

## 산해박 분획물의 항산화, 항염증 및 항노화 활성 효과 연구

서재용<sup>\*,†</sup> · 김고은<sup>\*</sup> · 유지수<sup>\*</sup> · 장아름<sup>\*</sup> · 심수안<sup>\*\*</sup> · 이정노<sup>\*\*</sup> · 배승희<sup>\*\*\*,††</sup>

\* (주)코스메카코리아 기술연구원  
\*\* (주)코씨드바이오팜 바이오융합연구소  
\*\*\* 건국대학교 화장품공학과, 박사과정  
\*\*\*\* 건국대학교 화장품공학과, 교수

(2024년 3월 14일 접수, 2024년 3월 29일 수정, 2024년 3월 30일 채택)

### Antioxidant, Anti-inflammation, and Anti-aging Effects of Ethyl Acetate Fraction from *Cynanchum paniculatum* Extracts

Jae Yong Seo<sup>1,3,†</sup>, Go Eun Kim<sup>1</sup>, Ji Soo Ryu<sup>1</sup>, A Reum Jang<sup>1</sup>,  
Su An Sim<sup>2</sup>, Jung No Lee<sup>2</sup>, and Seunghee Bae<sup>3,††</sup>

<sup>1</sup>CIR Center, COSMECCA KOREA, 6F, 323 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea

<sup>2</sup>Bio Convergence R&D Center, CoSeedBioPharm Corporation

<sup>3</sup>Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University

(Received March 14, 2024; Revised March 29, 2024; Accepted March 30, 2024)

**요약:** 본 연구에서는 산해박(*Cynanchum paniculatum*)을 이용하여 에틸아세테이트로 분획물을 제조하고, 지표물질 페오놀(paeonol)의 구조와 함량을 확인하였다. 산해박은 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol, distilled water를 사용해서 순차적 용매 분획을 시행하여 분획물을 획득하였고, 에틸아세테이트(EtOAc)에서 가장 높은 paeonol 함량을 보였다. 산해박 에틸아세테이트 분획물(EA)의 구조는 nuclear magnetic resonance (NMR)을 통해서 확인하였고, 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 통해 확인하였다. 산해박 에틸아세테이트 분획물(EA)의 항산화 활성 효과를 검증하기 위해 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 소거능을 통해서 확인하였으며, 염증 완화 효과를 검증하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생성 억제능을 확인한 결과, 농도 의존적으로 NO 생성을 저해함을 확인하였다. 추가적으로, ultraviolet B (UVB)에 의해 유도된 MMP-1 생성량은 산해박 에틸아세테이트 분획물(EA)의 농도 의존적으로 감소하였고, 프로콜라겐(procollagen type-I) 생성 능력은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 산해박 에틸아세테이트 분획물(EA)을 함유한 화장품 제형을 이용하여 임상시험을 실시한 결과, 눈가 주름 개선 효과를 확인하였다. 이를 통하여 산해박은 항산화 및 항노화 효과를 가지는 천연 기능성 화장품 소재로 사용이 가능할 것으로 기대된다.

**Abstract:** In this study, we prepared fractions from *Cynanchum paniculatum* (*C. paniculatum*) with ethyl acetate and identified the structure and content of paeonol, an indicator substance. Fractions were obtained by sequential solvent fractions using n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol, and distilled water, and showed the highest paeonol content in ethyl acetate (EtOAc). The structure of the ethyl acetate fraction (EA) was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) and the content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The antioxidant activity of EA was tested through its ability to scavenge 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), and its

† 주 저자 (e-mail: sjyb612@cosmecca.com)

call: 031-784-6522

†† 교신저자 (e-mail: sbae@konkuk.ac.kr)

call: 02-450-0463

ability to inhibit nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) was tested for its ability to inhibit NO production in a concentration-dependent manner. Furthermore, MMP-1 production induced by ultraviolet B (UVB) was decreased in a concentration-dependent manner by the EA, and the ability to produce procollagen type-I was increased in a concentration-dependent manner. In addition, as a result of conducting clinical trials using cosmetic formulations containing EA, the effect of improving wrinkles around the eyes was confirmed. Thus, it is expected that *Cynanchum paniculatum* can be used as a natural functional cosmetic material with antioxidant and anti-aging effects.

**Keywords:** *Cynanchum paniculatum*, anti-aging, paeonol, anti-oxidant, anti-inflammation

## 1. 서 론

산해박(*Cynanchum paniculatum*, *C. paniculatum*)은 박주가리과의 다년생 식물로서, 동아시아 지역에서 주로 서식하며 한국에서는 산황제비꽃으로도 알려져 있다. 이 식물의 꽃은 작고 향기롭고 연한 분홍색을 띠어 주로 조경용으로도 사용되며, 전통적으로는 약용으로 사용되었다. 뿌리 및 줄기는 우리나라에서는 서장경(徐長卿)이라고 불리며, 중국 의학에서 간, 비장, 위 등에 좋다고 알려져 있으며, 진통작용, 진정작용 그리고 이뇨작용을 가지고 있다.

현재까지 보고된 산해박(*C. paniculatum*)에 대한 성분 및 그 성분에 대한 생리활성 연구로는 항암작용, 항염작용 및 항혈소판 활성 등이 있는 것으로 보고되어 있다[1]. 또한 산해박(*C. paniculatum*) 뿌리 정유 추출물의 장내 미생물 5종에 대한 항균활성에 대한 연구가 있다[2]. 산해박(*C. paniculatum*)의 뿌리의 성분으로는 paeonol과 같은 phenolic compound가 주성분으로 알려져 있으며 그 이외에도 C<sub>21</sub> steroids와 alkaloids 성분이 보고되어 있다[3,4]. Paeonol의 약리작용에 관해서 항염 및 신경 보호 효과, 항노화 및 항부종작용과 해열, 이뇨작용이 있는 것으로 보고되어 있고 [5,6], 다른 지표 성분인 homosyringaldehyde의 뇌신경세포 보호 활성을 나타낸다는 보고가 있다[7].

피부는 외부 환경에 지속적으로 노출되어 피부가 손상되고 생리 기능이 저하되는 등 피부 노화가 빠르게 진행된다. 따라서 이러한 피부노화를 억제하기 위해서는 천연물로부터 항산화 및 항노화 효능을 갖는 소재에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔으며, 특히 식물체로부터 많은 물질이 개발되어 왔다. 피부의 활성을 가진 다양한 천연 소재에 대한 주름개선, 항산화, 노화억제 등의 효능이 과학적으로 증명되고 있기 때문에 안전성을 기반으로 효능이 검증된 식물 유래 유효 성분의 화장품 적용에 대한 관심은 더욱 커질 것이다[8].

본 연구에서는 피부노화 개선용 천연 소재를 발굴하기

위해 산해박을 이용하였고, 산해박 분획물의 지표성분인 paeonol를 확인한 후 자유 라디칼 소거능 실험을 통해 항산화능을 확인하였으며, nitric oxide (NO) 생성 억제능을 통해서 염증 완화 효과를 규명하였다. 추가적으로, UVB에 의해 유도된 MMP-1 생성량 억제능과 프로콜라겐(procollagen type-I) 생성능을 통해 주름개선에 미치는 영향에 대해서 확인하였다. 또한 눈가주름에 대한 개선 효과를 인체적용 시험을 통해 확인하였으며, 항노화 화장품 소재로서의 산해박의 활용 가능성을 연구하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

분리 및 분석 기기로는 preparative liquid chromatography (Prep-LC) (YMC, LC-Forte/R, Japan), high-performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, Alliance e2695 - 2998 PDA Detector, USA) 를 사용하였다.

분리 시 사용된 시약으로는 n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol (Daejung Chemical & Metals, Korea)를 사용하였고, 분석 시 사용된 시약으로는 methanol-D<sub>4</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA), paeonol (Sigma-Aldrich, USA) 를 사용하였고, methyl alcohol과 acetonitrile은 Daejung Chemical & Metals (Korea)사의 시약을 사용하였다.

효능 평가용 기기는 microscope (CKX41, Olympus, Japan), discover microplate reader (GM3000, Promega, USA), cell counter (LUNA-II™, Logos Biosystems, Korea)을 사용하였고, 세포배양에 사용된 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)(Gibco, USA), fibroblast basal medium (FBM), FGM-2 Single Quot Kit Supplement & Growth Factors (LONZA, USA), penicillin-streptomycin solutions (Welgene, Korea)를 구입하여 사용하였다. 그 외 trypsin-EDTA, DPBS (Gibco, USA), EZ-cytox cell viability assay kit (DoGen Bio, Korea), 96 well culture

microplate (Falcon, USA), 10 N NaOH (Welgene, Korea), DC protein assay (Bio-rad, USA), BSA standard ampules (ThermoFisher scientific, USA), sodium nitrite (DAEJUNG, Korea), immunoplate (SPL life science, Korea), Procollagen Type 1 (TAKARA Bio inc., Japan), 2,2-azino-bis(3- ethylbenzthiazoline- 6-sulfonicacid) (ABTS) (Alfa Aesar, USA), MMP-1 (R&D system inc., USA), Griess reagent (modified), trypan blue solution, LPS, potassium persulfate, L-ascorbic acid (Sigma Aldrich, USA)를 구입하여 사용하였다.

2.2. 산해박 분리 및 정제

본 실험에 사용된 산해박(*C. paniculatum*) 뿌리는 대구광역시 소재의 약초궁(Korea)에서 구매하였으며, 증류수로 세척한 후 건조 및 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 산해박 뿌리를 10 배 중량의 70% (v/v) 에탄올을 혼합하여 95 °C 에서 180 min 환류 추출한 이후 여과지로 여과하였다. 이후 여과액을 감압 농축시킨 뒤 24 h 동안 동결건조하여 산해박 추출물을 얻었다. 얻어진 산해박 추출물을 20 배 중량의 정제수에 현탁하여 n-hexane, dichloromethane, ethyl

acetate (EA), n-butanol 순으로 극성에 따라 분획하였고, 이후 각 분획을 감압 농축하였다. 산해박 에틸아세테이트 분획물(EA)에서 main peak에 해당하는 물질을 Table 1의 조건으로 Prep-LC를 이용하여 분리를 진행하였고 순도를 높이기 위해 Sephadex G-25 resin을 packing한 open column에 흘려주어 compound를 수득하였고, 그 분리도는 Figure 1에 표기하였다.

Table 1. Prep-LC Conditions for the Separation of Paeonol

Items	Condition
Instrument	YMC, LC-Forte/R
Mobile phase	ACN / 0.1% TFA = 45 / 55
Column	YMC-Actus Triart C18 250 mm × 20 mm
Oven temperature	25 °C
Flow rate	12.0 mL/min
Injection volume	3 mL
Detector	UV (200 nm, 254 nm, 360 nm)

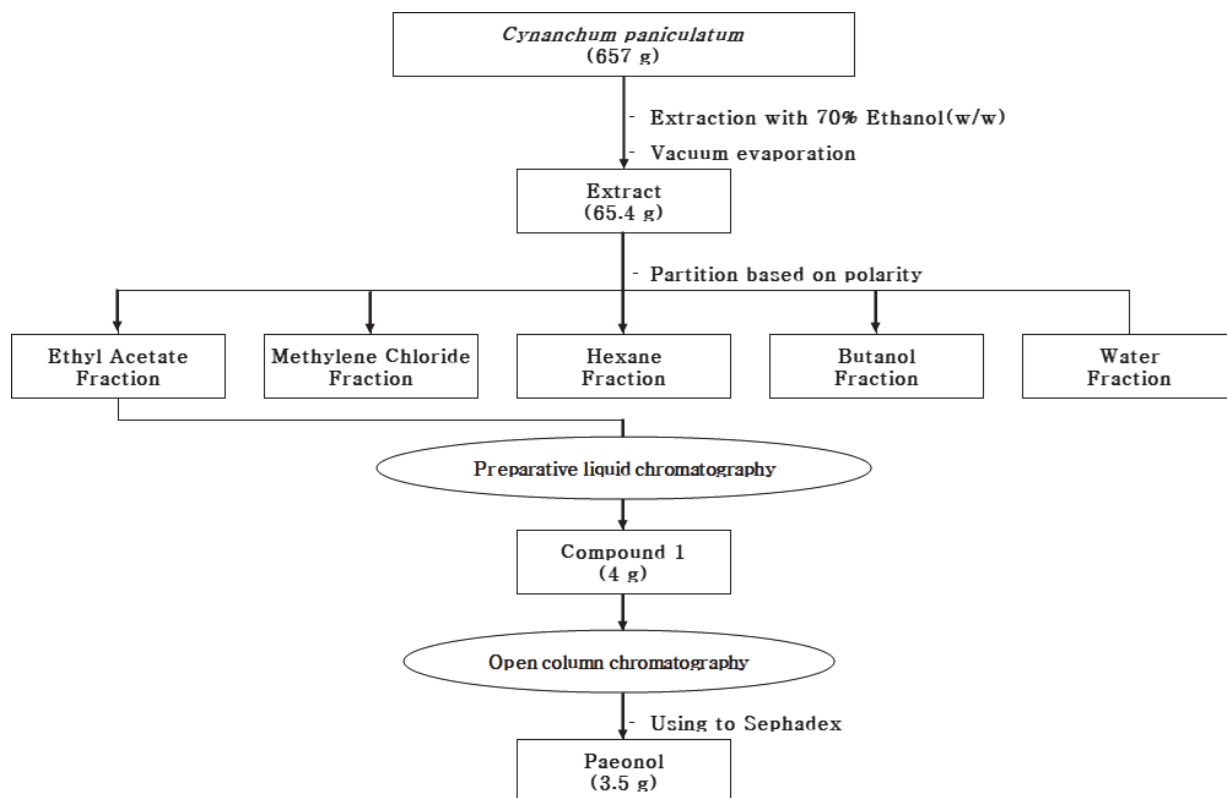


Figure 1. Schematic diagram of the isolation of Paeonol.

### 2.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 분석

산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)에서 main peak에 해당하는 물질을 분리하였고, methanol-D4 시약에 용해하여 NMR 분석을 통해서 구조를 확인하였다. NMR 분석을 위해 사용된 기기는 충북대학교 공동실험실 습관의 nuclear magnetic resonance (NMR) (BRUKER, AVANCE III 400MHz, 500MHz, USA) 기기를 이용하였다.

### 2.4. 세포 배양

실험에 사용된 human keratinocyte인 HaCaT 세포와 murine macrophage인 RAW 264.7 세포는 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 µg/mL), 10% fetal bovine serum (FBS) 를 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지를 넣고 37 °C, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양하였다. Normal human dermal fibroblast (NHDF)를 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 µg/mL), supplement를 함유하는 fibroblast basal medium (FBM) 배지를 넣고 37 °C, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

### 2.5. 세포 독성 평가

96 well plate에 NHDF 세포를  $6 \times 10^3$  cells/well씩, RAW 264.7 세포를  $6 \times 10^4$  cells/well씩 분주한 후, 24 h 동안 세포 배양조건에서 배양하였다. 시험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, PBS로 세척한 다음 NHDF 세포는 supplement를 함유하지 않은 FBM 배지를, RAW 264.7 세포는 FBS를 함유하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아 상태로 만들어 주었다. 다음 날, 일정 농도의 시험물질을 처리하여 24 h 배양한 후 배지에 10 배 희석 시킨 WST-1 시약을 각 well 당 100 µL씩 넣고 2 h 배양 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.6. ABTS 소거능 측정

ABTS 소거능은 Re 등의 방법을 변형하여 실험을 진행하였다[9,10]. 반응액으로 7.4 mM ABTS solution 및 2.45 M Potassium persulfate solution을 1 : 1 비율로 혼합하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 에탄올 10%로 희석하여 사용하였다. 각 농도별 시료 용액 20 µL씩에 ABTS solution 180 µL를 가하여 상온에서 5 min 동안 반응한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.7. NO 생성 억제능 측정

96 well plate에 RAW 264.7 세포를  $6 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, PBS로 세척한 다음 FBS를 함유하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 주었다. 다음 날, LPS 1 µg/mL와 일정 농도의 시험물질을 처리하여 다시 24 h 동안 배양하였다. 세포 배양액과 griess reagent를 동량 넣어 혼합 후, 15 min 간 상온에서 반응시켰다. 반응 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NO의 양은 sodium nitrite로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였다. 최종 NO의 양은 일정 단백질 당 NO의 양으로 환산하여 음성대조군과 비교하였다[11,12].

### 2.8. MMP-1활성 억제능 측정

96 well plate에 HaCaT 세포를  $2.5 \times 10^5$  cells/well씩 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, PBS로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 준 후, 다음 날 UVB (UV-B G8T5E 8W, 76.7 mJ/cm<sup>2</sup> 조사)를 조사하여 배양하였다. 96 well plate에 NHDF 세포를  $6 \times 10^3$  cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 배양하였다. 24 h 후 supplement를 포함하지 않은 FBM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 준 후, 다음 날 UVB 자극을 받은 HaCaT 세포의 배양액을 시료와 함께 인체섬유아세포에 처리하여 배양하였다. 24 h 배양 후, MMP-1 Elisa kit를 이용하여 실험 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 MMP-1의 양은 일정 단백질 당 MMP-1의 양으로 환산하여 음성대조군과 비교하였다[13].

### 2.9. 프로콜라겐(Procollagen Type-I) 생성 능력 측정

96 well plate에 NHDF 세포를  $6 \times 10^3$  cells/well씩 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, PBS로 세척한 다음 supplement를 함유하지 않은 FBM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어주었다. 다음 날, 일정 농도의 시험물질을 처리하여 24 h 배양하였다. Procollagen type 1 elisa kit를 이용하여 실험 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 procollagen의 양은 일정 단백질 당 procollagen의 양으로 환산하여 음성대조군과 비교하였다[14,15].

### 2.10. 주름 개선 인체 효력 시험 평가

주름 개선 인체 효력 시험을 위해, 피엔케이피부임상연

구센터(주) 생명윤리위원회에 의해 연구 수행 이전에 승인 되었으며(IRB 승인번호: P2109-2390), 주름의 거칠기 및 깊이 에 있어 성별에 따른 차이가 발생할 수 있는 경향이 있으므로, 데이터의 편차를 최소화하기 위하여 30 ~ 65 세 의 눈가주름을 보유한 여성으로만 피험자로 선정하였다. 광학 3 차원 영상측정기(PRIMOS CR Small Field)를 이용하여 눈가주름을 측정하여 시험제품 사용 전 후에 시험대 상자의 동일한 좌측 및 우측 눈가주름 부위(눈꼬리에서 약 1 cm 떨어진 부위를 중심으로 4.5 cm × 3.0 cm (가로 × 세 로) 크기의 영역)를 촬영하였고, 분석은 PRIMOS software (PRIMOS version 5.8E, Canfield, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

### 2.11. 통계처리

본 연구의 실험결과는 최소 3 회 반복하여 수행하였고, 실험 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD) 로 그래프에 넣었으며 student's *t*-test를 시행하여  $p < 0.05$  미만의 경우, 유의성이 있는 것으로 나타내었다(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 분석 결과

산해박(*C. poniculatum*) 에틸아세테이트 분획물에서 분리해 낸 물질의 구조를 NMR 분석을 통해 확인하였다(Figure 2).

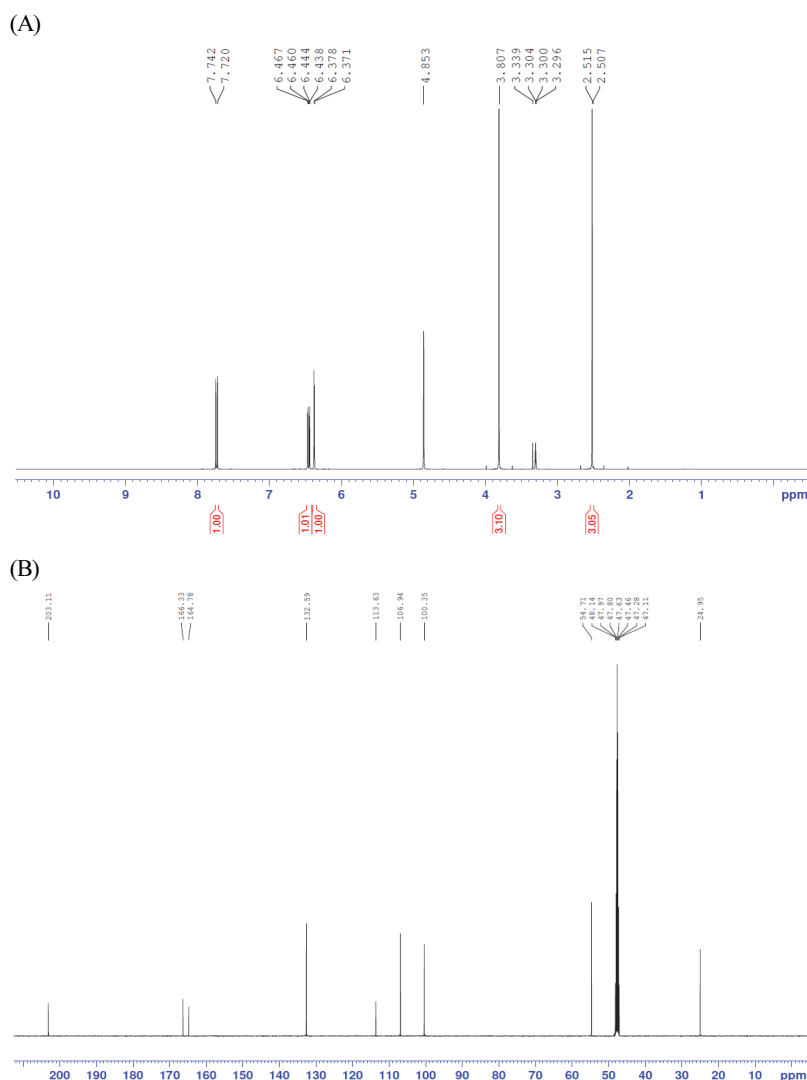


Figure 2. NMR Spectra of Paeonol isolated in *Cynanchum poniculatum* ethylacetate fraction. (A) <sup>1</sup>H-NMR (B) <sup>13</sup>C-NMR.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD,  $\delta_{\text{H}}$ ) 분석 결과 2.515(3H, s), 3.807(3H, s), 6.375(1H, d,  $J=3.5$  Hz), 6.452(1H, dd,  $J=3.5, 8.8$  Hz), 7.731(1H, d,  $J=8.8$  Hz)에서 peak를 확인하였으며 (Figure 2A),  $^{13}\text{C-NMR}$  (500MHz, MeOD,  $\delta_{\text{C}}$ ) 분석 결과 (Figure 2B)에서 203.11, 166.33, 164.78, 132.82, 113.63, 106.94, 100.61, 54.71, 24.95에서 peak를 확인하였고, 수소와 탄소의 연관 관계를 통해서 지표물질이 paeonol임을 확인하였다.

### 3.2. High-performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

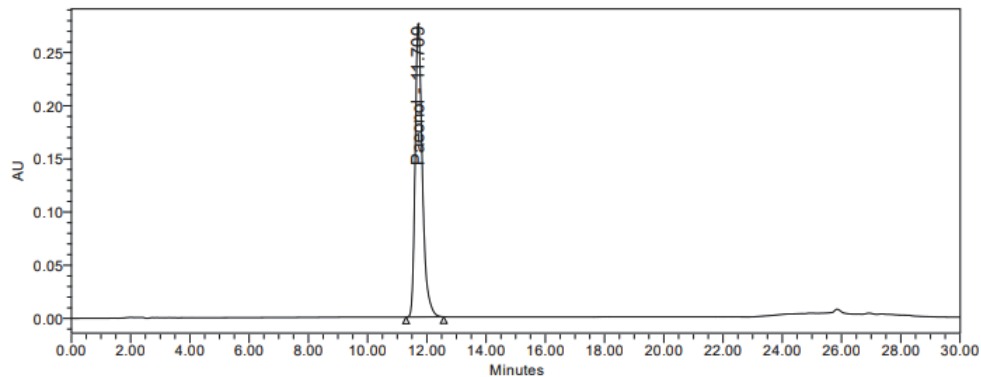
산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)의 지표성분인 paeonol 함량 확인을 위해서 Table 2의 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다. 산해박 추출물은 methyl alcohol에 용해하여 분석을 진행하였다. HPLC 분석을 실시한 결과, 산해박(*C. paniculatum*) 추출물에 약 5653.4 ppm 함유한 것으로 확인하였고 그 chromatogram은 Figure 3에 표기하였다.

### 3.3. 세포 독성 확인

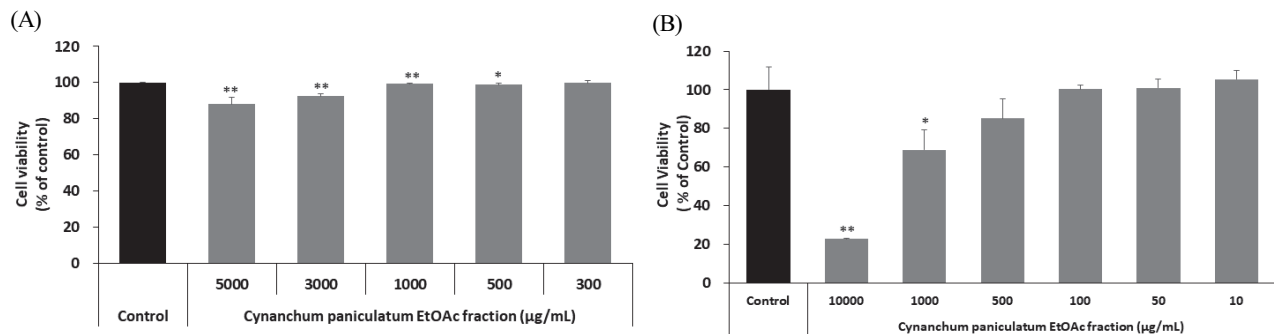
세포독성 시험을 위해 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA) 시험물질을 최소 10  $\mu\text{g/mL}$ 부터 최고 10,000  $\mu\text{g/mL}$ 까지의 농도로 하여 시험을 진행하였고, 세포 생존율이 90% 이상인 최고 농도는 각각 NHDF에서 3,000  $\mu\text{g/mL}$ , RAW 264.7에서 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 나타났다(Figure 4).

**Table 2.** HPLC Conditions for the Quantitative Analysis of Paeonol

Items	Condition
Instrument	Waters Alliance e2695 - 2998 PDA Detector
Mobile phase	Acetonitrile : Water = 45 : 55
Column	RStech optimapak C18 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 $\mu\text{m}$
Oven temperature	25 $^{\circ}\text{C}$
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	1 $\mu\text{L}$
Detector	PDA Detector



**Figure 3.** HPLC Spectrum of Paeonol isolated in *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction.



**Figure 4.** Cell viability on each sample concentration. (A) NHDF fibroblast cell, (B) RAW 264.7 macrophage cell. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD (N = 3). \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with the control group.

본 효력 시험의 농도는 세포독성이 없는 농도 3 ~ 5 개를 선정하여 효력의 농도의존성을 확인하였다.

3.4. ABTS 소거능 평가

양성대조군으로 vitamin C를 사용하였으며, 시험물질의 농도는 최소 500 µg/mL부터 최고 100,000 µg/mL까지의 농도로 하여 시험을 진행하였다. 그 결과, 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물 100,000 µg/mL 농도에서 68.4%, 10,000 µg/mL 농도에서 54.9%, 5,000 µg/mL 농도에서 26.9%로 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 나타났다(Figure 5).

3.5. Nitric Oxide (NO) 생성 억제능 평가

효력시험을 위한 시험물질의 농도는 100, 50, 10 µg/mL 농도로 선정하여 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 87.4%

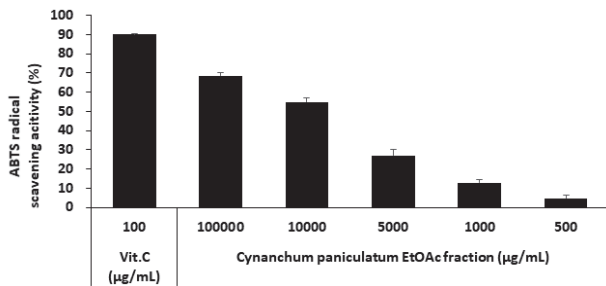


Figure 5. ABTS radical scavenging ability of *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction. The results are expressed as the mean ± SD (N = 3).

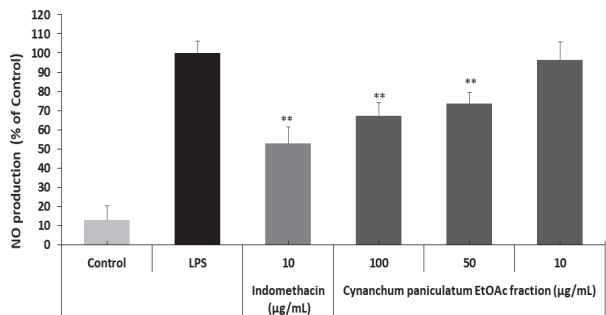


Figure 6. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells of *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction. The results are expressed as the mean ± SD (N = 3). \*\* p < 0.01 compared with the LPS treated group.

증가한 NO 생성량이 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며, 최고 32.7% 감소하는 것으로 나타났다(Figure 6).

3.6. MMP-1활성 억제능 평가

효력시험을 위한 시험물질의 농도는 50, 100, 200, 500, 1000 µg/mL의 농도로 선정하여 진행하였다. 그 결과, UVB에 의해 25.3% 증가한 MMP-1 생성량이 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며, 최고 79.2% 감소하는 것으로 나타났다(Figure 7).

3.7. 프로콜라겐(Procollagen Type-I) 생성 능력 평가

효력시험을 위한 시험물질의 농도는 10, 20, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 선정하여 진행하였다. 그 결과, procollagen

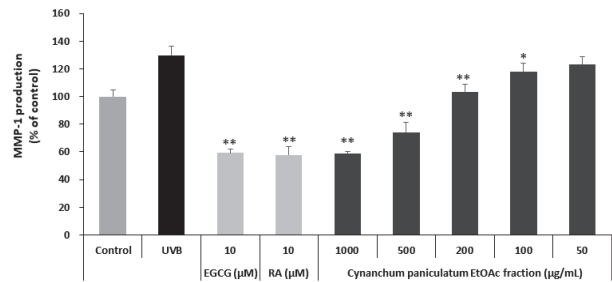


Figure 7. Inhibition of MMP-1 Expression of *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction. The results are expressed as the mean ± SD (N = 3). \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 compared with the UVB irradiated group.

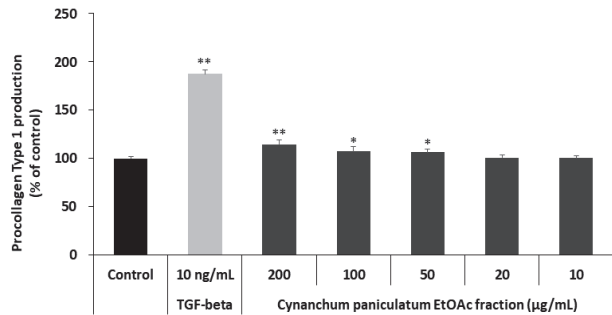
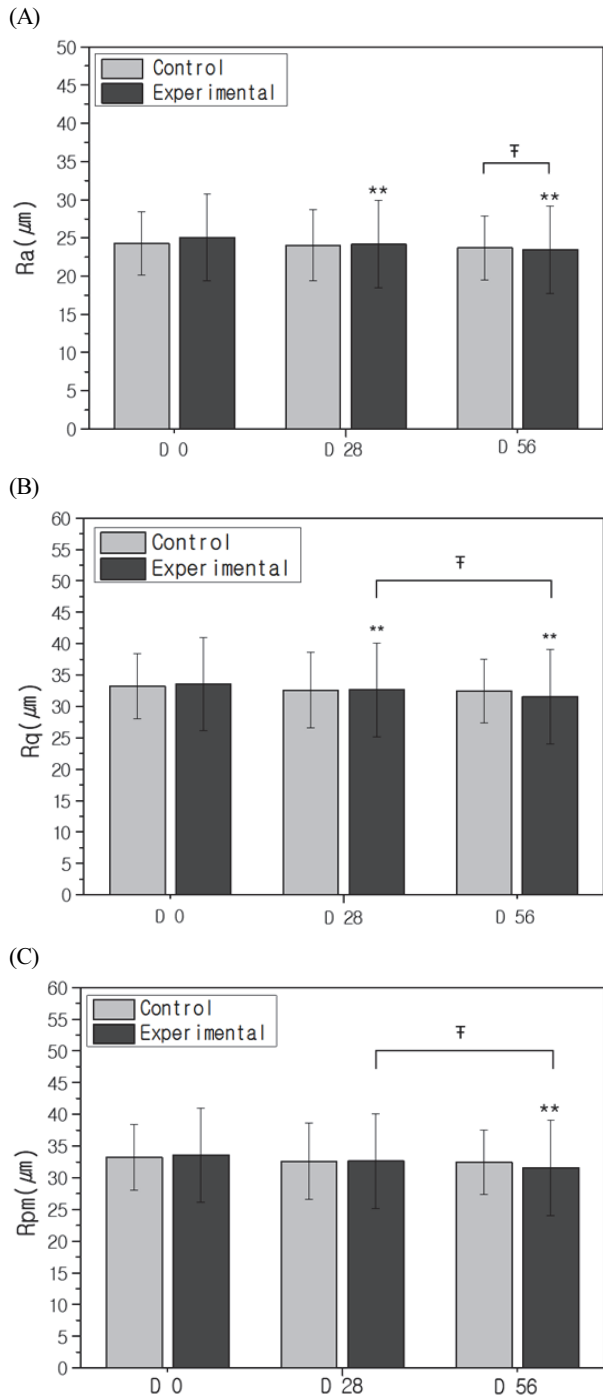


Figure 8. Effect of *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction on type-1 procollagen synthesis. The results are expressed as the mean ± SD (N = 3). \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 compared with the control group.



**Figure 9.** Clinical study for effect of wrinkles around improvement on the skin of *Cynanchum paniculatum* ethyl acetate fraction. (A) Ra (average roughness), (B) Rq (root mean square roughness), (C) Rpm (average maximum profile peak height), \*\*  $p < 0.05$  by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction,  $F_p < 0.05$  by repeated measures ANOVA.

Type 1 생성량이 최고 14.5% 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 8).

### 3.8. 주름 개선 임상시험 결과

산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)을 2% 적용한 크림의 눈가주름 개선 효과를 평가하기 위해서 피엔케이피부임상연구센터(주)에서 인체적용시험을 실시하였다. 눈가에 주름을 보유한 30 ~ 65세의 성인여성을 대상으로 8주 사용하는 동안 눈가주름 개선 효과를 측정하였다.

광학 3차원 피부 영상 측정기를 이용한 눈가주름 변화를 확인한 결과, 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)을 함유하는 시험제품에서 Ra (중심선평균조도, average roughness), Rq (제곱평균 거칠기, root mean square roughness), Rpm (최대 단면 산 높이의 평균값, average maximum profile peak height)에서 8주 후 유의하게 감소 (\*\*  $p < 0.05$  by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction) 하였으며, 대조제품과 대비해서 유의한 차이( $F_p < 0.05$  by repeated measures ANOVA)를 나타내는 것을 확인하였다(Figure 9). 시험대상자가 시험제품을 사용하는 기간 동안 특별한 피부 이상반응은 없었다. 위의 결과를 토대로 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)은 눈가 주름 개선에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

## 4. 결론

본 연구에서는 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)의 지표성분이 paeonol임을 확인하고, *in vitro* 및 인체적용시험을 통해서 항노화 화장품의 소재로서의 가능성을 검토하였다.

항산화 효과를 검증하기 위해 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 소거능을 통해서 확인하였으며, lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생성 억제능을 확인하여 농도의존적으로 NO 생성을 저해함을 확인하여 염증 완화 효과가 있음을 확인하였다. 또한 UVB에 의해 유도된 MMP-1 생성량은 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)의 농도 의존적으로 감소하고, 프로콜라겐(procollagen type-I) 생성 능력은 농도 의존적으로 증가하여 항노화 효과가 우수함을 확인하였다. 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물(EA)을 2% 함유한 크림 제형을 이용하여 인체적



용시험을 실시하여 눈가 주름의 개선 효과를 확인하였다.

이를 통하여 산해박(*C. paniculatum*) 추출물은 세포독성이 없으면서도 항산화 및 항노화, 항염증 효과를 가지는 천연 기능성 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 현재 산해박(*C. paniculatum*) 에틸아세테이트 분획물 (EA)의 안정성을 개선하여 화장품 제형에서의 활용성을 높이는 후속 실험을 진행 중에 있다.

### Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 산업기술혁신 사업(10077377)의 지원을 받아서 수행된 연구 결과입니다.

### References

1. J. H. Choi, B. H. Jung, O. H. Kang, H. J. Choi, P. S. Park, S. H. Cho, Y. C. Kim, D. H. Sohn, H. Park, J. H. Lee, and D. Y. Kwon, The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *Cynanchi paniculati* radix, *Biol. Pharm. Bull.* **29**(5), 971 (2006).
2. M. J. Lee, H. J. Kim, A. H. Jeong, and H. S. Lee, Acaricidal and antimicrobial toxicities of *Cyanachum paniculatum* root oils and these components against *Haemaphysalis longicornis* and human intestinal bacteria, *J Appl Biol Chem* **61**(4), 423 (2018).
3. H. Mitsuhashi, K. Sakurai, and T. Nomura, Constituents of asclepiadaceae plants. XVII. components of *Cynanchum wifordii* hemsley, *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 712 (1966).
4. S. L. Li, H. Tan, Y. M. Shen, K. Kawazoe, and X. J. Hao, A pair of new C-21 steroidal glycoside epimers from the roots of *Cynanchum paniculatum*, *J. Nat. Prod.*, **67**(1), 82 (2004).
5. L. Zhang, D. C. Li, and L. F. Liu, Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action, *International Immunopharmacology*, **72**, 413 (2019).
6. M. Harada, A. Yamashita, and M. Aburada, Pharmacological studies on the roots bark of *Paeonia moutan*. II. anti-inflammatory effect, preventive effect on stress-induced gastric erosion, inhibitory effect on gastric juice secretion and other effects of paeonol, *Yakugaku Zasshi*, **92**(6), 750 (1972).
7. J. B. Weon, B. H. Lee, B. R. Yun, J. W. Lee and C. J. Ma, Neuroprotective effect of Homosyringaldehyde isolated from *Cynanchum paniculatum* against glutamate-induced neurotoxicity, *Yakhak Hoeji*, **56**(5), 299 (2012).
8. P. K. Mukherjee, N. Maitya, N. K. Nema, and B. K. Sarkar, Bioactive compounds from natural resources against skin aging, *Phytomedicine*. **19**(1), 64 (2011).
9. R. Re, N. Pellegrinni, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
10. J. M. Awika, L. W. Rooney, X. Wu, R. L. Prior, and L. Cineros-Zevallos, Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products, *J. Agric. Food. Chem.*, **51**(23), 6657 (2003).
11. M. J. Kim, N. Y. Bae, K. B. W. R. Kim, J. H. Park, S. H. Park, Y. J. Cho, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory effect of *Zostera marina* ethanolic extract on LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse model, *KSBB Journal*, **30**(4), 182 (2015).
12. H. S. Woo, S. M. Lee, J. D. Heo, M. S. Lee, Y. S. Kim, and D. W. Kim, Anti-inflammatory activity of extracts of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells, *Korean J. Plant Res.*, **31**(5), 466 (2018).
13. M. S. Kim, T. J. Park, J. S. Kim, and S. Y. Kim, Effect of *Agaricus biorenovate* extract on collagen synthesis and matrix metalloproteinase-1 production in human dermal fibroblast, *KSBB Journal*, **34**(1), 49 (2019).
14. J. C. Geesin, D. Darr, R. Kaufman, S. Murad, and S. R. Pinnell, Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, **90**(4), 420 (1988).
15. Y. Kishimoto, N. Saito, K. Kurita, K. Shimokado, N. Maruyama, and A. Ishigami, Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**(2), 579 (2013).