ISSN 2466-2046 (Print)
ISSN 2466-2054 (Online)
Asian J Beauty Cosmetol 2026; 24(2): 163-173
http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

RESEARCH ARTICLE Open Access

Effects of Accelerated Solvent Extracts from *Polygonum multiflorum* on Skin Whitening and β-Hexosaminidase Secretion

Juyeon Lee[1], Yoonseo Lee[1], Sang Myung Lee[1,2], Bora Kim[1,3*]
[1]Department of Chemistry, The Graduate School of Mokwon University Daejeon, Korea
[2]Division of Food and Pharmaceutical Technology, Mokwon University, Daejeon, Korea
[3]Department of Cosmetics, Mokwon University, Daejeon, Korea

[*]**Corresponding author:** Bora Kim, Department of Cosmetics, Mokwon University, 88 Doanbuk-ro, Seo-gu, Daejeon 35349, Korea
Tel.: +82 42 829 7565
Email: bora0507@mokwon.ac.kr

Juyeon Lee and Yoonseo Lee contributed equally to this work.

Received October 24, 2025
Revised November 05, 2025
Accepted December 01, 2025
Published June 30, 2026

Abstract

Purpose: Accelerated solvent extraction (ASE) is an advanced technique that enables the rapid extraction of active compounds using solvents under high temperature and pressure. Due to its high efficiency and reproducibility, ASE acts as a good tool for optimized extraction methods. In this study, we compared the extraction efficiency and biological activity of *Polygonum multiflorum*, a traditional medicinal herb renowned for its many pharmacological properties, using ASE and conventional reflux solvent extraction (RSE). **Methods:** *P. multiflorum* root was extracted at various ethanol concentrations using ASE, and extracts exhibiting superior antioxidant activity were identified. Thereafter, the inhibitory effects on melanin synthesis were evaluated in B16F10 melanoma cells, while the anti-allergic potential was assessed based on the reduction of β-hexosaminidase release from RBL-2H3 mast cells. **Results:** Extracts obtained through both ASE and RSE exhibited antioxidant activity. Notably, the 70% and 100% ethanol extracts prepared using ASE demonstrated the highest antioxidant potential among all extracts. Additionally, ASE extracts showed superior anti-glycation and tyrosinase inhibitory activity and greater inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells compared with RSE. Furthermore, ASE treatment statistically inhibited β-hexosaminidase release, indicating its potential anti-allergic effect. **Conclusion:** The antioxidant, skin whitening, and antihistamine inhibitory effects of *P. multiflorum* roots were evaluated using both ASE and RSE methods. Overall, ASE can be suggested as a more economical, environmentally sustainable, and efficient extraction technique than conventional reflux extraction.

Keywords: *Polygonum multiflorum*, Accelerated solvent extraction, Antioxidant, Skin-whitening, Anti-allergy

Introduction

화장품 및 식의약 소재로서 식물을 활용하기 위해 일반적으로 유효성분을 추출하기 위하여 환류 추출법을 사용하여 추출한다. 환류 추출법은 다양한 용매를 이용하여 추출하고 추출액을 정제하여 유효성분만 남겨 동결 건조하는 방식의 추출법으로서 용매에 따라 원하는 성분을 추출할 수 있다. 그러나 열에 의한 유효성분 파괴, 단백질 변성, 장시간의 추출 및 낮은 추출 효율로 인한 에너지 소비 등과 같은 단점이 있다(Kwon *et al.*, 2002). 가속용매추출법(accelerated solvent extraction, ASE)은 짧은 시간에 고온 및 고압을 이용하여 시료에서 화합물을 효율적으로 추출하는 자동화된 고속 시료 처리 기술이다. 고온조건은 용매가 표적 분석물질이 용해력을 향상시키고, 고압은 용매를 끓는점 이상의 액체 상태로 유지하여 추출 소요시간, 효율 및 회수율을 향상시키며 추출 시간과 용매 소비량을 크게 줄여 환경 부담 완화 등 장점을 지닌 방법이다(Onuska *et al.*, 2001). 실제로 식물로부터 ASE 방법을 통해 적삼에서의 진세노사이드 추출 효율을 높이려는 등 여러 연구가 보고되었다(Kim, 2022).

본 연구에 사용한 적하수오(*Polygonum multiflorum*)는 마디풀과의 덩이뿌리로서 적갈색을 띄며 쓰고 떫은 맛이 난다. 중국이 원산지이며 뿌리 부위를 주로 사용하는 약용식물로서 전 세계에 널리 퍼

Copyright ⓒ Korea Institute of Dermatological Sciences.
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.

져 있으며 오래전부터 면역 기능, 항염, 항노화 효능으로 인해 우리나라를 비롯한 수많은 동아시아 국가에서 전통적으로 사용되어온 약재이다(Lv *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012). 또한, 적하수오 뿌리 추출물은 초기 흰머리를 포함한 색소 질환과 관련된 질병 등 다양한 질병 치료를 위해 민간요법으로 사용되어 왔으며 흑모 촉진효과와 관련된 멜라닌 합성을 촉진할 수 있다는 연구가 밝혀졌다(Kim & Kim, 2017). 반면에 tyrosinase, *TRP-1*, *TRP-2*, *MITF* 등의 유전자 발현 억제를 통한 미백효과에 대한 보고도 있어(Song & Yoo, 2008) 평가 매개체와 추출 상태, 적용 농도, 함량 성분에 따른 상이한 효과가 나타나는 것으로 보인다(Kim *et al.*, 2009). 이외에도 혈액을 보충하고 간과 신장 기능 강화, 뼈와 근육 강화, 생리불순 해소, 갱년기 장애 및 산후조리에도 활용되는 등 다양한 생리활성을 가진 것으로 보고되고 있다(Thanh *et al.*, 2016). 그러나, 항알레르기 효과 등과 같은 효능 연구는 미비하다. 적하수오에 주요 유효 성분으로 gallic acid, catechin, epicatechin, 더불어 tyrosinase 활성 저해제로 알려진 stilbene glycoside, emodin이 보고되었다(Zhang *et al.*, 2020). 피부 알레르기(allergy)는 특정 물질인 알러젠(allergen)에 대한 반응으로 발생하는 피부의 과민반응으로 발진, 두드러기, 가려움증 등의 증상이 나타나며 아토피피부염이 대표적이다(Ahn *et al.*, 2010). 최근 화장품 기능성 소재로서 연구가 활발한 천연물질도 피부에 자극이 있거나 알레르기를 유발할 수 있고 특히, 피부보호를 위한 피부색소인 멜라닌 생성을 억제하는 미백 효과를 나타나는 성분의 경우는 안전성(safety)에 더욱 유의해야 할 소재이다. 그래서 알레르기 발생의 원인 물질인 히스타민을 분비하는 비만세포(mast cell) 작용을 억제하거나 히스타민의 작용 자체를 억제하는 효과를 가진 천연 기능성소재의 개발이 필요하다(Shin & Shon, 2015). 천연소재로서 갈대, 함초, 매실 등 추출물이 항히스타민 작용에 대한 연구가 보고되었으나(Ryu, 2016) 항알레르기효과와 더불어 미백, 항산화, 항염 등 다양한 피부효능을 지닌 천연소재 개발은 필요하다. 본 연구에서는 가속용매추출법이라는 경제적이고 친환경적, 효율적인 추출법을 사용한 적하수오 뿌리 부위의 에탄올 농도별 추출물의 미백 및 항알레르기 효과를 기존 추출방법과 비교 확인하였다.

Methods

1. 실험 재료

1) 시료

본 실험에서 사용한 적하수오 뿌리는 ㈜인차(Seoul, Korea)에서 구매하여 3차 정제수로 세척 후 사용하였다. 환류추출물은 적하수오 뿌리 파쇄물 1800 g을 에탄올 추출 용매로 사용하여 55℃에서 24 h, 2회 환류 추출하여 얻었으며, 적하수오 뿌리 부산물을 제거하기 위해 185 mm filter paper (Whatman, China)를 사용하여 감압 필터링하였고, 55℃에서 감압 농축하여 실험에 사용하였다. 가속용매추출법(ASE) 과정은 추출용매가 시료를 포함하고 있는 고온의 cell에 유입되고 고압으로 추출용매가 액상으로 유지시켜 추출하며 최종 collection bottle에 받게 된다. 적하수오 가속용매추출물을 얻기 위하여 가속용매추출시스템 ASE-100 (Dionex, USA)을 통해 에탄올에 적하수오 분쇄물을 포함하고 있는 고온의 추출 cell (66 mL)에 유입시키고 100℃, 1500 psi 고압고온 하에서 pre-heat 1 min, static time 5 min, flush volume 60%, purge time 100 s의 조건으로 2 cycles의 추출과정을 진행하여 시료 중 에탄올 농도별로 추출하였고 용매를 증발시켜 시료로 사용하였다. 가속용매추출법(ASE)을 적용한 시료는 에탄올을 0%에서 100%까지 시료를 구분 명기하였고 기존 추출법으로 얻은 시료는 RSE로 표기하였다. AE추출과정에 따른 에탄올 농도별 추출과정의 샘플명을 각각 기재하였다(Table 1).

2) 세포주

동물세포 실험에 사용된 B16F10 melanoma cell은 American type culture collection (ATCC, USA)에서, RBL-2H3 cell (rat basophilic leukemia mast cells)은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

세포배양에 사용된 시약은 fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Welgene, Korea), phosphate buffered saline solution (PBS; Welgene), penicillin-streptomycin solutions (PC/SM; Welgene), trypsin-

Table 1. The abbreviations of extracts of *Polygonum multiflorum* root

Method		Ethanol content (%)	Abbreviations of extract samples
ASE	Accelerated solvent extraction	0%	AE0
		10%	AE10
		30%	AE30
		50%	AE50
		70%	AE70
		100%	AE100
RSE	Reflux solvent extraction	70%	RSE

http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

ethylene diamine tetra-acetic acid solution (EDTA; Welgene) 제품을 사용하였다(Kim & Kim, 2023). 세포 독성 실험에 사용한 시약으로 water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1; DoGenBio, Korea) 제품을 사용하였다(Kim & Kim, 2023). 흡광도를 측정하기 위해 microplate reader (Epoch; Biotek Instruments, USA)를 사용하였고, 형광을 측정하기 위해 fluorescence reader (TECAN infinite 200; Tecan AU, Austria)을 사용하였다(Kim & Kim, 2023).

2. 실험 방법

1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH 반응 조건은 Kim *et al*. (2014)의 방법에 따라 진행하였다. 대조군으로 아스코빅산(ascorbic acid)를 사용하였으며 DPPH 라디칼(radical) 소거 활성 정도는 50% 저해 농도(SC_{50})를 계산하여 표현하였고 양성대조군으로 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하였다(Miliauskas *et al*., 2004).

2) ABTS 라디칼 소거능

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS; Alfa Aesa, USA)는 짙은 청록색이고 항산화 능력을 가진 시료와 반응시키면 투명색을 나타내며 색의 변화를 측정하여 시료의 항산화 효과를 평가하였다(Lee & Moon, 2019). 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

3) 총 폴리페놀 정량

폴리페놀 성분의 정량은 Yoon *et al*. (2020)의 방법에 따라 진행하였으며 갈릭산(gallic acid)를 이용하여 폴리페놀 함량을 정량하였다. Folin-ciocalteu (F-C) 시약은 sodium molybdate와 sodium tungstate를 인산용액과 혼합하여 노란색의 phosphotungstic acid complex가 생성된다. 700 mM sodium carbonate와 10% F-C 시약을 혼합하여 25℃ incubator에서 30 min 동안 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid equivalents (GAE)의 시료 1 g당 무게(mg)로 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

4) 총 플라보노이드 정량

플라보노이드 함량의 정량은 Yoon *et al*. (2020)의 방법에 따라 진행하였으며 quercetin, catechin, naringin을 표준시료로서 이용하여 플라보노이드 함량을 정량하였다. 1 N NaOH와 diethylene glycol을 혼합하고 시료와 반응시켜 37℃ incubator에서 1 h 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin equivalents (QE), catechin equivalents (CE), naringin equivalents (NE)의 시료 1 g당 무게(mg)로 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

5) HPLC 분석

고성능 액체 크로마토그래피-다이오드 어레이 검출기(HPLC-PDA; Thermo Fisher Scientific Inc., Ultimate-3000 UPLC system) 이용하여 성분 분석을 수행하였다. 크로마토그래피 분리는 C18 분석 컬럼(Capcell Pak ODS UG120, 4.6×250 mm, 입자 크기 3 μm) 두 개를 연결하여 35℃로 유지하면서 수행되었으며, 이동상은 100 mM 포름산(formic acid)이 포함된 초순수와 아세토니트릴(acetonitrile)의 gradient 용출 방식으로 유속은 1.0 mL/min로 설정하여 진행하였다. 플라보놀, 에모딘 정량분석은 371 nm 파장에서, 갈릭산 유도체 정량에는 271 nm 파장에서 UV 검출기를 사용하여

Table 2. Gradient elution condition of HPLC mobile phase for kaempferol and emodin (UV 371 nm)

Time (min)	A (formic acid in water)	B (acetonitrile)
0	85	15
45	60	40
75	2	98
84	2	98
85	85	15
90	85	15

Table 3. Gradient elution condition of HPLC mobile phase for gallic acid, methyl gallate and ethyl gallate (UV 271 nm)

Time (min)	A (formic acid in water)	B (acetonitrile)
0	96	4
20	96	4
65	80	20
70	2	98
83	2	98
84	96	4
90	96	4

진행하였다(Table 2, 3). 또한, 각 성분의 정성적 확인을 위해 관련 표준물질과 PDA (photodiode array detection) 스펙트럼을 서로 비교하여 확인하였다.

6) 항당화 효과

당화 반응(glycation) 및 비효소적 당화 반응(non-enzymatic glycation)은 단백질의 유리 amino기와 환원당의 carbonyl기가 반응하여 초기 당화 반응 생성물인 Schiff base를 형성한다. 이 화합물들이 축합, 산화, 분열 등의 일련의 복잡한 과정을 통해 갈색 화합물인 melanoidine을 생성하여 노화 인자로 확인한다. 특히 피부의 콜라겐과 엘라스틴을 딱딱하게 만들어 피부 탄력 저하, 주름, 처짐 발생시킨다. 생성된 최종 당화 산물(advanced end products, AGEs)에 대해 excitation 370 nm, emission 440 nm에서 형광을 측정하여 시료의 항당화력을 산출하였다. 양성대조군으로 aminoguanidine (Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

7) Tyrosinase 저해 활성 측정

타이로시네이즈 저해활성 측정은 Masamoto *et al*. (2003)의 방법으로 측정하였다. 활성 측정에 필요한 기질 농도 및 반응용액 조성은 Kim *et al*. (2014)의 방법에 따라 수행하였다. 3 mM L-tyrosine과 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)와 시료들을 혼합하고, 2000 U/mL의 mushroom tyrosinase를 마지막에 첨가한 후 37℃ incubator에서 15 min 간 반응시킨다. 반응시킨 후 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성 저해력을 계산하였다.

8) 세포 생존율 평가

세포생존율 평가는 세포내의 수용성 테트라졸륨염(water soluble tetrazolium salts) (WST-1)이 불용성의 포마잔(formazan)으로 변환되어 나타나는 정도를 정량 하였다(Ranke *et al*., 2004). 멜라노마 세포(murine melanoma B16F10)는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Korea)에서 배양하고 96 well plate에 7×10^3 cells/well의 농도로 세포를 접종한 후, 37℃, 5% CO_2 조건에서 24 h 배양하였다(Yoon *et al*., 2020). 이후 배양세포에 각 시료를 농도 별로 처리하였으며 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

9) 멜라닌 생성 저해 측정

세포 내에서의 멜라닌 생성 저해력을 평가하기 위해 B16F10 세포에 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma-Aldrich)를 처리해 멜라닌의 생성을 유도하여 멜라닌 생성 저해력을 평가하였다(Yoon *et al*., 2020). 멜라닌 합성 저해 측정에 필요한 기질 농도 및 반응용액 조성은 Yoon *et al*. (2020)의 방법에 따라 수행하였다. 세포 내부와 배지로 분비된 멜라닌 합성 억제 정도를 각각 100 μM IBMX로 처리한 대조군(control) 대비하여 저해율(%)로 표현하였으며 양성대조군은 kojic acid 200 μg/mL를 사용하였다.

10) RBL-2H3 rat 비만세포에서 β-hexosaminidase 유리 억제 측정

β-Hexosaminidase 유리 억제 측정은 Lv *et al*. (2018)의 방법을 일부 변형하여 실험을 진행하였다. RBL-2H3 cell을 24 well plate에 2.5×10^5 cell/well의 농도로 분주한 후 24 h 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 각 well을 PBS로 세척한 후 DNP-IgE (dinitrophenyl-specific Immunoglobulin E) 250 ng/mL를 함유한 배지로 12 h 감작 배양하였다. Siraganian buffer (Biosolution, Korea)로 각 well을 세척한 후 이 buffer에 용해된 다양한 농도의 시료를 가한 후 2 h동안 배양하였다. DNP-HAS (dinitrophenyl-conjugated human serum albumin) 4 μg/mL로 1 h 배양한 후, 10 min동안 얼음 위에서 냉각시켜준다. 상층액을 96 well plate에 옮기고 substrate buffer를 가한 후 37℃에서 90 min 반응시킨다. Stop solution을 첨가한 후, microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

11) 통계분석

모든 실험은 3회 반복 시행하고 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 통계처리는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., USA)을 이용하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다(Kim & Kim, 2023). 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였으며 통계적 유의성은 Bonferroni 방법을 이용하여 사후검정을 시행하였다.

Results and Discussion

1. 라디칼 소거 항산화 활성, 총 폴리페놀 및 총플라보노이드 함량

DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, AE70과 RSE의 SC_{50}이 각각 30.14, 45.30 μg/mL으로 확인되었으며 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 7.47 μg/mL로 확인되었다. ABTS소거능은 AE70, RSE의 SC_{50}이 각각 2.90, 8.28 μg/mL로 확인되었으며 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 5.22 μg/mL로 확인되었다. 특히, AE70의 경우에는 양성대조군보다 더 효과적인 것을 확인할 수 있었다(Table 4). 폴리페놀은 식물의 대표적인 2차 대사물질이며 플라보노이드는 페놀계 화합물의 가장 큰 부류로서 폴리페놀과 플라보노이드는 천연 항산화제 중에서 다양한 생리활성 기능을 가지고 있다고 알려져 있으며 유효 성분으로 이용되고 있다(Hong & Ahn, 2005). QE와 CE가 전체적으로 높은 함량을 보였는데 이는 적하수오 뿌리에서는 quercetin와 catechin이 많이 함유되어 있다는 보고와 일치한다(Rui *et al*., 2018). 따라서, 용매 추출물 각각의 함량을 측정한 결과, AE100의 경우에 polyphenol과 flavonoid 정량 값이 GAE 함량 224.97 (mg/g), QE 함량 87.28 (mg/g), CE 함량 116.51 (mg/

http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

Table 4. The results of antioxidant activity, polyphenol and flavonoid contents

Sample	DPPH SC_{50} (μg/mL)	ABTS SC_{50} (μg/mL)	Polyphenol GAE (mg/g)	Flavonoid		
				QE (mg/g)	CE (mg/g)	NE (mg/g)
AE0	148.08±12.01	21.29±1.70	79.88±2.38	50.97±1.08	32.51±3.62	11.96±0.24
AE10	79.34±5.63***	11.66±0.91***	128.68±10.83***	55.25±2.80	46.85±9.37	12.92±0.63
AE30	47.45±1.71***	12.65±1.87***	153.97±7.92***	57.11±3.48	53.08±11.67	13.34±0.78
AE50	35.13±4.98***	8.48±0.62***	198.99±10.15***	80.51±1.16	116.27±5.02***	16.48±0.34***
AE70	30.14±2.12***	2.90±0.12***	183.36±2.79***	72.84±1.04	106.28±4.53***	14.94±0.30**
AE100	45.63±4.98***	6.47±0.93***	224.97±3.86***	87.28±3.24*	116.51±14.07***	17.58±0.94***
RSE	45.30±2.29***	8.28±0.76***	200.59±11.06***	77.70±2.45	74.97±10.64*	14.80±0.71*
L-ascorbic acid	7.47±1.22***	5.22±0.00***	-	-	-	-

SC_{50}, scavenging concentration 50; GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent; CE, catechin equivalent; NE, naringin equivalent; -, no result. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, compared with AE0.

Table 5. The contents of gallic acid derivatives and flavonol of each fraction of *Polygonum Multiflorum* root by HPLC (% based on each fraction)

Sample	RSE	AE100	AE70	AE50	AE30	AE10	AE0
Gallic acid	0.2127±0.0010	0.1695±0.0030	0.1583±0.0020	0.1573±0.0029	0.0939±0.0005	N.D.	N.D.
Methyl gallate	0.2032±0.0013	0.2240±0.0029	0.1898±0.0020	0.1839±0.0014	0.1758±0.0012	0.1470±0.0003	0.1521±0.0008
Ethyl gallate	0.0977±0.0002	0.1137±0.0017	0.0856±0.0011	0.0858±0.0012	0.0779±0.0006	0.0705±0.0005	0.0687±0.0002
Kaempferol	0.0626±0.0004	0.0650±0.0004	0.0557±0.0004	0.0584±0.0002	0.0567±0.0002	0.0560±0.00008	0.0553±0.0002
Emodin	0.1298±0.0010	0.3148±0.0028	0.1214±0.0007	0.1312±0.0010	0.1130±0.0014	0.0898±0.0007	0.0759±0.0005
Sum	0.71	0.89	0.61	0.62	0.52	0.36	0.35

N.D., not detected.

g), NE 함량 17.58 (mg/g)으로 가장 높은 함량을 갖고 있음을 확인하였다(Table 4). 이와 같은 결과는 에탄올에 잘 용해되는 항산화 성분이 다량 있음을 알 수 있다. 전체적으로 RSE보다 AE100, AE70, AE50은 우수한 항산화력과 더 많은 플라보노이드를 함유하고 있었다. 이는 70% 에탄올을 사용한 기존 추출법보다 더 낮은 유기용매를 사용해도 더 신속하고 우수한 수율로 추출할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 이들 결과 간의 상관분석 결과, 두 가지 항산화 활성은 상관계수가 0.9로 매우 높은 상관성을 나타냈으며, 폴리페놀 및 플라보놀 함량은 −0.7~0.9의 음의 상관관계를 보여 항산화력이 높을수록 이들 성분 함량이 증가한 것으로 판단된다. 특히 폴리페놀 함량과의 상관계수는 −0.86~0.88로, 높은 폴리페놀 함량이 항산화 활성에 크게 기여한 것으로 해석된다. AE100 및 AE70을 선정하여 RSE와 비교하여 미백 및 항알레르기 효과에 대한 시험을 수행하였다.

2. HPLC를 이용한 성분 확인

본 연구의 가속용매추출법에 의한 전 시료들에 대한 유효성분을 HPLC로 표준시료와 비교 분석한 결과(Table 5), 갈릭산(gallic acid), 메틸 갈레이트(methyl gallate) 및 에모딘(emodin)이 주로 검출되었고, 에틸 갈레이트(ethyl gallate) 및 캠페롤(kaempferol)이 소량 측정되었다. 갈릭산 유도체과 에모딘은 에탄올 농도가 높을수록 많이 검출되고 RSE와 AE100은 비슷한 함량을 보인다. 한편, 에모딘과 갈릭산은 멜라노제네시스(melanogenesis)를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고(Su *et al.*, 2013)됨을 고려해 볼 때, 전체 시료들의 항산화 활성, 미백, 항알레르기 효과는 갈릭산을 비롯한 유도체 및 flavonols가

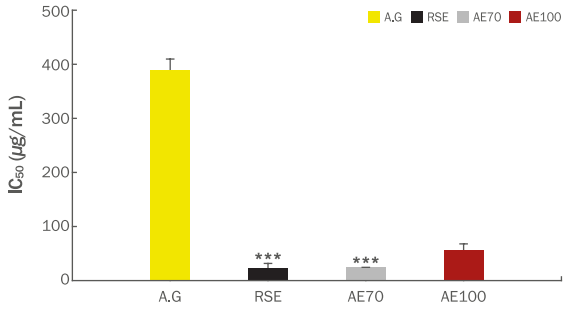

Figure 1. Anti-glycation activity of AE70, AE100, and RSE. AE70, AE100, and RSE exhibited 50% glycation inhibition (IC_{50}), demonstrating anti-glycation activity comparable to that of the positive control, AG. Data are presented as the mean±SD from three independent experiments (***p<0.001, compared with AG). AG, aminoguanidine; RSE, reflux solvent extraction; AE70, accelerated solvent extraction with 70% ethanol; AE100, accelerated solvent extraction with 100% ethanol; SD, standard deviation.

유효성분으로서 영향을 미친다고 사료된다.

3. 항당화 효과

항당화 효과를 측정한 결과(Figure 1), AE70, AE100, RSE 모두 양성대조군인 aminoguanidine 보다 높은 저해력을 보였으며 50%의 항당화효과를 보이는 농도인 IC_{50}를 비교한 결과 AE70과 RSE는 23.40, 22.18 μg/mL로 aminoguanidine의 388.2 μg/mL 보다 뛰어난 억제 효과를 확인하였다. 70% 에탄올 동일한 용매 조건의 ASE와 RSE 추출물 비교 시 항당화 효과는 비슷한 것으로 보인다.

4. Tyrosinase 저해 활성

항산화 효과가 우수한 AE70, AE100 및 RSE에 대해 tyrosianse 저해력을 측정하였다(Figure 2). 100, 200 μg/mL 농도에서 RSE보다 AE100는 통계적으로 우수한 저해력이 나타남을 확인하였다. 70% 에탄올 동일한 용매 조건의 ASE와 RSE 추출법에 따른 추출물 비교 시 tyrosinase 저해 활성 효과는 거의 비슷한 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 AE100의 경우, 미백 소재로서 tyrosinase 저해 활성 효과가 가장 우수한 것으로 나타났는데 갈릭산과 에모딘 등의 함량이 높은 것에서 기인하는 것으로 보인다.

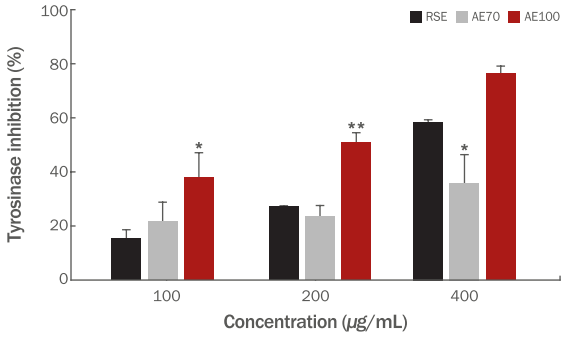

Figure 2. Tyrosinase inhibition of AE70, AE100, and RSE.
AE70, AE100, and RSE exhibited mushroom tyrosinase inhibitory activity. Data are presented as the mean±standard deviation (SD) from three independent experiments ($^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$, compared with RSE). RSE, reflux solvent extraction; AE70, accelerated solvent extraction with 70% ethanol; AE100, accelerated solvent extraction with 100% ethanol.

5. 세포 생존율 측정

상기 실험에서 항산화 활성 및 타이로시네이즈 저해활성 효과가 확인된 RSE, AE70, AE100을 농도별로 처리하여 WST-1 assay를

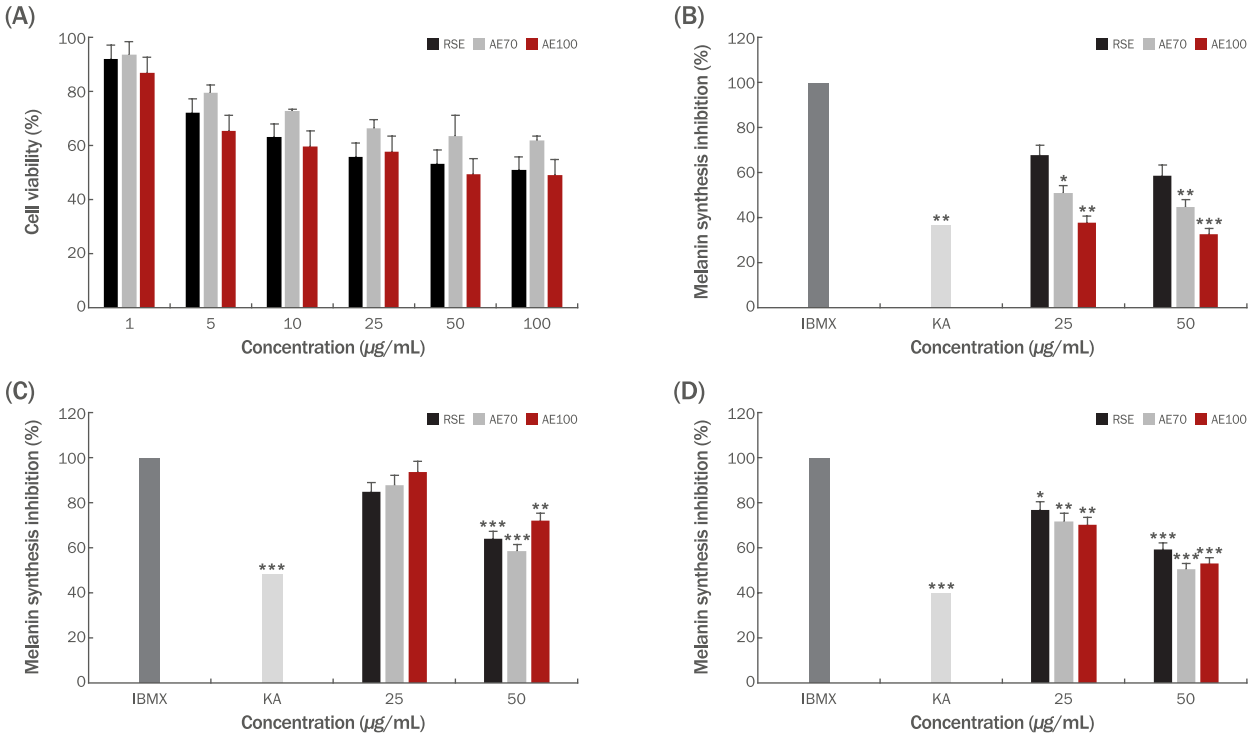

Figure 3. Inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells.
(A) B16F10 cell viability; (B) extracellular melanin secretion inhibition; (C) intracellular melanin synthesis inhibition; (D) total melanin content. Data are presented as the mean±SD from three independent experiments ($^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$, compared with IBMX). RSE, reflux solvent extraction; AE70, accelerated solvent extraction with 70% ethanol; AE100, accelerated solvent extraction with 100% ethanol; KA, kojic acid 200 μg/mL (positive control); IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; SD, standard deviation.

http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

통해 세포 생존율을 확인하였다(Figure 3A). 농도의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였으며 AE70의 경우, 동일 농도에서 세포 생존율이 더 높음을 확인하였다. 멜라닌 생성 억제능 평가에서 시료 처리 시간을 고려하여 25, 50 μg/mL의 농도로 실험을 진행하였다.

6. 멜라닌 생성 저해 효과

타이로시네이즈 저해활성 효과가 확인된 RSE, AE70, AE100을 대상으로 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 세포 외 멜라닌 분비에 미치는 영향(Figure 3B), 세포 내 멜라닌 생성에 미치는 영향(Figure 3C)과 총 멜라닌 생성량(Figure 3D)을 각각 확인하였다. 세포 외 멜라닌 분비에 미치는 영향에 대한 결과는 100 μM IBMX를 단독으로 처리하였을 경우를 100%로 계산하였을 때, 시료 처리군은 IBMX와 비교하였을 때 AE70과 AE100의 경우에 유의하게 농도의존적으로 멜라닌 분비를 감소시켰으며 세포 내 멜라닌 생성에 미치는 영향에 대한 결과는 시료 처리군은 IBMX와 비교하였을 때 RSE, AE70, AE100이 50 μg/mL의 농도에서 유의하게 멜라닌 생성이 저해됨을 확인하였다. 총 멜라닌 생성량은 IBMX와 비교하였을 때 RSE, AE70, AE100이 25, 50 μg/mL 모든 농도에서 유의하게 멜라닌 생성을 저해함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 RSE, AE70, AE100이 멜라닌 생성 저해 효과가 우수한 소재임을 의미한다.

7. 항히스타민 활성 측정

멜라닌 생성 억제는 자외선에 의한 피부 손상을 방지하는 보호 메커니즘과 상반되는 과정으로, 미백 화장품에 사용되는 일부 원료는 피부에 대한 독성을 야기할 수 있다(Ephrem *et al.*, 2017). 본 연구의 시료들에 대해 알레르기 유발 피부자극에 대한 평가를 진행하였다. β-hexosaminidase는 히스타민과 함께 분비되어 알레르기 반응의 대표적인 증상 중 하나인 가려움증을 유발하며, 비만세포의 탈과립(mast cell degranulation) 정도를 평가하는 지표로 널리 활용된다(Lv *et al.*, 2018). RBL-2H3 세포를 anti-dinitrophenyl (anti-DNP) IgE로 감작 시킨 후 DNP-human serum albumin (DNP-HSA)으로 자극하였을 때, 세포는 활성화되어 탈과립을 유도하고 β-hexosaminidase를 과량 분비하였다(Lv *et al.*, 2018). 억제 효과를 평가한 결과, 추출 방법에 관계없이 β-hexosaminidase의 분비가 감소하는 것이 확인되었다(Figure 4). 이와 같은 결과는 각 시료들은 항히스타민 효과가 우수하여 향후 알레르기 유발 염려가 없는 소재가 될 수 있다고 판단된다.

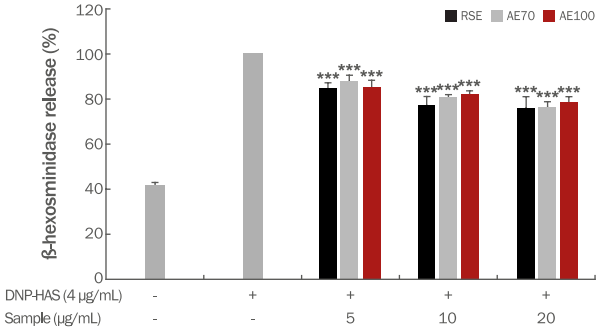

Figure 4. Inhibition of β-hexosaminidase release in RBL-2H3 cells.
Cells were stimulated with DNP-HAS in the presence or absence of the extraction samples, and β-hexosaminidase activity was measured. Data are presented as the mean±SD from three independent experiments (***p<0.001, compared with DNP-HAS-only-treated cells). RSE, reflux solvent extraction; AE70, accelerated solvent extraction with 70% ethanol; AE100, accelerated solvent extraction with 100% ethanol; SD, standard deviation.

Conclusion

본 연구는 가속 용매 추출법이라는 경제적이고 친환경적인 추출방법을 사용하여 추출법에 따른 적하수오 에탄올 추출물의 항히스타민 및 미백 효과를 비교하였다. 항산화 활성 측정 결과 가속용매추출법으로 추출한 적하수오 에탄올 추출물(AE70, AE100)이 제일 좋은 효과를 확인하였으며 AE100의 경우 가장 우수한 tyrosinase 저해 활성을 나타냈다. 또한, RSE, AE70, AE100 처리에 의한 B16F10에서의 멜라닌 생성량을 측정한 결과, 세포 외 멜라닌 분비에 미치는 영향에 대한 결과는 AE70과 AE100이 25, 50 μg/mL 농도에서 유의성 있게 농도의존적으로 멜라닌 분비를 감소시켰으며 세포 내 멜라닌 생성에 미치는 영향에 대한 결과는 RSE, AE70, AE100이 50 μg/mL의 농도에서 유의성 있게 멜라닌 생성을 저해하였다. 총 멜라닌 생성량은 IBMX와 비교하였을 때 RSE, AE70, AE100이 25, 50 μg/mL 농도에서 유의성 있게 멜라닌 생성을 저해됨을 확인하였다.

RBL-2H3 세포에서 항히스타민 활성을 측정한 결과, IgE-DNP에 의해 β-hexosaminidase가 증가된 것에 비해 가속용매추출물을 사용한 추출물과 환류용매추출법을 사용한 추출물이 β-hexosaminidase 방출에 대한 억제 효과를 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과는 적하수오 에탄올 추출물의 항산화, 항히스타민 및 미백 효과를 비교해본 결과, 적하수오 에탄올 추출물은 항히스타민효과가 우수하며 항산화와 미백 활성을 갖는 소재이며 가속용매추출법이 더 효과적임을 확인하였다. 향후 본 연구 결과를 피부모델 또는 인체적용 시험에 확장하여 임상적 효과를 검증할 경우, 실제적인 효능 확인을 통해 산업적 응용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서, 천연 소재에 가속용매 추출법을 적용하면 경제적이고 친환경적이며 효과적으로 사용할 수 있다고 판단되며 적하수오 에탄올 추출물은 알레르기로 인한 소양감 유발이 없는 미백 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 시사한다.

Author's contribution

BK designed, JL, YL and SL performed experiments, JL, YL and SL analyzed data, JL and YL made materials, and JL, YL and BK wrote the manuscript. JL, YL and BK created all figures.

Author details

Juyeon Lee (Graduate Student)/Yoonseo Lee (Graduate Student), Department of Chemistry, The Graduate School of Mokwon University, 88 Doanbuk-ro, Seo-gu, Daejeon, 35349, Korea; Sang Myung Lee (Professor), Division of Food and Pharmaceutical Technology, Mokwon University, 88 Doanbuk-ro, Seo-gu, Daejeon, 35349, Korea; Bora Kim (Professor), Department of Cosmetics, Mokwon University, 88 Doanbuk-ro, Seo-gu, Daejeon, 35349, Korea.

References

Ahn JY, Im LR, Kim JH, Xin M, Kwon SU, Kim DK, Song BS, Song BJ, Jung HJ, Hong SH, *et al.* Inhibitory effect of Gamigunggui-tang on allergic contact dermatitis. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology,* 24: 290-295, 2010.

Ephrem E, Elaissari H, Greige-Gerges H. Improvement of skin whitening agents efficiency through encapsulation: current state of knowledge. *International Journal of Pharmaceutics*, 526: 50-68, 2017.

Hong JJ, Ahn T. Changes in total flavonoid and total polyphenol contents of leafy vegetables (spinach, chard and whorled mallow) by blanching time. *Korean Journal of Food and Cookery Science*, 21: 190-194, 2005.

Kim B, Choi YE, Kim HS. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α and suppression of inflammatory cytokines. *Phytotherapy Research*, 28: 1359-1366, 2014.

Kim H, Kim MM. Promotive effect of *Polygonum multiflorum* radix ethanol extract on melanogenesis. *Journal of Life Science*, 27: 423-429, 2017.

Kim J, Kima JH, Jeung SE, Park IS, Choe CH, Kwon TH, Yu KY, Jeong SI. Inhibitory effects of stilbene glucoside isolated from the root of *Polygonum multiflorum* on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*, 52: 342-345, 2009.

Kim JS. Optimization of accelerated solvent extraction of ginsenosides from cultivated wild ginseng using response surface methodology. *Preventive Nutrition and Food Science*, 27: 315-322, 2022.

Kim J, Kim B. Anti-aging and antimicrobial effects of the stems and roots of *Sedum kamtschaticum* in cosmetic production. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 21: 371-382, 2023.

Kwon YJ, Kim KH, Kim H, Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Food Science and Preservation*, 9: 332-337, 2002.

Lee HH, Moon YS. Assessment of the important factors influencing consistent and accurate ABTS assay. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 48: 390-393, 2019.

Lv L, Cheng Y, Zheng T, Li X, Zhai R. Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Carbohydrate Polymers*, 99: 765-773, 2014.

Lv Y, Fu J, Jia Q, Che D, Lin Y, Han S, He L. Accurate quantification of β-hexosaminidase released from laboratory of allergic diseases 2 cells via liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A*, 1578: 106-111, 2018.

Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 631-634, 2003.

Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237, 2004.

Onuska F, El-Shaarawi AH, Terry K, Vieira EM. Optimization of accelerated solvent extraction for the analysis of munitions residues in sediment samples. *The Journal of Microcolumn Separations*, 13: 54-61, 2001.

Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczobutt J, HoffmannJ, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 396-404, 2004.

http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

Rui W, Xia W, Zhao W, Li B, Li J, Feng Y, Chen H, Zhao S, Quantitative analysis of the roots, stems, and leaves of *Polygonum multiflorum* by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters*, 51: 1633-1641, 2018.

Ryu MJ. Anti-stress and anti-histamine effects of *Phragmites communis*, *Salicornia herbacea*, and *Prunus mume*. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 14: 147-157, 2016.

Shin HS, Shon DH. Evaluation of antiallergic activities of natural and food materials. *Food Science and Industry*, 3: 50-55, 2015.

Song JS, Yoo DY. Inhibitory effect of *Polygonum multiflorum* on melanin synthesis and its action mechanism in B16F10. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*, 21: 59-75, 2008.

Su TR, Lin JJ, Tsai CC, Huang TK, Yang ZY, Wu MO. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ß-catenin signaling pathways in B16F10 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 20443-20458, 2013.

Thanh DTH, Thanh NL, Thang ND. Toxicological and melanin synthesis effects of *Polygonum multiflorum* root extracts on zebrafish embryos and human melanocytes. *Biomedical Research and Therapy*, 3: 808-818, 2016.

Zhang L, Liu X, Tu C, Li C, Song D, Zhu J, Zhou Y, Wang X, Li R, Xiao X, *et al*. Components synergy between stilbenes and emodin derivatives contributes to hepatotoxicity induced by *Polygonum multiflorum*. *Xenobiotica*, 50: 515-525, 2020.

Zhu ZW, Li J, Gao XM, Amponsem E, Kang LY, Hu LM, Zhang BL, Chang YX. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni* multiflori by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 62: 162-166, 2012.

Yoon J, Park J, Kim B. Skin whitening effect of *Sedum kamtschaticum* Fisch. solvent fractions. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 37: 1239-1247, 2020.

국문초록

적하수오 가속용매추출물의 피부 미백 및 β-hexosaminidase 분비에 미치는 영향

이주연[1], 이윤서[1], 이상명[1,2], 김보라[1,3*]
[1]목원대학교 대학원 화학과, 대전, 한국
[2]목원대학교 식품제약학부, 대전, 한국
[3]목원대학교 화장품학과, 대전, 한국

목적: 가속용매추출법(accelerated solvent extraction, ASE)은 고온·고압 조건에서 용매를 사용하여 목표 성분을 신속하게 추출할 수 있는 첨단 기술로, 높은 효율성과 재현성을 바탕으로 최적화된 추출법 개발에 유용한 도구로 활용되고 있다. 본 연구에서는 다양한 약리학적 효능으로 알려진 전통 한약재인 적하수오(*Polygonum multiflorum*)의 ASE와 기존의 환류용매추출법(reflux solvent extraction, RSE)을 비교하여 추출 효율 및 생리활성을 평가하였다. **방법:** 적하수오 뿌리를 다양한 농도의 에탄올을 용매로 하여 ASE 조건에서 추출하였으며, 우수한 항산화 활성을 나타내는 추출물을 선별하였다. 이후, B16F10 흑색종 세포를 이용하여 멜라닌 합성 저해 효과를 평가하였고, RBL-2H3 비만세포에서 β-헥소사미니다아제 분비 억제를 통해 항알레르기 활성을 검증하였다. **결과:** ASE 및 RSE로 얻은 적하수오 추출물 모두 항산화 활성을 보였다. 특히 ASE로 제조한 70% 및 100% 에탄올 추출물은 모든 시료 중 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한 ASE 추출물은 RSE에 비해 우수한 항당화 효과와 티로시나아제 저해 활성, 그리고 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 보였다. 또한 ASE 추출물도 β-헥소사미니다아제 분비를 유의하게 억제하여 항알레르기 잠재 효과를 확인할 수 있었다. **결론:** ASE와 RSE 방법을 이용하여 적하수오 뿌리의 항산화, 미백, 항히스타민 억제 활성을 비교 평가한 결과, ASE는 기존 환류추출법에 비해 경제적이고 환경친화적이며 효율적인 추출기법으로 제안될 수 있음을 확인하였다.

핵심어: 적하수오, 가속용매추출법, 항산화, 미백, 항알레르기

참고문헌

권영주, 김공환, 김현구. 마이크로웨이브 추출조건에 따른 곰취 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화작용의 변화. *한국식품저장유통학회지*, 9: 332-337, 2002.

김승희, 장혜진. 화장품 소재로서의 노니 추출물에 관한 특성연구. *대한화장품학회지*, 42: 183-193, 2016.

김자영, 김보라. 기린초 줄기, 뿌리 분획물의 항노화 및 항균 활성에 대한 화장품 응용 연구. *아시안뷰티화장품학술지*, 21: 371-382, 2023.

김혜정, 김문부. 적하수오 에탄올 추출물의 melanin 합성 촉진효과. *생명과학회지*, 27: 423-429, 2017.

송종석, 유동열. 赤何首烏의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. *대한한방부인과학회지*, 21: 59-75, 2008.

안지영, 임이랑, 김준호, 신명걸, 권세욱, 김대근, 송봉석, 송봉준, 정현주, 홍승헌, *et al*. 알레르기성 접촉성 피부염에 대한 가미궁귀탕(加味芎歸湯)의 억제효과. *동의생리병리학회지*, 24: 290-295, 2010.

윤지혜, 박지혜, 김보라. 기린초(*Sedum kamtschaticum* Fisch.) 추출 분획물의 피부 미백효과 연구. *한국응용과학기술학회지*, 37: 1239-1247, 2020.

이호현, 문용선. 정확하고 일관된 ABTS Assay에 영향을 미치는 중요한 요인 평가. *한국식품영양과학회지*, 48: 390-393, 2019.

홍정진, 안태현. 데치는 시간에 따른 엽채류(시금치, 근대, 아욱)의 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량 변화. *한국식품조리과학회지*, 21: 190-194, 2005.

http://dx.doi.org/10.20402/ajbc.2025.0103

中文摘要

何首乌加速溶剂提取物对美白作用及β-己糖胺苷酶分泌的影响

李周妍[1]，李允惜[1]，李相明[1,2]，金寶羅[1,3*]
[1]牧园大学大学院化学科，大田，韩国
[2]牧园大学食品制药学科，大田，韩国
[3]牧园大学大学化妆品工学科，大田，韩国

目的： 加速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)是一种先进的提取技术，可在高温高压条件下利用溶剂快速提取活性成分。由于其具有高效率和高重复性，ASE被认为是优化提取工艺的有效工具。本研究以具有多种药理活性的传统药用植物何首乌(*Polygonum multiflorum*)为研究对象，比较ASE与传统回流溶剂提取法(reflux solvent extraction, RSE)的提取效率及生物活性。**方法：** 采用ASE在不同乙醇浓度条件下提取何首乌根，并筛选出具有优异抗氧化活性的提取物。随后，在B16F10黑色素瘤细胞中评价其对黑色素生成的抑制作用；同时，通过检测RBL-2H3肥大细胞中β-己糖胺苷酶(β-hexosaminidase)释放量的变化，评估其抗过敏潜力。**结果：** ASE和RSE获得的提取物均表现出抗氧化活性。其中，采用ASE制备的70%和100%乙醇提取物显示出最高的抗氧化能力。此外，与RSE相比，ASE提取物表现出更优异的抗糖化活性和酪氨酸酶抑制活性，并且在B16F10黑色素瘤细胞中对黑色素生成具有更显著的抑制作用。同时，ASE提取物还能显著抑制β-己糖胺苷酶的释放，表明其具有潜在的抗过敏作用。**结论：** 本研究采用ASE和RSE两种提取方法评价了何首乌根的抗氧化、美白及抗组胺相关活性。综合来看，与传统回流提取法相比，ASE是一种更经济、更环保且更高效的提取技术，具有广阔的应用前景。

关键词： 何首乌，加速溶剂萃取，抗氧化，美白，抗过敏