

## The Biological Activity from *Prunella vulgaris* Extracts

Jin-Sung Kim<sup>1</sup>, Ju-Yeong Lee<sup>2</sup>, Ki-Tae Park<sup>3</sup>, Bong-Jeun An<sup>4</sup>, Sun-Ho Lee<sup>5</sup>,  
and Young-Je Cho<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

<sup>2</sup>School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>School of Culinary Art and Baking Technology, Dongju College University, Busan 604-715, Korea

<sup>4</sup>Department of Cosmeceutical, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea

<sup>5</sup>The Institute of Marine Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>6</sup>School of Food Science and Biotechnology / Food and Bio-Industry Research Institute,  
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

### 하고초(*Prunella vulgaris*) 추출물의 생리활성

김진성<sup>1</sup> · 이주영<sup>2</sup> · 박기태<sup>3</sup> · 안봉전<sup>4</sup> · 이선호<sup>5</sup> · 조영제<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품과학부, <sup>2</sup>경북대학교 응용생명과학부, <sup>3</sup>동주대학교 외식조리제과계열,  
<sup>4</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>5</sup>안동대학교 해양연구소, <sup>6</sup>경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

#### Abstract

The phenolic compounds of water extracts from *Prunella vulgaris* were highest at 9.25 mg/g, respectively, when various extraction solvents were used. The optimum condition for extracting phenolic compounds from *Prunella vulgaris* was extraction in water for 18hr. The DPPH-scavenging activities of *Prunella vulgaris* were highest at the water extracts. The ABTS radical cation decolorization was higher than 40% in the range of 0~100% ethanol extract section. The antioxidant protection factor on the lipophilic phenolic metabolites was shown to be 1.1 PF in the water extracts from *Prunella vulgaris*. The TBARS was lower than the control (0.53  $\mu$ M) in all the sections. The tyrosinase inhibitory effect, which is related to skin whitening, was above 40%, and for the anti-wrinkle effect, the elastase inhibition activity was above 40% at 0.2 mg/mL. The astringent effect of the *Prunella vulgaris* 40% ethanol extracts was 98.1% at 1 mg/mL. As a result, it can be concluded that *Prunella vulgaris* has the potential to be used as a cosmetic material.

Key words : Phenolic compounds, *Prunella vulgaris*, beauty food activity, whitening, anti-wrinkle, anti-inflammation

#### 서 론

현대의학에서 한의학은 질병 발생 요소를 사람의 정기나 기력이 쇠하여 발생한다고 믿고 사람의 기력을 회복시켜 사람 스스로 질병을 이겨내도록 함을 기초로 하여 발전하였다(1). 따라서 한의학의 경우 질병의 발병 원인을 사람의 저항능력 약화를 전제로 치료 하게 되는데, 신체의 일부분에 한정되어 단순히 병의 치료에 목적을 두는 것이 아니라

신체의 생리적 균형을 생각하고 치료하는 것이다(2).

웰빙 식품에서 유기농식품으로 식품시장의 점유율이 소비자의 경향에 따라 높아지고 있는 것처럼 인공 화학적 원료의 비중을 줄여 사용하고자하는 경향이 화장품에도 강하게 확산되어 천연화장품과 한방화장품에 대한 수요도 급격하게 증가하고 있다. 화장품은 현대인의 필수품으로 인식되고 있다. 그로 인하여 화장품산업은 인류문화의 진보와 함께 크게 동반성장된지도 오래이다. 특히 화장품은 인간의 건강과 미에 대한 욕구와 더불어 제약시장을 앞지르는 현상을 보이고 있을 뿐 아니라 기능성의 부여로 부가가치가 더욱 높아지고 있다. 이에 따라 화학적 안정도와 기능

\*Corresponding author. E-mail : yjcho@knu.ac.kr  
Phone : 82-53-950-7755, Fax : 82-53-950-7762

성이 부가된 천연, 한방 화장품의 개발이 주목되고 있는데, 특히 우리 전통의학에 사용되어온 한약재의 약리적 기능의 효과가 과학적으로 입증되고 있어 이를 이용한 한방화장품의 개발이 활발히 이루어지고 있다(3,4).

하고초(*Prunella vulgaris*)는 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하는 식물로서 이뇨, 소염, 해열 및 혈압 강하 등에 효능이 있다고 알려져 있다(5). 또한 신농본초경에 의하면 예로부터 화농성피부질환과 다리부종 등의 치료약으로 사용되었고, 민간으로는 폐결핵, 황달, 고혈압의 치료로 사용되었으며, 그 구성 성분으로는 oleanolic acid, ursolic acid, rutin, hyperoside, *cis*-caffeic acid, *trans*-caffeic acid, carotenoid, tannin, organic acid 등이 보고되었고, 꽃에는 ursolic acid 및 delphinidin과 cyanidin의 glycoside, *d*-camphor, *d*-fenchone 및 fenchyl alcohol 등이 보고되어 있으며(6), 지상부로부터 sterol ( $\alpha$ -spinasterol, stigmast-7-en- $\beta$ -3-ol)과 각종 ursane 및 oleanane계 triterpenoid들이 보고되었다(7). 하지만 많은 하고초의 생리기능성 연구에도 불구하고 이를 이용한 미용식품학적 연구는 미비한 실정이며, 이에 따라 본 연구는 하고초의 미용식품학적 기능성을 밝혀 한방 미용식품 및 한방화장품의 개발가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 하고초(*Prunella vulgaris*)는 경북 영천시 임고면 수성리에서 재배된 것을 약업사에서 2011년 가을에 구매하여 50°C dry oven에서 건조한 후 40 mesh로 분쇄하여 4°C에서 저온저장하며 시료로 사용하였다.

### 추출물의 제조

시료 추출은 열수추출물의 경우 건조 하고초 1 g에 증류수 200 mL를 가하고 액이 100 mL가 될 때 까지 15분간 가열하여 증발시킨 후 냉각하고, 상온에서 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 시료 1g에 100 mL의 10~100%의 농도별 ethanol을 추출용매로 가하여 24시간 동안 상온에서 교반 추출하였다. 추출액은 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

### Phenol성 화합물 정량

총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법(8)으로 측정하였으며, 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

### Electron donation ability 측정

DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(9)에 준하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60  $\mu$ M DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times$ 100으로 나타내었다.

### ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법(10)으로 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 mL과 140 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 88  $\mu$ L를 섞어 어두운 곳에 16시간정도 방치한 용액 1 mL과 ethanol 88 mL를 혼합한 ABTS solution 1 mL과 시료용액 50  $\mu$ L를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2분 30초간 incubation하고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 percentage inhibition(%)으로 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times$ 100으로 나타내었다.

### Antioxidant protection factor (PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(11)으로 측정하였다. 10 mg의  $\beta$ -carotene/50 mL chloroform 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을 증류시킨 후, 20  $\mu$ L linoleic acid, 184  $\mu$ L Tween 40과 50 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion을 시료용액 100  $\mu$ L에 혼합하여 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, PF는 반응구의 흡광도/대조구의 비로 나타내었다.

### Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정

TBARS는 Burge와 Aust의 방법(12)에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA/TCA 시약 3 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1000 rpm으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상정액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의  $\mu$ g으로 표시하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Imokawa 등의 방법(13)에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분간

반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 침가구와 무침가구의 흡광도 감소율로  $1-(\text{반응구의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 나타내었다.

#### Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Lee 등(14)의 방법에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL)용액 0.5 mL을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, elastase 저해활성(%)은  $1-(\text{시료침가군의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 나타내었다.

#### 수렴효과(astringent effect) 측정

Astringent 활성 측정은 Lee 등(15)의 방법에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심 분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1:1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성은  $1-(\text{시료침가군의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 나타내었다.

#### Hyaluronidase 저해 활성 측정

Hyaluronidase (HAase) 저해 활성은 Tolksdorf 등(16)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 추출용액 0.5 mL에 2mM sodium phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 HAase (100U/mL) 0.5 mL을 혼합하여 38°C에서 5분간 반응시키고 0.3M phosphate buffer (pH 5.3)에 녹인 기질(4 mg/mL) 0.5 mL을 넣어 다시 38°C에서 45분간 반응시킨 후 0.24 M acetate buffer (pH 3.75)에 녹인 알부민 용액 5 mL을 첨가한 후 5분간 방치하고 600 nm에서 투과도를 측정하였다.

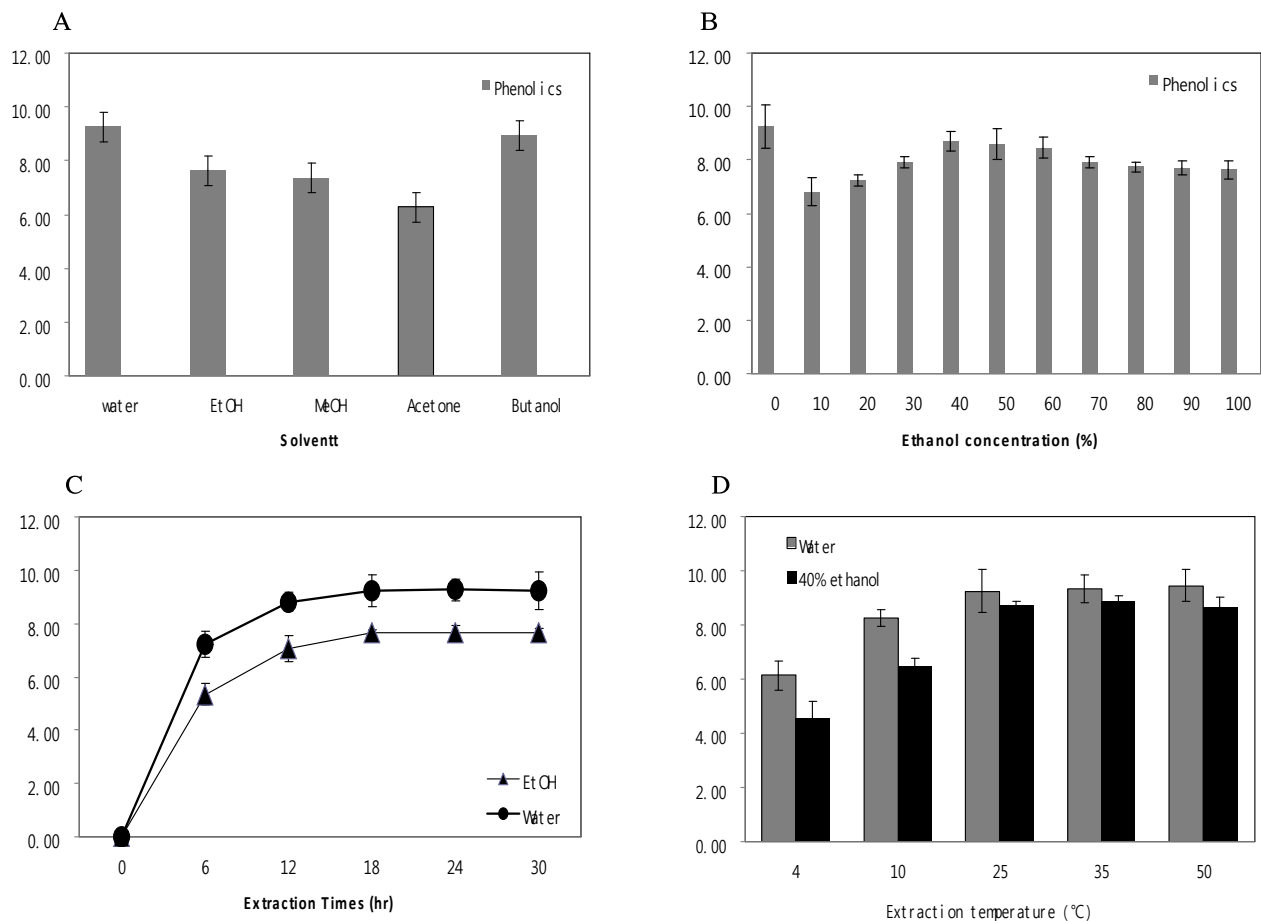


Fig. 1. Optimum extraction condition of phenolics from *Prunella vulgaris*.

The data were expressed as the mean±SD. Results are representatives of more than three independent experiments. A: effect of various solvents, B: effect of ethanol concentration, C: effect of extraction time, D: effect of extraction temperature.

Hyaluronidase 저해율(%)은 1-(시료첨가군의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times$ 100으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### Phenolic 성 물질의 추출 조건

Phenolic compounds는 식물계에 널리 분포하고 있다. 이는 식물체의 2차 대사산물로서 여러 가지 다양한 구조와 분자량을 가지고 있어 이화학적 성질 및 생리적 활성도 매우 다르게 나타난다. 특히 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 거대분자로 분류되는 단백질, 효소단백질 등과 결합하는 성질이 있어 항산화, 항균활성 등과 같은 여러 생리 기능을 가진다고 보고되어 있다(17). 따라서 다양한 용매를 이용하여 하고초의 phenolic compounds를 추출하였다. 그 결과 Fig. 1-A와 같이 열수추출에서 9.25 mg/g으로 가장 높은 추출률을 보였으며, butanol, ethanol, methanol, acetone 순으로 8.94, 7.64, 7.35, 6.28 mg/g 각각 나타내었다. 이는 유기용매보다 열수추출에서 하고초의

phenolic compounds가 높은 용해도를 가진다는 것을 알 수 있으며, 한약재로 많이 사용되어온 하고초를 달여 먹는 원리와 유사하다고 볼 수 있다. 하고초의 추출물의 추출조건을 확립시키기 위하여 다양한 농도의 ethanol을 용매로 사용하여 하고초의 phenolic compounds를 추출하였다. 그 결과 Fig. 1-B와 같이 40% ethanol에서 8.74 mg/g의 함량으로 가장 높은 phenolic compounds의 함량을 보였다. 하고초 추출물을 식품 및 화장품산업에 이용가능성을 알아보고자 물과 인체에 유해하지 않으며 산업적으로 이용도가 높은 ethanol을 사용하여 phenolic 성 물질의 용해도를 30시간동안 6시간 간격으로 추출한 후 phenolics 함량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1-C와 같이 열수추출물과 ethanol 추출물 모두 6시간동안 용출량이 급증하는 것을 알 수 있었다. 또한 18시간 이후에는 용출량의 변화량이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 하고초의 유효성분 추출에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 추출온도를 4°C, 10°C, 25°C, 35°C, 50°C 등으로 구분하여 용출 결과를 살펴본 결과 상온인 25°C까지 온도가 상승할수록 용출량이 증가하였으며, 25°C 이상의 온도에서의 용출량 증가는 거의 증가하지 않았다. 이상의

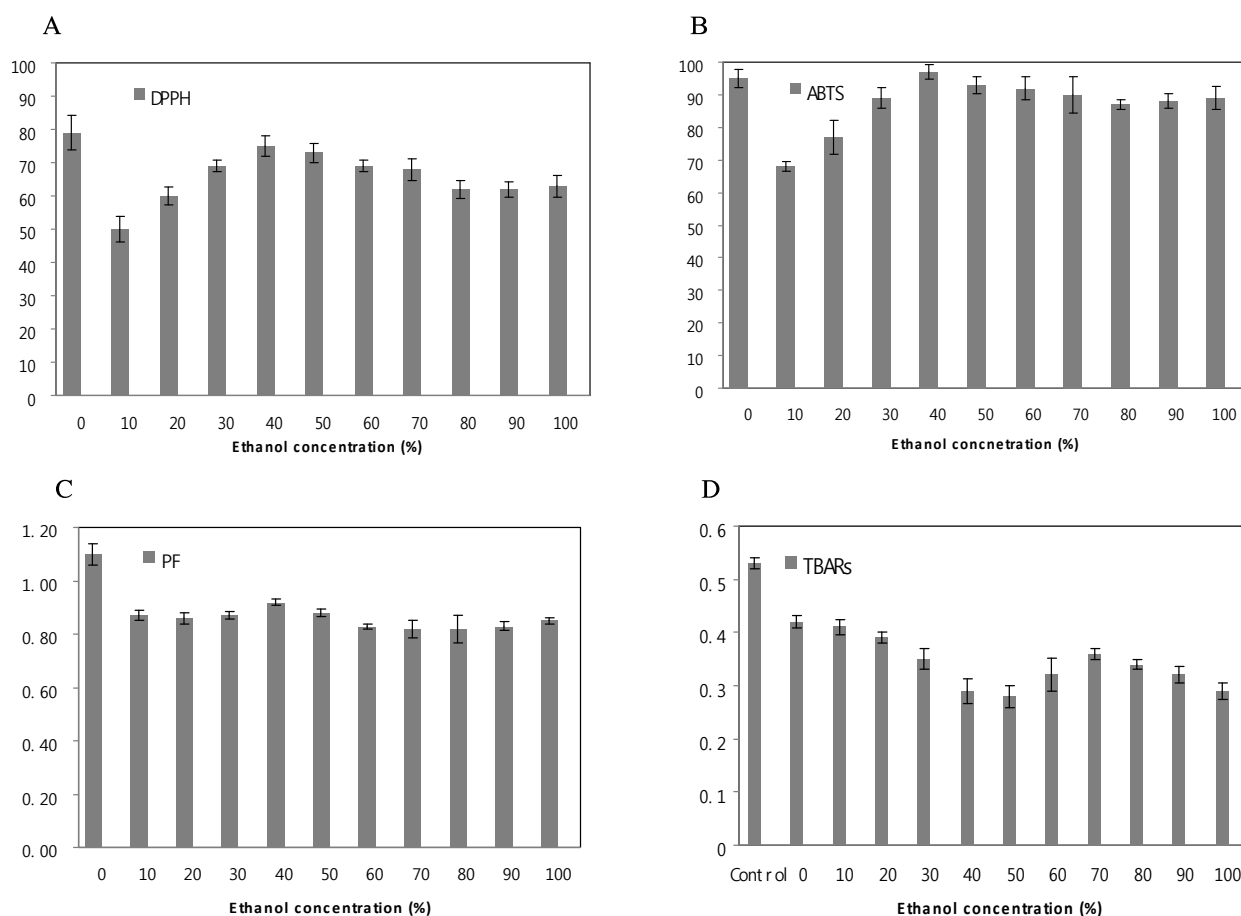


Fig. 2. Effect of ethanol concentration on antioxidative activities of *Prunella vulgaris* extracts.

The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3). A: DPPH, B: ABTS radical cation decolorization, C: antioxidant protection factor, D: TBARS

결과에 따라 하고초의 항산화 활성과 생리가능성을 알아보기 위하여 40% ethanol과 물을 추출용매로 하여 상온에서 18시간 추출한 후 실험 시료로서 사용하기로 하였다. 상기의 최적 조건에서 추출한 하고초 추출물의 phenolics 함량은 Table 1에서와 같이 물추출물이  $9.25 \pm 0.18$  mg/mL이었고, 40% ethanol 추출물에서  $8.74 \pm 0.52$  mg/mL의 함량을 나타내었다.

**Table 1. Phenolics contents of extracts from *Prunella vulgaris***

Sample	Phenolics content (mg/g)	
	Water extracts	40% Ethanol extracts
<i>Prunella vulgaris</i>	$9.25 \pm 0.18$	$8.74 \pm 0.52$

The data were expressed as the mean $\pm$ SD. Results are representatives of more than three independent experiments.

### 하고초 추출물의 항산화 효과

전자공여능 측정에 주로 사용되는 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl은 일정한 스펙트럼을 가지고 있으나, 수소에 전자를 제공해 주는 전자공여체인 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류 등과 phenolic compounds와 반응하게 되면 전자의 hydrogen radical을 받아서 phenoxy radical을 생성하게 된다. 또한 이로 인하여 안정한 분자를 이루는데, 이는 공여전자의 비가역적 결합의 수와 비례하여 보라색의 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl의 색이 점점 투명하거나 옅어지게 된다(18). 하고초의 항산화 활성을 측정하기 위해 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 2-A와 같이 열수 추출물에서 79%의 가장 높은 전자공여능이 측정되었으며, ethanol 추출물의 경우 농도가 증가함에 따라 순차적으로 전자공여능이 증가하다가 40% ethanol 추출물에서 75%의 가장 높은 측정값을 나타내다가 다시 순차적으로 낮은 측정값을 나타내었다. 이는 phenolic compounds의 용출량에 따라 농도 의존적으로 DPPH 시약이 반응한 것으로 판단되었다. 또한 ethanol 추출물과 열수 추출물에서 28.5%와 18.8%의 전자공여능을 보인 Koh 등(19)의 석류씨 추출물의 항산화 측정 결과와 비교해 보았을 때, 하고초의 전자공여능의 우수함을 알 수 있었다. 추출물들의 상대적인 항산화 측정은 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있으며, aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능할 뿐만 아니라, 표준물질의 사용으로 추출물의 상대 비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색된다(20). 이러한 원리를 이용하여 ABTS를 측정한 결과 Fig. 2-B와 같이 열수 추출물의 경우 95%의 항산화 활성을 보였으며, ethanol 추출물의 경우 40%에서 97%의 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 또한 항산화 활성이 10% ethanol 추출물을 제외한 전체

추출물에서 80%이상의 높은 결과를 나타내었다. 이는 하고초 추출물이 친수성 물질에 대한 항산화력이 우수한 것을 알 수 있다. 하고초의 열수 추출물과 ethanol 추출물의 antioxidant protection factor를 측정한 결과 Fig. 2-C와 같이 열수 추출물의 경우 1.10의 PF값을 나타내었고, 농도별 ethanol 추출물의 경우 40% ethanol 추출물에서 최대 0.92의 값을 나타냈다. 이는 일반적으로 1.2 이상의 PF값을 antioxidant protection factor 물질에 대한 항산화력이 높다고 평가하는데(20), 오디 추출물의 antioxidant protection factor에 대한 항산화력은 60% ethanol 추출물에서 1.25 PF라는 Kim(21)의 연구 결과와 최 등(22)이 자색고구마 50% 에탄올 추출물의 PF가 1.2라는 연구 결과 비교하였을 때 하고초의 PF가 다소 낮은 수치임을 알 수 있다. 지질과산화물인 malondialdehyde의 함량을 측정한 결과, Fig. 2-D와 같이 하고초의 열수 추출물과 농도별 ethanol 추출물의 thiobarbituric acid reactive substance의 측정량은 대조구의  $0.53 \mu\text{M}$ 에 비하여 대부분의 낮은 TBARS값을 나타내었으며, 그 중 40% ethanol 추출물이  $0.04 \mu\text{M}$ 로 가장 낮아 산화 촉진인자를 binding하는 능력이 가장 높았으며, 열수 추출물이 가장 높은  $0.42 \mu\text{M}$ 을 나타내었다. 따라서 하고초의 열수 추출물보다 ethanol 추출물이 thiobarbituric acid reactive substance에 대한 항산화력은 우수하다는 것으로 판단된다. 이는 Kim 등(23)의 유기용매에 의한 대두 추출물의 항산화 실험에서 열수 추출물에 비해 유기 용매 추출물의 항산화 효과가 우수하다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. Kim 등(24)은 첨가되는 phenolics 양과 추출물의 항산화활성과의 관련성을 비교한 결과, 대부분 phenolics의 함량이 높을수록 항산화활성이 높아서 함량의 상관관계를 나타내었다고 보고한 결과와 유사한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

### Elastase 저해효과 측정 결과

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소이며, 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 그 효소의 활성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부 주름 및 탄력성 손실을 유발하기도 한다(25). 또한 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이기도 하다(26). 따라서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타낸다(27). 따라서 하고초 추출물을 미용식품 또는 화장품의 소재로서의 이용가능성을 알아보고자 elastase 저해활성을 하고초에서 추출한 phenolics를 50~200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가하여 측정한 결과, Table 2와 같이 첨가되는 phenolics의 농도가 높아짐에 따라 저해활성이 증가하였다. 특히 40% ethanol extracts의 경우 200  $\mu\text{g/mL}$  phenolics 농도에서 43.68%를 저해함으로써 미용식품 또는 기능성화장품의 원료로서의

산업화 가능성을 확인하였다. Kim 등(28)은 유근피의 70% ethanol 추출물이 200 µg/mL의 농도에서 69.5%의 elastase 억제력을 나타내었다고 보고한 것과 비교하면 본 시료인 하고초의 elastase 저해력이 조금 낮게 나타났다.

**Table 2. Inhibition effect of water and 40% ethanol extracts from *Prunella vulgaris* on elastase**

Phenolics content (µg/mL)	Inhibition activity(%)		
	70% ethanol extracts from <i>Ulmus pumila</i> L.	Water extracts	40% Ethanol extracts
50	55.5±3.5	ND	ND
100	61.8±3.4	15.8±2.4	17.3±2.7
150	64.8±1.0	29.9±1.1	34.2±1.0
200	69.5±2.5	39.2±2.4	43.7±1.5

ND: Not detected. The data were expressed as the mean±SD. Results are representatives of more than three independent experiments.

### Tyrosinase 저해효과 측정 결과

Tyrosinase는 구리를 함유한 효소로, tyrosinase의 역할은 tyrosine을 dopa로 변화시키는 hydroxylase의 활성과 dopa를 dopaquinone으로 변화시키는 dopa-oxidase의 활성을 모두 가지고 있어, 두 단계의 반응을 촉진하는 key enzyme의 역할을 수행하며, melanin의 초기 합성단계에서 L-tyrosine으로 부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 L-dopaquinone으로 전환되고 마지막으로 멜라닌이 형성되게 된다(29). 따라서 tyrosinase는 melanin 생합성 과정에서 중요한 역할을 하므로 tyrosinase 억제 물질이 피부의 melanin 색소생성을 조절할 수 있는 물질로 사용될 수 있다(30). 따라서 하고초 추출물의 tyrosinase 저해효과를 측정함으로써 미용식품 또는 미백 기능성 화장품의 원료로서의 활용가능성을 알아본 결과, Table 3과 같이 200 µg/mL의 phenolics 농도에서 열수 추출물은 35.74%의 저해력을 나타내었으며, 40% ethanol 추출물에서는 42.67%의 우수한 저해력을 나타내었다. 이는 Kim 등(31)이 한약재 복합 추출물을 1000 µg/mL의 농도로 처리했을 때 34% 억제를 나타내었다고 보고한 것과 Kim 등(28)이 유근피의 70%

**Table 3. Inhibition effect of water and 40% ethanol extracts from *Prunella vulgaris* on tyrosinase**

Phenolics content (µg/mL)	Inhibition activity(%)		
	70% ethanol extracts from <i>Ulmus pumila</i> L.	Water extracts	40% Ethanol extracts
50	9.4±1.5	ND	ND
100	12.5±1.1	16.7±1.4	18.3±1.7
150	19.2±1.2	26.5±1.0	34.3±1.0
200	23.9±1.8	35.7±1.4	42.7±1.0

ND: Not detected. The data were expressed as the mean±SD. Results are representatives of more than three independent experiments.

ethanol 추출물이 200 µg/mL의 농도에서 23.9%의 tyrosinase 억제력을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때, 더 우수한 tyrosinase 저해력을 나타내었다.

### 수렴 효과(Astringent effect) 측정 결과

수렴작용은 피부 단백질인 고분자 flavonoids와 가교적 결합 형태로 생성되어 피부가 수축되는 현상을 말한다. 이러한 수렴이란 뜻은 기본적으로 움추러서 주름진다는 의미를 가지고 있으며, 수렴제는 피부와 점막 혈관 등을 수축시키는 효과가 있어서 세포간극 및 림프간극을 가로막아 점액의 분비를 억제시키는 효과가 있다(27,32). 수렴작용에는 외용 작용에 의해서 피부와 점막의 표면에 난용성 피막을 만들고, 그 결과 국소를 보호하며, 또는 조직을 치밀하게 만들어 세포막의 투과성을 감소시키는 효과가 있다고 할 수 있다(25). 하고초 추출물의 astringent 활성을 측정한 결과 200 µg/mL 이하의 phenolics 농도에서는 수렴효과가 없어 첨가농도를 500 µg/mL 이상으로 높여 실험한 결과, Table 4와 같이 750 µg/mL의 phenolics 함량의 ethanol 추출물에서 31.1%의 효과를 나타내었으며, 1000 µg/mL phenolics 이상의 함량에서는 98.1%의 수렴효과를 보여 Kim 등(28)은 유근피의 70% ethanol 추출물이 69.4%의 수렴효과를 나타내었다고 보고한 것과 비교하면 본 시료인 하고초의 수렴효과가 높아 모공 축소효과 등을 활용한 화장품에 적용이 가능하리라 판단되었다.

**Table 4. Astringent effect of water and 40% ethanol extracts from *Prunella vulgaris***

Phenolics content (µg/mL)	Astringent effect(%)		
	70% ethanol extracts from <i>Ulmus pumila</i> L.	Water extracts	40% Ethanol extracts
250	37.7±0.9	ND	ND
500	47.4±0.7	ND	ND
750	55.3±2.9	10.1±1.4	31.1±1.6
1000	69.4±1.5	36.9±2.0	98.1±1.4

ND: Not detected. The data were expressed as the mean±SD. Results are representatives of more than three independent experiments.

### Hyaluronidase 저해효과 측정 결과

히아루론산(hyaluronic acid, HA)은 고분자 다당으로 진피층의 섬유아세포에서 산출되어, 표피, 진피에 주요한 세포의 매트릭스로 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide이다. 그리고, 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해 산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시키는 것으로 고분자 HA의 분해효소인 hyaluronidase(HAase)의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서

항염증 효과를 기대할 수 있다(16).

하고초 추출물의 농도를 달리하여 hyaluronidase (HAase)의 저해활성을 측정한 결과 Table 5와 같이 200 µg/mL의 phenolics 농도의 물 추출물과 40% ethanol 추출물에서 각각 17.24%와 25.35%의 상대적으로 높은 저해활성을 나타내었으며, 150 µg/mL의 phenolics 농도에서 8.27%와 16.38%의 저해활성을 나타내었다. Kim 등(28)이 유근피의 70% ethanol 추출물이 200 µg/mL의 농도에서 88.4%의 hyaluronidase 억제력을 나타내었다고 보고한 것과 비교하면 하고초 추출물의 항염증활성이 상대적으로 다소 낮게 나타났으나, 추출물의 phenolics 함량이 증가 할수록 농도의존적으로 저해활성이 증가함을 알 수 있었다.

이상의 연구결과 하고초 추출물은 항산화능, tyrosinase 저해효과, elastase 저해효과 및 수렴성 등이 매우 우수한 것으로 확인되어 미용식품 또는 기능성 화장품의 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

**Table 5. Inhibition effect of water and 40% ethanol extracts from *Prunella vulgaris* on hyaluronidase**

Phenolics content (µg/mL)	Inhibition activity(%)		
	70% ethanol extracts from <i>Ulmus pumila</i> L.	Water extracts	40% Ethanol extracts
50	79.9±6.1	ND	ND
100	80.5±4.1	ND	ND
150	82.9±5.5	8.3±2.0	16.4±2.0
200	88.4±2.5	17.2±1.5	25.4±2.0

ND: Not detected. The data were expressed as the mean±SD. Results are representatives of more than three independent experiments.

## 요 약

하고초(*Prunella vulgaris*)에 함유된 페놀성 물질은 물과 40%ethanol을 용매로 하여 18시간 이상 추출하였을 때 9.25 mg/g, 8.74 mg/g 함량으로 가장 많이 용출되었다. 항산화 효과 중 전자공여능을 측정한 결과는 물 추출물과 40% ethanol에서 각각 79%와 75%를 나타내었으며, 농도별 ethanol 추출물에서 모두 50% 이상의 높은 항산화 활성을 나타내었다. ABTS radical cation decolorization을 측정한 결과는 ethanol 추출물의 모든 구간에서 70% 이상의 높은 항산화력을 보였으며, 그 중 40% ethanol 추출물에서 97%의 가장 높은 항산화활성을 나타내었다. 지용성 물질에 대한 항산화력으로 antioxidant protection factor (PF)를 측정한 결과, 물 추출물에서 1.10의 값으로 가장 높은 항산화활성을 나타내었으며, ethanol 추출물 전 구간에서는 0.92 이하의 PF값을 나타내었다. 활성 산소 중 지방산화를 일으키는 hydroxyl radical에 대한 하고초 추출물의 영향은 물 추출물

과 ethanol 추출물 전 구간에서 대조구 보다 낮은 TBARs 값을 나타내었다. 하고초 추출물의 주름개선효과의 경우 200 µg/mL phenolics의 농도에서 물 추출물의 경우 39.24%를 ethanol 추출물에서는 43.68%의 가장 높은 저해력을 보였으며, 수렴효과는 ethanol 추출물 1000 µg/mL이상의 phenolics 농도에서 대조구인 tannic acid와 비슷한 98.1%의 저해력을 보였다. 미백효과를 확인결과 가장 높은 농도인 200 µg/mL phenolics에서 물 추출물의 경우 35.74%, ethanol 추출물에서 42.67%의 저해력을 나타내어 대조구인 kojic acid의 65.25%보다 낮은 활성을 나타내었다. hyaluronidase의 저해활성의 경우 물 추출물과 ethanol추출물 모두 150 µg/mL 이상의 phenolics 농도에서 대조구인 vitamin C보다 높은 저해력을 보였다. 이러한 결과는 하고초 추출물이 미용식품 또는 기능성 화장품의 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

- Bong SG (2009) A study on the preservation and utilization of *Donguibogam*. J Kor Inst Orient med, 15, 31-42
- Choi JS (2009) The medical system of *Donguibogam* is based on the relationship between body, Disease, symptom-complex and recipe. J Kor Inst Orient med, 15, 125-130
- Cho YJ (2011) Characteristics of cosmetic with whitening compounds from *Phellodendron amurense*. J Appl Biol Chem, 54, 108-113
- Cho YJ, An BJ, Kim JH (2011) Application of isolated tyrosinase inhibitory compounds from Persimmon leaves. Kor J Life Sci, 21, 976-984
- Kim YB, Kim HC (2002) The clinical Study on Cosmetics by Using Traditional Herbal Medicine. J Kor Orient Med Ophth & Otol & Derm Soc, 15, 259-275
- Kim JS, Kang SS, Lee KS, Chang SY, Won DH (2000) Quantitative determination of ursolic acid from *Prunella herba*. Korean J Pharmacogn, 31, 416-420
- Kojima H, Ogura H (1986) Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry, 25, 729-733
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-249
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200
- Pellegrin N, Roberta R, Min Y, Catherine RE (1998) Screening of diatry carotenoids and carotenoid-rich fruit

- extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol*, 299, 379-389
11. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780
  12. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol*, 105, 302-310
  13. Imokawa G, Mishima Y (1981) Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br J Dermatol*, 104, 531-539
  14. Lee KT, Lee SY, Jeong JH, Jo BK(1999) New anti-wrinkle cosmetics. Coreana cosmetics Co., Ltd. Cheonan, Korea, p. 32
  15. Lee JT, Jeong YS, An BJ (2002) Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Kor J Herb*, 17, 51-60
  16. Tolksdorf S, McCready M, McCullagh D, Schwenk E (1949) The turbidimetric assay of hyaluronidase. *J Lab Clin Med*, 34, 74-81
  17. Choi HS, Kim MG, Shin JJ, Pack JM, Lee JS (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 723-727
  18. Aoshima H, Tsumoue H, Koda H, Kiso Y (2004) Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J Agric Food Chem*, 52, 5240-5244
  19. Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY (2005) Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Kor J Food Cookery Sci*, 21, 171-179
  20. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780
  21. Kim JH (2006) Biological activities of phenolic compound from Herb and oriental medicinal resource. MS Thesis, Sangju National University, Korea
  22. Choi JH, Kim JS, Jo BS, Kim JH, Park HJ, An BJ, Kim MU, Cho YJ (2011) Biological activity in functional cosmetic of purple sweet potato extracts. *Kor J Food Preserv*, 18, 414-422
  23. Kim JY, Maeng YS, Lee KY (1995) Anti-oxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Kor J Food Sci Technol*, 27, 635-639
  24. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor J Food Sci Tech*, 36, 333-338
  25. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Phytochem Photobiol*, 74, 283-290
  26. Roth GJ, Siok CJ, Ozols J (1980) Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J Biol Chem*, 255, 1301-1304
  27. Dewitt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, Smith WL (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 256, 10375-10382
  28. Kim KB, Jo BS, Lee JY, Park KT, An BJ, Lee SH, Cho YJ (2012) Beauty food activities of isolated phenolic compounds from *Ulmus pumila*. *J Appl Biol Chem*, 54, 207-215 (2012)
  29. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica*, 3981, 517-519
  30. Imokawa G, Mishima Y (1980) Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br J Dermatol*, 103, 625-633
  31. Laskin JD, Piccinini LA (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J Biol Chem*, 261, 16626-16635
  32. Kim MR, Hwang JH, Yun JK, Han KH, Do EJ, Lee JS, Lee EJ, Kim JB (2011) Antioxidation and antiaging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs. *Kor J Herb*, 26, 111-117