J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 32, No. 3. September, 2015. 439~450
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2015.32.3.439

으름열매 추출물의 항산화 활성 및 피부미용 효과

김민희† · 최태부

건국대학교 일반대학원 생물공학과

(2015년 8월 14일 접수; 2015년 9월 25일 수정; 2015년 9월 30일 채택)

Anti-oxidant Activity of Akebia quinata fruit extract and the Effects of Skin

Min-Hee Kim† · Tae-Boo Choe

Department of Bioengineering, Konkuk University,
1, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

(Received August 14, 2015; Revised September 25, 2015; Accepted September 30, 2015)

요 약 : 으름열매는 폴리페놀과 사포닌과 같은 페놀성 물질을 많이 함유하고 있다. 본 연구는 세포실험을 통해 으름열매 추출물의 항산화활성을 확인하고, 피부에 적용하였을 때 수분과 유분, 멜라닌과 홍반변화의 효과를 측정하였다. 항산화 효과 측정결과, 농도 의존적으로 폴리페놀, 플라보노이드, DPPH 소거능이 상승한 것으로 확인되었고, 으름열매 추출물 크림을 사용하였을 때 수분함량 변화, 유분함량 변화, 멜라닌지수, 홍반지수의 감소가 통계적으로 유의미한 변화를 보여 으름열매 추출물 함유 화장품이 피부개선을 위한 기능성화장품으로서 활용 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 으름열매 추출물은 독성을 나타내지 않으면서도 피부보습, 피부개선효과를 가진 천연 및 기능성화장품 소재로서 활용 가능성이 있다고 사료된다.

주제어 : 으름열매, 추출물, 항산화, 화장품, 피부

Abstract : Akebia quinata fruit(AQF), as identified in the preceding paper, polyphenols and other phenolic components of saponin also has similar or higher levels. The purpose of this study is to analyze the effect of akebia quinata fruit extract, well-known for soothing, anti-oxidizing effects, on the improvement of the moisture, sebum, melanin, erythema content of facial skin. As a result of measuring DPPH radical scavenging activity to examine independent anti-oxidation of AQF, there was a slight scavenging activity. Compared to before the usage of cream, a group who used cream with akebia quinata fruit extract showed a very slight increase in the moisture content and slight decrease in the sebum, melanin, erythema on their faces after 4 weeks of tests, indicating that there was some statistically significant changes found. This study proves that the akebia quinata fruit(AQF) extract has a positive effect on the overall improvement of facial skin and it

†Corresponding author
(E-mail: mini1103@nate.com)

also implies that the akebia quinata fruit extract has high potential as an ingredient of cosmetic products.

Keywords : Akebia quinata fruit, Extracts, Antioxidant, Cosmetics, Skin

1. 서 론

피부 표면은 항산화 방어막으로 구축되어 있지만 지속적인 자외선 노출로 인해 활성산소가 과잉 생성된다. 특히 활성 산소종 중 O_2^-, OH는 피부 광 손상에 있어서 중요한 영향을 미치는데 이들은 피부 항산화제 파괴, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 피부 노화를 가속화시킨다[1]. 이에 건강에 대한 관심이 높아지면서 피부를 유지, 관리하기 위한 화장품의 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 페놀화합물과 같이 특히 식물계에 널리 분포되어 있는 각종 생약과 식용식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 중요성이 부각되면서 개발 및 연구가 활발히 진행되고 있다[2,3]. 으름(Akebia quinata)은 쌍떡잎식물 미나리아재비속 으름덩굴과의 낙엽 덩굴식물로서 한국(황해도 이남), 일본, 중국 등에 분포되어 있다[4]. 으름의 뿌리 및 줄기는 창달(暢達), 인후(咽喉), 진해(鎭咳), 해열(解熱), 소염(消炎), 배농(排膿), 구충(驅蟲), 부종(浮腫) 등에 약재로 사용되어 왔었고, phenol성 물질과 oleanolic acid와 hederagenin과 같은 사포닌 성분 함유가 높은 것으로 알려져 있다[5]. 특히 으름의 열매에는 검은씨가 많은데 이것을 먹으면 머리를 맑게 하고 앞일을 미리 알 수 있는 능력이 생긴다고 하여 예지자(預知子) 또는 팔월찰(八月紮)이라고도 하며 췌장암, 구강암, 임파선 종양 등에 효험이 있다고 한다[6]. 지금까지 으름에 대한 연구에는 으름의 항균 성분 분리 및 함량 분석[7], 으름줄기의 트리테르펜 사포닌에 관한 연구[8], 으름꽃과 잎의 물 추출물이 DNA 손상을 유도한 human lymphocytes에서 항산화 및 보호효과에 관한 연구[9], 으름 줄기의 triterpene glycosides에 관한 연구[10], 으름줄기와 말린 과일로부터 에센션오일 성분에 관한 연구[11], 으름 유래 사포닌의 HepG2 간암세포에 대한 세포 독성 및 세포자살 유도 연구[12]가 있으며, 으름열매에 대한 연구로는 으름열매를 첨가한 막걸리의 생리활성[13], 급성 알코올 간독성을 유발한 생쥐에 있어서 으름열매 추출물의 간 기능 보호효과[14]에 대한 연구가 있다. 으름에 대한 효과들이 검증되면서 연구가 활발히 하고 있으며 최근에 으름 추출물을 유효성분으로 한 화장료조성물(KR-A-10-2014-0071716), 최종당화산물 생성 억제용 피부 외용제 조성물(KR-A-10-2014-0115742) 개발 특허도 연구되고 있지만 으름 열매부분에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 in vitro 실험을 통해 으름열매 추출물의 항산화 생리 활성 정도를 조사하고, in vivo 실험연구를 통해 으름열매 추출물의 피부 개선효능을 확인하고 화장품 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다. 또한 으름열매의 유효성을 검증하고 더 다양한 이용과 스킨케어 제품 개발에 대한 기초자료가 되고자 한다.

2. 실 험

2.1. in vitro 실험방법

2.1.1. 으름열매의 추출

본 연구에서 실험재료로 사용한 으름열매(Akebia quinata fruit, AQF)는 토종마을에서 2014년 5월에 음건한 열매(원산지: 전북 임실)를 1.2kg을 구입하여 사용하였다. 으름열매는 물로 4~5회 깨끗이 씻어 불순물과 씨를 제거하고, 실온에서 일주일 건조한 후 분쇄하여 10배 무게의 에탄올(Ethanol)을 가한 후 37℃, 100rpm의 인큐베이터에서 72시간 진탕하여 추출액만을 분리하기 위하여 20분간 초음파 적용 후 원심분리기에서 8000rpm, 20분간 원심 분리한 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하였으며 추출용매인 에탄올(Ethanol)을 제거하기 위하여 진공감압을 하였다. 감압 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

2.1.2. DPPH 소거능 측정

으름열매 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 Blois[15]의 방법으로 측정하였는데 96 well plate에 에탄올에 용해시킨 1M DPPH(1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl ,Sigma, USA)용액 180 μL와 으름열매 추출물 20 μL씩 혼합한 후 37℃ 착광 상태에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 microplate reader(Biotek, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid(Sigma)를 사용하였고, DPPH free radical 소거활성을 산출하였다.

2.1.3. 총 폴리페놀 함량 측정

으름열매의 총 폴리페놀 함량 측정은 AOAC의 Folin-Denis 방법(Folin & Denis, 1912)을 수정하여 Folin-reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다[16]. 으름열매 400 μL와 Folin-Denis reagent 시약 400 μL을 혼합하여 실온에 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3용액 400 μL를 혼합하고 암실에서 1시간 방치한 후 96 well plated에 상등액 200 μL를 취하여 microplate reader를 이용하여 729nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid (Sigma)를 표준물질로 사용하여 0~100 μg/mL농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량 선으로부터 으름열매의 폴리페놀 함량값을 caffeic acid equivalent (μg/mL)로 표기하였다.

2.1.4. 총 플라보노이드 함량 측정

으름열매 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno 방법을 이용하여 측정하였다[17]. 으름열매 추출물 100 μL농도의 시료액에 10% aluminium nitrate 20 μL과 1M potassium acetate 20 μL 및 ethanol 860 μL를 차례로 가하여 혼합하여 실온에서 40분간 방치한 후 원심분리기로 부유물을 가라앉힌 후 96 well plate에 200 μL씩 분주하여 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin (Sigma)을 표준물질로 사용하여 0~100 μg/mL 농도범위에서 얻은 표준검량 선으로부터 으름열매의 총 플라보노이드 함량을 Quercetin equivalent(μg/mL)로 표시하였다[18].

2.1.5. SOD 유사활성 측정

SOD 유사 평가는 Marklund[19]의 방법을 변형하여 실험하였는데 과산화수소(H_2O_2)와 반응을 촉매하는 pyrogallol 자동산화를 SOD 유사활성으로 나타내었다. 으름열매 추출물을 농도별로 처리하고 Tris-Hbuffer (50 mM tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallo l0.2 mL를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시키고 1N HC l1 mL을 첨가하여 반응을 종료 시켰다. 그 후 ELISA reader을 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가군과 무첨가군과의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

2.2. in vivo 실험방법

2.2.1. 실험기간 및 대상

본 연구는 기능성 화장품 지침기준에 부합하여 자발적 참여 동의를 받은 서울 및 경기도 거주 20-40대 여성 30명을 연구 대상으로 하였다. IRB 심의 통과 후 2015년 6월 10일부터 7월 17일까지 총 4주간 진행하였다. 임상 실험 기간에는 연구대상자가 평소에 사용하던 기초 화장품의 사용을 중지하고 본 실험제품만을 아침, 저녁 1일 2회 사용하도록 하여 실험 임상 집단의 결과에 대한 변이를 최소화하였으며 무작위로 두 군을 나누어 임상실험을 하였다. 대조군 15명, 실험군 15명 (대조군, 실험군 각각 20대 5명, 30대 6명, 40대 4명)으로 연구시작 전 선정된 전체 시험 대상자들에게 임상시험 참여 동의서 및 설문조사, 시험목적, 내용 및 준수사항, 피부측정, 화장품을 사용하는 방법 등을 설명하였다.

본 실험의 임상 대상자는 다음과 같이 한국 식품의약 안전청의 기능성 화장품 지침에 따른 임상 대상자의 기준에 부합되지 않은 사람을 제외하고 선정되었다.

1) 만성 피부 질환이 없는 자
2) 민감성, 과민성 피부가 아닌 자
3) 피부에 알레르기, 광과민증, 일광화상, 심각한 질환 관련하여 약물복용 중인 자
4) 최근 6개월 이내 수술 및 피부질환 치료용으로 스테로이드 함유 외용제를 실험 부위에 사용한 자
5) 암, 간질, 심각한 피부질환을 가진 자
6) 동일한 실험에 참가한 뒤 1개월이 경과되지 않은 자

7) 임상 연구 시작 전 6개월 이내 미백 및 주름 개선 관련 피부과 시술을 받지 않은 자

2.2.2. 피부측정 도구

2.2.2.1. 피부의 수분함량 측정

Corneometer® CM 825(C.K electronic, Germany)를 이용하여 피부의 수분함량을 측정하였다[20]. 피부 수분함량 측정은 피부표면에 접촉하는 전극 간격을 probe를 통해 전도되는 미미한 전류의 정전부하용량(capacitance)을 계측하여 작동한다. 수분의 함량과 정전부하용량은 서로 비례하는 경향이 있어 피부의 보습도가 높을수록 측정되는 수치가 높아지며 표면 각질층으로부터 하방 약 30~40 μm 깊이 이내에 존재하는 수분함량을 일정하게 측정하며 정전부하용량이 환산된 단위인 arbitrary capacitance unit(A.U.)으로 표시하였다. 측정 시에는 정확도를 높이고자 항상 일정한 부위를 5회 반복 측정하여 평균값을 기록하였고, 동일인이 처음부터 끝까지 피부의 수분함량을 측정하였으며 사용 전과 사용 4주 후에 측정하였다.

2.2.2.2. 피부의 유분함량 측정

Sebumeter® SM 810(C.K electronic, Germany)을 이용하여 피부의 유분함량을 측정하였다[20]. 피부의 유분함량 측정은 유분 측정 카세트(Sebumetercassette)인 특수한 반투명 지질 흡수 테이프를 피부에 접촉시킨 후 묻어나오는 분비된 피지량은 광학적 반사 원리(photometric reflection)로 단위 면적당 유분함량(μg/cm2)을 측정한다. 반투명 지질 흡수 테이프가 부착되어 있는 probe를 피부 표면에 30초간 가볍게 눌러 피지를 흡착시킨 후 측정구에 눌러주어 빛이 투과하는 정도를 측정하였고 정확도를 높이고자 측정 시 피부의 같은 지점이 반복되지 않도록 5회 반복 측정하여 평균값을 기록하였고, 동일인이 처음부터 끝까지 피부의 유분함량을 측정하였다. 측정은 사용 전과 사용 4주 후에 측정하였다.

2.2.2.3. 피부의 멜라닌 지수 및 홍반 지수 측정

빛을 방출해 피부에서 반사되는 빛을 측정하는 기구인 Mexameter®MX 18,(C.K electronic, Germany)를 이용하여 피부의 멜라닌지수와 홍반지수를 측정하였는데 MX 18은 피부색조 분석에 가장 적합한 멜라닌과 혈색소에 대응하는 서로 다른 3종의 파장대를 갖는 광원(다이오드) 16개가 원형으로 배치된 센서 probe를 특징으로 하는 반사측정기법(narrow-band reflect ancespectro photometric measurement)을 사용한다. 빛을 방출 후 멜라닌에 대하여 피부에 흡수되고 반사된 빛의 강도를 계산해 melanin index를 산출한다. 측정결과는 피부에 센서를 접촉한 1초 이내에 index value(melanin, erythema)로 표시되며 측정 시에는 정확도를 높이고자 항상 일정한 부위를 4회 반복 측정하여 평균값을 기록하였고, 동일인이 처음부터 끝까지 피부의 멜라닌지수(Melanin index, MI)와 홍반지수(Erythema index, EI)를 측정하였다. 측정은 사용 전과 사용 4주 후에 측정하였다.

2.2.3. 측정방법

본 연구에서 으름열매 추출물 2%가 함유된 크림과 동일한 처방에서의 으름열매 추출물이 함유되지 않은 크림을 대조군과 실험군으로 나누어 사용하였으며 정확한 피부 측정을 위해 실험자들은 일정한 시간대를 정한 뒤 준비된 동일한 세안제를 사용하여 세안한 후 측정시의 실내 환경 조건은 실내 온도 22-24° C 실내 습도 40~60%를 유지하는 항온, 항습의 실내 조건에서 세안 후 1시간이 경과된 후에 측정하였다. 측정 시에는 부위를 얼굴의 오른쪽 볼 (코 옆에서 3cm지점), 왼쪽 (코 옆에서 3cm지점), 이마(미간 위 3cm 지점), 턱(아랫입술 중앙 아래 1.5cm지점)으로 나누어 측정하였으며 정확도를 높이고자 측정 시 항상 일정한 부위를 5회 반복하여 측정하였다.

2.3. 통계분석

본 연구의 수집된 자료는 SPSS Win 20.0을 이용하여 분석하였고, 연구 대상자의 동질성 검증을 위해 독립검정 t-test를 시행하였으며, 대조군과 실험군의 사전·후 변화를 파악하기 위해 paired t-test(대응표본 t검정)를 시행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. in vitro 실험결과

으름열매 추출물의 항산화 활성검사는 DPPH free radical 소거능과 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 측정으로 알아보았다.

3.1.1. DPPH free radical 소거능 측정 결과

DPPH free radical은 비교적 안정한 화합물로 항산화활성을 갖는 물질을 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정하는데 사용되는 물질이다. DPPH free radical 소거 활성법은 식물추출물의 항산화활성을 쉽게 측정할 수 있으며, 실제로 항산화 활성과 연관성이 매우 높다고 알려져 있다[21]. 으름열매 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과, Fig. 1과 같이 으름열매 추출물은 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 사용하였으며 모두 농도가 증가함에 따라 소거능도 증가하는 것을 확인하였다. 특히 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 54.3 %의 높은 소거능을 확인하였다. 박경희[4]의 연구에서도 으름 과피와 열매의 에탄올 추출물에서 DPPH Radical 소거능이 비타민 C보다 우수한 것으로 보고되어 본 연구결과와 비슷하였으며, Jung et al.,[22]의 연구에서 으름 추출물의 유효성분 중 oleanane disaccharides은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 라디컬을 제거하는 효과를 보였다. Kang et al.,[23]의 연구결과에 의하면 DPPH 라디칼 소거 활성은 phenolic acids, 플라보노이드 및 기타 페놀성 물질에 의한 항산화 작용이며, 이러한 물질의 환원력이 클수록 DPPH 라디칼의 소거활성이 크다는 보고가 있다.

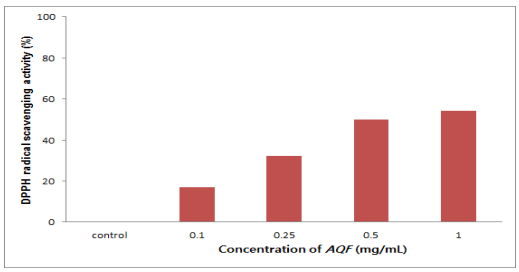

Fig. 1. Change of DPPH radical scavenging activity of *Akebia quinata fruit* extract (AQF).

3.1.2. 총 폴리페놀 함량 측정 결과

으름열매 추출물의 함량은 caffeic acid를 표준물질로 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(Fig. 2). 으름열매 추출물 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL에서 총 폴리페놀 함량은 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 0.5 mg/mL 농도에서 폴리페놀의 함량은 55.6 mg/mL로 0.25 mg/mL의 농도에서보다 2배 이상으로 증가하였다. 으름열매 식초의 항산화 활성을 측정한 이은경 등[24]의 연구에서는 농도와 발효정도에 따라 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가한 것으로 보고되어 본 연구와 유사한 결과를 보였다. Kim et al.,[25]의 연구에서도 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화 활성이 높아지는 농도의존성 상관관계를 보여 폴리페놀의 양과 추출물의 항산화활성과는 관련성이 있는 것으로 사료된다.

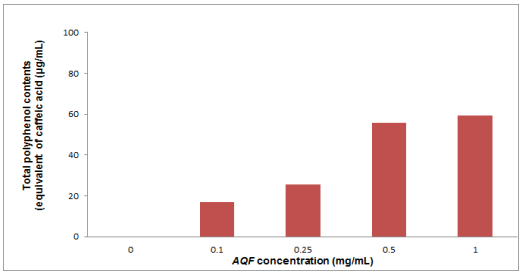

Fig. 2. Change of total polyphenol concentration of *Akebia quinata fruit* extract (AQF).

3.1.3. 총 플라보노이드 측정 결과

으름열매 추출물의 함량은 Quercetin을 표준물질로 하여 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 으름열매 추출물 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 %에서의 총 플라보노이드 함량은 0, 12.3, 23.2, 55.3, 93.8 mg/mL로 변화되었으며, 으름열매 추출물의 농도가 높아질수록 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 대부분의 식물에서 폴리페놀 함량이 높을 경우 플라보노이드 함량이 높았던 Choi et al.,[26]의 연구결과와 일치하였으며 플라보노이드는 활성산소와 nitric oxide 제거력의 특성이 있는 것으로 보고되었다.

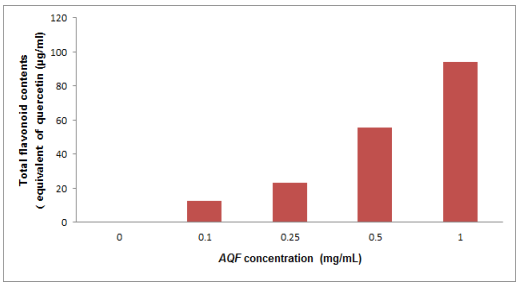

Fig. 3. Change of total flavonoid concentration of *Akebia quinata fruit* extract (AQF).

3.1.4. SOD 활성 측정 결과

SOD는 생명체가 산소를 소비하는 기관에 존재하며 호흡과정에서 발생하는 초과산화 음이온(Superoxide anion)을 산소(O_2)와 과산화수소(H_2O_2)로 불균등화하는 반응을 촉매 함으로써 세포를 보호한다[27]. 본 실험에서 으름열매 추출물의 SOD 활성을 측정한 결과, Fig. 4와 같이 으름열매 추출물은 농도 의존적으로 증가하였으며 1 mg/mL에서 높은 활성도를 보였다. 이는 으름열매에 함유된 Polyphenol 성분이 우수한 항산화 작용에 영향을 주었던 것으로 판단된다.

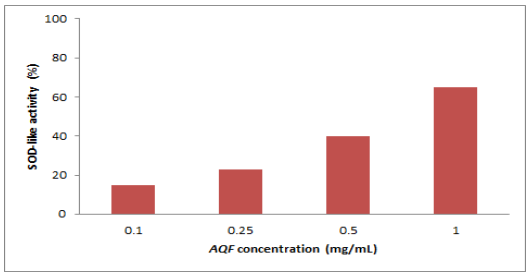

Fig. 4. SOD-like activity of solutions with different concentration of *Akebia quinata fruit* extract (AQF).

3.2. in vivo 실험을 통한 피부상태 변화 측정

3.2.1. 동질성 검증

본 연구대상자의 실험 전·후 안면피부의 수분, 유분, 멜라닌, 홍반 상태는 Table 1과 같고, 오른쪽 볼, 왼쪽 볼, 이마, 턱에서 모두 집단 간 유의한 차이를 나타내지 않았으므로 동질성이 확보되었다($p<.05$).

3.2.2. 안면 피부의 수분변화

대조군과 으름열매군의 제품을 아침, 저녁 1일 2회 4주간 사용하여 두군 간의 사용시점에 따른 안면피부의 왼쪽 볼, 오른쪽 볼, 턱, 이마의 수분 함량 지수 평균 총합의 변화량을 분석한 결과 Table 2와 같이 실험 전보다 실험 후 으름열매군의 수분 함량이 증가하는 경향을 보였다. 결과적으로 수분 함량은 대조군에서는 실험 전 59.34±7.56 AU에서 4주 후 64.31±6.71 AU이었으나 으름열매군은 55.79±6.22 AU에서 4주 후 65.55±5.38 AU로 증가하여 유의적인 차이를 확인 할 수 있었다. 제품사용 전, 후 개선율로 분석하기 위해 제품 사용 전 수분값을 100%로 기준하여 4주차의 변화 정도를 백분율로 계산했을 때, 대조군은 4주 후에는 8.4%로 증가하였으나 으름열매 추출물 함유크림이 17.5%로 증가하여 두 배 정도 수분함량 차이를 보였다.

Table 3과 같이 각 부위별 수분변화를 분석한 결과, 대조군의 경우 오른쪽 볼, 왼쪽 볼, 이마, 턱에서 수분의 증가가 나타났지만, 유의한 변화는 나타나지 않았다. 실험군의 경우 오른쪽 볼에서는 사전 52.87(M)에서 사후 66.32(M)로 유의한 수분 증가가 나타났으며($p<.01$), 왼쪽 볼에서도 사전 55.35(M)에서 사후 68.07(M)로 유의한 수분 증가가 나타났고($p<.01$), 또한 이마에서는 사전 56.10(M)에서 사후 62.56(M)으로 유의한 수분 증가가($p<.01$), 턱에서는 사전 58.83(M)에서 사후 65.25(M)로 유의한 수분 증가가 나타났다($p<.001$). 또한 오른쪽 볼과 왼쪽 볼에서 각각 13.45(M), 12.72(M)의 높은 수분 증가를($p<.01$), 이마와 턱에서 각각 6.45(M)($p<.01$), 6.41(M)($p<.001$)으로 비슷한 수분량의 증가를 나타내어 U존의 수분 증가량이 T존의 수분 증가량의 두 배에 달하며, U존의 수분 증가가 T존에 비해 훨씬 효과적임을 알 수 있다(Figure 4). 이러한 결과는 과채류를 이용하여 수분을 측정한 이연주[28], 백년초 손바닥 선인장 추출물의 수분

Table 1. The average values of moisture index in two groups

Variable	Cont. (n=15)	A.Q (n=15)	t	p
Moisture (AU)	59.34±7.56	55.79±6.22	1.402	.172
Sebum (㎍/㎠)	23.91±16.98	32.05±34.84	-.813	.423
Melanin Index (MI)	154.63±23.83	173.00±33.16	-1.742	.094
Erythema Index (EI)	333.00±52.22	374.38±69.02	-1.852	.075

Table 2. Comparison of the average values of the moisture index in the two groups measured before and after the experiments. C:Control group, A.Q.F: *Akebia quinata fruit* extract group. The date were presented as mean±SD

Moisture index (AU)	C (n=15)	A.Q (n=15)
Before	59.34±7.56	55.79±6.22
After	64.31±6.71	65.55±5.38
t_2-t_1 (p)	4.96±9.99 (.075)	9.76±5.43 (.000***)

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

Table 3. The variations and the changes of moisture index measured before and after the experiments on the skin surface. C:Control group, A.Q.F: *Akebia quinata fruit* extract group.

Group	Right cheek		Left cheek		Forehead		Jaw	
	Before	4 weeks	Before	4 weeks	Before	4 weeks	Before	4 weeks
C (n=15)	56.68± 12.50	63.25± 9.62	56.36± 8.97	61.80± 12.96	57.85± 11.17	65.45± 7.94	66.45± 13.26	66.71± 7.77
p value	0.14		0.102		0.014*		0.941	
A.Q (n=15)	52.87± 12.06	66.32± 7.77	55.35± 12.58	68.07± 8.51	56.10± 8.49	62.56± 8.64	58.83± 5.90	65.25± 4.84
p value	001**		0.001**		0.008**		0.000**	

*p<.05, **p<.01, ***p<.001
Abbreviations were the same as Table 2.

측정 연구[29]의 연구결과와 유사한 결과를 나타냈다. 또한 대조군의 수분 증가량이 부위에 따라 산발적인 것에 반해, 실험군의 수분 증가량은 T존과 U존에 따라 고르게 나타났으며, 이는 으름열매성분의 균일한 보습 효과에 의한 것으로 판단된다. 이는 으름열매 추출물에 함유된 천연보습인자 성분인 아미노산류가 피부보습에 영향을 미치는 것으로 생각되며 또한 피부보습 기능성 소재로서의 가능성이 있다고 사료된다.

3.2.3. 안면 피부의 유분변화

대조군과 으름열매군의 제품을 아침, 저녁 1일 2회 4주간 사용하여 두군 간의 사용시점에 따른 안면피부의 왼쪽 볼, 오른쪽 볼, 턱, 이마의 수분함량 지수 평균 총합의 변화량을 분석한 결과 Table 4와 같이 실험 전보다 실험 후 으름열매군이 대조군보다 유분 함량이 더 감소하였다. 결과적으로 유분함량은 대조군에서는 실험 전 23.91±16.98 에서 4주 후 23.91±16.98 이었으나 으름열매군은 32.05±34.84 에서 4주 후 22.56±22.95 로 감소하였는데 최윤하[30]의 연구에서도 유사하게 나타났다.

각 부위별 피부의 유분변화를 분석한 결과, Table 5와 같이 대조군과 실험군에서 모두 유분의 감소가 나타났고, 두 군 모두 사전·후 간 유의한 감소는 나타나지 않았지만, 모든 항목에서 실험군의 유분감소가 더 크게 나타난 것을 알 수 있다. 유종엽[31]에서 실험 전, 후 유분량에 본 연구 결과와 유사하였으며 식물 추출물 함유 화장품의 유분량에 미치는 영향은 긍정적인 것으로 사료된다. 안면의 부위별로 살펴보면, 대조군의 경우 이마와 턱에서 각각 8.06(M), 6.20(M)으로 유분의 감소가 비교적 크게 나타났고, 오른쪽 볼과 왼쪽 볼에서는 각각 3.86(M), 2.20(M)의 비

Table 4. Comparison of the average values of the Sebum index in the two groups measured before and after the experiments. C:Control group, A.Q.F: *Akebia quinata fruit* extract group. The date were presented as mean±SD

Sebum (㎍/㎠)	Control (n=15)	A.Q.F (n=15)
Before	23.91±16.98	32.05±34.84
After	18.83±14.87	22.56±22.95
t_2-t_1 (p)	−5.08±25.46 (.452)	−9.48±26.63 (.190)

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

Table 5. The variations and the changes of sebum index measured before and after the experiments on the skin surface

Variable		Control (n=15)		A.Q.F (n=15)	
		Before (M±SD)	After (M±SD)	Before (M±SD)	After (M±SD)
Right cheek	MV	14.86±14.66	11.00±12.77	20.80±26.60	13.53±18.35
	t_2-t_1	−3.86±21.88		−7.26±20.90	
	t (p)	−.684 (.505)		−1.346 (.200)	
Left cheek	MV	11.60±10.62	9.40±11.10	20.53±24.76	17.73±25.94
	t_2-t_1	−2.20±17.21		−2.80±26.49	
	t (p)	−.495 (.628)		−.409 (.689)	
Forehead	MV	35.26±20.45	27.20±21.52	42.60±49.76	27.06±32.31
	t_2-t_1	−8.06±32.74		−15.53±33.41	
	t (p)	−.954 (.356)		−1.801 (.093)	
Jaw	MV	33.93±28.72	27.73±22.80	44.26±40.13	31.93±22.27
	t_2-t_1	−6.20±38.81		−12.33±36.17	
	t (p)	−.619 (.546)		−1.320 (.208)	

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

교적 낮은 유분 감소를 나타냈다. 실험군의 경우도 이마와 턱에서 각각 15.53(M), 12.33(M)의 높은 유분 감소를, 오른쪽 볼과 왼쪽 볼에서 각각 7.26(M), 2.80(M)으로 T존에 비해 낮은 유분 감소를 나타냈다. 따라서 모든 연구대상자에서 T존의 유분 감소가 U존에 비해 높게 나타났으며, T존의 유분감소는 으름열매성분이 약 두 배 더 효과적임을 알 수 있다.

3.2.4. 안면 피부의 멜라닌 변화

본 연구대상자가 안면에 도포한 크림 종류에 따라 전·후 멜라닌 변화를 분석한 결과는 다음에 제시된 Table 6과 같다. 대조군의 경우 오른쪽 볼에서는 사전 127.00(M)에서 사후 136.40(M)으로, 왼쪽 볼에서는 사전 121.93(M)에서 사후 140.33(M)으로(p<.05), 이마에서는 사전 177.40(M)에서 사후 179.40(M)으로, 턱에서는 사전 192.20(M)에서 사후 202.13(M)으로 멜라닌이 증가했지만, 유의한 변화는 나타나지 않았다. 실험군의 경우 오른쪽 볼에서는 사전 141.40(M)에서 사후 132.80(M)으로, 왼쪽 볼에서도 사전 145.13(M)에서 사후 135.06(M)으로, 이마에서는 사전 186.60(M)에서 사후 173.73(M)으로(p<.001), 턱에서는 사전 218.86(M)에서 사후

Table 6. Comparison of the average values of the melanin index in the two groups measured before and after the experiments. C:Control group, A.Q.F: *Akebia quinata* fruit extract group. The date were presented as mean±SD

Melanin Index (MI)	Control (n=15)	A.Q.F (n=15)
Before	154.63±23.83	173.00±33.16
After	164.56±29.55	162.95±31.41
t_2-t_1 (p)	9.93±19.90 (.074)	10.05±5.50 (.000***)

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

210.10(M)으로(p<.05) 멜라닌의 감소가 나타났다. 따라서 대조군에서는 모든 항목에서 멜라닌의 증가가, 실험군에서는 모든 항목에서 멜라닌의 감소가 나타났으며, 이마와 턱에서는 유의한 감소를 나타냈다. 이와 같이 으름열매성분이 멜라닌을 감소시켜 안색을 맑게 하는 미백효과를 나타낸다는 것을 알 수 있는데 으름열매에 함유되어 있는 oleanolic acid가 안면부위의 멜라닌 감소량에 긍정적 영향을 얻은 결과라고 생각된다[32].

Fig. 5와 같이 멜라닌 지수 비율(after/before)로 평가한 후 대조군과 실험군을 비교한 결과 대조군의 경우 멜라닌 지수비율이 1.0에서 거의 변화를 보이지 않으나 실험군의 경우 1.0 이하로 감소한 것을 볼 수 있다.

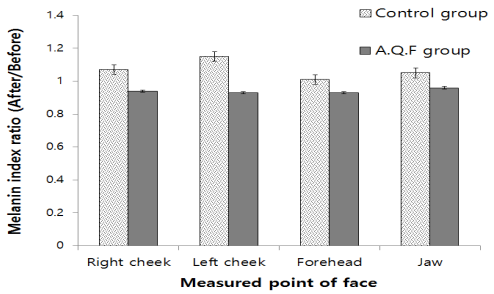

Fig. 5. The changes of melanin index ratio measured before and after the experiments between the control and A.Q.F group. Average melanin index was calculated with individual tests at right cheek, left cheek, jaw, forehead on the face.

3.2.5. 안면 피부의 홍반 변화

본 연구대상자가 안면에 도포한 크림 종류에 따라 전·후 홍반 변화를 분석한 결과는 다음에 제시된 Table 7과 같다. 대조군의 경우 오른쪽 볼에서는 사전 302.26(M)에서 사후 301.46(M)으로, 왼쪽 볼에서는 사전 298.86(M)에서 사후 286.26(M)으로 홍반의 감소가 나타났고, 이마에서는 사전 313.26(M)에서 사후 324.20(M)으로, 턱에서는 사전 417.60(M)에서 사후 427.13(M)으로 홍반의 증가했으며, 유의한 변화는 나타나지 않았다. 실험군의 경우 오른쪽 볼에서는 사전 338.86(M)에서 사후 284.53(M)으로(p<.01), 왼쪽 볼에서도 사전 338.86(M)에서 사후 296.40(M)으로(p<.05), 이마에서는 사전 345.26(M)에서 사후 312.53(M)으로(p<.01), 턱에서는 사전 474.53(M)에서 사후 425.40(M)으로(p<.001) 홍반의 유의한 감소가 나타났다. 따라서 대조군에서는 홍반의 증가 또는 감소가 있었으나 유의한 변화는 나타나지 않았고, 실험군에서는 모든 항목에서 사후 홍반이 감소했으며, 또한 모든 항목에서 유의한 감소를 나타냈다. 이러한 결과는 으름에 함유된 아미노산에 의해 피부보호 및 피부의 재생 기능으로 으름열매가 안면 부위의 홍반량 감소에 긍정적 영향을 얻을 수 있는 결과라고 생각된다[32]. 또한 Fig. 6과 같이 홍반 지수 비율(after/before)로 평가한 후 대조군과 실험군을 비교한 결과 대조군의 경우 홍반 지수비율이 1.0에서 거의 변화를 보이지 않으나 실험군의 경우 1.0 이하로 감소한 것을 볼 수 있다.

Table 7. Comparison of the average values of the erythema index in the two groups measured before and after the experiments. C:Control group, A.Q.F: *Akebia quinata* fruit extract group. The date were presented as mean±SD.

Erythema Index (EI)	Control (n=15)	A.Q.F (n=15)
Before	333.00±52.22	374.38±69.02
After	334.76±66.21	329.71±54.34
t_2-t_1 (p)	1.76±38.26 (.861)	44.66±33.51 (.000***)

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

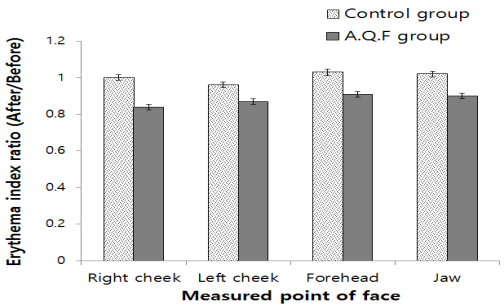

Fig. 6. The changes of erythema index ratio measured before and after the experiments between the control and A.Q.F group. Average erythema index was calculated with individual tests at right cheek, left cheek, jaw, forehead on the face.

4. 결 론

본 연구는 으름열매 추출물의 항산화 활성 및 안면피부에 긍정적인 영향을 미치는가를 검증하는데 초점을 두었다. 으름열매의 in vitro 항산화 효과 측정결과, 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 상승한 것으로 확인되었다. 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화 활성이 높아지는 농도의존성 상관관계를 보여 폴리페놀의 양과 추출물의 항산화활성과는 관련성이 있다고 본다. 또한 으름열매 추출물의 농도가 높아질수록 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 확인되었다. 이러한 실험을 토대로 으름열매 추출물을 함유하는 크림(화장품)을 제조하여 in vivo 임상평가를 2015년 06월 10일부터 2015년 7월 17일까지 20~40세 여성 30명을 대상으로 4주간 으름열매 함유 크림을 1일 2회 피부에 도포하여 유분과 수분, 멜라닌과 홍반지수의 변화를 알아보았다. 크림 사용 전, 후의 개선율을 비교하였을 때 수분함량은 대조군이 8.4% 증가하였으나 으름열매 추출물 함유 크림이 17,5%로 증가하여 두 배 정도의 차이를 보였으며 유분도 감소하였다. 또한 두 그룹간의 멜라닌지수 변화는 대조군의 경우 멜라닌 수치가 증가하였으나 으름열매추출물군의 경우 5.8% 감소율을 보였다. 홍반변화 역시 으름열매 추출물군에서 11.9%로 감소하여 피부에 진정효과를 주는 것으로 나타났다. 이와 같이 으름열매 추출물 함유 화장품 사용 그룹에서 수분함량 변화, 유분함량 변화, 멜라닌지수 감소가 통계적으로 유의미한 변화를 보여 으름열매 추출물 함유 화장품이 피부개선을 위한 기능성화장품으로서 활용 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 으름열매 추출물은 독성을 나타내지 않으면서도 피부보습, 피부개선효과를 가진 천연 및 기능성화장품 소재로서 활용 가능성이 있다고 사료된다.

References

1. S. N. Park, Physicochemical characteristics of dasik using Scattered-floxer ladybell, Kongju National University Ph. D. Thesis, (2009).
2. G. H. Halliwell, J. Gutteridge, Role of free radical and catalytic metalions in human disease, An overview, Methods Enzymol, **186**, 1-85 (1990).
3. N. Ramarthnam, T. Osawa, H. Ochi and S. Kawakishi. The contribution of plant

food antioxidants to human health, *Trends Food Science*, **6**, 75-82 (1995).
4. K. H. Park, Antioxidant and anti-cancer effects of Akebia quinata, Inje University Master's Thesis, (2007).
5. H. U. Kim, Constituents from the Leaves of Akebia quinata, Chungang University, Master's Thesis, (2006).
6. K. D. Lee, Inhibitory effects of Akebia quinata fruit extract against mutans streptococci, Chonbuk National University Ph.D. Thesis,, (2008).
7. H. N. Hwang, I. S. Lee, J. E. Kim, H. Y. Moon, The investigation of antibiotic substances isolation and quantitative analysis from Akebia quinata. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **4**, 253-256 (2002).
8. Y. Mimaki, M. Kuroda, A. Yokosuka, H. Harada, M. Fukushima, Y. Sashida, Triterpenes and triterpene saponins from the stems of Akebia trifoliata. *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 960-965 (2003).
9. A. R. Rim, S. J. Kim, K. I. Jeon, E. J. Park, H. R. Park, S. C. Lee, Antioxidant activity of extracts from Akebia quinata Decne, *J. Food Sci. Nutr.*, **11**, 84-87 (2006).
10. Y. Mimaki, S. Doi, M. Kuroda, A. Yokosuka, Triterpene glycosides from the stems of Akebia quinata, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1319-1324 (2007).
11. J. Kawata, M. Kameda and M. Miyazawa, Constituents of essential oil from the dried fruits and stems of Akebia quinata DECNE, *J. Oleo. Sci.*, **56**, 59-63 (2007).
12. H. S. Kang, J. S. Kang, W. S. Jeong, Cytotoxic and apoptotic effects of saponins from Akebia quinata on hepG2 hepatocarcinoma cells, *Korean J Food Preserv.,* **17**, 311-319 (2010).
13. S. M. Lee, Y. H. You, K. G. Kim, J. J. Park, C. S. Jeong, D. Y. Jhon and W. J. Jun, Antioxidant activities of native gwangyang Rubus coreanus Miq. *Korean J Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 327-332 (2012).
14. S. H. Lee, Y. S. Song, S. Y. Lee, S. Y. Kim and K. S. Ko, Protective Effects of Akebia quinata Fruit Extract on Acute Alcohol-induced Hepatotoxicity in Mice, *Food Science and Biotechnology*, **46(5)**, 622-629 (2014).
15. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a UV free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
16. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966-968 (1981).
17. M. Moreno, M. Isla, A. R. Sampietro and M. Vattuone, Comparison of the freeradical scavenging activity of propolis from several region of Argentina, *J Enthropharmacology*. **71**, 109-114 (2000).
18. Y. H. Pyo, Studies on the Dermal Bioactive Properties of the extracts from Celosia cristata Linne and Its cosmetic application, Konkuk University Ph. D. Thesis, (2009).
19. S. Marklund, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474 (1994).
20. B. H. So, Equipment Evaluation of the skin effect, *The Journal of Skin Barrier Research.,* **8(1)**, 68-75 (2006).
21. Y. H. Jeon, M. H. Kim and M, R, Kim, Antioxidative, Antimutagenic, and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts from Cornus officianalis, *Kororean J Soc. Food Sci. Nutr.*, **37(1)**, 1-7 (2008).
22. H. J. Jung, C. O. Lee, T. K. Lee, J. W. Choi and H. J. Park, Structure activity relationship of oleanane disaccharides isolated from Akebia quinata versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 744-747 (2004).
23. H. S. Kang, J. S. Kang and W. S. Jeong, Cytotoxic and apoptotic effects of saponins from Akebia quinata on hepG2 hepatocarcinoma cells. *Korean J. Food Preserv.,* **17**, 311-319 (2010).

24. E. K. Lee, W. Y. Kwon, J. W. Lee, J. A. Yoon, K. H. Chang, B. C. Song, J. H. An, Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Vinegar Supplemented Added with Akebia quinata Fruit during Fermentation, *Kororean J Soc. Food Sci. Nutr.,* **43(8)**, 1217-1227 (2014).
25. E. Y. Kim, I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim and M. R. Rhyu, Screening of the antioxidant activity of somr medicinal plants. *Korean J Sci. Tech*, **36**, 333-338 (2004).
26. H. S. Choi, S. H. Yeo, S. T. Jeong, J. H. Choi, H. S. Park and M. K. Kim, Preparation and characterization of urushiol free fermented *Rhus verniciflua* stem bark (FRVSB) extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**, 173-178 (2012).
27. J. M. Na, Characterization of superoxide dismutase from cold-adapted Arctic bacteria, Sejong University Master's Thesis., (2009).
28. Y. J. Lee, Efficacy and Preference Tendency of the Natural Cosmetic Using Fruits and Vegetables, Konkuk university Master's Thesis., (2007).
29. S. J. Hong, The effects of Opuntia ficus-indica var. saboten extract on the skin condition, Master's Thesis, Seokyeong University, (2012).
30. Y H. Choi, A study on the perception of DIY natural cosmetics and satisfaction with its improvement effects upon the skin, Chungang University, Master's thesis, (2011).
31. J. Y. Yoo, S. H. Park, I, A, Hwang, C. H. Heo, S. Y. Yoon and K. C. Park, A Clinical Study on the Effect of a Cream Containing Ramulus Mori Extract and Tea Tree Oil on Acne Vulgaris and Aerobic Skin Flora, *Korean journal of dermatology*, **41**, 1136-1141(2003).
32. J. A. Park, M. O. Choi and H. S. Kim, An Analysis on Physical and Chemical Features and Components of Each Part of the Rumex crispus L. *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **8**, 193-201(2010).