

## 택사추출물의 성분분리와 화장품 원료로서의 특성

이 대 우<sup>†</sup> · 김 영 진 · 김 영 실 · 김 종 현

(주)참존 기술원 응용연구소  
(2006년 1월 9일 접수, 2006년 2월 13일 채택)

### Separation and Purification of Effective Components from the *Alisma orientale* and its Application as a Cosmeceutical Ingredient

Dae-Woo Lee<sup>†</sup>, Young-Jin Kim, Young-Sil Kim, and Jong-Heon Kim

R&D Center, Charmzone, 1720-1 Taejang 2-dong, Wonju-si, Kangwon-do 220-962, Korea  
(Received January 9, 2006; Accepted February 13, 2006)

**요약** 본 연구는 택사의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 화장품의 기능들인 항산화, 미백, 세포 손상 회복 및 항염증과 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 30, 70, 100% MeOH 용매로 추출한 택사 추출물들은 DPPH법으로 실시한 free radical scavenging assay에서 좋은 활성을 보여주었고, tyrosinase 활성 억제 시험에서도 0.5% 이상의 농도에서 농도 의존적인 활성을 보여주었다. Human fibroblast를 사용한 proliferation assay (MTT assay)에서 각 용매 추출물들은 별다른 효과를 보여주지 못했고 0.05% 이하의 농도에서는 세포 독성으로부터 안전하다는 것을 알 수 있었다. B16 melanocyte를 사용한 melanin 생성 억제 시험에서 각 용매별 추출물은 독성으로부터 안전한 0.05% 이하의 농도에서 melanin 생성을 40% 이상 억제 하는 높은 활성을 보여주었다. 이후 우리는 택사 추출물의 MPLC분리 분획을 실시하여 세 가지 분획을 얻었으며 이들을 대상으로 세포 손상 회복 시험과 melanin생성 억제 시험, 염증인자 생성 억제 시험을 실시하였다. 그 결과 분획물들 중 3번 분획물이 세포 손상 회복을 30% 이상 올려주는 좋은 결과를 보여주었고, melanin생성 억제 시험과 COX-2 생성억제에서도 주목할만한 결과를 보여주었다.

**Abstract:** In this study, we performed anti-oxidation, whitening, cell recovery and anti-inflammation effects with *Alisma orientale* to evaluate the cosmeceutical properties. *Alisma orientale* extract (30, 70, 100 % MeOH) exhibited a significant free radical scavenging effect against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH) radical generation and showed tyrosinase inhibition effect in a dose dependent manner (over 0.5% concentration). In cell proliferation assay using human fibroblast, it didn't show any proliferation effect but showed safety from cytotoxicity under 0.05% concentration. For whitening assay, we evaluated the melanin synthesis rate using B16 melanocyte and it showed a significant inhibitory effect (up to 40% under 0.05% concentration). After major screening assay, we separate 3 fractions from *Alisma orientale* extract by MPLC and performed cell recovery assay, melanin synthesis inhibition assay and anti-inflammatory assay. The third fraction showed a cell recovery effect over 30% against radical damage and remarkable repression in melanin synthesis and COX-2 synthesis.

**Keywords:** *Alisma orientale*, anti-oxidation, whitening, cell recovery, anti-inflammation

## 1. 서 론

택사는 택사과에 속하며 세계적으로 약 13속 90종이 분포되어 있다. 택사는 *Alisma plangtago-aquatica* var. *orientale* Samuels. (*Alisma orientale* Juzep.)인 질경이택사로 주로 재배 생산되며 *Alisma canaliculatum* All. Br. et Bouche인 쇠귀나무, 쇠토나물 및 물택사라 불리며 연

못가 습지에서 자라나는 다년초로서 근경은 짧으며 수염 뿌리가 돋는 두 종류가 기록되어 있으나, 한방에서는 주로 질경이택사의 근경을 건조한 것을 택사라고 하며 사용한다. 두 종의 택사는 외관상 모양이 비슷하지만 잎의 모양이 질경이택사의 잎은 아랫부분이 둥근 모양이며 택사는 피침형 또는 넓은 피침형으로 양끝이 좁고 밑부분이 밑으로 흘러 구별이 가능하다[1].

택사는 신농본초경 상품에 수재되어 있는 중요한 한약재이다. 동의보감에서는 택사의 성질은 차고 맛이 달며

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: leedw@charmzone.co.kr)

짜고 독이 없으며, 방광에 물린 오줌을 잘 나가게 하고 방광의 열을 없애는 것으로 기재되어 있다[2]. 한방에서 택사는 우리 몸의 습기(濕氣)를 빨아들이고, 소변을 잘 고게 하며, 설사를 멈추게 하고 부종을 없애주는 약물이다. 또 남성의 설정(泄精)을 없애주기도 한다. 한방에서는 차가운 성질을 이용하여 갈증과 종양을 없애고 땀을 많이 흘리는 병을 치료한다. 택사는 담미(淡味)를 지니고 있어 습기를 빼주고 배설시키며, 차가운 성질은 신장의 화기(火氣)를 없애주는 효능이 있다. 민간에서는 뿌리줄기를 설사, 고혈압, 급성장염, 점막의 건조, 어지러움증 및 황달에 달여 먹인다[3,4].

택사는 이뇨, 지갈증(止渴症), 구갈((口渴), 다한증(多汗症), 해독 또는 당뇨병 등에 한방 및 민간에서 널리 쓰여 온 생약으로서[5] 간보호[6], 고지혈증[7], 항보체[8], 항알러지[9], 항균, 항진균 및 항산화[10], 지방세포의 분화를 억제한다는 결과[11] 등이 알려져 있으며, 함유성분으로는 전분 23%, 단백질 7%, 정유의 furfural과 triterpenoid계의 alisol A, B, C 및 acetate와 당류로서 D-glucose, D-fructose, sucrose 및  $\beta$ -sitosterol과 sesquiterpenoid 화합물[12-16]과 각종 아미노산, 그 외에 germacrene C, D와 소량의 alismoxide, 알칼로이드와 아스파라긴산, 피토스테롤과 피토스테롤의 배당체, 지방산은 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산 및 리놀산이 함유되어 있다.

본 연구에서는 수십여 가지의 천연물을 대상으로 실시한 기본 스크리닝에서 주목할만한 결과를 보여준 몇 가지 천연물 중 하나인 택사의 화장품적인 특성을 알아보기 위하여 항산화, 미백, 세포 증식 및 세포 손상 억제, 항염증 등과 관계된 일련의 실험을 실시하였다. 추가로 MPLC를 사용하여 택사 추출물을 분리 분획하여 각각의 분획물에 대한 실험도 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

본 실험에 사용한 택사는 2005년 3월 경동시장에서 구입하여 사용하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), tyrosinase (from mushroom), L-tyrosine, MTT[3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)]는 Sigma사의 제품을, 크로마토그래피에 사용한 Silica gel 60 (230~400 mesh)은 Merck사의 제품을, 용매는 덕산화학과 Fisher사의 제품을 사용하였다.

### 2.2. 추출 및 분리

#### 2.2.1. 추출

택사 300 g을 각각 1 L의 100%, 70% 그리고 30% 메

탄올의 조건으로 실온에서 일주일동안 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No 2)를 사용하여 여과한 후 evaporator (EYELA, BUCHI)를 이용하여 농축하였다. 메탄올 추출물은 syringe filter (Sartorius)로 다시 한번 여과하여 실험에 사용하였다.

#### 2.2.2. 추출물의 분리

택사 100% 메탄올 추출물 2 g을 메탄올 20 mL에 용해시킨 후 syringe filter (Sartorius)로 여과한 후, MPLC를 사용하여 실라카겔 크로마토그래피 ethyl acetate: methyl alcohol (7:3)의 조건으로 전개시켜 분리하였다. 이 방법으로 3개의 분획으로 분리하였고, 254 nm에서 측정된 결과 1번 분획은 약 25%, 2번 분획은 약 44% 그리고 3번 분획은 약 30%의 면적비를 나타내었다.

### 2.3. DPPH Radical 소거 활성

항산화 활성은 DPPH를 이용하여 시료의 라디칼 소거 효과를 측정하는 Blois법[17]을 변형하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 0.2 mM DPPH 메탄올 용액과 농도별로 희석한 동량의 시료를 혼합하여 실온에서 30 min 동안 반응 시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거율(%)로 나타내었다.

### 2.4. Tyrosinase 억제 활성

Tyrosinase 효소의 활성 저해 측정은 Kubo와 Kinoshita의 방법[18]을 변형하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 180  $\mu$ L, 농도별로 희석한 시료 20  $\mu$ L, 1.5 mM L-tyrosine (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8) 40  $\mu$ L, mushroom tyrosinase (1500 Unit/mL, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8) 40  $\mu$ L을 혼합한 후, 37°C incubator에서 10 min 동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여, 티로시나제 저해율(%)로 나타내었다.

### 2.5. Fibroblast Proliferation and Damage Recovery Effect

사람의 정상 섬유아세포를 국내 MTT사에서 구입하여 DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도로 하여 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 측정은 Mosmann 방법[19]을 변형하여 실시하였다. 섬유아세포증식 시험은 각 용매별 택사 추출물을 대상으로 실시하였다. Human fibroblast를 12 well plate에 분주하여 24 h 배양 후, 시료를 처리하여 48 h 배양하였다. 그 후

당일 제조한 50 mg/mL 농도의 MTT를 배양액의 10%가 되도록 처리한 후 4 h 동안 배양하였다. 상층액을 버리고 DMSO를 200 mL씩 넣고 15 min간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 손상 회복 시험은 proliferation assay와 동일한 방법으로 실시하였다. 세포 손상의 유도는 과산화수소를 사용하여 라디칼 손상을 유도하였다. 이 시험에서의 시료는 100% 메탄올 추출물의 MPLC 분획물을 대상으로 하였다. Human fibroblast를 12 well plate에 분주하여 24 h 배양 후  $2 \times 10^{-4}$  M의 과산화수소를 대조군을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 시료를 처리하여 48 h 배양하였다. 그 후 당일 제조한 50 mg/mL 농도의 MTT를 배양액의 10%가 되도록 처리한 후 4 h 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 버리고 DMSO를 200 mL씩 넣고 15 min간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 세포내 멜라닌 생성 억제

B-16 melanoma를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6 well에 세포수  $2 \times 10^4$  cells/well의 농도로 각 well에 2 mL씩 첨가하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10% FBS, 0.2 mM theophylline이 함유된 DMEM으로 교체한 농도별 희석한 sample을 각각 첨가하고 나서, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 세포가 약 80% 이상 될 때까지 배양하였다. 이 시험에서 사용한 택사 시료는 각 용매별 추출물과 100% 메탄올 추출물의 MPLC 분획물을 사용하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 PBS로 세척하고 trypsin으로 처리하여 세포 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet을 1.5 mL eppendorf tube로 옮겨 5,000 rpm으로 10 min 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet을 60°C 항온기에서 24 h 건조시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 세포내의 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 PBS로 적당량 희석하여 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanin 저해율을 측정하였다.

2.7. IL-1 및 COX-2 생성 억제 효과

Human normal fibroblast를 국내 MTT사에서 구입하여 DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3:1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도로 하여 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주한 후 24 h 배양한다. 그 후  $2 \times 10^{-4}$  M의 과산화수소를 대조군을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 시료를 처리하여 48 h 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액으로 유리된 IL-1을 ELISA kit (ENDOGEN 사) 사용하여 정량

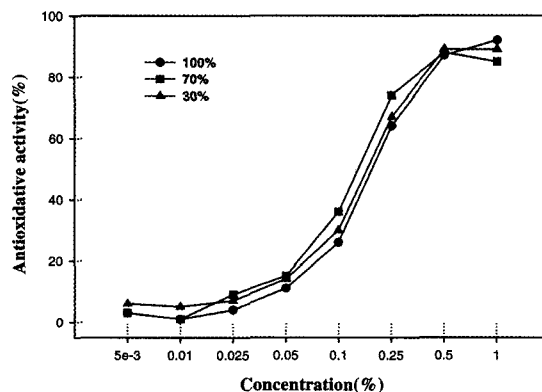


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of *Alisma orientale*.

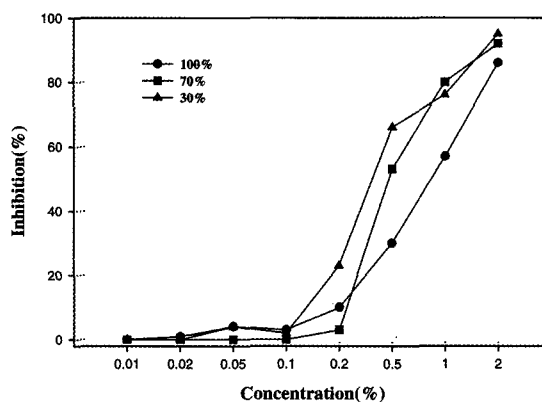


Figure 2. Tyrosinase inhibitory effect of *Alisma orientale*.

한다. Dish를 사용하여 동일한 시험을 실시한 후 dish 바닥에 세포들을 수거하여 초음파로 파쇄한 후 세포 내에 존재하는 COX-2의 양을 COX2 ELISA kit (ENDOGEN 사)을 사용하여 정량한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH Radical 소거 효과

Figure 1의 각각의 용매 농도별 DPPH radical 소거효과가 0.005% (50 µg/mL)부터 1% (10 mg/mL)까지 비슷하게 나타나는 것을 알 수 있다.

3.2. Tyrosinase 활성 억제 효과

Figure 2의 각각의 용매 농도별 Tyrosinase 활성 억제 효과가 0.01% (100 µg/mL)에서 0.1% (1 mg/mL)까지는 비슷한 결과를 나타내었다. 0.2% (2 mg/mL)부터 1% (10 mg/mL)까지는 70%와 30%메탄올 추출물이 100% 메탄올 추출물에 비해 좋은 결과를 나타내었다. 0.1% 이하의 농도에서는 각각의 용매별 활성이 유사하다는 결과를 얻었다.

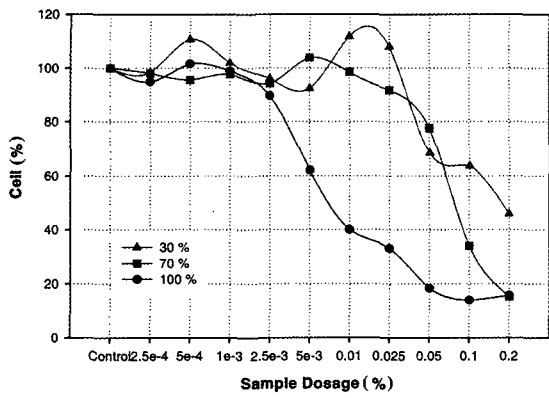


Figure 3. Fibroblast proliferation assay results of *Alisma orientale*.

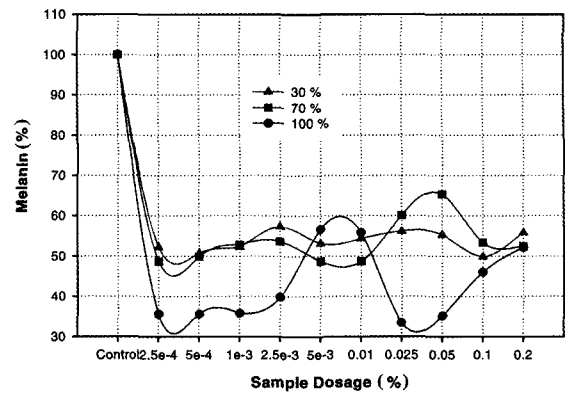


Figure 5. Inhibition effect of *Alisma orientale* on melanogenesis.

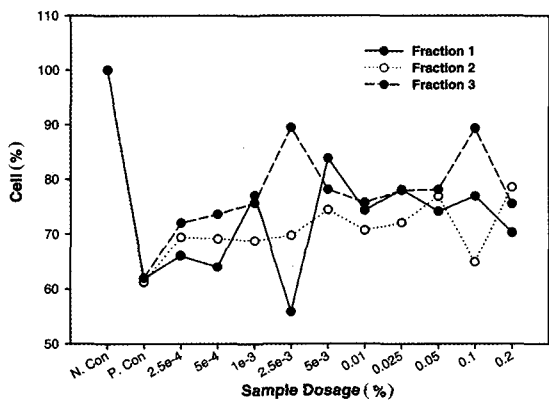


Figure 4. Effect of *Alisma orientale* MPLC fractions in damage recovery assay.

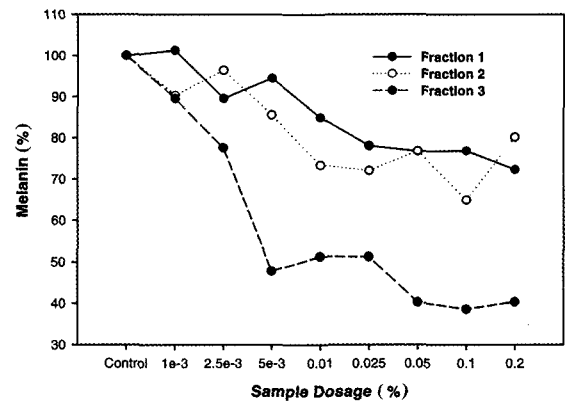


Figure 6. Inhibition effect of *Alisma orientale* MPLC fractions on melanogenesis.

### 3.3. Fibroblast Proliferation and Damage Recovery Effect

Figure 3은 각 용매별 추출물의 fibroblast proliferation 결과를 보여주고 있다. 이 결과는 시험 농도에서 cell의 proliferation 결과 뿐 아니라 cytotoxicity를 확인할 수 있다. 각 용매별 텍사 추출물은 별 다른 세포증식 효과를 보여주지 못하였고 30, 70% 메탄올 추출물은 세포 독성에 대하여 비교적 안전한 결과를 보여주었다. 그러나 100% 메탄올 추출물은 0.005% 이상의 농도에서 농도 의존적인 세포 독성을 나타냈다.

Figure 4는 100% 메탄올 용매로 추출한 텍사 추출물의 MPLC 분획물을 대상으로 실시한 세포 손상 회복 시험 결과이다. MPLC로 얻은 3가지로 시험한 결과 세 가지 분획물 모두 세포 손상을 회복시키는 효과가 있었으며 3번 분획물의 경우 손상 회복 효과가 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 1, 2번 분획물은 마일드한 효과를 보여주었다.

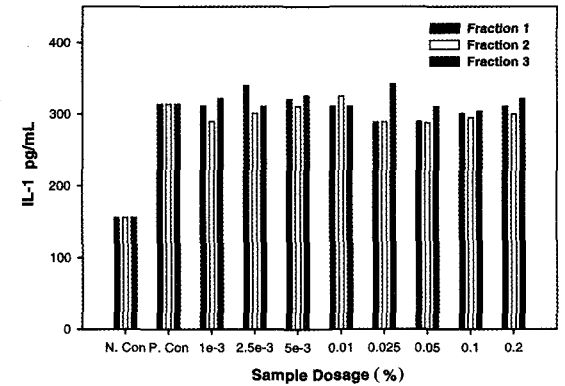


Figure 7. Suppressive effect of *Alisma orientale* MPLC fractions on IL-1a synthesis.

### 3.4. 세포내 멜라닌 생성 억제 효과

Figure 5는 각 용매별 멜라닌 생성 억제효과를 보여주고 있다. 각 용매별 텍사 추출물은 0.2% 이하 모든 시험 영역에서 매우 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 보여주고

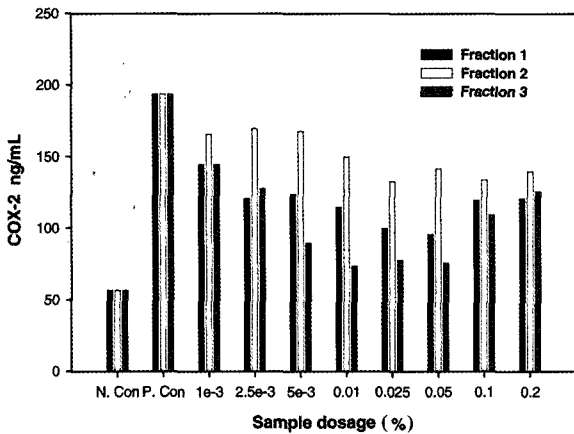


Figure 8. Suppressive effect of *Alisma orientale* MPLC fractions on COX-2 synthesis.

있다. 그러나, 3.3에서 나타난 세포 독성 시험 결과를 감안하면 실제 효과는 0.025% 이하의 농도에서 있다고 할 수 있다.

Figure 6은 MPLC 분획물의 결과이다. 분획물들은 세포 손상 회복 시험 결과 시험 농도에서는 세포 독성이 있다고 보기 어렵다. 이 분획물들은 Figure 6에서 보듯이 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 보여주고 있다. 특히, 3번 분획물의 효과는 매우 뛰어나다.

3.5. IL-1 및 COX-2 생성 억제 효과

Figure 7, 8은 다양한 염증 인자중에 IL-1a와 COX-2를 정량 시험하여 텍사 MPLC 분획물의 염증 인자 분비 억제 효과를 검정한 결과이다. Figure 7에서 보듯이 텍사 MPLC분획물은 IL-1a에 대한 분비 억제 효과가 거의 없다는 것을 알 수 있다. 그러나, Figure 8에서 텍사 MPLC 분획물은 높은 COX-2 생성 억제 효과를 보여주었다. 특히, 1, 3번 분획물은 매우 높은 억제 효과를 보여주고 있다.

4. 결 론

30, 70, 100% 메탄올 용매로 추출한 텍사 추출물은 *in vitro* 실험인 DPPH 라디칼 소거 시험과 tyrosinase 활성 억제 시험에서 좋은 활성을 보여주었다. 또한, 세포 배양계를 이용한 시험에서는 주목할만한 세포 분화 촉진 효과를 보여주지는 못하였으나 세포 독성이 없는 농도 범위에서 매우 높은 멜라닌 생성 억제 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 메탄올 텍사 추출물을 대상으로 MPLC 분리 분획을 통한 추가 연구를 하게 하였고, 실리카겔 크로마토그래피 ethyl acetate : methyl alcohol (7:3)의 조건으로 전개시켜 분리한 결과 3개의 분획을 얻을 수 있었다. 각 분획의 면적비는 1번 분획은 약 25%, 2번 분획은 약

44% 그리고 3번 분획은 약 30% 였다. 이렇게 얻어진 세 개의 분획을 가지고 세포 손상 복구 시험과 멜라닌 생성 억제 시험, IL-1, COX-2 분비 억제 시험을 실시하였고, 우리는 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. 세포 손상 복구 시험에서 세 가지 분획 모두 좋은 효과를 보여주었고, 특히 3번 분획물의 효과가 두드러졌다. 멜라닌 생성 억제 시험에서 역시 3번 분획물의 효과가 매우 높았으며, 염증 인자 분비 억제 시험에서도 COX-2 생성에 대한 강한 억제 효과를 보여주었다.

이러한 결과들로부터 우리는 텍사 추출물 및 그 분리 분획물들이 화장품 원료로써 매우 높은 연구 가치가 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 또한, 3번 분획물에 대한 좀 더 다양하고 깊은 연구가 필요하다고 판단하였다. 따라서, 본 연구소에서는 3번 분획물에 대한 구조분석을 실시하여 효능성분의 작용메카니즘 등 더욱 구체적인 연구를 진행 중에 있다.

참 고 문 헌

1. 이창복, 대한식물도감, 향문사, 서울 (1985).
2. 허준, 동의보감(탕액, 침구편), 여강출판사, 서울 (1994).
3. 정진섭, 신민교, 도해 향약(생약)대사전, 영림사 (1990).
4. 동국대학교 한의과대학 본초학회, 중국본초도감, 여강출판사 (1994).
5. J. Huh, The handbook of oriental medicine, Nams-andang, Seoul, Korea (1994).
6. I. M. Chang, Y. S. Kim, H. S. Yun, and S. O. Kim, Liver-protective activities of alisol compounds against CCl<sub>4</sub> intoxication, *Korean Journal of Pharmacognosy*, **13**, 112 (1982).
7. Y. Imai, H. Matsumura, and Y. Aramaki, Hypocholesterolemic effect of alisol A-24-monoacetate and its related compounds in rats, *Jap. J. Pharmac.*, **20**, 222 (1970).
8. S. M. Lee, J. H. Kim, Y. Zhang, R. B. An, B. S. Min, H. Joung, and H. K. Lee, Anti-complementary activity of protosane-type triterpenes from *Alismatis Rhizoma*, *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 463 (2003).
9. M. Kubo, H. Matsuda, N. Tomohiro, and M. Yoshikawa, Studies on *Alismatis rhizoma* I anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizoma of *Alisma orientale*), *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 511 (1997).
10. C. A. Toh, Antimicrobial and antifungal studies on *Alisma rhizoma*, *Korean J. Pharmacogn.*, **27**, 378 (1996).

11. J. S. Eun, J. S. Hong, and J. N. So, Effects of the extracts from Hoelen alba, *Alismatis Rhizoma* and *Atractylodes Rhizoma* on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cell, *Korean J. Pharmacogn.*, **24**, 131 (1993).
12. H. Matsuda, T. Kageura, I. Toguchisa, T. Murakami, A. Kishi, and M. Yoshikawa, Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizoma of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones B 23-acetate and C 23-acetate, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**, 3081 (1999).
13. Y. Nakajima, Y. Satoh, M. Katsumata, K. Tsujiyama, Y. Ida, and J. Shoji, Terpenoids of *Alisma orientale* rhizoma and the crude drug *Alismatis Rhizoma*, *Phytochemistry*, **36**, 119 (1994).
14. Y. Oshima, T. Iwakawa, and H. Hikino, Alismol and alismoxide, sesquiterpenoids of *Alisma Rhizomes*, *Phytochemistry*, **22**, 183 (1983).
15. M. Yoshikawa, Y. Fukuda, S. Hatakeyama, N. Tanaka, H. Matsuda, J. Yamahara, and N. Murakami, Sulfoorientalols a, b, c and d, four new biologically active sesquiterpenes from *Alismatis Rhizoma*, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1194 (1993).
16. M. Yoshikawa, T. Murakami, A. Ikebata, A. Ishikado, N. Murakami, J. Yamahara, and H. Matsuda, Absolute stereostructures of alismalactone 23-acetate and Alismaketone-A-23-acetate new seco-protostane and protostane-type triterpenes with vaso-relaxant effects from Chinese *Alismatis Rhizoma*, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 756 (1997).
17. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
18. I. Kubo and I. Kinst-Hori, Flavonols from saffron flower : tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4121 (1999).
19. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).