

삼칠화 에탄올 추출물의 항산화, 항염증 활성 및 여드름 피부에 미치는 영향

김송이^a · 리순화^{b†}

건국대학교 산업대학원 화장품학과^a·건국대학교 교육대학원 미용교육^{b†}
(2018년 1월 20일 접수: 2018년 2월 10일 수정: 2018년 2월 24일 채택)

Effects of *Panax Notoginseng Flos* extract on Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Acne skin

Song-Yi Kim^a · Shun-Hua Li^{a†}

^aDepartment of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

^{b†}Department of Education Theory of Cosmetology, Graduate School of Education,
Konkuk University, 120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

(Received January 20, 2018; Revised February 10, 2018; Accepted February 24, 2018)

요약 : 본 연구에서는 삼칠화 에탄올 추출물의 항산화 및 피부 세포 독성, 항염증을 확인하고, 삼칠화 함유 화장품을 여드름 피부에 적용하여 수분, 홍반, 모공, 블랙헤드에 미치는 영향을 분석하여 화장품 소재로서의 가능성을 규명하고자 하였다. 연구 결과, 삼칠화 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 확인하였고, 높은 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 나타내었다. 삼칠화 에탄올 추출물은 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 적었고, LPS에 의해 유도된 NO 생성을 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 4주간 삼칠화 에탄올 추출물이 3% 함유된 스킨 토너와 스팟 솔루션을 여드름 피부에 적용한 결과, 수분 증가와 홍반지수, 눈에 띄는 모공수, 블랙헤드 감소가 유의하게 나타났고, 사용 후 만족도 조사에서 피지량 감소, 붉음증 완화에 대한 만족도가 높은 것을 확인하였다. 따라서 삼칠화는 항산화 및 항염증 효과가 있으며, 여드름 관리용 화장품 소재로서 활용 가능할 것으로 사료된다.

주제어 : 삼칠화, 항산화, 항염증, 여드름, 화장품

Abstract : The purpose of this study is to observe how *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract has anti-oxidant activity, cytotoxicity for skin cells, and anti-inflammatory effects and Cosmetics *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract was applied to acne skin to analyze moisture, erythema, pores, and blackberries to identify potential as cosmetics material .According to the analysis, *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract was found to have high contents of polyphenols and flavonoids

†Corresponding author
(E-mail:

and excellent DPPH radical scavenging activity. The extract had no significant cytotoxicity for Raw 264.7 cell and significantly inhibited the creation of NO induced LPS in Raw 264.7 cell so as to present anti-inflammatory effect. After applying an *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract of 3% skin toner and spot Solutions to the skin of the skin of the acne for 3 weeks, Increased skin moisture, erythema, pores, black head count were found to be statistically significant, and reduced red spots were found in skin condition questions following management. Given the results, it is considered that *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract is applicable as the ingredient of a functional cosmetic product that has low cytotoxicity for skin cells, high anti-oxidant activity, anti-inflammatory effect, and acne improvement effect.

Keywords : *Notoginseng Flos*, *Anti-oxidant effect*, *Anti-inflammatory*, *Acne*, *Cosmetics*

1. 서론

여드름(Acne)은 모낭지선부(毛囊脂腺部) 단위의 염증성 질환으로 여드름의 발생기전은 androgen이 피지 분비를 촉진하고 *Propionibacterium acnes* (P. acnes)가 피지를 triglyceride와 유리 지방산으로 가수분해하면서 염증이 일어나게 되고 모공이 두꺼운 각질로 채워져 그 결과 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 발생하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 여드름은 모낭 내 상주하는 P. acnes에 의한 생리적 요인(physiological elements), 스트레스 등의 심리적 요인(psychological elements), 모낭관 출구의 폐쇄에 의한 물리적 요인(physical elements), androgen과 estrogen 분비의 증대가 피지선 기능 항진 또는 표피 각화를 촉진시켜 면포를 형성하는 내분비 요인(hormonal elements) 및 유전적 소인 등 다양한 주요 인자가 복합적으로 작용하여 발생한다[3-7]. 특히 여드름의 발생원인 중 피부의 염증 반응과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 염증 반응에서 대식 세포는 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 Nitric Oxide (NO)를 생성하고, 과도하게 생성된 NO는 조직 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시키게 된다. 이때 염증 반응에서 생성되는 물질 중 NO, PGE₂와 같은 물질의 생성을 억제하여 염증 반응에 의한 여드름 증상을 개선시킬 수 있는 측면에서 유효 성분이 개발되고 있다[8-11].

여드름 치료는 주로 모공 내 비후된 각질을 제거 하거나 여드름을 짜는 물리적 방법, 피지선의

활동 및 염증 반응을 억제하는 항생제 의존 약물 방법이 있지만[12], 피부 홍반, 내성균주 발생의 증가, 소양증, 작열감, 호르몬 부작용 등의 많은 문제점들이 야기 되고 있다[13]. 이와 관련하여 합성 물질에 대한 독성과 부작용들이 보고되고 있으며, 이러한 문제점을 극복하기 위해 피부에 자극이 적은 천연 물질이나 단일 화합물을 이용한 염증 유도 물질 억제 효과와 여드름 피부에 효과적인 유용 물질의 연구가 진행되고 있으며 [14-16], 국내에서도 염증 생성 억제 및 여드름 피부 개선에 효과적인 천연 화장품 개발 연구가 활발히 진행되고 있다[17,18].

본 연구의 실험 소재인 삼칠화(三七花, *Panax Notoginseng Flos*)는 삼칠의 꽃으로, 삼칠에서 사포닌 함량이 제일 많은 부위이며, 예로부터 청열(淸熱), 해독, 평간(平肝), 명목(明目), 진정, 혈압 하강, 피부 부스럼 개선, 인후염에 차로 음용하거나 약선(藥膳)으로 이용하였다. 삼칠화 80% methanol 추출물은 항산화 효과 및 대식 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO와 염증성 사이토카인 생성 억제 효과가 있어 창상 등 피부 손상 치료에 효과가 있을 것이라고 보고되어 있다[19]. 삼칠의 뿌리인 삼칠근의 saponin 성분 분석에 대한 연구[20], 대장암 항암 효과에 대한 연구[21] 등 약리작용에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나 삼칠화 에탄올 추출물에 대한 다양한 생리활성 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 삼칠화를 50% 에탄올로 추출하여 항산화 활성과 RAW 264.7 세포에서의 세포 독성, 염증 억제 효과를 평가하였고, 삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 화장품을 여드름 피부에 적용하여 피부 유분, 수분, 모공, 멜라닌, 홍반에

미치는 효과를 평가함으로써 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 실험

2.1. in vitro 실험 방법

2.1.1. 시료 준비 및 사용 시약

본 실험에 사용된 삼칠화는 2016년 8월 중국 사천 고산 지역에서 수확하여 건조한 것을 사천 중약점(China)에서 구입하였다. 삼칠화 에탄올 추출물을 제조하기 위하여 시료 100 g에 50% 에탄올을 20 배로 가하여 37°C, 100 rpm 인큐베이터 안에서 72 h 동안 추출하였다. 추출액만을 분리하기 위하여 원심분리한 후 여과하였고, 추출용매인 에탄올을 제거하기 위하여 감압농축기로 농축한 후 72 h 동안 동결건조하여 본 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), neutral red (NR) solution, NR desorb solution, caffeic acid, quercetin, ascorbic acid, griess reagent, aluminium nitrate, potassium acetate, sodium phosphate buffer, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic, lipopolysaccharide (LPS), formaldehyde, phosphate buffered saline solution (PBS)를 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Synergy-HT, Bio-Tek Instruments, USA)를 사용하였고, 세포 배양을 위하여 CO₂ incubator (Sanyo Electric Co., Japan), 원심 분리기(Hanil science industrial co.,Ltd, SUPRA25K, Korea), 시료 추출용 인큐베이터 (Jeio Tech, Korea), 감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai, Japan), 동결 건조기(IiShin, Korea)를 사용하였다.

2.1.2. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, DMEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic를 첨가하여, 37°C로 유지되는 5% CO₂ 상대습도 100% 습윤 배양기에서 배양하였다.

2.1.3. 항산화 효과 측정

가. Total phenolic compounds 함량 측정

삼칠화 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin & Denis (1912) 방법을 수정하여, Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되면 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다[22]. 시료의 최종 농도가 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 에탄올에 희석한 후 시료 400 μ L와 Folin-Denis reagent 400 μ L를 혼합하여, 3 min 동안 반응시킨 뒤, 10% Na₂CO₃ 400 μ L를 혼합하여, 암실에서 60 min 반응시킨 후 96 well plate에 상등액 200 μ L를 취하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Caffeic acid를 사용하였다.

나. Total flavonoid 함량 측정

삼칠화 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno *et al.* (2000) 방법을 이용하여 측정하였다[23]. 시료 최종 농도가 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 에탄올에 희석한 후 시료 100 μ L 와 1M potassium acetate 20 μ L, 10% aluminum nitrate 20 μ L, ethanol 860 μ L를 차례로 혼합하여, 실온에서 40 min 방치 후 부유물을 원심분리기로 가라앉힌 후 96 well plate에 200 μ L씩 취하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하였다.

다. DPPH radical 소거능 측정

삼칠화 에탄올 추출물의 radical 소거활성은 Blois (Blois MS, 1958) 방법을 이용하여, DPPH에 대한 수소공여 효과를 측정하였다[24]. 시료의 최종 농도가 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL이 되도록 에탄올에 희석한 후 96 well plate에서 ethanol에 녹인 10 mM DPPH 용액 180 μ L와 시료액 20 μ L를 혼합하여, 30 min 동안 37° C 인큐베이터 안에서 반응시켰으며, 반응 후 microplate reader를 이용하여, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%)=

$$100 - \left[\left(\frac{\text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{시료 무첨가군 흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

2.1.4. Neutral Red (NR) assay를 이용한 세포 독성 측정

NR assay를 이용하여 삼칠화 에탄올 추출물이 세포 독성에 미치는 영향을 측정하였다[25]. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고, 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 부착시켰다. 세포 부착 확인 후 무혈청 배지에 시료를 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 희석하여 각 well plate에 처리하고 48 h 배양하였다. 세포 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여, 3 h 배양한 다음 PBS에 희석한 10% formaldehyde 용액을 각 well에 100 µL씩 분주하여 20 min 동안 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 µL씩 분주하여 세포내의 neutral red를 추출하였다. microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였으며, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

세포 생존율(%)=

$$\frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.1.5. Nitric Oxide (NO) 생성 저해능 측정

삼칠화 에탄올 추출물의 NO 생성 저해능을 측정하기 위하여 NO양을 nitrite (NO₂⁻)와 nitrate (NO₃⁻) 형태로 측정하였다[26]. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 24 h 동안 37°C에서 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, LPS (lipopolysaccharide) 1 µg/mL 농도로 처리된 배지에 삼칠화 에탄올 추출물을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도별로 가하여 48 h 동안 배양하였다. 새로운 96 well plate에 배양된 세포 배양 상층액 100 µL와 Griess reagent 100 µL를 가하여 차광된 상태에서 10 min 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 저해능(%)=100 -

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{LPS의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.2. in vivo 실험 방법

2.2.1. 실험 기간 및 실험 대상 선정

본 연구는 서울 지역에 거주하고 최근 한 달간 병원 치료를 받고 있지 않는, 10-30대 여드름 고객을 대상으로, 2016년 9월 11일부터 10월 9일까지 4주간 임상연구를 하였다. 남성(6명), 여성(12명) 총 18명을 선정하여, 무작위로 대조군(9명)과 실험군(9명) 두 그룹으로 나누어 진행하였다. 본 임상 연구는 연구 대상자로부터 사전 동의를 얻어 건국대학교 기관 생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받고 심의결과 통보서 승인과제번호 7001355-201609-HR-133을 받아 진행하였다.

2.2.2. 삼칠화 에탄올 추출물 함유 화장품 제조 방법

Table 1과 같이 삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 스킨 토너(3%, pH 6.0 ± 0.65)와 반투명 액상의 스팟 솔루션(3%, pH 6.2 ± 0.38)을 제조하였다. 두 제품 모두 수상인 A상과 유상인 B상을 측량한 후 70°C 이상으로 가열하여 모든 성분이 용해시킨 후 A상과 B상을 혼합하여, 10 min 동안 3,000 rpm에서 유회하였다. 온도를 50°C로 떨어뜨린 후 스킨 토너에는 C, D, E상을 순서대로 첨가하였으며, 스팟 솔루션은 C상을 첨가하여 5 min 동안 50°C 조건에서 교반 후 밀봉하여 24 h 동안 숙성시킨 다음 본 실험에 사용하였다. 기타 필요한 홈케어용 제품과 클렌징, 크림, 자외선 차단제는 S사(Korea) 제품을 동일하게 사용하였다.

2.2.2. 피부 자극도 시험

삼칠화 에탄올 추출물을 함유한 화장품의 안정성 평가는 피부 질환 및 과민 반응이 없는 10-30대 남녀 18명을 대상으로 인체 폐쇄 철폐 시험(Closed patch test)을 통하여 피부 자극도 시험을 실시하였다. 피험자의 상완 안쪽에 0.5 mL 스킨 토너와 스팟 솔루션을 도포한 후 Finn Chamber (Epitest®, Tuusula, Finland)가 부착된 테이프를 부착하여 48 h 동안 밀폐 철폐한 후와 철폐 제거 후 2 h 후의 피부 반응을 육안으로 확인하였으며, 연구 대상자 모두 이상 반응이 없는 것을 확인하고 임상 실험을 진행하였다. 판정기준은 국제 접촉 피부염 연구회의 판정기준을 적용하였다(Table 2).

Table 1. Skin toner and spot solution manufacturing content

No.	Material name	Skin toner		Material name	Spot solution	
		Control	PNF		Control	PNF
A	Distilled Water	64.0	61.0	Distilled Water	38.0	35.0
	Aloe vera water	10.0	10.0	Ethanol	15.0	15.0
	Glycerin	10.0	10.0	Poloxamer 188	3.0	3.0
	Na-hyaluronic acid	5.0	5.0	Tween 80	2.0	2.0
	Beta-glucan	2.0	2.0	Span 20	2.0	2.0
				Menthol	0.3	0.3
				Genistein	0.3	0.3
				EDTA-2Na	0.1	0.1
B	1,3 Butylene glycol	0.5	0.5	Glycerin	20.0	20.0
	Tween 80	0.3	0.3	1,3 Butylene glycol	10.0	10.0
	Span 20	0.3	0.3	Grape seed oil	3.0	3.0
	Tocopheryl acetate	0.1	0.1	Chamaecyparis obtusa Essential oil	0.3	0.3
	Menthol	0.1	0.1			
	Salicylic acid	0.1	0.1			
	EDTA-2Na	0.1	0.1			
	NaOH(1N)	3.0	3.0			
C	95% Ethanol	3.0	3.0	Xanthangum	1.0	1.0
	PNF	0.0	3.0	NaOH	5.0	5.0
				PNFE	0	3.0
D	Caprylyl glycol	0.1	0.1			
	Phenoxyethanol	0.3	0.3			
	Chamaecyparis obtusa Essential oil	0.1	0.1			
E	Xanthangum	1.0	1.0			
	Total	100.0	100.0	Total	100.0	100.0

A) Control : no add *Panax Notoginseng Flos* Ethanol ExtractB) PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract

Table 2. A criterion of patch test

Signature	Criteria for judging
-	Negative
±	A slight erythema
+	Erythema, edema
++	Erythema, edema, papule, vesicle
+++	Big blister, necrosis

2.2.3. 피부 측정 방법

실험 전 연구 대상자에게 동질성 검사와 설문 을 통해 대조군과 실험군으로 나누어 진행하였다. 실험군은 삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 스킨 토너와 스팟 솔루션 세럼형 화장품, 대조군은 삼칠화가 미 함유된 화장품을 아침, 저녁 2회/일, 총 4주간 피부에 적용하였다. 세안, 화장품 사용 방법, 주의 사항 등의 홈 케어 교육 프로그램을 2회 실시한 후, 김민희(2015)의 선행 연구[27]를 바탕으로 유·수분량, 홍반 및 멜라닌 수치, 모공 수 변화량을 0주, 4주 총 2회 측정하였고, 연구 대상자의 실험 후 사용 만족도(7문항)를 조사하였다.

본 연구에 사용된 임상 기기는 모두 비침습적 방법으로 전안 촬영 시스템 RSA (Robo Skin Analyzer CS 50, Inforward, inc., Japan)을 사용하여 안면 피부의 모공수를 측정하였고, Mexameter stand alone® Mx 18 (Courage-Kazaka Electronic, Gemany)을 이용하여 피부 표면의 멜라닌 지수(Melanin index)와 홍반 지수(Erythema index)를 측정하였다. 피부의 수분량은 Corneometer® CM 825 (C.K electronic, Germany)를 이용하였고, 유분량은 Sebumeter® SM 810 (C.K electronic, Germany)을 이용하여 측정하였다. 측정 부위는 눈동자 중앙에서 수직 아래 코끝과 일직선이 되는 부분에 동일한 압력으로 왼쪽 볼과 오른쪽 볼을 측정하였고, T존은 미간 중앙 1 cm 위 이마 부분과 코끝 부분을 동일하게 측정하였다. 본 임상 실험에서는 측정 오차를 최소화하기 위하여 모든 연구 대상자의 안면을 3회 반복 측정한 후 평균값을 사용하였다.

2.2.5. 통계 분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 대상자의 제품 사용 후 만족도는 기술통계(Descriptive statistics)를 실시하였다. 실험군과 대조군의 동질성 검증을 위해 비모수 통계 방법인 Mann-Whitney 검증을 하였으며, 각 군별 실험 전·후 변화를 알아보기 위하여 대응표본 T-test (Paired t-test)를, 그룹 간 비교는 독립표본 T-test (Independent t-test)를 실시하였고, 유의성을 검증하였다. 본 연구 실증분석은 유의확률 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 으로 표시하였고 측정된 자료는 SPSS Window Ver. 20.0 (Statistical Package for Social Science, Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 실험 결과

3.1.1. 총 폴리페놀 함량 변화

페놀성 화합물은 2차 대사 산물중의 하나로서 식물체에 널리 분포되어 있는데, phenolic hydroxyl기(-OH)가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항염, 항암 및 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[28]. 본 실험에서는 삼칠화 에탄올 추출물이 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도에서의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(Fig. 1). 실험 결과, 삼칠화 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 25, 55, 67, 79 mg/g으로 농도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량이 증가하는 것을 확인하였다. Halliwell *et al.*,와 Imai *et al.*,의 연구[29,30]에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높을수록 항산화 활성간의 상관관계가 있음이 보고되고 있으며, 본 연구에서도 삼칠화 에탄올 추출물의 농도가 높아질수록 총 폴리페놀 함량에 따른 항산화 활성이 높게 나타난 것으로 사료된다.

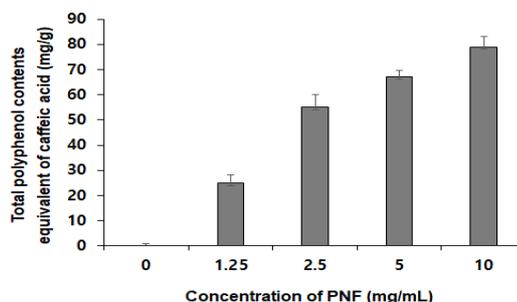


Fig. 1. Total polyphenol content of PNF extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

3.1.2. 총 플라보노이드 함량 변화

삼칠화 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도에서 12, 20, 30, 57 mg/g의 높은 플라보노이드 함량을 확인하였다(Fig. 2). Aydos (2011)의 연구에서 페놀화합물의 일종인 플라보노이드가 산화를 억제시킨다고 보고되어 있다[31]. 이는 삼칠화

에탄올 추출물이 가지고 있는 높은 플라보노이드의 함량이 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

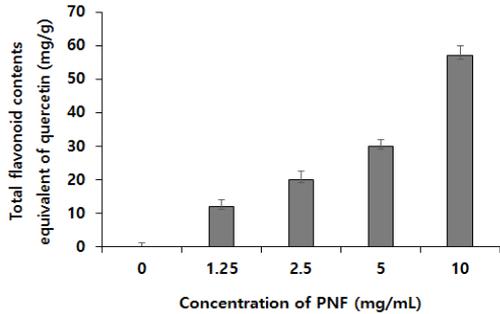


Fig. 2. Total flavonoid content of PNF extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

3.1.3. DPPH radical 소거능

DPPH radical은 매우 안정한 활성산소(reactive oxygen species)이며, 대조군과의 결과 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 기능성 식물이나 약용 추출물 시료의 항산화 활성 측정에 일반적으로 사용되어 지고 있다[32,33]. 본 연구에서도 삼칠화 에탄올 추출물의 농도별 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다(Fig. 3). 실험 결과, 양성 대조군으로 사용된 vitamin C는 1.25 mg/mL의 농도에서 54%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었

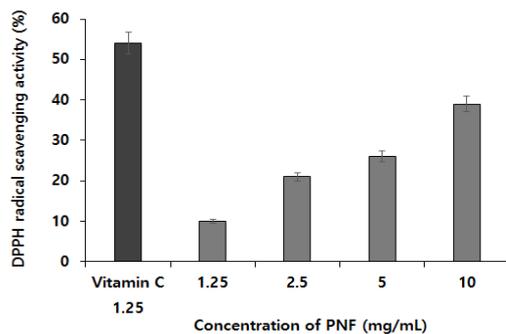


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of PNF extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

고, 삼칠화 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, 최고 농도인 10 mg/mL에서 39%의 DPPH radical 소거능을 확인하였다.

3.2. 항염증 효과

3.2.1. RAW 264.7 세포 독성 측정

삼칠화 에탄올 추출물에서 RAW 264.7 대식세포의 생존율을 확인하기 위하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도를 사용하여 NR assay를 실시하였다(Fig. 4). 본 실험 결과, 100 μ g/mL 농도까지 86% 이상의 세포 생존율이 확인되었으며, 200 μ g/mL 농도에서 세포 생존율이 23%로 줄어들음을 확인하였다. 선행 연구에서 삼칠근 메탄올 추출물은 최고 농도 100 μ g/mL에서 모두 80% 이상의 세포 생존율을 나타냈는데[34], 이는 본 실험에서 진행한 삼칠화 에탄올 추출물과 삼칠근의 세포 독성 실험과 유사함을 알 수 있었다. 본 실험에서 100 μ g/mL 농도까지 세포에 대한 독성이 없음이 확인되어, 추후 실험에서는 최고 농도 100 μ g/mL 농도로 실험을 진행하였다.

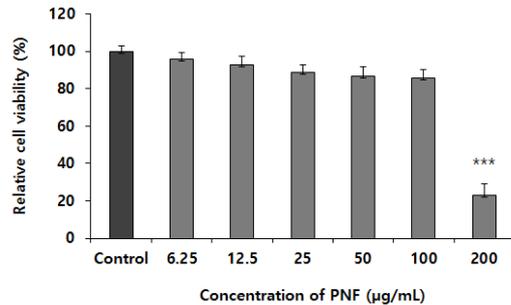


Fig 4. Effects of PNF extract on cell viability in RAW264.7 cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

3.2.2. RAW 264.7 세포에 대한 Nitric oxide 생성 억제능 측정

삼칠화 에탄올 추출물이 염증유발 물질로 알려진 NO 생성 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 삼칠화 에탄올 추출물 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL을 처리하여 NO 생성 억제능을 측정하였다(Fig. 5). 본 실험

결과 삼칠화 에탄올 추출물은 LPS 처리군에 비하여 모든 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제하였고, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 35%의 NO 생성 억제 효과가 확인되었으며, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각 48%, 58%의 높은 NO 생성 억제 효과가 확인되었다. 정기훈(2013)의 연구[34]에서는 삼칠근 추출물이 LPS에 의해 자극받은 RAW 264.7 세포의 NO 생성량을 유의하게 감소시킨다고 보고하였다. 이는 삼칠화 추출물과 삼칠근 추출물이 염증과 관련된 매커니즘에 관여하는 것으로 사료된다.

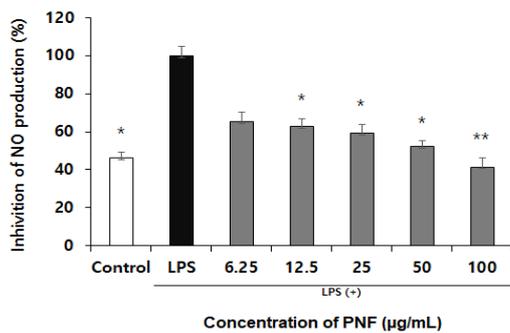


Fig 5. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cell treated with PNF extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

3.3. in vivo 실험을 통한 피부 상태 변화 측정

3.3.1. 연구대상자의 실험 전 동질성 검증

본 연구 대상자의 피부 특성에 대해 대조군과 실험군의 동질성을 확인하기 위하여, 독립표본 t 검정(independent t-test)을 한 결과, 두 그룹은 멜라닌, 홍반, 유분 및 수분, 모공수 모든 항목에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아 두 그룹의 동질성이 입증되었다(Table 3).

3.3.2. 대조군과 실험군의 실험 전·후 효과 비교

삼칠화 에탄올 추출물이 첨가된 화장품 제형의 안전성을 확인하고자 인체 폐쇄 칩포 시험을 진행하였으며 피부에서 이상 반응을 나타내는 지원자는 확인되지 않았고 제품에 대한 안전성이 확인 되어 피부 적용 실험을 진행하였다. 삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 제품을 사용하였을 때 피부에 미치는 변화를 확인한 결과(Table 4), 실험군에서 피부 수분량은 47.05 \pm 8.74에서 53.62 \pm 10.51으로 14%의 피부 수분 함량이 통계적으로 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), 유분 함량은 17.11 \pm 11.20에서 15.56 \pm 11.92으로 6 주 후 9.1% 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$) 피부 홍반 변화량이 통계적으로 유의하게 감소하였고 ($p < 0.05$) 눈에 띄는 모공수($p < 0.01$)와 블랙헤드 모공수($p < 0.05$)가 통계적으로 유의하게 감소하였으며 멜라닌은 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 대조군의 경우 모든 항목에서 통계적으로 유의하지는 않은 것으로 확인되었다.

Table 3. Verification of pre-experimental skin homogeneity

Item	Control	PNF	t(p)
	M \pm SD		
Melanin	190.78 \pm 56.60	195.67 \pm 36.54	0.218(0.830)
Erythrospia	363.33 \pm 82.61	380.17 \pm 64.37	0.482(0.636)
Oily	13.06 \pm 9.93	17.11 \pm 11.20	0.812(0.429)
Moisture	41.19 \pm 4.89	47.05 \pm 8.74	1.755(0.098)
Pores	601.22 \pm 281.05	608.44 \pm 356.99	0.048(0.963)
Black head	215.56 \pm 147.94	245.67 \pm 212.70	0.349(0.732)

PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

Table 4. Comparison of skin changes between controls and PNF

Item		Before	After	t(p)
		M ± SD		
Moisture	Control	41.19 ± 4.89	45.04 ± 6.73	-2.162(0.063)
	PNFE	47.05 ± 8.74	53.62 ± 10.51	-3.098(0.015*)
Oily	Control	13.06 ± 9.93	14.58 ± 5.29	-0.674(0.519)
	PNFE	17.11 ± 11.20	15.56 ± 11.92	2.634 0.030*
Erythrospia	Control	363.33 ± 82.61	368.31 ± 92.61	-0.479(0.645)
	PNFE	380.17 ± 64.37	359.39 ± 67.32	3.223 0.012*
Melanin	Control	190.78 ± 56.6	192.78 ± 62.29	-0.425(0.682)
	PNFE	195.67 ± 36.54	196.28 ± 35.18	-0.313(0.762)
Pores	Control	601.22 ± 281.05	696.67 ± 374.22	-2.440(0.041)
	PNFE	608.44 ± 356.99	499.33 ± 311.89	4.220(0.003**)
Black head	Control	215.56 ± 147.94	257.78 ± 213.29	-1.758(0.117)
	PNFE	245.67 ± 212.70	184.78 ± 162.92	3.006(0.017*)

PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

Table 5. Comparison of satisfaction with usage between groups after use

Effect	Control	PNF
	M ± SD	
Acne improvement effect	3.89 ± 0.78	3.89 ± 0.60
The skin has decreased in size	3.56 ± 0.73	4.11 ± 0.60
The skin has lost its red spots	3.33 ± 0.87	3.78 ± 0.97
The skin has lost its pigmentation	3.44 ± 0.53	3.44 ± 0.73
The skin has become moisturized	3.33 ± 0.71	2.44 ± 1.13
The tone of my skin has cleared	4.00 ± 0.50	3.56 ± 0.53
It was good to use	3.42 ± 0.63	3.56 ± 0.87

PNF : *Panax Notoginseng Flos* Ethanol Extract.

3.3.3. 그룹 간 제품 사용 후 만족도 비교

삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 화장품을 사용 후 사용 만족도를 조사한 결과(Table 5), 여드름 변화, 멜라닌, 피부 톤 변화에서 두 그룹간 육안적으로 관찰 시 큰 차이가 없는 것으로 나타났고, '피부의 피지분비량이 줄어들었다', '피부의 붉음증이 줄어들었다'에서 실험군이 대조군보다 효과가 있는 것으로 조사되었다. '피부의 보습력이 좋아졌다.'에서는 대조군이 실험군보다 더 높게 나타나 실험군의 피지분비량 감소로 인한 피부는 킁으로 사료된다. 이와 같은 결과는 삼칠화 에탄올 추출물이 함유된 화장품의 경우 피지 분비 억제로 인한 효과로 실험군에서 사용감이 높은 것

으로 확인되었다.

4. 결론

본 연구는 삼칠화 에탄올 추출물을 이용하여 항산화, 세포 독성, 항염증 실험을 수행하였고, 이를 토대로 삼칠화 에탄올 추출물이 3% 함유된 스킨 토너와 스팟 솔루션을 여드름 피부에 4주 적용하여 여드름 개선 효과를 확인하였다. in vitro 실험을 통하여 삼칠화 에탄올 추출물의 10 mg/mL에서 39% DPPH radical 소거능을 확인하였고, 10 mg/mL 농도에서 79 mg/g의 높은

폴리페놀 함량을 나타내었으며 10 mg/mL 농도에서 57 mg/g의 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 따라서 삼칠화가 가지고 있는 폴리페놀, 플라보노이드의 함량이 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로, 화장품 제재로서 사용 가능할 것으로 사료된다. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 확인하고자 NR assay를 진행한 결과, 삼칠화 에탄올 추출물은 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 86% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 생존률이 23% 줄어듦을 확인하였다. RAW 264.7 세포에 대한 항염증 실험결과, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 모든 농도에서 LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제 효과가 확인되었으며, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 56.43% 감소시켰고, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 80%의 높은 NO 생성 억제율을 나타내었다($p < 0.05$). 여드름 피부에 4주간 적용하여 피부 개선 효과를 측정 한 결과, 대조군에서 피부 수분, 유분, 홍반, 멜라닌, 모공 수는 시험 전·후 차이가 유의하지 않은 것으로 확인되었으며, 스킨 토너와 스팟 솔루션을 적용한 실험군에서 멜라닌은 시험 전·후 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 수분은 유의하게 증가하였고, 홍반, 유분, 모공수는 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 화장품 사용 후 만족도 설문 평가에서 실험군이 대조군 보다 '피지분비량이 더 줄어들었다', '피부 붉음증이 더 줄어들었다'로 만족도가 높은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 통하여 천연 유래 소재이며 일상에서 응용차로 이용되고 있는 삼칠화가 여드름 피부 염증 개선을 위한 화장품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료되어 진다. 본 연구를 바탕으로 향후 연구 대상을 추가하고 적용 시간을 길게 하여 다양한 피부 타입에 대한 적용 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

1. N. I. Kim, "A Study on Plasma Levels of Testosterone and Dehydroepian drosterone sulfate (DHEA-S) in the Patients with Acne Vulgaris", *Korean journal of dermatology*, Vol.27, No.1 pp. 29-33, (1989).
2. H. Y. Sohn, Y. S. Kim, E. J. Geum, Y. S. Gyeon, K. H. Son, "Anti-acne activity, medicinal and wild plants, Propionibacterium acnes, Sophora flavescens", *KJMB*, Vol.34, No.3 pp. 265-272, (2006).
3. J. Y. No, "The effect of propionibacterium acnes on the mechanism of inflammation in acne", *Korea University Doctoral thesis*, pp. 1-40, (1991).
4. S. H. Lee, "A Statistical Analysis of Acne patients who Visted University Hospitals Recently", *Korean Dermatological Association*, Vol.34, No.3 pp. 386-393, (1996).
5. S. H. You, J. S. Moon, "Research regarding curcumin and soybean extract's influence on anti-inflammatory and acne and skin-repairing effect on RAW 264.7 macrophages", *KOCS*, Vol.33, No.2 pp. 311-323, (2016).
6. J. L. Burton, S. Shuster, "The relationship between seborrhea and acne vulgaris", *Br. J. Dermatol.*, Vol.85, No.2 pp. 197-198, (1971).
7. W. J. Cunliffe, D. B. Holland, A. Jeremy, "Comedone formation: etiology, clinical presentation, and treatment", *Clin. Dermatol.*, Vol.22, No.5 pp. 367-374, (2004).
8. D. H. Lee, D. S. Sohn, D. Y. Cho, B. J. Kim, Y. Y. Lim, Y. H. Kim, "Anti-inflammatory and Anti-oxidant Effects of Sophora flavescens Root Extraction in Lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 Cells", *Korean Journal of Medical Mycology*, Vol.15, No.2 pp. 39-50, (2010).
9. Y. G. Ahn, S. K. Kim, C. S. Shin, J. H. Min, "Inhibitory effects of wax gourd extract on melanin formation and acne-forming bacterial growth", *Kor. J. Food Nutr.*, Vol.15, No.2 pp. 138-143, (2002).
10. S. M. Choi, C. D. Kim, M. H. Lee, Y. H. Choi, M. J. Rang, H. J. Ahn, Y. P. Yun, "Screening of 5 α -reductase inhibition and comedolytic effects from natural products", *Yakhak Hoeji*, Vol.43, No.3 pp. 342-350,

- (1999).
11. A. Jain, E. Easal, "Inhibition of Propionibacterium acnes-induced mediators of inflammation by indian herbs", *Phytomedicine*, Vol.10, No.1 pp. 34-38, (2003).
 12. J. D. Kim, J. E. Seol, "A Study on the State of Acne Awareness and Care", *The Journal of the Korean Society of Knit Design*, Vol.13, No.2 pp. 1-9, (2015).
 13. S. C. Kim, G. J. An, S. G. Han, J. U. Kim, G. J. Seong, Y. C. Gye, I. J. Kim, G. H. Jo, G. J. Kim, J. I. Yun, "Clinico-Epidemiologic study on the Abuse, Misuse, and Adverse Effects of Topical Dermatologic Drugs", *Korean journal of dermatology*, Vol.41, No.9 pp. 1129-1135, (2003).
 14. M. T. Chomnawang, T. Surassmo, V. S. Nukoolkam, W. Gritsanapan, "Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria", *J. Ethnopharmacol.*, Vol.101, No.1 pp. 330-333, (2005).
 15. A. M. Dattner, "From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future", *Dermatol. Ther.*, Vol.16, No.2 pp. 106-113, (2003).
 16. K. W. Martin, E. Emst, "Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials", *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol.51, No.2 pp. 241-246, (2003).
 17. S. J. Lee, H. J. Lee, H. S. Kim, J. R. Kim, S. K. An, "The Effect of Cosmetics Included Centella Asiatica Extracts on the Improvement of Erythema of Inflammatory 20's Acne", *Journal of The Korean Society of cosmetology*, Vol.16, No.1 pp. 176-184, (2010).
 18. J. H. Park, B. R. Lee, "Effects of Green Tea Catechin Polyphenon 60 on the Improvement of Acne Symptoms", *Journal of Investigative Cosmetology*. Vol.13, No.1 pp. 27-35, (2017).
 19. Y. J. Joo, H. M. Jung, U. K. Seo, "Flower MeOH Extract of Panax Notoginseng Attenuates the Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 Cells", *Korean journal of Korean Medicine*, Vol.30, No.1 pp. 150-162, (2009).
 20. X. Gao, M. Dan, A. Zhao, G. Xie, W. Jia, "Simultaneous determination of saponins in flower buds of Panax notoginseng using high performance liquid chromatography", *Biomedical chromatography*, Vol.22, No.3 pp. 244-249, (2008).
 21. C. Z. Wang, X. Luo, B. Zhang, W. X Song, M. Ni, S. Mehendale, J. T. Xie, H. H. Aung, T. C. He, C. S. Yuan, "Notoginseng enhances anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, Vol.60, No.1 pp. 69-79, (2007).
 22. T. Gutfinger, "Polyphenols in olive oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol.58, No.11 pp. 966-968, (1981).
 23. M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone, "Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of argentina", *J. Ethnopharmacol*, Vol.71, No.1-2 pp. 109-114, (2000).
 24. M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181 pp. 1199-1200, (1958).
 25. E. Borenfr4eund, J. A. Puerner, "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption", *Toxicol. Lett.*, Vol.24, No.2 pp. 119-124, (1984).
 26. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skippr, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids", *Anal Biochem.*, Vol.126, No.1 pp. 131-138, (1982).
 27. M. H. Kim, "Anti-oxidant Activity of Akebia quinata fruit extract and the Effects of Skin", *KOCS*, Vol.32 No.3 pp.

- 439-450, (2015).
28. W. Kalt, A. Hanneken, P. Milbury, F. Tremblay. Recent research on polyphenolics in vision and eye health", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.58, No.7 pp. 4001-4007, (2010).
 29. B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, O. I. Aruoma, "The characterization of antioxidants", *Food Chem. Toxicol.*, Vol.33, No.7 pp. 601-617, (1995).
 30. J. Imai, N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura, Y. Itakura, "Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents", *Plant. Med.* Vol.60, No.5 pp. 417-420, (1994).
 31. O. S. Aydos, A. Avcl, T. Ozkan, A. Karadag, E. Gurleyik, B. Altinok, A. Sunguroglu, " Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheat grass (*Triticum aestivum L.*) extract on CML (k562) cell line", *Turk. J. Med. Sci.* Vol.41, No.4 pp. 657-663, (2011).
 32. B. C. Cha, "Changes in the constituents and antioxidant activity in accordance with the processing conditions of Citrus unshiu Markovich", *Kor. J. Pharmacogn.* Vol.46, No.1 pp. 23-30, (2015).
 33. N. Y. Kim, D. S. Park, H. Y. Lee, "Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid", *Kor. J. Med. Crop Sci.*, Vol.23, No.1 pp. 37-42, (2015).
 34. K. H. Jung, "Effect of *Panax notoginseng* radix extract on Phototoxicity Inhibition, Anti-inflammation and Antioxidation by Concentration", *semyung university Doctoral thesis*, pp.1-23, (2013).