

오이풀 뿌리 분획물의 화장품 소재로서의 약리활성 연구

장영아¹, 여신일², 이진태^{1*}

1 : 대구한의대학교 화장품약리학과, 2 : 메가젠임플란트

The research of pharmacological activation for Sanguisorbae Radix Fractions as cosmetic material

Young-Ah-Jang¹, Shin Il Yeo², Jin-Tae Lee^{1*}

1 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

2 : Megagen Implant Co., Ltd, Gyeongsan 712-852, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Sanguisorbae Radix(SO) is a plant in the family Rosaceae, which grows widely in open fields Korea. It has been used as traditional medicine for thousands of years, as a treatment for anti-inflammatory and it is widely used for throat infection, tonsillitis, conjunctivitis and lymphadenitis. In this study, investigated skin antiaging and anti-bacterial by using SO fractions water, acetone and butanol, chloroform.

Methods : The effects of anti-microbial on SO fractions and elastase inhibition activity, collagenase inhibition activity were experimented.

Results : 1. The ethyl acetate fraction showed the strongest antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*.

2. The elastase inhibition rate and collagenase inhibition rate of the water fraction of SO was the highest other factions.

Conclusions : From the above results, it was confirmed the SO has sufficient potentiality applying itself to industry and also SO can be utilized as antimicrobial natural materials and antiaging cosmetics

Key words : Sanguisorbae Radix, anti-aging, antimicrobial activity

서론

최근 미용을 목적으로 한 기능성 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있고, 특히 이러한 여러 가지 천연 물질들의 항균, 항산화, 미백, 보습 및 피부노화 억제 효과 등이 과학적으로 입증되면서 이들에 대한 연구가 주목받고 있다¹⁻⁵. 기능성화장품의 개발에는 생리활성을 가지는 원료물질의 개발이 선결과제이며, 검토하여야 할 기능성 효과를 보유한 물질을 한약재소재 등 다양한 식물자원에서 찾으려는 연구가 계속되고 있다⁶⁻⁹.

오이풀은 중국, 일본, 우리나라 전지역에서 널리 분포하고 있는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 식물로 그 동속 식물의 뿌리를 생약에서 지유(Sanguisorbae Radix)라 하고, 예로부터 한의학에서 流血과 便血, 痔漏에 사용되어온 식물이다.

지유의 약리성분으로는 뿌리에는 tannin, triterpenoid계 saponin이 함유되어 있고 가지에는 quercetin과 kaempferol의 배당체와 ursol산 등 triterpenoid계 saponin이 함유되어 있으며 잎에는 vitamin C, 꽃에는 chrysanthemine, cyanin이 함유되어 있다¹⁰. 한방에서는 수렴, 지혈약으로 사용하며, 특히 피부염, 점막염, 습진, 화상에 외용하는 것으로 알려져 있다¹¹. 또한 오이풀추출물은 항염증에 우수하고 치아우식증 주원인균인 *mutans streptococci*의 성장을 억제한다는 보고가 있다¹².

현재까지 오이풀에 대한 *mutans streptococci*균의 항균활성, 임상학적 연구는 많이 진행되었으나 주름개선 효과 등 미용학적 효과에 관한 보고는 없어 유용하게 활용되지 못하고 있으므로 본 연구를 통해 천연소재이면서 경제적인 기능성 화장품소재로 오이풀 뿌리를 활용하고자 한다.

*교신저자 : 이진태, 경북 경산시 여천동 240-3번지 대구한의대학교 오성캠퍼스 별관 205호.
· Tel : 053-819-1430, · HP : 010-5594-1430,
· 접수 : 2012년 2월 20일 · 수정 : 2012년 3월 3일 · 채택 : 2012년 3월 16일

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용된 오이풀뿌리 지유(地榆)는 경북 안동시 북후면에서 2009년 4월 채취한 것을 구입하여 사용하였다.

2) 균배양

전 배양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Escherichia coli*의 액체배지로는 nutrient broth(NB)를 *Candida albicans*의 액체배지로는 yeasts moldsbroth(YMB)를 사용했다. *Staphylococcus epidermidis* 및 *Escherichia coli*의 고체배지는 nutrient agar(NA)를 사용했으며, *Candida albicans*의 고체배지로는 yeasts moldsagar(YMA)로 배양하여 본 실험에 사용하였다. 모든 균주는 BOD incubator에서 37°C로 배양하였다.

2. 방법

1) 추출물의 제조

극성차를 이용한 용매 분획물을 획득하기 위하여 오이풀뿌리 아세톤 추출물의 제조는 오이풀 뿌리 3 kg에 70% acetone을 10배 양을 가하여 상온에서 3회 추출한 다음 filter paper로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축하여 아세톤 추출물 423 g을 얻었다. 아세톤 추출물의 극성차를 이용하여 서로 다른 용매를 첨가하여 Fig. 1과 같은 순서로 분획하였다. 오이풀 뿌리 아세톤 추출물을 분별갈대기에 넣고 chloroform을 첨가하여 chloroform 층과 water 층을 분획하였고, chloroform 층 5.4 g을 얻었다. 동일한 과정을 통해 ethyl acetate 분획물 127 g 및 n-butanol 분획물 116 g을 순차적으로 얻었고, 최종 남은 용액은 물 분획물 150 g이라 하였다. 이들 분획물을 감압, 농축 후 동결건조하여 용매를 제거한 후 4°C에서 보관 하였다.

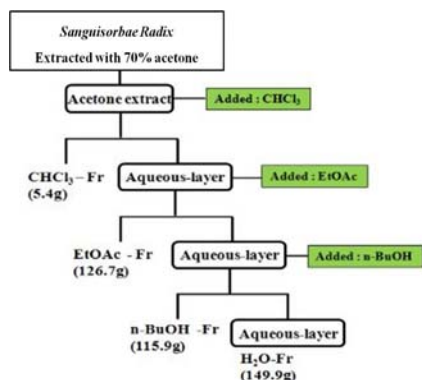


Fig. 1. Purification procedure for the fractions isolated from *Sanguisorbæ Radix*

2) Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 오이풀 뿌리 분획물을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5mL씩 시험관에 취하고, 50mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5U/mL)용액 0.5mL을 가한 후 50mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹

인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (0.5mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405nm에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

3) Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wünsch 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

측 반응구는 0.1M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3mg/mL)를 녹인 기질액 0.25mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 collagenase (0.2mg/mL) 0.15mL를 첨가하여 실온에서 20분간 정치한 후 6% citric acid 0.5mL을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5mL을 첨가하여 320nm에서 흡광도를 측정하였다. collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

4) 생육 저해환 (Clear zone) 측정

항균력 측정은 paper disc법을 이용하여 측정하였다. 즉, 평판배지에 배양된 각 균주를 1 백금이량 취해서 액체배지 10mL에서 18~24시간 배양하여 활성화 시킨 후 다시 액체배지 10mL에 균액을 0.1mL 접종하여 3~6시간 본 배양한 후, 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 50μL/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37°C에서 18~24시간 배양하여 disc주위의 clear zone(mm)의 직경을 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 시험관 실험을 통해 오이풀 뿌리 분획물을 기능성 한방화장품소재로 활용하고자 elastase저해활성, collagenase저해활성을 통하여 주름개선효과를 검증하였다.

항균효과를 확인하기 위해서는 생육저해환을 측정하였으며 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) Elastase 저해 활성 측정확인

Elastase는 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소로 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 피부의 진피조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부의 그물망 구조 결합이 끊어짐으로, elastase가 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다¹⁵⁾. elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내고, ursolic acid등이 elastase 저해제로 이용되고 있다¹⁶⁾. 그리고 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 효소의 활성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실을 유발한다¹⁷⁾. 오이풀 뿌리 분획물을 이용한 elastase 저해 활성 측정 결과는 Fig. 2와 같이 100 ug/ml의 농도에서 분획물 모두 효과가 없었다. 하지만 500~1,000 ug/ml에서 오이풀 뿌리 분획물 중 water 층이 각각 55%와 58%의 효과가 있었다. 그 밖의 분획물에서는 전 농도에서 효과가 미미하였다.

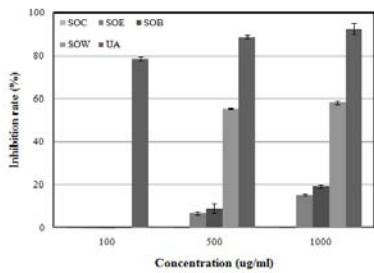


Fig. 2. Inhibition rate of solvent fractions from *Sanguisorbæ Radix* extracts on elastase.

SOC : Chloroform layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOE : Etylactatelayer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOB : n-Butylalcohollayer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOW : Water layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. UA : Ursolic acid(positive control).

2) Collagenase 저해활성 측정

콜라겐은 대부분 피부의 진피층에 존재하며, 피부 전체 건조중량의 약 70~80%를 차지하고 있어 세포의 기질의 대부분을 차지하면서 피부를 지지하는 역할을 한다. 그러나 자연 노화에 따른 세포 활성의 감소와 같은 내적 요인에 의해 콜라겐의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 태양 광선에 의한 활성 산소종의 증가와 같은 외적 요인에 의해 분해가 가속화되어 피부 기질이 파괴되면서 주름이 생성된다¹⁸⁾. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다¹⁹⁾.

오이풀 뿌리 분획물의 collagenase 저해활성을 Fig. 3과 같이 나타내었다. 100 ug/ml에서 ethyl acetate 층, butanol 층, water 층이 각각 88%, 92%, 95%로 대조군인 EGCG((-)-epigallocatechin-3-gallate) 의 65%보다 높은 효과를 나타내었다. 500~1,000 ug/ml에서는 이 세 분획물 모두 95%이상의 높은 효과를 나타내어 EGCG와 비슷한 효과를 나타내었다. 그러나 chloroform 층은 전 농도에서 20%이하의 효과를 나타내어 collagenase 억제 효과가 없었다. 오이풀 뿌리 ethyl acetate, n-butanol, water 층은 대조군 EGCG대비 collagenase 억제 효과가 우수했다.

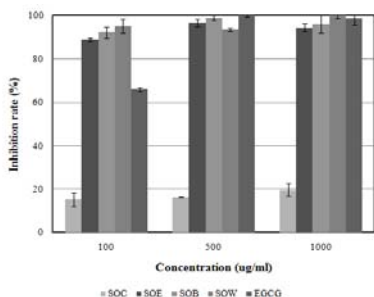


Fig. 3. Inhibition rate of solvent fractions from *Sanguisorbæ Radix* extracts on collagenase.

SOC : Chloroform layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOE : Etylactatelayer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOB : n-Butylalcohollayer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. SOW : Water layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control).

3. 생육 저해환(Clear zone) 측정

오이풀 뿌리 분획물의 항균 효과를 측정한 결과, Table. 1

및 Fig. 4와 같이 나타내었다.

모든 분획물은 농도의존적으로 항균효과를 가지고 있으며 특히 피부염증유발균인 *Staphylococcus epidermidis*균에서 clear zone형성은 n-butanol층에 대해 4mg/disc에서 19.0mm의 높은 항균효과를 나타내었다.

Table1. Antimicrobial activity of *Sanguisorbæ Radix* on several microorganisms

Strains	Sample 1)SOC		2)SOE			3)SOB			4)SOW			
	1A	2B	4C	1	2	4	1	2	4	1	2	4
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	- ^a	-	14 ^b	-	-	14	-	-	13	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	11	14	18	16	18	18	16	17	19	14	15	17
<i>Candida albicans</i> KCTC 7965	-	-	15	-	-	14	-	-	16	-	-	-

a : no inhibition, b : inhibition zone diameter(mm)

- 1) SOC : Chloroform layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 2) SOE : Etyl acetate layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 3) SOB : n-Butyl alcohol layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 4) SOW : Water layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.

A : 1mg/disc, B : 2mg/disc, C : 4mg/disc

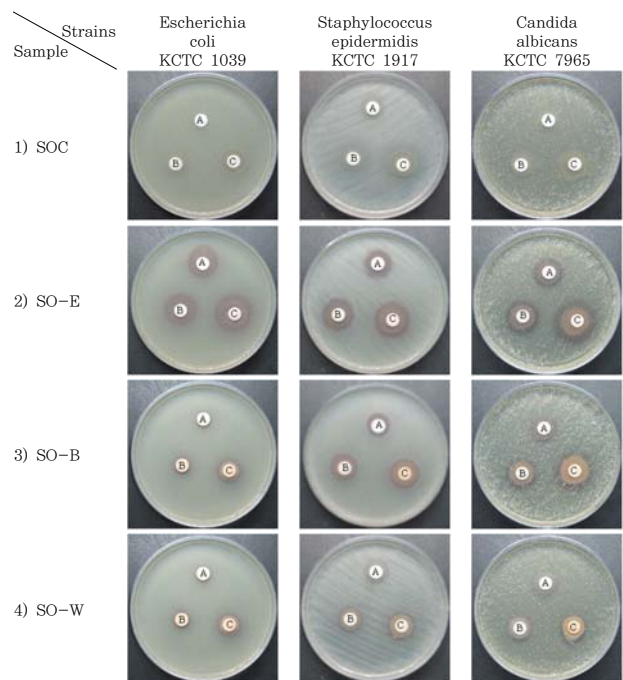


Fig. 4. Antimicrobial activity of *Sanguisorbæ Radix* on several microorganisms

- 1) SOC : Chloroform layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 2) SOE : Etyl acetate layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 3) SOB : n-Butyl alcohol layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.
- 4) SOW : Water layer of *Sanguisorbæ Radix* extracted with acetone.

A : 1mg/disc, B : 2mg/disc, C : 4mg/disc

결론

본 연구에서는 오이풀 뿌리 분획물의 항노화 실험과 항균

실험 통하여 분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 오이풀 뿌리 분획물은 실험한 모든 균에 항균효능을 나타내었으며 특히 피부염증유발균인 *Staphylococcus epidermidis*균의 활성을 효과적으로 저해 하였으며, 농도 의존적으로 증가하였다.
2. 오이풀 뿌리 분획물의 항노화 실험결과, collagenase저해 활성은 water층이 가장 우수했으며 100ug/ml에서 대조군 EGCG보다 훨씬 높은 90%이상의 활성을 나타내었다.

이상의 실험결과, 오이풀 뿌리 분획물은 우수한 항균력과 항노화 효능을 가지는 것으로 확인되었으며, 이를 기능성 한방화장품 제품의 천연물소재로 적용한다면 피부를 개선하고 치료하는데 있어 합성제제들을 대체 할 수 있는 보조제로서의 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업(M-02-20090304152224)으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Korea Institute of Patent Information, 2002(10) ; 0079594.
2. Kim YG, Lee YH, Kang MK, Lee BH, Yun JK, Kim SB, and Kim CJ. Preparation of functional cosmetics containing β -carotene derived from recombinant Escherichiacoil and evaluation of anti-wrinkle efficacy by clinical testing. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 2009 ; 37 ; 399-404.
3. Kligman D. Cosmeveuticals. Dermatol Clin. 2000 ; 18 ; 609-615.
4. Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, and Lee JS. Screeing and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicina lplants. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 2005 ; 13(6) ; 213-216.
5. Mun JH, and Park CW. Flavonoid chemistry of Polygonum sect. Tovara (Polygonaceae) a systematic survey. Pl. Syst. Evol. 1995 ; 196 : 153.
6. Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Choi BW, Park CW, and Han YH Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. Kor J Biotechnol Bioeng. 2004 ; 19 ; 437-440.
7. Kwak JH, Seo UK, and HanYH. Inhibitory effect of Mugwork extracts on tyrosinase activity. Kor. J. BiotechnolBioeng. 2001 ; 16 ; 220-223.
8. Choi WY, Chun HJ, Lee JH, and Baek SH. Effect of methanol extract from Cornis fructus on melanogenesis. Kor J Pharmacogn. 2003 ; 34 ; 70-74.
9. Chun HJ, Choi WH, Baek SH, and Woo WH. Effect of Quercetin on melanogenesis in a melanocyte cells. Kor J Pharmacogn. 2002 ; 33 ; 245-251.
10. Kang BS, Ko UC, Kim SH, No SH, Shin YB, Song HJ, Shin MG, Ann DG, Lee SI, Lee YJ, Lee TH. Collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. In Herbology. 1994 ; 392-393.
11. Son KJ, Lee SA, Lee G D, Kim YS, Jeon JG, Chang KY. Effects of crude Sanguisorbaofficinalis L. extract on the growth and the adherence to hydroxyapatite beads of mutans streptococci. The Journal of the Korean academy of dental health. 2004 ; 28(1) ; 97-104.
12. Ryu MJ, Rim YS, Choi DI, Lee SY. Anti-fungal Activity Against Malasseziafurfur and Anti-inflammatory Activity in RAW264.7 Cells of the Sanguisorbaofficinalis Extracts. Journal of Korean Beauty Society. 2011 ; 225-232.
13. Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, and Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Medica. 1987 ; 54(1) ; 4-10.
14. Wünsch E, and Heindrich HG. Zur quantitativen Bestimmung der Kollagenase. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische chemie. 1963 ; 333 : 149-151.
15. Lee SY, An JH, and Cho HY. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor Peptide from Crataegus pinnatifida bunge in fibroblast cell line HS68cells. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Bio techno. 2003 ; 46 ; 60-65.
16. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, and Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation : implication through selective inhibition of elastase activity. Photochemistry and Photobiology. 2001 ; 74(2) ; 283-90.
17. Roth GJ, Siok CJ, and Ozols J. Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. Journal of Biological chemistry. 1980 ; 255(4) : 1301-1304.
18. Kim SN, Lee SH, Lee BK, and Jang IS. A compositions containing Anthriscus sylvestris Hoffmann extract or Petroselinum sativum Miller extract for external application having effects of improving skin wrinkle. Korea Institute of Patent Information. 2002 ; 10 ; 0079594.
19. El-Domyati M, Attia S Saleh, F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, and Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. Experimental Dermatology. 2002 ; 11(5) ; 398-405.