

황기추출물의 항노화 효과

김 미 진 · 임 경 란 · 정 택 규 · 윤 경 섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소
(2007년 2월 26일 접수, 2007년 3월 5일 채택)

Anti-aging Effect of *Astragalus membranaceus* Root Extract

Mi Jin Kim, Kyung Ran Lim, Taek Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon[†]

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 805-5, Gyesan-ri, Yeongdong-eup, Yeongdong-gun, Chungbuk 370-802, Korea
(Received February 26, 2007; Accepted March 5, 2007)

요약: 예로부터 황기는 민간에서 강장제로서 인삼 다음의 보약으로 쓰이고 있다. 본 연구에서는 황기의 성분 중 플라보노이드 화합물로 알려진 calycosin과 formononetin을 유효성분으로 함유하는 황기추출물의 항노화 효과에 대해 알아보았다. Calycosin과 formononetin의 함량은 효소처리 추출방법에 따라 차이가 있었으며, 두 가지 성분들의 함량에 따라 항산화효과 및 tyrosinase 활성 저해효과가 다르게 나타났다. 이러한 연구 배경으로 calycosin과 formononetin을 유효성분으로 함유하는 황기추출물의 피부 주름개선 효과를 알아보기 위해 콜라겐 발현효과 및 MMP-1 발현 억제효과를 각각 측정하였다. 그 결과 황기추출물의 콜라겐 합성은 증가하였으나, MMP-1 발현 저해효과는 크지 않았다. 또한 0.1% 황기추출물 함유 크림은 대조군에 비하여 피부주름 개선효과를 나타냈다. 이러한 결과를 볼 때 황기추출물은 주름개선용 기능성화장품 신소재로의 응용이 기대된다.

Abstract: *Astragalus membranaceus* root extract (ARE) contains saponins, flavonoids, and their glycosides. Two flavonoids, calycosin and formononetin, were predominant constituents with the different amount by diverse extraction conditions. ARE showed the anti-oxidative activities, inhibited tyrosinase activity, and increased type I procollagen expression in proportion to calycosin and formononetin contents. The clinical study also showed that skin wrinkles were significantly reduced in the test group treated with a cream formulation containing 0.1% ARE compared with a group treated with a cream formulation without 0.1% ARE ($p < 0.05$). These results suggest that ARE may have potential as an anti-aging ingredient in cosmetics.

Keywords: *Astragalus membranaceus* root extract, calycosin, formononetin, anti-oxidative, tyrosinase activity, type I procollagen, anti-aging

1. 서 론

황기(*Astragali Radix*; *Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과(Legumiosae)에 속하는 다년생 초본식물인 단너삼 *Astragalus membranaceus* Bunge의 뿌리로 기타 다른 *Astragalus*속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것이며, 우리나라에서는 예부터 민간에서 강장제로서 인삼 다음의 보약으로 쓰이고 있다[1,2]. 한방에서는 보중익기탕, 가미대보탕 등 수백 개의 처방에 황기가 포함된다. 한국, 중국, 몽고 등의 아시아 지역과 유럽 및 아프리카의 일부 지역에 널리 분포하며, 신체허약, 익기, 강장 등의

효능을 갖는 보약으로서 많이 사용되고 있는 약재이다[3]. 황기의 생리활성 작용은 혈압강화작용, 이뇨작용, 강장작용, 면역증강작용, 항염작용 등이 보고된 바 있다[4-7].

황기의 주요성분으로는 triterpenoids, isoflavonoids, polysaccharides 등이 알려져 있으며 그 밖에 다양한 성분들이 포함되어 있는 것으로 보고된 바 있다[8]. 황기에 포함된 triterpenoids 성분은 astragalosides와 같은 saponin류의 배당체가 주로 포함되어 있는 것으로 알려져 있다[9]. 또한 isoflavonoids 성분은 formononetin과 calycosin이 대표적이며 두 성분의 배당체, 그리고 (6R, 11R) 3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside와 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O- β -D-glucoside의 6가지 성분이 주요 성분으로 보고된 바

[†] 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@hanmail.net)

있다[10-14]. Isoflavonoids 성분은 에스트로겐 유사활성을 지니고 있는 피토에스트로겐(phytoestrogen) 성분으로서 제니스테인(genistein), 세로토닌(serotonin) 유도체, 리그난(lignan) 등이 알려져 있으며, 이들은 항산화효과, 미백 및 주름개선 등의 노화방지 효과를 가지고 있으며, 천연물에서 추출되어 화장품 원료로서 응용되고 있다[15-17].

본 연구에서는 다양한 효소처리 추출방법을 이용하여 황기로부터 isoflavonoids의 일종인 calycosin과 formononetin을 유효성분으로 함유하는 황기추출물을 분리, 농축하여 항산화효과, 미백 및 주름개선 효과 등을 평가하여 항노화를 위한 기능성화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에서 사용한 황기는 충북 제천에서 유래한 황기 1년 근을 이용하였으며, 거피 및 절단된 상태로 구입하여 사용하였다. 황기의 추출과정에 사용된 용매들은 시약급을 구입하여 그대로 사용하였다. 황기추출물에 포함된 생리활성 성분 중 지표성분은 calycosin (Chromadex, USA)과 formononetin (Fluka, USA)을 사용하였다. 추출과정에 사용되는 효소는 상업적으로 판매되어 사용하고 있는 viscozyme L (100 FBG/g, Novo Nordisk Co., Denmark), celluclast 1.5 LFG (700 EGU/g, Novo Nordisk Co., Denmark), pectinex 100 L (5,000 FDU/mL, Novo Nordisk Co., Denmark)를 이용하였다. Viscozyme L은 arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase 등을 포함한 탄수화물 분해효소이며, celluclast 1.5 LFG는 셀룰로오스 분해효소이다. 또한, pectinex 100 L은 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase를 주성분으로 하는 펙틴 분해효소이다.

세포주는 사람 섬유아세포(normal human fibroblast)를 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Omega사의 것을, 배양용 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)는 Jeil Biotechservices Inc.의 것을 사용하였다.

2.2. 황기추출물의 제조 및 분석

2.2.1. 황기추출물의 제조

거피 및 절단된 황기 약재 50 g를 분쇄한 후, 75% 에탄올 수용액 500 mL을 가하여 60 ~ 90°C에서 2 h 동안 가열추출하고 여과하였다. 이 추출 과정을 2회 반복하고 농축하여 조추출물 10 g를 얻었다. 이 조추출물을 10%

Table 1. Various Combined Enzymes of *Astragalus Membranaceus* Root Extract Process

No. of extracts	Enzymes
# 1	Non
# 2	Viscozyme
# 3	Pectinex
# 4	Celluclast
# 5	Viscozyme + pectinex
# 6	Viscozyme + celluclast

Table 2. Gradient Elution Condition for HPLC Analysis

Time (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
5	25	75
10	50	50
20	70	30
30	100	0
40	10	90

에탄올수용액 400 mL에 다시 용해시키고 Table 1과 같은 구성으로 효소를 가하여 40 ~ 70°C에서 20 h 진탕 배양하였다. 여기에 증류수 100 mL을 가하고 추출용액과 동량의 에틸아세테이트를 가하여 분획·농축하였다.

2.2.2. HPLC를 이용한 황기추출물의 분석

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

HPLC 분석 조건으로 크로마토그래피는 Agilent Technologies 1200 series HPLC를, 컬럼은 YMC-Pack Pro C18 (5 μ m, 4.6 I.D. \times 50 mm), 검출기는 자외부 흡광광도계로 측정과장은 260 nm로 하였다. 유속은 1.0 mL/min이며 이동상은 용매 A (0.1% acetic acid in acetonitrile), 용매 B (0.1% acetic acid in water)를 기울기 용매로 하여 Table 2의 조건에 따라 실시하였다.

2.3. 황기추출물의 항산화효과 평가

2.3.1. 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 시험은 안정한 자유라디칼 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma, USA)을 사용하는 방법[18]으로 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL에 Table 1에 나와있는 효소 #1 ~ 6로 추출하여 얻은 각각의 시료를 메탄올에 녹여 적당한 농

도로 제조하여 첨가하였다. 그리고 실온에서 10 min간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액과 DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 소거율(%)은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.3.2. 활성산소 소거효과 측정

활성산소(reactive oxygen species) 소거활성(SOD activity) 평가는 Noro 등의 방법[19]을 활용하여 xanthine/xanthine oxidase (Sigma, USA) 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (Sigma, USA), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, BSA (bovine serum albumin, Sigma, USA), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25°C에서 10 min간 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25°C에서 20 min간 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂ (Sigma, USA)를 넣어 반응을 정지시키고 UV-VIS spectrophotometer로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였다.

2.4. Tyrosinase 활성 억제효과 측정

Tyrosinase는 생체 내에서 tyrosine이라는 물질의 산화 과정을 촉진하여 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소이다. 본 실험은 이 효소의 기능을 억제하여 tyrosine이 산화되어 멜라닌이라는 흑색의 고분자를 형성하는 것을 억제하는 정도를 측정하는 방법[20]을 응용하였다. 시료 0.9 mL, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 mL, 1.5 mM L-tyrosine 1.0 mL을 넣은 후, 37°C에서 10 min동안 유지시켰다. Mushroom tyrosinase (1,500 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 10 min간 반응시킨 후, UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.5. 사람 섬유아세포 증식효과 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) 정량은 Mosmann의 방법[21]을 변형하여 실시하였다.

Table 3. Evaluation Creatia for Marking of Human Patch Test

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

사람 섬유아세포를 1.0 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 15 h 정도 배양한 후, 각 well에 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 황기추출물을 처리하여 CO₂ 배양기에서 24 h 더 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 µL을 첨가하고 4 h 후 상등액을 제거하고 150 µL의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)를 첨가한 후 540 nm에서 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포증식율}(\%) = \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도} - \text{대조구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.6. 콜라겐 합성을 증가효과와 비교물질로 비타민 C와의 비교

배양한 normal human fibroblast에 시료 처리하여 24 h 배양한 배지를 96-well microplate에 분주하여 4°C에서 하룻밤 코팅하였다. PBS-T (0.05% Tween 20/phosphate buffered saline)로 3회 세척하고 블로킹 용액(5% skim milk, Fluka, USA)으로 37°C에서 1 h 동안 블로킹하였다. Mouse anti-collagen type I를 PBS-T에 희석하여 100 µL씩 분주하고, 37°C에서 2 h 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후, anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 PBS-T에 희석하여 100 µL씩 분주하고, 37°C에서 2 h 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음, alkaline phosphatase substrate solution을 100 µL씩 넣고 실온에서 발색시킨 후, ELISA reader (EL800, BIO-TEK Instruments, Inc., USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값을 총단백질로 보정하였다.

2.7. 피부안전성 시험

황기추출물에 대한 피부안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아

Table 4. Evaluation Criteria of Skin Reactions

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

보기 위하여 인체척포시험을 실시하였다.

피험자로 20세 이상 50세 이하의 건강한 성인 남, 여 30명을 선정하였고, 척포시험은 대상자 상박 내측에 척포를 부착하였으며, 48 h이 지난 후 척포를 제거하였다. 약 60 min간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 척포 부착 후 96 h이 경과한 후 2차 판독을 시행하였다. 판정기준은 Table 3에 나타내었다.

척포 부착 후 48 h과 96 h에 판독한 결과의 피부반응도를 아래의 식에 따라 계산하였다.

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

상기 계산식에 의해 계산되는 피부반응도를 미리 정한 다음의 Table 4의 판정기준에 준하여 각 시료의 피부반응도를 판정하였다.

2.8. 황기추출물 함유 크림의 피부 주름개선 효과

본 실험은 병력조사 및 피부상태 진단을 통해 시험목적에 적합한 35세 이상의 여성 20명을 선정하고, 선정된 피험자들을 무작위(randomization) 방식으로 시험품(황기추출물 0.1% 함유 크림)과 대조품(함유하지 않은 크림) 각각을 좌우로 할당하여 12주간 정하여진 부위(양쪽 눈가)에 사용하게 하였다. 제품 사용 4주, 8주, 12주 후 시점에서 대조군과 시험군 눈꼬리 부근 주름의 육안 평가와 facial stage DM-3을 이용한 사진 촬영 및 Skin Visiometer SV600 (Courage-Khazaka Electronic, Germany)을 이용한 R-value 측정, 설문에 의한 피험자의 주관적 평가 방법을 실시하여 제품의 주름개선 상태를 평가하였고, 피험자의 설문 작성과 시험자의 관찰, 질의응답을 통해 주관적 피부 자극감과 객관적 피부자극을 평가하였다. R-value의 값이 작아질수록 피부주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며 단위는 임의의 단위(arbitrary unit)를 나타낸다. 육안평가 자료 및 기기평가 자료는 SPSS 11.5의 반복측정 분산분석법(Repeated Measures ANOVA)을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

Table 5. Quantity of the Calycosin and Formononetin from *Astragalus membranaceus* Root Extracts

No. of extracts	Calycosin ^a (%)	Formononetin ^b (%)
# 1	0.65	0.61
# 2	5.75	2.95
# 3	3.29	1.96
# 4	4.49	2.27
# 5	5.99	2.73
# 6	6.37	2.76

^a Calycosin content in dried powder of *Astragalus membranaceus* root extract

^b Formononetin content in dried powder of *Astragalus membranaceus* root extract

△R1 : Skin roughness, 최고 주름의 포인트와 최저 주름 포인트와의 거리

△R2 : Maximum roughness, 주름을 자동적으로 5개로 분할하여 각각 R1을 구한 후 분할된 주름 중에서 가장 높은 R1 값

△R3 : Average roughness, 5개로 분할하여 얻은 R1 값의 평균값

△R4 : Arithmetic average roughness, R5에 대한 평균값

△R5 : Smoothness depth, 기준 profile 위로 최고 주름 선까지 선을 그어 중앙값으로 분리했을 때 윗부분의 크기

3. 결과 및 고찰

3.1. 황기추출물의 Calycosin과 Formononetin 함량 분석

Table 1의 조건에 따른 추출방법으로 얻어진 황기추출물의 calycosin과 formononetin 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 황기추출물들의 플라보노이드 화합물인 calycosin과 formononetin의 함량 비율이 다르게 나타났다(Table 5). 추출방법에 따른 비교는 효소를 처리한 추출물에서 처리하지 않은 추출물에 비해 calycosin과 formononetin 함량은 4 ~ 5배 정도 증가하였다. 효소 종류별 비교는 pectinex나 celluclast를 단독으로 처리한 추출물보다 viscozyme을 단독으로 처리한 추출물에서 두 화합물 함량이 높게 나타났다. 복합효소 처리에 따른 비교는 viscozyme + pectinex 처리 추출물보다 viscozyme + celluclast 처리 추출물에서 calycosin 함량은 약간 높았으며, formononetin의 함량은 유사하였다. Calycosin의 경우, 단독처리 추출물군보다 복합처리 추출물군에서 다소 높은 함량을 보였으나, formononetin 함량에는 변화가 없었다.

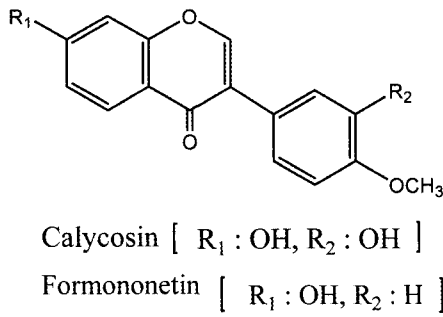


Figure 1. Chemical structures of calycosin and formononetin.

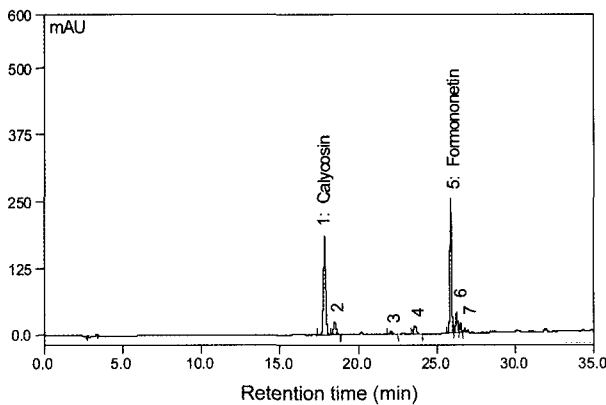


Figure 2. HPLC chromatogram of *Astragalus membranaceus* root extract.

이러한 결과로 볼 때, 황기추출물에는 formononetin 배당체보다 calycosin의 배당체가 좀 더 많이 존재함을 예상할 수 있었다. 황기추출물에 함유된 플라보노이드 화합물인 calycosin의 화학구조를 Figure 1에 나타내었으며, HPLC 크로마토그램은 Figure 2에 나타내었다.

3.2. 황기추출물의 항산화효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다. 추출방법에 따른 자유라디칼 소거효과는 viscozyme, pectinex, celluclast 단독처리 추출물은 자유라디칼 소거율 50% 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도인 IC₅₀ 값이 각각 0.38, 0.40, 0.40 mg/mL로 0.70 mg/mL의 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 2배의 소거효과를 나타내었다. Viscozyme + pectinex, viscozyme + celluclast 처리한 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 0.23, 0.28 mg/mL로 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 3배의 소거효과를 나타내었으며, 단독처리 추출물보다도 다소 좋은 효과를 보였다(Table 6).

Table 6. Anti-oxidative Effect of *Astragalus Membranaceus* Root Extract

No. of extracts	IC ₅₀ ^a	
	DPPH scavenging activity (mg/mL)	SOD activity (mg/mL)
# 1	0.696	1.013
# 2	0.382	0.387
# 3	0.400	0.587
# 4	0.400	0.563
# 5	0.230	0.340
# 6	0.284	0.223

^a IC₅₀ : Concentration of the sample required for 50% the radical to be scavenged

Table 7. Inhibitory Effect of *Astragalus Membranaceus* Root Extract on Mushroom Tyrosinase Activity

No. of extracts	IC ₅₀ ^a (mg/mL)
# 1	0.733
# 2	0.096
# 3	0.099
# 4	0.066
# 5	0.079
# 6	0.073

^a IC₅₀ : Concentration of the sample required for 50% the activity to be inhibited

추출방법에 따른 활성산소 소거효과는 viscozyme, pectinex, celluclast 단독처리 추출물은 활성산소 소거율 50% 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도인 IC₅₀ 값이 각각 0.39, 0.59, 0.56 mg/mL로 1.01 mg/mL의 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 2.5배의 소거효과를 나타내었다. Viscozyme + pectinex, viscozyme + celluclast 처리한 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 0.34, 0.22 mg/mL로 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 3.5배의 소거효과를 나타내었으며, 단독처리 추출물보다도 우수한 효과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때, calycosin과 formononetin의 함량이 높을수록 항산화효과가 우수함을 알 수 있었다 (Table 6).

3.3. Tyrosinase 활성 저해효과

추출방법에 따른 tyrosinase 활성 저해효과는 viscozyme, pectinex, celluclast 단독처리 추출물은 tyrosinase 활성 저해율 50%를 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도 IC₅₀ 값이 각각 0.096, 0.099, 0.066 mg/mL로 0.733 mg/mL의 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 10배의 활성저해효과를 나타내었다. Viscozyme + pectinex, viscozyme

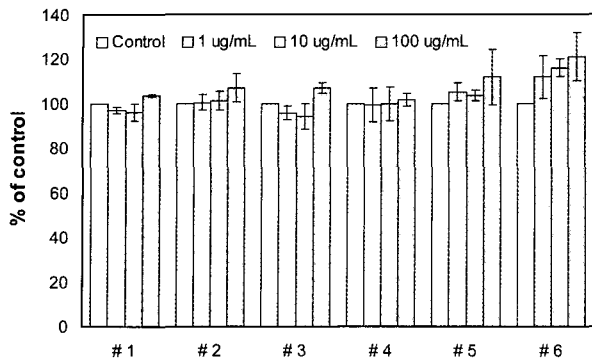


Figure 3. Relative cell viability of *Astragalus membranaceus* root extracts on human dermal fibroblast by MTT assay. The cells were treated with various concentration of samples for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples.

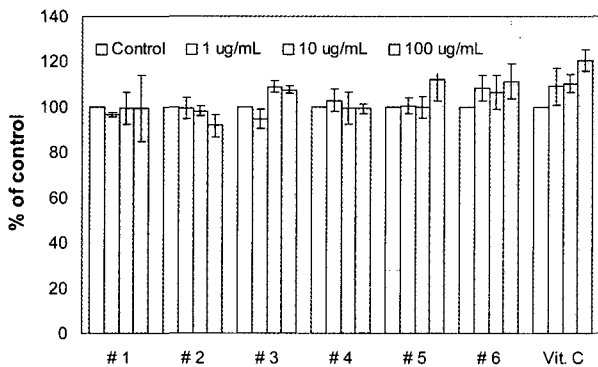


Figure 4. The effect of *Astragalus membranaceus* root extracts on the production type I procollagen.

+ celluclast 처리한 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 0.079, 0.073 mg/mL로 효소를 처리하지 않은 추출물에 비해 약 10배의 활성저해효과를 나타내었으며, 단독처리 추출물보다도 비슷한 효과를 보였다. 항산화효과에서와 마찬가지로, tyrosinase 활성 저해효과도 황기추출물 고형분에 함유된 calycosin과 formononetin의 함량에 비례하여 우수한 효과가 나타났다(Table 7).

3.4. 섬유아세포 증식효과

시험 시료들의 섬유아세포에 미치는 영향 및 세포독성과 더불어 시험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. 황기추출물은 농도 100 µg/mL 이하에서는 농도 의존적으로 섬유아세포의 증식효과를 보였으며, 앞선 실험 결과와 마찬가지로 calycosin과 formononetin의 함량이 높은 추출물에서 섬유아세포 증식효과를 보였다(Figure 3).

Table 8. Skin Irritation Index of *Astragalus membranaceus* Root Extract

Sample	48 h		96 h		Response (%)		
	+	++	+	++	48 h	96 h	Average
ARE (0.1 % in 1,3-BG)	-	-	1	-	0.00	0.56	0.28

3.5. Collagen 생합성효과

Type I collagen의 합성을 증가효과를 알아보기 위하여 섬유아세포에 황기추출물 및 vitamin C를 처리하여 24 h 후에 배양액을 취하여 enzymelinked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였다. 실험 결과, 황기추출물의 처리농도가 1, 10, 100 µg/mL 농도 내에서 콜라겐 생합성을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었으며, calycosin과 formononetin 함량에 의존적으로 증가함을 보였다(Figure 4).

3.6. 피부주름 개선효과

황기추출물을 함유한 제품에서의 주름 개선효과를 측정하기 위하여 제품 사용전과 사용 4주, 8주, 12주 후 시점에서 Skin Visiometer SV600을 이용하여 피부주름을 측정하였다. 각 시점 별 측정된 R-value 분석을 통해 피부주름 개선정도를 평가하였다.

주름 측정 parameter인 ΔR1 ~ ΔR5 측정 결과를 보면, ΔR1은 제품 사용 8주 후와 12주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, ΔR2는 제품 사용 4주 후, 8주 후 및 12주 후 시점에서, ΔR3은 제품 사용 12주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Figure 5).

3.7. 피부자극 평가

피험자 30명에 대하여 실시한 인체첨포시험의 검사 결과에 근거하여 계산된 피부반응도를 Table 8에 나타내었다. 시험 결과, 황기추출물 0.1%에 대한 피부반응도는 0.28로 Table 4의 피부반응도 판정기준에 의하여 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다.

4. 결 론

황기는 국내에서 많이 생산되고 있으며, 예로부터 강장제로서 인삼 다음의 보기약으로 널리 쓰이고 있는 약재이다. 본 연구에서는 다양한 효소처리 추출방법을 이용하여 황기의 성분 중 플라보노이드 화합물의 일종인 calycosin과 formononetin을 유효성분으로 하는 황기추출물을 제조하여 항산화효과, 미백 및 주름개선 효과와 같은 효능에 대한 평가를 통하여 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. 다양한 추출방법으로 얻어진 황기추출물은

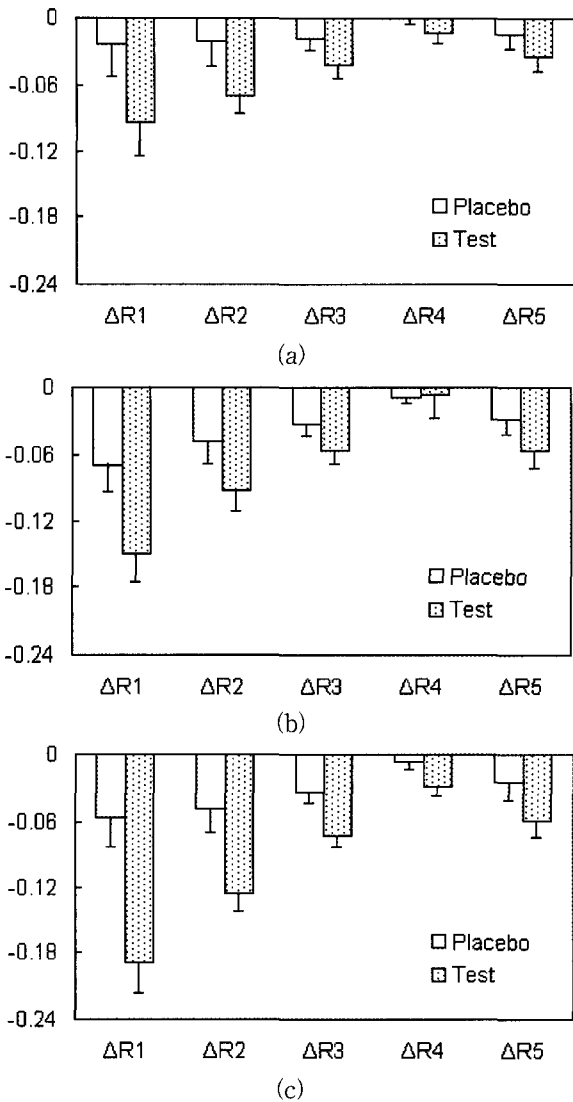


Figure 5. Comparison of the volunteer's eye area, before and after the treatment of the cream containing *Astragalus membranaceus* root extract. The wrinkle index ($\Delta R1 \sim \Delta R5$) of the volunteer's eye area, at 4 weeks (a); at 8 weeks (b); and at 12 weeks (c).

각각 calycosin과 formononetin 함량에 차이가 있었으며, 당분해 효소를 처리한 추출군이 효소를 처리하지 않은 추출군에 비해 상기 두 화합물의 함량이 증가하였다. 황기추출물의 평가에서는 플라보노이드 화합물인 calycosin과 formononetin의 함량에 비례하여 항산화효과, 미백 및 콜라겐 합성효과를 나타내었다. 또한, 황기추출물을 함유한 제품의 피부주름 개선효과의 평가에서는 자극없이 통계적으로 유의하게 주름 감소효과를 보였다. 앞선 연구의 황기추출물 보습효과[22]와 종합적으로 볼 때, 항노화를

위한 기능성화장품의 천연소재로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2005년 산업자원부 지역연고산업진흥사업의 연구비 일부에 의하여 이루어 진것으로 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 생약학연구회, 현대생약학, 268, 학창사 (2000).
2. 김태희, 이경순, 문영희, 박종희, 육창수, 황완균, 본초학, 393, 계축문화사 (2000).
3. 안덕균, 한국본초도감, 교학사 (1998).
4. 중약대사전, 1, 上海科學技術出版社 (1985).
5. H. Hikino, S. Funayama, and K. Endo, Hypotensive principles of *Astragalus* and *Hedysarum* roots, *Planta Med.*, **30**, 297 (1976).
6. M. Tomoda, N. Shimizu, N. Ohara, R. Gonda, S. Ishii, and H. Otsuki, A reticuloendothelial system activation Glycan from Roots of *Astragalus membranaceus*, *Phytochemistry*, **31**(1), 63 (1992).
7. Y. D. Zang, Y. L. Wang, J. P. Shen, and D. X. Li, Hypotensive and antiinflammatory effects of *Astragalus* saponin I, *Acta. Pharm. Sin.*, **19**, 333 (1984).
8. L. Z. Lin, X. G. He, M. Lindermajer, G. Nolan, J. Yang, M. Cleary, S. X. Qiu, and G. A. Cordell, Liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*, *J. Chromatogr. A*, **876**, 87 (2000).
9. M. Hirotsani, Y. Zhou, H. Lui, and T. Furuya, Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*, *Phytochemistry*, **36**, 665 (1994).
10. T. Wu, S. W. Annie Bligh, L. H. Gu, Z. T. Wang, H. P. Liu, X. M. Cheng, C. J. Branford-White, and Z. B. Hu, Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial *Radix astragali* by HPLC-UV, *Fitoterapia*, **76**, 157 (2005).
11. H. B. Xiao, M. Krucker, K. Albert, and X. M. Liang, Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, **1032**,

- 117 (2004).
12. X. Ma, T. Zhang, Y. Wei, P. Tu, Y. Chen, and Y. Ito, Preparative isolation and purification of calycosin from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) hsiao by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **962**, 243 (2002).
 13. H. Z. Zheng, Z. H. Dong, and Q. She, Modern study of traditional Chinese medicine, **4**, 3886, Xue Yuan Press, Beijing (1998).
 14. D. Yu, Y. Duan, Y. Bao, C. Wei, and L. An, Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate, *Journal of ethnopharmacology*, **98**, 89 (2005).
 15. M. J. Kim, J. Y. Kim, S. W. Choi, J. T. Hong, and K. S. Yoon, Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists*, **30**(1), 15 (2004).
 16. M. J. Kim, J. Y. Kim, S. W. Choi, J. T. Hong, and K. S. Yoon, Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists*, **30**(4), 449 (2004).
 17. M. J. Kim, J. Y. Kim, T. K. Jung, S. W. Choi, and K. S. Yoon, Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(6), 444 (2006).
 18. Y. Fugita, I. Urea, Y. Morimoto, M. Nakajima, C. Hatano, and T. Okuda, Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids, II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation, *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129 (1988).
 19. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
 20. J. K. No, D. Y. Soung, Y. J. Kim, K. H. Shim, Y. S. Jun, S. H. Rhee, T. Yokozawa, and H. Y. Chung, Inhibition of tyrosinase by green tea components, *Life Science*, **65**, 241 (1999).
 21. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 22. T. K. Jung, M. J. Kim, K. R. Lim, and K. S. Yoon, Moisturizing and anti-oxidation effect of *Astragalus membranaceus* root extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists*, **32**(3), 193 (2006).