大韓本草學會誌 제27권 제5호(2012년 9월)
Kor. J. Herbology 2012 ; 27(5) : 65-75
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2012.27.5.65

도인승기탕 및 그 구성약재의 화장품약리활성

이진영[1*], 이수연[1], 전혜지[1], 윤지영[1], 황현욱[1], 박주훈[1], 안봉전[2], 손준호[3], 황주영[3]

1 : 호서대학교 한방화장품과학과
2 : 대구한의대학교 화장품약리학과
3 : 한국한방산업진흥원

Cosmeceutical Activities of Doinseunguitang and Its Composition

Jin-Young Lee[1*], Soo-Yeon Lee[1], Hye-Ji Jun[1], Ji-Young Yoon[1], Hyun-Uk Hwang[1], Joo-Hoon Park[1], Bong-Jeun An[2], Jun-Ho Son[3], Ju-Young Hwang[3]

1 : Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Korea
2 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Korea
3: Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Korea

ABSTRACT

Objectives : Cosmeceutical activities such as anti-oxidative and anti-aging effects of the Doinseunguitang and its composition, a traditional prescription, were evaluated.

Methods : We performed MTT assay, melanin synthesis inhibition assay, DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition assay, astringent activity assay, tyrosinase inhibition assay, elastase and collagenase inhibition assay.

Results : The results were obtained as follows : DPPH free radical scavenging of water extract Doinseunguitang (DISG) and ethanol extract DISG was 60% and 50% at 1,000 ppm. Xanthine oxidase inhibition effect of ethanol extract showed more than 80% at 500 ppm. Tyrosinase inhibition and inhibition melanin synthesis activities were measured in 40% and 50% at 1,000 ppm and 100 ppm. Elastase and collagenase inhibition rate of ethanol extracts DISG 40% and 80% at 1,000 ppm. It was concluded that compositive ingredients (Persicae Seman, Glycyrrhizae Radix, Cinnamomi Ramulus, Rhei Rhizoma) influenced the most results.

Conclusions : The results indicated that, ethanol extract which is superior in its anti-oxidative and anti-aging effects is useful to be applied in herbal cosmetic industry.

Key words : Doinseunguitang, anti-oxidant, anti-aging, herbal cosmetic, compositive ingredients

서 론

도인승기탕은 도핵승기탕이라고도 불리는 한의학상의 처방으로 월경통이나 월경불순, 월경곤란과 같은 부인병에 효과가 있으며[1], 무좀과 습진 같은 피부질환에도 주로 처방되어져 질환을 완화시키는 작용을 한다. 도인승기탕의 처방은 도인, 대황, 감초, 계지, 망초의 5가지 한약재로 구성되어 있다[2]. 이 구성약재들의 효능을 보면 도인은 피부가려움증, 건조, 기미, 주근깨 등에 쓰이고 단독으로 사용 시, 민감성 피부는 빨갛게 달아오를 수 있으므로 감초나, 보리, 현미 등과 같이 사용하는 것이 좋으며 약리작용으로는 혈관확장작용, 항염증작용, 항알르레기 작용 등이 보고되어있다[3]. 이러한 도인은 항산화작용을 가지고 있어 지질산화물의 억제뿐 만 아니라 노화의 억제와 항암성 등이 우수한 천연물로 알려져 있다. 또한 염증성 매개물질의 생성을 강하게 억제하는 물질로 면역질환, 인체질환 치료에 중요한 도움이 된다. 계지는 피부의 땀구멍을 열어 땀을 내어 피부를 풀어주어 감기에 매우 효과적인 한약재로 널리 알려져 있으며 특히 계지의 aldehyde 성분은 항균

*교신저자 : 이진영, 충남 아산시 배방읍 호서로 79번길 20 호서대학교 한방화장품과학과
· Tel : +82-41-540-9552 · Fax : +82-41-540-9538 · E-mail : jylee@hoseo.edu
· 접수 : 2012년 07월 24일 · 수정 : 2012년 09월 03일 · 채택 : 2012년 09월 06일

효과와 항바이러스 효과를 띄며[4] 이러한 효과로 피부소양증, 두드러기, 알레르기 비염 등 피부에 효과적으로 작용한다고 알려져 있다. 망초는 박초를 두 번 달여서 만든 약재로 소염, 항염 작용이 뛰어나다. 이러한 망초를 사용하여 목욕을 하면 피부가 미끌미끌해지고 부드러워져 미인탕이라고 불리며[5] 또한 망초는 tyrosinase 활성 저해 효과가 뛰어나 미백효과가 우수하다고 보고되어진바 있다[6]. 감초는 중화 및 해독작용을 하여 독성을 가진 약이나 세균에 의한 독에도 효과가 뛰어난 한방 처방으로 알려져 있다. 이 추출물에는 강한 콜라겐의 혼합촉진활성이 있으며 항염증효과, 항알르레기 효과를 가진다. 또한 감초추출물은 코직산과 아스코르빈산보다 효능이 더 우수하며 여드름, 피부염, 습진 땀띠에 효과적이며 피부뿐 만 아니라 두피염증의 발생억제를 위한 항산화물질과 산화질소 형성억제 물질로 활용될 수 있어 탈모의 예방 및 치료에도 많이 쓰인다[6,7]. 대황은 외용약으로 효력이 강하여 화상치료와 피부병에 이용되고 있으며[8], 항산화 효과 및 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 활성저해효과와 자외선에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하여 우수한 항노화 소재로 보고되어진 바 있다[9]. 이러한 특징을 가진 한방복합처방인 도인승기탕 및 그 구성약재의 생리활성을 측정하여 화장품 소재 및 식품 첨가제로서 사용이 가능할지 판단하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시료 추출

도인승기탕(挑仁承氣湯) 제조에 필요한 구성약재는 경산 북도 경산시 소재의 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. 도인승기탕은 동의보감[2]에 기록된 내용에 준하였으며, 구성약재는 Table 1과 같다. 대황 3 g, 계지 2 g, 망초 2 g, 감초 10 g, 도인 10 g를 혼합하여 준비하고 구성약재는 시료 10배씩 준비하였다. 도인승기탕 및 구성약재는 각각 시료의 10배 되는 용매를 사용하였다. 열수 추출물의 경우 85 ℃에서 9시간 환류냉각 추출하여 3회 반복 추출하였고, 에탄올 추출물의 경우 12시간 동안 침지추출한 후 여과지(Whatman No. 1)로 3회 반복 여과한다. 각 추출물은 농축 후 동결건조 시켜 분말상태로 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료에 사용하였다.

Table 1. Prescription contents of Doinseunguitang

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	重量 (g)
桃仁	Persicae Semen	10
甘草	Glycyrrhizae Radix	10
大黃	Rhei Rhizoma	3
桂枝	Cinnamomi Ramulus	2
芒硝	Natrii Sulfas	2

2. 세포 배양 및 실험 시약

실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA), porcine pancreas elastase (PPE), N-succinyl-(L-Ala)$_3$-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정에 사용된 세포주는 melanoma 세포인 B16F10을 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbeco's modified eagle 's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 또한 세포 생존율 측정에 사용한 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법[10]을 변형하여 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 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

4. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법[11]에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 tris-HCl 완충용액(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 M HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

5. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법[12]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℃에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가군와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 uric acid 생성량}}{\text{무첨가군의 uric acid 생성량}}\right) \times 100$$

6. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[13]에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500 μl에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 200 μl 및 시료용액 100 μl의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 200 μl을 첨가하여 25 ℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

7. Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등[14]의 방법에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37 ℃에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 500 μl씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/ml)용액 500 μl을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-$(L\text{-}Ala)_3$-p-nitroanilide (500 μg/ml)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

8. Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wűnsch 등[15]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM $CaCl_2$를 첨가하여, 4-phenylazo-benzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (300 μg/ml)를 녹인 기질액 250 μl 및 시료용액 100 μl의 혼합액에 collagenase (200 μg/ml) 150 μl를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6 % citric acid 500 μl을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

9. Astringent 활성 측정

Astringent 활성 측정은 Lee 등[16]의 방법에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1 : 1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성 측정은 시료용액의 첨가군와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Astringent 활성능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

10. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[17]에 따라 측정하였다. Melanoma (B16F10) 세포를 96 well plate에 $0.6 \sim 8 \times 10^3$ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : ethanol (1 : 1) 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

11. Melanin 생합성 저해율 측정

피부 멜라노마 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등[18]의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm culture dish에 2×10^6 cell/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 ml 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액 (pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10^6 세포 당 1 ml의 5 % TCA로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether : ethanol (1 : 3) 1 ml를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 ml로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 ml 가하여 80 ℃에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Melanin 생합성 저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

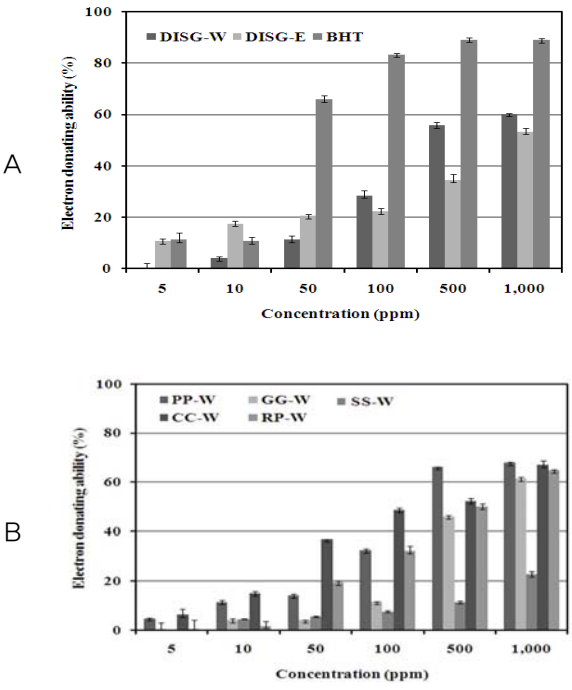
12. 통계처리

본 연구의 통계처리는 SPSS 통계분석 프로그램(version 12.0)을 이용하여 평균치와 표준오차을 산출하여 오차막대를 이용하여 표시하였다.

결 과

1. 전자공여능 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 도인승기탕 복합처방의 전자공여능은 망초를 제외한 모든 추출물 1,000 ppm에서 50% 이상의 효과를 나타내었다. 또한 그 구성약재의 전자공여능은 계지 열수 추출물의 경우 100 ppm에서 50 %의 효과를 나타내었으며, 도인과 감초 및 대황도 각각 500 ppm에서 66, 46, 50 %의 효과를 나타내었다. 에탄올 추출물의 경우 대황은 100 ppm에서는 92 %의 효과를 보였으며, 1,000 ppm의 도인, 감초, 계지의 경우 88, 79, 92 %로 에탄올 추출물의 활성이 우수하였다. 이는 Cha 등[19]이 연구한 오디의 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 전자공여능이 더 우수함을 나타낸 결과와 비교하여 비슷한 경향을 나타내었으며, Hwang 등[20]의 바나바잎 메탄올, 에탄올, 열수 추출물의 경우 5,000 ppm에서 각각 50.7, 58.3, 50.3 %의 활성을 나타낸 결과와 비교하여 도인승기탕 및 그 구성약재의 전자공여능이 우수함을 확인할 수 있었다.



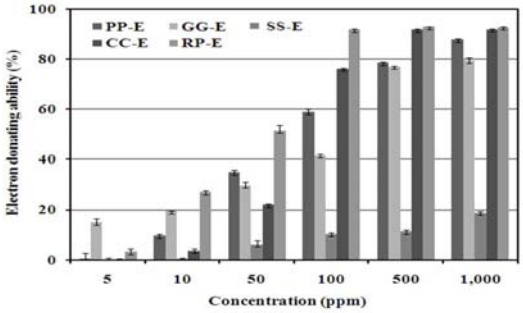
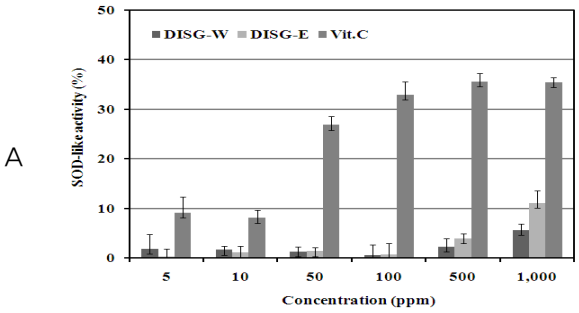


Fig. 1. Electron donating ability of Doinseunguitang and its composition.
A – DISG-W : Doinseunguitang extracted with water, DISG-E : Doinseunguitang extracted with ethanol, BHT : butylhy droxytoluen
B – PP-W : Persicae Semen extracted with water, GG-W : Glycyrrhizae Radix extracted with water, SS-W : Sodium sulfate extracted with water, CC-W : Cinnamomi Ramulus extracted with water, RP-W : Rhei Rhizoma extracted with water
C – PP-E : Persicae Semen extracted with ethanol, GG-E : Glycyrrhizae Radix extracted with ethanol, SS-E : Sodium sulfate extracted with ethanol, CC-E : Cinnamomi Ramulus extracted with ethanol, RP-E : Rhei Rhizoma extracted with ethanol
Result are means ± S.D. of triplicate data.

2. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 SOD 유사활성능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 먼저 도인승기탕 복합처방의 SOD 유사활성능은 모든 추출물에서 20 % 이하의 다소 낮은 경향을 보였으나, 그 구성약재의 SOD 유사활성능은 계지의 열수 및 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 각각 21 %, 23 %를, 대황의 에탄올 추출물에서 33 %로 구성약재 중 가장 높은 효과를 나타내었다. 이는 도인승기탕 복합처방과 그 구성약재가 Hong 등[21]이 보고한 바와 같이 플보리수의 농도가 높아짐에 따라 SOD 유사활성능이 증가하는 경향을 보였고, An 등[22]이 보고한 한방복합처방인 내소황련탕의 에탄올 추출물 700 ppm에서 27.4 %로 그 효능이 유사함을 확인할 수 있었다. 따라서 도인승기탕과 그 구성약재의 경우 열수 추출물보다는 에탄올 추출물에서 더 높은 효과를 나타내었으며, 그 구성약재인 계지와 대황의 추출물이 가장 효과가 높은 것으로 보아, 그 영향력이 있음을 확인할 수 있었다.



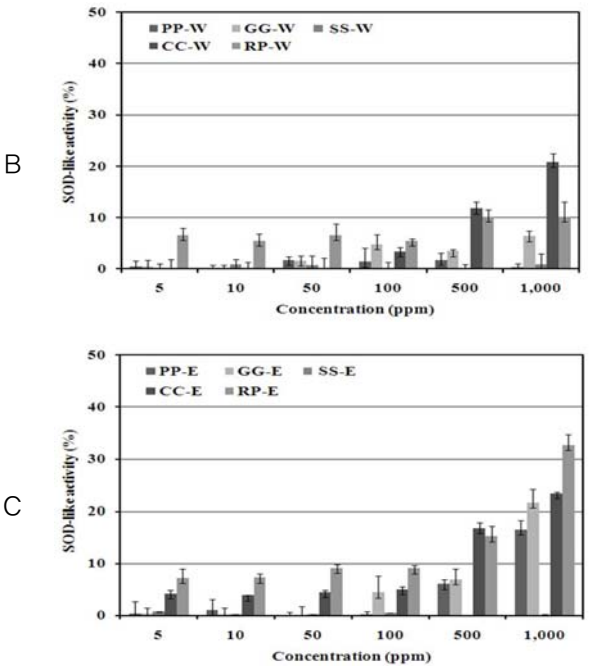


Fig. 2. SOD-like activity of Doinseunguitang and its composition.

3. Xanthine oxidase 저해활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 먼저 도인승기탕 복합처방의 xanthine oxidase 저해활성은 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 높은 효과를 나타내었으며, 특히 에탄올 추출물 50 ppm에서 48 %로 유의성 있는 결과를 나타내었으며, 1,000 ppm에서는 94%의 저해활성을 나타내었다. 도인승기탕 구성약재의 xanthine oxidase 저해활성은 감초, 계지 및 대황의 열수 추출물 1,000 ppm에서 각각 81%, 88 %, 93 %로 우수한 효과를 나타내었으며, 에탄올 추출물에서도 감초와 계지 1,000 ppm에서 각각 87 %, 96 %로 우수한 저해활성을 나타내었다. 이는 Yeo 등[23]의 녹차, 오룡차 및 홍차 추출물의 xanthine oxidase 억제 작용에서 차 추출물의 농도가 증가할수록 저해효과가 높은 경향을 나타내었고, Hong 등[24]의 솔잎 추출물의 xanthine oxidase의 저해활성에서 솔잎 발효 추출물, 솔잎의 80 % 에탄올 추출물과 50 % 에탄올 추출물이 1,000 ppm에서 62.8 %, 64.9 %, 55.9 %로 나타난 결과보다 더 높은 활성을 나타내었다. 위 결과로 미루어 보아 도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 경우 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 더 높은 효과를 나타내었으며, 도인승기탕 복합처방의 xanthine oxidase 저해활성은 특히 그 구성약재인 계지 추출물이 가장 효과가 높은 것으로 보아 그 영향력이 있음을 확인할 수 있었다.

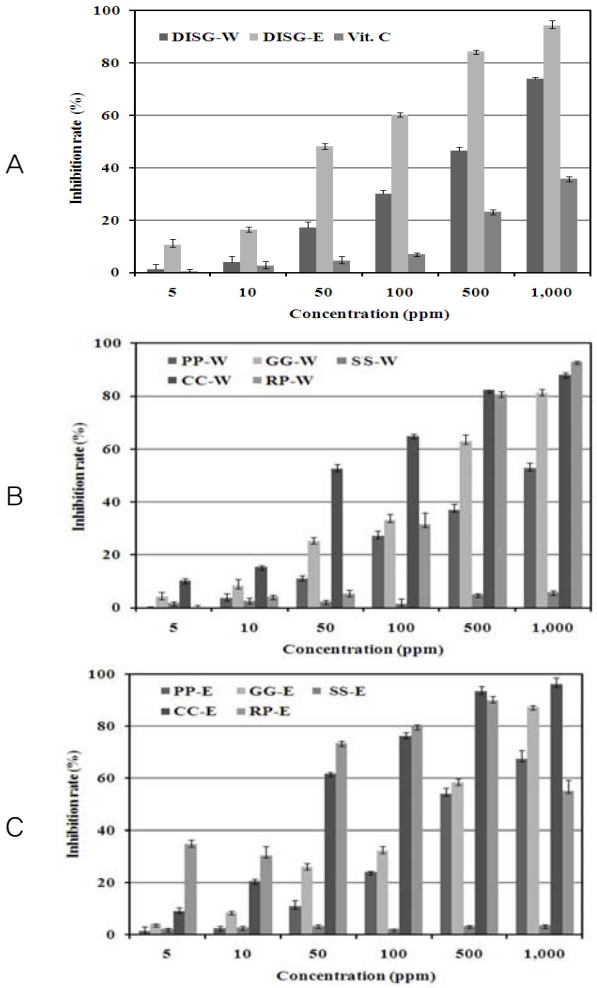


Fig. 3. Inhibition rate of Doinseunguitang and its composition on xanthine oxidase.

4. Tyrosinase 저해활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 도인승기탕 복합처방의 tyrosinase 저해활성은 vitamin C 보다는 다소 낮았지만 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 41 %의 저해활성을 나타내었으며, 그 구성약재의 tyrosinase 저해활성은 감초 열수 추출물 1,000 ppm에서 42 %의 저해활성을, 도인과 계지의 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 각각 51%, 52%의 저해활성을 나타내었다. 이는 Lee 등[25]의 배나무 절지 추출물과 kojic acid, epicatechin의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 10,000 ppm 농도에서 각각 89%, 92 %, 9 %를 저해활성을 나타낸 결과와, Lee 등[26]의 제주산 식물인 돌외, 비파, 쇠무릎, 측백, 치자, 환삼덩굴의 CHCl3 분획물 1,000 ppm 농도에서 각각 9.5%, 8.4%, 6.2 %, 4.4 %, 4.3 %, 6.6 %를 나타내어 도인승기탕 복합처방과 그 구성약재인 도인과 계지의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다. 도인승기탕 복합처방은 에탄올 추출물의 활성이 더 우수하였으며, 그 구성약재의 경우 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 더 높은 효과를 나타내었다. 또한 도인승기탕 복합처방의 tyrosinase 저해활성은 특히, 그 구성약재인 도인과 계지 추출물이 가장 높은 것으로 보아 그 영향력이 있음을 확인할 수 있었다.

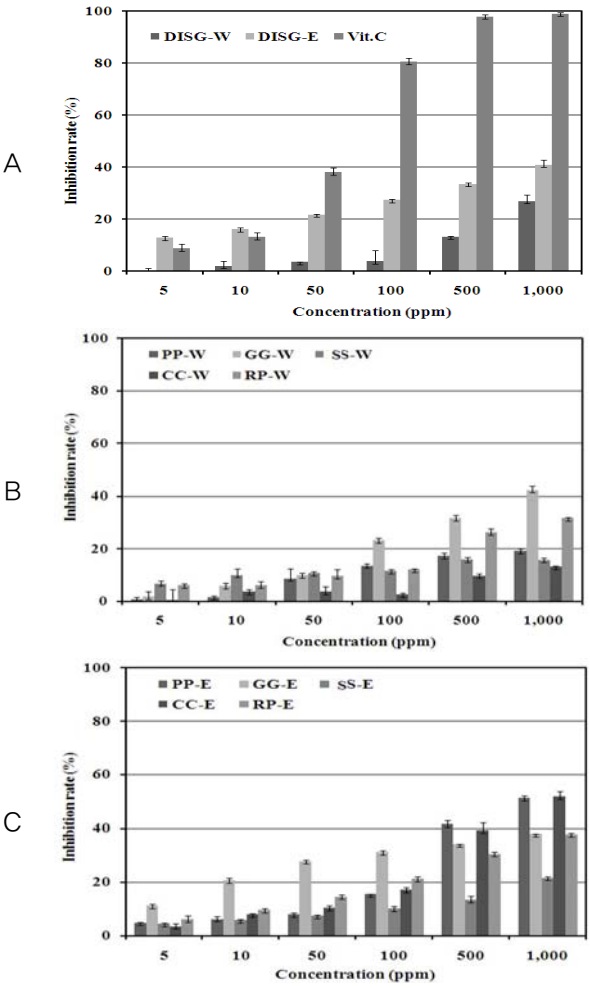


Fig. 4. Inhibition rate of Doinseunguitang and its composition on tyrosinase.

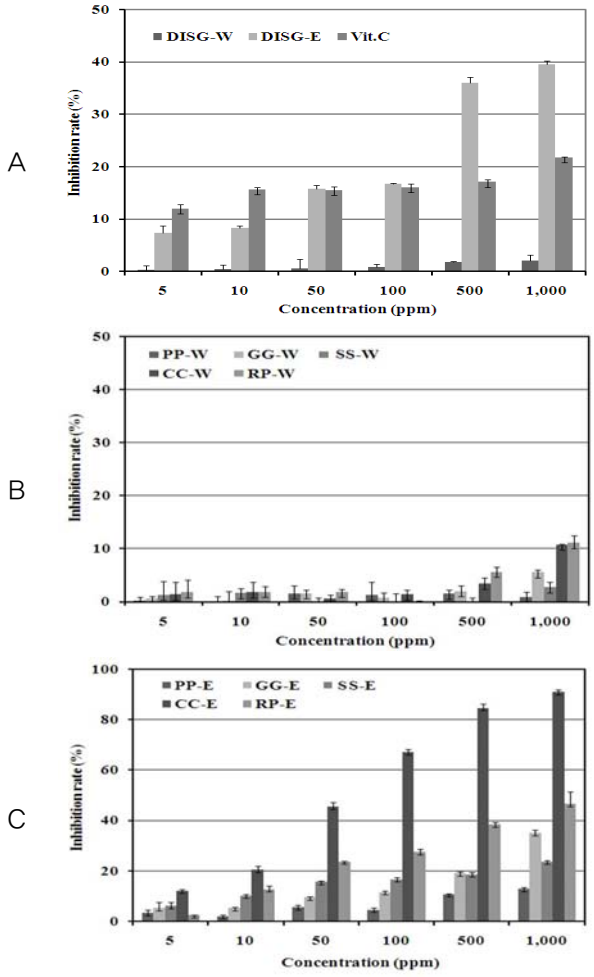


Fig. 5. Inhibition rate of Doinseunguitang and its composition on elastase.

5. Elastase 저해활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 elastase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 5와 같이 나타내었다. 도인승기탕 복합처방의 경우 열수 추출물이 10 % 미만의 낮은 저해활성을 나타낸 반면, 에탄올 추출물 500 ppm에서 36 % 저해활성을 나타내었다. 또한 그 구성약재의 경우도 열수 추출물이 10% 미만의 낮은 저해활성과 달리, 에탄올 추출물 500 ppm에서 계지의 경우 85 %의 저해활성을, 대황의 경우 38 %의 저해활성을 나타내어 에탄올 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다. 이는 Kwak 등[27]의 노화억제에 관련된 각종 약용식물인 모과나무, 계피차, 마, 조각자, 저령의 열수 추출물의 elastase 저해활성 측정한 결과 1,000 ppm 농도에서 각각 54 %, 52 %, 51 %, 45 %, 57 %의 저해활성을 나타낸 결과와, Kim 등[28]의 홍화씨 추출물과 식물성 유사 호르몬으로 알려진 ursolic acid는 500 ppm에서 31.7 %, genistein은 40.7 %의 저해능을 나타내어, 도인승기탕의 에탄올 추출물과 비슷한 효과를 나타내었으며, 구성약재인 계지의 경우 우수한 elastase 저해활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

6. Collagenase 저해활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 collagenase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. 먼저 도인승기탕 복합처방의 경우 열수 추출물과 에탄올 추출물 1,000 ppm에서 대조군인 vitamin C와 유사한 효과를 나타내었으며, 특히 에탄올 추출물의 경우 500 ppm에서 75 %의 우수한 저해활성을 나타내었다. 또한 구성약재의 열수 추출물에서 감초, 계지 및 대황 추출물 500 ppm에서 각각 73, 76, 84 %의 저해활성을 나타내었으며, 에탄올 추출물의 경우도 500 ppm에서 감초, 계지 및 대황 추출물이 62, 76, 75 %의 저해활성을 나타내어 구성약재 중 가장 높은 효과를 나타내었다. 이는 Lee 등[29]의 유백피 추출물의 collagenase 저해활성 측정결과, 100 ppm에서 27.6 %를 나타내었으며, Barrantes 등[30]의 알로에 추출물의 경우 37.1 %를 나타내어 도인승기 탕 및 구성약재의 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다. 위 결과로 미루어 보아 도인승기탕 복합처방의 collagenase 저해활성은 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 구성약재는 감초, 계지 및 대황 열수 및 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내어 영향력이 있음을 확인할 수 있었다.

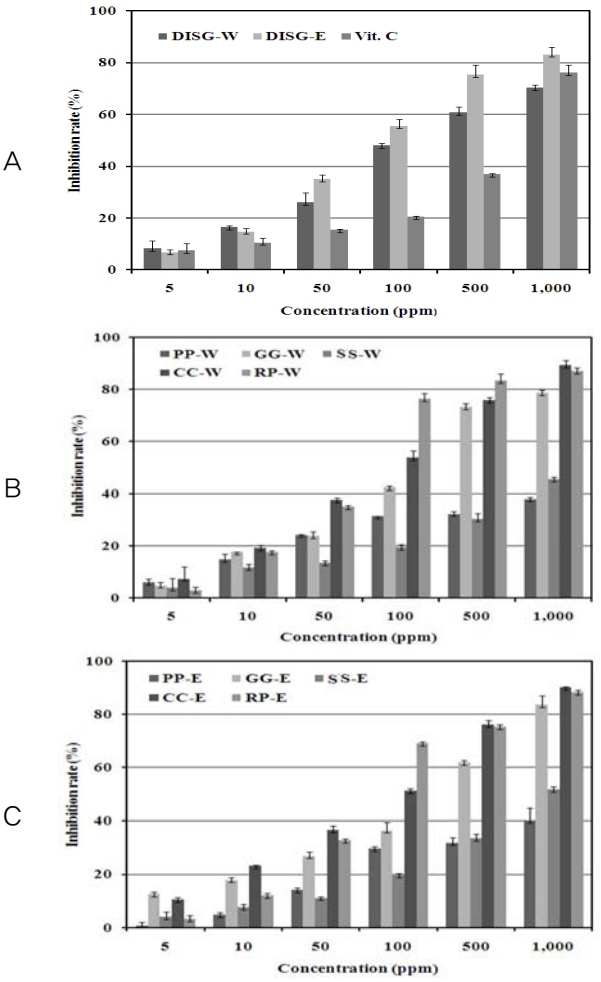


Fig. 6. Inhibition rate of Doinseunguitang and its composition on collagenase.

7. Astringent 활성 측정 결과

도인승기탕 복합처방과 그 구성약재의 astringent 활성을 측정한 결과 Fig. 7과 같이 나타내었다. 먼저 도인승기탕 복합처방의 에탄올 추출물의 경우 5,000 ppm에서 51 %로 대조군인 vitamin C 보다 높게 나타났으며, 구성약재 열수 추출물의 경우 5,000 ppm에서 20 % 이상의 활성을 나타내었다. 반면 구성약재 에탄올 추출물의 경우 1,000 ppm에서 감초를 제외한 모든 약재가 50 % 이상의 활성을 나타내어 에탄올 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다. 이는 Jeong[31]의 함초 추출물 10,000 ppm에서 50 %의 효과를 나타냈다는 보고와 비교하여 도인승기탕 구성약재인 에탄올 추출물의 활성이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

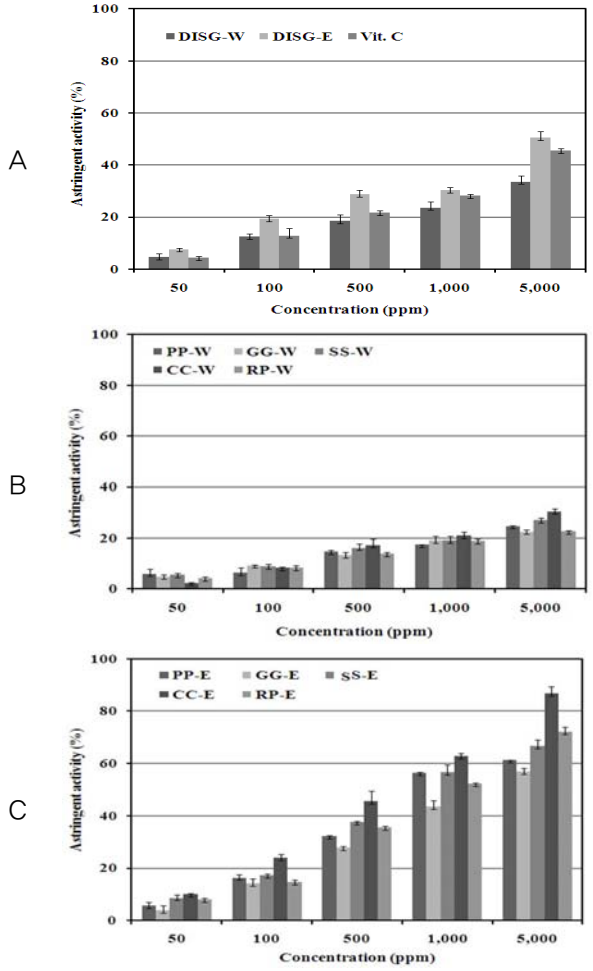


Fig. 7. Comparison of astringent activity on Doinseunguitang and its composition.

8. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

도인승기탕 추출물의 세포 생존율을 확인할 결과 Fig. 8에 나타낸 결과와 같이 열수 및 에탄올 추출물 모두 100 ppm 이하에서 세포의 독성이 없음을 확인할 수 있었으며, 이에 멜라노마 세포의 농도를 100 ppm 이하로 하여 실험을 실시하였다. 실험을 실시하였다.

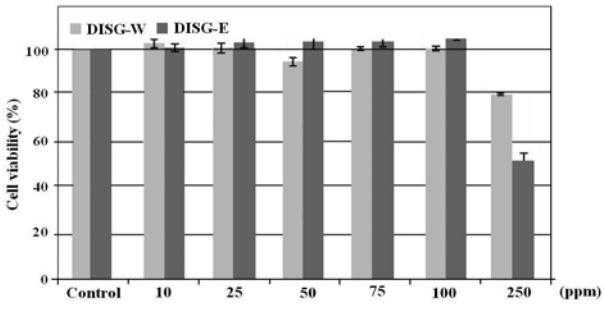


Fig. 8. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treatment with Doinseunguitang.
The cell were cultured in the presence of various concentration of extract for 48 hours. The viability of the cells was measured by MTT assay.

9. Melanin 생합성 저해율 측정 결과

도인승기탕 복합처방의 melanin 생합성량을 측정한 결과 열수 추출물의 경우 그 활성이 미비하였으나, 에탄올 추출물 100 ppm에서 53.3%의 저해활성을 나타내어 유의한 결과를 나타내었다(Fig. 9). 이는 Lee 등[32]의 연구 결과에 따르면 시료 10% 첨가 시 50%의 tyrosinase의 활성이 억제 되는 것을 보았을 때 도인승기탕 에탄올 추출물은 0.01% 첨가 시 57%의 tyrosinase 활성 억제능을 나타내어 미백 효과가 우수함을 알 수 있다.

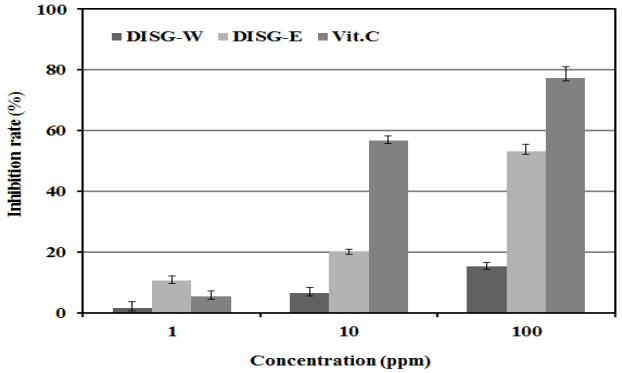


Fig. 9. Inhibition melanin synthesis of Doinseunguitang on melanoma cell (B16F10).
DISG-W : Doinseunguitang extracted with water, DISG-E : Doinseunguitang extracted with ethanol, Vit. C : ascorbic acid
Result are means ± S.D. of triplicate data.

고 찰

최근 사회적으로 피부노화에 대한 관심이 급증하고 삶의 질을 우선하는 소비자들의 욕구에 따라 화장품 사업이 자연주의와 자연성분을 이용한 제품으로 변하고 있으며, 피부보호 기능 보다는 고기능성 제품을 개발하려는 움직임이 활발하다. 이러한 추세에 맞추어 동의보감에 수록된 도인승기탕을 이용하여 생리활성을 검증한 결과 다음과 같이 나타났다.

전자공여능 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picryhydrazyl (DPPH)는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 free radical로서 시스테인, 글루타치온과 같은 함 유황아미노산과 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[33]. DPPH를 첨가하여 반응시켜 추출물이 DPPH의 비공유전자를 소거하였을 때 그것의 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡수치를 나타낸다. 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하여, 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다[34]. 이러한 노화 억제의 척도가 되는 전자공여능을 측정한 결과 1,000 ppm에서 50% 이상의 활성을 나타내었고, 특히 구성약재 중 계지와 대황 에탄올 추출물의 활성이 우수하였다.

Superoxide radical 소거활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 측정방법으로 pyrogallol은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 여기에는 superoxide가 관여한다고 알려져 있다[35]. 그러므로 superoxide dismutase (SOD)나 SOD 유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 이 억제되는 정도를 비교하여 실험대상의 물질효능을 비교할 수 있다. Superoxide radical은 주로 세포막 지질의 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화물을 생성하므로 세포손상을 초래한다고 알려져 있다[36]. SOD 유사활성물질은 활성산소의 시발물질이라고 할 수 있으며, superoxide anion의 저해물질로는 생체 내 SOD라는 효소가 있지만 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성물질이라 부르며 식물체를 대상으로 탐색하는 효능이 평가된 바 있으며, 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하여 유용한 생리활성을 나타낸다고 보고하고 있다[37]. 또한 SOD는 다른 종류의 항산화제보다 우수한 효과를 나타내기 때문에 현재 항염증제재나 피부노화방지를 위한 미용제재로 화장품 등에 많이 이용이 되고 있다. 도인승기탕의 SOD 유사활성능을 측정한 결과 복합처방은 20% 이하의 다소 낮은 활성을 나타내었으나 그 구성물질 중 대황 에탄올 추출물의 활성이 33%로 가장 활성이 우수함을 나타내었다. 다른 생리활성 보다 SOD 유사활성능 측정에서 다소 낮은 효능을 나타내었다.

Xanthine oxidase는 생체 내 유리기 생성계의 하나로 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하며 urate가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍과 신장에 침착되어 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 왔다[38,39]. 통풍의 치료에 사용되는 약물로는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 alloxanthine이 있는데 alloxanthine은 xanthine oxidase에 의하여 alloxanthine으로 산화된 다음 이것이 xanthine oxidase에 결합하여 urate생성의 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 효소활성을 저해함으로써 urate의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다[40]. 도인승기탕의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과 도인승기탕 에탄올 추출물에서 94%의 저해활성을 나타내었고, 이는 구성물질 중 계지 추출물의 영향으로 복합처방의 활성을 높인 것으로 사료된다.

피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 합성되어 피부노화가 촉진되며[41,42], 이때 생성된 free radical은 지질, 단백질, 당 및 핵산을 손상시키고 세포막의 파괴에 관여함으로써 돌연변이 유발, 피부암을 포함한 발암, 성인병 및 노화 등을 촉진시키는 원인요소로 알려져 있다. 이런 피부 색소 침착뿐만 아니라 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포 사멸 촉진의 부정적인 기능을 하고 있다[43]. 도인승기탕 에탄올 추출물에서 40% 이상의 활성을 나타내어 유의한 결과를 나타내었으며, 구성물질 중 도인과 계지의 tyrosinase 저해활성이 우수한 것으로 미루어 보아 두 가지 한약재의 영양이 큰 것으로 사료된다.

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지시키는 데 중요한 기질인 엘라스틴을 분해하는 효소이다. 또한 elastase는 다른 중요한 기질단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다[44]. 따라서 elastase 저해제는 피부주름을 개선하는 작용을 나타내며, ursolic acid 등이 elastase 저해제

로서 이용되고 있다. Elastase는 동물 결합조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조기의 그물망 구조 결합을 끊어줌으로서 주름생성의 주원인인 효소로 알려져 있다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로서 피부노화를 억제할 수 있다[45]. 세포 외 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. Collagen은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부의 진피에 그 포함량이 높다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다[46]. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다[47]. 이러한 피부 주름과 관련된 elastase와 collagenase 저해활성을 측정한 결과 500 ppm에서 우수한 활성을 나타내었는데, 특히 도인승기탕 에탄올 추출물의 활성이 우수하였으며, 구성약재 중 계지 및 대황 에탄올 추출물의 활성이 우수하여 주름개선 화장품 소재로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

피부 단백질은 고분자 flavonoid인 polyphenol과 결합하여 가교결합을 형성하고 피부가 수축되어 수렴작용을 하게 된다[48]. 본 실험에서는 hemoglobin의 단백질이 추출물과 결합하는 정도에 따라 수렴효과 정도를 판단하였다. 도인승기탕 에탄올 추출물의 경우 열수 추출물보다 활성이 우수하여 수렴작용을 하는 것으로 판단되며, 구성약재 중 계지 에탄올 추출물이 수렴효과를 상승시킨 것으로 판단된다.

피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 합성되어 피부노화가 촉진되며 이때 생성된 자유라디칼은 지질, 단백질, 당 및 핵산을 손상시키고 세포막의 파괴에 관여함으로서 돌연변이 유발, 피부암의 발암, 성인병 및 노화 등을 촉진시키는 원인요소로 알려져 있다. 세포 독성이 나타나지 않는 100 ppm 이하에서 멜라닌 생합성량을 측정한 결과 도인승기탕 에탄올 추출물에서 50% 이상의 활성을 나타내었으며, 이는 in-vitro 효소 실험인 tyrosinase 저해활성에서 에탄올 추출물의 활성이 높게 나타난 것과 비교하여 비슷한 경향을 확인할 수 있었다.

결 론

최근 천연 한방소재를 이용한 한방화장품 개발이 증가하고 있는 실정이며, 본 연구에서는 도인승기탕과 그 구성약재의 생리활성에 대해 연구하여 화장품 복합 기능성 소재로서의 가능성을 검토하였다.

1. 도인승기탕 및 그 구성약재의 전자공여능, SOD 유사활성능 및 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과 전자공여능은 도인승기탕 열수추출물의 활성이 우수하였으며, 그 외 에탄올 추출물의 활성이 우수하였다. 구성약재 중 대황과 계지 에탄올 추출물의 활성이 우수하였다.
2. Tyrosinase 저해활성 측정 결과 도인승기탕 에탄올 추출물이 1,000 ppm에서 41%의 저해활성을 나타내었으며, 그 구성약재 중 감초, 도인, 계지 추출물의 활성이 우수하여 그 영향력이 있었을 것으로 판단된다.
3. Elastase와 collagenase 저해활성 측정 결과 도인승기탕 에탄올 추출물의 활성이 우수하였으며, 구성약재 중 계지 및 대황 추출물의 활성이 우수하였다.
4. Astringent 활성 측정 결과 도인승기탕 복합처방의 에탄올 추출물의 활성이 5,000 ppm에서 유의한 결과를 나타내었으며, 그 구성약재 중 계지 에탄올 추출물의 활성이 높았다.
5. 멜라닌 생합성 저해율 측정을 위한 세포생존율 측정 결과 100 ppm 이하에서 세포 독성의 미비하였으며, 도인승기탕 에탄올 추출물 100 ppm에서 53.3%의 저해활성을 나타내어 미백활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

이상의 *in vitro* 생리활성 검증 결과 도인승기탕 복합처방의 에탄올 추출물의 활성이 대부분 우수하였으며, 그 구성약재 중 몇몇 약재에 대한 영향력이 있었을 것으로 판단되며, 차후 구성 약재 및 복합처방의 세포 차원에서의 연구가 더 진행 된다면 한방 화장품 소재로서의 가능성이 매우 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(2010-0273).

참고문헌

1. Yoon JM. A study on the inhibitory effect of Doinseunggi-tang on the growth of human uterine. J Ori Obstetr Gynecol. 2003 ; 16(1) : 18-24.
2. Heo J. Donguibogam. 6th. Seoul : Namsangdang. 462.
3. Cheon HJ, Chang KE, Moon YO, Keum KS. A study on Chinese medicines of "Dongeuibogam" used for the face skin ailments. J Kor Inst Ori Med Inform. 2010 ; 16(1) : 105-33.
4. Kim IR, Eom TW. Theological study on pharmacological effects of extracts and essential oil from various parts of Cinnamomum cassia. Res Inst Ori Med. 2003 ; 7 : 33-9.
5. Park SM. Effect of purgation therapy with Natrii Sulfas on iNOS and MMP 9 expressions of the MCAO rat brain. The Graduate School of East-West Medical Science. Kyung-Hee University. 2008.
6. Kang SY. Inhibitory effect of Erigeron annuus (L.) Pers extracts on tyrosinase activity. The Graduate School of Small Business. Soongsil University. 2008.
7. Yu NG. A study on the oriental medical cosmetic method of scalp and hair treatment. The Graduate

School of Social Culture. Hannam University. 2007.
8. Lee JC, Kim KJ. The effect of elastase inhibition and tyrosinase by Rheum undulatum stokes extracts. J. Kor Ori Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2009 ; 22(3) : 36-46.
9. Park SM, Lee GW, Cho YH. Effect of Rheum undulatum extract on antioxidant activity and activity of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. J Life Sci. 2008 ; 18(12) : 1700-4.
10. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 181 : 1199-20.
11. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 ; 47(3) : 469-74.
12. Stirpe F, Della Corte E. 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 1969 ; 244(14) : 3855-63.
13. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986 ; 3981 : 517-9.
14. Cannell RJ, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med. 1988 ; 54(1) : 10-4.
15. Wűnsch E, Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem. 1963 ; 333(1) : 149-51.
16. Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of Salicornia herbacea and its application for cosmetic materials. Kor J Herbology. 2002 ; 17(2) : 51-60.
17. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987 ; 47(4) : 936-42.
18. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 1985 ; 45(4) : 1474-8.
19. Cha WS, Shin HR, Park JH, Oh SL, Lee WY, Chun SS, Choo JW, Cho YJ. Antioxidant activity of phenol compounds from Mulberrry fruits. Korean J Food Preserv. 2004 ; 11(3) : 383-7.
20. Hwang HS, Lee YK, Lee KG. Fractionation of banaba leaves extract (Lagerstroemia speciosa L. Pers) and its antioxidant activity. Korean J. Food Sci Technol. 2006 ; 10(2) : 120-4.
21. Hong JH, Nam HS, Lee YS, Yoon KY, Kim NW, Shin SR. Study on the antioxidant activity of extracts from the fruit of Elaeagnus multiflora Thumb. Korean J Food Preserv. 2006 ; 13(3) : 413-9.
22. An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Park TS, Park JM, Bae HJ, Pyeon JR. Antioxidant, anticancer and antibacterial activities of Naesohwangryntang and its ingredients. Kor J Herbology. 2005 ; 20(4) : 17-26.
23. Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. J Food Sci Nutr. 1995 ; 24(1) : 154-9.
24. Hong TG, Lee YR, Yim MH, Hyun CN. Physiological functionality and nitrite scavenging ability of fermentation extracts from pine needles. Korean J Food Preserv. 2004 ; 11(1) : 94-9.
25. Lee SJ, Park DW, Jang HG, Kim CY, Park YS, Kim TC, Heo BG. Total phenol content, electron donating ability, and tyrosinase inhibition activity of pear cut branch extract. Korean J. Hort. Sci. Technol. 2006 ; 24(3) : 338-41.
26. Lee NH, Lee SJ, Jung DS, Bu HJ. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. Korean J Pharm Sci Technol. 2001 ; 32 : 175-80.
27. Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, Lee JS. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci. 2005 ; 13(6) : 213-6.
28. Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KS. Anti-wrinkle effect of safflower (Cathamus tinctorius) seed extract. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2004 ; 30(1) : 15-22.
29. Lee TW, Kim SN, Jee UK, Hwang SJ. Anti-wrinkle effect of pressure sensitive adhesive hydrogel patches containing Ulmi cortex extract. J Pharm Invest. 2004 ; 34(3) : 193-9.
30. Barrantes E, Guinea M. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. Life Sci. 2003 ; 72(7) : 843-50.
31. Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of Salicornia herbacea and its application for cosmetic materials. Kor J Herbology. 2002 ; 17(2) : 51-60.
32. Lee YH, Park SS, Lee SW, Lee SH, Park KH, Choi YJ, Gal SW. Whitening effect of mycelial cuture broth of paecilomyces japonica in the mixture of cucumber and grape extracts. J Life Sci. 2006 ; 16(5) : 870-5.
33. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of

Zizyphus jujuba var. inermis Rehder. Kor J Food Sci. Technol. 2006 ; 38(1) : 128-34.
34. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. J Agric Food Chem. 2004 ; 52(16) : 5240-4.
35. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 ; 47(3) : 469-74.
36. Kim MC, Kim MJ, Kim T, Park GT, Son HJ, Kim GY, Choi WB, Oh DC, Heo MS. Comparison of antibacterial and antioxidant activities of mushroom mycelium culture extracts cultivated in the citrus extracts. Kor J Biotechnol Bioeng. 2006 ; 21(1) : 72-8.
37. Kim SW, Lee SO, Lee TH. Purification and characterization of superoxide dismutase from Aerobacter aerogenes. Korean J. Agric Biol Chem. 1991 ; 55(1) : 101-8.
38. Storch J, Ferber E. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. Anal Biochem. 1988 ; 169(2) : 262-7.
39. Hatano T, Yasuhara T, Fukuda T, Noro T, Okuda T. Phenolic constituents of licorice. Ⅱ. Structures of licopyranocoumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. Chem Pharm Bull. 1989 ; 37(11) : 3005-9.
40. Lehninger AL. Principles of biochemistry. New York : Worth publishers INC. 1988 : 634-40.
41. Chen JS, Wei CI, Marshall MR. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem. 1991 ; 39(11) : 1897-901.
42. Yang MJ, Lim SJ, Ahn HS, Kim MA, Ahn RM. Inhibitory effects of chestnut bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. Korean J Environ Health. 1999 ; 25(1) : 37-43.
43. Kaneyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ. Pigment production in murine melanoma cells in regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol. 1993 ; 100(2) : 126-31.
44. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem. Photobiol. 2001 ; 74(2) : 283-90.
45. Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. Int J Cosmet Sci. 1999 ; 21(2) : 71-82.
46. Perlich JS, Lemlich G, Fleischmajer R. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. J Invest Dermatol. 1988 ; 90(1) : 48-54.
47. Giacomoni PU, Rein G. Factors of skin ageing share common mechanisms. Biogerontology. 2001 ; 2(4) : 219-29.
48. Okuda K. 植物成分の收斂作用. Fragrance J. 1986 ; 6 : 270-4.