

밤나무 잎 추출물의 항산화 활성 및 화장품에의 응용(1)

김진영·박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2008년 10월 17일 접수, 2008년 12월 5일 채택)

Anti-oxidative Activities of *Castanea crenata* Leaf Extract / Fractions and Application on Cosmetics

Jin Young Kim and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature & Life Science, Seoul National University of Technology,
172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received October 17, 2008; Accepted December 5, 2008)

요약: 본 연구에서는 밤나무 잎 추출물의 항산화 활성 및 주름과 미백에 관련된 tyrosinase와 elastase의 활성에 대한 억제 효능을 측정하였으며, 밤나무 잎 추출물에 함유된 플라보노이드 성분에 대한 분석을 실시하였다. 항산화 활성 측정 결과로, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)을 이용한 free radical 소거활성은 50 % ethanol 추출물(13.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethyl acetate 분획(6.2) < aglycone 분획(2.1)으로 나타났고, luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종(ROS)의 소거활성은 aglycone 분획(0.8) < 50 % ethanol 추출물(0.5) < ethyl acetate 분획(0.3) 순으로 나타났다. NBT법을 이용한 xanthine과 xanthine oxidase의 반응으로부터 생성된 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 의 소거활성은 aglycone 분획(65.5)이 ethyl acetate 분획(145.5)보다 더 높게 나타났으며, rose-bengal과 빛으로 유도된 사람 적혈구의 용혈에 대한 세포보호 활성은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 aglycone 분획이 가장 높은 세포보호 활성을 나타내었다. Elastase 저해활성은 aglycone 분획이 oleonic acid (13.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 훨씬 좋은 9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 뛰어난 주름 개선효과가 있을 것으로 생각된다. Tyrosinase 저해활성은 aglycone 분획이 미백 관련 화장품 고시 원료인 arbutin (226.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 훨씬 좋은 21.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 뛰어난 미백 효과가 있을 것으로 생각되어 B16 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 합성 저해 활성을 측정하였다. 측정에 앞서 세포 독성 실험에서는 ethyl acetate 및 aglycone 분획이 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서 80 % 이상의 세포 생존율을 나타내었고, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서의 멜라닌 합성 저해활성 측정 결과, ethyl acetate 및 aglycone 분획이 arbutin보다 훨씬 높은 저해 활성을 나타내었다. 이러한 항산화 및 항노화 활성을 나타내는 밤나무 잎 추출물의 플라보노이드 성분을 TLC와 HPLC를 통해 분석한 결과, kaempferol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin이 함유되어 있었고, 그 중에서도 quercitrin이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 밤나무 잎 추출물이 free radical, ROS를 소거하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다. 또한 자외선으로 인한 기미, 주근깨 과형성 및 주름 생성에 있어 상당한 저해 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase and elastase and components of *Castanea crenata* leaf were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH) scavenging activity (FSC_{50}) of extract / fractions of *Castanea crenata* leaf was in the order: 50 % ethanol extract (13.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethyl acetate fraction (6.2) < aglycone fraction (2.1). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC_{50}) of extract / fractions from *Castanea crenata* leaf extract / fractions on ROS generated in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activity was in the order: aglycone fraction (0.8) < 50 % ethanol extract (0.5) < ethyl acetate fraction (0.3). The scavenging activity (IC_{50}) for $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical) generated by NBT method was in the order: ethyl acetate frac

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

tion (145.5) < aglycone fraction (65.5). The protective effects on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethyl acetate fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ_{50} , 191.9 \pm 12.2 min at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The inhibitory effect of aglycone fraction (9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on elastase was higher than oleanolic acid (13.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). And the inhibitory effect of aglycone fraction (21.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on tyrosinase was higher than arbutin (226.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). But 50 % ethanol extract rarely exhibited the inhibitory activity on tyrosinase and elastase. Flavonoids were contained in *Castanea crenata* leaf (96.3 mg / 100 g dried *Castanea crenata* leaf). And flavonoids contained in ethyl acetate fraction were kaempferol, quercetin, quercitrin, and so on. Quercitrin is the most abundant component. These results indicate that extract / fractions of *Castanea crenata* can function as anti-oxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging free radical and ROS, *Castanea crenata* leaf extract / fractions could be used as a new cosmeceutical for whitening and anti-wrinkle products.

Keywords: *Castanea crenata*, anti-oxidative activity, tyrosinase, flavonoids, cosmetics

1. 서 론

피부는 인체를 덮고 있는 최외곽에 있는 조직으로서, 여러 유해 환경과 접촉하고 있으며, 특히 산소와 항상 접촉하고 있다. 또한 자외선에 노출됨으로써 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 계속 받게 된다. 태양광선에 노출되면 피부에서는 비타민 D가 형성되어 골격 형성, 근육 및 근력 성장에 도움을 주는 역할도 하지만, 과다하게 노출되면 활성산소종(reactive oxygen species)이 과량 생성된다. 활성산소종은 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen) 및 $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)을 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide)가 있고, 그 외에 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함하며, 에너지가 크고, 반응성이 매우 큰 성질이 있다. 이들 활성산소종 중에서 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 초래하여 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속시킨다[1-7]. 특히 피부에서는 주름과 관련하여 활성산소종에 의해 단백질 분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 발현이 유발되어 피부에 탄력을 부여하는 콜라겐 또는 엘라스틴 등을 변성 또는 파괴시켜 주름을 야기시킬 수 있다. 콜라겐(혹은 엘라스틴 등)은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 따라서 이러한 MMPs의 발현을 억제시키기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는 실정이다[8].

밤나무(*Castanea crenata*)는 참나무목 참나무과의 낙엽교목으로, 우리나라 전역에 분포하고 있다. 밤나무에서 밤 과육 외에도 수피, 뿌리, 꽃, 잎을 달인 액이나 분말은 창상 및 염증의 치료에 효과가 있다고 알려져 있다[9]. 최근 연구된 바에 의하면, 밤 과육에는 gallic acid, catechin, ellagic acid가 함유되어 있고, 대식세포 식세포 활성을 증가시킨다는 연구 결과도 보고된 바 있다. 또한, 밤 껍질에는 salicylic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, gallic acid, ferulic acid, ellagic acid 등이 함유되어 있고, DPPH 소거 활성이 있는 것으로 보고되었다[10,11].

밤나무 잎에 대한 항산화 연구로는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) 소거활성, 항미생물 효과가 보고된 바 있으며[9], 성분으로는 quercitrin과 isoquercitrin이 알려져 있다[12]. 하지만 생체에서 각종 ROS (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ 등)가 생성되는 계(Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계)에서의 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구와 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 소거활성 및 빛으로 유도된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포손상에 관한 연구는 보고되지 않고 있으며, 화장품에 관한 어떠한 응용 사례도 보고되지 않았다.

따라서, 본 연구에서는 밤나무 잎 추출물의 활성 분획을 추출하여 피부노화에 있어서 주도적인 역할을 하는 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호작용, 총항산화능 및 free radical과 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 의 소거활성에 대하여 몇 가지 다른 항산화제들과 비교하여 밤나무 잎 추출물의 항산화능을 비교 평가하였다. 그리고 이러한 항산화능을 나타내는 플라보노이드 물질에 대한 함량 및 성분 분석을 실시하였으며, 주름 생성에 주된 역할을 하는 elastase의 활성에 대한 억제 효능을 측정하였고, 미백 효능에 대해서는 tyrosinase 활성 억제 효능과 B16 melanoma cell을 이용한 멜라닌 합성 저해 효능을 측정하였다. 피부노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품소재를 개발하고자 하였다.

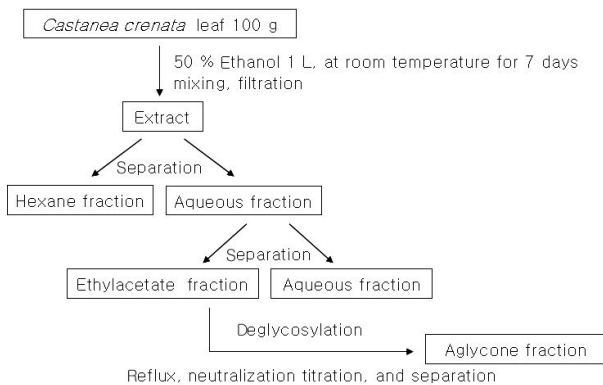


Figure 1. Scheme for preparation of compounds from *Castanea crenata* leaf.

2. 실험장치 및 실험방법

2.1. 기기 및 시약

실험에 사용한 시약으로 quercetin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, hyperin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), FeCl₃ · 6H₂O, EDTA, luminol, heparin, rose-bengal, L-tyrosine, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, tyrosinase, trizma base, elastase 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, H₂O₂는 Fluka에서, Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O는 Dae Jung Chemicals & Metals (Korea)에서 구입하였다. 또한 성분분리에 사용된 silica gel thin layer chromatography plate는 Merck (Germany)에서 구입하였고, ethanol (EtOH), ethyl acetate (EtOAc), hexane 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

기기는 high pressure liquid chromatography (DIONEX, Germany), UV-visible spectrophotometer (Varian, Australia), Spectronic 20D (Milton Roy Co., USA)를 사용하였다.

2.2. 시료 준비

본 연구에서 사용한 밤나무(*Castanea crenata*) 잎은 2007년 9월 경에 서울시 노원구 공릉동 서울산업대학교 교내에서 채취한 것을 음건하여 사용하였다. 건조시킨 밤나무 잎은 Figure 1과 같은 방법으로 추출하였다. 잎은 50 % ethanol과 1 : 10의 비율로 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액의 일부는 감압·농축하여 50 % ethanol extract로 사용하였고, 일부는 hexane으로 비극성 성분을 제거하였고, 이후 ethyl acetate로 추출하여 얻은 추출액을 감압·농축하여 파우더를 얻어 실험에 사용

하였다. 또한 ethyl acetate 분획의 일부는 산가수분해시켜 당을 제거시킨 aglycone 분획을 만들었다. Ethyl acetate 분획에 함유되어 있는 배당체는 aglycone에 당(sugar)이 결합되어 있어 수용성이 커 세포막에 투과가 용이하지 못하기 때문에 피부 또는 세포막으로의 투과를 향상시킬 목적으로 당을 산가수분해시켜 제거한 aglycone 분획을 제조하고 이를 제품에 응용 가능한지를 검토하고자 하였다.

Aglycone 분획은 ethyl acetate 분획 일정량에 5 % H₂SO₄와 50 % acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류시킨 용액을 5 % KOH 용액으로 중화시킨 후, ethyl acetate 분획을 얻어 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 항산화능 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol과 시료를 각각 1 mL씩 첨가한 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성

총항산화능은 luminol이 ROS에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 먼저 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 시료를 농도 별로 넣는다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 화학발광기의 6개의 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

2.3.3. NBT법을 이용한 Superoxide Anion Radical 소거 활성

Superoxide anion radical 소거 활성은 NBT 법을 이용하여 측정하였다[13]. Xanthine과 xanthine oxidase의 반응에서 생성된 superoxide anion radical로 인해 nitro-

blue tetrazolium (NBT)이 formazan의 형태로 환원되고, 환원된 formazan의 흡광도를 560 nm에서 측정하여 밤나무 잎 추출물에 대한 superoxide anion radical 소거 활성을 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer에 용해시킨 0.4 mM xanthine과 0.24 mM nitroblue tetrazolium에 시료와 0.049 units/mL의 xanthine oxidase를 넣은 후 37 °C에서 20 min 동안 배양시킨다. 배양 후, 69 mM sodium dodecylsulfate (SDS)를 넣고, 565 nm에서 흡광도를 측정한다. 소거활성은 xanthine oxidase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포막 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합하다고 판단하여, 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 의한 세포 손상(또는 파괴)에 대한 보호 효과를 측정하였다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다.

2.4.2. 밤나무 잎 추출물의 광용혈 억제효과

적혈구 현탁액 3.5 mL에 시료를 농도별로 50 μL 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 사전반응(pre-incubation) 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (10 μM) 0.5 mL를 가하고 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간 동안 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하여 적혈구의 파괴정도를 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례하기 때문에 밤나무 잎 추출물의 광용혈에 미치는 효과를 투광도로부터 구할 수 있다. 결과는 적혈구의 50 %가 용혈 되는 시간인 τ_{50} 로

나타내었다. 대조군은 τ_{50} 이 31 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다.

2.5. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에 있어 주된 역할을 하는 matrix metalloproteinases (MMPs)인 elastase의 활성 저해 능력을 다음과 같이 측정하였다. 0.13 M (pH 8.0) Tris-Cl buffer에 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM을 용해시킨 용액 1.9 mL에 추출물 0.1 mL를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 시킨다. 10 min 후 elastase 용액을 100 μL 첨가하고, 다시 25 °C에서 10 min 동안 post-incubation 한 뒤 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해 활성은 elastase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌은 L-tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase가 핵심 효소로 작용하여 생성되기 때문에 tyrosinase의 활성을 저해하는 능력을 측정하였다. 실험방법은 potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.1 M에 L-tyrosine (0.3 mg/mL)을 용해시킨 용액 1.9 mL에 추출물 0.1 mL과 tyrosinase (1,250 units/mL) 0.1 mL를 가한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양시킨다. 10 min 후 반응혼합물을 얼음 수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정한다. Tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.7. 세포독성 및 멜라닌 생성 저해 활성

2.7.1. 세포 배양

B16F1은 쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5 % fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1 % penicillin streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 μM α -MSH (Sigma, USA)를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.7.2. 세포생존율 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann[14]의 방법을 변

형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1×10^5 cell/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 시료를 처리하고 24 h 동안 37 °C CO₂ 배양기에서 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 3 h 후, 원심 분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7.3. B16 Melanoma Cell에서 멜라닌 생성 저해 효과
멜라닌 정량은 Yasunobu[15]의 방법을 사용하였다. 6 well plate에 3×10^5 cell/well로 세포를 분주하여 배양한 후 시료를 처리하고, 48 h 동안 37 °C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1,200 rpm에서 5 min 동안 원심 분리하여 침전한 후, 1 mL homogenization buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1 % triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet 에 1 N NaOH (in 10 % DMSO) 200 µL를 첨가하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위세포 (1×10^4 cells)에서 생성량을 비교하였다.

2.8. 밤나무 잎 추출물의 성분 분리

2.8.1. 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드 함량은 AlCl₃법[16]에 의해 측정하였다. Methanol에 ethyl acetate 분획을 용해시킨 용액과 AlCl₃ · 2H₂O를 용해시켜 만든 2 % AlCl₃ · 2H₂O용액을 각각 1 mL씩 반응시킨 후, 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 quercetin을 농도별로 처리하여 농도별 흡광도에 따른 검량곡선을 만든 뒤 ethyl acetate 분획과 AlCl₃ · 2H₂O 반응 후 측정된 흡광도와 비교하여 밤나무 잎에 함유된 플라보노이드 함량을 계산하였다. 결과는 밤나무 잎 건조 중량 100 g 당 quercetin의 mg으로 표시하였다.

2.8.2. Thin Layer Chromatography (TLC)

Silica gel TLC plate을 이용하여 ethyl acetate 분획의 성분 분리에는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), aglycone 분획은 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)의 조건으로 전개용매를 제조하여 전개하였고, TLC plate 에서 분리된 띠의 위치는 retention factor (R_f) value를 구하여 확인하였다. 또한 발색시약을 이용해 발색시켜 물질의 구조상 특징적으로 나타내는 색상을

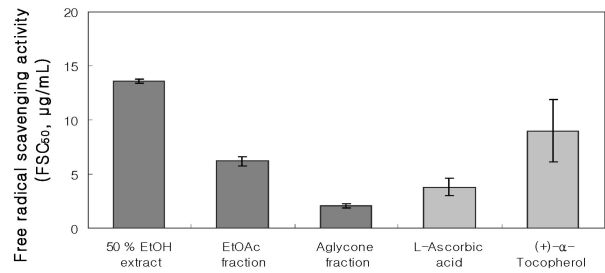


Figure 2. Free radical scavenging activities of extract and fraction from *Castanea crenata* leaf and references.

확인하여 플라보노이드 물질을 추측하였고, 이렇게 추측된 물질들은 2차적으로 ethyl acetate 분획과 표준물질을 함께 전개시켜 확인하였다.

2.8.3. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC 분석은 C18로 충전된 column (250 nm × 4.6 nm, 5 µm, Phenomenex)을 이용하였고, 주입량은 20 µL였다. 이동상은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 전개용매로 사용하였으며, 70 : 30 ~ 10 : 90의 비율로, 유속 1 mL/min로 분리하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 밤나무 잎 추출물의 수득률

음지에서 건조시킨 밤나무 잎을 50 % ethanol로 침적시켜 얻은 추출물의 수득률은 9.0 %이었고, ethyl acetate 분획의 수득률은 1.8 %이었다. 또한 ethyl acetate분획 중 일정량을 취해 당체거 반응을 통해 배당체의 당을 제거시킨 aglycone 분획은 0.53 %이었다.

3.2. 밤나무 잎 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

밤나무 잎 추출물 및 분획에 대한 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 2와 같다. 50 % ethanol 추출물은 13.6 µg/mL, ethyl acetate분획은 6.2 µg/mL, aglycone 분획은 2.1 µg/mL로, 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (3.8 µg/mL), 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (9.0 µg/mL)과 비교해 볼 때, 유사한 소거활성을 가진 것으로 나타났으며, 그 중 aglycone 분획은 소거활성이 상당히 뛰어난 것으로 나타났다.

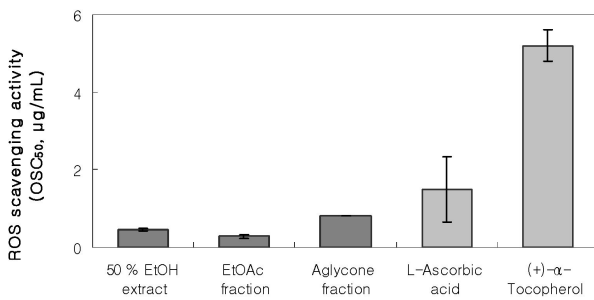


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of extract and fractions from *Castanea crenata* leaf and references in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

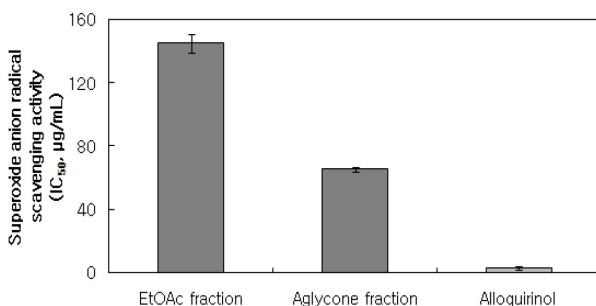


Figure 4. Superoxide anion radical scavenging activity of fractions from *Castanea crenata* leaf and references.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성

Luminol 발광법을 이용한 밤나무 잎 추출물의 농도에 따른 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 ROS 소거활성 (OSC₅₀)을 Figure 3에 나타내었다. 50 % ethanol 추출물은 0.5 µg/mL, ethyl acetate 분획은 0.3 µg/mL, aglycone 분획은 0.8 µg/mL로 L-ascorbic acid이 1.5 µg/mL, (+)-α-tocopherol이 5.2 µg/mL인 것에 비교하면 밤나무 잎 추출물 및 분획은 활성산소 소거능이 상당히 뛰어난 것을 알 수 있다.

3.2.3. NBT법을 이용한 Superoxide Anion Radical 소거활성

Xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide anion radical 생성 저해 활성 측정결과를 Figure 4에 나타내었다. IC₅₀이 각각 145.5 µg/mL, 65.5 µg/mL로 나타난 ethyl acetate 및 aglycone 분획과 superoxide anion radical의 효과적인 소거제로 알려진 allopurinol의 IC₅₀이 3.2 µg/mL인 것에 비해, 활성이 낮긴 하지만 aglycone 분획의 경우 ethyl acetate 분획에 비해 활성이 높게 나타나

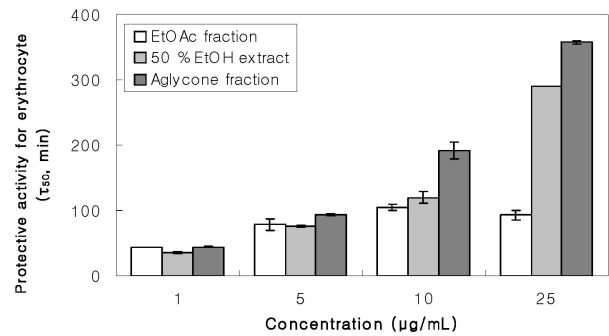


Figure 5. Effects of extract and fractions from *Castanea crenata* leaf on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 31.0 ± 1.0 min).

superoxide anion radical의 소거제로 사용이 가능함을 시사하였다.

3.3. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 활성

전체 적혈구 50 %가 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 1, 5, 10, 25 µg/mL에서 밤나무 잎 추출물의 용혈 억제 효과 측정 결과를 보면, ethyl acetate 분획의 경우 세포 보호 활성이 미약한 것으로 나타났으나, 50 % ethanol 추출물과 당을 제거시킨 aglycone 분획은 세포보호활성이 큰 것으로 나타났다. 10 µg/mL일 때, 50 % ethanol 추출물은 120.0 min, ethyl acetate 분획은 104.8 min, aglycone 분획은 191.9 min이었고, 이들과 세포막에 존재하면서 항산화 활성을 지닌 α-tocopherol이 10 µg/mL일 때 38 min 인 것을 비교해 보면(Data is not shown), 50 % EtOH 추출물, ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 모두 세포보호 활성이 매우 큰 것을 확인할 수 있다.

3.4. Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성측정 결과, 50 % ethanol 추출물은 IC₅₀이 314.0 µg/mL로 elastase 저해 활성이 거의 없었지만, ethyl acetate 분획은 42.4 µg/mL, aglycone 분획은 9.1 µg/mL로 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획이 매우 큰 효능을 나타내었다(Figure 6). 최근 들어 주름 개선에 대한 기능성 화장품 원료로 사용되고 있는 oleanolic acid과 비교했을 때, oleanolic acid가 89.0 µg/mL인 것에 비하면 ethyl acetate분획과 aglycone 분획은 뛰어난 주름 개선 효과가 있을 것으로 생각된다.

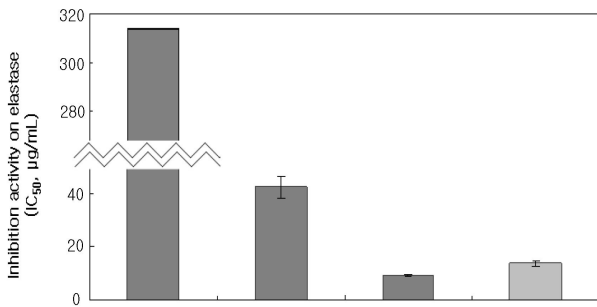


Figure 6. Inhibitory activity of extract and fractions from *Castanea crenata* leaf and oleanolic acid on elastase.

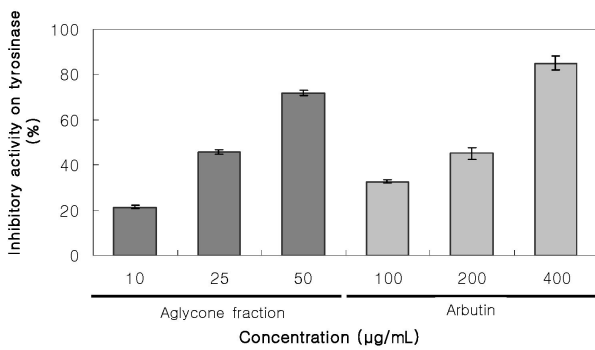


Figure 7. Inhibitory activity of aglycone fraction from *Castanea crenata* leaf and arbutin on tyrosinase.

3.5. Tyrosinase 저해 활성

밤나무 잎 추출물 및 분획의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과를 Figure 7에 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 능력 측정결과 50 % ethanol 추출물과 ethyl acetate 분획은 효능이 없었다(data is not shown). 하지만 aglycone 분획의 경우 IC₅₀이 21.6 µg/mL로 나타나 미백관련 기능성 화장품 원료에 있어서 기준이 되고 있는 arbutin이 226.2 µg/mL인 것에 비하면 상당히 큰 저해능력을 가졌음을 알 수 있다(Figure 7).

3.6. B16 Melanoma Cell을 이용한 세포 생존률 및 멜라닌 생성 저해 활성

3.6.1. 세포 생존율

밤나무 잎의 ethyl acetate와 aglycone 분획의 1, 5, 10, 25 µg/mL에서의 세포 독성 측정 결과를 Figure 8에 나타내었다. Ethyl acetate와 aglycone 분획은 25 µg/mL이하에서 세포 생존율이 80 % 이상인 것으로 나타났다.

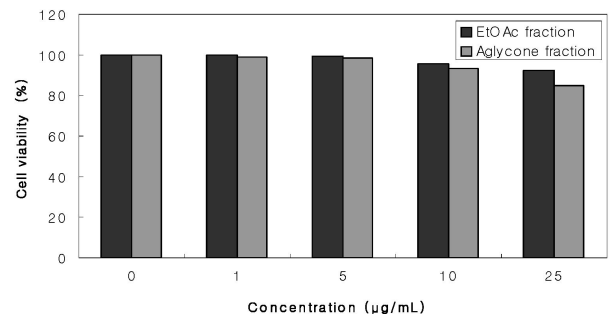


Figure 8. Relative cell viability of ethyl acetate and aglycone fraction from *Castanea crenata* leaf on B16 melanoma cells by MTT assay.

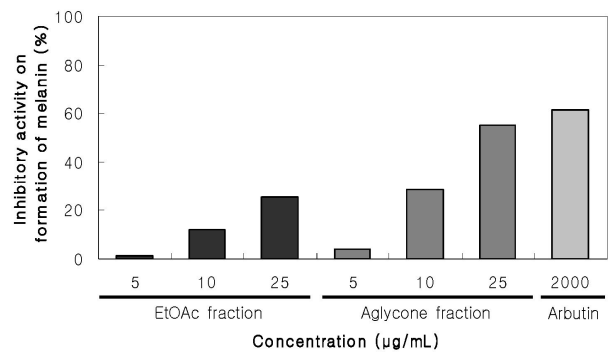


Figure 9. Inhibitory activity on melanin formation of ethyl acetate and aglycone fraction from *Castanea crenata* leaf and arbutin.

3.6.2. 멜라닌 생성 저해 활성

밤나무 잎 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 생성된 멜라닌 양을 측정하였다. 세포독성 결과에 따라 처리한 ethyl acetate와 aglycone 분획의 농도는 25 µg/mL 이하로 처리하였다. Figure 9에 나와있는 것과 같이 ethyl acetate와 aglycone 분획은 농도 의존적으로 멜라닌 합성을 저해시켰다. 상기에서 언급한 바와 같이, *in vitro* tyrosinase 실험에서 ethyl acetate 분획이 tyrosinase의 활성을 저해하지는 못하지만, B16 melanoma cell을 이용한 실험에서는 멜라닌 저해 활성을 나타내었다. 이는 ethyl acetate 분획이 또 다른 메카니즘에 의해서 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 추정되며, 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. B16 melanoma cell에서 25 µg/mL의 ethyl acetate 및 aglycon 분획은 arbutin에 비해 더 큰 멜라닌 생성 억제 작용을 나타냈으며, 이 때 aglycone 분획이 보다 더 큰 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

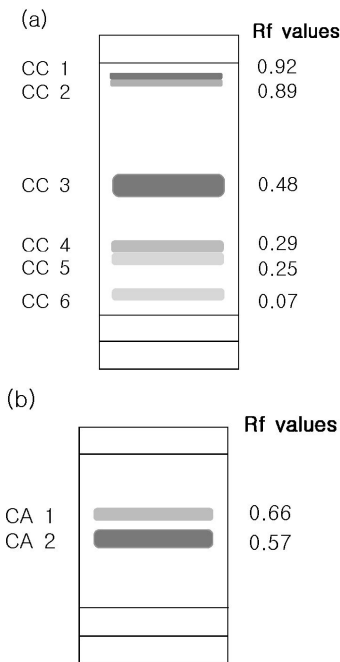


Figure 10. TLC chromatogram of ethyl acetate and aglycone fraction from *Castanea crenata* leaf. (a) ① kaempferol, ②: quercetin, ③: quercitrin, ④ isoquercitrin, ⑤ hyperin, ⑥: rutin, eluent system; ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), (b) ①: kaempferol, ②: quercetin, eluent system; ethyl acetate : acetic acid : formic acid : distilled water = 21 : 14 : 5 (v/v).

3.7. 밤나무 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.7.1. 총 플라보노이드 함유량

음건한 밤나무 잎 100 g에는 플라보노이드 93.6 mg이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

3.7.2. Thin Layer Chromatography (TLC)

밤나무 잎 ethyl acetate 분획은 TLC 분리 후 UV 흡수 및 H₂SO₄ 발색 등을 통해 6개의 띠(CC 1 ~ 6)로 분리되었음을 볼 수 있었다(Figure 10(a)). 발색 시약으로부터 CC 1은 kaempferol, CC 2 ~ 6은 quercetin 및 quercitrin 유도체로 추측되었다. 이후 표준물질과 함께 전개시켜 CC 1은 kaempferol, CC 2는 quercetin, CC 3은 quercitrin, CC 4는 isoquercitrin, CC 5는 hyperin, CC 6은 rutin임을 확인하였다. Aglycone 분획은 2개의 띠(CA 1, 2)로 분리되었다. 표준물질과 함께 전개시킨 결과 CA 1은 kaempferol, CA 2는 quercetin으로 확인되었다(Figure 10(b)).

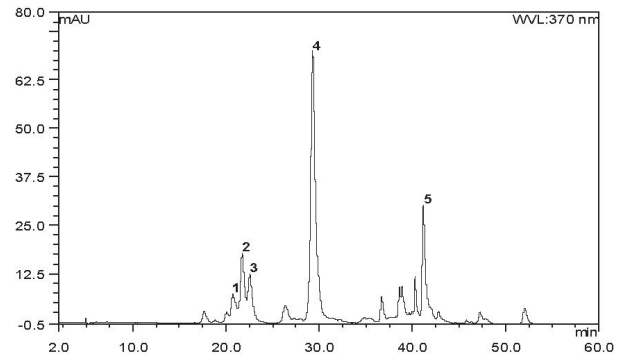


Figure 11. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Castanea crenata* leaf at $\lambda = 370$ nm (1: rutin, 2: hyperin, 3: isoquercitrin, 4: quercitrin, 5: quercetin).

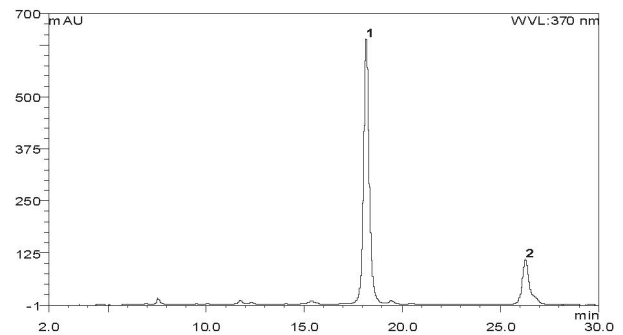


Figure 12. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *Castanea crenata* leaf at $\lambda = 370$ nm (1: quercetin, 2: kaempferol).

3.7.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램을 Figure 11에 나타내었다. 각각 peak의 동정은 표준물질을 사용하여 비교하였다. 또한 Figure 10(a)의 크로마토그램에 나타난 각각의 띠를 긁어 용매로 용출하여 얻은 시료용액은 UV-visible spectrophotometer로 물질 고유의 흡광도를 확인하였고, 동일 조건의 HPLC로 분리하여 Figure 11의 peak를 확인하는데 사용하였다. 따라서 Figure 11의 peak 1은 rutin, peak 2는 hyperin, peak 3은 isoquercitrin, peak 4는 quercitrin, peak 5는 quercetin이고, 가장 많이 함유된 플라보노이드 성분은 quercitrin임을 확인하였다. Ethyl acetate 분획으로부터 얻어진 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 12에 나타내었다. Figure 11을 보면, 주성분이 quercetin에 rhamnose가 결합되어 있는 quercitrin이기 때문에 당 제거 반응을 통해 얻은 aglycone 분획에는 quercetin이 상

당히 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.

4. 결 론

1) 밤나무 잎 추출물의 수득물의 경우 50 % ethanol 추출물은 9.0 %, ethyl acetate 분획은 1.8 %, aglycone 분획은 0.53 % 이었다.

2) 밤나무 잎 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물 13.6 µg/mL, ethyl acetate 분획은 6.2 µg/mL, aglycone 분획은 7.6 µg/mL로 나타났다.

3) 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물 0.45 µg/mL, ethyl acetate 분획은 0.28 µg/mL, aglycone 분획은 0.8 µg/mL로 나타났다.

4) Rose-bengal과 빛으로 유도된 사람 적혈구의 용혈에 대한 세포보호 활성은 ethyl acetate 분획의 경우 세포보호 활성이 미약한 것으로 나타났으나, 50 % ethanol 추출물과 당을 제거시킨 aglycone 분획은 세포보호활성이 큰 것으로 나타났다. 특히, 10 µg/mL에서 aglycone 분획은 τ₅₀이 191.9 min으로, α-tocopherol (38 min)보다 약 5배 가량 높은 세포보호 활성을 나타내었다.

5) 피부에 탄력을 부여하는 elastin을 분해하는 elastase의 소거활성에 대해서는 50 % ethanol 추출물은 활성이 거의 없었고, 반면에 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 각각 42.4 µg/mL, 9.1 µg/mL로 최근 주름 개선에 대한 기능성 화장품 원료로 사용되고 있는 oleanolic acid가 89.0 µg/mL인 것에 비하면 억제 효능이 상당히 큰 것으로 나타나 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 뛰어난 주름 개선 효과가 있을 것으로 생각된다.

6) Melanin 생성의 핵심역할을 하는 tyrosinase의 활성에 대해서는 50 % ethanol 추출물, ethyl acetate 분획은 효능이 없었다. 하지만 aglycone 분획의 경우, IC₅₀이 21.6 µg/mL로 나타나 미백관련 기능성 화장품 원료에 있어서 기준물질이 되는 arbutin이 226.2 µg/mL에 비해 억제 효능이 크게 나타났다.

7) 밤나무 잎의 ethyl acetate와 aglycone 분획은 25 µg/mL 이하에서 세포 생존율이 80 % 이상인 것으로 나타나 B16 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생성 저해 활성은 25 µg/mL 이하에서 측정하였다.

8) B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험한 결과, ethyl acetate와 aglycone 분획은 농도 의존적으로 멜라닌 합성을 저해시켰다. Ethyl acetate 분획에 비해 aglycon 분획이 더 큰 효능을 나타냈지만 비교물질로 사용한 arbutin이 2000

µg/mL에서 61.5 %의 저해 활성을 나타낸 것에 비교해 보면, ethyl acetate와 aglycone 분획 모두 멜라닌 생성 저해 활성이 크다는 것을 알 수 있다.

9) 총 플라보노이드 함유량 측정결과 음건한 밤나무 잎 100 g에는 플라보노이드 93.6 mg이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

10) 밤나무 잎의 ethyl acetate분획은 TLC와 HPLC를 통하여 quercetin, quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin 이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이들 플라보노이드 중 quercitrin이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

11) Aglycone 분획의 성분은 kaempferol, quercetin으로 확인되었다.

이상의 결과들로부터, 밤나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획들은 항산화 및 항노화 활성이 크며, 이들 추출물 및 분획은 항산화와 항노화 작용에 관한 기능성 소재로서 화장품에 응용 가능성이 큼을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 산업자원부 “제주생물자원 공동 연구개발” 사업과 “(재)서울테크노파크 연구개발사업”의 일환으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982).
2. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
3. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85, Academic press, New York (1976).
4. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).

7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
8. G. S. Sim, J. H. Kim, D. H. Lee, B. C. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo, The inhibition of UVA-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and the improvement of skin elasticity by *Cirsium setidens* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 181 (2007).
9. O. B. Choi, G. S. Yoo, and K. H. Park, Antioxidative and antimicrobial effects of water extracts with *castanea crenata* leaf tea, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(4), 1128 (1999).
10. H. J. Lee, M. J. Chung, J. Y. Cho, S. S. Ham, and M. Choe, Antioxidative and macrophage phagocytic activities and functional component analyses of selected korean chestnut (*Castanea crenata* S. et Z.) cultivars, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(9), 1095 (2008).
11. K. H. Son, H. E. Yang, S. C. Lee, J. H. Chung, B. K. Jo, H. P. Kim, and M. Y. Heo, Antioxidative activity of the extract from the inner shell of chestnut, *The Journal of Applied Pharmacology*, **13**, 150 (2005).
12. Y. H. Choi, J. H. Kim, M. J. Kim, S. S. Han, and Y. S. Rim, Antioxidative compounds in leaves of *Castanea crenata* S. et Z., *Korean J. Medical Crop. Sci.*, **8**(4), 373 (2000).
13. Y. Lu and L. Y. Foo, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry*, **68**, 81 (2000).
14. T. Mosmann, Rapid chrometric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methos.*, **65**, 55 (1983).
15. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Histoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS.*, **6th**, 69 (2003).
16. C. Quettier-Deleu, B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine, C. Brunet, M. Luycks, M. Cazin, J. Cazin, F. Bailleul, and F. Trotin, Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35 (2000).