

잣나무 잎 추출물의 항균 및 항산화 활성과 성분분석

김정은·김우연*·김지욱*·박현수*·이승훈*·이순영*·김민지·김아름·박수남[†]

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, *서울과학고등학교
(2010년 12월 15일 접수, 2010년 12월 18일 수정, 2010년 12월 24일 채택)

Antibacterial, Antioxidative Activity and Component Analysis of *Pinus koraiensis* Leaf Extracts

Jung Eun Kim, Woo Yeon Kim*, Ji Wook Kim*, Hyun Soo Park*, Seung Hoon Lee*, Soon Young Lee*,
Min Ji Kim, A Reum Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of
Science and Technology, 172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

*Seoul Science High School

(Received December 15, 2010; Revised December 18, 2010; Accepted December 24, 2010)

요약: 본 연구에서는 잣나무 잎 추출물의 항균, 항산화 및 성분 분석에 관한 연구를 수행하였다. 피부 상재균에 대한 항균활성 측정결과, *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) 및 *Escherichia coli* (*E. coli*)에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 각각 0.06 %, 0.25 %, 0.13 %, 0.50 %로 나타났으며, *P. acnes*, *P. ovale* 및 *S. aureus*에서 큰 항균활성을 나타내었다. 잣나무 잎 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 aglycone 분획에서 22.93 µg/mL으로 나타났다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 잣나무 잎 추출물의 총 항산화능(OSC₅₀)은 50 % ethanol extract 분획에서 0.70 µg/mL, ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획이 각각 1.04 및 1.43 µg/mL으로 매우 큰 항산화능을 보였다. Rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈 실험에서 추출물의 세포보호 효과를 측정하였다. 잣나무 잎 추출물 분획들은 농도 의존적(5 ~ 50 µg/mL)으로 세포보호효과를 나타내었다. 잣나무 잎 추출물의 가수분해로 얻은 ethyl acetate 분획은 TLC (PK-4, PK-6)와 HPLC (peak 1, peak 2)에서 2개의 주성분으로 나타났다. 이 성분들은 LC/ESI-MS/MS를 통해서 PK-6는 kaempferol-3-O-glucoside (astragalins)로, PK-4는 kaempferol-3-O-arabinside (juglanin)로 확인되었다. 이상의 결과들은 잣나무 잎 추출물이 ROS를 소광시키거나 소거함으로써, 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 잣나무 잎 성분 분석, 그리고 피부 상재균에 대한 항균작용으로부터 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, the antibacterial, antioxidative effect and component analysis of *Pinus koraiensis* leaf extracts were investigated. MIC values of the ethyl acetate fraction from *P. koraiensis* leaf extracts on *P. acnes*, *S. aureus*, *P. ovale*, and *E. coli* were 0.06 %, 0.25 %, 0.13 % and 0.50 %, respectively. The results showed that the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction on *P. acnes*, *P. ovale*, and *S. aureus* was more prominent. The aglycone fraction of *P. koraiensis* leaf extracts (22.93 µg/mL) showed more higher free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (OSC₅₀) of *P. koraiensis* leaf extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system was investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The 50 % ethanol extract (0.70 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. Also the ethyl acetate (1.04 µg/mL) and the aglycone fraction (1.43 µg/mL) showed very high antioxidant activity. The protective effects of extract/fractions of *P. koraiensis* leaf extracts on the rose-bengal sensitized photohemolysis

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

of human erythrocytes were investigated. The *P. koraiensis* leaf extracts showed cellular membrane protective effects in a concentration dependent manner (5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). TLC and HPLC chromatogram of the ethyl acetate fraction obtained from hydrolysis of *P. koraiensis* leaf extracts revealed 2 main bands (PK-4, PK-6) and peaks (peak 1, peak 2), which were identified as kaempferol-3-*O*-glucoside (PK-6, peak 1) and kaempferol-3-*O*-arabinoside (PK-4, peak 2) by LC/ESI-MS/MS, respectively. These results indicate that extract/fractions of *P. koraiensis* can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging ROS, and protect cellular membrane against ROS. Extract/fractions of *P. koraiensis* can be applicable to new cosmeceuticals for antioxidant, antiaging, and antibacterial activity.

Keywords: *Pinus koraiensis* leaf, antibacterial activity, antioxidative activity, LC/ESI-MS/MS, component analysis

1. 서 론

피부는 여드름균, 황색포도상구균 및 비듬균 등의 피부 상재균에 의해서 많은 피부 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다[1]. 여드름균은 일반적으로 호르몬과 외부 영향에 의해 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 피부 모공이 막힌 경우 증식하여 여드름의 원인이 되기도 한다[2]. 비듬균은 등, 목덜미와 같은 피부에서 이상적으로 증식하여 지루성 피부염을 유발한다[3]. 피부 상재균 이외에도 화장품을 변질시키는 세균 또한 피부에 나쁜 영향을 주고 있기 때문에, 피부를 보호하고 제품의 안정성을 위해 인체에 보다 안전하고 무해한 새로운 천연 방부제나 항균제 개발에 관심이 모아지고 있다[4].

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 활성산소종(ROS)이 과잉으로 생성되고 이어서 피부 항산화 방어계는 붕괴되며, 결과적으로 피부에 산화적 스트레스에 의한 세포 손상이 야기되고, 이어 노화가 가속화된다[5-8]. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다[9,10].

이러한 산화적 스트레스에 의한 항산화 방어망의 붕괴와 미생물로부터 피부를 보호하기 위한 항산화, 항균, 미백 및 항노화 효과를 가진 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있다[11-16].

잣나무(*Pinus koraiensis*)는 소나무과에 속하는 상록 교목으로 일명 홍송이라고도 한다. 해발고도 1,000 m 이상에서 자라며 높이 30 m, 지름 1 m 정도까지 자라는 나무로 수피는 회갈색이고 얇은 조각이 떨어진다. 잎은 짧은 가지 끝에 5개씩 달리며, 뒷면에는 하얀 기공선이 있어 연한 초록색을 띠며 가장자리에 잔 톱니가 있다. 잣나

무 목부의 성분으로는 5-hydroxy-7-methoxyflavone, chrysin, pinocembrin, galangin, 3-hydroxy-5-methoxy-stilbene, pinosylvin 등의 물질이 함유된 것으로 나타났다[17]. 미국 Forest Farm에서 채취한 잣나무의 성분을 분석한 결과, 잣나무 잎의 성분으로는 gallic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, scopoletin, (+)-catechin 등의 물질이 함유된 것으로 보고되었다[18,19]. 본 연구에서는 우리나라에서 자생하는 잣나무의 플라보노이드 성분을 분석 비교하였다.

잣나무 잎 추출물의 성분과 작용에 대한 연구는 보고되어 있으나 잣나무 잎 추출물에 대하여 피부 상재균에 대한 항균 활성이나 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 잣나무 잎 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의 항균 활성과 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능을 측정함으로써 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있는지를 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea) 제품을 사용하였으며, 플라보노이드 분석을 위한 LC/ESI-MS/MS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명과학공동기기원에 분석 의뢰하였다.

(+)- α -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 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)에서 구입하였고, 플라보노이드 비교물질로 사용한 quercetin, kaempferol은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 본 연구에서 사용한 잣나무(*P. koraiensis*) 잎은 2010년 4월경에 서울시 노원구 공릉동 서울과학기술대학교 교내에서 직접 채취한 것을 음건하여 사용하였다.

2.2. 잣나무 잎의 플라보노이드 분획 추출

건조된 잣나무 잎 100 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 3 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 *n*-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 H_2SO_4 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. 3가지 형태의 잣나무 잎 추출물(50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획)은 모두 화장품의 원료로 이용 가능한 형태의 추출물로 이들의 활성을 측정하여 그 응용 가능성을 검토하였다. 특히 ethyl acetate 분획은 활성을 나타내는 플라보노이드 등

의 성분 다수 포함되어 있으며, aglycone 분획은 피부 흡수를 증진시켜 효능을 향상시키는 데 적합하다.

상기의 ethyl acetate 분획은 많은 정유 성분을 함유하고 있기 때문에 잣나무 잎의 플라보노이드 분석을 위해 건조된 잎은 Figure 1과 같은 방법으로 별도로 추출하여 사용하였다. 잎 10 g을 잘게 자른 후 80 % 아세톤 500 mL를 이용하여 20 min 동안 침적시킨 후 여과하였다. 여과하고 남은 잣나무 잎을 4 M NaOH 200 mL로 상온에서 24 h 동안 가수분해 후 여과하였다. 이 여액을 진한 염산으로 중화적정하였고 ethyl acetate로 3번 추출하여 이 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻어 실험에 사용하였다[19].

2.3. 잣나무 잎 추출물의 항균 활성 측정

2.3.1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919와 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078, 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC6538, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736는 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다.

2.3.2. 배지 및 배양조건

*P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4 °C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활성화시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult[®] Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37 °C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24 h 배양하면서 사용하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar: 6 %, ox-bile: 2 %, tween 40: 1 %, glycerol mono-oleate: 0.25 %)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30 °C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

2.3.3. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

최소억제농도(MIC)는 한천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 분획물들을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고, 시험균을

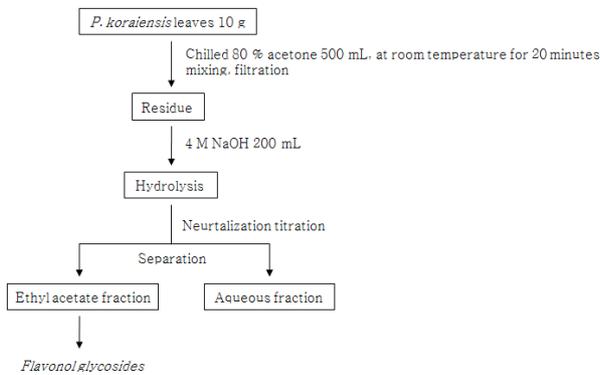


Figure 1. Scheme for preparation of fractions from *P. koraiensis* leaf extract.

평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *P. acnes*는 37 °C에서 72 h 후에, *S. aureus*와 *E. coli*는 37 °C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30 °C에서 48 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

2.4. 잣나무 잎 추출물의 항산화 효과 측정

2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

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

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

2.4.2. 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/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH, 그리고 H₂O₂)를 생성시킨다. 따라서 이 계

를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 이 총항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 사이의 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.

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

2.5. 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.

2.5.1. 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, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉각고에 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.

2.5.2. 잣나무 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-incubation시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

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 광조사하였다. 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. 잣나무 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 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다. 상대적인 광용혈 보호 효과는 아래와 같이 나타내었다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

2.6. 잣나무 잎 추출물로부터 플라보노이드의 동정 및 정량

2.6.1. TLC 및 HPLC를 이용한 잣나무 잎 추출물의 플라보노이드 분석

플라보노이드 분석을 위한 잣나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Millipore 0.45 µm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 ethyl acetate 분획의 전개용매는 ethyl acetate : formic acid : chloroform : water = 8 : 1 : 1 : 1을 사용하였고, aglycone 분획의 전개용매는 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5를 사용하였다. 성분

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fraction Obtained from *P. koraiensis* Leaf Extract

Column	VP-ODS 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 50 % in H ₂ O acetoneitrile solution
	(90 : 10 ~ 0 : 100, Gradient) for ethyl acetate fraction (50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

확인은 각 성분들의 R_f치와 자외선을 이용한 분리된 띠 등으로 확인하였다.

HPLC 분석은 A, 2 % acetic acid 수용액과 B, 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이 때, HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 특히 잣나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획의 경우 기울기 용리법은 0 ~ 50 min까지 90 % A에서 45 % A: 50 ~ 60 min까지 45 % A에서 0 % A: 60 ~ 65 min까지 0 % A에서 90 % A를 사용하였다[19]. 또한 잣나무 잎 추출물의 성분 분석을 위하여 TLC로 분리된 각각의 띠를 긁은 후 50 % 에탄올에 추출, 여과한 뒤 감압 농축하여 파우더를 얻었다. 이 때 얻어진 파우더 중 일부는 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Millipore 0.45 µm)를 이용하여 여과하고 그 여액을 HPLC 분석에 사용하였다.

2.7. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 잣나무 잎(*P. koraiensis* Leaf) 추출물의 수득률

건조한 잣나무 잎 100 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 3 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이때 수득률은 15.45 %이었다. Ethyl acetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 n-hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 0.62 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.19 %였다. Ethyl acetate 분획은 플라보노

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, w/v%) of Ethyl Acetate Fraction from *P. koraiensis* Leaf Extracts Against Various Bacteria

Strains	<i>P. koraiensis</i> leaf extract (50 % EtOH)	<i>P. koraiensis</i> leaf extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben
<i>E. coli</i>	-	0.50	0.13
<i>P. ovale</i>	0.50	0.13	0.13
<i>P. acnes</i>	0.13	0.06	0.25
<i>S. aureus</i>	0.06	0.25	0.25

이드 배당체를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 플라보노이드 배당체로 이루어진 ethyl acetate 분획에서 당이 제거시킨 것으로 aglycone이 주성분으로 존재한다. 이들 잣나무 잎 추출물의 수득율은 이들 추출물을 화장품 소재로 이용하기에 적절함을 보여준다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

3.2. 잣나무 잎 추출물의 항균 활성 측정

비듬균인 *P. ovale*에 대한 잣나무 잎 분획물 중 50 % 에탄올 추출물의 MIC는 0.50 %, ethyl acetate 분획은 0.13 %로 나타났다. Ethyl acetate 분획은 화장품에서 방부제로 사용하고 있는 methyl paraben (MP, MIC: 0.13 %)과 비교하였을 때 비슷한 항균활성을 나타내었다. 여드름균인 *P. acnes*에 대한 잣나무 잎 분획물 중 50 % 에탄올 추출물의 MIC는 0.13 %, ethyl acetate 분획은 0.06 %로 나타났다. 이는 MP (MIC: 0.25 %)와 비교하여도 여드름균에 대해서 항균 활성이 매우 큼을 보여주고 있으며, 잣나무 잎 분획물이 여드름에 유효한 소재 및 화장품 개발에 응용가능성이 높음을 시사한다(Table 2). 여드름 균처럼 특정 세균의 기능이나 생리활동을 약화 또는 억제시키거나 세균자체를 사멸시키기 위한 목적의 항균제 이외에도, 화장품에서는 제품의 변질이나 오염을 막기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 사용되고 있다. 일반적으로 세균의 세포막을 파괴하여 세균을 사멸시키는 기작을 응용하여 화장품에 응용되고 있는 방부제나 항균제들은 직접적으로 인체 피부와 접촉하여 반응하게 되므로 인체 피부에 영향을 주지 않는 가능한 한 최소량을 사용하여 최대의 효과를 얻을 수 있는 물질을 선택 사용하는 것이 중요하다. 이런 관점에서 살펴보면 본 실험에 대조군으로 사용된 호기성 균주인 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 잣나무 잎의 항균활성 측정 결과, *E. coli*에 대해서는 비교물질에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 *S. aureus*에 대한 잣나무 잎 분획물 중 ethyl

acetate 분획의 MIC는 0.25 %로 MP (MIC: 0.25 %)와 비교하여 동일한 항균활성을 나타내었고, 50 % 에탄올 추출물의 경우 MIC가 0.06 %로 MP (MIC: 0.25 %)와 비교하여 큰 항균활성을 나타내고 있음을 알 수 있다. 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.20 ~ 0.40 % 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 잣나무 잎 분획물은 훨씬 낮은 농도에서도 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

3.3. 잣나무 잎 추출물의 항산화 활성

3.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)- 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 알아볼 수 있다.

잣나무 잎(*P. koraiensis* leaf) 추출물, 그리고 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 2와 같다. 잣나무 잎 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC₅₀이 46.7 μ g/mL, ethyl acetate 분획은 23.02 μ g/mL, aglycone 분획은 22.93 μ g/mL를 나타냈다. Ethyl acetate 및 aglycone 분획의 free radical 소거활성이 세포막의 강력한 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (FSC₅₀, 8.98 μ g/mL)보다는 다소 떨어지지만 여전히 상당한 정도의 소거활성이 있음을 보여주고 있다.

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

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노

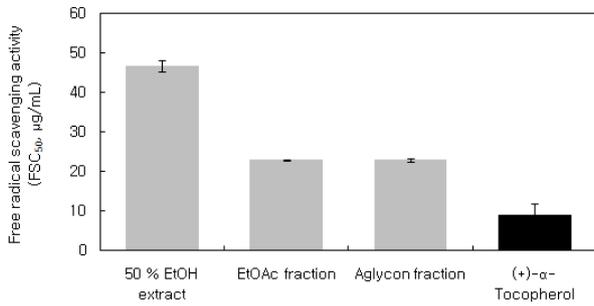


Figure 2. Free radical scavenging activities of extract/fractions of *P. koraiensis* leaf extracts and (+)- α -tocopherol.

프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS는 갯나무 잎 추출물에 의해 소거되어 화학발광이 감소됨을 Figure 3에서 알 수 있다. 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 갯나무 잎 50% 에탄올 추출물이 0.70 µg/mL, ethyl acetate 분획이 1.04 µg/mL, aglycone 분획이 1.43 µg/mL로 나타났다.

따라서 총항산화능은 50% 에탄올 추출물이 당을 제거시킨 aglycone 분획 및 ethyl acetate 추출물보다 활성산소 소거활성이 큼을 알 수 있다. 모든 분획들은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)의 총항산화능과 비슷하거나 보다 더 큰 활성을 보였다. 이러한 이유는 50% 에탄올 추출물이 매우 다양한 성분으로 구성되어 있어서 활성산소 소거능 뿐만 아니라 활성산소의 생성을 억제하는 작용을 포함하는, 즉 전이금속(특히 철이온)의 킬레이트 작용도 나타낼 수 있기 때문인 것으로 생각된다.

3.4. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

갯나무 잎 추출물의 활성산소에 의한 세포 손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Figure 4 및 Table 3에 나와 있다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간 (τ_{50})은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다. 갯나무 잎의 50% 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도 범위에서 농도 의존적(τ_{50} 이 각각 44.70, 72.45, 156.27, 461.70 min)으로 세포보호 효과를 나타냈다. Ethyl acetate 분획의 경우 62.35, 92.10, 178.20, 204.85 min, aglycone 분획의 경우 84.02, 140.65, 275.25, 329.60 min으로 모두 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타냈다. 특히 10 µg/mL의 낮은 농도에서 세포 보호 효과는 50% 에탄올 추출물(72.45 min) < ethyl acetate 분획(92.10

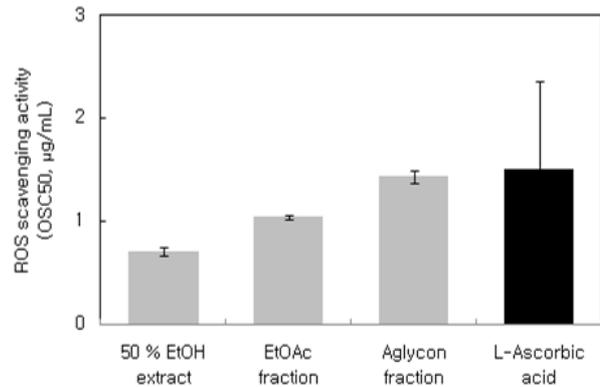


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of *P. koraiensis* leaf extracts and L-ascorbic acid in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

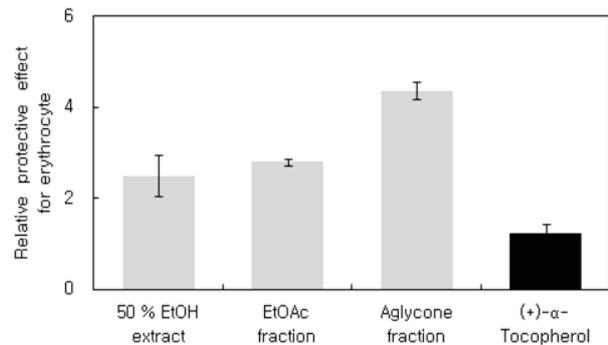


Figure 4. The effects of extract/fractions obtained from *P. koraiensis* leaf extracts and (+)- α -tocopherol at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effect = sample τ_{50} /control τ_{50} .

Table 3. Effects of Extracts from *P. koraiensis* Leaf and Reference Compound on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, µg/mL	τ_{50} (Half time of hemolysis ¹⁾)			
	5	10	25	50
<i>P. koraiensis</i> leaf extract (50 % EtOH)	44.70 ± 0.85	72.45 ± 0.35	156.27 ± 1.80	461.70 ± 13.50
<i>P. koraiensis</i> leaf extract (EtOAc fraction)	62.35 ± 0.75	92.10 ± 0.50	178.20 ± 2.20	204.85 ± 2.55
Deglycosylated fraction from <i>P. koraiensis</i> leaf extract (Aglycone fraction)	84.02 ± 3.44	140.65 ± 4.75	275.25 ± 9.75	329.60 ± 6.10
(+)- α -Tocopherol	-	38.00 ± 1.80	-	74.33 ± 6.35

1) Control, τ_{50} = 31 ± 1.0 min

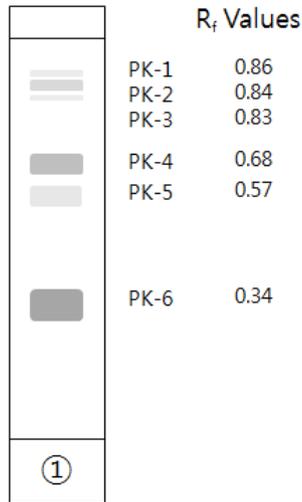


Figure 5. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from hydrolysis of *P. koraiensis* leaf extracts. Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v) ①: ethyl acetate fraction.

min) < aglycone 분획(140.65 min) 순으로 증가하였으며, 이는 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- α -tocopherol에 비해 매우 큰 세포보호 활성이 있음을 보여주고 있다. 따라서 이들 추출물들을 화장품 등에 사용하면 자외선에 의한 피부 손상에 있어 큰 보호 활성을 나타낼 수 있음을 시사한다.

3.5. 잣나무 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 분석

3.5.1. 잣나무 잎 추출물의 TLC 분석

잣나무 잎 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 5 및 Figure 6에 나타내었다. Figure 5는 잣나무 잎 추출물을 4 M NaOH로 처리한 후 얻은 ethyl acetate 분획으로 6 개의 띠(PK-1, PK-2, PK-3, PK-4, PK-5, PK-6)로 분리됨을 보여주고 있다. 그 중 R_f 0.34인 PK-6와 R_f 0.68인 PK-4는 자외선 흡수와 및 발색법으로 확인한 결과 추출물 중 농도가 가장 진한 주 성분을 확인할 수 있었다. 이 두 가지 띠 성분을 TLC 크로마토그램에서 각각 긁어서 추출·여과하고 여액을 감압·건조시켜 얻은 띠별 파우더를 성분 분석에 사용하였다. 분리된 TLC 띠 성분 확인에는 자외선 흡수 및 발색법, HPLC에 의한 분리 및 확인, MS/MS 등에 의한 구조 결정 등의 분광학적 데이터를 이용하였다. Figure 6은 잣나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획을 당 가수분해 시켜서 얻은 당이 제거된 aglycone 분획의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone

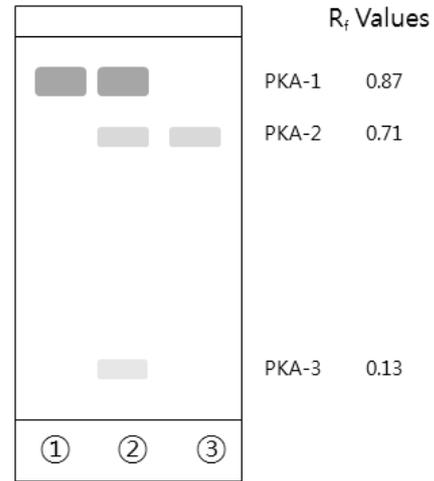


Figure 6. TLC chromatogram of aglycone fraction from hydrolysis of *P. koraiensis* leaf extracts. Eluent system: hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v) ①: kaempferol, ②: aglycone fraction, ③: quercetin.

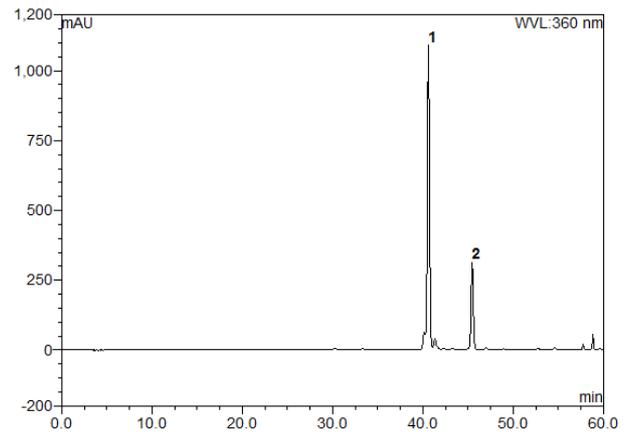


Figure 7. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from hydrolysis of *P. koraiensis* leaf extracts at $\lambda = 360$ nm. 1: PK-6, 2: PK-4 (Figure 5).

분획은 3개의 띠(PKA-1, PKA-2, PKA-3)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 R_f value는 0.87인 PKA-1은 kaempferol로 확인되었고, R_f value는 0.71인 PKA-2는 quercetin으로 확인되었다.

3.5.2. 잣나무 잎 추출물의 HPLC 분석

가수분해 한 잣나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 7과 같다. $\lambda = 360$ nm에서 크로마토그램은 2개의 주 피크를 나타내었다. 각각의 피크는 Figure 5에 있는 TLC 크로마토그램에서

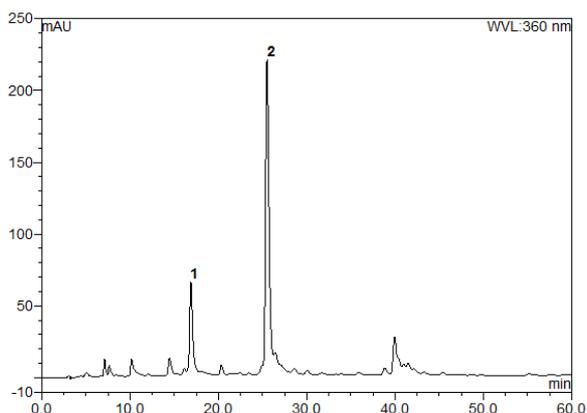


Figure 8. HPLC chromatogram of aglycone fraction from hydrolysis of *P. koraiensis* leaf extracts at $\lambda = 360$ nm. 1 : quercetin, 2: kaempferol.

Table 4. LC/ESI-MS/MS Characteristics of Ethyl Acetate Fraction from hydrolysis of *P. koraiensis* Leaf Extract in Negative Ion Mode

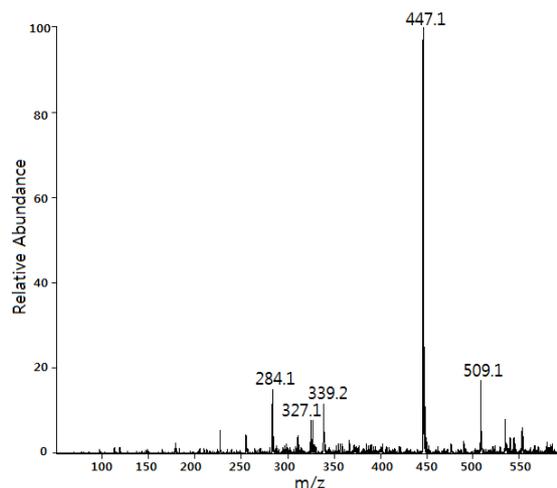
HPLC peak	TLC band	MW	[M-H] ⁻ m/z	LC/ESI-MS/MS m/z
1	PK-6	448	447	447, 327, 284, 255
2	PK-4	418	417	417, 327, 284, 255

분리된 띠를 긁어서 50 % 에탄올로 추출·여과하고 용매를 감압·건조시킨 후 얻은 파우더를 에탄올 용액으로 하여 HPLC로 분석하여 확인하였다. 그 결과 Figure 5의 TLC PK-4 (R_f 0.68)는 Figure 6의 HPLC peak 2, PK-6 (R_f 0.34)는 peak 1과 일치함을 확인하였다.

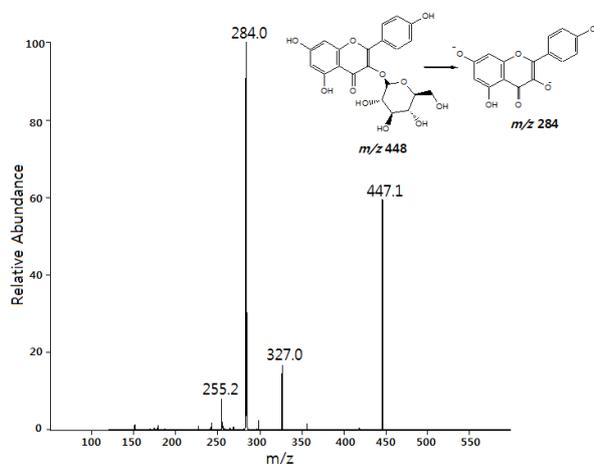
잣나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거반응 후 얻어진 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 8과 같다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 6의 TLC 크로마토그램에서 확인한 바와 같이 Figure 8의 peak 1은 quercetin, peak 2는 kaempferol임을 확인하였다. 잣나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 경우 소량의 quercetin 배당체가 함유되어 있어 aglycone 분획의 HPLC 크로마토그램에서 quercetin이 확인되었다.

3.5.3. LC/ESI-MS/MS를 이용한 잣나무 잎 추출물의 플라보노이드 분석

잣나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획의 주성분 구조를 분석하기 위하여, Figure 7에 있는 HPLC 상에서 함량이 높은 peak 1 (75.79 %), peak 2 (24.21 %)를 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 그 구조를 동정하였다.



(A)



(B)

Figure 9. Mass spectra of HPLC peak 1 (PK-6) in negative mode (LC-MS): (A) full MS spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 447.

3.5.3.1. HPLC Peak 1 (PK-6)의 구조 결정

Kaempferol-3-*O*-glucoside (astragalinalin) - TLC 및 HPLC를 이용한 해석 외에, HPLC peak 1 (PK-6)의 구조 해석을 위한 LC/ESI-MS/MS를 이용한 분석 결과 (Table 4, Figure 9), negative ion 모드에서 분자 이온 [M-H]⁻는 m/z 447에서 나타났으며, glucose 단위의 소실로 인한 이온 피크(m/z 447 → m/z 284)가 나타났다. 또한 분자 이온에서 -CH₂O- (neutral loss)의 소실에 의해 나타나는 특징적인 조각 이온인 m/z 255 이온 피크가 확인되었다. m/z 327 ion은 hexose의 ^{1,2}X cleavage에 의한 결과 (Figure 10)로 보이며 이는 F. Cuyckens

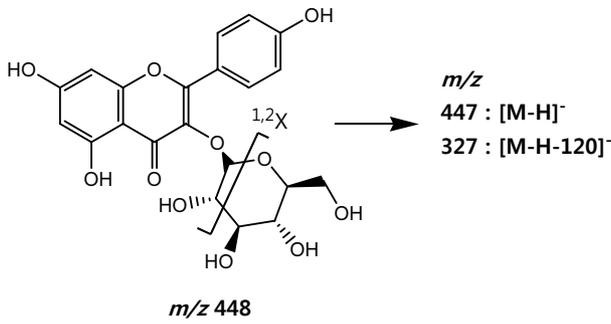


Figure 10. Structure and fragmentation pathways of HPLC peak 1 (PK-6) by negative ion mode LC/ESI-MS/MS.

등[19]에 의해 기술된 바와도 일치한다. 본 연구실에서 Yang 등[20]이, TLC의 자외선 흡수 및 발색법, UV λ_{max} , HPLC, NMR, IR, 그리고 LC/ESI-MS/MS로 나뉜 채 추출물의 ethyl acetate fraction의 성분 중에 kaempferol-3-O-glucoside가 있음을 확인하여 보고한 바 있는데, 바로 이 성분이 잣나무 잎 추출물의 TLC에서의 PK-6 띠와 분광학적 결과들이 일치함을 확인하였다. 따라서 잣나무 잎 추출물 PK-6는 kaempferol-3-O-glucoside로 동정하였다. 이는 Kang 등[21]에 의해 보고된 논문에서도 확인할 수 있었다.

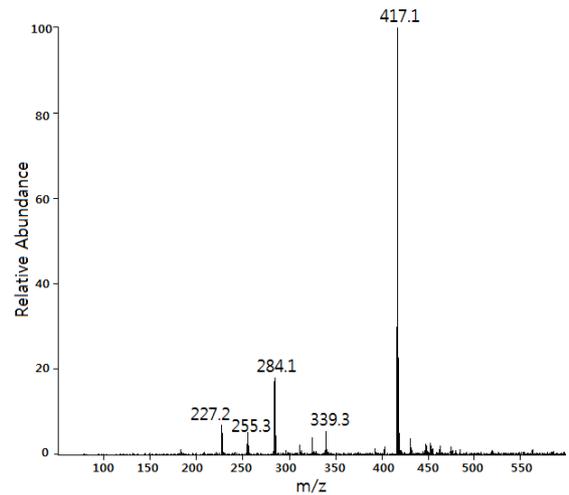
3.5.3.2. HPLC Peak 2 (PK-4)의 구조 결정

Kaempferol-3-O-arabinoside (juglanin) - HPLC peak 2 (PK-4)의 구조해석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용한 분석을 행한 결과(Table 4, Figure 11), negative ion 모드에서 분자 이온 [M-H]⁻가 m/z 417에서 나타났으며, glucoside 단위의 소실로 인한 이온 피크(m/z 417 → m/z 284)를 나타내었다. m/z 327 ion은 hexose의 1,2X cleavage에 의한 결과(Figure 12)로 보여지며, 또한 분자 이온에서 -CH₂O- (neutral loss)의 소실에 의해 나타나는 특징적인 조각 이온 피크 m/z 255가 확인되었다. 잣나무의 TLC 상에서의 PK-4 띠는 Choi 등[22]이 보고한 바 있는 마디풀 추출물 성분이기도 한 kaempferol-3-O-arabinoside (juglanin)임을 확인하였다.

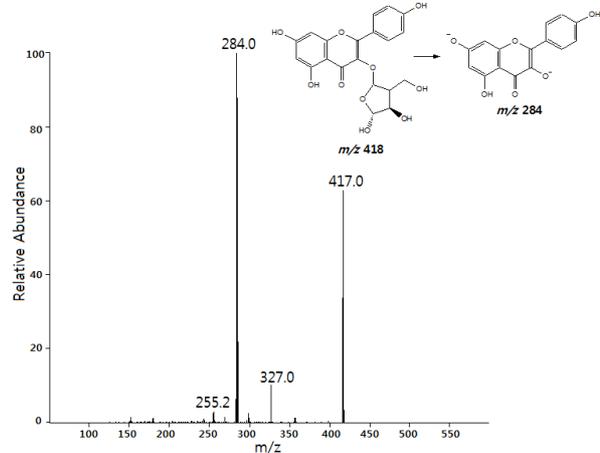
4. 결 론

1) 잣나무 잎 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 15.45 %, ethyl acetate 분획은 0.62 %, aglycone 분획은 0.19 %이었다.

2) 잣나무 잎의 항균활성 측정결과, *P. acnes*, *P. ovale*,



(A)



(B)

Figure 11. Mass spectra of HPLC peak 2 (PK-4) in negative mode (LC-MS) : (A) full MS spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 417.

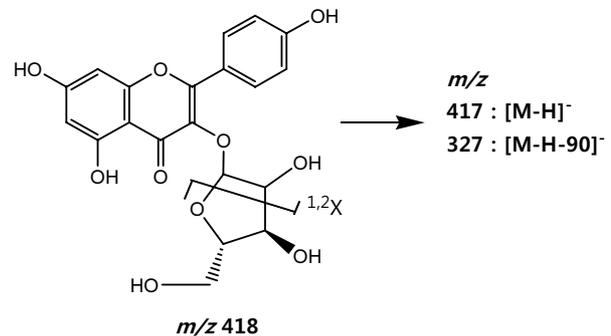


Figure 12. Structure and fragmentation pathways of HPLC peak 2 (PK-4) by negative ion mode LC/ESI-MS/MS.

S. aureus 및 *E. coli*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 각각 0.06 %, 0.13 %, 0.25 % 및 0.50 %로 나타났다. *P.* 매우 큰 항균활성을 나타내었으며, 이는 화장품에서의 천연 방부제 또는 항균제로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

3) 잣나무 잎 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물 46.70 µg/mL, ethyl acetate 분획 23.02 µg/mL, aglycone 분획 22.93 µg/mL로 비교적 큰 소거활성을 나타내었다.

4) 잣나무 잎 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 잣나무 잎 50 % 에탄올 추출물, 0.7 µg/mL, ethyl acetate 분획, 1.04 µg/mL, aglycone 분획, 1.43 µg/mL로 잣나무 잎 추출물 모두 비교물질인 ascorbic acid보다도 큰 항산화능을 나타내었다.

5) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 실험에서, 잣나무 잎 추출물은 µg/mL의 농도 범위(5 ~ 50 µg/mL)에서 추출물 모두 농도-의존적으로 세포 보호효과를 나타내었으며, 10 µg/mL의 농도에서 aglycone 분획은 비교물질인 (+)- α -tocopherol보다도 훨씬 큰 세포보호활성을 나타내었다.

6) 가수분해 한 잣나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 TLC 및 HPLC 크로마토그램(Figures 5, 7)은 각각 2개의 주성분 피이크(TLC, PK-4 및 PK-6; HPLC, peak 1 및 peak 2)를 나타냈으며, LC/ESI-MS/MS법의 negative ion 모드에서 HPLC peak 1 (PK-6)은 분자 이온 [M-H]⁻이 m/z 447, HPLC peak 2 (PK-4)는 m/z 417로 나타났다. 따라서 PK-6은 kaempferol-3-O-glucoside (astragalol)로, PK-4는 kaempferol-3-O-arabinoside (juglanin)임을 확인하였다. 잣나무 잎 추출물의 aglycone 분획의 TLC 및 HPLC 크로마토그램(Figure 6, Figure 8)은 각각 2개의 주성분 피이크(TLC, PKA-1 및 PKA-2; HPLC, peak 1 및 peak 2)를 나타냈으며, 표준 물질을 이용하여 확인한 결과 PKA-1은 quercetin으로, PKA-2는 kaempferol임을 확인하였다.

이상의 결과들은 잣나무 잎 추출물의 항산화 작용과 더불어 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 항균 활성 측정으로부터 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Y. M. Ha, B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim, J. S. Choi, and I. S. Choi, Anti-microbial activity of grapefruit sees extract and processed sulfur solution against human skin pathogens, *J. Life Science*, **19**(1), 94 (2009).
2. R. R. Marples, The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 326 (1974).
3. C. M. Gemmer, Y. M. DeAngelis, B. Theelen, T. Boekhout, and T. L. Dawson, Fast, non-invasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3350 (2002).
4. C. K. Zhoh, B. N. Kim, S. H. Hong, and C. G. Han, The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **28**(1), 166 (2002).
5. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, N. Takeda, and T. Nagahata, The skin-lightening effects of artocarpin on UVB-induced pigmentation, *Planta Med.*, **68**(1), 79 (2002).
6. B. A. Jukiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buettner, Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
7. D. L. Black, R. Chatterjee, and D. P. Hannon, Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators, *Photochemistry and Photobiology*, **54**(2), 215 (2008).
8. M. Kubo and H. Matsuda, Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis, *Fragrance J.*, **8**, 48 (1995).
9. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Pathol.*, **107**, 397 (1982).
10. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
11. Korea Dermatological Association, Dermatological Science, 325, Yeomungak, Seoul (2001).
12. S. S. Ham, D. H. Oh, J. K. Hong, and J. H. Lee, Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs, *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 155 (1997).

1. Y. M. Ha, B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim,

13. S. Jun, K. Goto, F. Nanjo, S. Kawai, and K. Murata, Antifungal activity of plant extract agai-nung *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funico-la*, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 442 (2000).
14. S. T. Kim, K. T. Lee, and T. J. Min, Characteristics of antimicrobial activities for the human pathogenic microorganism by extracts from Korean mush-rooms, *Kor. J. Mycol.*, **31**, 67 (2003).
15. K. S. Lee, J. C. Lee, K. H. Han, and M. J. Oh, Antimicrobial activities of extract of *Perilla fru-tescens Briton var. acuta* Kudo on food spoilage or foodborne disease microorganism, *Kor. Soc. Food Preserv.*, **6**, 239 (1999).
16. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaves extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
17. H. J. Lee, Y. J. Choe, D. H. Choe, and I. P. Hong, Extractives of *Pinus koraiensis* wood, *Mokchae Konghak*, **31**(5), 49 (2003).
18. B. H. Bae and Y. O. Kim, Effect of leaves Aqueous Extracts from Some Gymnosperm Plant on the Seed Germination, Seedling Growth and Transplant of *Hibiscus syriacus* Varieties, *Journal of Ecology and Field Biology*, **26**(1), 39 (2003).
19. F. Cuyckens and M. J. Claeys, Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 1 (2004).
20. H. J. Yang and S. N. Park, Component Analysis of *Suaeda asparagoides* Extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(3), 157 (2008).
21. Y. H. Kang and L. R. Howard, Phenolic composi-tion and antioxidant activities of different solvent extracts from pine needles in *Pinus* species, *Journal of Food Science and Nutrition*, **15**(1), 36 (2010).
22. H. J. Choi, N. J. Kim, J. W. Kim, and N. D. Hong, Anti-lipid Peroxidation and Liver Protective Effects of *Polygonum aviculare* L., *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**(3), 117 (1997).