

구아바 잎 추출물의 항산화 활성과 성분 분석

양희정·김은희·박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2008년 9월 19일 접수, 2008년 9월 24일 채택)

Antioxidative Activity and Component Analysis of *Psidium guajava* Leaf Extracts

Hee Jung Yang, Eun Hee Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology,
172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received September 19, 2008; Accepted September 24, 2008)

요약: 본 연구는 구아바 잎 추출물의 항산화 성분 분석 및 tyrosinase와 elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물(7.05 µg/mL) < ethyl acetate 분획(3.36) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(3.24) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 구아바 잎 추출물의 총 항산화능은 50 % 에탄올 추출물(OSC₅₀, 2.17 µg/mL) < ethyl acetate 분획(0.64) < aglycone 분획(0.39) 순으로, aglycone 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 구아바 잎 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 구아바 잎 추출물의 경우 1 ~ 10 µg/mL의 농도에서 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 1 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 107.5 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC와 HPLC (360 nm)에서 1개의 피이크로 나타났으며, 그 성분이 quercetin임을 확인하였다. 구아바 잎 추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램은 5개의 띠로 분리되었고, HPLC 크로마토그램도 5개의 피이크를 나타내었다. TLC와 HPLC의 띠와 피이크를 확인한 결과, HPLC의 5개의 피이크는 용리순서로 피이크 1 (10.32 %)은 quercetin 3-O-gentobioside, 피이크 2 (13.30 %)는 quercetin 3-O-β-D-glucoside (isoquercetin), 피이크 3 (11.34 %)는 quercetin 3-O-β-D-galactoside (hyperin), 피이크 4 (19.70 %)는 quercetin 3-O-α-L-arabinoside (guajavarin), 피이크 5 (45.33 %)는 quercetin 3-O-β-L-rhamnoside (quercitrin)로 확인되었다. 미백 및 주름억제 효과측정으로는 각각 tyrosinase 및 elastase의 활성 저해 효과를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 50 % 에탄올 추출물(149.67 µg/mL) < ethyl acetate 분획(30.67) < aglycone 분획(17.10) 순으로 나타났으며, elastase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 50 % 에탄올 추출물(6.60 µg/mL) < aglycone 분획(5.66) < ethyl acetate 분획(3.44) 순으로 나타났다. 이상의 결과들은 구아바 잎 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소거시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 구아바 잎 성분에 대한 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 elastase 저해활성은 구아바 잎 추출물이 주름개선 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on elastase and tyrosinase, and component analysis of *Psidium guajava* leaf extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC₅₀) of extract/fractions of *Psidium guajava* leaf were in the order: 50 % ethanol extract (7.05 µg/mL) < ethyl acetate fraction (3.36 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (3.24 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of some *Psidium guajava* leaf extracts on ROS

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

generated in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activities were 50 % ethanol extract (OSC_{50} , 2.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethyl acetate fraction (0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aglycone fraction showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Psidium guajava* leaf on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Psidium guajava* leaf extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), particularly deglycosylated flavonoid aglycone fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ_{50} , 107.5 min at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aglycone fraction obtained from the deglycosylation reaction of ethyl acetate fraction among the *Psidium guajava* leaf extracts, showed 1 band in TLC and 1 peak in HPLC experiments (360 nm). One component was identified as quercetin. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf extract revealed 5 bands and HPLC chromatogram showed 5 peaks, which were identified as quercetin 3-*O*-gentobioside (10.32 %), quercetin 3-*O*- β -D-glucoside (isoquercetin, 13.30 %), quercetin 3-*O*- β -D-galactoside (hyperin, 11.34 %), quercetin 3-*O*- α -L-arabinoside (guajavarin, 19.70 %), quercetin 3-*O*- β -L-rhamnoside (quercitrin, 45.33 %) in the order of elution time. The inhibitory effect of *Psidium guajava* leaf extracts on tyrosinase were investigated to assess their whitening efficacy. Finally, their anti-elastase activities were measured to predict the anti-wrinkle efficacy in the human skin. Inhibitory effects (IC_{50}) on tyrosinase of some *Psidium guajava* leaf extracts was 50 % ethanol extract (149.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethylacetate fraction (30.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < deglycosylated aglycone fraction (17.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Inhibitory effects (IC_{50}) on elastase of some *Psidium guajava* leaf extracts was 50 % ethanol extract (6.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < deglycosylated aglycone fraction (5.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethylacetate fraction (3.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These results indicate that extract/fractions of *Psidium guajava* leaf can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging $^1\text{O}_2$ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. And component analysis of *Psidium guajava* leaf extract and inhibitory activity on elastase of the aglycone fraction could be applicable to new functional cosmetics for smoothing wrinkles.

Keywords: *Psidium guajava* leaf, flavonoid, antioxidative activity, elastase, cosmetics

1. 서 론

피부는 자외선, 공해, 산화제 등과 같은 다양한 환경적 요인과 접촉함으로써 산화적 스트레스를 받게 된다. 산화적 스트레스의 주 원인은 태양 자외선(UVA 및 UVB)에의 노출이며, 이때 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 피부의 항산화제를 압도할 때 산화적 스트레스를 받게 된다. ROS란 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여 O_2^- , H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 포르피린과 같은 광증감제에 의한 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 을 포함하는 ROS는 피부 광손상을 주도하며, 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화의 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].

사람 피부세포에 있어서 지질 및 생체 고분자 물질 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320

~ 380 nm)-의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 ROS가 포함되는 것으로 알려져 있다. 콜라겐은 피부 진피 층의 매트릭스 성분 중 가장 많은 성분으로 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위해 촉망되는 전략임이 분명하다[17-21].

구아바 잎(*Psidium guajava* leaf)은 도금양목 도금양과의 쌍떡잎 식물로, 원산지는 아메리카 열대지방 및 남부 아시아이며, 주로 아열대 지방에 분포하고 있고, 우리나라에서는 제주도에 자생하는 것으로 알려져 있다[22]. 구아바 잎의 에탄올 추출물은 생체 내 과산화반응을 저해하는 anthocyan류, alkaloid류, flavonoid류,

tannin류와 같은 페놀성 화합물을 함유하며[23], 그 주요 성분에는 quercetin 배당체인 quercetin 3-O-β-D-glucoside (isoquercitin), quercetin 3-O-β-D-galactoside (hyperin), quercetin 3-O-β-L-rhamnoside (quercitrin), quercetin 3-O-gentobioside, quercetin 3-O-α-L-arabinoside (guajavarin) 등의 플라보노이드[24]가 있고 그 외에 β-selinene, β-caryophyllene, squalene, morin-3-O-α-L-lyxopyranoside, morin-3-O-α-L-arabopyranoside, β-sitosterol, oleanolic acid 및 ursolic acid[25-27] 등이 함유된 것으로 보고되었다. 또한 구아바 잎은 당뇨병, 암, 심장 질환과 같은 바이러스성 만성 질병, 동맥경화증 및 혈전증을 예방하는 효과도 있는 것으로 알려져 있다 [28,29].

하지만 구아바 잎 추출물을 이용한 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 ¹O₂으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H₂O₂, O₂^{·-}, ·OH 등)가 생성되는 계(Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계)에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 보고 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 우리나라 제주 자생의 구아바 잎을 구입하여 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 ¹O₂으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서의 총 항산화능, 미백과 관련 있는 tyrosinase와 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 측정하고, 제주도 자생의 구아바 잎 추출물(혹은 분획)의 성분을 분석하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 구아바 잎의 항산화능을 비교 평가하고 활성산소에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-VIS spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 분광기는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)-α-Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-di-

phenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 FeCl₃ · 6H₂O는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품, H₂O₂는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F₂₅₄ (0.2 mM)로 Merck (USA)사에서 구입하였다. 플라보노이드 비교물질로 사용한 apigenin, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin, hyperin, isoquercitrin은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 실험 재료인 구아바 잎은 제주도에서 자생한 것을 2008년 4월경 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 구아바 잎의 플라보노이드 분획 추출

건조된 구아바 잎 200 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압 · 농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H₂SO₄ 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류 · 냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압 · 농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 구아바 잎 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 구아바 잎 추출물에 대한 free radical 소거 활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 메탄올

에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (·OH)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

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 buffer (pH 7.4)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 구아바 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 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) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 구아바 잎 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ₅₀이 31 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl acetate and Deglycosylated Fraction from *Psidium guajava* Leaf Extract

Column	Luna 5 μ C18 (L : 250 nm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2 % acetic acid : 0.5 % acetic acid in H ₂ O in 50 % acetonitrile solution (70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for ethyl acetate fraction (50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

우 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosin으로부터 멜라닌 생성과정에는 tyrosinase가 핵심효소로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-Tyrosin (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.8 mL, 시료 0.1 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항은 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase를 첨가하지 않은 것을 공시험(blank)으로 하여 효소활성 저해를 계산하였다. 활성의 크기는 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 elastase 기질인 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μ L에 측정시료용액 7.5 μ L와 buffer 92.5 μ L를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μ L 첨가하였다. Blank는 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300 μ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

2.7. TLC 및 HPLC를 이용한 구아바 잎 추출물의 플라보노이드 분석

구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 μ m)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다.

TLC 분석에서 전개용매는 ethyl acetate 분획의 경우 ethyl acetate : formic acid : water = 82 : 9 : 5 (v/v)을 사용하여 분석하였으며, aglycone 분획은 chloroform : acetone : formic acid = 75 : 16.5 : 8.5 (v/v)를 사용하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다.

HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 또한 제조된 aglycone 분말은 100 % 에탄올에 녹이고, syringe filter (Milipore 0.45 μ m)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's t-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 구아바 잎 추출물의 수득율

3.1.1. 구아바 잎(*Psidium guajava* Leaf) 추출물

건조한 구아바 잎 200 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 2 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득률은 19.89 %이었다. Ethyl acetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 hexane으로 비

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Psidium guajava* Leaf and References

Compounds	Scavenging activity (FSC ₅₀ , µg/mL)
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (50 % EtOH)	7.05 ± 0.38
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	3.36 ± 0.04
Deglycosylated fraction of <i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	3.24 ± 0.09
L-Ascorbic acid	3.79 ± 0.83
(+)- α -Tocopherol	8.98 ± 2.93

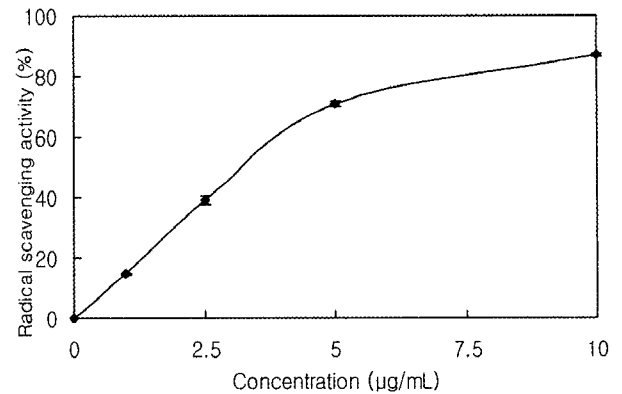
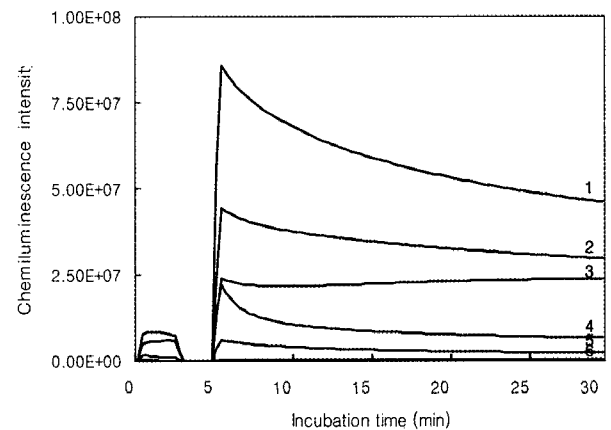
극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 이때 수득률은 약 3.39 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해 시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.88 %였다. Ethyl acetate 분획은 플라보노이드 배당체를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 플라보노이드 배당체로 이루어진 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 것으로 aglycone이 주성분으로 존재한다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

3.2. 구아바 잎 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄 반응이다. (+)- α -Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킴으로써 세포막을 보호한다. 이와 같이 세포막에서 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

구아바 잎 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성 (FSC₅₀) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 구아바 잎 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC₅₀이 7.05 µg/mL, ethyl acetate 분획은 3.36 µg/mL, aglycone 분획은 3.24 µg/mL을 나타냈다. Ethyl acetate 분획, aglycone 분획은 free radical 소거활성이 L-ascorbic acid와 유사한 것으로 나타났으며, (+)- α -tocopherol 과 비교했을 때 2배 이상의 큰 효과를 나타내었다. 비교

**Figure 1.** Free radical scavenging activity of deglycosylated fraction from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction).**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction) in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. [FeCl₃ · 6H₂O] = 25 µM, [EDTA] = 50 µM, [H₂O₂] = 3 mM, [luminol] = 1.4 mM, concentrations of *Psidium guajava* leaf (EtOAc fraction): 1: control, 2: 10 µg/mL, 3: 1 µg/mL, 4: 0.5 µg/mL, 5: 0.1 µg/mL, 6: blank.

물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid의 free radical 소거활성은 3.79 µg/mL, (+)- α -tocopherol은 8.98 µg/mL이었다.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광 (420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 당이 제거된 분획(deglycosylated fraction)의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 Table 3에서와 같이 0.39 µg/mL이었다. Table 3에서 구아바 잎 50 % 에탄올 추

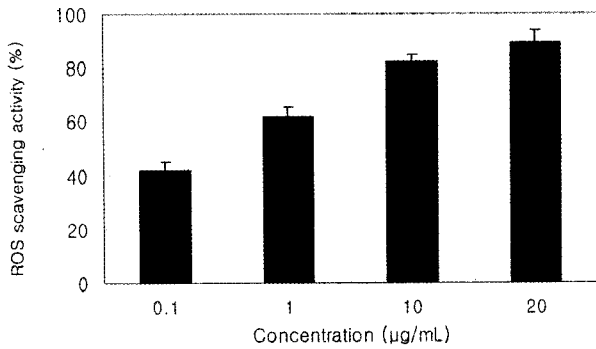


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated fraction from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction).

Table 3. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *Psidium guajava* Leaf and References

Compounds	Scavenging activity (OSC ₅₀ , µg/mL)
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (50 % EtOH)	2.17 ± 0.47
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	0.64 ± 0.04
Deglycosylated fraction of <i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	0.39 ± 0.16
L-Ascorbic acid	1.50 ± 0.85

출물은 2.17 µg/mL, ethyl acetate 분획 0.64 µg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 당을 제거시킨 분획이 50 % 에탄올 추출물이나 ethyl acetate 분획보다 활성 산소 소거활성이 보다 큼을 보여주었다. 당을 제거시킨 분획 추출물은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다도 훨씬 큰 활성을 나타내었다.

3.3. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

활성산소에 의한 세포손상에 있어서 구아바 잎 추출물의 보호 효과를 측정한 결과가 Figure 4 및 Table 4에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 구아바 잎의 aglycone 분획은 1, 2.5, 5, 10 µg/mL의 농도에서 τ₅₀이 각각 107.50, 248.50, 391.67, 393.93 min으로 세포 파괴를 억제 하였고, 위의 결과에서 보듯이 10 µg/mL의 농도에서 가장 큰 세포보호 효과(393.93 min)를 보여주었다. Ethyl acetate 분획의 경우 38.83,

Table 4. Effects of Extracts from *Psidium guajava* Leaf and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

	τ ₅₀ (half time of hemolysis ¹⁾)			
	Concentration, µg/mL			
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (50 % EtOH)	43.87 ± 3.85	60.03 ± 1.39	105.40 ± 9.00	287.50 ± 8.50
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	38.83 ± 8.17	108.05 ± 10.3	250.9 ± 11.7	327.50 ± 2.50
Deglycosylated fraction from <i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	107.5 ± 19.4	248.50 ± 4.95	391.67 ± 7.73	393.93 ± 16.59
Rutin	35.20 ± 1.40	-	-	40.50 ± 10.44
(+)-α-Tocopherol	-	-	-	38.00 ± 1.80

¹⁾Control, τ₅₀ = 31 ± 1.0 min

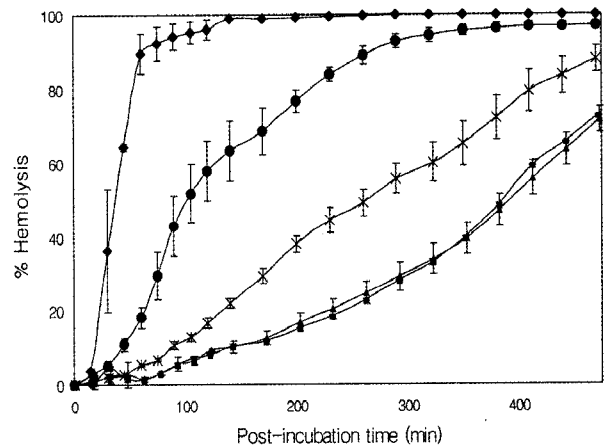


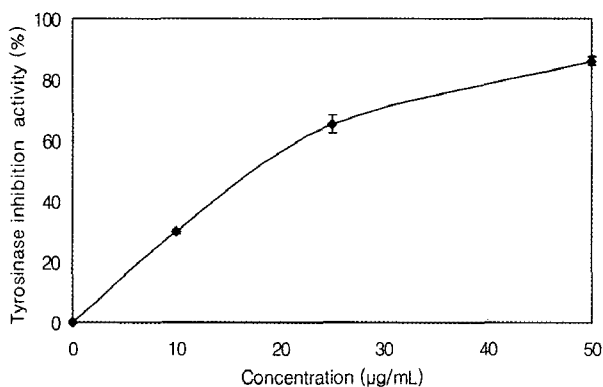
Figure 4. Effects of deglycosylated fraction from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction) on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time : 15 min, pre-incubation time: 30 min, [rose-bengal] = 1.5 µM, concentrations of deglycosylated fraction from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction): ◆-◆: control, ●-●: 1 µg/mL, *-*: 2.5 µg/mL, ■-■: 5 µg/mL, ▲-▲: 10 µg/mL.

108.05, 250.9, 327.50 min. 50 % 에탄올 추출물의 경우는 43.87, 60.03, 105.40, 287.50 min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었지만, aglycone 분획에 비해 낮은 효과를 나타내었다.

따라서 세포보호 효과는 10 µg/mL에서 50 % 에탄올 추출물(τ₅₀, 287.50 min) < ethyl acetate 분획(327.50) < aglycone 분획(393.93) 순으로 증가하였다. 1 ~ 10

Table 5. Inhibitory Activity of Extracts from *Psidium guajava* Leaf and References Compound on Tyrosinase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (50 % EtOH)	149.67 ± 11.85
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	30.67 ± 1.52
Deglycosylated fraction from <i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	17.10 ± 0.76
Arbutin	226.88 ± 1.55

**Figure 5.** Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf extract on tyrosinase.

µg/mL 농도에서 구아바 잎 추출물의 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- α -tocopherol과 비교할 수 없을 정도의 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

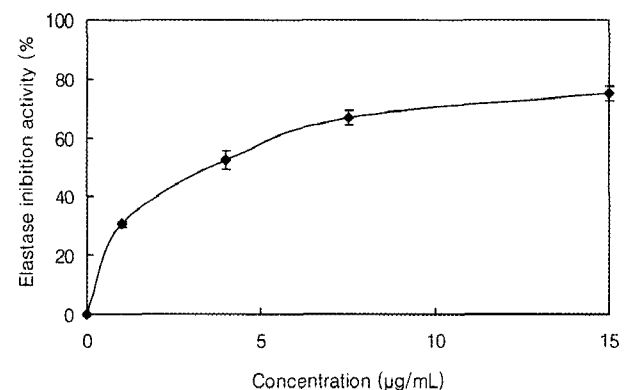
3.4. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다.

구아바 잎 추출물중 ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 추출물은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 17.10 µg/mL로 나타났다. ethyl acetate 분획의 경우에도 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 30.67 µg/mL로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 훨씬 큰 tyrosinase 저해활성을 보여주었다. 따라서 당이 제거된 추출물과 ethyl acetate 분획 등을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 5).

Table 6. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethyl Acetate Fraction of *Psidium guajava* Leaf Extract and Reference Compounds on Elastase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (50 % EtOH)	6.60 ± 0.30
<i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	3.44 ± 0.58
Deglycosylated fraction from <i>Psidium guajava</i> leaf extract (EtOAc fraction)	5.66 ± 0.30
Quercetin	6.10 ± 0.90
Oleanolic acid	13.70 ± 1.03

**Figure 6.** Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf extract on elastase.

3.5. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되어 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

구아바 잎 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 elastase 저해활성(IC₅₀)이 6.60 µg/mL, ethyl acetate 분획은 3.44 µg/mL, aglycone 분획은 5.66 µg/mL을 나타냈으며, 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 저해 활성 13.70 µg/mL에 비해서도 큰 elastase 저해활성을 보였다. 또한 50 % 에탄올 추출물, aglycone 분획은 비교물질 quercetin과 유사한 것으로 나타났으며, aglycone 분획은 그보다 더 큰 elastase 저해활성이 보였다(Table 6, Figure 6).

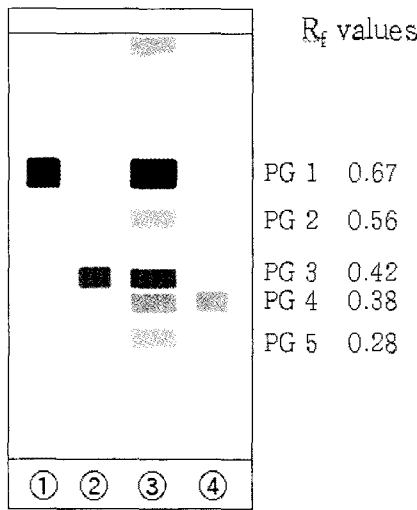


Figure 7. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Psidium guajava* leaf and references. Eluent system: ethyl acetate : formic acid : water = 82 : 9 : 5 (v/v) ①: quercitrin, ②: isoquercitrin, ③: ethyl acetate fraction, ④: hyperin.

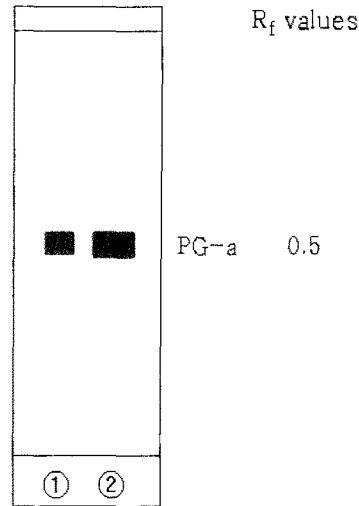


Figure 8. TLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction) and references. ①: quercetin, ②: deglycosylated fraction (EtOAc fraction). Eluent system: chloroform : acetone : formic acid = 75 : 16.5 : 8.5 (v/v).

3.6. 구아바 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.6.1. 구아바 잎 추출물의 TLC 성분 분석

구아바 잎 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 7 및 Figure 8에 나타내었다. Figure 5는 50 % 에탄올로 추출한 구아바 잎 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램이며 플라보노이드 배당체들을 분리할 수 있는 조건에서 구아바 잎의 ethyl acetate 분획은 5개의 띠(PG 1, PG 2, PG 3, PG 4, PG 5)로 분리되었다. 이 5개의 띠들이 어떤 플라보노이드인가를 알아보기 위하여, TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 각각 긁어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시켜 얻은 띠별 파우더를 분석에 사용하였다. 또한 분리된 TLC 띠 성분 확인에는 UV-VIS 흡수스펙트럼, IR 스펙트럼 등의 분광학적 데이터들도 이용하였다. 그 결과 Figure 7에서 용출된 PG 1, 2, 3, 4, 5는 모두 당 제거반응에서 quercetin으로 확인되었다. 그 중 R_f value가 0.67인 PG 1은 자외선 및 발색법으로 확인한 결과 농도가 가장 진한 것으로 나타났으며, quercetin 3-O-β-L-rhamnoside (quercitrin)으로 나타났고, PG 3는 quercetin 3-O-β-D-galactoside (hyperin), PG 4는 quercetin 3-O-β-D-glucoside (isoquercitrin)로 나타났다. Lozoya 등(1994)이 보고한 바와 같이, PG 2는 quercetin 3-O-α-L-arabinoside (guajavarin) 그리고 PG 5는 quercetin 3-O-gentobioside으로 추정되었다.

Figure 8은 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획을 당 가수분해 시켜서 얻은 aglycone 분획의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone 분획은 1개의 띠(PG-a)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 PG-a는 quercetin으로 확인되었다. 한편, ethyl acetate 분획을 당 가수분해 시켜서 얻은 aglycone 분획에는 플라보노이드 배당체는 존재하지 않았다.

3.6.2. 구아바 잎 추출물의 HPLC 성분 분석

구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 9과 같다. 크로마토그램은 5개의 피이크를 나타내었다. 각각의 피이크를 동정하기 위하여, Figure 7에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 긁어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시킨 후 얻은 파우더를 에탄올 용액으로 하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과 Figure 7의 TLC (normal phase) 크로마토그램에서 R_f치가 가장 큰 띠인 PG 1 (R_f 0.67)은 Figure 9의 HPLC (reverse phase) 피이크 5로, PG 3는 피이크 3, PG 4는 피이크 2와 일치함을 확인하였다. 또한 Figure 7와 함께 표준 물질을 사용하여 피이크 2 (13.30 %)는 quercetin 3-O-β-D-glucoside, 피이크 3 (11.34 %)는 quercetin 3-O-β-D-galactoside, 피이크 5 (45.33 %)는 quercetin 3-O-β-L-rhamnoside임을 확인하였다. 피이크 1과 피이크

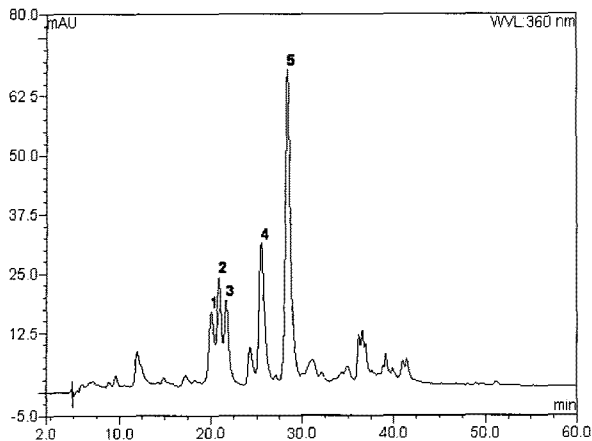


Figure 9. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Psidium guajava* leaf, at $\lambda = 360$ nm. 1: quercetin 3-*O*-gentobioside, 2: quercetin 3-*O*- β -D-glucoside, 3: quercetin 3-*O*- β -D-galactoside, 4: quercetin 3-*O*- α -L-arabino-side, 5: quercetin 3-*O*- β -L-rhamnoside.

4는 각각 quercetin 3-*O*-gentobioside (10.32 %) 및 quercetin 3-*O*- α -L-arabino-side (19.70 %)으로 추정되었으며 이는 Lozoya 등에 의해서 보고된 바 있다 [24]. 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에서는 quercetin 3-*O*- β -L-rhamnoside의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다. 이러한 성분 분석을 통하여, Lozoya 등(1994), Arima 등(2002) 및 Begum 등(2004)에 의해서 밝혀진 구아바 잎 추출물의 성분이 제주에서 자생하는 구아바 잎 추출물에서도 일부가 확인되었다. 그러나 morin-3-*O*- α -L-lyxopyranoside 및 morin-3-*O*- α -L-arabopyranoside 등 일부 화합물들은 확인되지 않았다 [24,26,27].

구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거반응 후 얻어진 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 10과 같다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 8의 TLC 크로마토그램과 Figure 8에서 확인한 바와 같이 Figure 10의 피이크 1은 quercetin임을 확인하였다.

4. 결 론

1) 구아바 잎 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 19.89 %, ethyl acetate 분획은 3.39 %, aglycone 분획의 경우 0.88 %이었다.

2) 구아바 잎 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물 7.05 μ g/mL, ethyl acetate 분

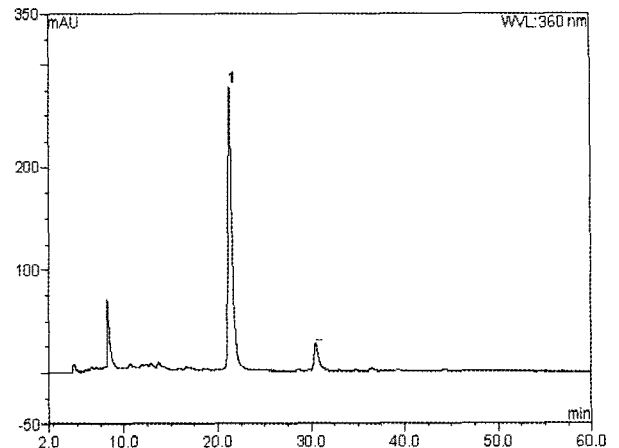


Figure 10. HPLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Psidium guajava* leaf extract (EtOAc fraction). 1: quercetin.

획 3.36 μ g/mL, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 3.24 μ g/mL로 나타났다.

3) 구아바 잎 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 구아바 잎 에탄올 추출물, 2.17 μ g/mL, ethyl acetate 분획, 0.64 μ g/mL, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 0.39 μ g/mL로 구아바 잎에서 당을 제거한 aglycone 분획이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 구아바 잎 추출물은 μ g/mL의 농도 범위(1 ~ 10 μ g/mL)에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 1 μ g/mL 농도에서 τ_{50} 이 107.5 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다.

5) 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 TLC는 5개의 띠(PG 1 ~ PG 5)로 분리되었고, 그 중에서 R_f 0.67인 PG 1의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

6) 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 1개의 띠(PG-a)를 나타내었고, 이 때 PG-a는 quercetin으로 확인하였다.

7) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 1개의 피이크를 나타냈고, quercetin으로 나타났다.

8) 구아바 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 360 nm에서 5개의 피이크를 나타내었고, 피이크 1 (10.32 %)은 quercetin 3-*O*-gentobioside, 피이크 2 (13.30 %)는 quercetin 3-*O*- β -D-glucoside, 피이크 3 (11.34 %)는 quercetin 3-*O*- β -D-galactoside, 피이크 4 (19.70 %)는 quercetin 3-*O*-

α -L-arabinoside, 피이크 5 (45.33 %)는 quercetin 3-O- β -L-rhamnoside로 확인되었다.

9) 구아바 잎 추출물 중 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 각각 17.10 μ g/mL로 나타났고, elastase 저해활성(IC₅₀)이 각각 5.66 μ g/mL로 활성을 나타내었다.

이상의 결과들은 구아바 잎 추출물의 항산화 작용과 더불어 구아바 잎 성분에 대한 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성으로부터 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 (재)서울테크노파크 연구개발 사업의 일환으로 서울테크노파크 지원(과제번호: R&BD-2008-001)을 받아 수행된 연구 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. E. H. Witt, P. Motchnik, and L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin, eds Fuchs and L. Packer, *Oxidative Stress in Dermatology*, 29, New York, Dekker (1993).
2. I. Emerit, Free radicals and aging of the skin, eds L. Emerit and B. Chance, *Free radicals and aging*, 328, Basel, Birkhauser (1992).
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. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
8. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
9. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
10. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
11. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
12. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
13. A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
14. A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
15. L. H. Kligman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: a contrast to UVB effects, ed. F. Urbach, **209**, Valdemar, Overland Park (1992).
16. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
17. J. W. Choi, S. I. Kim, S. M. Jeon, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).

18. H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of anti-oxidant potential of extract/fractions of *Equisetum areense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
19. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum areense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
20. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative potencies of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).
21. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Le, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiangiogenic effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
22. L. M. Pery, Medicinal Plants of East and Southeast Asia, MIT Press, Massachusetts, 284 (1980).
23. R. G. Belemtougri, B. Constantin, C. Cognard, G. Raymond, and L. Sawadogo, Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. *J Zhejiang Univ SCIENCE B*, **7**(1), 56 (2006).
24. X. Lozoya, M. Meckes, M. Abou-Zaid, J. Tortoriello, C. Nozzolillo, and J. T. Arnason, Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle, *Arch. med. res.*, **25**(1), 11 (1994).
25. M. Meckes, F. Calzada, J. Tortoriello, J. L. González, and M. Martinez, Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. *Phytother. Res.*, **10**, 600 (1996).
26. H. Arima and G. I. Danno, Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1727 (2002).
27. S. Begum, S. I. Hassan, S. N. Ali, and B. S. Siddiqui, Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Natural Product Research*, **18**, 135 (2004).
28. S. Kimura, T. Tamaki, and N. Aoki, Acceleration of fibrinolysis by the N-terminal peptide of alpha 2-plasmin inhibitor. *American Society of Hematology*, **66**(1), 157 (1985).
29. T. Okuda, T. Yoshida, T. Hatano, K. Yakazi, and M. Ashida, Ellagitannins of the casuarinaceae, stachyuraceae and myrtaceae. *Phytochemistry*, **21**(12), 2871 (1982).