

천궁 및 당귀를 함유한 한방처방제 휘발성 향기추출물의 항염증 효과

임 현 희 · 김 은 옥 · 서 미 자* · 최 상 원[†]

대구가톨릭대학교 식품영양학과, *하늘호수
(2011년 6월 22일 접수, 2011년 9월 5일 수정, 2011년 9월 16일 채택)

Anti-Inflammatory Effects of Volatile Flavor Extract from Herbal Medicinal Prescriptions Including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai

Hyun Hee Leem, Eun Ok Kim, Mi Jae Seo*, and Sang Won Choi[†]

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, 330, Geumrak-ri,
Hayang-eup, Gyeongsan 712-702, Korea

*Skylake, Co., 145, Daehan-ri, Wachon-myeon, Gyeongsan 712-841, Korea

(Received June 22, 2011; Revised September 5, 2011; Accepted September 16, 2011)

요약: 본 연구는 항염증 효능을 가지는 한방처방제 휘발성 향기추출물을 이용하여 염증질환 치료 한방화장품 기능성 소재를 개발하고자 하였다. 먼저 전보에서 항염증 효능이 있는 것으로 알려진 천궁, 당귀, 박하 및 애엽을 비롯하여 5 가지 생약(적작약, 숙지황, 황금, 인삼 및 감초)으로 구성된 4가지 한방처방제(HH-1: 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황, HH-2: 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황, 황금, 인삼, 감초, HH-3: 천궁, 당귀, 박하, 애엽, HH-4: 천궁, 당귀, 박하, 애엽, 황금, 인삼, 감초)를 선정한 후 연속수증기증류법(simultaneous steam distillation extraction, SDE)을 이용하여 추출한 휘발성 향기추출물의 항산화 및 항염증 활성을 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 및 soybean lipoxygenase (SLO)를 이용하여 각각 측정하였다. HH-2가 다소 높은 항산화 활성뿐 아니라 SLO 저해활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 항염증 활성이 강한 HH-2의 항염증 효능을 보다 상세하게 확인하기 위해 lipopolysaccharide (LPS) 유발한 RAW 264.7 세포를 이용하여 염증 유발매개인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 interleukin-6 (IL-6) 생성 억제 효과를 측정하였다. HH-2가 강한 NO 생성 억제 효과뿐 아니라 PGE₂ 및 IL-6를 강하게 억제하여 우수한 항염증 활성을 나타내었다. 항염증 활성이 높은 HH-2의 휘발성향기성분을 GC-MS로 분석한 결과, eugenol, paeonol, butyl phthalide, β -eudesmol 및 butylidene dihydrophthalide로 확인되었다. 이러한 연구결과로부터 항산화뿐만 아니라 항염증활성이 높은 HH-2를 피부노화 및 염증질환 치료용 한방화장품의 기능성 소재 개발 가능성을 확인하였다.

Abstract: This study was conducted to develop functional sources of herbal cosmetics for treatment of skin aging and inflammatory disorders using volatile flavor extracts of four different herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino (COM), *Angelica gigas* Nakai (AGN), *Mentha arvensis* L. (MAL), *Artemisiae argyi* Folium (AAF), *Paeonia lactiflora* Pall (PLP), *Rehmanniae Radix* Preparata (RRP), *Scutellaria baicalensis* Georgi (SBG), *Panax ginseng* C.A. Meyer (PGM), *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (GUF). The volatile flavor extracts of four different herbal medicinal prescriptions (HH-1: COM, AGN, PLP, RRP, HH-2: COM, AGN, PLP, RRP, SBG, PGM, GUF, HH-3: COM, AGN, MAL, AAF, HH-4: COM, AGN, MAL, AAF, SBG, PGM, GUF) were extracted using SDE and their antioxidant and anti-inflammatory effects were measured by using DPPH radical and SLO, respectively. As a result, HH-2 showed moderate DPPH radical scavenging activity (68.24 %) and the strongest SLO inhibitory activity (83.96 %) at 100 μ g/mL. Moreover, HH-2 of four different prescriptions significantly inhibited NO production on LPS-stimulated RAW 264.7 cells in a dose-dependent manner without considerable cell cytotoxicity at range of 2.0 ~ 50 μ g/mL. Additionally, HH-2 also effectively suppressed the production of PGE₂ and IL-6, which

[†] 주 저자 (e-mail: swchoi@cu.ac.kr)

are responsible for promoting the inflammatory process. Major volatile components of HH-2 were identified as eugenol, paeonol, butyl phthalide, β -eudesmol and butylidene dihydrophthalide by GC-MS analysis. Thus, these results suggest that HH-2 may be useful as a potential source of anti-inflammatory agents in herbal medicinal cosmetics.

Keywords: *Cnidium officinale Makino, Angelica gigas Nakai, four different herbal medicinal prescriptions, volatile flavor extract, anti-inflammatory*

1. 서 론

염증은 체내의 자극에 의해 변화된 손상 부위를 재생 하려는 기전이며, 지속적인 염증반응은 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으켜 기능장애를 유발한다[1]. 대식세포는 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 과량 만들어지는 prostaglandin E2 (PGE2) 등과 같은 염증 촉진 인자들을 생성한다[2]. 또한 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유발된 세포에서 염증매개 물질인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 사이토카인을 생산하여 다양한 염증반응을 매개한다[3,4]. 따라서 NO, PGE2 및 염증성 사이토카인 등 염증매개체의 활성을 직접적으로 억제하는 물질들은 여드름, 아토피성 피부염, 류마티스성 관절염, 악성 신생물 등과 같은 각종 염증 관련 질환을 억제하는 항염증제로서 개발 가능성이 높으며, 최근에는 부작용을 나타내는 합성항염증 치료제를 대체하는 보다 안전하고 효과 있는 천연 유래의 여러 식품 및 한약재로부터 항염증 치료제를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

한편, 동·식물이 지니는 고유한 향기성분 또는 essential oil은 예로부터 식품, 향료, 의약품 및 화장품의 다양한 기능성 원료로서 널리 사용되어져 왔으며, 특히 최근 천연 지향적인 소비자들의 요구에 따라 합성 유래 향기성분보다 여러 생약 및 허브 유래 향기성분을 추출하여 기능성 소재로 널리 이용하고 있다. 식물로부터 휘발성 향기성분을 추출하는 방법에는 크게 용매추출법(SE, solvent extraction)[5,6], headspace법, 연속수증기증류법(SDE, simultaneous steam distillation extraction) 및 고체상미세추출법(SPME, solid-phase microextraction)등[7]이 있는데, 비교적 열에 안정한 향기성분을 대량 추출할 때는 SDE법을 많이 이용하고 있고, SPME법은 향기성분의 대량 추출보다 유기용매를 사용하지 않고 적은

양의 시료를 간단하게 전처리하여 향기성분을 분석할 때 주로 사용되고 있다[8-10].

천궁(川芎, *Cnidium officinale Makino*)은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본인 산궁궁이의 뿌리 줄기를 말린 것으로, 그에 함유된 생리활성물질에는 ligustilide, butylidenephthalide, cnidilide 및 neocnidilide 등의 특유한 약초향을 지니고 있으며[11], 풍냉으로 인한 두통, 동통, 무월경, 난산 치료 등에 널리 이용되고 있다. 천궁의 생리적작용에는 항암작용[11] 및 항산화[12, 13] 그리고 혈소판응집 억제 활성[14] 등의 보고가 있다.

한편, 당귀(當歸, *Angelica gigas Nakai*)는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 1 ~ 2년된 뿌리를 가을에 채취하여 건조한 것을 이용하고 있다[15]. 당귀는 보혈제의 대표적인 생약으로 혈을 보하여 주고 청열작용과 혈의 흐름을 좋게 하므로 빈혈이나 어혈로 인한 혈행 장애에 크게 활용하고 있으며 월경불순, 월경정지, 신체허약, 두통, 복통 및 변비에 널리 응용된다. 당귀의 생리활성성분으로는 pyranocoumarin계 화합물인 decursin, decursinol 및 nodakenin과 휘발성 향기성분인 α -pinene, β -eudesmol 등을 함유하고 있다[16,17]. 당귀의 주요 생리적 활성에 관한 연구로 면역부활[18] 효과 뿐만 아니라 항산화[19], 항암[20], 항염증[21] 및 항당뇨 효과[22] 등 다양한 생리적 효능이 보고되어 있다. 이와 같이 지금까지 천궁 및 당귀의 생리적 작용 및 주된 생리활성물질에 관한 많은 연구가 수행되어져 왔으나, 그들의 휘발성 향기추출액의 생리적 효능 및 그를 이용한 한방화장품의 개발에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 항염증 효능을 가지는 천궁 및 당귀를 주 베이스로한 한방치방제 휘발성 향기추출물을 이용하여 염증질환 억제 한방화장품 기능성 소재를 개발하기 위한 연구의 일환으로 항염증 활성을 지닌 천궁, 당귀, 박하 및 애엽을 비롯하여 5가지 생약(적작약, 숙지황, 황금, 인삼 및 감초)으로 구성된 4가지 한방치방제를 선정하고 SDE를 이용하여 추출한 휘발성 향기추출물의 항산화 및 항염증 활성 검증과 GC-MS를 이용하여 휘발성향기성분을 분석함으로써 향후 피부 염증질환 치료용 한방화장

품 기능성 소재 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 천궁(*Cnidium officinale* Makino), 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 박하(*Mentha arvensis* L.), 애엽(*Artemisiae argyi* Folium), 적작약(*Paeonia lactiflora* Pall), 숙지황(*Rehmannia Radix Preparata*), 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi), 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 및 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 등의 생약은 국내산으로 2010년 영천 약전시장에서 구입하였으며 모두 잘게 자른 건조된 상태로 저온(-5 °C)에 보관하면서 실험재료로 사용하였다. 실험에 사용한 시약인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), soybean lipoxigenase (SLO), linoleic acid, lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (USA)로부터, Cell-Titer 96Aqueous One solution과 Griess Reagent System은 Promega (USA), PGE2 ELISA kit은 Parameter™ R&D systems (USA), IL-6 ELISA kit은 eBioscience (USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다. 그 외 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 HPLC급 시약을 사용하였다.

2.2. 4가지 한방처방제의 선정 및 휘발성 향기추출물 제조

최근 본 연구진의 연구결과[23]와 한방에서 이미 알려진 항염증 생약[24]을 바탕으로 Table 1과 같이 4가지 한방처방제를 제조하였다. 즉, 염증 유발 지표인자인 NO 생성을 크게 억제하여 항염증 효능이 우수한 것으로 밝혀진 천궁 및 당귀를 베이스로 한 사물탕처방제를 한방처방제 1 (HH-1; 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황)으로 선정하였고, 여기에 한방에서 염증질환 치료에 이용되고 있는 황금, 인삼, 감초를 첨가하여 한방처방제 2 (HH-2; 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황, 황금, 인삼, 감초)를 제조하였다. 다음, 여러 생약의 휘발성 향기추출액 중 박하 및 애엽이 염증 매개 인자인 IL-6 생성을 크게 억제하는 효과가 있었기에 천궁 및 당귀 베이스에 박하 및 애엽을 포함한 한방처방제 3 (HH-3; 천궁, 당귀, 박하, 애엽)과 여기에 위와 동일하게 황금, 인삼, 감초를 첨가한 한방처방제 4 (HH-4; 천궁, 당귀, 박하, 애엽, 황금, 인삼, 감초)를 Table 1에서 나타난 생약 혼합비율로 섞어 각각 제조하였다.

한편, Table 1과 같이 선정한 4가지 한방처방제를 Schultz

Table 1. The Composition, Amount and Yield of Four Different Herbal Medicinal Prescriptions Including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai

Prescription	Herbal medicine	Amount (g)	Yield (mg/100 g)
HH-1	<i>Cnidium officinale</i> Makino	12.5	91.6
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	12.5	
	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	12.5	
	<i>Rehmanniae Radix</i> Preparata	12.5	
HH-2	<i>Cnidium officinale</i> Makino	10	121.7
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	10	
	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	10	
	<i>Rehmanniae Radix</i> Preparata	10	
	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	10	
	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	5	
HH-3	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	5	113.5
	<i>Cnidium officinale</i> Makino	12	
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	12	
	<i>Mentha arvensis</i> L.	6	
HH-4	<i>Artemisiae argyi</i> Folium	24	115.4
	<i>Cnidium officinale</i> Makino	10	
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	10	
	<i>Mentha arvensis</i> L.	5	
	<i>Artemisiae argyi</i> Folium	20	
	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	10	
	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	5	
	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	5	

등[25]의 방법에 따라 연속수증기증류추출 장치(Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus, SDE)를 사용하여 다음과 같이 휘발성 향기추출물을 제조하였다. 즉, 4가지 한방처방제 50 g에 초순수 1 L를 첨가한 후 SDE에서 재증류한 diethyl ether 500 mL를 사용하여 상압 하에서 4 h 동안 향기성분을 추출하였다. 이 추출액에 무수 황산나트륨을 가하여 4 °C에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고 유기용매층은 rotary vacuum evaporater (Eyela, Tokyo, Japan) 및 질소가스 purger를 이용하여 농축 후 휘발성 향기추출물을 각각 얻었다.

2.3. HH-2 및 HH-4 한방처방제의 휘발성 향기성분의 분석

HH-2 및 HH-4 한방처방제의 휘발성향기성분의 분석은 GC-MS를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. GC-MS 기기는 HP 5973 Mass selective detector (Agilent technologies Inc., Chandler, AZ, USA)가 장착된 Agilent 5975C Series gas chromatography (Agilent Inc., Chandler, AZ, USA)를 사용하였으며, 분리용 칼럼은 HP-5MS 5 % phenyl methyl silox nonpolar (30 m × 0.25 mm, i.d., 0.25 μm film thickness, J & W, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, 이때 oven의 온도는 50 °C에서 3 min간 유지한 다음 5 °C/min의 속도로 300 °C까지 상승시켰으며, carrier gas의 유속은 1 mL/min (He)로 유지하였다. 분리된 화합물의 이온화는 electron impact ionization (EI mode) 방법으로 행하였으며 ionization voltage와 ion source의 온도는 각각 70 eV와 230 °C로 설정하였고, 분석할 분자량의 범위는 40 ~ 350 (m/z)로 설정하였으며, GC injector의 온도는 250 °C로 설정하였다. SDE 추출법으로 추출된 증류추출액 0.5 μL를 split ratio 1 : 20으로 주입하여 분석하였다.

GC-MS에 의해 total ionization chromatogram (TIC)에 분리된 각 peak의 휘발성향기성분 분석은 mass spectrum library (Wiley 275&7N, NBS 75K)[24]와 mass spectral data book의 spectrum과, 그리고 문헌상의 retention index와의 일치 및 표준물질의 분석 data를 비교하여 확인하였다.

2.4. 항산화 효과 측정

4가지 한방처방제 휘발성 향기추출액의 항산화활성은 Tagashira 등[27]의 방법을 약간 변형하여 DPPH 라디칼에 대한 전자공여 효과로 각 시료의 활성을 측정하였다. 즉, 시료 용액 100 μL에 100 μM DPPH를 함유한 메탄올 용액 2 mL를 가해 격렬히 vortex하여 실온에서 10 분간 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer (Scinco S-3100, Seoul, Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때, DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성 (\%)} = (1-A/B) \times 100.$$

A : 517 nm에서 시료 흡광도,

B : 517 nm에서 대조구 흡광도

2.5. 항염증 효과 측정

2.5.1. Soybean 15-Lipoxygenase 활성 저해 효과

4가지 한방처방제 휘발성 향기추출액의 항염증활성은 Block 등[28]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) 2 mL에 추출물 20 μL와 SLO (1 nM, final concentration) 20 μL를 넣어 5 min간 반응시키고 에탄올에 용해한 linoleic acid (110 μM, final concentration) 50 μL를 기질로 첨가한 후 1 min간 반응시키고 234 nm에서 흡광도를 측정하였다. SLO 저해활성 계산은 DPPH 라디칼 소거활성 계산법과 동일하게 실시하였다.

2.5.2. 세포 배양 및 세포 증식

실험에 사용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10 % fetal bovine serum (FBS)과 1 % antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여 5 % CO₂, 37 °C incubator에서 배양하였다.

4가지 한방처방제 휘발성 향기추출물의 세포 증식력을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well 당 1 × 10⁴ 세포가 되도록 분주한 후 12 h 배양하였다. 이때 향기추출물은 10 ~ 200 μg/mL의 농도가 되도록 150 μL/well를 세포에 처리하여 24 h 배양한 후, CellTiter 96Aqueous One solution assay를 이용하여 20 μL/well의 one solution을 첨가하고 2 h 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포증식에 미치는 효과를 측정하였다[29].

2.5.3. NO 생성 억제 효과

RAW 264.7 세포를 48 well plate에 2 × 10⁵ cells/well이 되도록 분주한 후 12 h 배양하고, 4가지 한방처방제 휘발성 향기추출물 1 ~ 50 μg/mL의 농도가 되도록 500 μL/well를 동시 처리 또는 LPS 단독 처리하여 20 h 배양한 후, 세포 배양액을 얻어 배양액 중에 함유된 NO의 양을 Griess Reagent System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다[30].

2.5.4. PGE2 생성 저해 효과

RAW 264.7 세포를 48 well plate에 2 × 10⁵ cells/well이 되도록 분주한 후 12 h 배양하였다. 4가지 한방처방제 휘발성 향기추출물 1 ~ 50 μg/mL 및 LPS 100 ng/mL

의 농도를 동시 처리 또는 LPS 단독 처리하여 20 h 배양 후, 배양액 중에 함유된 PGE2의 양을 PGE2 ELISA kit (Parameter™ R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 측정하였다.

2.5.5. IL-6 생성 저해 효과

4가지 한방처방제 휘발성 향기추출물이 염증반응 시 대식세포가 분비하는 염증성 사이토카인(IL-6)의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해, RAW 264.7 세포에 4가지 향기추출물 1 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 LPS 100 ng/mL 의 농도에서 동시 처리 또는 LPS 단독 처리하여 20 h 배양 후, 배양액 중에 함유된 IL-6를 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.6. 통계처리

본 연구의 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균값 \pm 표준편차로 나타내었으며, 모든 자료의 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System) software package[31]를 사용하여 실시하였다. 이 때 분산분석은 ANOVA test를, 각 시험구간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 Duncan multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 4가지 한방처방제의 휘발성 향기추출물 수율

먼저 최근 H사의 한방스킨의 주 원료인 한방증류추출액을 구성하고 있는 8가지 생약(노간주, 목향, 천궁, 당귀, 정향, 고본, 박하, 애엽)의 휘발성 향기추출물의 항염증 활성을 측정한 결과, 천궁 및 당귀가 염증 지표인자인 NO 생성을 크게 억제하였고, 아울러 박하 및 애엽은 염증매개인자 IL-6 생성을 크게 억제하였다[23]. 또한, 한방에서 황금, 인삼, 감초는 피부노화 예방 및 염증 질환 치료에 널리 이용되고 있다[24]. 이러한 사전 연구보고를 토대로 본 연구에서는 Table 1과 같이 각 생약의 혼합비율로 제조한 4가지 한방처방제(HH-1, HH-2, HH-3, & HH-4)를 Table 1과 같이 선정하고 앞서 재료 및 방법에서 기술한 수증기증류장치를 이용하여 각 처방제의 휘발성 향기추출물의 수율을 측정한 결과, HH-1은 91.6 $\text{mg}/100 \text{ g}$, HH-2는 121.67 $\text{mg}/100 \text{ g}$, HH-3은 113.52 $\text{mg}/100 \text{ g}$ 및 HH-4는 115.38 $\text{mg}/100 \text{ g}$ 으로, HH-2의 휘발성 향기추출물의 수율이 가장 높게 나타났다.

Table 2. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of the Volatile Flavor Extracts from Four Different Herbal Medicinal Prescriptions

Medicinal drug prescription	Inhibition activity (%)	
	DPPH radical	Soybean 15-lipoxygenase
HH-1	24.07 \pm 0.37 ^d	56.70 \pm 3.71 ^b
HH-2	68.24 \pm 0.64 ^c	83.96 \pm 5.08 ^a
HH-3	86.19 \pm 1.64 ^a	28.60 \pm 1.17 ^d
HH-4	80.64 \pm 0.05 ^b	45.03 \pm 4.70 ^c

Data represent mean \pm S.D. of triplicate determination. Superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. Sample concentration: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HH-1 ~ HH-4 are shown in Table 1.

3.2. 천궁 및 당귀를 함유한 4가지 한방처방제 향기추출물의 항산화 효과

활성산소종 또는 지질라디칼은 피부의 면역기능을 억제시키고, 염증을 유발하여 탄력 감소, 주름 및 기미, 주근깨 등의 각종 피부질환을 유발하고 결국 피부노화를 가속화시키는 원인이 된다. 따라서 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 생성되는 활성산소 및 지질라디칼을 포착하는 항산화 물질은 피부 노화를 방지하는 주 수단이 되기에 현재 항산화 활성 측정에는 DPPH 라디칼 소거활성 측정이 가장 널리 이용되고 있다[32].

앞서 SDE법으로 추출한 4가지 한방처방제 향기추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HH-3이 86.19 %로 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 높게 나타났으며, 다음 HH-4 (80.64 %) > HH-2 (68.24 %) > HH-1 (24.07 %)의 순으로 낮게 나타났다. 이와 같이 HH-3과 HH-4의 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것은 여기에 함유되어 있는 애엽의 항산화성 향기성분에 기인된 것으로 생각된다[33].

3.3. 천궁 및 당귀를 함유한 4가지 한방처방제 향기추출물의 항염증 효과

3.3.1. Soybean 15-Lipoxygenase 저해활성

SLO는 리놀레산 및 리놀렌산과 같은 불포화지방산에 작용하여 leucotrienes을 생성하여 피부 트러블, 알레르기, 아토피와 같은 염증성 피부질환을 유발시켜 결국 피부노화를 촉진하는 효소로 잘 알려져 있다[34]. 따라서

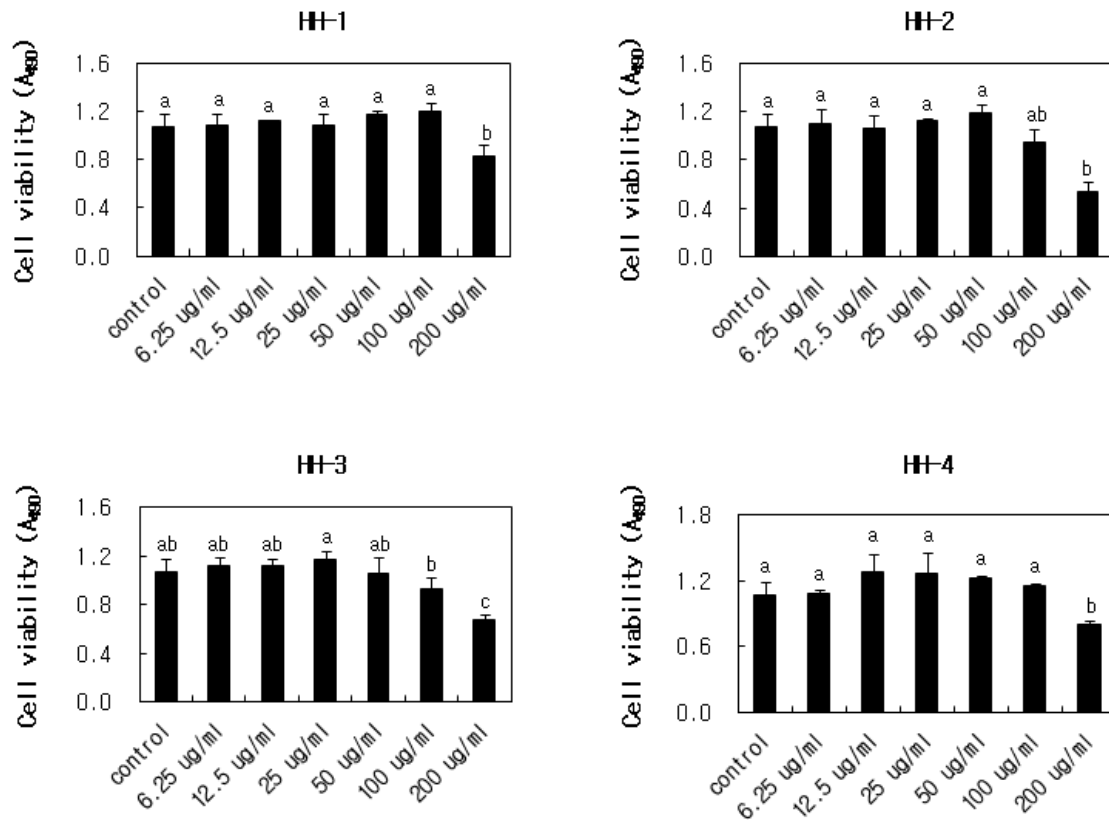


Figure 1. Cytotoxicity of the volatile flavor extracts from four different herbal medicinal prescriptions in RAW264.7 cells. Data represent mean \pm S.D. of triplicate determination. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. HH-1 ~ HH-4 are shown in Table 1.

SLO를 선택적으로 저해하는 물질은 피부의 염증 치료제로 개발 가능성이 있다.

4가지 한방처방제 향기추출물의 항염증 효과를 알아보기 위해 SLO 저해활성을 측정된 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HH-2 (83.96 %)가 가장 높은 저해활성을 나타내었고, 다음 HH-1 (56.70 %) > HH-4 (45.03 %) > HH-3 (28.60 %)의 순으로 낮게 나타났다. 이와 같이 HH-2가 가장 높은 항염증 활성을 나타내었으며, 이의 상세한 염증 억제 효과를 확인하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포를 이용하여 염증 매개인자들을 다음과 같이 측정하였다.

3.3.2. 세포 독성

천궁 및 당귀를 포함한 4가지 한방처방제 향기추출물의 항염증 활성을 세포실험을 통해 측정하기 전에 먼저 이들 향기추출물의 세포독성을 측정된 결과, Figure 1에서 보는 바와 같이 4가지 한방처방제 향기추출물은 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서만 세포독성을 나타내었으므로 세포독성이 나타나지 않은 0 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 범위에서 각 생약처방제의 향기추출물의 항염증 효과를 측정하였다.

3.3.3. NO 생성 억제효과

천궁 및 당귀를 포함한 4가지 한방처방제 향기추출물의 항염증 효과를 평가하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제 효과를 측정된 결과는 Figure 2와 같다. 즉, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 HH-2만 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 다소 감소시켰으며 그 외 HH-1, HH-3, HH-4는 NO 생성 저해효과가 거의 없었다. 다음, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 HH-2가 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 가장 크게 감소시켰으며 다음 HH-1 > HH-3 \geq HH-4의 순으로 저해활성이 낮게 나타났다. 한편, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 HH-2가 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 가장 크게 감소시켰으며 10 $\mu\text{g}/$

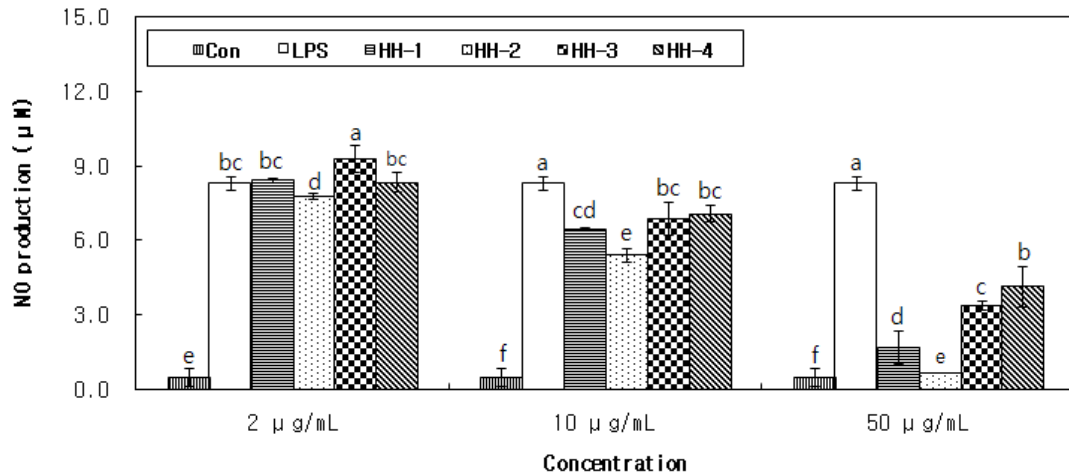


Figure 2. Inhibitory effects on NO production of the volatile flavor extracts from four different herbal medicinal prescriptions in LPS-induced RAW264.7 cells. Data represent mean ± S.D. of triplicate determination. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. HH-1 ~ HH-4 are shown in Table 1.

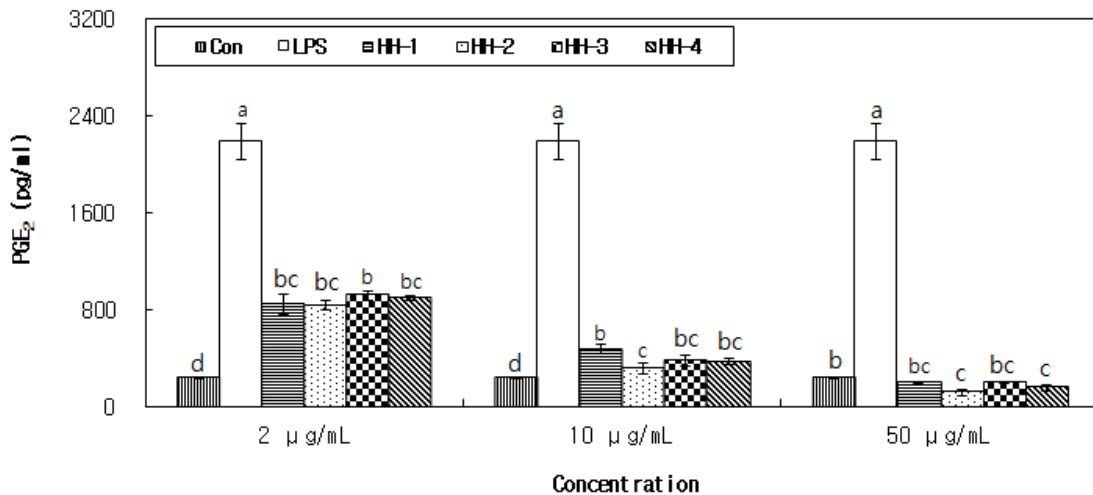


Figure 3. Inhibitory effects on PGE₂ production of the volatile flavor extracts from four different herbal medicinal prescriptions in LPS-induced RAW 264.7 cells. Data represent mean ± S.D. of triplicate determination. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. HH-1 ~ HH-4 are shown in Table 1.

mL 농도에서의 저해활성과 동일한 경향을 나타내었다. 따라서, 천궁 및 당귀를 포함한 4가지 한방처방제 향기추출물 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제함으로써 항염증 활성을 나타냄을 보여주었고, 이들 중 HH-2의 NO 생성 저해효과가 가장 우수함을 알 수 있었다.

3.3.4. PGE₂ 생성 억제 효과

천궁 및 당귀를 함유한 4가지 한방처방제 향기추출물의 항염증 효과를 평가하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 염증 생성 인자인 PGE₂ 생성 억제 효

과를 측정해 결과는 Figure 3과 같다. 즉, 2 µg/mL의 농도에서는 HH-1과 HH-2가 LPS에 의해 증가된 PGE₂의 생성을 크게 감소시켰으며, HH-4 ≥ HH-3의 순으로 저해활성이 낮게 나타났다. 10 µg/mL의 농도에서는 HH-2의 PGE₂의 생성 억제효과가 가장 컸으며 다음 HH-3 ≥ HH-4 > HH-1의 순으로 낮게 나타났다. 한편, 50 µg/mL의 농도에서는 HH-2와 HH-4가 HH-1 및 HH-3의 PGE₂의 생성 억제효과보다 다소 크게 나타났다. 따라서, 천궁 및 당귀를 포함한 4가지 한방처방제 향기추출물 중 HH-2가 PGE₂의 생성 저해효과도 우수함을 알 수 있었다.

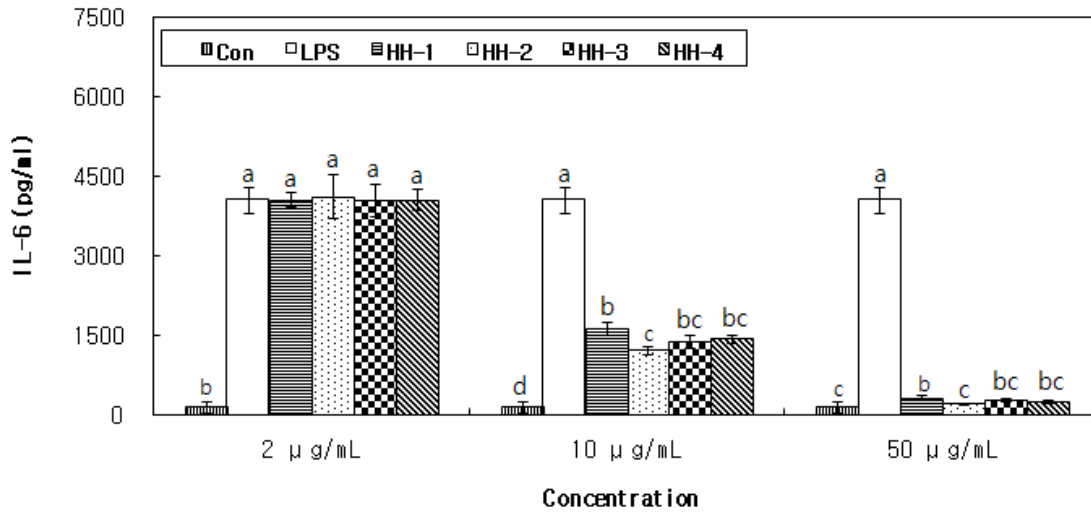


Figure 4. Inhibitory effects on IL-6 production of the volatile flavor extracts from four different herbal medicinal prescriptions in LPS-induced RAW 264.7 cells. Data represent mean \pm S.D. of triplicate determination. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. HH-1 ~ HH-4 are shown in Table 1.

한편, 세포 내에서 생성된 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX) 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 합성을 유도하여 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다 [35]. 한방처방제 향기증류추출물의 PGE2 생성 저해효과는 NO 생성 저해에 의한 COX의 활성 억제로 초래된 결과라 생각되며, 향후 COX의 발현 및 활성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3.3.5. IL-6 생성 억제 효과

천궁 및 당귀를 포함한 4가지 한방처방제 향기추출물의 염증 유발인자 IL-6 생성 억제효과를 측정한 결과는 Figure 4와 같다. 2 µg/mL의 농도에서는 4가지 한방처방제 모두 IL-6 생성 억제 효과가 없었으며, 10 µg/mL의 농도에서는 HH-2의 IL-6의 생성 억제효과가 가장 컸으며 다음 HH-3 \geq HH-4 > HH-1 순으로 낮게 나타났다. 한편, 50 µg/mL의 농도에서도 HH-2가 LPS에 의해 증가된 IL-6의 생성을 가장 크게 감소시켰으며, 10 µg/mL 농도에서의 저해활성과 동일한 경향을 나타내었다.

최근 본 연구진은 천궁과 당귀의 휘발성 향기추출물에 함유된 eugenol 성분이 항산화 및 항염증 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 [36], 아울러 한방에서 이미 보고된 연구결과에 의하면 작약, 숙지황, 황금, 및 감초추출물은 항염증 및 항알레르기 효능이 있는 것으로 알려져 있다 [24].

이상의 결과로부터 천궁 및 당귀를 함유한 4가지 한방처방제 향기추출물 중 HH-2는 염증반응을 매개하는 다

양한 인자(NO, PGE2 및 IL-6)의 생성을 억제하여 항염증 활성을 나타냄으로써 피부 염증 관련 질환 치료용 한방화장품의 기능성 소재로서의 개발 가능성을 보여준다.

3.4. HH-2 및 HH-4의 휘발성향기성분 분석

앞서 Figures 2 ~ 4에서 보는 바와 같이 항염증활성이 우수한 HH-2 및 HH-4 한방처방제의 휘발성 향기성분을 확인하기 위해 SDE법으로 추출한 후 GC-MS로 분석한 결과는 Figure 5와 같다. 먼저, HH-2는 eugenol (peak 1, M.W. = 164.20), paeonol (peak 2, M.W. = 166.18), butyl phthalide (peak 3, M.W. = 190.24), β -eudesmol (peak 4, M.W. = 222.36) 및 butylidene dihydrophthalide (peak 5, M.W. = 190.23)을 확인하였으며, 반면 HH-4는 eugenol (peak 1, M.W. = 164.20), butyl phthalide (peak 3, M.W. = 190.24), β -eudesmol (peak 4, M.W. = 222.36), butylidene dihydro-phthalide (peak 5, M.W. = 190.23) 및 menthol (peak 6, M.W. = 156.2)을 확인하였으며 나머지 peak에 대해서는 library searching에 의한 성분의 match quality가 낮았기에 여기서는 동정하지 못하였다. HH-2 및 HH-4의 공통 향기성분으로 확인된 eugenol과 butyl phthalide 및 β -eudesmol과 butylidene dihydrophthalide은 각각 천궁 및 당귀의 주된 향기성분으로 보고된 바가 있으며 [11,37], HH-2의 paeonol과 HH-4의 menthol은 각각 적작약 및 박하의 주된 향기성분으로 확인된 바가 있다 [25]. 이들 향기성분 중 eugenol, paeonol 및 β -eudesmol은 항염증 물질로 이

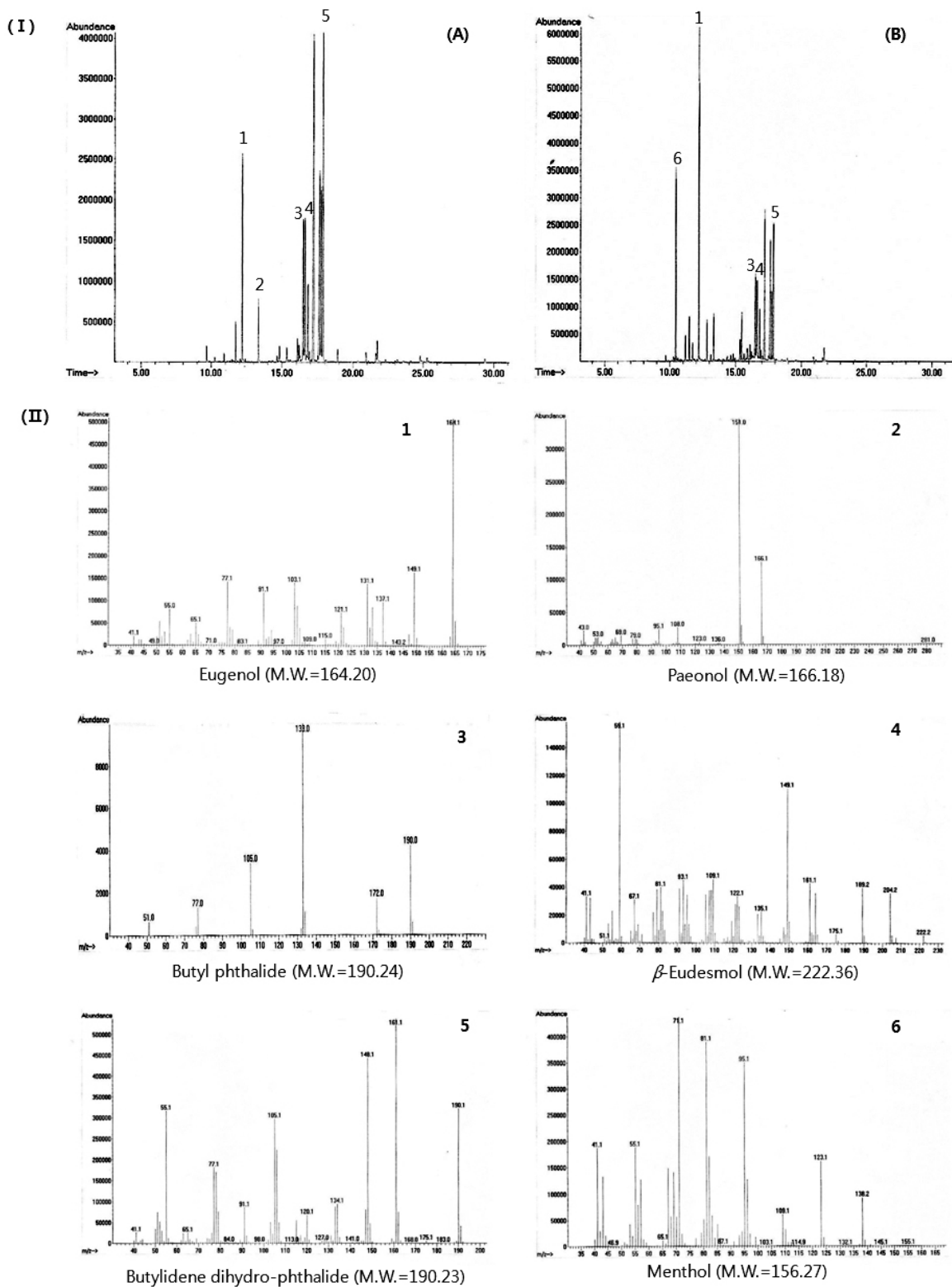


Figure 5. GC chromatograms (I) and MS spectra(II) of the volatile flavor extracts from HH-2 (A) and HH-4 (B). HH-2 and HH-4 are shown in Table 1.

미 보고된 바가 있어[38], 앞서 HH-2가 HH-4보다 우수한 항염증 활성을 나타낸 것은 바로 이들 물질에 기인된 것으로 사료된다. 그러나 HH-2의 항염증 물질의 확인 및 작용 기작에 대한 보다 자세한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

본 연구는 항염증 효능을 가지는 천궁 및 당귀를 함유한 한방처방제의 향기증류추출물을 이용하여 피부 염증 관련 질환 치료용 한방화장품 소재로서의 개발 가능성에 대해 평가하고자 수행하였다. 먼저 사전연구결과와 한방에서 보고된 항염증 활성 생약을 바탕으로 4가지 한방처방제(HH-1 : 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황, HH-2 : 천궁, 당귀, 적작약, 숙지황, 황금, 인삼, 감초, HH-3 : 천궁, 당귀, 박하, 애엽, HH-4 : 천궁, 당귀, 박하, 애엽, 황금, 인삼, 감초)을 선정하였고, 이들의 항산화 및 항염증 활성을 DPPH 라디칼 및 SLO를 이용하여 측정할 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HH-3와 HH-4가 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈으며, HH-2도 다소 높은 항산화 활성과 더불어 가장 높은 SLO 저해활성을 나타내었다. 한편 4가지 한방처방제 중 HH-2는 염증 지표인자인 NO 생성을 크게 억제하였으며, 아울러 염증 유발인자인 PGE2 및 IL-6 생성도 크게 저해하는 효과를 확인하였다. HH-2의 증류추출물의 휘발성 향기성분을 GC-MS로 분석한 결과, 항염증 활성물질인 eugenol, paeonol, β -eudesmol 등이 확인되었으며, 이들 성분이 HH-2의 높은 항염증 활성에 기여한 것으로 사료된다. 이러한 연구결과로부터 천궁 및 당귀를 베이스로 하여 여기에 적작약, 숙지황, 황금, 인삼, 감초를 혼합하여 제조된 HH-2는 항산화 활성뿐 아니라 높은 항염증 활성을 지니고 있어 향후 피부노화 예방 및 염증 치료용 한방화장품 기능성 소재로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2009년 중소기업청 산학협력실 지원사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. S. Jew, O. N. Bae, and J. H. Chung, Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cell line, *J. Toxicol. Pub. Health*, **19**, 33 (2003).
2. M. Higuchi, N. Higashi, H. Taki, and T. Osawa, Cytolytic mechanism of activated macrophages, tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, *J. Immunol.*, **144**, 1425 (1990).
3. D. E. Lee, J. R. Lee, T. W. Kim, Y. K. Kwon, S. H. Byun, S. W. Shin, S. I. Suh, T. K. Kwon, J. S. Byun, and S. C. Kim, Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α , IL-1 β and COX-2 expression by flower and whole plant of *Lonicera japonica*, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **19**, 481 (2005).
4. Y. P. Cheon, M. L. Mollah, C. H. Park, J. H. Hong, G. D. Lee, J. C. Song, and K. S. Kim, Inhibition effects of water extract of *Bulnesia sarmienti* on inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 cell line, *J. Life Science*, **19**, 479 (2009).
5. M. K. Yoon, A. Choi, I. H. Cho, M. J. You, J. W. Kim, M. S. Cho, J. M. Lee, and Y. S. Kim, Characterization of volatile components in Eoyuk-jang, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(4), 366 (2007).
6. M. K. Yoon, M. J. Kwon, S. M. Lee, J. W. Kim, M. S. Cho, J. M. Lee, and Y. S. Kim, Characterization of volatile components according to fermentation periods in Gamdongchotmoo Kimchi, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **40**(5), 497 (2008).
7. G. A. Reineccius, Flavour-isolation techniques. In *flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*, berger RG, ed., 409, Springer-Verlag, Heidelberg (2007).
8. K. S. Yun, J. H. Hong, and Y. H. Choi, Characteristics of *Elsholtzia splendens* extracts on simultaneous steam distillation extraction conditions, *Korean J. Food Preserv.*, **13**, 623 (2006).
9. J. G. Lee, H. J. Jang, J. J. Kwang, and D. W. Lee, Comparison of the volatile components of Korean ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) by different extraction methods, *Korean J. Food Nutr.*, **13**, 66

- (2000).
10. C. L. Arthur, L. M. Killam, K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, and J. R. Berg, Automation and optimization of solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **64**, 1960 (1992).
 11. K. S. Nam, O. L. Son, K. H. Lee, H. J. Cho, and Y. H. Shon, Effect of *Cnidii rhizoma* on proliferation of breast cancer cell, nitric oxide production and ornithine decarboxylase activity, *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**(4), 283 (2004).
 12. S. H. Kim and I. C. Kim, Antioxidant properties and whitening effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae* Radix, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizoma*, *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **18**(4), 618 (2008).
 13. J. H. Lee, H. S. Choi, M. S. Chung, and M. S. Lee, Volatile flavor components and free radical scavenging activity of *Cnidium officinale*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**(2), 330 (2002).
 14. Y. Y. Lee, S. H. Lee, J. L. Jin, and H. S. Yun-Choi, Platelet anti-aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*, *Arch. Pharm. Res.*, **26**(9), 723 (2003).
 15. G. S. Kim, C. G. Park, T. S. Jeong, S. W. Cha, N. I. Baek, and K. S. Song, ACAT(Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) inhibitory effect and quantification of pyranocoumarin in different parts of *Angelica gigas* Nakai, *J. Appl. Biol. Chem.*, **52**(4), 187 (2009).
 16. M. Konoshima, H. J. Chi, and K. Hata, Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai, *Chem. pharm. Bull.*, **16**, 1139 (1968).
 17. S. Y. Kang and Y. C. Kim, Neuroprotective coumarins from the root of *Angelica gigas*: structure-activity relationships, *Arch. Pharm. Res.*, **30**, 1368 (2007).
 18. S. B. Han, Y. H. Kim, C. W. Lee, S. M. Park, H. Y. Lee, K. S. Ahn, I. H. Kim, and H. M. Kim, Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai, *Immunopharmacol.*, **40**, 39 (1998).
 19. S. A. Kang, J. A. Han, K. H. Jang, and R. W. Choue, DPPH radical scavenger activity and anti-oxidant effects of Cham-Dang-Gui(*Angelica gigas*), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **33**, 1112 (2004).
 20. K. W. Park, S. R. Choi, M. Y. Shon, I. Y. Jeong, K. S. Kang, S. T. Lee, K. H. Shim, and K. I. Seo, Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* NaKai in human cancer cells, *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**, 1385 (2007).
 21. S. Shin, J. H. Jeon, D. Park, J. Y. Jang, S. S. Joo, B. Y. Hwang, S. Y. Choe, and Y. B. Kim, Anti-inflammatory effects of and ethanol extract of *Angelica gigas* in a carrageenan-airpouch inflammation model, *Exp. Anim.*, **58**, 431 (2009).
 22. H. M. Kim, J. S. Kang, S. K. Park, K. Lee, J. Y. Kim, Y. J. Kim, J. T. Hong, Y. Kim, and S. B. Han, Antidiabetic activity of angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai, *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 1489 (2008).
 23. H. H. Leem, Y. J. Lee, E. O. Kim, W. J. Lee, M. J. Seo, and S. W. Choi, Anti-inflammatory activity of volatile extract of *Cnidium officinale* and *Angelica gigas*, Annual Meeting of Korean Society of Food Sci & Technology, Daegu, P11-140 (2011).
 24. M. Kubo and A. Yoshikawa, Herbal medicine · crude drug, Hirokawa Publishing Co., Tokyo, Japan (2003).
 25. T. H. Schultz, R. A. Flath, T. R. Mon, S. B. Egging, and R. Teranishi, Isolation of volatile components from a model system, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 446 (1977).
 26. E. S. Sehegen, F. Abrahamsom, and W. Mclafferty, The Wiley/NBS registry of mass spectral data, John Wiley and Sons, NY, USA (1974).
 27. M. Tagashira and Y. Ohtake, A new antioxidative 1,3-benzo-dioxole from *Melisa officinalis*, *Planta Med.*, **64**, 555 (1988).
 28. E. Block, R. Iyer, S. Grisoni, C. Saha, S. Belman, and P. Lossing, Lipooxygenase inhibitors from the essential oil of gaic, Markovnikov addition of the allyldithio radical to olefins, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7813 (1988).
 29. D. S. Bredt and S. H. Snyder, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 175 (1994).
 30. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum,

- Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**, 131 (1982).
31. SAS Institute, Inc. SAS User's statistical analysis system institute, Cary, NC, USA, (1985).
 32. M. Ramalingam and P. Yong-Ki, Free radical scavenging activities of *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort. methanolic extracts, *Pharmacogn. Mag.*, **6**(24), 323 (2010).
 33. H. Yoshigi, Physiological activity of essential oils, *Fragrance J.*, **6**, 88 (1986).
 34. J. M. Jeong, Antioxidative and antiallergic effects of *Aronia* (*Aronia melanocarpa*) extract, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(9), 1109 (2008).
 35. M. Yamashita, Analysis of the mechanism for the anti-inflammatory effect of the anti-rheumatic drug auranofin, *Yakugaku Zasshi.*, **120**(3), 265 (2000).
 36. H. H. Leem, E. O. Kim, and S. W. Choi, Antioxidant and anti-inflammatory activity of eugenol derivatives of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2011 (in print).
 37. M. R. Kim, A. M. A. El-Aty, J. H. Choi, K. B. Lee, and J. H. Shim, Identification of volatile components in *Angelica* species using supercritical-CO₂ fluid extraction and solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 1267 (2006).
 38. H. J. Park and M. Y. Choi, *In vitro* antiinflammatory activity of paeonol from the essential oil and its derivative methylpaeonol, *Kor. J. Pharmacogn.*, **36**(2), 116 (2005).