구 결과를 토대로 초음파 공정을 추가하여 활성의 증진을 돕고자 하였다 (Kim *et al.*, 2014; Choi and Lee, 2014; Jin *et al.*, 2011). 뿐만 아니라, 기존의 추출방법은 높은 온도를 사용하기 때문에 활성물질의 불안정 및 손실을 초래할 수 있어서, 미선나무에 함유되어있는 catechin, chlorogenic acid, coumaric acid 등 각종 성분의 초음파 공정을 통해 용출되는 성분물질함량을 증가시키고 활성의 증진효과를 도모하고자 연구하였다 (Shin and Ahn, 2013; Lee *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005). 초음파 공정 및 저온 추출을 실시함으로써 시간 단축과 온도를 낮춤으로써 추출효율을 높이고, 미선나무 활성물질의 보호 및 용출이 용이할 것으로 기대할 수 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 제조

실험에 사용한 미선나무 잎, 줄기는 국내 자생지인 충청북도 괴산군에서 구입하였다. 미선나무는 3일 간 충분히 말려 건조된 상태의 미선나무 지상부 (잎과 줄기)를 길이 약 3 cm로

잘라 추출 하였다. 열수 추출은 미선나무 잎, 줄기를 증류수에서 100°C 조건으로 24시간 추출하였으며, 70% 에탄올 추출은 80°C에서 24시간 추출하였다. 초음파 70% 에탄올 추출은 140 khz의 초음파 (AUG-R3-900, ASIA ULTRASONIC, Korea) 조건에서 1시간 전 처리 후 60°C에서 12시간 추출하였다. 모든 추출물은 전부 환류 추출로 실시하였다. 추출한 액상은 감압여과기 필터를 이용하여 여과하고, 여과액을 회전감압농축기 (EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 충분히 농축하였다. 농축 후 동결건조기 (PVTFA 10AT, ILSHINBioBase, Dongducheon, Korea)에 3일 간 건조하여 파우더 된 샘플을 실험에 사용하였다.

### 2. 세포 및 시약

인간피부섬유아세포 CCD-986sk는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 구입한 세포를 유동적으로 첨가량을 조절된 fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 포함 된 DMEM 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 그 외 사용된 모든 시약들은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)을 통하여 구입, 사용하였다.

### 3. Elastase 저해 활성 실험

Elastase 효소 저해활성 실험은 Kim 등(2011)의 선행연구를 참고하여, 실험을 진행하였다. pH 8.0의 0.13 M Tris-Cl buffer를 용매로 하여, *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide를 1.0 mM의 농도로 한 용액 950  $\mu$ l 와 미선나무 추출물 및 양성대조군 ursolic acid를 각 농도별로 50  $\mu$ l 를 첨가하여 상온에서 20분 동안 방치하였다. 20분 후 elastase 효소 용액 50  $\mu$ l 를 추가 주입한 뒤 상온에서 다시 20분 동안 방치하였다. 20분 뒤 반응을 종료하고 410 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 저해 활성도를 평가하였다.

### 4. 세포 독성 평가

미선나무 추출물의 세포생존율을 확인하고자 MTT assay를 사용하였다. 피부섬유아세포 CCD-986sk를 사용하였고, 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 96-well plate에 주입한 뒤 부착할 때 까지 incubator에서 배양하였다. 부착 후 배지를 제거하고 미선나무 추출물을 농도별로 200  $\mu$ l 씩 주입하여, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 뒤 추출물을 제거하고, 200  $\mu$ g/ml 농도의 MTT 용액을 150  $\mu$ l 만큼 주입하여 37°C에서 빛을 차단한 채 다시 3시간 동안 배양 한 후, MTT 용액을 제거하였다. PBS로 세척 후 DMSO를 200  $\mu$ l 주입하고 30분 간 반응하여 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 무처리군을 100%로 하여 미선나무 추출물의 세포 생존율을 확인하였다.

### 5. MMP-1 생성량 측정

피부섬유아세포 CCD-986sk 세포를 96-well plate에  $2.0 \times 10^5$  cell/ml 만큼 각 well에 분주하여, 세포가 충분히 부착되도록 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 다음 배지를 제거하고, 농도 별 미선나무 추출물을 처리한 뒤에 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 준비된 MMP-1 키트 Human MMP-1 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, GA, USA)에 있는 plate에 옮겨 처리한 샘플을 100 µl 만큼 주입하여 상온에서 2시간 배양하였다. 2시간 후 처리한 샘플을 제거하고 kit에 준비된 wash buffer를 이용하여 4회 세척한 뒤 detection antibody MMP-1을 100 µl 주입하여 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 1시간 뒤 다시 wash buffer로 4회 세척하고, streptavidin solution을 처리하여 45분 간 상온에서 shaking해준다. 용액 제거 후 한 번 더 wash buffer로 세척하고 substrate reagent를 넣어 30분 동안 빛을 차단하여 실온에 방치하였다. 30분 뒤 50 µl stop solution 넣어 반응을 종결시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고 양성대조군은 retinoic acid를 사용하였으며, 표준품을 이용한 정량곡선을 통해 각 샘플별 MMP-1의 생성량을 확인하였다.

### 6. Collagen 생성량 측정

Procollagen Type I C-peptide (PIP) EIA Kit (Takara, Otsu, Japan)을 이용하여 collagen 생성량을 측정하였다. 피부섬유아세포 CCD-986sk를  $1.5 \times 10^5$ 로 96-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 각 미선나무 추출물 샘플 처리를 한 뒤에 다시 2일 동안 배양하였다. 배양액을 kit에 준비된 plate에 양성대조군 retinoic acid 및 미선나무 추출물 배양액을 총 20 µl가 되게 농도를 달리하여 첨가하고 빛을 차단한 채 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 wash buffer로 4회 반복 세척하고 난 후 substrate solution을 각 well에 넣어 15분 동안 방치하였다. 15분 뒤에 stop solution으로 사용하는 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 각 well에 100 µl을 넣고, 1분 동안 흔들여 준다. 반응을 종결하여, microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준품을 통해 정량하였다.

### 7. DPPH 자유 라디칼 활성 시험

미선나무의 항산화능 측정을 위하여, DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 자유 라디칼 활성평가를 실시하였다. 각 추출물을 농도별로 150 µl을 첨가 후 에탄올로 제조한 0.1 mM DPPH용액 150 µl을 혼합하여, 30분 동안 빛을 차단하여 실온에서 반응하였다. 30분 후 517 nm의 파장에서 흡광도 측정하였다. 항산화 효능의 확인은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 자유 라디칼 소거활성 IC<sub>50</sub>으로 확인하였다.

### 8. HPLC 측정

미선나무 추출물의 지표 성분의 농도를 비교하기 위해 측정 시료의 농도를 각각 1000 ppm로 설정하여 측정하였으며, 분석 장비로는 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1260 series, Agilent Technologies, Santa clara, USA)를 이용하였고, 칼럼은 Jupiter 5u C<sub>18</sub> 3000A (250 × 4.6 mm, Phenomenex, Seoul, Korea)을 사용하였다. 지표 물질로는 coumaric acid (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 ppm으로 사용하였다. 이동상 용매의 조건은 기존의 연구를 참고 및 일부 변형하여, (A) H<sub>2</sub>O (1% acetic acid), (B) acetonitrile: methanol:2% acetic acid (2:2.5:1)하였을 때, 0분에서 11분까지 (A) 100%로 하고, 11분에서 40분까지 (A) 85%, (B) 15%, 40분에서 60분까지 (A) 65%, (B) 35%로 하였다 (Oruh and Zdogan, 2015). 기기에 투입되는 시료의 양은 20 µl로 하고 유속은 1 ml/min으로 하였으며, 280 nm 파장에서 측정하여 실험을 진행하였으며 지표 물질의 peak 면적을 기준으로 각 추출물 내 존재하는 지표 성분의 농도를 계산했다.

### 9. 통계처리

모든 실험의 데이터 통계처리는 3회 반복하였으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 통하여 two-way ANOVA법으로 처리하였다. 처리구간의 최소 유의 수준의 차는  $p < 0.05$ 로 처리 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 1. 세포 생존율 확인

피부섬유아세포를 이용하여 미선나무추출물의 세포 생존율을 확인하였다 (Table 1). 생존율은 무처리군의 생존율을 100%로 하였을 때 각 추출물의 세포 수 비율로 비교하여 측정하였다. 열수, 70% 에탄올 그리고 초음파 70% 에탄올의 최저 세포 생존율은 각각 91.12%, 85.52%, 85.33%로 높은 세포 생존율을 보여, 세포 실험에 있어 해당 농도 내에서 독성이 없을 것으로 판단되므로 세포 실험을 진행하였다.

#### 2. Elastase 저해 활성 평가

미선나무 추출물의 주름개선에 대한 효과를 확인하기 위하여 elastase 효소 저해 활성 평가를 진행하였으며, 결과는 Fig. 1에 표시하였다. 열수 추출물은 0.3 mg/ml의 농도에서 12.80%로 낮은 활성 값을 보였으며, 농도 의존적이지 못했다. 70% 에탄올 추출물은 최고 농도에서 22.01%로 열수 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었으며, 농도의존적으로 활성 값이 증가하였다. 마찬가지로 초음파 전처리 샘플 또한 농도에 따라 활성 값이 증가하였으며, 0.3 mg/ml에서 25.32%로 70% 에탄

**Table 1.** Comparison of cell viability by extraction processes in *Abeliophyllum distichum* Nakai.

Cell viability (%)	0.1 mg/ml	0.2 mg/ml	0.3 mg/ml
WE**	101.48 ± 3.85 <sup>Aa</sup>	93.76 ± 4.97 <sup>Ba</sup>	91.12 ± 2.28 <sup>Ba*</sup>
EE***	98.20 ± 4.73 <sup>Aa</sup>	85.52 ± 3.80 <sup>Bb</sup>	86.67 ± 5.12 <sup>Bb</sup>
UE****	105.26 ± 4.01 <sup>Aa</sup>	86.22 ± 2.81 <sup>Bb</sup>	85.53 ± 3.13 <sup>Bb</sup>

\*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Means with the difference letter (A-B) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$  and means with the difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . \*\*WE; Water Extract. \*\*\*EE; 70% Ethanol Extract. \*\*\*\*UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.

**Table 2.** Comparison of DPPH free radical scavenging activities by extraction processes in *Abeliophyllum distichum* Nakai.

Sample	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
WE**	138.3 ± 8.8 <sup>A*</sup>
EE***	76.7 ± 3.6 <sup>B</sup>
UE****	70.5 ± 1.7 <sup>C</sup>
Ascorbic acid	37.2 ± 0.6

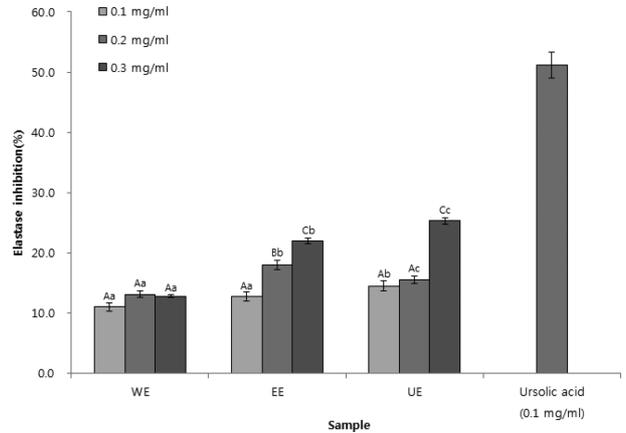
\*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Means with the difference letter (A-C) are significantly different at  $p < 0.05$ .

\*\*WE; Water Extract. \*\*\*EE; 70% Ethanol Extract. \*\*\*\*UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.

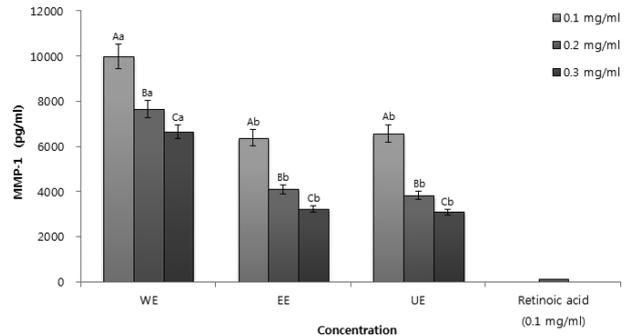
을 추출물에 비해 값이 증가하였음을 확인할 수 있다. 양성대조군으로 쓰인 ursolic acid는 51.16%의 elastase 저해율로 미선나무 추출물에 비해 높은 수치를 보였으나, 주름개선효과에 대해 연구 보고한 오가피 열매의 elastase 저해 활성의 경우 비슷한 60% 에탄올 추출물에서 22.4%의 활성을 보여 (Jo and Cho, 2012), 비슷한 값을 보이는 미선나무 추출물 역시 주름개선효능이 있음을 알 수 있었다.

**3. MMP-1 생성량 확인**

Collagen을 분해하는 효소 MMP-1의 생성량을 미선나무 추출물을 처리하여 확인함으로써 미선나무 추출물의 주름개선 활성 정도를 확인하였다. Fig. 2을 보면, 모든 추출용매별 미선나무 샘플에서 농도가 증가함에 따라 생성량이 감소하는 양상을 보여 MMP-1 저해에 대한 활성을 확인하였다. 양성대조군으로 쓰인 retinoic acid의 경우 113.6 pg/ml의 MMP-1생성량을 보였으며, 미선나무 추출물은 앞의 실험결과와 마찬가지로 열수 추출물은 최대농도에서 MMP-1 생성량이 6640.8 pg/ml로 측정되었고, 70% 에탄올 추출물은 3240.6 pg/ml의 MMP-1 생성량을 보여 70% 에탄올 추출물의 주름개선효능이 높게 측정되었다. 초음파 전처리 샘플의 경우 70% 에탄올 추출물보다 MMP-1에 대한 저해활성이 높았으나, 차이는 오차 범위 내로 큰 차이는 없었다. 미선나무 추출물의 MMP-1 생성량은 주름



**Fig. 1.** The inhibitory effect on elastase activities by extraction processes in *Abeliophyllum distichum* Nakai. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Means with the difference letter (A-C) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$  and means with the difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . WE; Water Extract, EE; 70% Ethanol Extract, UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.



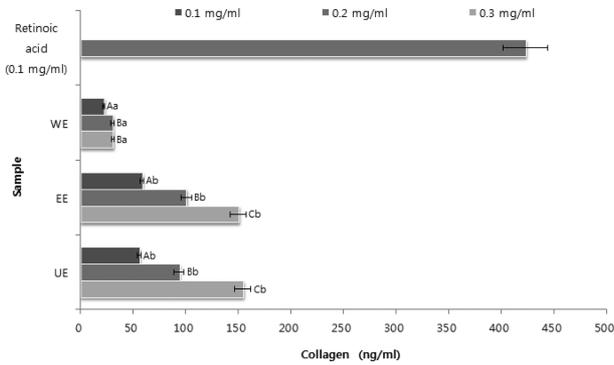
**Fig. 2.** The inhibitory effect on MMP-1 production by extraction processes in *Abeliophyllum distichum* Nakai. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Means with the difference letter (A-C) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$  and means with the difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . WE; Water Extract, EE; 70% Ethanol Extract, UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.

개선 효능에 대해 연구한 초음파 처리 아로니아 추출물과 비교하였을 때, 아로니아 추출물은 미선나무 추출물과 동일 농도 구간에서 6000~10000 pg/ml로 미선나무 추출물의 MMP-1 생성량이 낮아, 주름개선에 대한 효능을 확인 할 수 있었다 (Kim et al., 2014).

**4. Collagen 생성량 확인**

Collagenase인 MMP-1 생성량에 이어 추가적으로 collagen 생성량을 정량하여 Fig. 3에 확인하였다. 양성대조군인 retinoic

## 미선나무 추출물의 항주름 효과



**Fig. 3. Comparison of collagen productions by extraction processes in *Abeliophyllum distichum* Nakai.** Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. Means with the difference letter (A-C) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$  and means with the difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . WE; Water Extract, EE; 70% Ethanol Extract, UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.

acid의 collagen 생성량은 423.1 ng/ml로 확인되었다. 미선나무의 경우 열수 추출물은 가장 높은 농도에서 최대 31.2 ng/ml의 생성량이 측정되었고, 70% 에탄올 추출물이 150 ng/ml로 열수 추출에 비해 월등히 높은 collagen 생성량을 나타내었다. 초음파 추출물은 70% 에탄올 보다 높은 collagen 생성량이 확인되었으나, 이 역시 오차범위 내로 차이가 없었다. 양성대조군에 비해 다소 낮은 수치가 확인되었으나, 측정된 미선나무 추출물의 collagen 생성량은 기준에 항주름 효과에 대해 연구 보고된 아로니아 추출물 및 포도와 오이즙액을 이용한 동충하초 균사체의 collagen 생성량과 비교하였을 때, 비슷한 농도에서 아로니아 및 동충하초 균사체의 생성량은 100-180 ng/ml로 비슷한 collagen 생성량이 확인되었다 (Kim *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2006). 이와 같은 결과는 미선나무 추출물 역시 주름개선에 대해 다른 천연물 이상으로 효과가 있음을 확인할 수 있다.

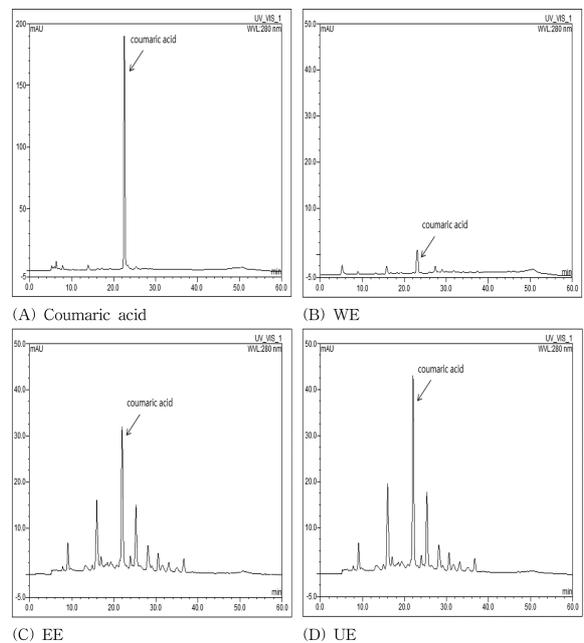
## 5. DPPH free radical scavenging activity

상기와 같은 미선나무의 주름개선 효능에 대한 결과를 기준에 보고된 항산화와 항주름의 관계를 검증하기 위하여, DPPH 자유 라디칼 소거활성에 대한  $IC_{50}$  확인하였다. 열수 추출물의  $IC_{50}$ 값은 138.3  $\mu$ g/ml로 확인되었고, 70% 에탄올 추출물의 경우 76.7  $\mu$ g/ml의  $IC_{50}$ 값이 확인되었다. 열수 추출물보다는 70% 에탄올 추출물에서 더 좋은 항산화 활성을 보였으며, 초음파 전처리한 70% 에탄올 추출물의 경우 70.5  $\mu$ g/ml의  $IC_{50}$ 값이 측정되어, 항산화 효능의 증진을 확인할 수 있었다. 이전의 주름개선 관련 실험들과 비교해보면 라디칼 소거능에 대한 효과가 높을수록 주름개선에 대한 활성정도가 높은 것을 확인할 수 있다. 이와 같은 결과는 주름개선

효과에 항산화가 연관이 있음을 시사하며, 서론에서 언급한 항산화와 주름개선 관련 이전의 연구들의 주장을 뒷받침 할 수 있는 자료가 될 수 있다 (Pentland *et al.*, 1995).

## 6. HPLC 측정

앞의 모든 결과들에서 초음파 추출물 (UE)이 다른 추출 공정으로 얻어진 추출물들에 비해 높은 활성을 보이는 이유를 확인하기 위해, 각 추출물들을 HPLC로 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 미선나무에 존재하는 coumaric acid의 정량 결과 열수 추출물의 경우 0.9 mg/100 g로 측정되었으며, 70% 에탄올 추출물에서는 12.6 mg/100 g이 계산되어 물보다는 에탄올 용매에서 더 높은 용출량을 나타냈다. 이에 비해 초음파 공정을 통해 얻어진 추출물의 경우, 지표 성분인 coumaric acid의 농도가 16.3 mg/100 g로 계산되어 통상적인 추출 공정인 70% 에탄올로 추출한 경우보다 60°C의 저온임에도 불구하고 30%에 가깝게 용출량이 증진되는 것이 확인되었다. 또한 기준에 보고된 미선나무의 coumaric acid 함량인 8.1 mg/100 g보다도 (Yoo and Kim, 2001) 많은 양이 추출될 수 있다는 것이 입증되었다. 이로써 초음파 저온 추출 공정을 이용함으로써 목적하는 물질들의 용출량에 대한 획기적 증진과 함께, 고온 추출 시 야기 될 수 있는 유용 성분들의 파괴 및 변성의 가능성이 줄어 초음파 추출물의 생리 활성이 높아진 결과의 설명이 가능하다. 또한 초음파로부터 발생되는 파장 진동에 의



**Fig. 4. HPLC chromatograms of the extracts of *Abeliophyllum distichum* Nakai obtained from different extraction processes.** WE; Water Extract, EE; 70% Ethanol Extract, UE; 70% Ethanol Extract with ultrasonic extraction.

한 높은 에너지에 따른 공동현상으로 천연물에 상대적으로 높은 압력이 가해져 목적하는 유용 성분외에 기타 미량의 성분들의 용출량도 같이 증가해 이들 성분들의 시너지 효과에 의해 미선나무 초음파 추출물의 향장 활성 증진에도 기여했다고 유추할 수 있다 (Park *et al.*, 2000).

기존에 항산화 효과에 대해 보고된 바 있는 coumaric acid의 용출량이 초음파 추출 공정을 통해 획기적으로 증진된 결과를 활성산소와 피부 주름 억제기능과의 연관성에 관한 보고들과 비교하면, 본 실험에서 초음파 추출물의 주름 개선 활성이 일관성 있게 증진된 결과들을 뒷받침하고 있다 (Pentland *et al.*, 1995; Wee *et al.*, 1989; Yoo and Kim, 2001; Lee, 2011). 이로써 본 미선나무의 향장 활성 실험 결과는 근래 대량생산에 성공하여 다양한 분야에 활용 될 수 있는 미선나무에 대해, 상대적으로 연구가 미흡한 주름 개선 활성을 확인하였을 뿐만 아니라 (Kwon *et al.*, 2014), 상기와 같은 연구의 결과는 천연 화장품 소재로서 미선나무의 상업화 가능성을 입증하였고, 국내에서만 자생하는 미선나무의 특성을 살려 생산 기술의 발달로 점차 생산성이 증가하게 되면, 천연추출물의 생리활성분야에서 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 사료 된다. 또한, 미선나무를 이용한 화장품 소재 개발 뿐만 아니라 미선나무를 이용하여 다른 생리 활성도 확인하여 미선나무자체의 가치를 증대시킬 수 있을 것으로 보인다.

## REFERENCES

- Choi WY and Lee HY.** (2014). Enhancement of antioxidant activities of *Curcuma longa* leaves by ultra high pressure extraction. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:121-126.
- Coruh N and Ozdogan N.** (2015). Identification and quantification of phenolic components of *Rosa heckeliana* Tratt roots. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 38:569-578.
- Jang MJ, Jun DH, Kim SH, Han SI and Lee JT.** (2013). Anti-wrinkle effect of chestnut leaf. Journal of Life Science. 23:751-756.
- Jo BS and Cho YJ.** (2012). Biological activity of extracts from *Acanthopanax sessiliflorum* fruit. Korean Journal of Food Preservation. 19:586-593.
- Kim JE, Kim AR, Kim MJ and Park SN.** (2011). Antibacterial, antioxidative and antiaging effects of *Allim cepa* peel extracts. Applied Chemistry for Engineering. 22:178-184.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Kim CH, Kwon MC, Seong NS, Lee SE and Lee HY.** (2005). Immuno-regulatory activities of various from *Ephedrae sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai extracts with ultrasonification. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 13:161-170.
- Kim NY, Kim JH, Choi GP and Lee HY.** (2014). Comparison of anti-skin wrinkle activities of *Aronia melanocarpa* extracts by extraction methods. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:217-222.
- Kwon SB, Kang HJ, Kim MJ, Kim JH, Shin HS and Kim KS.** (2014). Analysis on the components and safety evaluation of *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves and stems. Korean Journal of Environmental Health. 40:234-244.
- Lee NN, Choi YE and Moon HK.** (2014). Effect of leds on shoot multiplication and rooting of rare plant *Abeliophyllum distichum* Nakai. Journal of Plant Biotechnology. 41:94-99.
- Lee GD.** (2011). Antioxidative activity of a medicinal herb mixture prepared through the traditional antidiabetic prescription. Korean Journal of Food Preservation. 18:916-922.
- Lee GH, La IJ, Cho HJ, Yea MJ, Kim SB, Park JY and Kim SH.** (2009). Changes in quality characteristics of green tea beverage pet during high temperature storage. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:98-104.
- Lee TB.** (1990). Conservation of threatened plants in Korea. Bulletin of the Arboretum Seoul National University. 3:190-196.
- Lee YH.** (2006). Anti-wrinkle effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. Journal of Life Science. 16:516-521.
- Park JH.** (2011). Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of extracts from *Abeliophylli distichi* Folium. The Korea Journal of Herbology. 26:95-99.
- Park KA, Hong IK, Kim WI and Jeong KW.** (2000). Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. Applied Chemistry. 4:149-152.
- 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 E<sub>2</sub> synthesis. Journal of Investigative Dermatology. 104:52-57.
- Shin JH and Ahn YG.** (2013). Simultaneous determination for the contents of caffeine and chlorogenic acid in coffee beans. The Korean Journal of Community Living Science. 24:5-12.
- Wee JJ, Park, JD, Kim MW and Lee HJ.** (1989). Identification of phenolic antioxidant components isolated from *Panax ginseng*. Journal of Korean Agricultural Chemistry Society. 32:50-56.
- Yoo YK and Kim KS.** (2001). Germination inhibitors in the seed coat of white forsythia(*Abeliophyllum distichum* Nakai). Korean Journal of Horticultural Science and Technology. 42:6-10.