

작약꽃 가수분해물의 항산화, 항염 및 광노화 억제 효능

이 경 주[†] · 김 유 아 · 박 병 준^{††}

한국콜마(주) 피부천연물연구소
(2023년 8월 4일 접수, 2023년 9월 20일 수정, 2023년 9월 22일 채택)

Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-photoaging Activities of Hydrolyzed Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Flower

Kyung Ju Lee[†], You Ah Kim, and Byoung Jun Park^{††}

Skin & Natural Products Lab., Kolmar Korea Co., Ltd., 61, Heolleung-ro 8-gil, Seocho-gu, Seoul 06800, Korea
(Received August 4, 2023; Revised September 20, 2023; Accepted September 22, 2023)

요약: 본 연구에서는 작약꽃을 가수분해하여 플라보노이드계 화합물인 peonidin 배당체를 비배당체로 전환하여 생리 활성을 증대시키고 신규 화장품 소재로 이용하고자 하였다. 이를 위해 품종별 작약꽃을 추출하여 유효성분 함량이 가장 높은 품종을 선정하였으며, 해당 품종을 이용하여 가수분해를 진행하였다. 이를 통해 고농도의 hydrochloric acid (HCl) 처리가 가수분해에 가장 적합함을 확인하였으며, 효소를 이용한 생물학적 가수분해는 효과가 없음을 확인하였다. 작약꽃 가수분해물에는 붉은색을 나타내는 안토시아닌계 화합물인 peonidin 배당체가 peonidin으로 전환되어 63.3 ppm 함유되어 있음을 분석을 통해 확인하였다. 작약꽃 가수분해물의 생리 활성을 확인해본 결과, 가수분해물이 일반 작약꽃추출물 대비 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼을 소거하는 항산화 활성이 우수하며, nitric oxide (NO) 생성을 저해하는 항염 효과가 증대하였음을 확인할 수 있었다. 또한, ultraviolet A (UVA)에 의한 피부 섬유아세포 손상을 감소시켜 광노화를 억제함을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 작약꽃 가수분해물이 화장품 산업에서 신규 항노화 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

Abstract: This study was conducted to evaluate physiological activity of flower extract of peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by hydrolysis and to use it as a valuable cosmetic ingredients. Four cultivar of peony flowers were extracted, and the highest active ingredient contents was selected, and that cultivar was used for hydrolyzing. The results showed that high concentration of hydrochloric acid (HCl) hydrolyzed, and biological hydrolysis using enzymes had no activity. The deglycosylation of peonidin 3,5-diglucoside occurred by hydrolysis. The hydrolysate contains 63.3 ppm of peonidin, a red-colored anthocyanin compound. The antioxidant activity of hydrolysate was compared with extract. The results showed the strong antioxidant activity in hydrolysate (96%) than extract (82%). In addition, hydrolysate of peony flower showed higher inhibitory activity of NO release than extract. UVA assay using fibroblast cell (CCD-986Sk) showed that hydrolysate increased cell viability than extract under UVA exposure. Based on these results, we anticipate that hydrolysate of peony flower can be used a valuable cosmetic ingredient.

Keywords: peony, hydrolysis, antioxidant, anti-inflammatory, anti-photoaging.

†주 저자 (e-mail: kjlee@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5587
†† 교신저자 (e-mail: A2001@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5570

1. 서 론

작약(*Paeonia lactiflora* Pall.; *Paeonia albiflora* Pall.; peony)은 모란과(Paeoniaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리에는 paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin 등이 함유되어 있다고 알려져 있다[1]. 주성분인 paeoniflorin은 혈관 확장 및 혈액순환을 원활히 하고 골격근의 탄력세포 결합력을 강화하여 근육경련을 완화하고 소화와 흡수를 증진하여 복통을 완화해 주는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[2].

작약은 뿌리를 한약재와 식용으로 주로 이용하는 중요한 작물이지만 꽃에 대한 활용의 예는 찾아보기 어려웠다. 그러나 최근 심미적 기능적 요소를 활용한 꽃잎 추출물 등이 천연 화장품 소재로 활용되기 시작하면서 작약꽃을 이용한 추출물의 기능성을 활용하기 위한 연구가 수행되어 미백 및 항산화 효과 분석 결과가 보고되고 있다[3-5]. 또한, 작약 열수 추출물이 자외선에 의해 생성된 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현을 억제하는 효과가 있으며 피부에 도포 시, 항주름 효과가 있는 것으로 보고되었다[6].

작약꽃에 대해서는 색소를 확인하기 위한 분석 연구가 수행된 이력이 있으며, 이를 통해서 작약꽃잎에는 peonin (peonidin 3,5-diglucoside, Pn3G5G), cyanin (cyanidin 3,5-diglucoside, Cy3G5G), chalcone, isosalipurposide, pelargonidin 등의 성분이 함유되어 있음이 보고되었다[7-9].

작약은 국내외 많은 연구를 통해 추출물에 대한 효능이 입증되었으며, 생리활성이 규명되었으나, 작약꽃의 효능을 증대시키는 방법에 관한 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 가수분해를 통해 작약꽃의 유효성분인 peonidin 함량을 증대시키고 항산화, 항염, 광노화 억제 등의 생리활성을 증대시켜 신규 화장품 소재로서의 가치를 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 작약꽃은 경상북도 의성시에 소재한 대동영농조합법인(Korea)에서 5월에 채취한 꽃을 구입하여 사용하였다. 작약꽃은 품종별 차이를 확인하기 위해 대작약, 의성작약, 태백곶작약, 와인곶작약 4 종의 품종을 구입하여 실험을 진행하였다. 표준품인 peonidin chloride는 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하였으며, 효능 평가를 위하여

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, D9132), L-ascorbic acid (Sigma, A5960), Griess reagent system Kit (Promega, G2930), LPS (MILLIPORE, LPS25), Celecoxib (Sigma, PZ0008)을 사용하였다. 실험에 사용된 대식세포주 RAW 264.7 세포와 인간 피부 섬유아세포(human skin fibroblast cell)인 CCD-986Sk는 ATCC (USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

2.2. 작약꽃 추출

작약꽃 4 종을 세척하고 실온 상태에서 암건조하여 원 재료를 준비하였다. 건조된 작약꽃 20 g을 70% 에탄올 (Daejung, Korea) 600 mL에 넣고 실온에서 3 일간 3 회 추출하였다. 추출된 용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 걸러진 여액을 감압농축기(CCA-1112A, EYELA, Japan)를 이용하여 농축하고 동결건조기(LP10, ILSINBIOLAB, Korea)로 건조시켜 분말 형태의 작약꽃추출물을 얻었다.

2.3. 작약꽃추출물의 가수분해

작약꽃추출물 1 g에 1 N HCl (Daejung, Korea), 6 N HCl (Daejung, Korea), 10% citric acid (Daejung, Korea)를 각각 10 mL 씩 처리하여 90 °C에서 1 h 동안 반응 후, 산 가수분해 여부를 확인하였다. 생물학적 가수분해 효과를 확인하기 위해 작약꽃추출물 1 g에 viscozyme (Novozymes, Denmark) 1 mL과 정제수 9 mL을 처리하여 40 °C에서 1 h 동안 반응하였다.

2.4. HPLC를 이용한 작약꽃추출물의 성분 분석

작약꽃추출물 4 종의 유효성분을 확인하기 위해 high-performance liquid chromatography (HPLC) (SCL-40, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석을 진행하였다. 작약꽃추출물과 가

Table 1. HPLC Conditions for Peonidin Analysis of Peony (*P. lactiflora* Pall.)

Parameter	Condition
HPLC	Shimadzu LC-20A HPLC system
Column	Phenomenon Luna C ₁₈ 250 × 4.6 mm
Mobile phase A	1% Formic acid in water
Mobile phase B	1% Formic acid in acetonitrile
Wavelength	525 nm
Injection volume	10 μ L
Oven temperature	35 °C
Flow rate	1 mL/min

수분해물은 메탄올에 0.1% (w/w) 농도로 희석하고, 여과하여 사용하였다. HPLC 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

2.5. 항산화 효능 시험

항산화 효능 시험을 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay를 수행하였다. 증류수와 ascorbic acid (100 µg/mL)를 비교군으로 설정하고, 작약꽃 추출물과 가수분해물의 항산화 효과를 확인하였다. 작약꽃 추출물과 가수분해물을 농도별로 제조 후, 0.5 mM DPPH 용액과 샘플을 1 : 1로 섞은 다음, 상온에서 30 min 동안 혼합 반응시켰다. Microplate reader (51119200, Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 540 nm 흡광도를 측정하였으며, 상기 실험은 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계 분석하였다. 항산화 효과는 아래 식에 의하여 도출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{100 - [\{\text{시료별 (OD}_{\text{DPPH}} - \text{OD}_{\text{에탄올}})\} / \{\text{dH}_2\text{O (OD}_{\text{DPPH}} - \text{OD}_{\text{에탄올}})\} * 100]}{}$$

2.6. 항염 효능 시험

2.6.1. 세포 독성 시험

세포독성 시험을 위하여 RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 well 당 100 µL씩 분주하고, 37 °C 및 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 샘플을 농도별로 처리 후, 37 °C 및 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양한 뒤, 배양 완료 3 h 전, 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 10 µL 처리하고, 3 h 동안 동일조건으로 배양하였다. 배양을 완료한 후 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 µL를 분주하고 상온에서 10 min 교반한 뒤, microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도 측정하고, 생존율을 아래의 수식에 따라 도출하였다.

$$\text{생존율(\%)} = (\text{실험군 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) * 100$$

2.6.2. Nitric Oxide (NO) Assay

RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 well 당 5 x 10⁵ cells/mL로 100 µL씩 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 NO의 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/mL이 포함된 배지로 교환한 후, 아래와 같이 시료를 준비 후 세포에

처리하였다. 시료는 각각 99.9% ethyl alcohol에 2,000 rpm, 25 °C, 차광조건에서 1 h 동안 섞은 뒤 10,000 rpm으로 10 min 원심분리하여, 상등액을 취하여 사용하였다. 세포 배지를 사용하여 1.5% (w/w)의 농도로 희석하고 세포에 최종 각각 1500 µg/mL이 되도록 처리한 뒤 24 h 재배양하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 질산나트륨(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였고, 항염 효과는 아래 식에 의하여 도출하였다. 상기 실험에서 증류수와 celecoxib (10 µg/mL)을 비교군으로 설정하였으며, 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계 분석하였다.

$$\text{NO inhibition(\%)} = 100 - [\{\text{NO conc. (\mu M)}_{\text{비교군2 or 실험군}} / \{\text{NO conc. (\mu M)}_{\text{비교군1}}\} * 100]$$

2.7. 광노화 억제 효능 시험

2.7.1. 세포 독성 시험

세포독성 시험을 위하여 CCD-986Sk 세포주를 96well plate에 well 당 200 µL로 분주하고, 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 샘플을 농도별로 처리 후, 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양하고, 배양 완료 3 h 전에 5 mg/mL MTT 20 µL 처리한 다음, 3 h 동일조건으로 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고, DMSO 150 µL 분주한 다음, 상온에서 10 min 교반하고, microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도 측정하고, 생존율을 아래의 수식에 따라 도출하였다.

$$\text{생존율(\%)} = (\text{실험군 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) * 100$$

2.7.2. UVA 조사 섬유아세포 모델

CCD-986Sk 세포주를 96 well plate에 well 당 200 µL로 분주하고, 37 °C 및 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서, 24 h 배양하였다. 이어서, 배양된 세포를 UV irradiation system (UV Bio-Sun, Vilber Lourmat, Germany)을 이용하여, UVA (312 nm)를 30 J/cm² 로 조사하였다. 이후에 UV 처리된 세포에 샘플을 농도별로 처리하고, 37 °C 및 5% CO₂ 인큐베이터 조건에서 24 h 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고, DMSO 150 µL 분주 후, 상온에서 10 min 교반하

였다. 그 후, microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도 측정하였으며, 생존율을 아래 식에 의하여 도출하였다

$$\text{생존율(\%)} = (\text{실험군 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) * 100$$

2.8. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0 (Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준 편차로 나타내었으며, 실험값과 대조값 사이의 통계적으로 유의한 차이는 2-표본 *t* 검정을 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)에서 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 작약 품종별 유효성분 함량 확인

작약꽃의 품종별 유효성분 함량을 확인하기 위하여 대작약, 의성작약, 태백작약, 와인작약 총 4 종의 품종을 이용하여 실험을 수행하였다(Figure 1). 대작약과 태백작약은 색깔이 연한 분홍빛을 나타냈으며, 의성작약과 와인작약은 진한 자주색을 나타냈다. 또한, 태백작약과 와인작약은 꽃잎이 겹겹이 자라나는 겹꽃잎으로 품종 간의 형태적 차이가 명확하게 나타남을 확인할 수 있었다.

품종별 작약꽃을 추출하여 생산량과 수율을 확인한 결과, 와인작약 품종의 추출 수율이 50.9%로 가장 우수하였다(Table 2). 각각의 추출물을 이용하여 HPLC 분석을 진행한 결과, 진한 자주색을 나타내는 와인작약과 의성작약 품종에 유효성분 함량이 비교적 높음을 확인하였다(Figure 2). 특히, 겹꽃잎을 가지고 있는 와인작약 품종의 유효성분 함량이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서 이후에는 유효성분 함량이 높은 와인품종의 작약꽃을 이용하여 실험을 수행하였다.

와인 품종의 작약꽃에서 유효성분 함량이 높은 것은 붉은색을 나타내는 플라보노이드계 물질이 자주색 꽃에 더



Figure 1. Morphological characteristics of four cultivars of peony (*P. lactiflora* Pall.). (A) Dae, (B) Uiseong, (C) Taebaek, (D) Wine.

Table 2. The Yield of Extracts from Flower of Peony (*P. lactiflora* Pall.)

Cultivars	Yields (%) ¹⁾
Dae	36.1
Uiseong	45.9
Taebaek	42.8
Wine	50.9

¹⁾ Yields (%) = total flower extract power weight/total flower weight

풍부하게 함유되어 있기 때문으로 추측된다. 선행 문헌에서는 붉은색을 띠는 작약꽃에는 흰색 작약꽃에 없는 안토시아닌 성분인 peonidin 3,5-di-O-glucoside이 확인된다고 보고한 바 있다[10].

작약근을 이용하여 품종별 성분 함량을 비교한 선행 문헌에서도 품종 간 뚜렷한 함량의 차이를 나타내었다[11,12]. 선행문헌에서 영천작약과 의성작약의 유효성분을 분석한 결과 영천작약이 의성작약보다 peoniflorin 함량이 2 배 이상 높은 양상을 보고한바 있어, 품종 간 성분 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. 작약꽃추출물 가수분해

작약꽃 가수분해물 내에 유효성분을 확인하기 위해 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과, 6 N HCl > 1 N HCl >

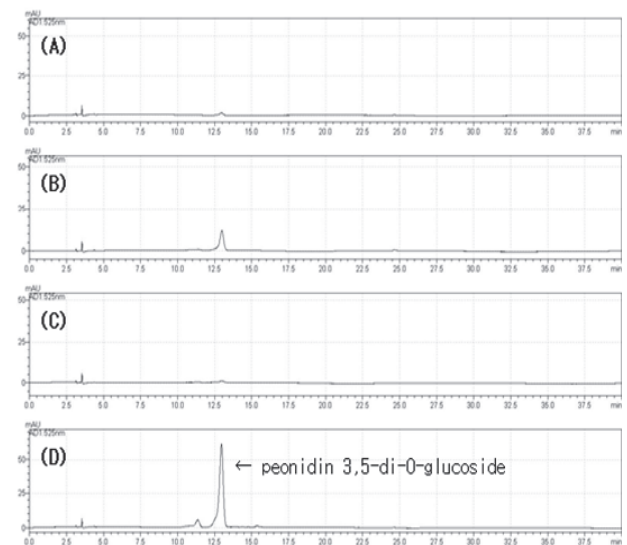


Figure 2. HPLC chromatograms of the extract from four cultivars of peony (*P. lactiflora* Pall.). (A) Dae, (B) Uiseong, (C) Taebaek, (D) Wine.

Table 3. The Concentration of Peonidin-3,5-di-O-glucoside and Peonidin on Extract and Hydrolysate from Peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*)

	Peonidin-3,5-di-O-glucoside (ppm)	Peonidin (ppm)
Extract	58.37 ± 0.33	-
Hydrolysate	-	63.33 ± 2.62

10% citric acid = viscozyme 순으로 가수분해 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 3). HCl을 이용한 산 가수분해의 경우 머무름 시간 13 min에 확인된 peak가 20 min으로 전환된 것을 확인할 수 있었으며, 1 N HCl 처리 시 peak가 일부만 전환된 것에 비해, 농도가 높은 6 N HCl 처리 시 peak 전체가 전환되어 가수분해 효율이 높음을 확인할 수 있었다. 반면에 산도가 낮은 citric acid를 이용한 가수분해는 peak가 전환되지 않았으며, 효소를 이용한 생물학적 가수분해도 효과가 없음을 확인하였다.

6N HCl 처리를 통해 생산한 가수분해물의 생산 수율은 29%로 확인되었으며, HPLC 분석을 통해 가수분해로 인해 전환된 성분이 플라보노이드계 화합물인 peonidin임을 확인하였다. 정량 분석을 통해 일반 작약꽃추출물에서는 peonidin이 검출되지 않았지만 가수분해물은 peonidin 성분

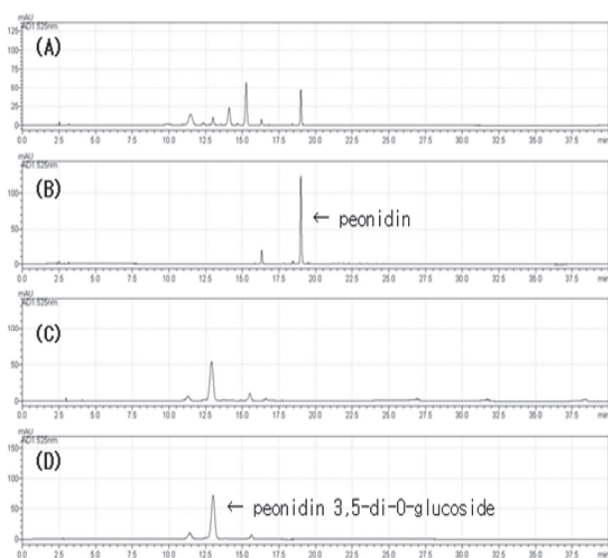


Figure 3. HPLC chromatograms of the hydrolysate from peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*). (A) 1 N HCl, (B) 6 N HCl, (C) 10% Citric acid, (D) Viscozyme.

이 63.33 ppm 함유하고 있음을 확인하였다(Table 3).

작약속 식물의 꽃에는 peonidin 3,5-di-O-glucoside, pelargonidin 3,5-di-O-glucoside, cyanidin 3,5-di-O-glucoside, pelargonidin 3-O-glucoside, peonidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-glucoside 등의 6 종류의 안토시아닌계 화합물이 함유되어 있어 꽃이 붉은색을 나타낸다는 것이 보고된 바 있다[13-15].

본 연구에서는 작약꽃 가수분해물 내에 함유되어 있는 peonidin 배당체가 HCl에 의해 가수분해되어 비배당체 형태인 peonidin으로 전환된 것으로 보여진다.

3.3. 가수분해물의 항산화 효과

작약꽃에 산 처리 후 구조가 변환된 성분이 항산화 활성에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. DPPH radical을 활용하여 일반 작약꽃추출물과 가수분해물의 항산화 효과를 측정된 결과, 80 µg/mL의 농도에서 일반 작약꽃추출물의 라디칼 소거능이 82%인데 반해 가수분해물은 96%의 소거능을 나타내어 항산화 효능이 더 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이러한 결과를 통해 작약꽃에 산 처리를 하여 peonidin 배당체를 비배당체로 전환함으로써 항산화 활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

기존의 선행 연구로는 적양과 분말에 산처리를 하여 quercetin 배당체를 비배당체로 전환하여 항산화 효능이 증대된 연구가 있으며, 사과 껍질에 산을 처리하여 플라보노이드 배당체의 구조적 전환을 통하여 항산화 활성을 증가시킨 연구가 보고된 바 있다[16,17].

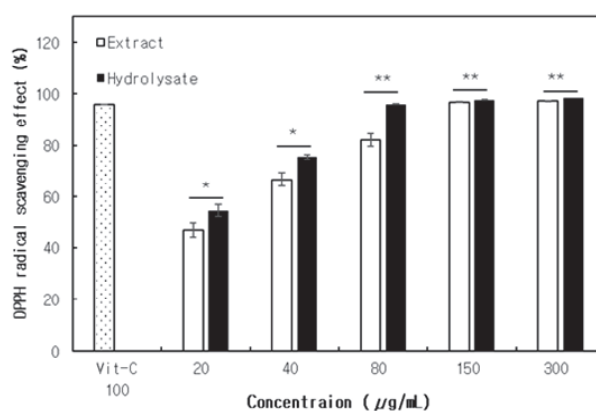


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of extract and hydrolysate from peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*). Positive control used L-ascorbic acid (100 µg/mL). The results are means ± SD, N = 3, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle group.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 강력한 산화 작용으로 세포막 혹은 세포 소기관을 비롯한 DNA 파괴 등을 일으키며 다양한 질환 및 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 ROS로부터 세포를 보호할 수 있는 항산화 물질을 섭취하거나 화장품과 같은 제품 등을 활용하여 외적으로 공급하여 체내 항산화 능력을 증대시키는 것이 중요하다[18,19].

본 연구를 통해서 작약꽃추출물을 산 가수분해함으로써 peonidin 배당체를 비배당체로 전환시켜 항산화 활성을 증대시키는 것을 입증하였다.

3.4. 가수분해물의 항염 효과

3.4.1. 세포 독성

세포 독성을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 이용하여 MIT assay를 수행한 결과, 작약꽃추출물과 가수분해물 모두 100 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 5). 따라서, NO assay에서는 본 세포 생존을 결과를 고려하여 진행하였다.

3.4.2. 항염 효과

산 처리에 의한 작약꽃의 유효성분 구조 변화가 항염 효과에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 NO assay를 이용하여 항염 효과를 측정하였다. 그 결과, 5 ~ 100 µg/mL의 농도로 처리할 경우, 일반 작약꽃추출물에 비하여 가수분해물의 NO 생성 억제 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 6). 특히, 처리 농도가 100 µg/mL인 경우 가수분해

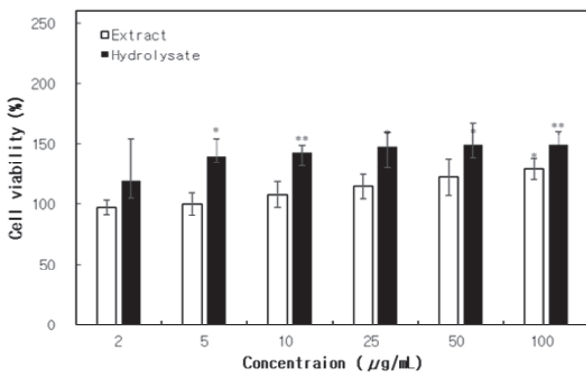


Figure 5. Cell viability of extract and hydrolysate from peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*) on RAW 264.7 cells. The cells were treated with extract for 24 h. The results are means ± SD, N = 3, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle group.

물이 일반 추출물 보다 약 1.5 배 이상 높은 NO 제거 효율을 보임을 확인할 수 있었다.

Nitric oxide (NO)는 적절한 농도로 존재하면 다양한 생리활성을 조절하는 중요한 역할을 하지만 염증반응 등에 의하여 고농도로 존재하면 peroxynitrite 혹은 nitrogen dioxide 등의 생성을 촉진하여 세포 내 유해 산화물의 축적 및 DNA 손상 등을 일으키며, 이는 암과 같은 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다[20,21]. 따라서 항노화를 위해서는 염증 인자인 NO 생성을 조절하는 것이 필요하다.

작약은 예로부터 한국과 중국에서 한방 약재로써 사용 해오던 식물로 작약이 가지고 있는 다양한 monoterpene glycosides 성분에 의해서 NO 생성을 억제하고 항염 효과를 나타낸다는 연구가 보고되었다[22]. 특히, peonidin-3-O-glucoside 화합물은 TNF-α receptor 신호를 억제하여 항염 효과를 나타낸다는 연구가 보고된 바 있다[23].

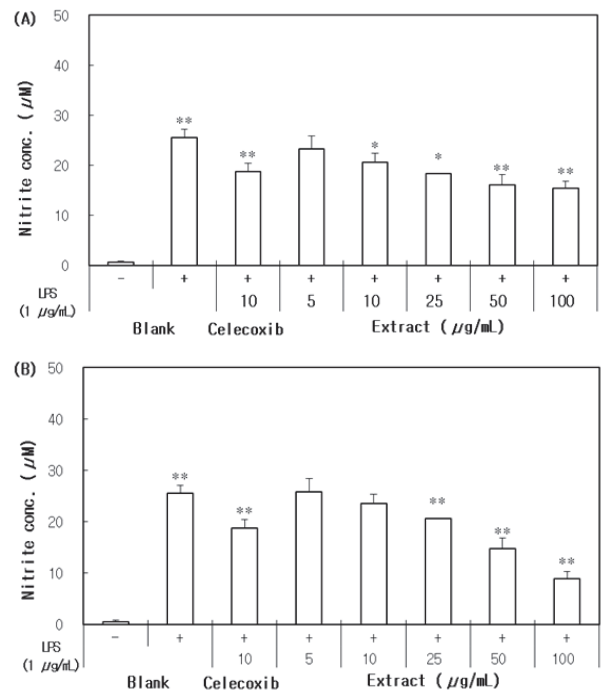


Figure 6. Inhibitory effect of extract and hydrolysate from peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*) on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. (A) extract (B) hydrolysate. Inhibition rate of NO production compared by vehicle group. The production of NO was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL). Positive control used celecoxib (10 µg/mL). Data are means ± SD, N = 3, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle group.

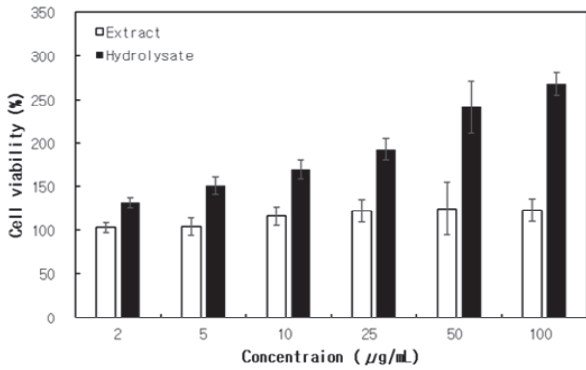


Figure 7. Cell viability of extract and hydrolysate from peony (*P. lactiflora* PALL. var. *wine*) on fibroblast cells (CCD-986Sk cells). The cells were treated with extract and hydrolysate for 24 h. The results are means \pm SD, N = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with the vehicle group.

본 연구를 통해서 작약꽃추출물을 산 처리함으로써 peonidin-3,5-di-O-glucoside를 peonidin으로 전환시켜 항염 활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

3.5. 가수분해물의 광노화 억제 효과

3.5.1. 세포 독성

섬유아세포인 CCD-986Sk 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 MIT assay를 실시한 결과, 일반 작약꽃추출물은 100 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성을 나타내지 않으며, 가수분해물의 경우에는 5 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(Figure 7). 가수분해물을 10 µg/mL 농도 이상 처리할 경우, 세포가 과도하게 증식하여 독성이 있음을 확인하였다. 따라서 UVA 조사 섬유아세포 모델에서는 본 독성 시험 결과를 고려하여 처리 농도를 선정하였다.

3.5.2. 광노화 억제 효과

UVA 조사 섬유아세포 모델을 통해서 작약꽃추출물과 가수분해물의 광노화 억제 효과 차이를 확인해본 결과, 일반 추출물보다 가수분해물 처리 시 UVA에 의해 손상된 진피 세포의 생존율이 증대됨을 확인할 수 있었다(Figure 8). 특히, 가수분해물을 5 µg/mL 처리 시, 섬유아세포의 생존율이 117%로 동량의 작약꽃추출물에 비해 세포의 생존율이 2.25 배 높음을 확인하였다.

UVA는 DNA 손상과 세포사멸 수용체 활성화, 그리고 ROS를 생성시켜 세포사멸을 유도하고, 축진된 ROS는 직접 혹은 간접적으로 염증반응, 광감작, 암화 등을 유도한다고 알려져 있다[24,25]. 그러므로 자외선과 같은 외부 환경에 의해 피부는 노화가 촉진되고 피부질환이 발생하게 된다.

따라서 본 실험을 통하여 작약꽃추출물과 가수분해물은 자외선에 의한 진피 세포 손상을 억제할 수 있다는 것을 확인하였으며, 특히, 가수분해물의 경우 낮은 농도에서도 일반 작약꽃추출물에 비해 우수한 광노화 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

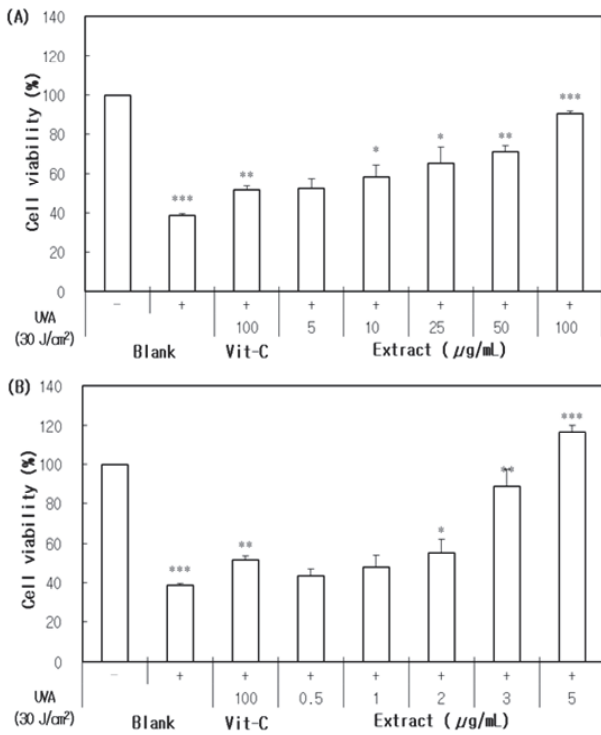


Figure 8. Photo-toxicity inhibitory effect of extract and hydrolysate from peony (*P. lactiflora* Pall. var. *wine*) on fibroblast cells (CCD-986Sk cells). (A) extract (B) hydrolysate. The cells were incubated for 24 h at 37 °C, were treated with 30 J/cm² of UVA and cell viability was measured. Data are means \pm SD, N = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with the vehicle group.

4. 결 론

본 연구에서는 식품, 의약품 및 화장품 소재로 이용되고 있는 작약의 부가가치를 향상시키고자 이의 항산화, 항염 그리고 광노화 억제 효과를 확인하였다. 대작약, 의성작약,

태백작약, 와인작약 4 종의 꽃을 추출하여 HPLC 분석을 수행함으로써 품종별 유효성분의 함량이 각기 다름을 확인하였다. 유효성분 함량이 가장 높은 와인품종을 이용하여 가수분해 실험을 진행하였으며, 6 N HCl, 1 N HCl, citric acid, 효소 처리 중에서 산도가 높은 6 N HCl이 가수분해에 가장 적합함을 확인하였다. 또한, 산 가수분해를 통해서 peonidin 배당체가 비배당체 형태인 peonidin으로 변환되어 가수분해물 내에 63.3 ppm이 함유되어 있음을 확인하였다. 가수분해물은 일반 추출물보다 항산화 활성이 우수함을 DPPH assay를 통해서 확인할 수 있었으며, 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 통해 NO 생성에 대한 억제 효과 또한 우수함을 확인하였다. 또한, 섬유아세포인 CCD-986Sk 세포를 이용한 UVA 조사 섬유아세포 모델을 통하여 작약 꽃 가수분해물이 일반 작약꽃추출물 대비 자외선에 대한 진피 세포 손상을 억제하여 광노화를 억제하는 효능이 있음을 알 수 있었다. 본 연구를 통해서 작약꽃을 가수분해하여 고농도의 peonidin을 함유한 신규 기능성 소재의 개발이 가능함을 확인하였으며, 항산화, 항염 그리고 광노화 억제 효과를 확인하였으므로 화장품 산업에서 기능성 신소재로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. J. D. Chung, J. S. Ham, and J. K. Sohn, Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* Pall, *Korean J. Plant Tissue Culture.*, **22**(1), 47 (1995).
2. J. T. Cheng, C. J. Wang, and F. L. Hsu, Paeoniflorin reverses guanethidine-induced hypotension via activation of central adenosine A1 receptors in Wistar rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**(10), 815 (1999).
3. N. H. Lee, S. J. Lee, D. S. Jung, H. J. Bu, H. C. Yang, and K. Z. Riu, Screening of the tyrosinase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju, *Kor J. Pharmacogn.*, **32**(3), 175 (2001).
4. Y. O. Jung, N. B. Park, S. J. Jung, J. S. Kwak, and J. H. Han, Effect of whitening, anti-aging on extract of *Paeonia lactiflora* flower, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **24**(3), 452 (2010).
5. M. K. Lee, J. S. Park, H. J. Song, and S. U. Chon, Effects of polyphenol and catechin levels on antioxidant activity of several edible flower extracts, *Korean J. Plant Res.*, **27**(2), 111 (2014).
6. M. H. Kwon, S. Y. Choi, and Y.C. Kim, Inhibitory effects of *Peonia japonica* water extract on skin aging, *J. Environ. Toxicol.*, **24**(2), 169 (2009).
7. K. Hayashi, The chemistry of flavonoid compounds, ed. T. A. Geissman, 248, Pergamon Press, Oxford (1962).
8. B. A. Bohm, The flavonoids, eds. J. B. Harbone, T. J. Mabry, and H. Mabry, 442, Chapman & Hall, London (1975).
9. F. C. Cooper, American Peony Society 75 years, ed. G. M. Kessenich, 141, Amer. Peony Soc., Minnesota (1970).
10. D. Zhao, W. Tang, Z. Hao, and J. Tao, Identification of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in two coloured tree peony flowers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **459**(3), 450 (2015).
11. M. G. Choung, Y. N. An, K. H. Kang, Y. S. Cho, and J. H. Kim, Comparison on the extract content by different processing method in peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) root, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **11**(3), 201 (2003).
12. M. G. Choung, K. H. Kang, and Y. N. An, Isolation and determination of phenolic compounds in peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) root, *Korean J. Crop Sci.*, **45**(2), 83 (2000).
13. T. Hosoki, M. Hamada, T. Kando, R. Moriwaki, and K. Inaba, Comparative study of anthocyanins in tree peony flowers, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **60**(2), 395 (1991).
14. L. S. Wang, F. Hashimoto, A. Shiraiishi, N. Aoki, J. J. Li, and Y. Sakata, Chemical taxonomy of the Xibei tree peony from China by floral pigmentation, *Journal of Plant Research*, **117**, 47 (2004).
15. S. Parker, B. May, C. Zhang, A. L. Zhang, C. Lu, and C. C. Xue, A pharmacological review of bioactive constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch, *Phytotherapy Research*, **30**(9), 1445 (2016).
16. M. R. Kim, J. H. Lim, and J. S. Song, Acid treatment effects on the contents of quercetin glycosides and aglycone in red onion powder, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **54**(2), 115 (2022).
17. J. Moon, H. Heu, J. Lee, and J. Yang, Acid treatment

- enhances the antioxidant activity of apple peel by converting flavonoid aglycones to glycosides, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **52**(2), 146 (2023).
18. C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell*, **153**(6), 1194 (2013).
19. K. H. Wagner, D. Cameron-Smith, B. Wessner, and B. Franzke, Biomarkers of aging: from function to molecular biology, *Nutrients*, **8**(6), 338 (2016).
20. I. Iontcheva, S. Amar, K. H. Zawawi, A. Kantarci, and Van T. E. Dyke, Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction, *Infection and immunity*, **72**(4), 2312 (2004).
21. G. L. Su, Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **283**(2), G256 (2002).
22. H. M. Xu, W. Wei, X. Y. Jia, Y. Chang, and L. Zhang, Effects and mechanisms of total glucosides of peony on adjuvant arthritis in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **109**(3), 442 (2007).
23. D. R. T. Sari, J. R. K. Cairns, A. Safitri, and F. Fatchiyah, Virtual Prediction of the Delphinidin-3-O- glucoside and Peonidin-3-O-glucoside as Anti-inflammatory of TNF- α Signaling, *Acta Informatica Medica*, **27**(3), 152 (2019).
24. Z. Assefa, A. Van Laethem, M. Garmyn, and P. Agostinis, Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1755**(2), 90 (2005).
25. D. R. Bickers and M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *Journal of Investigative Dermatology*, **126**(12), 2565 (2006).