

연근 추출물에서 주름개선 소재의 개발

김희진 · 김타곤 · 강환열* · 백 현* · 전해영* · 김보영* · 김동욱†

인제대학교 제약공학과
621-749 경남 김해시 어방동 607번지
*아마란스화장품
618-817 부산시 강서구 송정동 1534-2
(2010년 2월 22일 접수, 2010년 3월 24일 채택)

Development of Anti-Wrinkle Agent from *Nelumbo nucifera* Root Extract

Hee Jin Kim, Tagon Kim, Whan Yul Kang*, Baek Hyun*, Hae Young Cheon*, Bo Young Kim* and Donguk Kim†

Department of Pharmaceutical Engineering, Inje University, 607, Obang-dong, Gimhae-si, Gyeongnam 621-749, Korea
*Amaranth Cosmetics, 1534-2 Songjung-dong, Gangseo-gu, Busan 618-817, Korea
(Received 22 February 2010; accepted 24 March 2010)

요 약

본 연구에서는 연근의 추출물에서 기능성화장품 소재를 개발하고자 하였다. 용매는 70~100%의 에탄올을 이용하였으며, 연근의 유효성분으로 *nuciferine*을 확인하였다. 연근 추출물의 화장품소재로서의 응용가능성을 보기 위해 안전성 시험(MTT assay), 주름개선 효과시험(Elastase 활성저해 시험) 및 항산화효과시험(DPPH free radical scavenging assay)을 실시하였다. 100% 에탄올로 연근을 추출할 경우 100 µg/ml의 농도에서 세포생존율이 80% 이상이어서 연근 추출물은 화장품소재로서 비교적 안전함을 알 수 있었다. 또한 연근 추출물은 100 µg/ml의 농도에서 elastase 활성억제가 40~50%를 보여주어서 비교적 우수한 주름개선 효과를 나타내었다. 50% 항산화 저해능을 보이는 농도(FSC₅₀)는 5.0~38 µg/ml로 연근 추출물의 항산화효과가 매우 우수하였다. 따라서 연근 에탄올추출물은 주름개선 기능성화장품 소재로서 그 가능성이 높음을 알 수 있었다.

Abstract – In this research, root extracts of *Nelumbo nucifera* was tested to see the possibility for functional cosmetic agent. 70-100% ethanol was used as solvent and *nuciferin* was confirmed as active component. To test cosmetic effect of root extracts of *Nelumbo nucifera*, safety effect(MTT assay), anti-wrinkle effect(elastase inhibition assay) and antioxidation effect(DPPH free radical scavenging assay) were measured. When 100% ethanol was used as extracting solvent, cell viability was over 80% at 100 µg/ml, which indicated that root extract of *Nelumbo nucifera* was suitable for cosmetic agent. Root extract of *Nelumbo nucifera* showed 40~50% elastase inhibition at 100 µg/ml so that it had good anti-wrinkle characteristics. 50% antioxidation capacity(FSC₅₀) was 5.0~38 µg/ml and root extract of *Nelumbo nucifera* showed excellent antioxidation effect. From the research, root extracts of *Nelumbo nucifera* showed strong possibility for anti-wrinkle functional cosmetic agent.

Key words: *Nelumbo Nucifera* Root, Ethanol Extraction, Anti-Wrinkle, Antioxidation

1. 서 론

사람의 노화는 우리 몸의 구성기관 모두에서 일어나고 피부도 마찬가지로 노화해 간다. 피부노화를 일으키는 원인은 다양하며 그 요인에 따라 나이가 들에 따라 나타나는 자연노화(내인성노화, intrinsic aging)와 자외선, 주변 환경 등 누적된 외부 자극에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다[1].

기존의 주름개선 소재로는 대표적으로 사용되는 레티놀(비타민 A), α -hydroxy acid(AHA), 아테노신 등은 콜라겐의 합성을 증가시

키고 표피 각화 과정을 정상화시켜 피부재생에 기여하는 물질로 많이 사용되고 있지만 빛과 열에 불안정하고 피부에 자극이 있는 것으로 알려져 있다[2,3].

많은 연구자들이 천연물에서 주름개선 소재 및 항노화소재를 개발하고자 하였다. 가장 대표적인 것으로서 현초(*Geranium nepalense*), 쇠뜨기(*Equisetum arvense*), 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens*), 스피루리나(*Spirulina*) 등이 보고되었다[4-7]. 그러나 천연물 중에서는 효능효과는 우수하나 원료의 대량획득이 어렵거나 혹은 생산단가가 높은 경우가 상당히 빈번하다.

따라서 본 연구에서는 천연물, 특히 식물유래에서 원료를 획득하면서도 가격이 저렴한 소재를 개발하고자 하였다. 천연물에서 주름

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: pedkim@inje.ac.kr

개선 소재를 탐색하기 위한 일환으로 연근 추출물의 화장품소재 응용가능성을 시험하였다. 연(*Nelumbo nucifera*)은 피자식물문의 미나리아재비목 수련과(Nymphaeaceae)로서 원산지는 인도, 중국, 일본, 한국, 시베리아 지역의 아시아 남부, 오스트레일리아 북부이다 [8]. 서식장소는 못이나 늪지에서 자라는 다년생 수초로 잎의 높이가 1~1.5 m이며 뿌리가 옆으로 길게 뻗은 원주형으로 마디가 많다.

연의 한의학과 중의학의 기록을 살펴보면 본초강목에서는 연은 기력을 왕성하게 하고 모든 질병을 몰리치며 오래복용하면 몸이 가벼워지고 수명을 연장한다고 기록되어 있다[9]. 약성본초에는 연은 오장육부의 기운부족, 특히 심, 비, 신의 기운부족과 속이 상한 것을 낮게 하며 12경맥의 기혈을 크게 보하고, 쌀과 연육으로 죽을 쑤어 먹으면 몸이 가볍고 든든하여지며 또 머리칼을 검게하고 장수하게 한다고 쓰여 있다[9]. 그리고 연은 전국 재배면적이 약 550 ha로서 많은 양이 생산되고 있으며, 가격도 다른 생약 및 천연물에 비해 매우 저렴한 것이 장점이다. 그리고 연근은 오랫동안 식품으로 사용되어져 와서 그 안전성이 입증된 천연물이다.

따라서 본 연구에서는 연근에서 에탄올을 용매로 사용하여 추출물을 얻고 안전성시험, 주름개선효과시험 및 항산화효과시험을 실시하여 연근 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 응용가능성을 조사하고자 하였다.

2. 실험

2-1. 시료의 추출

연근은 경남 함안 칠서에서 구입하였으며 수세 후 잘게 잘라 동결건조하였다. 추출용매는 70~100% 에탄올을 사용하였으며, 환류추출과 침지법의 2가지 방법을 사용하였다. 환류추출의 구체적인 실험방법은 다음과 같다; 연근 20 g에 에탄올 200 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간 동안 3회 환류 추출하였고, 여과지(Whatman No.2)로 여과 후, 여과액을 회전식 진공증발기로 감압 농축하여 건조시켰다. 침지법은 연근 20 g을 80% 에탄올 600 ml를 가한 다음 일주일 동안 침지시켜 추출하였고, 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후, 여과액을 회전식 진공증발기로 감압 농축하여 건조시켰다.

각각의 에탄올 추출물에 대해 극성에 따른 분획실험은 다음과 같이 실행되었다; 농축시킨 추출물을 물에 희석시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 3회 연속 반복하여 추출하였고, 회전식 진공증발기로 감압 농축하였으며, 고형물함량은 동결 건조 방법을 이용하여 산출하였다.

연뿌리 추출물을 농도 1 mg/ml(메탄올 : 물=1:1)로 제조하고 0.2 µm 여과막을 이용하여 여과한 후 HPLC(Agilent Technologies 1100series, USA)와 LC-MASS(Agilent Technologies 1100series, USA)로 분석하였다. 칼럼은 Zorbax SB C-18(5 µm, 4.6×150 mm)를 사용하였고, UV detector를 사용하여 285 nm에서 측정하였으며, 용매는 아세트니트릴(ACN, 0.1% H₃PO₄)과 물(0.1% H₃PO₄)을 사용하였고, 유속은 0.5 ml/min였다.

2-2. 화장품소재 시험

용매별 분획물의 총 폴리페놀 함량은 AOAC법[10]에 의해 측정하였다. 연근 추출물의 용매별 분획물 1 ml를 취하여 2%(w/v) Na₂CO₃ 용액 1 ml를 가하여 3분간 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 ml를 가하여 반응시켜 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준

곡선은 타닌산(tannic acid)을 증류수에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1%의 농도로 조제하고 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 680 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

세포독성시험은 mouse melanoma cell을 이용하여 측정하였다 [11]. 24-well plate에 B16F10 mouse melanoma cell을 5×10⁴ cell/ml씩 분주하여 24시간 배양 후 10~100 µg/ml의 농도로 희석한 연 추출물의 시료가 첨가된 새 배지로 교체하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma) 5 mg/ml를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양 2시간 후 형성된 fomazan을 DMSO로 녹이고, 96well plate로 옮긴 후 595 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

Elastase 활성억제는 다음과 같이 측정하였다[12]; 기질 1.0 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide(Sigma) 200 µl에 연뿌리 추출물 100-1,000 µg/ml로 희석시킨 시료용액 20 µl와 2.5 U elastase(porcine pancreas solution) 10 µl를 첨가하여 25°C에서 10 min 동안 반응한 후 ELISA reader로 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 활성은 DPPH(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl, Sigma)을 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하였다[13]. 0.2 mM DPPH 에탄올 용액을 제조하여 조제한 액을 여과지(Whatman No. 2)에 여과한 후 0~200 µg/ml 사이의 농도로 제조 후 37°C에서 30 분간 반응시키고, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

모든 실험은 3회 반복하여 평균하였고, 95%의 신뢰도 구간으로 분석하였다. 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 사용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 추출 및 분석

연근을 70~100%의 에탄올용매로 추출을 하여 수율을 구한 결과가 Table 1에 나타나 있다. 전체 수율을 기준으로 할 경우 80% 에탄올로 1주간 침지한 경우가 가장 높았으며, 그 중에서도 물 층의 질량 수율이 가장 많았고, 이어서 에틸아세테이트, 헥산의 분획물 순이었다.

용매별 분획물의 총 폴리페놀 함량을 분획물 부피당 폴리페놀의 질량으로 측정하였으며 그 결과가 Table 2에 나타나 있다. 연근의 70~100% 에탄올 추출물 중 전반적으로 에틸아세테이트 분획에서 폴리페놀의 함량이 가장 높았다. 각 에탄올 추출법 중에서는 80% 에탄올로 침지한 경우가 폴리페놀의 함량이 가장 높았다. 따라서 본 연구에서는 80% 에탄올로 침지한 추출물 중 에틸아세테이트 분획물과 100% 에탄올 추출물중 에틸아세테이트 분획물을 주 소재로 사용하여 화장품소재 시험을 실시하였다.

LC-MS로 80% 에탄올 침지 추출물 중 에틸아세테이트 분획물을

Table 1. Yields of root extracts of *Nelumbo nucifera* for each fraction in ethanol extraction (%)

	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Buthanol	Water
100% Ethanol	0.0067	0.19	0.34	1.7	1.2
80% Ethanol	0.18		0.14		1.7
70% Ethanol	0.24	0.18	0.25	0.065	2.4
80% Ethanol immersion	0.62	0.11	0.83	0.080	7.9

Table 2. Total polyphenol concentration of root extracts of *Nelumbo nucifera* for each fraction in ethanol extraction (mg/mL)

	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	Water
100% Ethanol	218	216	452	245	243
80% Ethanol			499		322
70% Ethanol	219	227	287	308	278
80% Ethanol immersion	267	268	564	221	245

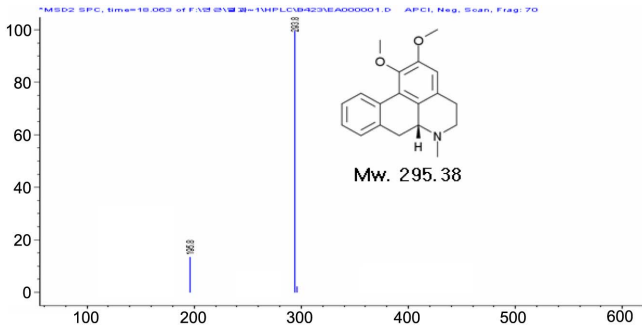


Fig. 1. HPLC-MS/MS plot of root extracts of *Nelumbo nucifera* in ethylacetate fraction by 80% ethanol immersion.

분석한 결과가 Fig. 1에 나타나 있다. LC-MS/MS의 분석결과 유효 성분은 폴리페놀의 일종인 분자량 295.38의 누시페린(nuciferine)으로 나타났다.

3-2. 화장품소재시험

연근 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 mouse melanoma cell을 이용한 MTT assay를 실시하였으며 그 결과가 Fig. 2에 나타나 있다. 연근 추출물의 세포독성은 측정범위인 10~100 µg/ml에서 비교적 낮았으며, 80% 에탄올 침지 분획물이 100% 에탄올 추출 분획물이 보다 세포독성이 다소 높았다. 이는 80% 에탄올 침지 분획물의 경우 1주일 동안 침출시킴으로 연근의 세포독성성분이 용액 중에 다량 용출된 것으로 생각된다. 100% 에탄올로 연근을 추출할 경우 100 µg/ml의 농도에서 세포생존율이 80% 이상이어서 연근 추출물은 화장품소재로서 비교적 안전함을 알 수 있었다.

주름개선 효과 측정의 일환으로 elastase 활성 억제 시험(elastase inhibition assay)을 실시하였으며 그 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. 연근 추출물의 주름개선 효과를 대조군인 ursolic acid와 비교했을 때 50~250 µg/ml의 저 농도 영역에서는 80% 에탄올 침지추출물의 효과가 보다 우수하였다. 100 µg/ml의 농도에서 elastase 활성억제

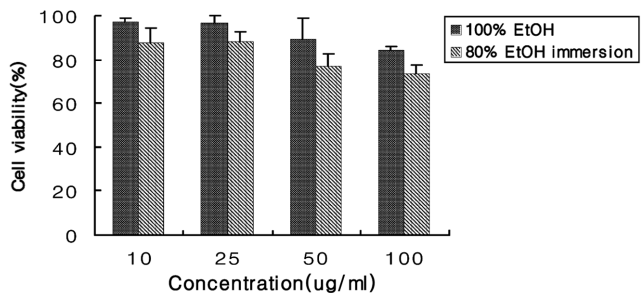


Fig. 2. Cell viability of ethylacetate fraction for root extracts of *Nelumbo nucifera* in ethanol extraction on B16F10 mouse melanoma cell.

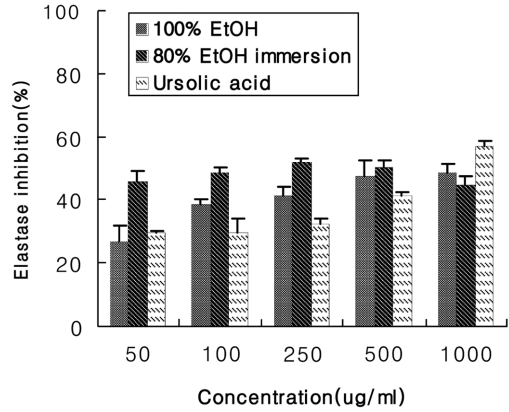


Fig. 3. Elastase inhibition activity of ethylacetate fraction for root extracts of *Nelumbo nucifera* in ethanol extraction.

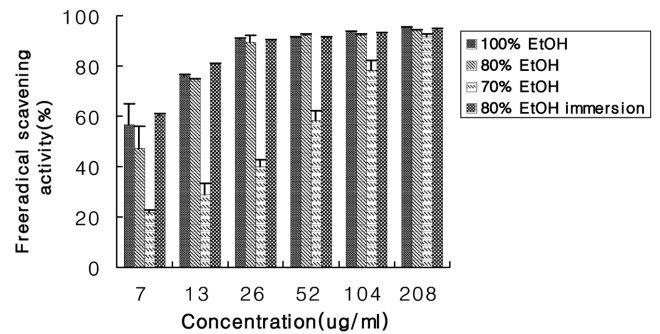


Fig. 4. Free radical scavenging activity of ethylacetate fraction for root extracts of *Nelumbo nucifera* in ethanol extraction.

가 40~50%를 보여주어서 천연 식물중에서는 상당히 우수한 결과를 보여주었다.

연근 추출물에 대해 DPPH free radical scavenging assay를 이용한 항산화효과 시험을 실시하였으며, 그 결과가 Fig. 4에 나타나 있다. 항산화효과는 각 에탄올 추출법에서 모두 매우 우수하였으며, 특히 7~208 µg/ml의 실험 농도범위에서 80% 에탄올 침지 분획물의 효과가 가장 우수하였다. 50% 항산화 저해능을 보이는 농도(FSC₅₀)가 100, 80, 70% 에탄올추출 및 80% 에탄올 침지의 경우 각각 5.5, 7.0, 38, 5.0 µg/ml로 나타났다. 항산화효과 시험의 비교대상으로 자주 사용되는 비타민 C와 E의 경우 FSC₅₀가 각각 4, 9 µg/ml임을 고려하면 연근 추출물의 항산화효과가 매우 우수함을 알 수 있다[14].

연근 에탄올 추출물의 항산화효과 및 주름개선 효과를 다른 천연물과 비교해 보면 그 효과가 유사하거나, 우수한 것을 알 수 있다 [4-7,14]. 연근은 다른 한방약제에 비해 원료를 구하기 쉬운 뿐만 아니라, 그 가격도 매우 저렴하며, 식용으로 장기간 사용되어져서 안전성도 입증된 식물이다. 따라서 연근 추출물은 기능성 화장품 소재로서의 응용가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

4. 결 론

연근으로부터 70~100%의 에탄올을 이용하여 유효성분을 추출하였다. 총 폴리페놀의 함량은 80% 에탄올 침지 추출물 중 ethylacetate 분획물에서 564 mg/ml로 가장 높았으며, 연근 추출물의 성분분석 결과 유효성분은 폴리페놀의 일종인 분자량 295.38의 nuciferine

으로 나타났다. 100% 에탄올로 연근을 추출할 경우 100 µg/ml의 농도에서 세포생존율이 80% 이상이어서 연근 추출물은 화장품소재로서 비교적 안전함을 알 수 있었다. 또한 연근 추출물은 100 µg/ml의 농도에서 elastase 활성억제가 40~50%를 보여주어서 천연 식물중에서는 상당히 우수한 결과를 보여 주었다. 50% 항산화 저해능을 보이는 농도(FSC₅₀)가 100, 80, 70% 에탄올추출 및 80% 에탄올 침지의 경우 각각 5.5, 7.0, 38, 5.0 µg/ml로 연근 추출물의 항산화효과는 매우 우수하였다. 따라서 연근 에탄올추출물은 주름개선 기능성화장품 소재로서 가능성이 높음을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 2009년도 지식경제부 한국산업기술평가원 지원 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. KDA Textbook Editing Board, *Dermatology*, 5th ed., Ryo Mook Gak, Seoul(2008).
2. Korea Food and Drug Administration, <http://www.kfda.go.kr/index.html>.
3. Elsner, P. and Mailbach, H. I., *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*, 2nd ed., Taylor & Francis, New York, NY(2005).
4. Lee, K. H. and Park, S. N., "Antioxidative Activities and Anti-aging Effects of *Geranium nepalense* Extracts;" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(1), 25-35(2008).
5. Yang, H. J. and Park, S. N., "Component Analysis and Study on Anti-elastase Activity of *Equisetum arvense* Extracts (II);" *J. Soc.*

- Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139-144(2007).
6. Sim, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Lee, B. C., Lee, G. S. and Pyo, H. B., "The Inhibition of UVA-induced Matrix Metalloproteinase-1 in Human Dermal Fibroblasts and the Improvement of Skin Elasticity by *Cirsium setidens* Extract;" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 181-187(2007).
7. Kim, D. H., Choi, H. K., Cho, S. C., Kook, M. C. and Park, C. S., "Enhancement of Antioxidant and Anti-aging Activities of Spirulina Extracts;" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(3), 225-231(2008).
8. Pharmacognosy Researchers, *Modern Pharmacognosy*, Hak Chan Publishing, Seoul(2000).
9. Park, J. C., *Functional Food and Oriental Medicine*, Hyoilbooks, Seoul(2007).
10. Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Washington DC.(1990).
11. Mosmann, T., "Rapid Colorimetric Assay for the Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxic Assay;" *J. Immun Method*, **65**, 55-62(1983).
12. Kim, H. J., "Development of Functional Cosmetic Agent from *Nelumbo nucifera*;" Master Thesis, Inje University, Gimhae, Gyongnam(2009).
13. Park, S. K., Hong, S.-K., Kim, H. J., Kim, B. Y., Kim, T. G., Kang, J. S. and Kim, D., "Cosmetic Effect of *Angelica gigas* Nakai Root Extracts;" *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 553-557(2009).
14. Kim, J. Y., Yang, H. J., Lee, K. H., Jeon, S. M., Ahn, Y. J., Won, B. R. and Park, S. N., "Antioxidative and Antiaging Effects of Jeju Native Plant Extracts (II);" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 165-173(2007).