

유근피로부터 추출한 다당류의 화장료적 특성

김 영 실[†] · 김 중 현 · 김 기 호*

(주)참존 응용연구소, *(주)바이올랜드 생명공학연구소

Cosmetical Properties of Polysaccharides from the Root Bark of *Ulmus davidiana* var. Japonica

Young Sil Kim[†], Jong Heon Kim, and Ki Ho Kim*

R&D Center, Charmzone, 1720-4, Taejang 2-dong, Wonju-si, Kangwon-do 220-962, Korea

*R&D Center, Bioland Ltd.

요 약: 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. Japonica)는 한국이나 중국 등에서 오래 전부터 전통의 민간요법으로 열매, 뿌리를 염증 및 종창 환부에 도포하여 항염제로 이용하거나, 중탕 추출하여 소화기 궤양 및 종양 등에 사용하여 왔다. 또한 한방에서는 유근피가 다량의 점액과 탄닌을 함유하고 있어 완화제, 치습, 이뇨, 소종독(消腫毒) 등에 이용하여 오고 있다. 본 연구에서는 유근피로부터 다당류를 분리 정제한 후 화장료 조성물로서의 사용 가능성을 확인하고자, 유근피 추출 다당류의 보습효과 및 소염효과 등을 조사하였다. 유근피에서 침출법으로 다당류를 분리정제한 후 가수 분해하고, 가수분해 생성물을 HPLC로 분석하여 주구성당분이 람노오스, 갈락토오스, 글루코오스 동입을 확인하였고 GPC로 측정된 평균분자량은 20,000이었다. Corneometer CM820 등을 이용한 보습효능 실험 결과 히알루론 산과 견줄만한 효능을 확인할 수 있었으며, carrageenin에 의해 유도된 부종억제 효능 실험에서는 ketoprofen에 버금가는 좋은 효능을 나타내었다. 결론적으로 유근피 추출 다당류가 좋은 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: The fruit or root of *Ulmus davidiana* var. Japonica and its extract has traditionally been used as anti-inflammation medicines as well as a remedy of the digestive ulcer for a long time. *Ulmus davidiana* var. Japonica has also been used to cure palliative and diuresis, because it contains lot of mucus and tannin. In this study, we examined the moisturizing effect and anti-inflammation effect of polysaccharides extracted from *Ulmus davidiana* var. Japonica to investigate whether it can be used as a cosmetic ingredient or not. The polysaccharides were extracted from *Ulmus davidiana* var. Japonica. Then the hydrolyzed was obtained through the hydrolysis. It has been ascertained that the polysaccharides are mainly composed of rhamnose, galactose, and glucose through HPLC experiments, and it has 20,000 of the molecular weight and 89.3 dL/g of intrinsic viscosity. In a moisturizing test of measuring water loss in a desiccator and moisture content by Corneometer CM820, *Ulmus davidiana* root extract showed a similar moisturizing effect as hyaluronic acid. And its anti-inflammation effect on carrageenin-induced edema evaluated by measuring the thickness of swelling over paw induced by carrageenin (25 μ L of 2% carrageenin saline injection), the % swelling over paw treated with *Ulmus davidiana* root extract was much less than that of paw treated with carrageenin only. The anti-inflammatory effect of *Ulmus davidiana* root extract was almost similar to that of ketoprofen. These results can say that *Ulmus davidiana* root extract can be effectively used as a cosmetic ingredient.

Keywords: *Ulmus davidiana*, moisturizing effect, anti-inflammatory, polysaccharide, cosmeceuticals, swelling

1. 서 론

느릅나무(*Ulmus davidiana* var. Japonica)는 느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 낙엽성 활엽 교목으로 높이가 약

30 m에 달하는 큰 키의 나무로서 꽃은 가지의 상단에서 황록색의 작은 꽃이 4~5월에 피며, 과실은 5~6월에 성숙한다. 우리나라의 전국의 산야에서 자생하며 지리적으로 만주, 일본, 중국에 널리 분포한다. 이 나무의 수피를 유피(楡皮) 또는 유백피(楡白皮)라고도 하며 뿌리의 껍질 및 수피 건조한 것을 유근피(楡根皮)라고 한다.

[†] 주 저자 (e-mail: silky@charmzone.co.kr)

민간에서는 오래 전부터 느릅나무 껍질(유근피)과 열매, 뿌리를 물에 담가두어 용출되는 끈끈한 점액질을 고약으로 만들어 염증 및 종창 환부에 도포하여 소염제로 이용하였고, 증탕 추출하여 소화기 케양 및 종양에도 사용하였다. 그리고 느릅나무의 열매와 꽃잎을 섞어서 풀처럼 만들어 두면 발효되는데 이것을 기생충을 죽이는 음식으로 이용하였을 뿐만 아니라 떡과 국수와 같은 음식으로도 이용하였다. 또한 한방에서는 유근피, 유백피가 다량의 점액과 탄닌을 함유하고 있어 완화제, 치습, 이뇨, 소종독(消腫毒)에 이용하였다[1,2].

국내 자생하는 *Ulmus*속 식물의 성분에 관한 연구로는 Son 등은 당느릅나무(*U. davidiana*) 근피에서 (+)-catechin 및 그 유도체의 분리를 보고하였으며[3], Kim 등은 참느릅나무(*U. parvifolia*)의 잎에서 isoquercetin, rutin 등을 분리하였으며[4], Moon 등은 참느릅나무에서 sterols 및 sterol glucoside, catechin rhamnoside 등을 분리하였다[5]. 또한 활성에 관한 연구로는 느릅나무 수피엑스의 위염, 위궤양 등에 대한 항염증 작용[6], 메탄올 또는 수침액스의 소염, 진통작용[7,8], 유산균, 일반세균에 대한 항균활성[9], 그리고 수피의 페놀성 화합물들의 항산화 활성[10] 등이 보고되어 있다.

피부의 최외각층인 각질층은 피부의 수분증발 및 흡수 조절기능과 화학물질, 독성물질 및 세균 등의 외부물질의 침투에 대한 장벽기능을 가지고 있다. 각질층은 납작한 모양의 각질세포(keratinocyte)와 그 사이를 세포간 지질(intercellular lipid)이 채우고 있으며 라멜라 형태를 이루고 있다. 피부의 각질층은 약 20%의 수분을 함유하고 있으며, 수분함량이 피부의 유연성, 윤택성을 결정하는 중요한 인자가 된다는 것이 잘 알려져 있다. 일반적으로 각질층의 수분이 10% 이하로 되는 경우에는 피부의 생리작용이 저하되어 피부가 본래의 기능을 잃게 되어 거칠어지게 되고, 각종 피부 트러블의 원인이 된다. 따라서 피부의 건조를 막기 위한 보습제의 사용은 화장품에서 거의 필수적이다. 화장품에서 요구하는 보습제의 조건으로는 첫째, 적절한 흡습력을 가져야 한다. 둘째, 흡습력이 주위 환경조건의 변화에 의해 영향을 적게 받아야 한다. 셋째, 피부에 대한 친화성이 좋아야 한다. 넷째, 피부와 생체에 대한 안전성이 좋아야 한다. 다섯째, 화장품에서 사용되는 다른 성분들과의 상용성이 우수해야 한다.

현재 널리 사용되고 있는 보습제로는 글리세린, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜과 같은 폴리올류, 아미노산, 피롤리돈 카르보산염, 젖산염과 같은 천연보습인자, 히알루론산염, 콘드로이친 설페이트, 키토산 등의 생체 고분자물질 등이 있다. 이들 중 몇몇은 비록 우수한 보습력을 나타내지만 합성된 화합물이거나 동물 유래의 보습제들이기 때문에 적정량 이상 사용되었을 경우에는 피부자극이나 오

염에 의한 감염을 배제할 수 없는 보습제들이다.

본 연구에서는 유근피로부터 추출, 분리, 정제한 다당류 추출물이 매우 우수한 피부 보습력과 소염효과를 가지고 있어서 기능성 화장품의 조성물로의 이용 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 기구

유근피는 한국에서 생산 건조한 제품을 경동시장에서 구입하여 세질하여 사용하였다. 용매는 시약급을 사용하였으며 추가적인 정제과정 없이 사용하였다. 일반적인 시약들은 Sigma-Aldrich사의 시약급을 구입하여 정제없이 사용하였다. 동물실험은 체중이 23 ± 3 g인 ICR계 웅성 생쥐를 제일상사로부터 공급받아 항온($22 \pm 3^\circ\text{C}$), 항습($50 \pm 14\%$)이 유지되는 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2.2. 다당류의 분리 정제

완전 건조시킨 유근피 1 kg을 정제수 30 kg에 넣고, 추출기로 증탕 조건에서 24 h 추출한 후 400 메쉬 여과포로 여과하고, 에탄올 22 kg에 침전, 여과, 건조시켜 105 g의 고형분을 얻었다. 이후, 이 고형분을 다시 정제수에 용해시키고, 0.45 μm 필터로 여과하여 10.5 kg의 수용액을 얻었다. 에탄올에 침전하여 점성이 있는 고형분을 얻었다.

2.3. 보습력 측정[11]

유근피 추출물의 보습효과를 확인하기 위하여 데시케이터 내에서 수분손실과 피부의 수분을 측정하였다. 비교 실험은 시료 자체 측정 시에는 증류수, 유근피 추출 다당류(1.0% 수용액), 히알루론산 나트륨염(1.0% 수용액), 1,3 부틸렌 글리콜(1.0% 수용액)을 사용하여 비교하였으며, 제품 측정 시에는 각각의 시료를 10 중량 %로 화장품 기본조성에 첨가제 개념으로 적용한 제품을 사용하였다. 제품 측정 시 사용되는 성상은 점도가 30,000~35,000 cps (20°C)이고 pH가 6.7 (20°C)이었다.

2.3.1 데시케이터를 이용한 보습력 측정[12]

각각의 시료 10 g을 실리카겔 블루와 마그네슘 클로라이드($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 특급시약) 포화 수용액을 이용하여 각각의 상대습도(R.H.)를 15%, 55%로 유지한 데시케이터($240 \times 130 \times 220$ mm) 중에서 37°C 에서 방치하고, 시간에 따른 중량변화를 관측하여 얻은 증발량 이용하여 증발률을 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

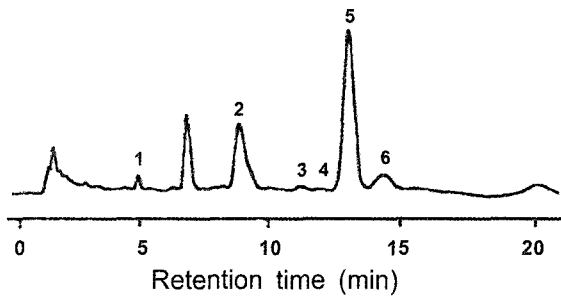


Figure 1. Liquid chromatogram of the hydrolysis products of Ulmus extract. Conditions: CarboPac PA1 column, PED2 with integrated amperometry detector, eluent: 16 mM NaOH, flow rate: 1.0 mL/min; (1) fucose, (2) rhamnose, (3) galactosamine, (4) glucosamine, (5) galactose, (6) glucose.

수분 증발율 = $((A - B)/A) \times 100$ (%)

A: 초기의 시료 및 시료 적용제품 무게 (g)

B: 각 시간대별 시료 및 시료 적용제품의 무게 (g)

2.3.2. Corneometer를 이용한 보습력 측정[13]

Corneometer CM820 (COURAGE + KHAZAKA, West Germany) 실내 온도 20~25°C, 상대 습도 45~55%로 유지시킨 피부기기 측정실에서 10명의 피검자에 대하여 좌, 우 팔을 측정부위로 하여 직경 40 mm circle의 면적에 시료자체 측정 시 0.05 mL/circle, 제품 측정 시 0.05 g/circle의 시료를 각각 적용하여 측정한다. 또한 1 circle당 5회를 측정하여 평균값으로 표시하였다.

이 측정 결과를 가지고 시간에 따른 보습력 변화율을 계산하였다. 계산식은 다음과 같다:

보습력 변화율 = $((B - A)/A) \times 100$ (%)

A: 시료 처리 전의 피부습도

B: 시료의 피부 습도

2.4. 세포독성

3T3 Fibroblast cell line (Swiss albino mouse cell)를 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO BRL)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100 μ L로 증폭된 10⁴ cell/well의 밀도를 가진 96 well plate에 놓았다. 그리고 24 h 동안 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 샘플을 첨가한 후, 세포들은 또 24 h 동안 배양하였다. 세포들의 생존과 증식은 MTT assay에 의해 측정되었다. MTT 용액(100 μ L)은 각 wells에 첨가되었고 4 h 동안 배양하였다. Overnight 후, 10% SDS를 함유하는 0.01 M HCl 100 μ L를 첨가했다. 형성된 Formazan은 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다

Table 1. Constituents of Ulmus Extract

Constituent	Content (wt%)
Rhamnose	57.37
Galactose	35.50
Glucose	4.98
Fucose	1.13
Galactosamine	0.55
Glucosamine	0.48

2.5. 소염작용

실험 2 h 및 1 h 전에 100 mg의 시험시료(시료 및 시료 5% 적용 크림)를 생쥐의 우측 발에 50번 정도 문질러 적용한 후, 2% carrageenin saline를 25 μ L를 주사한 후 1 h 간격으로 6 h을 발의 두께를 측정하였다. 디지털 두께 측정기(Electronic digital thickness gauge, Chicago brand, USA)를 사용하여 얻어진 결과를 아래의 공식을 이용하여 족부종률(% Swelling)을 산출하였다.

% Swelling = $\frac{(E - Ec)}{Ec} \times 100$

Ec: 주사 전 발의 두께

E : 주사 후 발의 두께

위에서 산출한 족부종률로부터 부종억제률(% Inhibition)을 계산하였다.

% Inhibition

= $(1 - \frac{\% \text{Swelling of additive treated rat}}{\% \text{Swelling of control group}}) \times 100$

3. 결과 및 고찰

3.1. 다당류의 분리 및 정제

유근피로부터 침출법에 의하여 다당류를 분리 정제하였다. 이 고형분을 탄소 핵자기 공명장치(¹³C NMR, 150 MHz, solvent: D₂O)로 분석한 결과 주로 탄수화물로 구성되었음을 확인하였다(data not shown). 겔투과 크로마토그래피(GPC, System: Water TH 150C Plus GPC, Column: Ultrahydrogel 250 (7.8 \times 300 mm, waters), Ultrahydrogel 500 (7.8 \times 300 mm, waters), eluent: pH 4.0, 0.1 M NaNO₃ 수용액, 온도: 30°C, flow rate: 0.9 mL/min)를 이용하여 구한 평균분자량은 20,000이었다. 점도계(Cannon-Ubbelohde Viscometer, solvent: 물, condition: 20 \pm 0.2°C)를 이용하여 구한 고유점도(intrinsic viscosity)는 89.3 dL/g 이었다.

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, System: Bio-LC

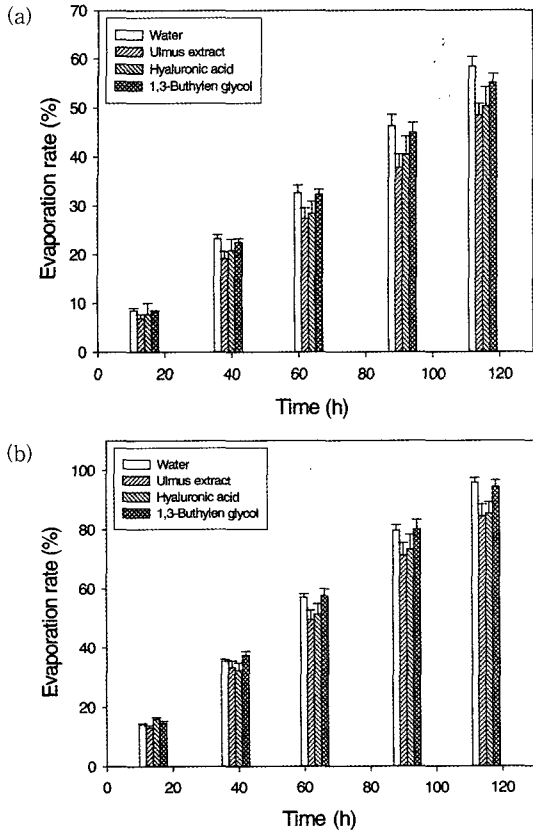


Figure 2. Water loss profile of Ulmus extract as a function of time in a desiccator: at 15% RH (a); and at 55% RH (b). The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments.

DX-300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), Column: CarboPac PA1 (4.5 × 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), 이동상: 16 mM NaOH, 유속: 1.0 mL/min)를 이용하여 상기 고형분을 가수분해한 후 그 성분 및 그 조성을 분석하였다(Figure 1). 확인된 당들에 대하여 각각의 당을 기준물질로 하여 농도를 계산하고 무게 비율로 환산한 결과를 Table 1에 표시하였다. 유근피 추출 다당류는 람노오스, 갈락토오스, 글루코오스, 푸코오스, 갈락토오스아민 및 글루코오스아민의 단당류들로 구성되어 있으며, 이들 중에서 람노오스와 갈락토오스의 함량이 가수분해된 단당류들의 총량에 대해 90% 이상임을 확인할 수 있었다.

3.2. 보습력 측정

유근피 추출 다당류의 보습효과를 확인하기 위하여 데시케이터내에서 수분손실과 comeometer을 이용하여 피부의 수분을 측정하였다. 상대습도 15%는 실험상 유지할 수 있는 최저 조건이고 이러한 최저 상대습도 조건에서의 수분 증발율의 측정을 위한 것이며, 참고적으로 기상

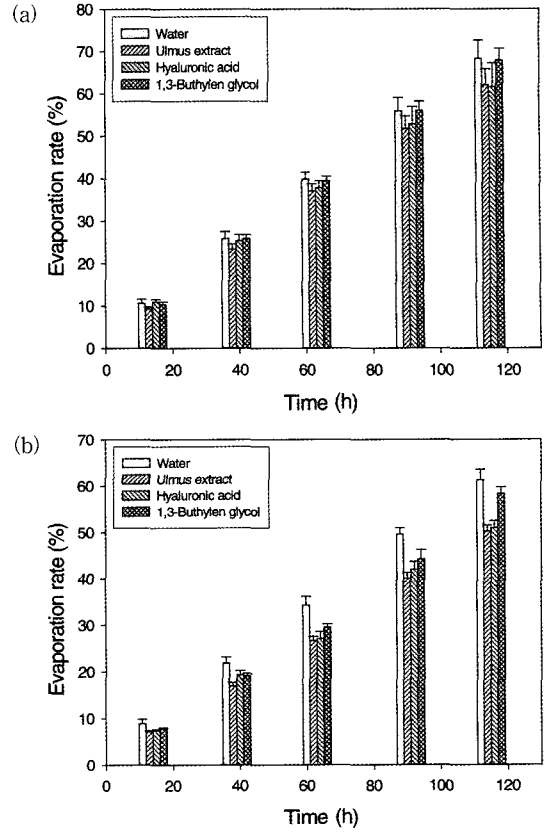


Figure 3. Water loss profile of formulation Ulmus extract as a function of time in a desiccator: at 15% RH (a); and at 55% RH (b). The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments.

청 자료에 의하면 화장품을 주로 사용하는 기간인 1~4 월과 10~12월 사이에 국내의 최저 평균 상대 습도는 1996~1998년 평균 21%이었다. 55%는 상대습도가 50%대일 경우의 수분 증발율을 측정하기 위하여 상대습도를 설정하였으며, 참고적으로 1999년 10월~2000년 4월까지 (일반적으로 기초화장품을 주로 사용하는 시기)의 전국 7대 광역시와 영동지역의 강릉을 포함하여 8대 도시의 평균 상대 습도가 48~65%이었다. 일정한 상대습도를 조절하기 위하여 실험온도는 25°C로 고정하였다. 시간이 지남에 따라 각 조건별 각각 5회 측정을 실시하여 나타난 결과를 평균으로 표시하였다. 데시케이터내에서 시료 자체 (1% 수용액)의 보습력 측정결과를 Figure 2에 나타내었다. Figure 2에서 볼 수 히알루론산에 비하여 조금 더 좋은 보습력을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 제품에 적용한 제형(1% 수용액의 10% 조성함유)을 가지고 보습력을 측정된 결과를 Figure 3에 나타내었으며 역시 유근피 다당 추출물이 제일 좋은 결과를 나타내었으며 시료 자체만 가지고 실험한 결과와 유사한 결과를 확인할

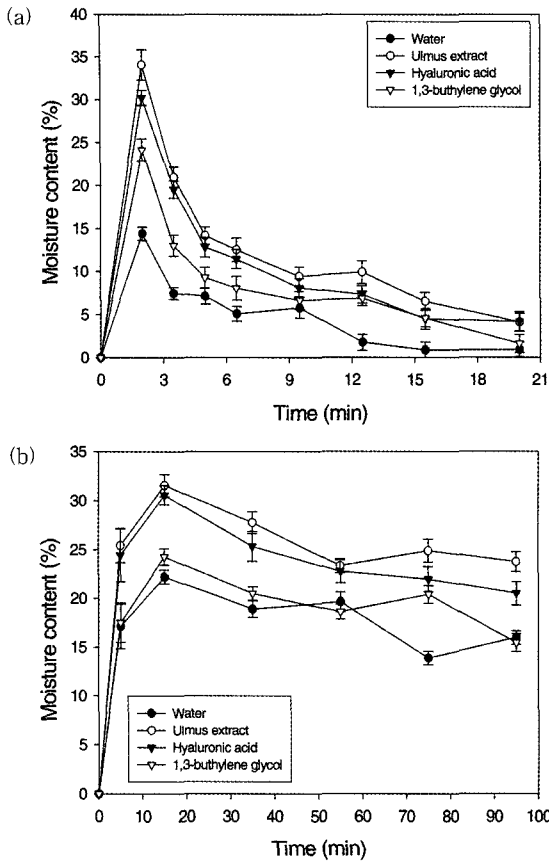


Figure 4. Moisturizing effect measured by Corneometer CM 825: of Ulmus extract solution (1%) (a); and formulation containing 10% of Ulmus extract solution (1%) (b). The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of five experiments.

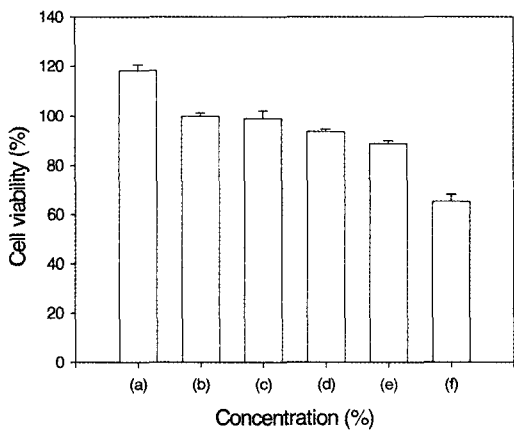


Figure 5. Cell cytotoxicity of Ulmus extract against 3T3 cell line: (a) 0.01%, (b) 0.05%, (c) 0.1%, (d) 0.5%, (e) 1%, (f) 5%. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of four experiments.

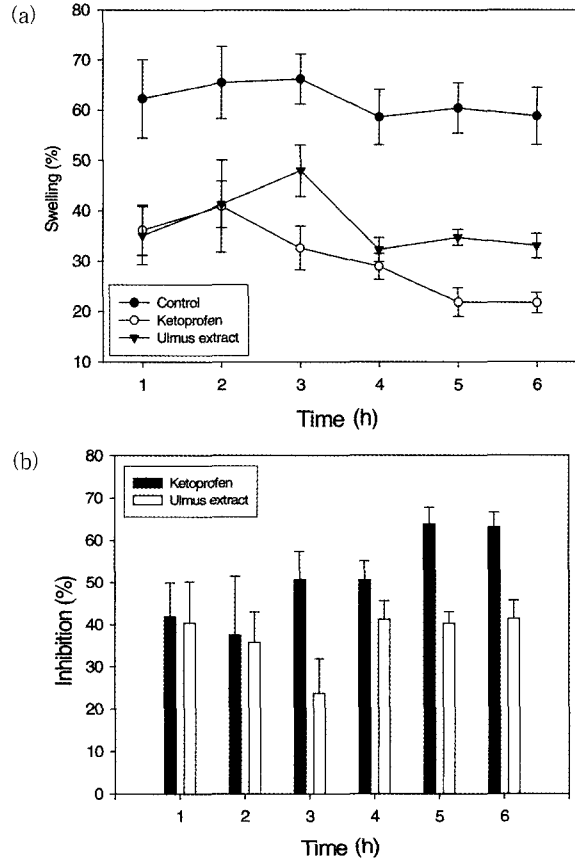


Figure 6. Anti-inflammatory effect of Ulmus extract on carrageenin-induced in rat paw: (a) % swelling; (b) % inhibition. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments.

수 있었다. Corneometer을 이용하여 피부의 수분을 측정 시 시료 자체인 경우에는 증발되는 속도가 빠르므로 장시간 그 효과를 보기가 어렵다. 따라서 20 min간의 피부 습도 변화를 관찰하였고 그 결과를 Figure 4에 나타내었다.

3.3. 세포독성

3T3 cell을 이용하여 유근피 추출물의 세포독성을 관찰하였고 그 결과를 Figure 5에 표시하였다. 저농도에서 세포 증식효과를 보이며 0.5%까지는 아무 이상이 없는 결과이었으나, 1.0% 이상에서는 세포의 관찰개체수가 현저하게 줄어들어 마치 독성이 있는 것처럼 보였다. 그러나 수회의 실험을 반복한 결과로 유근피 추출 다당류의 독성이 아니라 시료의 자체 점도로 인하여 MTT assay에서 시료제거 후 MTT 시약을 투여하는 과정에서 시료(유근피 추출 다당류)와 함께 제거되어 세포수를 상당히 낮추는 것을 확인하였다. 따라서 Figure 5의 결과는 독성에 기인한 것이 아니므로 세포독성의 우려가 없는 것으로 판명되었다.

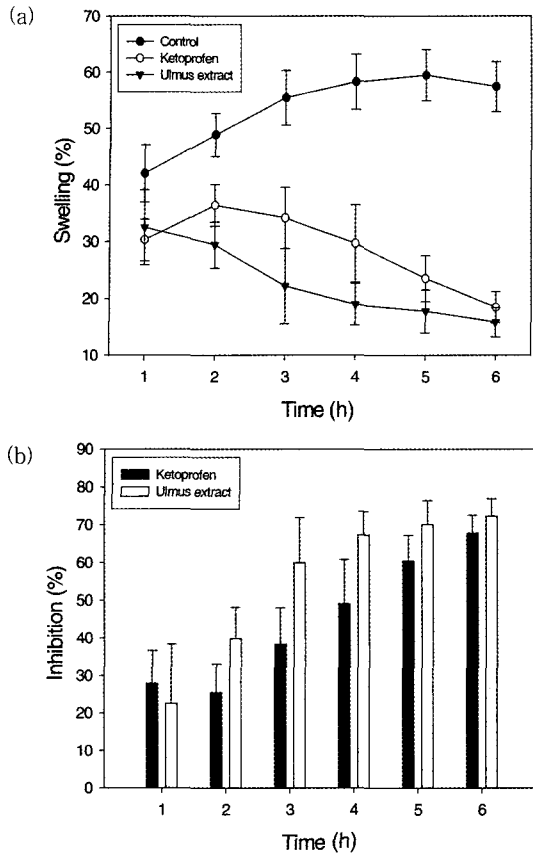


Figure 7. Anti-inflammatory effect of formulation containing Ulmus extract on carrageenin-induced in rat paw: (a) % swelling; (b) % inhibition. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments.

3.4. 소염작용

부종유발 물질로 널리 이용되는 carrageenin을 이용하여 부종을 유발하고 소염작용을 실험하였다. 대조군의 처리는 시료자체의 경우 생리식염수를 사용하였으며, 크림 등의 제품일 경우 첨가물을 적용하지 않은 크림을 적용하였다. 양성대조군으로 케노펜겔(일양약품) 100 mg를 같은 방법으로 사용하여 실험하였으며, 각각의 결과를 Figure 6과 Figure 7에 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서 유근피로부터 침출법으로 다당류를 분리 정제하고, 분리된 유근피 추출 다당류의 보습효과 및 항염효과 등을 조사하였다. 가수분해 생성물을 HPLC로 분석하여 람노오스, 갈락토오스가 주 구성 당분임을 확인하였고 측정된 평균분자량은 20,000이었다. Corneometer CM825 등을 이용한 보습효능 실험 결과 히알루론 산과

견줄만한 효능을 확인할 수 있었으며, carrageenin에 의해 유도된 부종억제 효능 실험에서는 ketoprofen에 버금가는 좋은 효능을 나타내었다. 결론적으로 유근피 추출 다당류가 좋은 화장료 조성물로써 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. 배기환, 한국의 약용식물, 64, 교학사, 서울 (2000).
2. 이경순 외, 중약대사전, 1851, 정담출판사, 서울 (1998).
3. B. W. Son, J. H. Park, and O. P. Zee, Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*, *Arch. pharm. Res.*, **12**, 219 (1989).
4. S. H. Kim, K. T. Hwang, and J. C. Park, Isolation of flavonoids and determination of rutin from the leaves of *Ulmus parvifolia*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **23**(4), 229 (1992).
5. Y. H. Moon and G. R. Rim, Studies on the constituents of *Ulmus parvifolia*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**(1), 1 (1995).
6. E. B. Lee, O. K. Kim, C. S. Jung, and K. H. Jung, The Influence of methanol extract of *Ulmus davidiana* var. *Japonica* cortex on gastric erosion and ulcer and paw edema in rats, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**(6), 671 (1995).
7. N. D. Hong, Y. S. Rho, N. J. Kim, and J. S. Kim, A study on efficacy of Ulmus cortex, *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**(9), 217 (1990).
8. S. Cho, S. Lee, and C. Kim, Anti-inflammatory and analgesic activities of water extract of root bark of *Ulmus parvifolia*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **27**(3), 274 (1996).
9. Y. Yang, J. W. Hyun, K. H. Lim, H. J. Kim, E. R. Woo, and J. Park, Antineoplastic effect of extracts from traditional medicine plants and various plants (III), *Kor. J. Pharmacogn.*, **27**(2) 105 (1996).
10. Y. M. Kwon, J. H. Lee, and M. W. Lee, Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities, *Kor. J. Pharmacogn.*, **33**(4), 404 (2002).
11. 北山雅一, Polypeptide의 보습효과, *Fragrance Journal*, **23**(1), 99 (1995).
12. 한국특허 10-0445430 (2004)
13. R. L. Rietschel, A method to evaluate skin moisturizers *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **70**(3), 152 (1978).