



Research Article

The inhibitory activity against oxidation, inflammation, wrinkle, and melanin production by phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*

참꽃마리(*Trigonotis radicans* var. *sericea*) 전초 유래 페놀성 추출물의 항산화, 항염증, 피부주름 생성 억제 및 미백 효과

Huiin Kim[†], Hee-Yeon Kim[†], Yu-Gyeong Kim, Dahyun Kim, Chae-Won Han, Hye-Jin Park, Young-Je Cho*
김희인[†] · 김희연[†] · 김유경 · 김다현 · 한채원 · 박혜진 · 조영제*

School of Food Science & Biotechnology/Research Institute of Tailored Food Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

경북대학교 식품공학부/특수식품연구소

Abstract The objective of this study was to assess the inhibition activity oxidation, inflammation, wrinkle, and melanin production of water and ethanol extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. (TRS). The antioxidant potential was measured using DPPH, ABTS, antioxidant protection factor, and TBARS assays. The extracts showed excellent antioxidant abilities at the 100 µg/mL total phenolic contents (TPC) concentration. Both distilled water extract (TRSW) and 60% ethanol extract (TRSE) showed high hyaluronidase inhibition activity at 400 µg/mL TPC concentration. The TRSW and TRSE showed 15.06% and 27.82% inhibition on elastase, 55.15% and 51.70% inhibition on collagenase at concentration of 400 µg/mL. The tyrosinase inhibition was 27.52% at 400 µg/mL phenolic extracts in TRSE. Therefore, this extract is considered to have high anti-aging effects. Furthermore, TRS extract has potential as a functional beauty food ingredient.

Keywords *Trigonotis radicans*, antioxidant, anti-inflammation, anti-wrinkle, whitening



OPEN ACCESS

Citation: Kim H, Kim HY, Kim YG, Kim D, Han CW, Park HJ, Cho YJ. The inhibitory activity against oxidation, inflammation, wrinkle, and melanin production by phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Food Sci. Preserv., 32(4), 745-753 (2025)

Received: September 09, 2024

Revised: February 13, 2025

Accepted: February 17, 2025

[†]These authors contributed equally to this study.

***Corresponding author**

Young-Je Cho
Tel: +82-53-950-7755
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

Copyright © 2025 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

현재 beauty(cosmetics) 산업은 약리적 기능이 첨가된 기능성 화장품(functional cosmetic) 혹은 약용화장품(cosmeceuticals)이 개발되어 판매되고 있으며, 많이 활용되고 있다. 기능성이 우수한 화장품의 개발을 위해서는 목적으로 하는 기능을 가진 원료의 확보가 전제되어야 한다. 식품의약품안전처에서 허용하는 기능성 화장품은 미백 효과, 주름 개선 효과, 자외선 차단 효과, 탈모방지 효과 등이 있다(Go 등, 2020; Lee 등, 2001). 젊음이 중요해지고 있는 최근 사회적 초점에 맞추어 피부의 탄력을 유지시켜 주고 주름 개선에 효능이 있는 천연 기능성 화장품의 선호도가 높아지고 있다.

노화는 필연적으로 모든 생물체에서 발생하는 자연현상이며, 또한 피부 노화는 여러 요인에 따라 진행속도가 다르다. 내적으로는 체내 분비 기능의 변화가 주된 요인이며, 외적 요인은 자외선, 기후 오염 등의 환경적 요인에 따라 노화가 다르게 진행된다. 이러한 요인 중 ROS는 피부노화의 주범이자 피부세포의 손상을 촉진시키게 된다. ROS는 다양한 radical뿐만 아니라 peroxide, singlet oxygen 등이 포함된다. ROS는 반응성이 큰 물질로써 생체 내 존재하는 지방물질인 불포화 지방산 및 막 지질 등을 산화시키면 ROS는 반응성이 큰 물질로써 생체 내 존재하는 불포화지방산 및 지질 단백질

막지질과 산화반응을 일으켜 DNA 산화와 같이 생체 내의 구성 성분의 손상을 일으켜 세포가 손상된다(Han 등, 2013; Pillai 등, 2005; Rhie 등, 2001). 또한 ROS는 matrix metallo-proteinases의 expression을 통해 진피에서 엘라스틴 섬유가 비이상적으로 증가하며 피부 내 진피에서 콜라겐 감소가 발생하는데 이는 피부의 장력과 안정도를 감소시키는 것이다(Han 등, 2013).

항산화제는 산화 요인인 유리기를 소거하여 산화를 억제하는데(Lee 등, 2012), 이러한 산화제는 대표적으로 천연항산화제와 합성항산화제 두 가지로 구분할 수 있다. 근래에 합성항산화제의 위험성에 관한 몇몇 가지의 보고로 인해 독성이 없으면서도 효과적인 천연항산화제에 관련된 연구가 활발하게 진행되고 있다(Lobo 등, 2010; Uttara 등, 2009).

참꽃마리(*Trigonotis radicans* var. *sericea*)는 지치과 식물이다. 관련 연구로는 자색풀의 각질형성세포 관련 유전자의 발현(Cho 등, 2017) 등의 연구가 있지만, 지치과 식물에 대한 기능성 연구는 미흡한 실정이다(Lee 등, 2020). 참꽃마리는 높이가 10-15 cm까지 자라는 여러해살이풀로 산기슭, 또는 습기 있는 숲속에 분포되어 있다. 꽃은 5-7월에 피며, 나물로 식용이 가능하다. 한방 분야에서는 과민성방광증후군과 적백이질(赤白痢疾) 약으로 잎과 줄기 등 전초를 이용한다. 현재까지 참꽃마리에 대한 연구는 식물학적 특성(Lee 등, 2020)에 대한 연구 외에 기능성 검증에 관한 연구는 거의 없는 상황이다.

따라서 본 연구는 참꽃마리 전초에서 추출된 phenolic 물질을 이용하여 항산화, 항염증, 주름개선 및 미백 등 피부미용에 관여하는 생리활성을 검증하여 피부미용 기능성 소재 및 미용 식품에 적용하기 위한 자료로 활용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

한국토종야생산약초연구소(Busan, Korea)에서 구매한 참꽃마리(*Trigonotis radicans* var. *sericea*)의 뿌리를 제거한 전초를 깨끗이 씻고, 50°C의 건조기(FO600M, Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 24시간 동안 건조 후 40 mesh로 분쇄한 것을 본 연구의 재료로 사용하였다.

2.2. 추출물 및 고형분(solid) 제조

증류수와 ethanol을 추출용매로 사용하였으며, 증류수 200 mL에 참꽃마리 분말 1 g을 침지시킨 후 가열, 증발시켜 추출물의 양을 100 mL로 제조한 후 냉각하였고, ethanol 추출물의 경우, 참꽃마리 건조분말 1 g을 10-100% 농도별로 조제한 ethanol 용액 100 mL에 첨가하였으며, 각 추출물들은 교반과 추출하기 위해 24 h 동안 4°C의 shaking 인큐베이터에서 200 rpm으로 작동시켰다. 추출물들은 Whatman NO. 1 여과지

(Whatman Inc., Piscataway, NJ, USA)로 여과하여 -20°C 냉동고에 보관하며, 필요에 따라 상온에서 농축한 후 실험에 이용하였다. 이렇게 제조된 참꽃마리 추출물을 냉동고에 얼린 후 동결 건조기를 사용해 분말화했다. -18°C 냉동고에 보관하며 고형분(solid) 시료로 사용하였다.

2.3. Total phenolic contents(TPC) 측정

TPC 측정은 Folin과 Denis의 방법(1912)으로 측정하였다. 시료 1 mL에 100% ethanol 1 mL, 증류수 5 mL, 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 첨가한 후 혼합하고 5분간 방치하였다. 1 mL의 5% Na₂CO₃ 첨가한 후 암실에서 1시간 반응시키고 분광광도계로 흡광도(725 nm)를 측정하였다. Phenolic 농도는 gallic acid를 사용하여 표준 곡선을 긋고, 이와 시료 추출물을 대조하여 표준 곡선에 의해 양을 환산하고, 참꽃마리 추출물에 함유된 TPC 함량을 측정하였다.

2.4. 항산화 효과 측정

2.4.1. DPPH activity

DPPH activity는 Bios의 방법(1958)에 따라 측정하였다. 처리구는 각 구간의 시료 1 mL에 100 μM DPPH 용액 3 mL를 넣고, control은 증류수 1 mL에 DPPH 시약을 넣고 vortexing한 후 15분간 실온에서 반응 후 분광광도계로 흡광도(517 nm)를 측정하였다. 대조구는 BHT를 사용하였으며, DPPH activity(%)는 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100으로 나타내었다.

2.4.2. ABTS activity

ABTS activity는 Pellegrin 등의 방법(1999)을 따라 측정하였다. ABTS 용액 제조는 7 mM ABTS 50 mL, 140 mM K₂S₂O₈ 0.88 mL를 vortexing하여 암실에서 15시간 이상 radical을 형성시키고, ethanol과 1:88 비율로 섞은 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절하여 사용하였다. 반응구는 시료 0.2 mL와 ABTS 용액 4 mL를 vortexing 하였으며, control은 증류수 0.2 mL에 ABTS 용액 4 mL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 2분간 반응 후 흡광도(734 nm)를 측정하였다. 대조구는 ascorbic acid를 사용하였으며, ABTS activity(%)는 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100으로 나타내었다.

2.4.3. Antioxidant protection factor(PF) activity

PF activity는 Andarwulan과 Shetty(1999)의 방법에 의해 측정하였다. 0.05 g의 β-carotene을 chloroform 50 mL에 녹여 용액으로 제조 후 등근 농축 플라스크에 1 mL를 분주하고 농

측시했다. 이후 linoleic acid 0.02 mL와 Tween 40 0.184 mL를 넣어 잘 용해시킨 다음 50 mL H₂O₂ 용액을 첨가하여 β-carotene 이멸전을 제조하였다. 측정은 시료용액 0.1 mL에 제조한 이멸전 5 mL를 넣고 혼합한 후 암실에서 50°C 항온수조에 넣어 30분간 반응시켰다. 반응 후 5분 동안 ice water에서 냉각시킨 후에 흡광도를 470 nm 파장에서 측정하였다. 대조구는 BHT를 사용하였으며, PF값(PF)은 (반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도)로 나타내었다.

2.4.4. TBARs inhibition activity

TBARs inhibition activity는 Buege와 Aust(1978)의 방법에 따라 진행하였다. 우선 핸드믹서를 이용하여 5% linoleic acid 100 mL, 1% Tween 40 100 mL를 섞어 이멸전 용액을 사용 직전에 제조하였다. 반응구는 0.2 mL 시료용액에 0.8 mL 이멸전을 넣고 50°C의 항온수조에서 17시간 이상 반응시켰다. Stock 용액은 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 4 mL 0.25 M HCl를 넣어 제조하였고, TBA reagent(stock solution에 2% BHT를 섞어서 제조) 4 mL를 반응액에 첨가하였다. 혼합한 용액은 끓는 물에 증탕으로 15분간 가열한 후 아이스 chamber에서 10분간 냉각시켰다. 냉각 후 2,000 rpm에서 20분간 원심분리기(FO600M, Jeio tech, Daejeon, Korea)로 원심분리 후, 10분간 정치하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARs inhibition activity(%)는 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100으로 계산하여 나타내었다.

2.5. 항염증 효과[hyaluronidase(HAase) inhibition] 측정

HAase의 inhibition activity를 Dorfman과 Ott(1948)의 방법을 따라 측정하였다. 시료용액 0.25 mL와 1,000 U/mL HAase 용액(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 0.25 mL[20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.9)에 용해]를 혼합 후 38°C 항온수조에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 0.25 mL 기질[4 mg/mL를 0.3 M phosphate buffer(pH 5.3)에 용해]을 추가한 후 38°C에서 45분 동안 반응시키고, 반응 후 0.04 M acetate buffer(pH 3.7)에 용해시킨 알부민 용액 2.5 mL를 첨가하여 5분 동안 방치한 후 600 nm에서 투과율을 측정하였다. 대조군으로는 증류수 0.25 mL를 시료를 대신하여 넣고 반응시켰다. 대조구로는 pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)를 사용하였으며, HAase inhibition(%)은 (1 - 시료의 투과율 / 대조구의 투과율) × 100으로 계산하였다.

2.6. 주름개선 효과 측정

2.6.1. Elastase 억제 효과

Elastase inhibition activity는 Kraunsoe 등(1996)의 방법에 준

하여 측정하였다. 0.1 mL 시료용액에 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 0.8 mM의 농도로 녹인 N-succinyl-(Ala)³-p-nitroanilide를 기질로 0.1 mL 넣고 Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL를 첨가하였다. Tris-HCl buffer에 녹인 0.3125 U/mL porcine pancreatic elastase 0.1 mL를 넣고, vortexing 후 37°C 항온수조에서 20분간 반응시키고 5분간 냉각시킨 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 eigallocatechin gallate를 사용하였으며, elastase inhibition(%)은 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100으로 나타내었다.

2.6.2. Collagenase 억제효과

Collagenase inhibition activity는 Wunsch와 Heindrich(1963)의 방법으로 측정하였다. 0.1 mL 시료에 0.1 M tris-HCl buffer in 4 mM CaCl₂(pH 7.5)에 녹인 0.4 mM 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg을 기질로 0.25 mL 넣고, tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.15 mL와 tris-HCl buffer(pH 7.5)에 녹인 100 U/mL collagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich Co.)을 0.15 mL 추가하였다. 25°C 수욕조에서 20분간 반응 후 0.5 mL의 6% citric acid로 반응을 종료시키고, ethyl acetate를 2 mL 넣은 후, 1분 이상 vortexing한 후 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 epigallocatechin gallate를 사용하였으며, collagenase inhibition(%)은 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100에 대입하여 나타내었다.

2.7. 미백효과(tyrosinase inhibition) 측정

Tyrosinase inhibition activity는 Kim 등(2006)의 방법으로 측정하였다. 시료 0.2 mL, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 1.5 mM L-tyrosine을 기질로 0.4 mL 첨가하고, sodium phosphate buffer(pH 6.8) 2.3 mL, 250 KU/mL tyrosinase from mushroom 1 mL를 추가하였다. 그리고 37°C 항온수조에서 20분간 반응 후 5분간 냉각시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 kojic acid를 사용하였으며, tyrosinase 저해율(%)은 (대조구의 흡광도 - 반응구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100에 대입하여 나타내었다.

2.8. 통계처리

결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, SPSS 25(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 유의차를 검증하고자 One-way ANOVA test, Duncan's multiple range test를 실시하였다(p<0.05).

3. 결과 및 고찰

3.1. 참꽃마리 추출물의 총페놀(TPC) 함량 및 추출 고형분(solid)과 페놀성 추출물의 생리활성

미생물 등 외부의 침입에 대한 방어기작으로 식물체가 2차 대사산물로 phyto-chemical을 생산하는데 그 중 phenolic 화합물은 단백질에 분자구조 내의 -OH기의 결합력이 높아지는 특성으로 생리활성 단백질 등에 결합해 생리적 기능을 다양하게 가지는 기능을 한다. Phenolic 화합물은 phenolic hydroxyl기가 함유되어 있어 이는 다양한 생리활성 기능을 가지고 있는데 그 중 2가 금이온과 결합해 항산화 효과를 크게 나타낸다. 따라서 참꽃마리 전초 추출물에도 다양한 phenol들이 추출되어 항산화 효과를 나타낼 것으로 보인다.

본 연구에서는 참꽃마리 전초 추출물에 함유된 생리활성 성분인 total phenolic compounds(TPC) 함량을 측정하였다. 본 연구에서는 증류수와 농도별로 ethanol을 10-100% 추출용매로 사용하여 참꽃마리 추출물의 TPC 함량을 비교한 결과, Fig. 1에서와 같이 물 추출물에서 TPC 함량이 27.05 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 60% ethanol 추출물에서 26.73 mg/g으로 나타났다. 따라서 이후 실험에서는 물과 60% ethanol 추출물을 대상으로 실험하였다.

참꽃마리 전초에서 추출한 solid 및 phenolics에 의한 생리활성을 측정하기 위해 참꽃마리 추출물로부터 제조한 solid 및 phenolics을 동일 함량으로 제조하여 DPPH와 ABTS를 비교하였다. 참꽃마리 추출물의 solid와 phenolics의 농도를 50 µg/mL로 동일하게 제조하여 DPPH와 ABTS를 측정한 결과, Fig. 2A에서와 같이 물과 ethanol 추출물 모두 76.00% 이상의 DPPH activity가 확인되었으며, ABTS activity 또한 Fig. 2B에서와 같이 저해활성이 약 70% 이상의 억제효과를 나타내었다. 반면

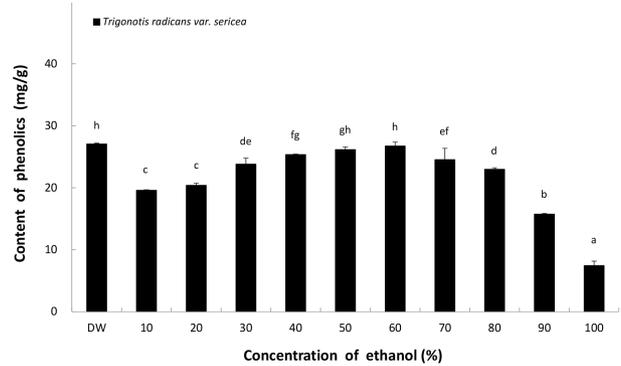


Fig. 1. The content of total phenolics of *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values are mean±SD (n=3). Means with different letters (^{a-h}) above the bars are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

solid의 경우, 50 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물에서 DPPH와 ABTS가 모두 phenolic에 비해 DPPH는 2배 이상, ABTS는 7배 이상 낮은 항산화 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 참꽃마리의 생리활성은 phenolics에 의해 좌우되는 것이 확인되었으며, 이후 실험에서는 생리활성에 관여하는 물질인 phenolics의 농도를 중심으로 진행하였다.

3.2. 참꽃마리 추출물의 항산화 효과

3.2.1 DPPH radical scavenging activity 비교

대표적인 항산화 활성의 한 종류인 DPPH radical은 free radical로서, 이에 대한 환원력이 클수록 활성산소를 소거하는 능력이 높아지는 것을 기대할 수 있으므로 이를 목표로 항산화 활성의 측정 지표로 사용된다. 참꽃마리 추출물의 DPPH scavenging activity는 Fig. 3A에서와 같이 물 추출물 25-100 µg/mL phenolics

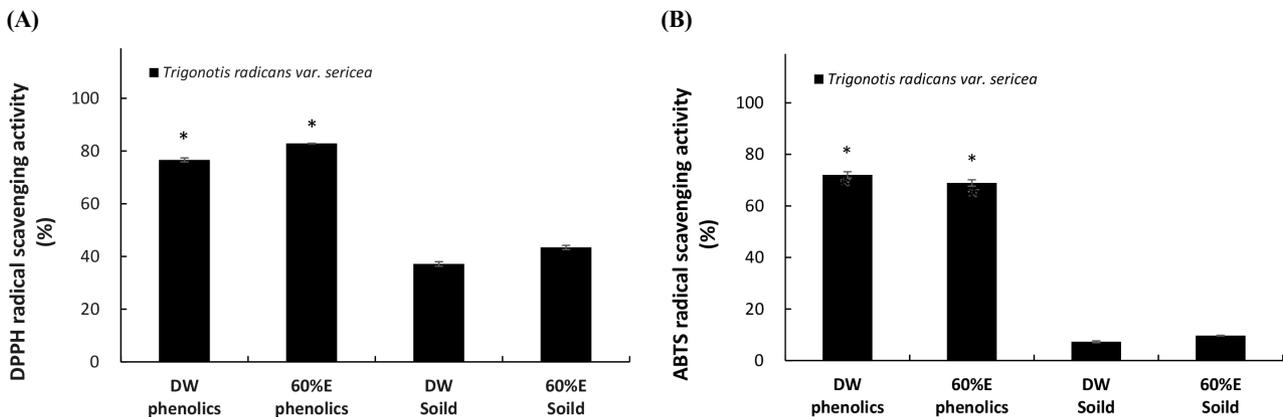


Fig. 2. Comparison of DPPH (A) and ABTS (B) activity by concentration of phenolic extracts and solid with 50 µg/mL from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values are mean±SD (n=3). * on the bars indicates significant differences at p<0.05.

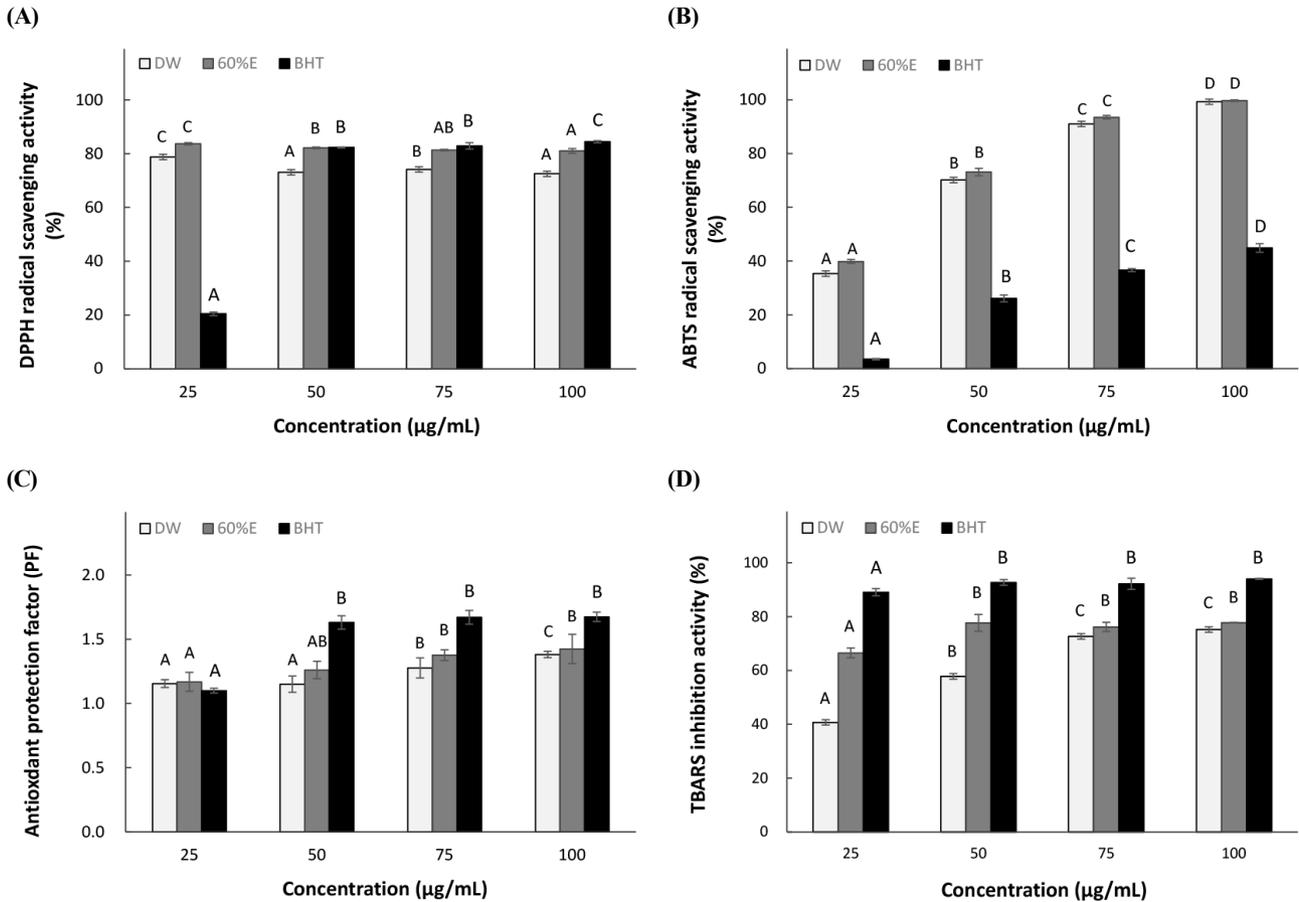


Fig. 3. Effect of DPPH (A), ABTS (B), antioxidant protection factor (C), and TBARS (D) inhibition activity by concentration of phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values are mean \pm SD (n=3). Means with different letters (^{A-D}) above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

농도에서 72.54-78.78%의 항산화 활성을 나타내었고, 동일 농도의 ethanol 추출물에서 81.03-83.69%의 항산화 활성을 나타내어 물 추출물보다 ethanol 추출물이 상대적으로 높은 결과를 나타내었으며, positive control인 BHT의 20.46- 84.44% 저해율보다 추출물에서 항산화력이 더 우수한 결과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 Jung 등(2024)의 연구에 따르면 엘더플라워 에탄올 추출물이 62.5-1,000 µg/mL에서 73.7-77%의 항산화력을 보였다는 이 연구 결과와 비교하면 참꽃마리 에탄올 추출물이 더 낮은 농도에서 더 높은 활성을 띠는 것을 알 수 있었다. 따라서 참꽃마리 추출물은 전체적으로 매우 높은 수준의 천연항산화제로 활용이 가능할 것으로 예상되었다.

3.2.2. ABTS activity 비교

ABTS는 시료 추출물에 존재하는 항산화 물질에 의해 ABTS radical이 시료에 존재하는 항산화물질에 의해 ABTS radical이 어느 정도 제거되는지 측정해 친수성 물질과 친유성 물질 각각

의 항산화 효과를 알 수 있다. 즉, potassium persulfate에 의해 생성된 ABTS free radical이 항산화물질에 의해 제거되어 탈색되는 정도를 측정한다. ABTS activity를 측정할 결과, Fig. 3B에서와 같이 물 추출물 25-100 µg/mL phenolics 농도에서 35.36-99.29%의 높은 항산화 활성을 나타내었고, 동일농도의 ethanol 추출물에서 39.8-99.69%의 항산화 활성을 나타내었다. 대조구인 BHT는 25-100 µg/mL 농도에서 3.52-44.87%를 나타낸 것에 비해 참꽃마리는 대단히 우수한 항산화 활성을 나타내었다. Choi와 Choo(2024)의 연구에 따르면 질경이 에탄올 추출물의 경우 200-800 µg/mL 농도에서 17.7-83.6%의 활성을 나타내었다는 연구결과와 비교하면, 참꽃마리 에탄올 추출물의 경우 더 낮은 농도에서 더 높은 항산화력을 나타내고 있어 기능성 소재로 사용되기에 우수한 자원일 것으로 사료되었다.

3.2.3. Antioxidant protection factor(PF) 비교

지방산화에 의해 만들어지는 peroxy radical은 이중결합을

가진 β -carotene과 작용해 불활성물질이 형성되며, 그 결과로 연쇄반응이 중단되면서 산화가 발생된다. 산화가 발생됨으로서 β -carotene이 지닌 오렌지색이 탈색되는데, 탈색 정도를 측정해 항산화 활성으로 환산하게 된다. PF activity는 Fig. 3C에서와 같이 물 추출물 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 1.15-1.38 PF, 동일 농도의 ethanol 추출물에서 1.17-1.42 PF의 항산화 활성을 나타내었다. 대조구인 BHT는 25-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 1.10-1.67 PF의 항산화 활성을 나타내었다. 물과 ethanol 추출물 모두 첨가하는 phenolics의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 유의적인 항산화 활성의 증가를 나타내었으며, 지용성 물질에 대한 우수한 항산화력을 확인할 수 있었다.

3.2.4. TBARs inhibition activity 비교

지질산화에 의해 생성되는 저분자 malondialdehyde의 생성 억제 효과로 지용성 물질에 대한 항산화효과로 TBARs 억제효과를 확인하였다. TBARs inhibition activity는 Fig. 3D에서와 같이 물 추출물 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 40.71-75.19% 항산화활성을 나타내었고, 동일농도의 ethanol 추출물에서 66.49-77.77%의 항산화 활성을 나타내었다. 물 추출물은 phenolics 농도 증가에 따라 유의적으로 증가함을 확인할 수 있고, ethanol 추출물은 물 추출물보다 항산화 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

3.3. 염증억제(hyaluronidase inhibition) 효과

Hyaluronic acid(HA)는 피부의 elastin, collagen과 같이 피부의 세포간 matrix 중 하나로 노화로 인해 감소될 때, 피부보습, 피부 탄력 감소, 주름 형성 등에 영향을 미친다(Chung 등, 2001). HA는 점질다당류의 구성 성분으로 피부에서 보습력에 관여하며 수분저장고로 불리운다. 또한 피부 세포성장인자 및 영양성분 저장, 세포의 분열, 분화 등에 관여한다(Dai 등, 2007). HA는 세포의 기질을 수화시키고, 피부조직의 수분항상성을 유지시킨다(Harada와 Takahashi, 2007). Hyaluronidase는 HA를 분해함으로써 염증반응을 나타낸다. 알레르기에 의해 hyaluronidase의 활성이 증가되며, 알레르기 억제 약물에 의해 활성이 억제되는 반응을 나타내므로 hyaluronidase 활성 저해와 알레르기 및 염증 작용과의 관련성이 보고되어 있다(Meyer, 1947). HAase 저해효과는 Fig. 4에서와 같이 물 추출물 50-400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 14.90-100.00%의 저해활성을 나타내었고, 동일농도의 ethanol 추출물에서 12.24-95.27%의 저해활성을 나타내었다. 대조구로 사용한 PDTC는 100-400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 14.49-46.61%의 저해활성을 나타내어, 물과 ethanol 추출물 모두 positive control보다 HAase 저해효과가 매우 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 따라서 참꽃마리 추출물이 피부 트러블의 원인인 염증 억제에 효능이 있을 것으로 판단되었다.

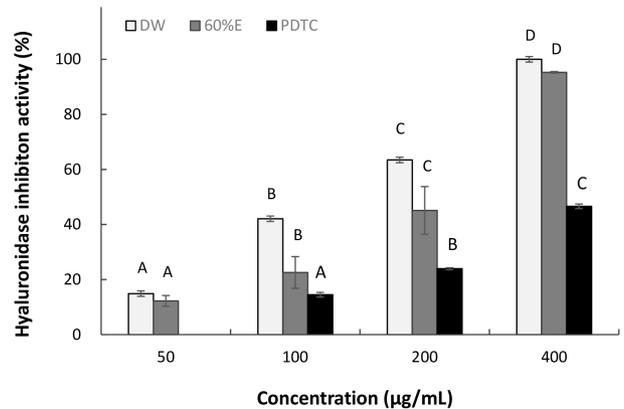


Fig. 4. Hyaluronidase inhibition activity by concentration of phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values are mean \pm SD (n=3). Means with different letters (^{A-D}) above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3.4. 주름개선 효과

3.4.1. Elastase inhibition activity 비교

피부의 노화에 미치는 가장 대표적인 요인은 자외선이며, 자외선으로 유도된 활성산소종은 피부노화에 직접 관여하여 광산화적 손상을 일으켜 주름 발생과 연관된 효소(collagenase와 elastase 등)의 발현을 촉진시켜 collagen 및 elastin 섬유 등을 분해시켜 피부 구조를 유지하지 못하고, 탄력이 상실되어 주름이 생기게 되며, 피부주름이 가속화 된다(Pillai 등, 2005). Elastase 저해효과는 Fig. 5A에서와 같이 물 추출물 100-400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 3.58-15.06%의 저해활성을 나타내었고, 동일농도의 ethanol 추출물에서 16.25-27.82%의 저해활성을 나타내었다. 참꽃마리 물과 ethanol 추출물 모두 400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 elastase 저해활성이 15-28% 수준으로 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 농도를 높인다면 보다 높은 elastase 저해효과를 나타낼 것으로 추측하였다.

3.4.2. Collagenase inhibition activity 비교

구조단백질인 collagen을 분해하는 collagenase에 대해 참꽃마리 추출물의 억제효과를 살펴본 결과 collagenase 저해효과는 Fig. 5B에서와 같이 물 추출물 100-400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 8.22-55.15%의 저해효과를 나타내었고, ethanol 추출물 200-400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 각각 4.82-51.70%의 저해효과를 나타내었다. 대조구인 EGCG는 50-400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 36.79-74.77% 저해효과를 나타내었다. Jung 등(2024)의 연구결과에서 엘더플라워 에탄올 추출물이 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 48%의 저해효과를 나타내는 것에 비해 참꽃마리 추출물이 물과 에탄올 추출물 모두 400 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서

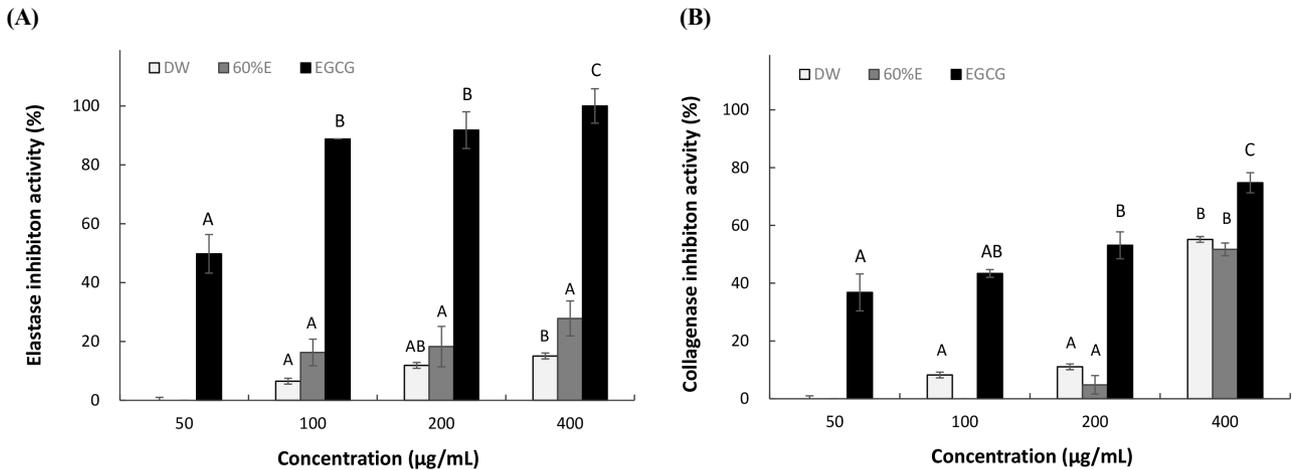


Fig. 5. Effect of elastase (A) and collagenase (B) inhibition activity by concentration of phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values mean±SD (n=3). Means with different letters (^{A-C}) above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

collagenase 저해효과가 51-55% 수준으로 비교적 더 높은 저해효과가 나타났다. 따라서 참꽃마리 추출물을 기능성 화장품에 적용하기 위해서는 400 µg/mL 이상의 농도로 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

3.5. 미백효과(tyrosinase inhibition)

Tyrosinase는 단백질을 구성하는 인자인 L-tyrosine에 작용하여 최종적으로 멜라닌이라는 중합체를 형성하는 mechanism에서 반응을 촉진하는 중요한 효소로 작용한다(No 등, 1999; Hamilton과 Gomez, 2002). 따라서 melanin 생합성의 핵심 효소인 tyrosinase의 억제로 인하여 피부의 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. Tyrosinase 저해활성은 Fig. 6에서와 같이 물 추출물의 경우 억제활성이 나타나지 않았으며, ethanol 추출물은 50-400 µg/mL phenolics 농도에서 5.82-27.52%의 저해활성을 나타내었다. 이러한 결과는 참꽃마리 추출물 농도를 높인다면 미백효과를 나타내는 기능성 화장품 원료로 사용이 가능할 것으로 예상된다.

4. 요약

본 연구에서는 참꽃마리 잎을 이용하여 항산화, 항염증, 미백 및 피부 주름에 관여하는 효소저해 활성을 측정하였다. 참꽃마리 추출물의 total phenolics compounds 함량에서 열수 추출물은 27.05 mg/g, 60% ethanol 추출물은 26.73 mg/g으로 나타났다. 참꽃마리 추출물 solid와 phenolics를 이용하여 DPPH, ABTS를 비교한 결과 phenolics 추출물에서 우수한 결과를 나타내는 것으로 확인되었다. 참꽃마리 추출물의 DPPH, ABTS를 측정한 결과 DPPH는 열수와 ethanol 추출물 200 µg/mL

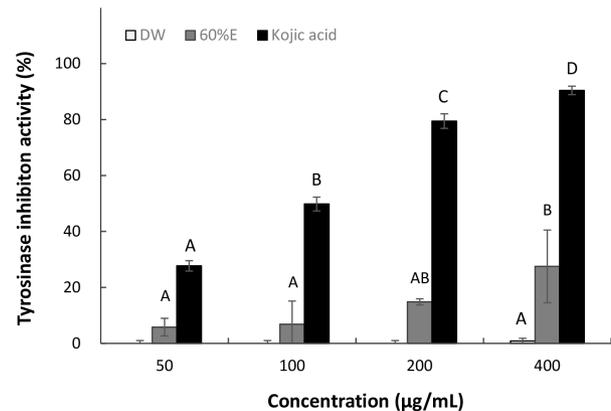


Fig. 6. Tyrosinase inhibition activity by concentration of phenolic extracts from *Trigonotis radicans* var. *sericea*. Values are mean±SD (n=3). Means with different letters (^{A-D}) above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

phenolic 농도에서 각각 72.54와 81.03%를, ABTS는 물, 에탄올을 모두 100%에 근접하는 활성을 나타내었다. Antioxidant protection factor와 TBARs를 측정한 결과 200 µg/mL phenolic 농도에서 PF는 열수와 ethanol 추출물에서 각각 1.38 PF, 1.42 PF를, TBARs는 물과 ethanol 추출물 모두 75% 이상의 항산화 활성을 나타내었다. 염증억제효과인 hyaluronidase 저해효과는 물 추출물과 ethanol 추출물 모두 400 µg/mL phenolics 농도에서 각각 100%에 가까운 저해활성을 나타내었다. 참꽃마리 추출물의 elastase와 collagenase 저해 활성은 물과 ethanol 추출물 400 µg/mL phenolic 농도에서 각각 15.06%, 27.82%와 55.15%, 51.70%의 저해 효과를 나타내었다. 참꽃마리 추출물의 tyrosinase 억제효과는 물 추출물에서는 활성이 거의 나타나

지 않았으며, ethanol 추출물 400 µg/mL phenolic 농도에서 27.52%의 억제효과가 확인되어 미백효과도 나타내는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 종합해보면 참꽃마리 추출물은 항노화 작용의 한 부분으로 매우 높은 항산화 활성과 피부 주름 생성에 관여하는 효소인 elastase와 collagenase 활성저해, 염증 반응에 관여하는 hyaluronidase 효소 저해 활성, 미백효과에 관여하는 tyrosinase 억제효과 또한 나타내는 것으로 확인되었다.

Funding

No funds are received for the completion of this manuscript.

Acknowledgements

None.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Kim H, Kim HY, Cho YJ. Methodology: Kim H, Kim HY, Kim YG, Kim D. Formal analysis: Han CW, Park HJ. Validation: Kim H, Kim HY, Park HJ, Cho YJ. Writing - original draft: Kim H, Kim HY, Kim YG, Kim D. Writing - review & editing: Han CW, Park HJ, Cho YJ.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Huiin Kim (First author)

<https://orcid.org/0000-0001-8865-4516>

Hee-Yeon Kim (First author)

<https://orcid.org/0000-0003-4982-5348>

Yu-Gyeong Kim

<https://orcid.org/0000-0002-0782-856X>

Dahyun Kim

<https://orcid.org/0000-0003-0680-8556>

Chae-Won Han

<https://orcid.org/0000-0003-1899-9935>

Hye-Jin Park

<https://orcid.org/0000-0001-5682-6539>

Young-Je Cho (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-2365-6294>

References

- Andarwulan N, Shetty K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Ahrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780 (1999)
- Bios MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200 (1958)
- Cho N, Lee B, Lee W, Kim K, Kim KE, Han H. Investigation of the effect of *Lithospermi Radix* on tight-junction related genes in HaCaT cells. *Korea J Herbology*, 32, 55-61 (2017)
- Choi Y, Choo BK. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Plantago asiatica* L. extract. *Korean J Org Agric*, 32, 91-105 (2024)
- Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*, 117, 1218-1224 (2001)
- Dai G, Freudenberg T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol*, 171, 1451-1461 (2007)
- Dorfman A, Ott ML. A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem*, 172, 367-375 (1948)
- El-Safory NS, Fazary AE, Lee CK. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydr Polym*, 81, 165-181 (2010)
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol*, 299, 379-389 (1999)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem*, 12, 239-243 (1912)
- Go YJ, Kim YE, Kim HN, Lee EH, Cho EB, Sultanov A, Cho YJ. Inhibition effect against elastase, collagenase, hyaluronidase and anti-oxidant activity of thinning green ball apple. *J Appl Biol Chem*, 63, 43-50 (2020)
- Hamilton AJ, Gomez BL. Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol*, 51, 189-191 (2002)
- Han QY, Koyama T, Watabe S, Nagashima, Y, Ishizaki S. Isolation and characterization of collagen and collagen peptides with hyaluronidase inhibition activity derived from the skin of marlin (*istiophoridae*). *Molecules*, 28, 889 (2023)
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon

- SH, Hwang JP, Park SN. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. J Soc Cos Sci Kor, 39, 1-8 (2013)
- Harada H, Takahashi M. CD₄₄-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. J Biol Chem, 282, 5597-5607 (2007)
- Jung HJ, Heo SY, Lee JH. Anti-wrinkle and antioxidant effects of elderflower (*Sambucus nigra*) water extract as a functional ingredient of cosmetics. Asian J Beauty Cosmetol, 22, 175-183 (2024)
- Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. Oxid Med Cell Longev, 1279250 (2019)
- Kim KN, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju island against four tumor cell lines. J Food Sci Nutr, 11, 17-24 (2006)
- Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Biochem, 35, 9090-9096 (1996)
- Lee EK, Bharadwaj S, Yadava U, Kang SG. Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using *in silico* and *in vitro* approach. J Enzyme Inhib Med Chem, 34, 927-936 (2019)
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. Kor J Food Sci Tech, 44, 540-544 (2012)
- Lee SI, Jeon US, Jeong JG. A herborological study on the plants of Boraginaceae in Korea. Korea J Herbology, 35, 1-9 (2020)
- Lee SJ, Jung DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ, Lee NH. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. Kor J Pharmacol, 32, 175-180 (2001)
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacon Rev, 4, 118-126 (2010)
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Sci, 65, PL241-246 (1999)
- Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation: A review. Inter J Cosmet Sci, 27, 17-34 (2005)
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr Neuropharmacol, 7, 65-74 (2009)