

열풍건조 삼채의 분획별 미백 및 항산화 활성에 관한 연구

정수지 · 김경희 · 육홍선

충남대학교 식품영양학과

Whitening and Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Hot-Air Dried *Allium hookeri*

Su-Ji Jeong, Kyoung-Hee Kim, and Hong-Sun Yook

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

ABSTRACT The study analyzed the antioxidant and whitening activities of fractions from hot-air-dried *Allium hookeri* (HADAH). The total polyphenol contents in fractions from HADAH extract showed the highest value (171.07±7.55 mg/g GAE) in ethyl acetate fraction of roots. Antioxidant activities of leaf and root parts were significantly higher in the ethyl acetate fraction. HADAH showed higher whitening activity (*n*-hexane fraction of leaf; 52.22% melanin production) than arbutin (65.82% melanin production), which is known as a whitening ingredient. These results suggest that HADAH extracts can be used as antioxidant and whitening materials. Thus, study of HADAH extracts showing effective whitening and physiological activities can provide efficient data for industrial use of *Allium hookeri*.

Key words: *Allium hookeri*, antioxidant, whitening, solvent fraction

서 론

21세기는 건강과 아름다움에 대한 관심이 높아져 가고 있으며, 특히 피부미용 분야는 오늘날 세계인들이 공감하는 핵심 산업으로 피부 노화에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 피부 노화는 체내 대사 작용, 환경오염물질 노출, 각종 스트레스, 특히 자외선 등에 의하여 생성이 촉진된 free radical이 세포 생체막의 구성물질인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으키며 발생하는데, 이로 인해 피부에 존재하는 항산화 물질의 파괴, 지질과산화 반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 collagen과 elastin 및 hyaluronic acid 등의 결합사를 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 촉진 등으로 노화가 가속화된다고(2,3). 이에 피부 노화와 관련한 다양한 기능성 소재 탐색이 진행되고 있는데, 특히 인체에 관한 안전성의 문제로 합성 원료보다는 천연물에서 유래하여 개발하는 연구에 관심이 높아지면서 합성 원료를 대체할 적절한 미백 및 항산화 효과를 나타내는 물질을 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있다(4-6).

달고 맵고 짭컌름한 세 가지 맛이 난다 하여 삼채로 불리게 된 삼채(三菜, *Allium hookeri*)는 뿌리 부추라고도 부르며, 히말라야산맥 1,400~4,200 m 사이의 초고랭지에서 자

생하고 미얀마, 인도 등지에서 주로 섭취하고 있는 채소이다(7). 현지에서는 주밋(juumpyit)이라고도 불리며 우리나라의 파, 마늘처럼 쉽게 애용되는 채소로 식용뿐만 아니라 약용으로도 사용해왔다고 한다(8,9).

최근 우리나라에서도 삼채가 들어와 삼채 재배 농가가 늘어나고 있고 건강식품으로 삼채의 성분 및 효능에 대한 관심이 집중되는 가운데 국내유통시장에서도 삼채를 쉽게 볼 수 있을 뿐만 아니라 김치 양념, 삼채막걸리, 삼채음료와 같은 여러 가지 삼채를 이용한 제품개발 기술도 나오고 있다. Rhyu와 Park(10)의 연구에 의하면 삼채는 10종류의 alkyl thiosulfinate를 포함하고 있다고 보고되었으며, 이러한 유효 화합물에 의해 양파, 마늘, 파, 생강, 겨자, 고추냉이, 후추 등과 같이 혈액응고, 항콜레스테롤, 항산화, 항균작용 및 혈당 강하 작용 등의 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 여겨진다(11-14). 국내에서 재배된 삼채에 대한 연구로는 항염증 효과에 대한 연구가 주로 진행되어 천식, 아토피, 관절염과 같은 자가면역질환 등에 효과가 있을 것이라 보고되어 있으며(15,16), Park과 Yoon(9)은 삼채의 주요 수입국인 미얀마에서 재배된 삼채와 국내산 삼채의 영양 및 화학적 특성을 비교한 결과 조회분, 조지방, 탄수화물, 유기산 및 유리당의 함량은 국내 재배 삼채가, 단백질과 조섬유의 함량은 미얀마 재배 삼채가 높았다고 보고하였으며, 이외 무기질, 조사포닌, 아미노산 함량이 국내산 삼채에서 높아 국내 재배 삼채에 미얀마 재배 삼채보다 더 많은 영양성분 및 기능성 성분이 함유되어 있음을 확인하여 미얀마 재배 삼채와 국내 재배 삼채의 성분에 차이가 있음을 보고하고 있으나 아직까지 국

Received 17 February 2015; Accepted 14 May 2015

Corresponding author: Hong-Sun Yook, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6840

내산 삼채에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 시중에서 많이 유통되고 있는 삼채 잎과 뿌리의 열풍건조분말을 메탄올로 추출하여 용매 분획한 뒤, 이들 분획물들의 총 페놀 함량을 분석하고 항산화 활성과 미백 활성을 평가함으로써 삼채 뿌리와 잎의 산업적 이용 증대를 위한 기초자료로 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 삼채는 수세, 절단 과정을 거친 후에 대류식 건조기(LMD-603H, Daeyeong E&B Co., Ltd., Ansan, Korea)를 이용하여 70°C에서 24시간 동안 건조한 다음에 분쇄기(후드믹서, CM-8000, CHATMING ART Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 분쇄한 후 24 mesh(710 μm)의 체를 통과한 것을 4°C에서 냉장 보관하면서 사용하였다.

용매 분획별 추출물의 제조

열풍건조 한 삼채 뿌리와 잎을 시료 100 g에 10배 중량의 메탄올에 현탁하여 실온에서 24시간 동안 추출한 후 원심분리기(COMBI-514R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)로 원심분리(3,200 rpm, 20 min) 한 후 상등액은 여과지로 여과(Whatman No.4, Maidstone, UK)하여 rotary vacuum evaporator(EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압·농축한 후 동결건조하여 메탄올 추출물을 얻었다.

건조된 메탄올 추출 시료에 증류수를 넣어 녹인 후 *n*-hexane(Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Paeongtaek, Korea) 용액을 1:1이 되게 혼합한 다음 separating funnel

을 이용하여 분획한 후 rotary vacuum evaporator로 감압·농축해 *n*-hexane 분획물을 얻었다(Fig. 1). 동일한 방법으로 chloroform(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.), ethyl acetate(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.), *n*-butanol(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.) 그리고 water 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 각 시료 분획물은 melanin synthesis 실험에서는 1% DMSO(dimethyl sulfoxide, Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)에 용해하여 cell에 처리하였으며, 그 외의 실험에서는 50% DMSO에 용해하여 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량 분석

총 폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Ciocalteu's 방법(17)에 따라 측정하였다. 시료를 50% DMSO에 녹여 추출한 뒤 시료 0.2 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 증류수를 1:2로 섞은 혼합액 0.2 mL를 첨가하고 암실에서 3분 방치한 다음 10% Na₂CO₃(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.) 3 mL를 가하여 다시 암실에서 1시간 방치 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 이 검량곡선으로부터 건조시료 중량당 mg gallic acid equivalent(mg/g GAE)로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 측정

항산화 활성은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 이용하여 시료의 radical 소거 효과를 측정하는 Blois 법(18)을 활용하였다. DMSO에 희석시켜 농도별로 제조한 시료 0.75 mL에 60 μM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.25 mL를 가한 뒤 vortex mixer(Model G-560, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)로 10초간 진탕하고 암실에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래의 식을 이용하여 각 시료의 농도별 free radical scavenging activity 곡선을 그린 뒤 50%의 DPPH radical scavenging activity(DPPH IC₅₀)를 나타내는 값을 구하였으며, 기존의 항산화제인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 대조구로 사용하여 비교하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)=

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거능의 측정은 Fellegrini 등(19)의 방법에 의해 측정되었다. 즉 7 mM ABTS(Sigma-Aldrich Co.)와 140 mM potassium persulfate(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.) 용액을 혼합하여 어두운 곳에 14~16

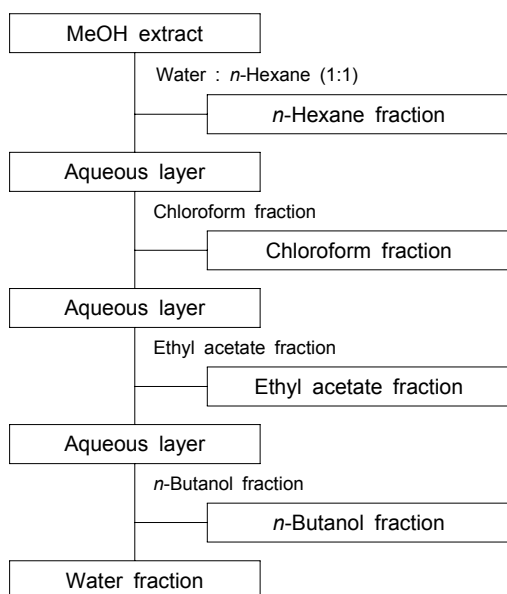


Fig. 1. Procedure for fractionation of methanol extract from *Allium hookeri* by various solvent.

시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)과 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 조절된 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 50 μ L와 ABTS solution 1 mL를 섞은 후 2.5분간 암실에 방치시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며 무처리구와 처리구의 값을 비교하여 free radical 소거 활성을 결정하였다. 이때 IC_{50} (mg/mL)은 아래의 식을 이용하여 각 시료의 농도별 free radical scavenging activity 곡선을 그린 뒤 50%의 radical 소거 활성을 나타내는 값으로 구하였으며, 기존의 항산화제인 ascorbic acid를 대조구로 사용하여 비교하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)=

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

FRAP(ferric-reducing antioxidant potential) 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(20)의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.3 M acetate buffer(pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)에 용해한 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ) solution(Sigma-Aldrich Co.)과 20 mM ferric chloride hexahydrate($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 10분간 incubation 시켜 FRAP reagent를 준비하였다가 사용하였다. 제조된 900 μ L FRAP reagent에 50 mg/mL의 농도로 추출시킨 시료 30 μ L와 증류수 90 μ L를 넣은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후 593 nm에서 spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid는 1 mg/mL 농도로 제조하여 대조군으로 사용하였고, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 및 5 mM의 농도로 반복하여 작성한 $FeSO_4$ 의 검량식에 대입하여 환산하였다.

Tyrosinase 억제 활성 평가

Tyrosinase 저해능은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 dopachrome을 비색법을 이용하여 측정하였다(21). 기질로써 10 mM L-DOPA(dihydroxyphenylalanine, Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 넣고, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 100 μ L를 혼합한 혼합액에 시료 40 μ L를 첨가하여 37°C에서 20분간 pre-incubate 시킨 다음, 효소액(mushroom tyrosinase, 100 unit/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 40 μ L 넣은 후 37°C에서 15분 동안 반응시켜 475 nm에서 측정하고 dopachrome의 변화를 저해능으로 환산하였다. Tyrosinase 저해능은 다음의 환산식에 의하여 계산되었다.

$$\text{저해능(\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C-D}\right) \times 100$$

A: 효소액을 첨가한 시료처리구의 흡광도

B: 효소액을 첨가하지 않은 시료처리구의 흡광도

C: 효소액 첨가 후 시료 대신 시료 희석액을 첨가한 흡광도

D: 효소액과 시료 대신 시료 희석액을 첨가한 흡광도

세포주 및 배양

B16F10 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, WelGENE, Deagu, Korea)과 1% antibiotic-antimycotic(100 unit/mL, 100 μ g/mL, Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)으로 37°C로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

세포 생존율(cell viability) 평가

B16F10 melanoma cell을 96 well plate에 배지 3.0×10^3 cells/well 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하면서 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 다음 시료를 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL로 처리한 후 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 72시간 이후 각 well에 EZ-Cytox(Daeil-lab Service, Seoul, Korea)를 10 μ L씩 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

응매 분획별 melanin 생성 억제 효과

6 well plate에 5.0×10^4 cells/well로 B16F10 세포를 접종한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하면서 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 삼채 분획별 추출물을 1% DMSO에 50 μ g/mL로 희석하여 처리하였다. B16F10 melanoma 세포의 세포 내 멜라닌의 과생성을 유도하기 위하여 100 nM의 α -MSH(α -melanocyte-stimulating hormone, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 72시간 후 원심분리 하여 cell pellet을 모은 뒤 멜라닌 정량에 사용하였다. 분리된 pellet에 1 N NaOH(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.) 200 μ L를 가해 60°C에서 1시간 반응하여 완전히 녹인 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준물질로부터 얻은 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 α -MSH 처리군 대비 백분율(%)로 계산한 것(22)을 다시 세포 생존율으로 표준화하여 나타내었다.

$$\text{멜라닌 생성 억제 효과} = \text{멜라닌 생성량} \times \frac{100}{\text{세포 생존율}}$$

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 IBM SPSS Statistics 20.0 software system(Statistical Package for Social, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에

서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

수율

삼채 메탄올 추출물의 수율은 잎은 37.33%, 뿌리는 25.46%이며 이를 100%로 환산하여 용매별로 분획한 후 추출 수율을 측정한 결과 잎과 뿌리 모두 water 분획물이 71.71% 및 86.00%로 가장 높았다(Table 1). 잎은 *n*-hexane 분획물이 14.98%, *n*-butanol 분획물이 7.27%, chloroform 분획물이 4.92%, ethyl acetate 분획물이 1.11%, 뿌리는 *n*-hexane 분획물이 5.04%, *n*-butanol 분획물이 3.40%, ethyl acetate 분획물이 2.98%, chloroform 분획물이 2.58%의 수율을 나타내어 두 가지가 비슷하지만 ethyl acetate, chloroform water 분획물에서 약간의 차이를 보였다.

총 페놀 함량

천연물에 많이 함유되어 있는 성분인 페놀성 화합물은 대사물질로 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 것으로, 자유라디칼을 소거하며 체내의 항산화 체계와 함께 자유라디칼로부터 조직을 보호해 주는 역할을 한다(23). 삼채 분획물의 잎과 뿌리에서의 총 페놀성 화합물 함량은 Fig. 2에 나타내었으며, gallic acid를 표준물질로 표준 검량식에 적용하여 건조시료 중 gallic acid 함량(gallic acid equivalent mg/g)으로 나타내어 총 폴리페놀 화합물 함량을 구하였다. 분획 전 메탄올 추출물의 경우 잎에서 19.08 ± 0.14 mg/g GAE, 뿌리에서 11.65 ± 0.36 mg/g GAE에 해당하는 페놀성 화합물을 갖고 있는 것으로 잎에서 뿌리보다 2배 정도 많은 페놀성 화합물을 갖고 있는 것으로 나타났다. 이는 인삼의 부위별 총 페놀 함량을 실험한 결과 인삼의 잎(147~200 mg%), 줄기(110~153 mg%), 뿌리(61~86 mg%)의 순으로 페놀 화합물 양이 높게 나타났다는 것과도 유사한 결과이다(24). 용매별 분획물 결과는 ethyl acetate 층이 잎에서 116.24 ± 7.46 mg/g GAE, 뿌리에서 171.07 ± 7.55 mg/g GAE로 가장 높은 수치를, water 층은 잎에서 11.02 ± 0.09 mg/g GAE, 뿌리에서 4.97 ± 0.00 mg/g GAE로 가장 낮은 수치

Table 1. Yield of each fractions extracted from *Allium hookeri*

| Solvent | Yield (% w/w) | |
|------------------------|---|-------|
| | Leaf | Root |
| Methanol ¹⁾ | 37.33 | 25.46 |
| | Fractions of methanol extract ²⁾ | |
| <i>n</i> -Hexane | 14.98 | 5.04 |
| Chloroform | 4.92 | 2.58 |
| Ethyl acetate | 1.11 | 2.98 |
| <i>n</i> -Butanol | 7.27 | 3.40 |
| Water | 71.71 | 86.00 |

¹⁾Yield (%)=(weight of solid extract/ weight of dry sample)×100.

²⁾Yield (%)=(weight of solid fraction/ weight of methanol extract)×100.

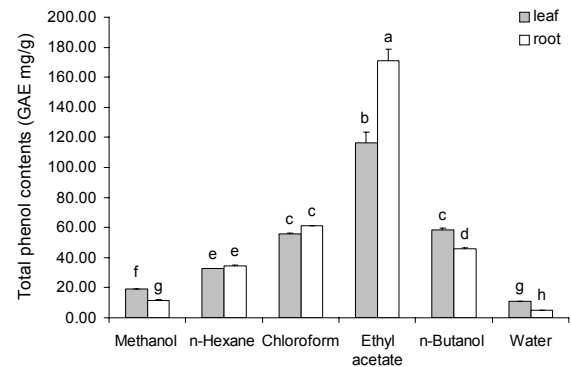


Fig. 2. Total phenolics compound contents on various solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*. Different letters (a-h) within a total sample differ significantly ($P < 0.05$).

를 나타내 용매 분획 시 ethyl acetate 분획물에 폴리페놀 함량이 다량 존재함을 확인할 수 있었다.

DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능은 항산화 활성을 평가하는 가장 흔한 방법으로 DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 radical 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 radical로 존재하며, 517 nm에서 최대 흡수를 나타내고 환원되면 517 nm에서의 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원 정도는 환원제의 환원력에 달려있어 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다(25-27). 삼채의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 검체 농도에 따른 항산화 활성 변화곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도인 IC_{50} 으로 Table 2에 나타내었다. 분획물 중 가장 활성이 높은 분획물은 ethyl acetate 분획물로, 뿌리가 0.06 ± 0.00 mg/mL, 잎이 0.29 ± 0.01 mg/mL의 IC_{50} 값이 나타나 뿌리의 ethyl acetate 분획물이 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 IC_{50} (0.01 mg/mL)과 비교해 보았을

Table 2. DPPH radical scavenging activity of the solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*

| Solvent | DPPH radical scavenging activity IC_{50} (mg/mL) ¹⁾ | |
|-------------------|--|----------------------|
| | Leaf | Root |
| Methanol | $5.98 \pm 0.12^{c2)}$ | 8.19 ± 0.35^b |
| <i>n</i> -Hexane | 5.46 ± 0.45^d | 2.20 ± 0.07^e |
| Chloroform | 0.84 ± 0.02^{fg} | 0.45 ± 0.01^{gh} |
| Ethyl acetate | 0.29 ± 0.01^h | 0.06 ± 0.00^h |
| <i>n</i> -Butanol | 1.22 ± 0.01^f | 1.06 ± 0.01^f |
| Water | 5.94 ± 0.63^c | 9.27 ± 0.08^a |

¹⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Values with different letters within the respective solvent extract and fractions are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

때 비교적 높은 DPPH 라디칼 소거능이 있다고 사료되며, Joo(28)는 약용식물의 항산화 활성을 평가한 결과 양성 대조군으로 사용된 비타민 C가 2.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC_{50})의 활성을 나타내었으며 화피, 헛개나무, 오가피, 황금, 감국 등이 5.39~43.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC_{50})의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다고 보고하고 있다. 그다음으로 높은 활성을 보이는 분획물은 잎과 뿌리 모두 chloroform 분획물 > *n*-butanol 분획물 > *n*-hexane 분획물 > water 분획물 순으로 나타났다. 이는 Song 등(29)의 홍화씨를 분획하여 얻어진 추출물의 DPPH radical 소거 활성에서 에틸아세테이트층에서 가장 높고 다음으로 부탄올 및 물 분획물의 순서라는 보고와 유사하였다.

ABTS radical 소거능

ABTS는 비교적 안정한 free radical로 혈장에서 ABTS radical의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS radical 소거 활성법은 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는 데 많이 이용되고 있다. ABTS를 peroxidase, H_2O_2 와의 반응에 의해 생성된 활성 양이온인 ABTS^+ 가 시료 중의 항산화성 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데, 이를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 ABTS^+ 라디칼 소거 활성을 측정할 수 있다(30). 삼채 추출물 및 분획물의 ABTS radical 소거능을 측정된 결과(Table 3), 잎과 뿌리 모두 ethyl acetate 분획물이 가장 낮은 IC_{50} (잎 0.05 \pm 0.01 mg/mL, 뿌리 0.01 \pm 0.00 mg/mL)으로 높은 활성을 나타내었고, chloroform 분획물(잎 0.29 \pm 0.15 mg/mL, 뿌리 0.12 \pm 0.00 mg/mL), *n*-butanol 분획물(잎 0.30 \pm 0.00 mg/mL, 뿌리 0.30 \pm 0.01 mg/mL), *n*-hexane 분획물(잎 1.27 \pm 0.11 mg/mL, 뿌리 1.14 \pm 0.02 mg/mL) 순으로 나타났고 water 분획물이 가장 낮은 활성을 보였다. 본 실험 결과와 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 활성(IC_{50} : 0.003 mg/mL)을 비교하였을 때

Table 3. ABTS [2,2'-azinobis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical scavenging activity of various solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*

| Solvent | ABTS radical scavenging activity IC_{50} (mg/mL) ¹⁾ | |
|-------------------|---|-------------------------------|
| | Leaf | Root |
| Methanol | 2.58 \pm 0.07 ^{d2)3)} | 2.91 \pm 0.07 ^c |
| <i>n</i> -Hexane | 1.27 \pm 0.11 ^e | 1.14 \pm 0.02 ^f |
| Chloroform | 0.29 \pm 0.15 ^g | 0.12 \pm 0.00 ^h |
| Ethyl acetate | 0.05 \pm 0.01 ^h | 0.01 \pm 0.00 ^h |
| <i>n</i> -Butanol | 0.30 \pm 0.00 ^g | 0.30 \pm 0.01 ^g |
| Water | 7.92 \pm 0.16 ^b | 12.94 \pm 0.10 ^a |

¹⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

²⁾Mean \pm SD (n=3).

³⁾Values with different letters within the respective solvent extract and fractions are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

ethyl acetate 분획물은 비교적 높은 활성이 있는 것으로 나타났다. *n*-Hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물 층의 경우 뿌리 부분에서 활성이 더 좋았고, *n*-butanol 층에서는 유의적 차이가 없었으며, water 분획물 층과 메탄올 추출물에서는 잎 부분의 활성이 더 좋게 나타나 DPPH radical 소거능과 유사한 결과를 나타내었다.

FRAP 측정

FRAP value의 측정은 colored ferrous TPTZ 복합체에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되는 과정을 분석함으로써 시료 내의 항산화력을 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 Fe^{3+} -TPTZ 복합체가 Fe^{2+} -TPTZ로 환원되는 원리에 기초하여 hydroxylation의 정도와 polyphenol에 결합하는 정도를 측정하는 것이다(31-33). 열풍건조 삼채 추출물 및 분획물의 FRAP value를 측정된 결과 잎과 뿌리 모두 각 분획물 중 ethyl acetate 분획물의 값이 4.00 \pm 0.04 및 10.08 \pm 0.41 mM로 가장 높았으며, chloroform 분획물 > *n*-butanol 분획물 > *n*-hexane 분획물 > MeOH 추출물 순의 활성을 나타내었다(Table 4). Water 분획물을 제외한 모든 분획물에서 잎보다는 뿌리의 FRAP value가 높게 나타났다. 분획물 중 가장 높은 활성을 나타낸 삼채 뿌리 ethyl acetate 분획물의 활성은 대조군인 ascorbic acid(7.04 mM, 1 mg/mL)보다 낮은 활성을 나타내었으나 단일 물질이 아닌 것을 감안하면 비교적 높은 활성을 가진 것으로 확인되었다.

Tyrosinase 저해 활성

열풍건조 삼채 뿌리 및 잎의 추출물과 분획물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하여 Table 5에 나타내었으며, 양성대조군으로는 tyrosinase 효소의 작용 저해 효과를 나타내는 대표적인 물질인 arbutin을 사용하였다. 열풍건조 삼채의 *n*-hexane 분획물은 잎에서 53.51 \pm 2.55%, 뿌리에서 49.19 \pm 2.39%로 분획물 중 유의적으로 높은 tyrosinase 억제 활성을 나타내었으며, chloroform 분획물 > ethyl acetate 분획물 > *n*-butanol 분획물 > MeOH 추출물 > arbutin > water 분획물 순서로 tyrosinase 저해 활성을 나

Table 4. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) on the *Allium hookeri* methanol extract by solvent fractionation

| Solvent | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mM) (5 mg/mL) ¹⁾ | |
|-------------------|--|-------------------------------|
| | Leaf | Root |
| Methanol | 0.31 \pm 0.01 ^{gh2)3)} | 0.37 \pm 0.01 ^g |
| <i>n</i> -Hexane | 0.87 \pm 0.00 ^f | 1.12 \pm 0.02 ^c |
| Chloroform | 2.83 \pm 0.16 ^d | 3.40 \pm 0.08 ^c |
| Ethyl acetate | 4.00 \pm 0.04 ^b | 10.08 \pm 0.41 ^a |
| <i>n</i> -Butanol | 1.00 \pm 0.06 ^{ef} | 1.13 \pm 0.02 ^c |
| Water | 0.18 \pm 0.00 ^{gh} | 0.11 \pm 0.00 ^h |

¹⁾Sample concentration.

²⁾Mean \pm SD (n=3).

³⁾Values with different letters within the respective solvent extract and fractions are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 5. Tyrosinase inhibition activities on various solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*

| Solvent | Tyrosinase inhibition activities (%) (2 mg/mL) ¹⁾ | |
|-------------------|---|--------------------------|
| | Leaf | Root |
| Methanol | 38.47±0.71 ^{ef(2)3)} | 36.59±1.44 ^f |
| <i>n</i> -Hexane | 53.51±2.55 ^a | 49.19±2.39 ^b |
| Chloroform | 48.06±1.60 ^{bc} | 42.11±1.17 ^d |
| Ethyl acetate | 45.49±0.50 ^c | 40.60±3.94 ^{de} |
| <i>n</i> -Butanol | 36.65±1.85 ^f | 35.28±0.78 ^f |
| Water | 36.15±0.47 ^f | 31.77±1.61 ^g |
| Arbutin | 37.09±1.21 ^f | |

¹⁾Sample concentration (arbutin and solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*).

²⁾Mean±SD (n=5).

³⁾Values with different letters within the respective solvent extract and fractions are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

타내었다. 이러한 결과는 썩 추출물의 hexane 및 chloroform 분획물(10 mg/mL)에서 각각 96.7%와 98.9%의 높은 활성을 보였다는 연구(34)와 유사한 결과이며, water 분획물을 제외한 나머지 분획물과 메탄올 추출물은 양성대조군으로 사용된 arbutin보다 높은 활성을 보여 피부 미백효과를 나타내는 기능성 화장품 원료 및 식품의 효소적 갈변화를 방지하는 기능성 제품으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

세포 생존능

멜라닌의 생성은 피부의 표피와 진피 사이에 주로 존재하는 melanocytes에서 이루어진다. Melanoma 세포주는 mouse 유래의 멜라닌 생성세포로 멜라닌을 생합성한다(35). 삼채 추출물과 용매별 분획물의 멜라닌 생성 억제 효과를 밝히고자 우선적으로 B16F10 melanoma cell의 생존율에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다(Fig. 3). 추출물 및 분획물을 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 세포에 처리한 후 72시간 동안 배양한 결과, 대조군에서의 생존율을 100%로 하여 비교하였을 때 62.5 µg/mL 농도의 모든 시료구에서 80% 이상의 생존율을 나타내었고, 특히 잎의 *n*-hexane 및 *n*-butanol 분획물과 뿌리의 *n*-hexane 분획

물에서 세포 사멸이 관찰되지 않은 결과를 토대로 melanin 생성 억제 효과 실험에서는 50 µg/mL의 arbutin 및 시료 처리구를 사용하여 실험하였다.

열풍건조 삼채 뿌리 및 잎의 추출물과 분획물의 melanin 생성 억제 효과

멜라닌은 자외선 등으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만 이의 과다 생성은 기미, 주근깨, 검버섯, 피부암 등의 질환을 유발한다. 세포 생존능 실험 결과를 토대로 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 50 µg/mL의 농도에서 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다(Fig. 4). 무리처군(non-treated group)에 비하여 α-MSH 처리군에서 멜라닌 농도가 유의적으로($P<0.05$) 증가한 것으로 보아 α-MSH에 의한 melanogenesis가 성공적으로 유도되었음을 보여준다. 또한 양성대조군으로 사용한 arbutin 처리 그룹에서 멜라닌 생성량이 유의적으로($P<0.05$) 감소되는 것이 관찰되었다. 분획물 중 뿌리의 *n*-hexane 층과 chloroform 층을 처리한 군에서 60.32%, 70.60%, 잎의 *n*-hexane 층과 chloroform 층에서 52.22%, 61.26%로 α-MSH만 처리한 대조군에 비해 melanin 생성 억제를 보이며 65.82%를 생성한 arbutin보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다($P<0.05$). 반면 분획하기 전의 MeOH 추출물과 water 분획물 및 뿌리의 ethyl acetate와 *n*-butanol 분획물은 melanin 생성 억제 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다. 삼채와 같은 속인 양파의 주요 성분인 quercetin은 tyrosinase의 monophenolase와 diphenolase 활성을 억제하고 B16F10 세포에 50~100 µL/mL 농도로 처리하였을 때 최대 50%까지 멜라닌의 합성을 억제한다는 보고(36,37)가 있으며 삼채의 경우에도 삼채 내 함유되어 있는 페놀 화합물이나 유향 화합물이 삼채의 미백 활성에 기여할 것으로 여겨지나 삼채의 미백 활성 성분에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. Seo 등(38)의 연구에서 더위지기 추출물을 분획하여 50 µg/mL 농도에서 melanin 저해 활성을 측정한 결과 에탄올 추출물에서 36.8%, 대조구인 ascorbic acid는 17.4%, 물 추출물은 10.5%의 억제 효과를 나타내었다는 결과와 죽향 추출물 50 µg/mL의 농도에서 31%의 활성을 나타내었다는 결과(39)를 비교했을 때 삼채

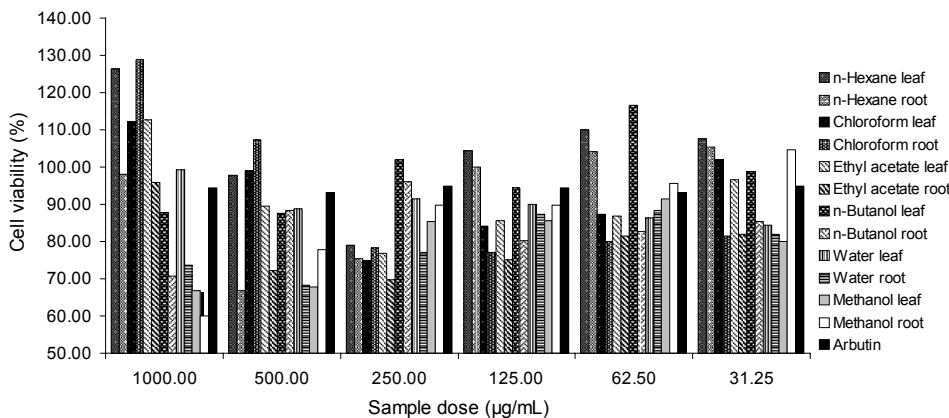


Fig. 3. Cell viability on various solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri*. B16F10 cells seeded at 3.0×10^3 cells/well.

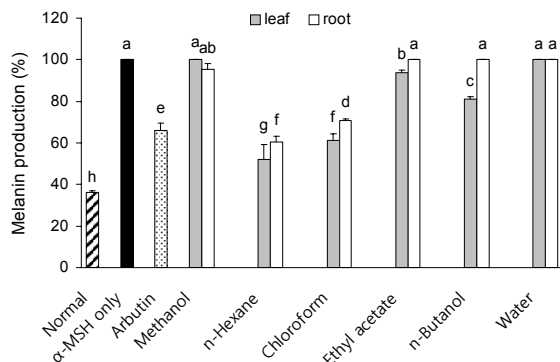


Fig. 4. Melanin production on various solvent fractions from methanol extract of *Allium hookeri* in B16F10 melanoma cell treated with α -MSH. B16F10 cells seeded at 3×10^5 cells/well. The cells were treated with 100 nM α -MSH, 50 μ g/mL of arbutin and samples for 72 h. Different letters (a-h) within a total sample differ significantly ($P < 0.05$).

분획물은 높은 미백 활성을 보인 것으로 확인되었다. 따라서 열풍건조 삼채 뿌리 및 잎의 추출물과 분획물의 melanin 생성 억제 효과는 tyrosinase 저해 활성 결과와 비슷하게 *n*-hexane 및 chloroform 분획물에서 높은 활성을 나타내어 삼채 추출물의 세포 내 melanin 생성 저해능이 melanin 생성 과정에서 중요한 역할을 담당하는 단백질인 tyrosinase의 활성 저해와 관계가 있을 것이라 여겨지며 삼채 뿌리 및 잎의 *n*-hexane 층과 chloroform 층은 미백 활성 관련 산업에서 유용한 자원으로 사용될 수 있을 것이다.

요 약

열풍건조 삼채 잎 및 뿌리 부분의 메탄올 추출물과 순차적 분획물에 대하여 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성을 측정하고, 미백 활성을 측정하여 삼채의 생리활성 효과와 화장품 원료 등의 기능성 소재로의 활용 가능성을 조사하였다. 열풍건조 삼채 잎 및 뿌리 부분의 총 폴리페놀 함량은 뿌리의 ethyl acetate 분획물에서 171.07 ± 7.55 mg/g GAE로 가장 높게 나타났다. 항산화 활성 측정 결과 잎과 뿌리 부분 모두 ethyl acetate 분획물에서 높은 활성을 나타내었다. 미백 활성 측정 결과 잎 부분의 *n*-hexane 분획물에서 tyrosinase 저해 활성은 2 mg/mL의 농도에서 $53.51 \pm 2.55\%$ 로 높은 활성을 나타내었으며 melanin 생성 억제 효과도 52.22%의 멜라닌 생성으로 양성대조군으로 쓰인 알부틴의 65.82%보다도 더 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 이상의 연구 결과로 삼채의 메탄올 추출물 및 용매 분획물은 항산화 활성을 가지고 있고, tyrosinase 저해 활성 및 melanin 생성 억제 효과를 나타내어 건강기능식품 및 화장품 관련 제품으로서의 개발 가능성이 있음을 확인하였다.

REFERENCES

1. Kim EJ, Ahn SY, Nam GW, Lee HK, Moon SJ, Kim YM,

- Oh MS, Kim NS, Chang IS, Park SK. 2006. The anti-aging effect of the cosmetic products containing the needles of red pine on human skin. *Kor J Herbology* 21: 25-31.
2. Papa S, Skulachev VP. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174: 305-319.
3. Fantone JC, Ward PA. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 395-418.
4. Bae SM, Kim JH, Cho CW, Jeong TJ, Ha JU, Lee SC. 2001. Effect of microwave treatment on the antioxidant activity of rice processed by-products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1026-1032.
5. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
6. Morrissey PA, O'Brien NM. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 8: 463-472.
7. Ayam VS. 2011. *Allium hookeri*, Thw. Enum. A lesser known terrestrial perennial herb used as food and its ethnobotanical relevance in Manipur. *Afr J Food Agric Nutr Dev* 11: 5389-5412.
8. You BR, Kim E, Jang JY, Choi HJ, Kim HJ. 2013. Quality characteristics of kimchi with *Allium hookeri* root powder added. *Korean J Food Preserv* 20: 863-870.
9. Park JY, Yoon KY. 2014. Comparison of the nutrient composition and quality of the root of *Allium hookeri* grown in Korea and Myanmar. *Korean J Food Sci Technol* 46: 544-548.
10. Rhyu DY, Park SH. 2013. Characterization of alkyl thio-sulfinate in *Allium hookeri* root using HPLC-ESI-MS. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56: 457-459.
11. Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. 2004. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 134: 149-152.
12. Welch C, Wuarin L, Sidell N. 1992. Antiproliferative effect of the garlic compound *S*-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett* 63: 211-219.
13. Banerjee SK, Maulik SK. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J* 1: 4.
14. Keusgen M. 2002. Health and alliums. In *Allium Crop Science-Recent Advances*. CABI, Wallingford, UK. p 357-378.
15. Bae GC, Bae DY. 2012. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium hookeri* cultivated in South Korea. *Kor J Herbology* 27: 55-61.
16. Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 577-583.
17. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
18. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
19. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
20. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
21. Flurkey WH. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 56: 93-95.

22. Park YJ, Yoon MY, Lim HW, Lee JY, Kim CJ, Sim SS. 2004. Effect of hot-water extracts from *Laminaria japonicus* on melanin production in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji* 48: 374-378.
23. Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1-7.
24. Lee SE, Lee SW, Bang JK, Yu YJ, Seong NS. 2004. Antioxidant activities of leaf, stem and root of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 237-242.
25. Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, Seo Y. 2003. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 165-169.
26. Wang LF, Zhang HY. 2003. A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 3789-3792.
27. Müller L, Theile K, Böhm V. 2010. *In vitro* antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Food Res* 54: 731-742.
28. Joo SY. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 41: 512-519.
29. Song JC, Park NK, Hur HS, Bang MH, Baek NI. 2000. Examination and isolation of natural antioxidants from Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8: 94-101.
30. Kim JE, Joo S, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 989-995.
31. Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. 2012. Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci Biotechnol* 21: 19-26.
32. Nicoli MC, Anese M, Manzocco L, Lericri CR. 1997. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *LWT - Food Sci Technol* 30: 292-297.
33. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
34. Kwak JH, Seo UK, Han YH. 2001. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 220-223.
35. Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. 1987. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 39: 414-418.
36. Yang YM, Son YO, Lee SA, Jeon YM, Lee JC. 2011. Quercetin inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Phytother Res* 25: 1166-1173.
37. Arung ET, Furuta S, Ishikawa H, Tanaka H, Shimizu K, Kondo R. 2011. Melanin biosynthesis inhibitory and antioxidant activities of quercetin-3'-O-beta-D-glucoside isolated from *Allium cepa*. *Z Naturforsch C* 66: 209-214.
38. Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. 2012. The antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomagi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 44: 89-93.
39. Lee KM, Lee EC, Cho SC, Moon SS. 2008. The antimelanogenic effects of compounds extracted from bamboo inner film. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 34: 287-301.