

산벚나무 (*Prunus sargentii* R.) 수피의 화장품활성에 관한 연구

박정미 · 이진영 · 박태순 · 현석준 · 김한혁 · 조영제¹ · 권오준² · 손애량³ · 김동석⁴ · 안봉전*

대구한의대학교 화장품약리학과, ¹상주대학교 식품공학과, ²경북전략산업기획단,
³경남도립거창대학 뷰티디자인과, ⁴고은미피부과

A Study on the Cosmeceutical activities of *Prunus Sargentii* R.

Jung-Mi Park, Jin-Young Lee, Tae-Soon Park, Sok-Jun Hyun, Han-Hyuk Kim, Young-Je Cho¹,
O-Jun Kwon², Ae-Ryang Son³, Dong-Seok Kim⁴ and Bong-Jeun An*

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

¹Department of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

²Gyeongbuk Regional Innovation Agency, Gyeongsan, 712-210, Korea

³Department of Beauty Design, Gyeongnam Provincial Collage in Geochang, Gyeongnam 670-804, Korea

⁴Gounmi skin laser/aesthetic clinic, Daegu 700-070, Korea

Received December 28, 2007; Accepted February 18, 2008

Prunus sargentii R. of Rosaceae family, has been reported to have radical scavenging activity and anti-inflammatory effect. On these facts, biological activity and safety test were conducted to evaluate biological activities of the extracts of *P. sargentii* R. as a potential pharmaceutical ingredient. The electron donating ability of its ethanol extracts at a 500 ppm level showed 92%, which was higher than that of hot water extract (59%), the superoxide dismutase (SOD)-like activity of the water extract of *P. sargentii* R. was about 50%, the ethanol extract of *P. sargentii* R. was about 40% at 1,000 ppm concentration. Xanthine oxidase inhibition by the water extract of *P. sargentii* R. was about 40% and that by the ethanol extract was 60% respectively at 500 ppm concentration. From the measurement on lipid oxidation, the Cu²⁺ chelating effect of the ethanol extract was higher than that of hot water extract. The Fe²⁺ chelating effect was also shown to be about 80% at a 500 ppm concentration in both hot water extract and ethanol extract. The tyrosinase inhibition effect related to skin-whitening was 26% by hot water extract and 20% by ethanol extract respectively at a 1,000 ppm. Hyaluronidase inhibition activity related to the anti-inflammation effect was 96% in ethanolic extract at a 500 ppm. Clear zones formed by *P. sargentii* R. against the human skin-resident micro-flora such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes* indicated that antimicrobial activity of the ethanol extract was higher than that of the hot water extract.

Key words: anti-inflammation effect, antimicrobial activity, antioxidant, *Prunus sargentii* R.

서론

경제 수준이 높아지고, 의학이 발달함에 따라 평균수명의 연장, 노인 인구가 증가하고, 노화와 더불어 건강하고 젊음을 유지하는 피부 관리에 대한 관심도 증가하고 있다. 피부노화는 연령이 증가함에 따라 발생하는 내적 노화와 외적 요인에 의한 외적 노화 과정으로 구분된다. 외적요인에 의한 노화는 자외선의 노출로 인한 광노화 이외에도 바람, 열, 담배 등이 그 원인으로 알려져 있으며 내적 노화를 촉진시키거나 그 자체로도 피

부노화를 유발한다.¹⁾ 내적 노화는 피부의 미세한 주름, 탄력의 소실, 위축된 피부 등이 관찰되며, 광노화 된 피부의 특징은 피부가 건조하여 거칠고, 굵고 깊은 주름이 나타나며 얼룩진 과색소침착과 저색소 침착 등이 발생하는 것이다. 이러한 피부표면의 변화는 피부노화나 여러 가지 피부질환들과 관련되어 연령에 따라 부위에 따라 변화하는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 이러한 현상과 더불어 화장품(cosmetics) 산업에는 약품(pharmaceuticals)의 기능이 첨가된 화장품 혹은 약용화장품(cosmeceuticals)의 개념이 도입되어 세계적으로 폭넓게 이용되고 있다. 장미과(Rosaceae)식물은 유럽, 북아메리카, 아시아 등 세계 널리 퍼져 있으며, 총 6아과 115속 3,200종이 알려져 있으며 한국에는 4아과 35속 207종이 자란다. 그 종류로는 *Fragaria ananassa*(딸기), *Rubus frondosa*(블랙베리), *Rubus*

*Corresponding author
Phone: +82-53-819-1429; Fax: +82-53-819-1429
E-mail: anbj@dhu.ac.kr

logano-baccus(로건베리), *Rubus idaeus* var.(라즈베리), *Prunus armeniaca*(살구나무), *Prunus avium*(버찌), *Prunus persica*(복숭아), *Prunus salicina*(자두), *Prunus sargentii*(산벚나무), *Malus domestica*(사과), *Pyrus pyrifolia* var.(배), *Photinia glabra*(홍가시나무), *Chaenomeles sinensis*(모과나무)등⁴⁾이 있으며 이 식물들은 항산화,⁵⁾ 항침해수용성,⁶⁾ 항염증,⁷⁾ 항소양증,⁸⁾ tyrosinase의 저해제⁹⁾와 항암성¹⁰⁾을 증진시키는 효과를 가진다고 보고되었다. 이 중 화피(樺皮)는 낙엽교목인 산벚나무의 수피로써 송대(開寶本草)에 최초로 수록되었으며, 앵피(櫻皮)¹¹⁾라고도 한다. 산벚나무 수피의 효능으로는 청열, 해독, 이습, 소종, 거담, 지해 등의 효능으로 상한시행열독, 황달, 유옹, 폐풍독, 응절, 매독, 임질, 피부발진, 급성편도선염, 폐염, 신염, 치주염, 외상감염, 요로감염, 만성기관지염, 장염, 이질, 간염, 방광염, 설사, 기천, 습진, 양진, 응절종독 등의 증상을 치료하는 것으로 나타나 주로 염증성 질환이나 피부 질환 등에 많이 응용 되었다.^{12,13)} 예부터 벚나무의 줄기 및 껍질은 기침, 담마진, 우육체 등에 민간약으로 이용되고 있으며,¹⁴⁾ Han 등¹⁵⁾에 의하여 벚나무 껍질이 강력한 면역억제 활성이 있음이 밝혀졌다. 또한 벚나무 기원식물인 화피는 배당체 sakuranin을 함유하고 있으며, 가수분해하면 sakuranetin 및 당이 생성되며,¹⁶⁾ 주요성분으로는 pinostrobin, naringenin, eriodictyol, taxifolin, pinocembrin, 그리고 flavanone 배당체인 vercundin 등이 분리 보고 되었고, prunetin, angophorol, sakuranetin, isosakuranin 등이 함유되어 있음이 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾

이에 본 연구에서는 피부노화 방지 및 항염 효과가 우수한 기능성 화장품 원료의 적합성을 알아보기 위해서, 산벚나무의 수피인 화피의 생리활성기능을 확인하고 화피의 화장품소재로서의 이용 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용한 산벚나무 수피인 화피는 2005년 3, 4월경 포항 죽장면에서 자생하는 산벚나무의 외피를 벗겨 양친한 것을 구입하여 실험재료로 사용하였다.

시료 제조. 화피 열수추출물의 경우 시료 300 g에 10배 양의 증류수를 첨가하여 80°C에서 3시간 환류 냉각 추출하여 상정액을 원심분리, 여과, 농축 및 동결건조 후 시료 31.5 g를 얻어 10.5%의 수율을 얻었으며, 화피 에탄올추출물의 경우 시료 300 g를 80% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치하여 상정액을 원심분리, 여과, 농축 및 동결건조 후 29.7 g를 얻어 9.9%의 수율을 얻었다. 각 추출물을 냉동실에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기. 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, trichloroacetic acid(TCA), mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine(L-DOPA), hyaluronidase, hyaluronic acid 등은 Sigma Chemical Co. Ltd.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemical(Rochester, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항균력 검색 실험 시, 전 배양 및 본 배양을 위한 액체배지 중

*Propionibacterium acnes*균은 Gifu anaerobic medium(GAM)을 사용하였고, *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*의 액체배지로는 nutrient broth(NB)를 사용하였고, *Staphylococcus aureus*의 액체배지로는 tryptic soy broth(TSB)를 사용하였다. 고체배지는 상기 액체배지에 agar를 첨가하여 본 실험에 사용하였다. *P. acnes*균은 5%, CO₂ incubator에서 37°C로 배양하였고, 그 외의 모든 균주는 BOD incubator에서 37°C로 배양하였다. 세포독성 실험에 사용된 흑색종세포(B16F10 melanoma cell)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포독성 측정을 위한 시약은 RPMI 1640 medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. Ltd.(Grand Island, NY, USA) 및 haemocytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT)는 Sigma Chemical Co. Ltd.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항염증 측정에 사용된 시약은 대식세포(Raw 246.7)의 배양 및 성장 억제능 측정에는 fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, PBS, trypan blue stain은 Gibco BRL Co. Ltd.에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정. 폴리페놀 정량은 AOAC²⁰⁾에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 3 ml에 Folin-ciocalteu phenol reagent 시약 1 ml를 가하고, 포화 Na₂CO₃ 용액 1 ml를 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고, 1 N HCl 0.2 ml를 가하여 640 nm에서 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 tannic acid 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

전자공여능 측정. 전자공여능(EDA; electron donating abilities)은 Blois의 방법²¹⁾을 따라 측정하였다. 각 시료용액 2 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정. SOD 유사활성은 Marklund의 방법²²⁾에 따라 실시하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Xanthine oxidase 저해활성 측정. Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stürpe와 Corte의 방법²³⁾에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 ml와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 ml에 xanthine(2 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml를 첨가하고 xanthine oxidase(0.2 U/ml) 0.1 ml를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 uric 생성량}}{\text{무첨가구의 uric 생성량}}\right) \times 100$$

지방산패 억제능 측정

Fish oil emulsion 조제. 지방산패 억제능 실험에 사용하는 oil emulsion은 실험직전에 만들었으며, 미리 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 ml에 유화제인 tween-20을 0.05 ml, 0.25 ml의 fish oil을 넣고 15분간 magnetic bar를 사용하여 교반하였다. 이 후 KOH 2 g를 넣고 150 ml 까지 정제수를 가한 후 교반 하면서 2 N HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하여 사용하였다.

Tiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정. Tiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다. pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 ml를 넣은 다음 50 µl의 tween-20과 0.25 ml의 fish oil을 넣고 15분간 magnetic bar를 사용하여 교반 후 KOH 2 g를 넣고 150 ml까지 물을 가한 후 교반 하면서 2 M HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하여 사용한 oil emulsion 용액 1 ml를 37°C 수욕상에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 7.2% 50 µl의 dibutylhydroxytoluens(BHT)를 시료에 가하여 산화반응을 정지 시켰다. 반응 혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml의 TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합한 후 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 원심분리 시켜 상정액을 흡광도 531 nm에서 측정하였고, 대조군은 시료대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Tyrosinase 저해 활성 측정. Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 0.2 ml를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Hyaluronidase 저해 활성 측정. Hyaluronidase저해 활성 측정은 sodium-hyaluronic acid로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucozazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethyl-amino-benzaldehyde(DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정 하였다.²⁶⁾ 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HAase(7900 U/ml) 0.05 ml와 시료용액 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 12.5 mM CaCl₂ 0.1 ml를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양 하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HA(12 mg/ml)를 첨가하여 다시 40분간 배양하여 0.4 N potassiumtetraborate 0.1 ml 및 0.4 N NaOH 용액 0.1 ml를 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕 상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각 시킨 반응물에 발색제로 DMAB시약 3 ml를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출 하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

대식세포(Raw 264.7 cell)가 nitric oxide 생성에 미치는 영향. Raw 264.7 세포주 (Murine macrophage cell line)는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 dish에 세포의 밀도가 2~3×10⁶/ml 정도가 되게 계대 배양하여 5% CO₂ 조건으로 세포 상태를 유지하였다. 실험을 할 때는 80%의 confluency와 20회 이하 passages 조건을 준수하여 실험하였다.

Nitric Oxide 측정. Nitric oxide(NO) 측정은 세포배양 상층액에서 NO의 양을 nitrite와 nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent (Sigma, USA)를 사용하였으며, 6 well plate에 2×10⁶개의 cell을 confluence가 80% 일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 LPS 10 µg/ml을 control 군을 빼 모든 well에다 넣어서 자극시켰다. 2시간 후에 산뱃나무 수피추출물을 10, 50, 100, 500 ppm의 농도로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 차광시켜 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

항균력 측정

균배양. 전 배양 및 본 배양을 위한 액체배지 중 *Propionibacterium acnes*균은 Gifu anaerobic medium(GAM)을 사용하였고, *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*의 액체배지로는 nutrient broth(NB)를 사용하였고, *Staphylococcus aureus*의 액체배지로는 tryptic soy broth(TSB)를 사용하였다. 고체배지는 상기 액체배지에 agar를 첨가하여 본 실험에 사용하였다. *P. acnes*균은 5%, CO₂ incubator에서 37°C로 배양하였고, 그 외의 모든 균주는 BOD incubator에서 37°C로 배양하였다.

생육 저해환(Clear zone) 측정. 항균력 검색실험에서 전 배

양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 tryptic soy broth를 사용하였으며, 생육 저해환 및 생균수 측정을 위한 고체배지는 tryptic soy agar를 사용하였다. 균액의 희석액으로는 0.1% peptone수를 사용하였다. 추출물의 항균력 측정은 paper disc법²⁷⁾으로 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1 백금이를 취해서 액체배지 10 ml에 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체배지 10 ml에 균액을 0.1 ml/접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균액을 약 1×10^7 cells되게 접종하여 멸균 먼봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 8 mm filter paper disc (Whatman, Japan)를 평판배지에 올려놓은 다음 50 µl/disc가 되도록 추출물을 흡수시켜 35°C에서 18~24시간 배양하여 disc위의 저해환(mm)의 직경을 측정하였다.

통계처리. 통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT: Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

산벚나무 수피추출물의 생리활성 검증

총 폴리페놀 함량 확인. 폴리페놀계 물질들은 식물체에 특유한 색깔을 부여하고 산화환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 총치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.²⁸⁾ 본 실험에서 사용한 산벚나무의 수피인 화피의 총 폴리페놀 화합물의 함량은 tannic acid를 표준 곡선으로 하여 측정된 결과 열수추출물이 346.84±0.8 mg/100 g, 에탄올추출물 556.50±1.2 mg/100 g로 에탄올추출물의 phenol 함량이 다소 높은 것으로 확인되었다.

전자공여능 확인. 산벚나무 수피추출물의 항산화 효과를 탐색하기 위하여, 안정한 유리 라디칼로 알려져 있는 1,1-diphenyl-

2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 라디칼소거 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 산벚나무 수피 열수추출물 50 ppm의 농도에서는 59% 이상의 전자공여능을 나타내었고, 에탄올추출물의 경우 50 ppm에서 92% 이상의 높은 전자공여능을 나타내었다. 50 ppm의 농도에서 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 산벚나무 수피의 열수추출물보다는 높았지만, 에탄올추출물에 비교하여 낮은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이는 Jung 등²⁹⁾의 괴화, 녹차, 작약, 생강의 메탄올 추출물의 전자공여능 측정 결과 1,000 ppm에서 각각 76.9, 64.6, 57.1, 48.3%의 활성을 나타낸 결과와 비교하여 산벚나무 수피의 전자공여능이 우수함을 확인할 수 있었다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 확인. Pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 Fig. 2와 같이 SOD 유사활성을 측정된 결과 산벚나무 수피 열수추출물은 농도 1,000 ppm에서 50%

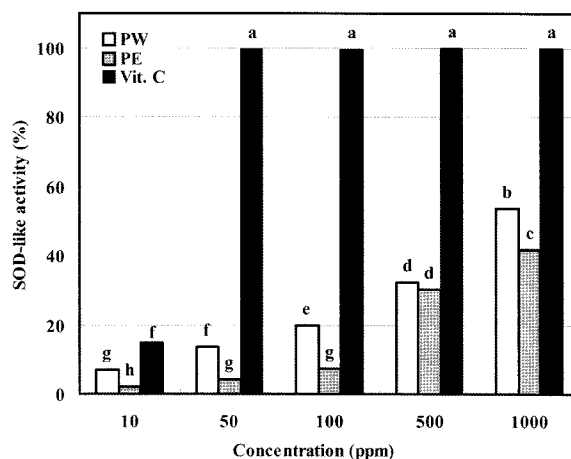


Fig. 2. SOD-like activity of *Prunus sargentii* R. extracts. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

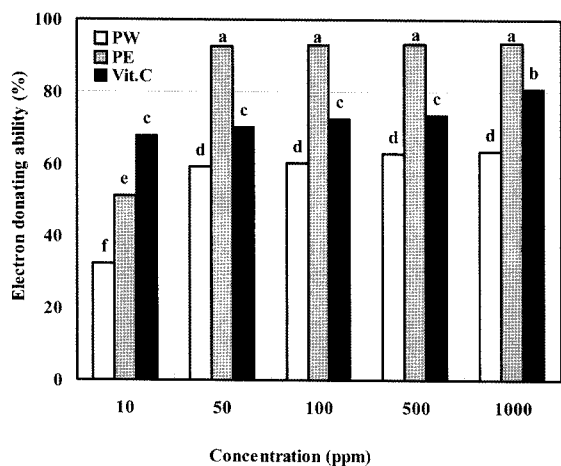


Fig. 1. Electron donating ability of from *Prunus sargentii* R. extracts. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

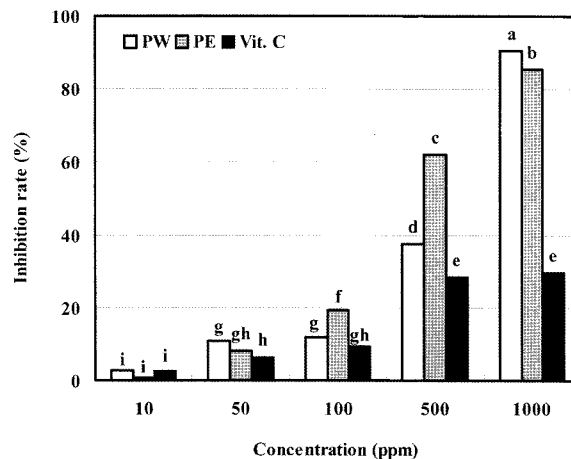


Fig. 3. Inhibition rate of *Prunus sargentii* R. extracts on xanthine oxidase. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

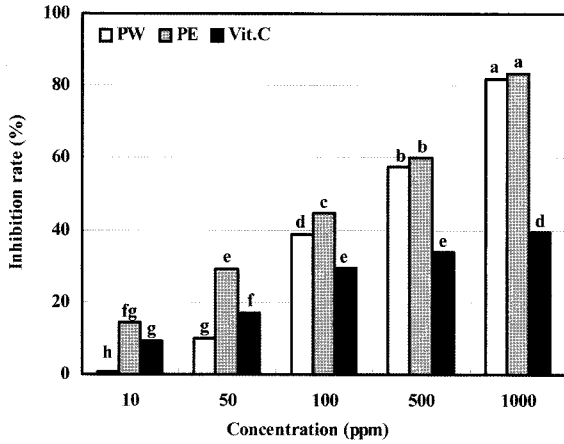


Fig. 4. Effect of *Prunus sargentii* R. extracts reacted with Cu^{2+} ion on lipid oxidation in oil emulsion. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

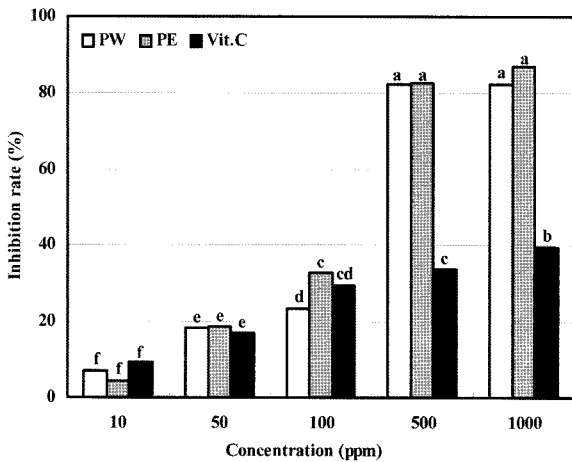


Fig. 5. Effect of *Prunus sargentii* R. extracts reacted with Fe^{2+} ion on lipid oxidation in oil emulsion. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

이상의 활성이 나타났으며, 에탄올추출물의 경우 1,000 ppm에서 40% 이상의 효능을 나타내어 산벚나무 수피 열수추출물에서 SOD 유사활성능이 더 높게 나타났다. 이는 Kim 등³⁰⁾의 팽이버섯, 마늘, 브로콜리, 상추의 SOD 유사활성이 에탄올추출보다 열수추출물이 효과가 크다는 결과와 일치하는 것이다.

Xanthine oxidase 저해활성 확인. 산벚나무 수피추출물의 농도별 xanthine oxidase의 저해활성을 관찰한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 산벚나무 수피 열수추출물의 경우 500 ppm의 농도에서 40% 미만의 효과를 나타냈으며, 에탄올추출물의 경우 60% 이상의 저해효능을 나타내어, 에탄올추출물의 저해효율이 열수추출물에 비하여 높음을 알 수 있었다. 이는 An 등³¹⁾이 황련 추출물의 xanthine oxidase 저해원에서 에탄올추출물의 경우 18.89%, 열수추출물의 경우 6.95%라고 보고한 것과 비교하여 우수한 저해능을 나타내었으며, Kim 등³²⁾의 미역, 모자반, 파래, 김 추출물의 xanthine oxidase 저해활성을 측정된 결과, 시

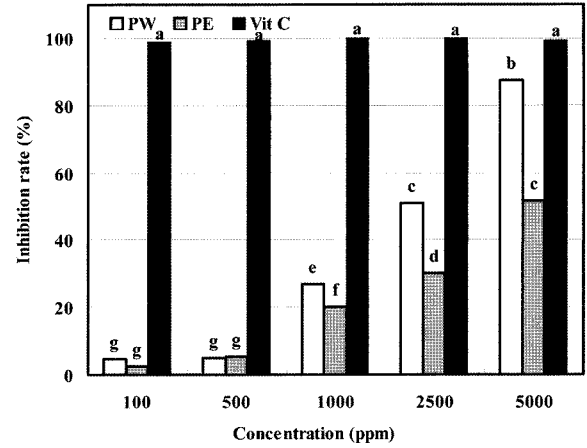


Fig. 6. Inhibition rate of *Prunus sargentii* R. extracts on tyrosinase. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

료농도 500 ppm에서 10.8, 10.7, 14.8, 8.6%의 저해활성을 나타낸 결과와 비교하여 산벚나무 수피추출물의 xanthine oxidase 저해능이 우수함을 알 수 있었다.

지방산패 억제능 확인. 식물체 추출물들의 지방산화 촉진인자인 Fe^{2+} 이온과 활성산소 중 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)에 대한 각 추출물들의 영향을 Fig. 4, 5와 같이 나타내었다. Fe^{2+} , Cu^{2+} 이온에 대한 산벚나무 수피추출물의 영향을 조사한 결과 전반적으로 Cu^{2+} 보다 Fe^{2+} 이온의 지방 산패 억제능이 뛰어났으며, 열수추출물 보다는 에탄올추출물의 효능이 더 우수하였다. Fe^{2+} 이온의 경우 1,000 ppm 열수추출물에서 82% 이상의 저해율을 보였으며, 에탄올추출물의 경우 86% 이상의 저해율을 보였다. Cu^{2+} 이온의 열수추출물의 경우 1,000 ppm에서 81% 이상의 저해율을 보였으며, 에탄올추출물의 경우는 1,000 ppm에서 84% 이상의 저해율을 보였다. 이에 산벚나무 수피추출물이 지방산화 촉진을 저해함으로써, 지방 산패 억제능이 우수함을 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 저해 활성 확인. Mushroom tyrosinase 효소를 사용하여 각 추출물의 농도별 tyrosinase 효소활성의 저해효과를 측정된 결과 Fig. 6과 같이 열수추출물의 경우 1,000 ppm에서 26% 이상의 효능을 보였으며, 에탄올추출물의 경우 20% 이상의 효능을 나타내어, 미백에 효능이 있다고 알려진 비타민 C에 비해 낮은 저해효과를 나타내었다. 이는 Jung 등³³⁾의 콩나물, 케일, 취나물의 10% 이하의 낮은 저해능과 비교할 때 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. 이러한 낮은 저해효과를 보이는 산벚나무 수피추출물은 미백작용 억제물질의 정제가 이루어진다면 더욱 높아질 것으로 생각된다.

Hyaluronidase 저해 활성 확인. 산벚나무 수피추출물의 hyaluronidase 저해 측정 결과는 Fig. 7과 같이 열수추출물의 경우 500 ppm에서 36%, 1,000 ppm에서 86% 이상의 효능을 보였으며, 에탄올추출물의 경우 500 ppm에서 96%, 1,000 ppm에서는 98% 이상의 효능을 나타내었다. 산벚나무 수피추출물의 hyaluronidase 저해 활성의 경우는 열수추출물 보다는 에탄올추

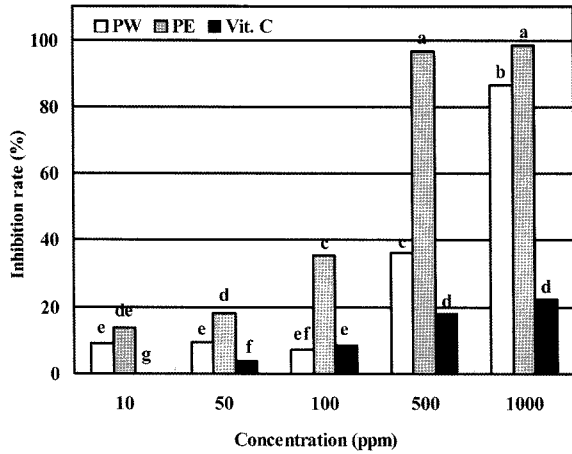


Fig. 7. Inhibition rate of *Prunus sargentii* R. extracts on hyaluronidase. □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ▨: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts; ■: Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

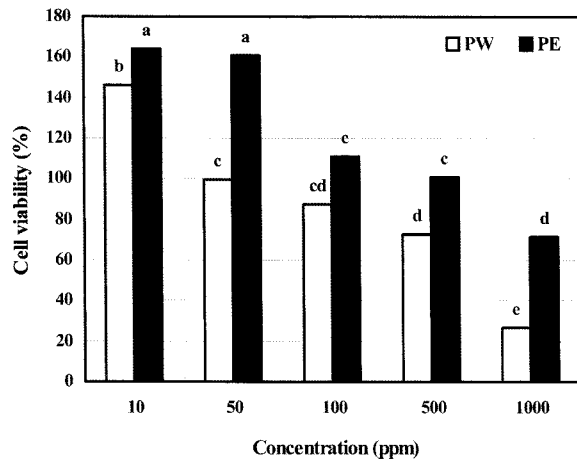


Fig. 8. Cell viability of *Prunus sargentii* R. extracts on macrophage cell (Raw 264.7). □: PW, *Prunus sargentii* R. water extracts; ■: PE, *Prunus sargentii* R. ethanol extracts. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

출물에서 높은 효능을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과로 볼 때, Cha 등³⁴⁾이 항산화 효과를 가진 물질이 항염증 효과를 동시에 나타냄으로서 활성 산소에 기인한다고 보고한 것과 유사한 것을 확인할 수 있었고, 산벚나무 수피추출물의 항염증 화장품 소재로서의 유용성을 확인할 수 있었다.

대식세포(Raw 264.7)의 세포독성효과 확인. 대식세포(Raw 264.7)에 lipopolysaccharide (LPS)와 산벚나무 수피추출물을 동시에 처리한 후 세포독성을 평가하였다. 산벚나무 수피추출물이 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, 산벚나무 수피추출물 자체의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, 산벚나무 수피추출물의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시한 결과 Fig. 8과 같이 나타내었다. 산벚나무 수피 열수 및 에탄올추출물의 경우 100 ppm 이하의 농도에서 독성을 갖지 않았으며, 따라서 본 실험에서는 산벚나무 수피추출물의 농도를 100 ppm 이하에서

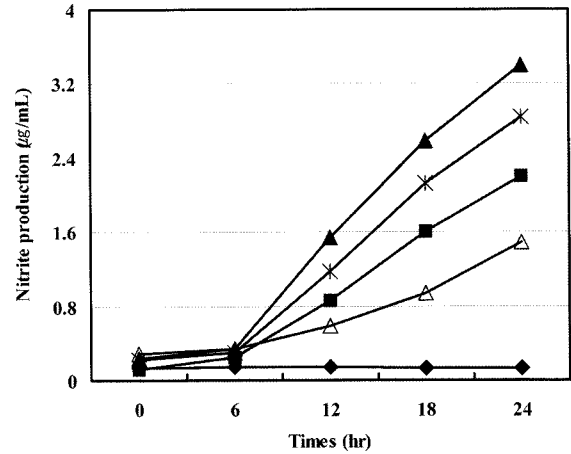


Fig. 9. Effects of *Prunus sargentii* R. water extracts on the production of NO in Raw 264.7 cells. -◆-, control; -■-, lipopolysaccharide (LPS); -▲-, LPS + 10 ppm; -×-, LPS + 50 ppm; -△-, LPS + 100 ppm

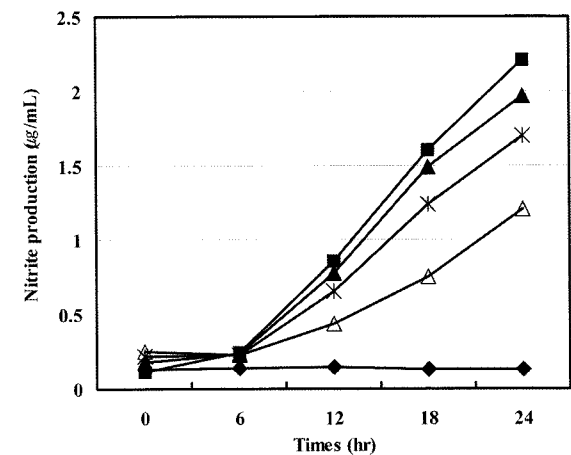


Fig. 10. Effects of *Prunus sargentii* R. ethanol extracts on the production of NO in Raw 264.7 cells. -◆-, control; -■-, lipopolysaccharide (LPS); -▲-, LPS + 10 ppm; -×-, LPS + 50 ppm; -△-, LPS + 100 ppm

nitric oxide 양을 측정하였다.

대식세포(Raw 264.7)의 nitric oxide production에 미치는 영향. 일산화질소(NO)는 dioxygenase인 nitric synthase(NOS)에 의하여 arginine이 citrulline으로 산화될 때 생산되는 반응성이 높은 라디칼로서,³⁵⁾ 다양한 생물학적 효과를 나타내는 물질로 알려져 왔다.³⁶⁾ 이와 같은 NO 생성량을 측정된 결과 LPS군에서는 Fig. 9, 10에서와 같이 control군에 비교하여 NO의 생성량이 시간 의존적으로 증가하였으며, 산벚나무 수피추출물을 처리한 실험 군에서는 18, 24 h에서 NO의 생성을 억제하였다 ($p < 0.05$). 산벚나무 수피 에탄올추출물을 10, 50, 100 및 500 ppm의 농도로 반응에 첨가하였을 때, 시료 농도가 증가에 의하여 NO 생성량이 감소하는 경향을 발견할 수 있었다. 이는 Byun 등³⁷⁾의 현삼 메탄올 추출물의 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향을 결과와 비교하여 보면 산벚나무 수피추출물의 NO 생성량을 억제한 것과 같은 결과를 나타내어, 산벚나무 수피추출물이 농도 의존적인 면역활성을 나타

Table 1. Antimicrobial activity of *Prunus sargentii* R. extracts on several microorganisms

Strains	PW ¹ (mg/disc)			PE ² (mg/disc)		
	1	2	4	1	2	4
<i>Escherichia coli</i>	- ^a	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12±0.9 ^b	14±0.3	22±1.0	12±0.3	16±1.5	17±0.5
<i>Propionibacterium acnes</i>	11±3.0	18±0.32	0.5±0.5	14±0.8	18±0.3	24±0.3

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

PW¹: *Prunus sargentii* R. water extract

RE²: *Prunus sargentii* R. ethanol extract

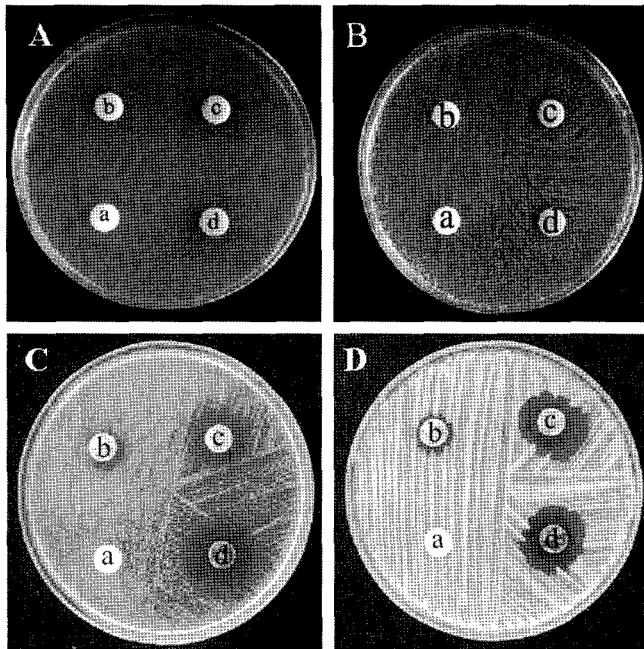


Fig. 11. Antimicrobial activity of *Prunus sargentii* R. water extracts on several microorganisms. A, *Escherichia coli* KCTC 1039; B, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; C, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, D, *Propionibacterium acnes* KCTC 3314.

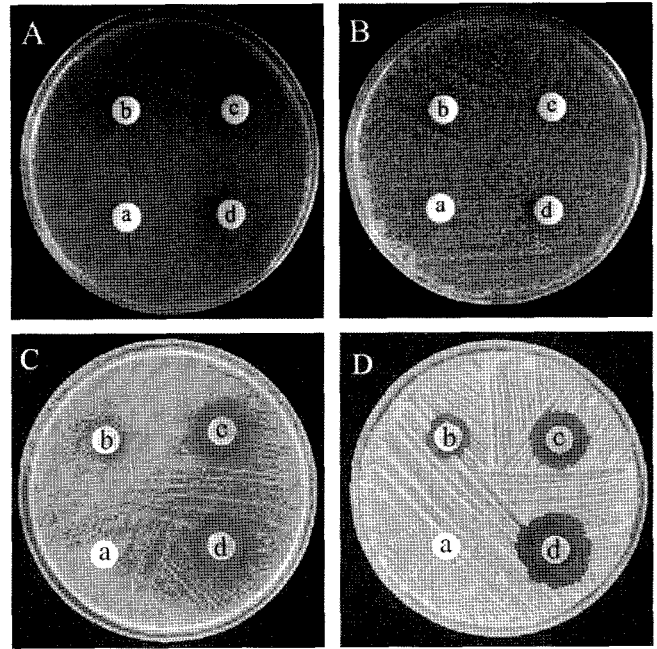


Fig. 12. Antimicrobial activity of *Prunus sargentii* R. ethanol extracts on several microorganisms. A, *Escherichia coli* KCTC 1039; B, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; C, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917; D, *Propionibacterium acnes* KCTC 3314.

낼 것으로 판단되었다.

생육 저해환(Clear zone) 확인. 산벚나무 수피추출물의 피부 상재균에 대한 영향력을 검토하기 위하여, 피부상재균인 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*와 *P. acnes*에 대한 항균효과를 관찰한 결과 Table 1 및 Fig. 11, 12와 같이 나타내었다. *P. acnes*에 대하여 에탄올추출물이 4 mg/disc에서 24 mm의 생육저해환 형성으로 항균력이 가장 높게 나타났으며, 열수추출물이 20.5 mm의 생육 저해환을 나타내었다. *S. epidermidis*에 대하여 열수추출물이 4 mg/disc에서 22 mm의 생육 저해환을, 에탄올추출물의 경우 17 mm의 생육 저해환을 나타내었다. Kim 등³⁸⁾은 민들레 chloroform 분획물이 1.5 mg/disc의 농도에서 *S. aureus*의 경우 11 mm의 저해환이 형성되었다고 보고하였고, Kang 등³⁹⁾은 갖의 에탄올추출물이 시료농도 2 mg/disc에서 *S. aureus*와 *E. coli*를 저해한다고 보고한 바 있다. 이들에 비하여 본 연구에서 사용한 산벚나무 수피추출물이 더 낮은 농도에서 이들의 증식을 억제함을 알 수 있었다.

초 록

산벚나무는 장미과에 속하는 것으로, 수피인 화피의 radical 소거능과 항염증 효과가 보고되고 있어, 이를 이용하여 화장품 원료로 이용하고자 생리활성을 검증하였다. 전자공여능은 에탄올추출물 500 ppm에서 92%의 효능을 보여 열수추출물 59% 보다 우수하였고, SOD 유사활성의 경우 열수추출물 1,000 ppm에서 에탄올추출물의 경우는 50%의 활성능을 나타내었다. xanthine oxidase 저해능은 500 ppm의 농도에서 열수추출물의 경우 40%, 에탄올추출물의 경우 60%의 저해능을 나타내었다. 지방산패 억제능 측정의 경우 Cu²⁺에 의한 저해 효과는 열수추출물보다 에탄올추출물의 효과가 높았으며, Fe²⁺에 의한 저해 효과는 열수와 에탄올추출물 모두 500 ppm에서 80% 이상의 저해능을 보였다. 피부미백과 관련된 tyrosinase 저해능의 경우 1,000 ppm에서 열수추출물의 경우는 26%, 에탄올추출물의 경우 20%의 저해능을 보였다. 항염증과 관련된 hyaluronidase 저

해능의 경우 500 ppm에서 에탄올추출물의 경우 96%의 효능을 보였다. 산벚나무 수피추출물의 피부상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* 및 *Propionibacterium acnes*에 대한 저해환형성을 관찰한 결과 열수추출물보다 에탄올추출물의 효능이 더 우수하였다.

Key words: *Prunus sargentii* R., antioxidant, anti-inflammation effect, antimicrobial activity

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Choi, H. C. and Oh, C. H. (1997) Evaluation of skin furrows in the ageing process using an image analysis system. *Kor. J. Dermatol.* **35**, 292-302.
- Yaar, M., Gilchrist, B. A., Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., Austen, K. F., Goldsmith, L. A. and Katz, S. I. Aging of skin. (2003) *Dermatology ingeneral medicine*. 6th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 1386-1398.
- Paepe, K. D., Lagarde, J. M., Gall, Y., Roseeuw, D. and Rogiers, V. (2000) Microrelief of the skin using a light transmission method. *Arch. Dermatol. Res.* **292**, 500-510.
- Jung, S., Jusudurai, C., Staton, M., Du, Z., Ficklin, S., Cho, I., Abbott, A., Tomkins, J. and Main, D. (2004) GDR (genome database for Rosaceae): integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research, *BMC Bioinformatics.* **5**, 130.
- Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. C. (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicin.* **10**, 544.
- Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J. and Park, H. J. (2003) Anticiceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1436.
- Oku, H., Ueda, Y. and Ishifuro, K. (2003) Anti-pruritic effects of the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1031.
- Matsuda, H., Nakamura, S. and Kubo, M. (1994) Studies of cuticle drugs from natural sources. II Inhibitory effects of prunus plants on melamin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1417.
- Gao, H., Wu, L., Kuroyanagi, M., Harada, K., Kawahara, N., Nakane, T., Umehara, K., Hirasawa, A. and Nakamura, Y. (2003) Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* K. and their activities in B16 mouse epidermal cells. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 1318.
- Kim, Y. M., Yun, J., Lee, C. K., Lee, H., Min, K. R. and Kim, Y. (2002) Oxyresveratrol and hydroxystibene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **277**, 16340.
- Kim, J. O. (2005) In *Illustrated Natural Drugs Encyclopedia* (Color Edition). *Yeokang Press*. Korea. **1**, 437.
- Kam, W. S. (1981) *Pharmaceutical Botany. A national Chinese medicine institute*. pp. 305-306.
- Ju, Y. C. (1989) The northeast medicinal plant. *Amur river scientific Press*. pp. 212-214.
- Lee, S. J. (1976) Korea folk medicine. *Seomoondang Press*. pp. 116.
- Han, B. H. and Han, Y. N. (1978) Immuno-suppressant activity of cherry bark extract. *Kor. J. Pharmacog.* **173**-175.
- Park, S. J. and Kang, Y. K. (1996) Species Identification of Tripitaka Koreana. *Mokchae Konghak.* **24**, 80-89.
- Hasegawa, M. and Shirato, T. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5559.
- Lee, H. J., Lee, S. S., Choi, D. H. and Atsushi, Kato. (2001) Studies on biological activity of wood extractives (VI)-Flavonoids in heartwood of *Prunus sargentii*. *Mokchae Konghak.* **29**, 133-139.
- Lee, H. J., Lee, S. S. and Choi, D. H. (2003) Studies on biological activity of wood extractives (VII)-Antimicrobial and anti-oxidative activities of extractives from the heartwood of *Prunus sargentii*. *Mokchae Konghak.* **31**, 16-23.
- Association of Analytical Chemists. (1984) Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): *Association of Analytical Chemists INC.*
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1199-1120.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
- Stirpe, F. and Della Corte, E. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method in Enzymol.* **105**, 302-310.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* **3981**, 517-519.
- Reissig, J. L., Storminger, J. L. and Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugars. *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.
- Conner, D. E. and Beuchat, L. R. (1984) Sensitivity of heat-stressed yeast to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 229-233.
- Yoshizawa, S., Horiuchi, T., Yoshida, T. and Okuda, T. (1987) Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* **1**, 44-47.
- Jung, S. J., Lee, J. H., Song, H. N., Seong, N. S., Lee, S. E. and Baek, N. I. (2004) Screening for antioxidant of plant medicinal extracts. *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 135-140.
- Kim, S. J., Han, D. S., Moon, K. D. and Thee, J. S. (1995) Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biotech. Biochem.* **59**, 822-826.
- An, B. J., Lee, J. T., Lee, C. E., Kim, J. H., Son, J. H., Kwak, J. H., Lee, J. Y., Park, T. S., Bae, H. J., Jang, M. J. and Jo, C.

- (2005) A study on physiological activities of *Coptidis Rhizoma* and application for cosmetic ingredients. *Kor. J. Herbology*. **20**, 83-92.
32. Kim, O. K., Lee, T. G., Park, Y. B., Park, D. C., Lee, Y. W., Yeo, S. G., Kim, I. S., Park, Y. H. and Kim, S. B. (1996) Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 1069-1073.
33. Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J., Han, D. S. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
34. Cha, B. C. and Lee, E. H. (2004) Anti-oxidant and anti-inflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **12**, 289-294.
35. Nathan, C. F. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
36. Guzik, T. J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune response. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
37. Byun, S. H., Yang, C. H. and Kim, S. C. (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Kor. J. Herbology*. **20**, 7-16.
38. Kim, H. K., Chun, H. J. and Han, Y. S. (1998) Screening of antimicrobial activity of the dandelion extract. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **14**, 144-147.
39. Kang, S. K. (1995) Isolation and antimicrobial activity of antimicrobial substance obtained from leaf mustard. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 695-701.