

자소엽 에탄올 추출물의 항장학적 활성 평가

박도영¹, 이기영^{1,2*}

¹전남대학교 대학원 향장품학협동과정,

²전남대학교 화학공학부

Evaluation of the cosmeceutical activity of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*

Do-Young Park¹, Ki-Young Lee^{1,2*}

¹Interdisciplinary Program of Perfume and Cosmetics, Graduate School of Chonnam National University.

²School of Chemical Engineering and Biocosmos co., Chonnam National University

요약 본 연구는 향장품 소재로 물이 IC50 680.98ppm으로 가장 높은 활성을 나타내었다. ABTS를 이용한 활성 산소 소거능에서는 50% 에탄올 추출물과 70% 에탄올 추출물에서 각각 IC50 646.94, IC50 661.94ppm으로 높은 활성을 보였다. 각 에탄올 추출물은 일정농도(100-10000ppm)에서 항산화 활성을 보였으나 에탄올 추출 농도와는 유의적인 관계를 보이지 않았다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 macrophage에 각각의 에탄올 추출물을 처리한 경우 모든 추출물에서 NO생성을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다. 50% 이상의 에탄올 추출물(10000ppm)에서 85%이상의 nitric oxide 생성 억제율을 보였으며, 특히 70% 에탄올 추출물에서 90% 이상의 nitric oxide 생성 억제율을 보였다. 또한 MTT assay를 실시한 결과 각 추출물의 모든 농도에서(1250-10000ppm) 세포독성이 없음을 확인 할 수 있었다. 본 연구를 통해 자소엽 에탄올 추출물은 세포독성이 없는 천연물 유래의 소재로서 각 추출농도에서 농도 의존적으로 항산화 활성과 항염활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

Abstract The purpose of this study was to investigate the antioxidative and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta* by varying the concentration of ethanol at 30, 50, 70, and 90% to utilize the effective extract of *Perilla frutescens* as a cosmetic and pharmaceutical material. In the DPPH antioxidant activity test, the 70% ethanol extract showed the highest activity with an IC50 of 680.98ppm. ABTS showed a high activity in the 50% ethanol extract and the 70% ethanol extract with an IC50 of 646.94 and 661.94 ppm, respectively. Each ethanol extract showed antioxidant activity at a certain concentration (100-10000 ppm), but did not show any significant relationship with the ethanol extract concentration. In RAW 264.7 macrophages induced by LPS, each of the ethanol extracts showed reduced NO production in all extracts, and more than 50% ethanol extract (10000ppm) inhibited nitric oxide formation by 85% or more. In particular, the 70% ethanol extract showed 90% or more nitric oxide production inhibition. In addition, the MTT assay showed no cytotoxicity at all concentrations (1250-10000 ppm) of each extract. In this study, the ethanol extract of *Perilla frutescens* var. *acuta* has antioxidant activity and anti-inflammatory activity that is dependent on the concentration at each extraction concentration.

Keywords : anti-inflammatory, antioxidant, cosmeceutical, *Perilla frutescens* var. *acuta*, *Perilla frutescens* var. *crispa*

1. 서론

물성 유래의 소재들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 이러한 성분들이 대표적으로 지적되는 문

최근 화장품, 의약품 소재로서 환경 친화적이면서 식

제점으로 출처를 알 수 없는 민간 처방식 재료혼합이나,

본 논문은 2015년도 전남대학교 연구년 교수 연구비 지원에 의하여 연구되었음

*Corresponding Author : Ki-Young Lee(Chonnam Univ.)

Tel: +82-62-530-1843 email: kilee@jnu.ac.kr

Received December 8, 2016

Revised (1st January 2, 2017, 2nd January 11, 2017)

Accepted March 10, 2017

Published March 31, 2017

원료물질의 안정성에 관한 자료 미흡, 유효 성분 함량의 일관성 부재 등이 나타나고 있다. 따라서 보다 우수한 천연물 유래의 소재 개발을 위해 피부활성 평가, 집중기술 확보, 안전성, 유효성을 고려한 원료와 기술 확보에 그 초점을 맞추어야 한다[1]. 이에 본 연구는 예로부터 민간 요법으로 널리 사용되고 있는 자소엽에 대해 향장품 소재로서의 기초자료를 제공하고자 하였다.

자소엽은 차즈기 (*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo) 또는 주름소엽 (*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decaisne)의 잎과 끝가지를 말하며, 예로부터 발한, 해열, 기관지염, 위장염 등에 사용되어 왔다[2-4]. 자소엽은 항염증, 항알레르기, 항균활성, 항종양효과 등에 대해 보고되어 왔으며, 특히 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있다[5-11]. 이러한 약리활성은 자소엽이 가지고 있는 phenolic compounds, rosmarinic acid, anthocyanin, caffeic acid, luteolin 등 때문으로 보고되었다[12,13].

본 연구에서는 보다 효과적인 추출물 이용을 위해 에탄올의 농도를 30, 50, 70, 90%로 달리하여 이들 추출물의 항산화활성과 항염활성 실험을 통해 비교해 보고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 재료 및 방법

자소엽은 경북지역에서 수확한 것을 세척하고, 자연 건조시켜 분쇄하여 사용하였다. 건조시킨 자소엽을 30, 50, 70, 90% 에탄올로 72시간 추출하였으며, 각 농도의 에탄올 용매는 시료에 대해 5배 (v/v)로 가하였다. 추출액은 여과 후 동결건조기 (FD8508S, Ilsin, Korea)를 사용하여 동결건조 시켰다.

2.2 추출물의 항산화 활성

2.2.1 DPPH assay

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 Blois의 방법으로 radical 소거능을 측정하였다[16]. 각 시료의 농도(100, 500, 1000, 5000, 10000ppm) 20 μ L와 0.2mM로 용해시킨 DPPH 용액 180 μ L를 혼합하여 30분간 암실에서 반응시킨 후 517nm에서 분광광도계(UV-160A, Shimadzu, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였다.

2.2.2 ABTS assay

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 이용하여 항산화능을 측정하였다. 7.4mM ABTS와 2.6mM potassium persulfate 용액을 섞어 12시간 방치한 후 methanol을 732nm에서 흡광도를 0.8-1.2 정도가 되도록 희석하였다. 이 후 농도별(100, 500, 1000, 5000, 10000ppm)로 만들어 놓은 시료 10 μ L를 희석된 ABTS 양이온 radical 용액 190 μ L에 가하여 732nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

2.3 Nitric oxide 소거능 측정

Nitric oxide 소거능은 Marocci 등의 방법[17]을 변형하여 측정하였다. 10mM sodium nitroferricyanide (III)dihydrate 50 μ L와 일정농도(100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000ppm)의 시료액 30 μ L를 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C에서 150분간 반응시켰다. 그 후 1% sulfanilamide(in 30% acetic acid) 60 μ L를 혼합하고 5분 후 0.1% N-(naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (in 60% acetic acid) 60 μ L를 첨가하였다. 실온에서 30분간 반응 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다.

2.4 Nitric oxide 생성억제활성 측정

일산화질소 생성량을 측정하기 위해 NO 농도는 배양 내의 nitrite 농도를 측정하였다. 48 well plate에 RAW 264.7세포가 2.5 \times 10⁵ cell/well이 되도록 분주한 후 12시간 배양하였다. 다양한 농도의 추출물을 지질 다당체 (lipopolysaccharide, LPS) (100ng/mL)와 함께 처리하여 24시간 배양한 후, 세포배양액을 얻어 배양액 중에 함유된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균치를 구하였다.

2.5 MTT assay

Fibroblast 3T3 cell(한국세포주은행)을 1 \times 10⁴cell/ml 씩 분주하여 24시간 배양 후 1mg/ml~0.125mg/ml의 농도로 희석한 추출물의 시료가 첨가된 새 배지로 교체하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma)를 각 well당 20 μ L 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂incubator에서 배양 2시간 후 형성된 formazan을 200 μ L DMSO

에 녹이고, 540 nm에서 ELISA reader(PowerWave XS2, BioTek, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(cell viability)은 아래의 식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = \frac{[\text{Exp}]}{[\text{Control}]} \times 100$$

Exp: 세포를 포함한 추출물의 흡광도

Control: 세포를 포함한 증류수의 흡광도

2.6 통계처리

각 실험에 이용된 그룹 간 통계 처리 결과는 엑셀 프로그램을 사용하였으며, 표준편차(standard deviation, SD)값을 산정하여 error bar로 표시하였다. ANOVA 검정으로 p가 0.05이하인 것과 0.01이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Radical scavenging activity

자소엽을 각 30, 50, 70, 90% 에탄올로 추출 후 농도별로(100-10000ppm) 조제하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. DPPH를 이용한 항산화능 측정결과 90% 에탄올 추출물의 가장 높은 농도에서 95.2%의 억제율을 나타내어 대조군인 ascorbic acid(98%)와 거의 비슷한 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었으며, 다른 농도의 에탄올 추출물에서도 일정한 활성 산소 억제능을 확인할 수 있었다(Fig.1a). 이러한 DPPH활성 산소 억제능(%) 결과는 기존에 있었던 물과 에탄올 추출물의 항산화활성 비교연구에서와 동일한 결과를 얻을 수 있었다[10]. 70% 에탄올 추출물이 IC50 680.98ppm으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 90% 에탄올 추출물(756.02 ppm),

50%에탄올 추출물(797.07ppm), 30% 에탄올추출물(867.53ppm) 순으로 항산화 활성을 확인하였다.

ABTS를 이용한 항산화능 측정 결과 모든 에탄올 추출물의 높은 농도(5000-10000ppm)에서 대조군인 ascorbic acid의 1000ppm농도와 거의 동일한 활성 산소 억제능을 보였다(Fig.1b). 50% 에탄올 추출물과 70% 에탄올 추출물에서 각각 IC50 값이 646.94, 661.94ppm으로 비슷한 활성을 보였으며, 30% 에탄올추출물은 797.21ppm, 90% 에탄올 추출물은 804.39ppm을 나타냈다.

활성산소 억제율(%)을 통해 대조군인 Ascorbic acid가 단일물질임을 감안하면 자소엽 에탄올 단순추출물의 고농도에서 거의 동일한 억제율을 나타내어 자소엽 에탄올 추출물의 항산화 효과를 확인할 수 있었으나, 에탄올 추출농도와는 유의적인 관계를 보이지 않았다.

3.2 Nitric oxide 소거능

정상적인 농도로 존재하는 NO는 신경계와 심혈관계 및 면역계의 전달물질로서 종양을 억제하거나 감염성 병원체에 대한 억제 등 다양한 기능을 가진다[20]. 그러나 과도하게 발현된 NO는 독성을 가지는 radical로 작용하여 세포손상 뿐 아니라 염증반응을 비롯한 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다고 보고되어지고 있다[21]. 따라서 항염증 활성을 가지는 소재에 대해 NO의 생성 억제와 소거활성에 대한 검토는 필수적으로 수행되어지고 있다[22].

자소엽 에탄올 추출물의 NO 소거능 측정된 결과 90%에탄올 추출물의 모든 농도(100-10000ppm)에서 대조군인 ascorbic acid의 농도가 100ppm 일 때와 거의 동일한 소거효과를 보였으며, 그 외의 추출물에서는 농도에 비례하여 NO소거능을 나타내었다(Fig.2a).

또한 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 macrophage

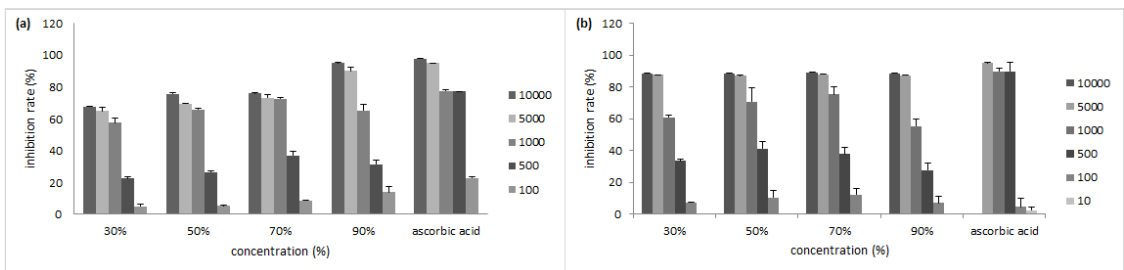


Fig. 1. (a) The DPPH radical scavenging activities of *perilla frutescens* var. *acuta*
(b) The ABTS+ radical scavenging activities of *perilla frutescens* var. *acuta*

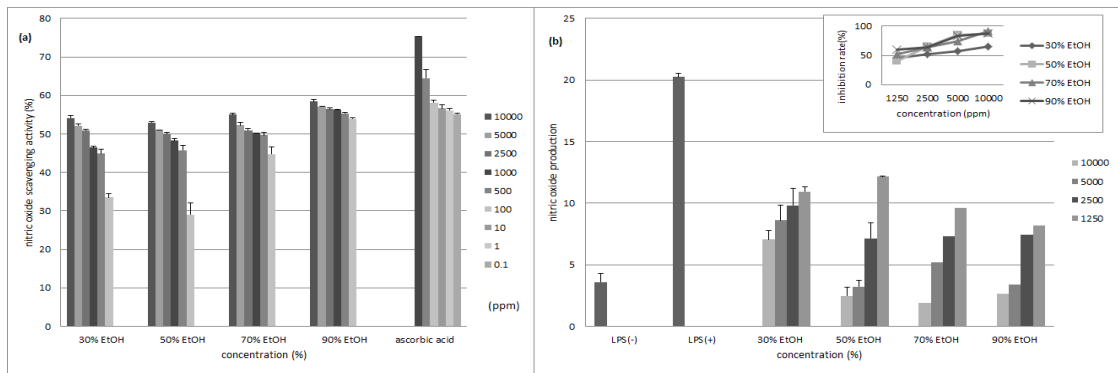


Fig. 2. (a) Nitric oxide scavenging activity of the extract from *perilla frutescens* var. *acuta*
 (b) nitric oxide production of *perilla frutescens* var. *acuta* on Raw264.7 macrophage.

는 NO의 생성을 현저히 증가시켰으나(20.25uM), 각각의 에탄올 추출물들을 농도별로 처리한 RAW264.7 macrophage에서는 LPS를 처리하지않은 정상군 (3.58uM)에 가까운 NO생성량을 나타내어, 염증이 생성되었을 때 자소엽 에탄올 추출물의 처리가 효과적으로 NO의 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 70%에탄올 추출물은 10000ppm에서 90% 이상 NO생성 억제율을 보였으며, 50% 에탄올추출물과 90% 에탄올추출물은 85% 이상의 억제율을 보였다(Fig.2b). 이를 통해 자소엽의 에탄올 추출물은 NO생성 자체를 억제할 뿐만 아니라 다양한 원인으로 이미 생성된 NO에 대한 소거효과로 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

3.3 세포독성 실험 결과

각 추출물의 정상세포 보호 및 독성의 정도를 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 각 추출물의 농도를 1250-10000ppm으로 설정하여 실험을 진행하였다. 모든 추출물의 농도에서 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig.3).

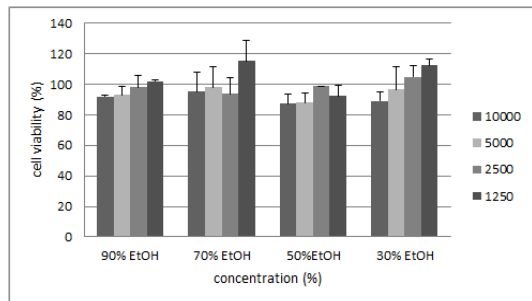


Fig. 3. effect of extracts from *perilla frutescens* var. *acuta* on cell viability

4. 결론

본 연구는 각 농도별 에탄올로 추출한 자소엽의 항산화 활성 및 항염증 조절작용에 대해 비교 연구하였다. DPPH와 ABTS 실험결과 에탄올 추출 농도와는 유의적인 관계를 보이지 않았으나, 각 농도(100-10000ppm)에 따른 항산화 활성을 확인할 수 있었다.

NO소거능과 생성억제활성 연구에서는 각 에탄올 추출물에서 농도별로 활성을 보였으며 50% 이상의 에탄올 추출물에서 85% 이상의 NO생성 억제율을 보였으며, 특히 70% 에탄올 추출물은 90% 이상의 높은 억제율을 보였다. 이를 통해 자소엽 에탄올 추출물은 항염 효과에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 판단되어지며, 보다 효과적인 항염증 활성을 기대하기 위해 추출농도의 범위를 좀 더 세분화해 후속 연구가 이루어질 필요가 있다고 판단되어진다. 또한 RAW 264.7세포에 MTT assay를 실시하여 모든 농도에서 우수한 세포생존율을 나타내었다.

각 농도별 자소엽 에탄올 추출물은 세포독성이 없는 천연물 유래의 소재로서 각각의 추출농도에서 농도 의존적으로 항산화 활성과 항염활성을 보였으며, 실험에 사용된 추출 농도 중 70% 에탄올로 추출 시 NO생성 억제율이 가장 높음을 확인할 수 있었다.

References

- [1] J. D. Kim. The prospects and current situation of oriental herbal cosmetics, Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty, 5(1), pp. 1-7, 2007.
- [2] Ministry of food and drug safety.herbmed [internet],

- pharmacopeia, <https://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do> (accessed Nov., 20, 2016)
- [3] J. K. Jang. Good medicinal herb for your body, p.334, Nexus Books, 2009.
- [4] Pharmacognosy Textbook Compilation Committee, Pharmacognosy, p475, Dongmyoungsa, 2014.
- [5] J. S. You, S. Y. Kim, S. H. Kim. Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Kor. J. Pharmacogn.* 43(2), pp. 163~166, 2012.
- [6] T. Makino, Y. Furuta, H. Wakushima, H. Fujii, K. Saito, Y. Kano. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother. Res.* 17(3), pp. 240-243, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1115>
- [7] M. H. Kim, N. H. Lee, M. H. Lee, D. J. Kwon, U. K. Choi. Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *perilla frutescens* var. *acuta* Leaf. *Korean J. Food culture.* 22(2), pp. 266-273, 2007.
- [8] U. Hiroshi, Y. Chikako, Y. Masatoshi. Luteolin as an Anti-inflammatory and Anti-allergic Constituent of *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 25(9) pp. 1197-1202, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1197>
- [9] M. Linghua, F. Yves, M. Emile, L. Bin. Antioxidant Activities of Polyphenols Extracted from *Perilla frutescens* Varieties. *Molecules.* 14(1), pp. 133-140, 2009.
- [10] M. H. Kim, W. W. Kang, N. H. Lee, D. J. Kwon, U. K. Choi. Antioxidant Activities of Extract with Water and Ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo Leaf. *Applied Biological Chemistry.* 50(4), pp. 327-333, 2007.
- [11] H. U. Son, J. C. Heo, M. S. Seo, S. H. Lee. Effects of *Perilla frutescens* L. on anti-oxidant and anti-inflammation activity. *Korean J. Food Preserv.* 17(5), pp. 757-761, 2010.
- [12] B. Y. Kim, J. S. Jeong, H. J. Kwon, J. H. Lee, S. P. Hong. Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid from *Perilla frutescens* var. *japonica* and var. *acuta* by Reversed-Phase HPLC. *Kor. J. Herbology.* 23(3), pp. 67-72, 2008.
- [13] Y. Nakamura, Y. Ohto, A. Murakami, H. Ohigashi. Superoxide Scavenging Activity of Rosmarinic Acid from *Perilla frutescens* Britton Var. *acuta* f. *viridis*. *J. Agric. Food Chem.*, 46(11), pp. 4545-4550, 1998.
DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980557m>
- [14] E. A. Ainsworth, K. M. Gillespie. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin - Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, pp. 875-877, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- [15] A. Li, A. Wang. Synthesis and properties of clay-based superabsorbent composite. *European Polymer Journal.* 41(7), pp. 1630-1637, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.01.028>
- [16] H. S. Kim, M. J. Hong, I. Y. Kang, J. Y. jung, H. K. Kim, Y. S. Shin, H. J. Jun, J. K. Suh, Y. H. kang. Radical Scavenging Activities and Antioxidant Constituents of Oriental Melon Extract. *Journal of Bio-Environment Control.* 18, pp.442-447, 2009.
- [17] L. Marcocci, J. J. Maguire, M. T. Droylefaix, L. Packer. The Nitric Oxide-Scavenging Properties of Ginkgo Biloba Extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 201(2), pp.748-755, 1994.
DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1764>
- [18] R. H. Liu. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 134(12) pp. 3479S-3485S, 2004.
- [19] P. M. Dewick. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. p.149-151, Wiley&Sons, 2002.
- [20] D. Y. Im, K. I. Lee. Nitric Oxide Production Inhibitory Effect and Antibacterial Activity of the Extract and Fractions from *Paeoniae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* 43(2) pp. 173-178, 2012.
- [21] H. T. Chung, H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar, Y. M. Kim. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(5) pp. 1075-1079, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4670>
- [22] T. B. Kang, T. J. Yoon. Effect of herbal composition on alcohol degradation and anti-inflammatory activity in mice. *Korean J. Food & Nutr.* 24(4), pp. 489-495, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.9799/ksfan.2011.24.4.489>

박도영(Do-Young Park)

[정회원]



<관심분야>
향장품

- 2012년 8월 : 중앙대학교 의약식품 대학원 향장학과 (향장학석사)
- 2016년 8월 : 전남대학교 대학원 향장품학협동과정 (향장학박사 수료)

이기영(Ki-Young Lee)

[정회원]



<관심분야>
응용화학, 향장품

- 1980년 2월 : 서울대학교 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 1991년 2월 : 서울대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 1981년 5월 ~ 현재 : 전남대학교 응용화학공학부 교수