



Biological activities of extracts from *Caryopteris incana* Miq.

Jae-Eun Lee¹ · Eun-Ho Lee¹ · Byung-Oh Kim¹ · Young-Je Cho¹

층꽃나무(*Caryopteris incana* Miq.) 추출물의 생리활성

이재은¹ · 이은호¹ · 김병오¹ · 조영제¹

Received: 18 November 2016 / Accepted: 21 November 2016 / Published Online: 31 March 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract In this study, extracts from *Caryopteris incana* Miq. (*C. incana*) were investigated to assess anti-oxidation, skin-whitening and anti-wrinkle activity. The total phenolic compounds of *C. incana* extracts with water and 80 % ethanol showed 7.69 and 12.50 mg/g respectively. Antioxidation activity of *C. incana* extracts was measured by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), protection factor (PF), and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). At concentration of 200 µg/mL, the DPPH free radical scavenging activity of water and ethanol extracts were 84 and 92 %, respectively. ABTS radical scavenging activity of water and ethanol extracts were both at approximately 99 %. Antioxidant PF of water and ethanol extracts were 1.56 PF and 1.67 PF, respectively. The TBARS of water and ethanol extracts were 62 and 82 %, respectively. In anti-wrinkle and skin-whitening activity, 80 % ethanol extract had more outstanding effect than water extract at concentration of 200 µg/mL. The levels of elastase and collagenase inhibitory activity related with anti-wrinkle were 58 and 89 % in ethanol extract. The tyrosinase inhibitory activity related with skin-whitening was 13 % in ethanol extract. The astringent effect of ethanol extract was 50 %. Throughout the results, *C. incana* extracts showed an excellent effect on anti-oxidation, skin-whitening and

anti-wrinkle activity. Therefore, *C. incana* extracts can be used as a new material for cosmetics.

Keywords Anti-oxidation activity · Anti-wrinkle · *Caryopteris incana* Miq. · Total phenolic compounds · Whitening effect

서론

삶의 질을 추구하며, 항노화에 대한 관심이 높아지는 가운데 천연 항산화 소재 개발에 대한 의미는 높아지고 있으며, 최근 미(美)를 중요하게 여기는 사회적 트렌드에 맞추어 노화를 지연시키거나 주름개선 및 미백효과를 가지는 antiaging 천연 기능성 화장품이 주목을 받고 있다(Shim 등, 2005). 피부의 노화현상은 세월이 흘러감에 따라 자연히 발생하는 내인적 노화와 자외선 노출 등 주위환경으로 인해 발생하는 외인적 노화로 분류한다. 외인적 노화 기전에 중심이 되는 O₂는 세포 내 전자전달계를 통해 최종적으로 전자를 받아 양성자와 반응하여 H₂O를 생성하고, 이로 인해 세포호흡이 지속되게 한다. O₂는 생명을 유지하는 데에 필수적인 역할을 하는 반면, superoxide radical, hydroxyl radical 등과 같은 반응성이 높은 산소종을 생성하기도 한다. 이러한 활성산소종은 생체방어시스템의 일부로 작용하기도 하지만 단백질 분해, 지질 산화 및 DNA 변성 등 세포의 기능을 상실시키기 때문에(Moure 등, 2001), 유해 활성산소 감소를 통한 생체방어, 피부 노화억제 등의 연구가 활발히 진행되고 있다.

미용 식품 활성 중 elastin과 collagen은 피부 진피층의 fibroblast에서 matrix를 구성하는 물질로서, elastin과 collagen의 생합성과 분해는 피부의 노화현상과 관련되어 있으며, 활성산소종에 의한 산화적 스트레스는 생합성을 억제하여 주름을 발생시키게 된다(Pyo 등, 2008). Melanin은 피부에 존재하는 미백과

Young-Je Cho (✉)
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

¹School of Food science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

관련된 색소로서 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만 지나치게 생성될 경우 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 심하면 피부암의 원인이 되기도 한다(Iwata 등, 1990). 기존 미용식품 분야에서는 vitamin C, E, β -carotene, polyphenol 등과 같은 천연 항산화제 및 미백제가 사용되고 있으며, BHA, BHT, PG 등의 합성 항산화제가 개발되어 이용되고 있지만 합성 항산화제의 경우 발암성이나 독성과 같은 문제점이 있다고 보고되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 식물체의 2차 대사물질이자 소량으로도 두드러진 생리활성 효과를 나타내는 대표적인 항산화 물질인 phytochemicals과 같은 안전한 천연 항산화제 소재 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Joo 2013).

층꽃나무(*Caryopteris incana* Miq., 층꽃풀, 난향초, Nursery Spiraea)는 마편초과에 속하는 다년초로 중국, 타이완, 일본, 우리나라 남부지방에 널리 분포한다. 주로 산과 들에서 자생하며 줄기는 높이가 약 30~60 cm 정도로 곧게 자라고 긴 타원형의 잎은 약 3~6 cm 정도의 길이로 자란다. 꽃은 자주색 또는 흰색으로 7~9월 사이에 개화하고 꽃이 층층으로 배열되어 층꽃나무라 명명하였다. 어린 새순은 나물로 먹고 뿌리는 한약재로 사용되는데, 전초 또는 뿌리를 약용하면 맛이 맵고 성질이 따뜻하고 독성이 전혀 없는 것으로 알려져 있다(Kim 2008). 층꽃나무의 전초에는 flavonoid 배당체, alkaloid, phenol류, phenylethanoid glycosides, phenylpropanoid glycosides, steroid, amino acid, 유기산, tannin이 함유되어 있으며, 항산화 작용, 수렴작용, 기침, 가래, 기관지염, 신경통, 종기, 월경불순, 어혈, 타박상, 습진 및 피부가려움증 등에 대한 효능과 황색포도상구균, 디프테리아균, 적리균에 대한 항균작용이 알려져 있다(Gao 등, 1999; Gao 등, 2000; Ha 등, 2014). 우리나라에서 층꽃나무는 관상용, 절화용, 조경용 이외의 다른 용도로는 활용되지 못하고 있으며(Kim 2008a), 지금까지 층꽃나무 추출물이 미용식품 분야에서 화장품 조성물로 사용되거나 기능성에 관한 연구 자료가 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 활용도가 낮은 층꽃나무 전초로부터 total phenolic compounds를 추출하여 항산화효과, 주름개선 및 미백 효과 등 미용 활성을 검정하고, 기능성을 가지는 천연 화장품 조성물로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 층꽃나무(*Caryopteris incana* Miq.)는 2015년 11월 경주지역에서 채취하여, 45 dry oven (Jeitech, Daejeon, Korea)에서 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

층꽃나무 추출물 및 고형분의 제조

시료 추출은 물 추출물의 경우 건조 층꽃나무 분말 1g에 증류수 200 mL를 가하고 용액이 100 mL가 될 때 까지 15분간 가열하여 증발시킨 후 냉각하여 상온에서 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 시료 1g에 80% ethanol 100 mL를 추출용매

로 가하여 24시간 동안 상온에서 교반 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 1 filter paper (Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료의 total phenolic compounds의 농도를 맞추어 사용하였다. 고형분의 제조는 추출에서 여과 과정까지 동일하게 진행하였으며, 이후 물과 ethanol 추출물을 동결건조하여 사용하였다. 얻어진 고형분을 물에 녹여 중량비 농도로 맞추어 실험을 진행하였다.

Total phenolic compounds 정량

Total phenolic compounds의 정량은 Folin과 Denis (1912)의 방법에 준하여 측정하였으며, 시료 추출물 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, 종료시약 Na_2CO_3 1 mL를 가한 후, UV-visible spectrophotometer (Optizen 3220UV Mecasys, Daejeon, Korea)로 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

DPPH radical 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거활성은 Blies (1958)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 각 시료 1 mL에 60 μM DPPH 3 mL를 넣었으며, 대조구에는 시료 대신 증류수 1 mL를 첨가하여 vortex한 후 실온에서 15분 동안 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거활성(%)은 $(1 - \text{반응구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 계산하였다.

ABTS radical cation decolorization 측정

ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등(1999)의 방법에 준하여 측정하였다. 7 mM ABTS 5 mL와 140 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 88 μL 를 섞어 암실에서 약 15시간 반응시켜 radical을 형성시켰다. 이를 ethanol과 약 1:88 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 반응구는 시료용액 50 μL 와 ABTS solution 1 mL를 혼합하였으며 대조구에는 시료 대신 증류수 50 μL 를 첨가하여 30초간 vortex한 후 2.5분간 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS radical 소거활성(%)은 $(1 - \text{반응구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 계산하였다.

Antioxidant Protection Factor (PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty(1999)의 방법에 준하여 측정하였다. 10 mg의 β -carotene을 50 mL의 chloroform에 녹인 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40 $^\circ\text{C}$ water bath에서 chloroform을 증류시킨 후 20 μL linoleic acid, 184 μL tween 40과 50 mL H_2O_2 를 가하여 emulsion을 만들었다. 반응구는 시료용액 100 μL 에 5 mL의 emulsion용액을 혼합하였으며, 대조구에는 시료 대신 증류수 100 μL 를 첨가하여 vortex한 후 50 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 후, 470 nm에서 흡광도를 측정하여 PF 값은 반응구의 흡광도/대조구의 흡광도의 비로 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) 측정

TBARs는 Buege와 Aust(1978)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 1% linoleic acid와 1% tween 40으로 emulsion을 만들고, 시료 0.2 mL와 emulsion 0.8 mL를 섞었으며, 대조구에는 시료 대신 증류수 0.2 mL를 첨가하여 50 °C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA reagent 4 mL를 가하고 15분간 중탕한 다음 10분간 냉각시켜 15분간 2,000 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리 한 액을 실온에서 10분간 방치 한 후 상층액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TBARs에 대한 저해율(%)은 (1-반응구의 TBARs μ M/대조구의 TBARs μ M) \times 100으로 계산하였다.

Elastase 저해효과 측정

Elastase 저해효과 측정은 James 등(1996)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1 mL에 기질액 0.8 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 용액 0.1 mL의 혼합액에 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase (Sigma-Aldrich Co., Louis, MO, USA) 효소용액 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 넣고, 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 25 °C에서 20분간 반응시켜 p-nitroaniline 생성량을 흡광도 410 nm에서 측정하여 저해율(%)은 (1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100으로 계산하였다.

Collagenase 저해효과 측정

Collagenase 저해효과 측정은 Wunsch와 Heidrich (1963)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하고, 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지 시키고, ethyl acetate 2 mL를 첨가하고 320 nm에서 흡광도를 측정하여, 저해율(%)은 (1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해효과 측정

Tyrosinase 저해효과 측정은 Vincent와 Hearing(1987)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 2.3 mL와 기질액 1.5 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL의 혼합액에 250 U/mL mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mL와 시료 0.2 mL를 넣고, 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL를 첨가하여 37 °C에서 20분간 반응시켜 흡광도 475 nm에서 측정하여, 저해율(%)은 (1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100으로 계산하였다.

수렴효과(Astringent effect) 측정

Astringent 활성측정은 Lee 등(2002)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액(Sigma-Aldrich Co.)을 1:1로 넣고, 대조구에는 시료 대신 증류수를 첨가하여 진탕 혼합한 다음 2,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성은

(1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100으로 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 7.5 for windows (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균 \pm 표준편차(mean \pm standard deviation)로 표시하였고 분산분석(ANOVA)과 Duncan의 다중범위검정 (Duncan's multiple range test)을 실시하여 시료간의 유의차를 $p < 0.05$ 수준으로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Total phenolic compounds의 최적추출 조건

Total phenolic compounds는 1,000여 가지 이상 알려진 식물체의 2차 대사산물이며, benzene 고리에 치환되어 있는 여러 개의 -OH로 방향족 고리를 가지고 있다(Han 2009). -OH가 free radical과 환원반응을 함으로 인해 항산화, 항암, 항당뇨 등 여러 가지 생리활성 효과를 지닌다고 알려져 있다(Nam 2004). 층꽃나무에 함유된 total phenolic compounds의 추출 수율을 확인하고자, 물과 ethanol로 추출한 고형분 100 μ g의 total phenolic compounds 함량을 측정된 결과 각각 25.56, 36.68 μ g/g으로 매우 낮게 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 100 μ g/mL의 농도로 조절된 층꽃나무의 total phenolic compounds와 고형분 100 μ g의 생리활성을 비교하기 위해 전자공여능을 측정된 결과 Fig. 1-B에서와 같이 100 μ g/mL의 농도로 조절된 층꽃나무의 total phenolic compounds에 의해 높은 전자공여능이 나타났으며, 고형분 100 μ g에서는 물과 ethanol 각각 27, 43 %로 상대적으로 낮은 전자공여능이 나타났다. 이는 고형분의 total phenolic compounds의 함량과 유사한 패턴을 나타내었으며 이를 통해 total phenolic compounds의 함량이 증가할수록 전자공여능이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 항산화효과, 주름개선 및 미백 효과 등의 생리활성은 층꽃나무의 고형분 함량보다 조절된 total phenolic compounds의 농도에 의해 영향을 받을 것으로 판단되어 향후 실험에서는 total phenolic compounds의 함량을 조절하여 진행하였다. 이에 근거하여 층꽃나무 추출물에 함유된 total phenolic compounds의 최적추출 조건을 알아보기 위해 여러 가지 추출용매를 사용하여 농도에 따라 조절하여 total phenolic compounds의 함량을 측정하였다. 층꽃나무를 다양한 용매로 추출한 결과 Fig. 1C와 같이 water, ethanol, methanol, acetone, butanol 추출물에서 각각 7.69, 11.47, 9.95, 6.51, 8.65 mg/g으로 ethanol 추출물이 가장 높은 total phenolic compounds 함량을 나타내었다. Ethanol 농도에 따른 total phenolic compounds의 함량을 측정된 결과 Fig. 1D와 같이 ethanol 추출물의 total phenolic compounds 함량이 농도의존적으로 점점 증가하다가 80 %에서 12.50 mg/g으로 가장 높게 측정되었다.

따라서 본 연구에서는 80 % ethanol을 추출 용매로 사용하여 실험을 진행하였고 total phenolic compounds의 용해도와 안정성이 높은 물 추출물도(Yoon 등, 2005) ethanol 추출물과의 비교를 위해 시료 추출물로 사용하였다.

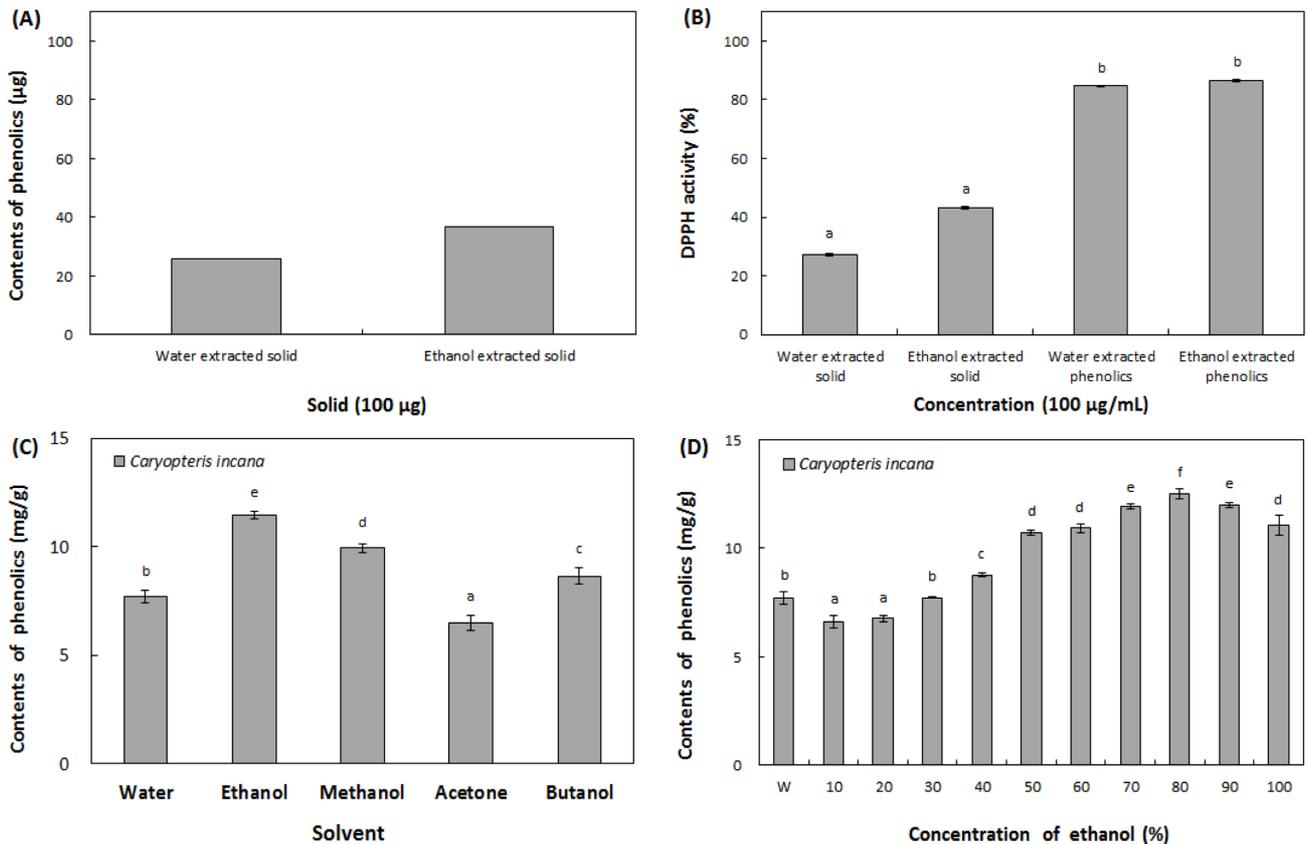


Fig. 1 The effect of extracted in solid (A), DPPH of solid and phenolics (B), various solvents (C), ethanol concentration (D) on extraction of phenolics from *Caryopteris incana* Miq.. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

층꽃나무 추출물의 항산화 효과

DPPH는 산화적 free radical 반응과 연관된 환원성 물질의 분석시약이며 DPPH법은 ascorbic acid, tocopherol, 방향족 아민류, polyhydroxy 방향족 화합물 등 항산화 물질의 전자공여능에 의해 분자가 안정되어 짙은 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 실험이다(Que 등, 2006). 이 원리로 천연물의 수용성 또는 유기용매 추출물의 항산화력을 측정하는 방법으로 DPPH법이 많이 사용되어지고 있다(Kim 2012). 층꽃나무 추출물을 이용하여 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 2A와 같이 물 추출물은 50~200 µg/mL의 농도에서 모두 약 84%의 전자공여능을 나타내었고, 80% ethanol 추출물은 84~92%로 농도의존적으로 증가하였다. Lee 등(2016)은 왕호장근 추출물을 100 µg/mL의 농도로 전자공여능을 측정한 결과 74%의 활성을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때 층꽃나무 추출물이 더 우수한 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. ABTS radical cation decolorization은 수용성 물질의 항산화력을 측정할 때 사용되며, potassium persulfate와 반응하여 생성되는 ABTS+ free radical이 추출물 내 항산화 물질에 의해 소거되어 radical 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용한다(Fellegrini 등, 1999). 층꽃나무 추출물을 이용하여 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 2B와 같이 물과 ethanol 추출물 모두 100~200 µg/mL의 농도에서 90% 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 대조군으로 사용한 BHT보다 더 우수한 효능을 나타내었다. Jeon 등(2015)

이 중국산 녹두 추출물을 이용하여 5,000 µg/mL의 농도로 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 82%의 활성을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때 층꽃나무 추출물이 더 낮은 농도에서 우수한 항산화 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. β-carotene은 지질이 산화되면서 만들어지는 peroxy radical과의 반응으로 불활성물질을 형성하여 free radical에 의한 연쇄 반응을 정지시킨다. 이러한 반응원리를 이용하여 β-carotene과 linoleic acid로 emulsion을 만들어 층꽃나무 추출물의 지용성 물질에 대한 항산화력을 측정하였고(Cho 등, 2006), 통상적으로 antioxidant protection factor 물질에 대한 PF가 1.20 이상이 되면 높은 항산화력을 지닌다고 평가하는데(Kim 등, 2013), 층꽃나무 추출물을 이용하여 PF를 측정한 결과 Fig. 2C와 같이 물과 ethanol 추출물에서 각각 1.56, 1.67 PF를 나타내었다. Duval과 Shetty(2001)가 완두 ethanol 추출물을 이용하여 PF를 측정한 결과 1.10~1.30 PF값이 나왔다고 보고한 것과 비교하였을 때 층꽃나무 추출물의 항산화 활성이 더 높은 것으로 확인하였다. PF와 같이 지용성 물질의 항산화력을 측정할 수 있는 TBARs는 과산화물과 carbonyl 화합물이 결합하여 적색복합체를 생성하는 정색반응으로 지질과산화물인 malonic dialdehyde (MDH)의 함량을 측정한 실험이다(Kim 2008b). 층꽃나무 추출물을 이용하여 TBARs를 측정한 결과 Fig. 2-D와 같이 물과 ethanol 추출물 100~200 µg/mL의 농도에서 각각 60, 80% 이상의 활성을 나타내었다. Kim 등(2014)이 노간주나무 물과

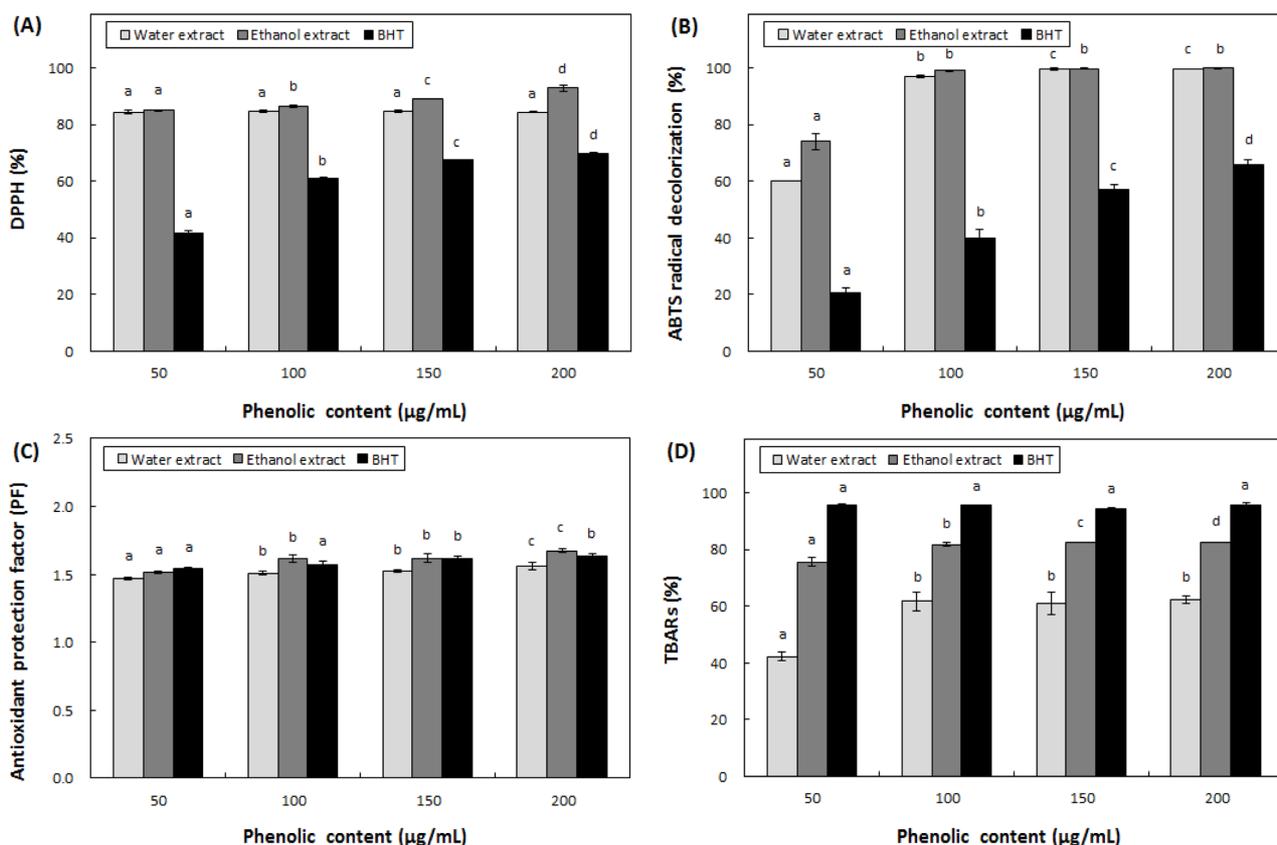


Fig. 2 Antioxidant activity of water and ethanol extracts from *Caryopteris incana* Miq.. (A): DPPH, (B): ABTS, (C): PF, (D): TBARs. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

ethanol 추출물을 500 µg/mL 농도로 항산화력을 측정하는 결과 각각 55, 71%로 층꽃나무 추출물보다 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 층꽃나무 추출물에 함유되어 있는 total phenolic compounds가 높은 항산화 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었고, 천연 산화방지제로서의 활용 가능성도 보여주었다.

Elastase 저해 효과

Elastin은 collagen과 그물망 구조로 결합된 상태로 피부의 진피 조직에 존재한다. Elastase는 피부의 탄력성을 조절하는 기질 단백질인 elastin, fibroectin 및 collagen 등을 분해하고 피부의 그물망 구조 결합을 끊어지게 함으로써 주름을 유발하는 비특이적 효소이다(Kligman 2000). Elastase 저해제로는 대표적으로 ursolic acid가 있으며, 피부 처짐과 주름을 개선시키는 효능을 가진 것으로 잘 알려져 있다(Tsuji 등, 2001). 이러한 주름 유발과 관련된 elastase 저해활성을 측정하는 결과 Fig. 3과 같이 물 추출물에서는 효과가 나타나지 않았으며, ethanol 추출물에서는 200 µg/mL의 농도에서 58%의 elastase 저해활성을 나타내었다. Ethanol 추출물의 경우 대조군으로 사용한 ursolic acid보다 elastase 저해활성이 우수한 것으로 나타났으며, Cho과 Choi (2010)가 감태 열수 추출물의 500 µg/mL 농도에서 elastase 저해활성을 측정하는 결과 38%의 저해활성을 나타내었다고 보고한 것과 Lee 등(2014)가 자귀나무 잎 ethanol 추출물의 300 µg/mL 농도에서 7%의 저해활성을 나타내었다고 보고한 것과

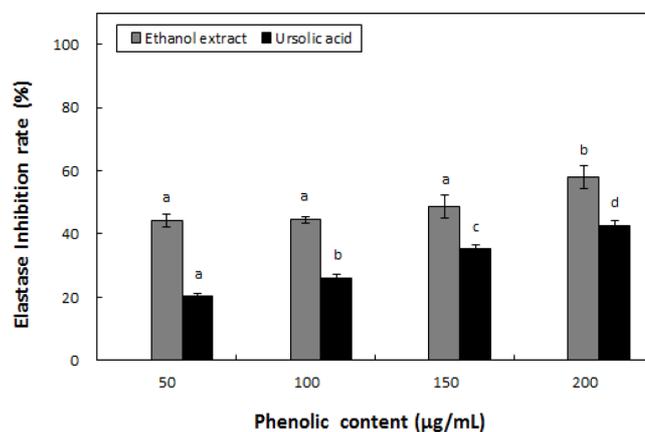


Fig. 3 Inhibitory activity of water and ethanol extracts from *Caryopteris incana* Miq. on elastase. Water extract has not shown activity on elastase. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

비교하였을 때 주름 개선제로서 더 우수한 층꽃나무 ethanol 추출물의 가능성을 확인할 수 있었다.

Collagenase 저해 효과

피부에 주로 존재하는 기질 단백질인 collagen은 피부 진피조직

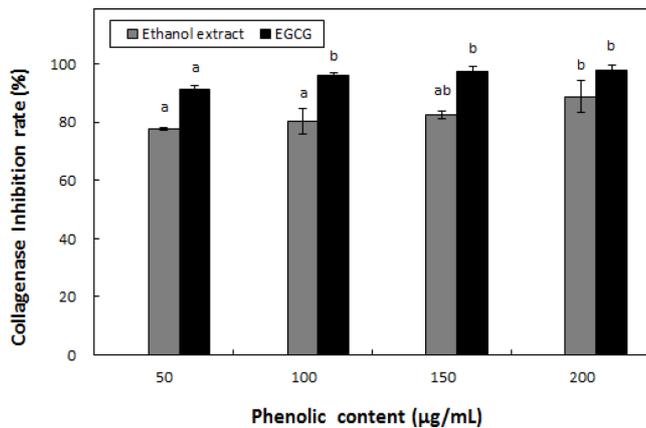


Fig. 4 Inhibitory activity of water and ethanol extracts from *Caryopteris incana* Miq. on collagenase. Water extract has not shown activity on collagenase. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

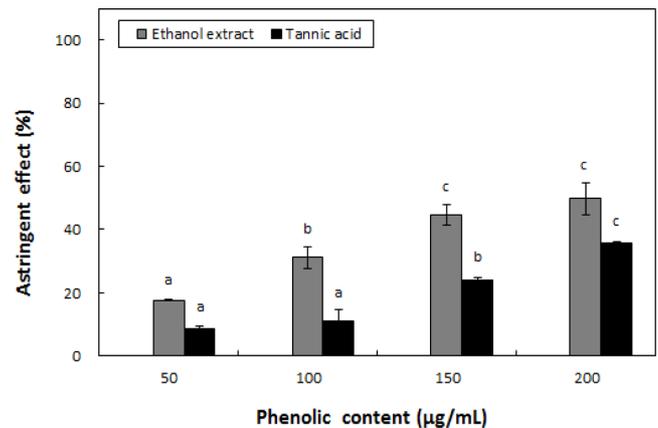


Fig. 6 The astringent effect of water and ethanol extracts from *Caryopteris incana* Miq.. Water extract has not shown activity on astringent effect. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

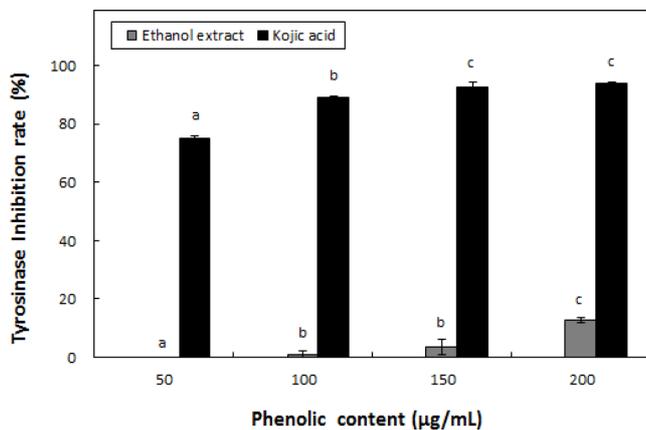


Fig. 5 Inhibitory activity of water and ethanol extracts from *Caryopteris incana* Miq. on tyrosinase. Water extract has not shown activity on tyrosinase. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests ($n=3$)

의 섬유아세포에서 합성되며(Han과 Kang 2008), 피부를 지지하고 견고하게 하는 역할을 한다. Collagenase는 자외선에 의한 ROS (Reactive oxygen species) 및 환경에 의한 스트레스 등 여러 요인에 의해 활성이 증가하고 collagen을 분해하여 주름 생성의 원인이 되는 효소이다(Yu 2013). 층꽃나무 추출물로 collagenase의 저해활성을 측정된 결과 Fig. 4와 같이 물 추출물에서 효과가 나타나지 않았으며, ethanol 추출물에서는 50~200 µg/mL의 농도에서 모두 75% 이상의 collagenase 저해활성을 나타내었다. 특히 200 µg/mL의 농도에서 89%의 우수한 저해활성을 나타내었다. 따라서 Min 등(2004)이 1% 단삼 ethanol 추출물에서 43%의 collagenase 저해활성을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때 층꽃나무 추출물이 더 우수하다는 것을 알 수 있었고, 주름개선제로서의 응용가능성을 확인하였다.

Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 전구물질인 tyrosine을 산화시켜 L-3,4-dihydroxy-

phenylalanine 및 DOPA quinon으로 전환되는 일련의 과정을 거쳐 melanin을 생성하는 중요한 효소이다(Choi 등, 1998). Melanin은 피부의 광노화를 막아주는 역할을 하는 반면, melanin 전구물질 등의 독성으로 인해 주근깨, 기미 및 검버섯 등의 색소침착을 유발시킨다. 따라서 tyrosinase 억제제는 melanin이 생성되는 것을 억제함으로써 피부 미백에 우수한 효과를 가진다(Seo 등, 2003). 층꽃나무 물과 ethanol 추출물로 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 5와 같이 물 추출물에서는 저해활성이 나타나지 않았지만, ethanol 추출물에서는 농도의존적으로 tyrosinase 저해활성이 증가하였고 200 µg/mL의 농도에서 13%의 미백 효과를 나타내었다. Cho 등(2009)이 솔솔, 솔잎의 ethanol 추출물을 4,000 µg/mL 농도로 설정하여 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 각각 15, 7%의 효과를 나타내었다고 보고하여 저농도의 층꽃나무 추출물이 더 높은 저해활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었고, 미백 화장품 원료로서의 활용가능성을 기대할 수 있었다.

Astringent 수렴 효과

수렴의 원리는 피부 단백질이 고분자 flavonoids와 가교결합을 형성함으로 인해 피부가 수축되는 현상이며, 수렴제는 뛰어난 단백질 결합 성질을 가지고 있다. 색소단백질인 hemoglobin을 이용하여 시료와 결합하는 정도를 측정하여 수렴효과를 판단하였다(Roberts와 Sarma 1940). 층꽃나무 물과 ethanol 추출물로 수렴효과를 측정된 결과 Fig. 6에서와 같이 물 추출물에서는 수렴 효과가 나타나지 않았지만, ethanol 추출물에서는 50~200 µg/mL의 농도에서 각각 15~50%의 수렴효과를 나타내어 대조군으로 사용한 tannic acid보다 월등히 우수한 수렴효과를 나타내었다. Lee 등(2002)이 함초 추출물 1,000 µg/mL 농도로 수렴효과를 측정하여 50%의 활성을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때, 저 농도의 층꽃나무 ethanol 추출물이 더 우수한 수렴 효과를 가짐으로 인해 모공축소 효과를 나타낼 수 있을 것이라 판단하였다.

초 록

본 연구에서 층꽃나무(*Caryopteris incana* Miq.)는 항산화, 피부미백 및 주름개선 활성을 측정하는 데에 사용되었다. 층꽃나무의 생리활성은 고형분 함량보다 첨가된 total phenolic compounds의 농도에 의해 영향을 받는 것으로 확인되어 이후 모든 실험은 층꽃나무로부터 추출한 물과 80% ethanol 추출물의 total phenolic compounds 함량을 조절하여 실시하였다. 층꽃나무 추출물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), antioxidant protection factor (PF), Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 측정하였다. 200 µg/mL의 농도에서 물과 ethanol 추출물로 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과 각각 84, 92%의 활성을 나타내었고, ABTS radical 소거능은 물과 ethanol 추출물 둘 다 약 99%의 활성을 나타내었다. PF를 측정한 결과 물과 ethanol 추출물이 각각 1.56, 1.67 PF 값을 나타내었고, TBARS는 각각 62, 82%의 활성을 나타내었다. 주름개선 및 피부미백 활성을 측정하였을 때, 200 µg/mL의 농도에서 80% ethanol 추출물이 물 추출물보다 눈에 띄게 높은 효과를 나타내었다. 주름개선과 연관된 elastase와 collagenase 저해활성은 ethanol 추출물에서 각각 58, 89%로 측정되었다. 피부미백과 연관된 tyrosinase의 저해활성은 ethanol 추출물에서 13%로 측정되었고, 수렴효과는 50%로 측정되었다. 이러한 결과로 보아, 층꽃나무 추출물은 항산화 활성, 주름개선 및 미백 효과가 우수하므로 기능성 화장품 원료의 새로운 자원이 될 것으로 기대되었다.

Keywords 미백효과 · 주름개선 · 총 페놀함량 · 층꽃나무 · 항산화 활성

References

- 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
- Blios MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199–1200
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 302–310
- Cho EK, Choi YJ (2010) Physiological activities of hot water extracts from *Ecklonia cava* Kjellman. *J Life Sci* 20: 1675–1682
- Cho EK, Song HJ, Cho HE, Kim MY, Choi IS, Choi YJ (2009) Inhibitory effects of ethanol extracts from Pine Buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *J Life Sci* 19: 1629–1636
- Cho YJ, Chun SS, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, An BJ, Kim MU (2006) Screening of the antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant by extracts from mulberry fruits (*Morus alba* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 15–20
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH (1998) Screening of the Tyrosinase Inhibitors from Marine Algae and Medicinal Plants. *Korean J Pharmacogn* 29: 237–242
- Duval B, Shetty K (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J Food Biochem* 25: 361–377
- Fellegriani N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379–389
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–249
- Gao J, Igalashi K, Nukina M (1999) Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 983–988
- Gao J, Igarashi K, Nukina M (2000) Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chem Pharm Bull* 48: 1075–1078
- Han CJ, Kang SM (2008) The effect of collagen supplementation from pork skin on serum collagen, serum sex steroid hormone, serum lipid and skin crack in Korean middle-aged women. *Korean J Community Nutr* 13: 912–921
- Han HM (2009) Change of antioxidant activity of wheat flour dough with the addition of phenolic compounds at the different baking process. Dissertation, University of Keimyung
- Ha SH, Ha ES, Oh YS, Jeong MH, Kim Seoul, Seo HM (2014) A composition for antioxidating, whitening and improving wrinkle comprising extracts of nursery spiraea. KOR Patent 1020140187919
- Hearing VJ Jr (1987) Mammalian monophenol monooxygenase(Tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol* 142: 154–165
- Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J Invest Dermatol* 95: 9–15
- James AEK, Timothy DWC, Gorden L (1996) Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem J* 35: 9090–9096
- Jeon KS, Xu YL, Park SI (2015) Antioxidant activity of Chinese mung bean. *Korean J Culinary Research* 21: 41–51
- Joo SY (2013) Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 512–519
- Kim JH, Lee SY, Park JM, Park JH, Kwon OJ, Lee JY (2014) Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Juniperus rigida* Sieb extracts. *Korean J Food Preserv* 21: 396–403
- Kim JS, Lee JY, Park KT, An BJ, Lee SH, Cho YJ (2013) The biological activity from *Prumella vulgaris* extracts. *Korean J Food Preserv* 20: 234–241
- Kim MH (2012) Antioxidative anti-inflammatory effects of rice bran extracts and its cosmetic application. Dissertation, University of Nambu
- Kim SM (2008a) Composition and Cell Cytotoxicity of Essential Oil from *Caryopteris incana* Miq. in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 238–244
- Kim SS (2008b) Antioxidative Effects of solvent extracts of *Sea tangle* powder and *Maejagwa* made with *sea tangle* powder. Dissertation, University of Mokpo
- Kligman D (2000) Cosmeveuticals. *Am J Clin Dermatol* 18: 609–615
- Lee DH, Ha HY, Lee PJ (2016) Antioxidant activity and tyrosinase inhibitory effects of *Fallopia sachalinensis* rhizome ethanol extract. *J Invest Cosmetol* 12: 15–20
- Lee JT, Jeong YS, An BJ (2002) Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J Herbology* 17: 51–60
- Lee YS, Kim BO, Kim NW (2014) Anti-wrinkle and antioxidant activity of the extract of *Albizia julibrissin* leaves. *J Invest Cosmetol* 10: 317–326
- Min EG, Kim YH, Kum SI, Han YH (2004) Inhibition of growth and collagenase activity of the extract from *Salvia miltiorrhiza* against microorganisms causing periodontal diseases. *Korean J Microbiol* 40: 111–114
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nunez JM, Parajo JC (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72: 145–171
- Nam JH (2004) Analysis of phenolic compounds and antioxidant activities of water extracts from *Zizypus jujuba*. Dissertation, University of

Keimyung

- Pyo YH, Yoon MY, Son JH, Choe TB (2008) The effect of *Celosia cristata* L. ethanol extract on anti-oxidant & anti-aging. Korean J Biotechnol Bioeng 23: 431–438
- Que F, Mao L, Zhu C, Xie G (2006) Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. LWT Food Sci Technol 39: 111–117
- Roberts EA, Sarma SN (1940) Tannins as hydrogen carriers in biological oxidation. Biochem J 34: 1517–1523
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N (2003) Mushroom tyrosinase: Recent prospects. J Agric Food Chem 51: 2837–2853
- Shim JS, Kim SD, Kim TS, Kim KN (2005) Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. Korean J Food Sci Technol 37: 78–83
- Tsuji N, S Moriwaki, Y Suzuki, Y Takema, G Imokawa (2001) The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation: Implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem Photobiol 74: 283–290
- Wunsch E, Heidrich HG (1963) Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. Hoppe-Seyler's Z Physiol chem 333: 149–151
- Yoon SJ, Kim JH, Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Cho YJ (2005) Antimicrobial effects and antioxidative activity of Baek-bu-ja (*Aconiti koreani Rhizoma*) by extraction solvent ratio. J Korean Soc Appl Biol Chem 48: 258–262
- Yu HS (2013) Effect of ethanol extract of *Rosa rugosa* Thunb. on hypopigmentation and antioxidant activity. Dissertation, University of Wonkwang