

## 고로쇠 수액 나노입자의 항산화 활성 및 미백 효과의 증진

김지선\* · 서용창\* · 최운용\*\* · 김학수\*\*\* · 김보현\*\*\* · 신대현\*\*\* · 윤창순\*\*\*\*  
임혜원\*\*\*\* · 안주희\*\* · 이현용\*\*\*†

\*의료바이오신소재융복합연구사업단 강원대학교 바이오산업공학부, \*\*강원대학교 바이오산업공학부,  
\*\*\*소망화장품, \*\*\*\*세바바이오텍

## Enhancement of Antioxidant Activities and Whitening Effect of *Acer mono* Sap Through Nano Encapsulation Processes

Ji Seon Kim\*, Yong Chang Seo\*, Woon Yong Choi\*\*, Hack Soo Kim\*\*\*, Bo Hyeon Kim\*\*\*, Dae Hyeon Shin\*\*\*, Chang Soon Yoon\*\*\*\*, Hye Won Lim\*\*\*\*, Ju Hee Ahn\*\* and Hyeon Yong Lee\*\*\*†

\*Medical & Bio-Material Research Center and College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*\*SOMANG Cosmetics, Namdong-gu, Incheon 405-310, Korea.

\*\*\*\*Shebah Biotech Co., Hallym Business Incubator/Industry-University, Coop Center #301, Chuncheon 200-702, Korea.

**ABSTRACT :** In this study, we investigated antioxidant activities and whitening effects of *Acer mono* sap by encapsulation of nanoparticles. *Acer mono* sap was through ultra high pressure process and then encapsulated by lecithin. Nano-encapsulated The nanoparticles of *Acer mono* sap showed highest free radical scavenging effect as 89.7% in adding sample (1.0 mg/ml), compared to sap of non-encapsulation. It was showed strong inhibition effect on melanin production test by Clone M-3 cells as 47.8%. High inhibitory of tyrosinase was also measured as 85.8% by adding lecithin nano-particle of 1.0 mg/ml. The nano-particles also showed 14.8% of low cytotoxicity against human normal fibroblast cells in adding 1.0 mg/ml of the highest concentration. These results indicate that *Acer mono* sap may be a source of cosmetic agents capable of improving whitening effect and antioxidant activities.

**Key Words :** *Acer mono* Sap, Ultra High Pressure, Antioxidant, Whitening Effect

### 서 언

사람의 피부색은 외적, 내적 인자에 의해 달라지게 되는데 피부색 결정의 근본적 내적요인은 멜라닌이라는 피부색소이다. 멜라닌은 표피 기저층에 있는 멜라닌 세포내의 멜라노솜에서 멜라닌이 합성되어 수상돌기를 통해 표피의 각질세포로 이동되어 피부색을 나타내고, 자외선, 외부자극 인자 등으로부터 피부를 보호해주는 기능을 하는 반면, 과도한 색소침착은 주근깨와 기미를 형성하고 피부노화를 심화시키는 등의 부정적인 기능을 나타내기도 한다 (Maeda and Fukuda, 1991). 멜라닌 색소의 생합성은 여러 효소들에 의하여 조절되는데, 그 중 tyrosinase는 tyrosine을 기질로 하여 dihydroxyindole의 산화에 작용한다 (Aroca et al., 1993). 현재 tyrosinase 활성 억

제제를 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 많이 알려져 있는 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, 4-hydrox-yanisole, kojic acid, azelaic acid 등이 있으나, 경제성 및 안전성에 대한 문제점이 있어 사용에 어려움이 있다 (Tomita et al., 1990; Cabane et al., 1994; Jeong et al., 1995; Hwang et al., 2002). 또한 피부는 기능적, 구조적으로 변화되어 노화를 시각적으로 나타내어 준다. 피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소 중에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 인간의 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응 과정에서 발생하는 활성산소는 자기 방어 기구인 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만, 이러한 활성산소가 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 2011 May 12 / 1st Revised 2011 June 14 / 2nd Revised 2011 June 21 / Accepted 2011 June 22

가해지면 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 성인병과 암 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 된다 (Park *et al.*, 2007; Halliwell, 1991). 또한, 활성산소가 다량 생성 시 체내에서는 자외선에 의한 활성산소의 생성을 막기 위해 멜라닌 색소를 분비한다 (Park, 1997). 이러한 이유로 체내의 활성 산소를 제거 시, 산화에 의한 노화의 방지와 동시에 활성 산소에 의한 멜라닌 색소의 합성이 저하되어 미백 효과가 동반될 것으로 추측된다. 학계에서는 이러한 미백 및 항산화 등의 기능성 성분이 함유된 식물을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

고로쇠나무는 표고 100~1,800 m에 자생하는 단풍나무과 낙엽교목으로 한국, 일본, 중국 등지에 널리 분포한다. 우리나라의 고로쇠나무는 지리산, 조계산 및 강원도 일대의 습한 계곡에 자생하는 내한성이 강한 식물로 알려져 있다. 우리나라에는 고로쇠나무 (*Acer mono*), 붉은고로쇠나무 (*A. mono for. rubripes*), 우산고로쇠나무 (*A. dkamotoanum*), 만주고로쇠나무 (*A. truncatum*), 긴고로쇠나무 (*A. mono for. dissectum*), 왕고로쇠나무 (*A. mono var. savatieri*), 산고로쇠나무 (*A. mono var. horizontale*), 집게고로쇠나무 (*A. mono for. connivens*), 털고로쇠나무 (*A. mono var. ambiguum*) 등 9종의 품종 및 변종이 생육하고 있는 것으로 알려져 있다 (Lee, 1982). 고로쇠나무는 경칩 무렵에 수액을 채취하여 약수로서 민간에서 이용하고 있는 대표적인 수종이다. 수액이란 수목의 체내에 존재하는 액체를 총칭하는 것으로 국내에서 건강음료로써 음용되고 있는 수종은 단풍나무과의 고로쇠나무와 당단풍, 자작나무과의 자작나무, 거제수나무, 박달나무, 물박달나무, 사스래나무 등을 들 수 있다 (Lee *et al.*, 2010). 이들 수종에서 총 채취량의 97%가 고로쇠나무 수액이다 (Korea Forest Service, 2002). 우리나라에서는 골리수 (骨利樹)라는 이명에서도 알 수 있듯이 뼈에 이로운 나무라는 데서 유래되었다는 속설이 있고 (Ahn, 1975,) 다른 수액에 비해 가장 많이 이용되고 있으나 고로쇠나무를 비롯한 여러가지 수액의 약리적 성분은 정확히 알려져 있지 않으며, 주성분이 자당이라는 사실과 다량의 미량원소를 함유하고 있다는 것이 보고되었다 (Kim *et al.*, 1991; Yoon *et al.*, 1992; Ahn, 1975).

우리나라는 고로쇠나무 수액에 대한 음용의 역사도 깊고 최근에는 수액 소비량도 증가하고 있어 수액을 이용한 산업화가 시도되고 있으나 이를 뒷받침할 과학적 연구가 미흡한 실정이다. 백운산, 지리산 지역에서는 30~40여년 전부터 수액 채취가 행해져 왔으나, 우산고로쇠나무가 자생하고 있는 울릉도 지역에서는 2002년도에 처음으로 수액 채취가 허가되어 최근에서야 수액 채취가 활발하게 이루어지고 있다.

고로쇠 수액에는 대표적인 미네랄로 알려져 있는 Ca, Mg,

K, Na 등의 무기질이 풍부하여, 섭취 시 항노화 효능 및 미백 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다 (Kim, 2005). 이러한 유용물질들을 세포내로 효과적으로 전달하여, 보다 향상된 생리활성을 나타내기 위해서는 나노수준의 물질 포집 기술이 요구된다. 물질은 나노미터 ( $10^{-9}$ ) 스케일에서 새로운 물리화학적 특성을 나타내게 되고, 이러한 특성들을 잘 활용하여 기존에 구현하지 못했던 많은 기술적 성과들을 얻을 수 있다 (Kim, 2006). 나노입자는 인체에 쉽게 침투할 수 있기 때문에 순환을 통하여 각기 다른 신체부위로 전달되며, 특히 100 nm 이하의 소수성 표면을 갖는 리포솜은 분자성 약물의 운반을 용이하게 하여 세포에 대한 친화성이 증가하게 된다. 그러나 인체의 내피세포는 인지질로 구성되어 있어 수용성 성분이 침투하기 어려운 구조로 되어 있다. 따라서 수용성 물질의 세포 내 침투 효율 향상을 위해서 레시틴의 유상이 포집한 리포솜 형태로 활성물질을 나노입자로 제조하고 이를 생체에 적용시켜 향상된 침투력 및 생체활용성을 나타내고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 (Kim and Kwak, 2004). 이에 따라, 세포 내 침투가 용이하지 않은 고로쇠수액도 레시틴으로 포집하여 나노입자화하면 세포 내로 보다 쉽게 침투하여 높은 활용성을 가질 것으로 판단된다.

따라서 본 연구는 이러한 고로쇠 수액의 나노입자를 일반 고로쇠 수액과의 비교를 통하여 기능성화장품으로서 적용 가능성을 검토하고, 더 나아가 향장소재와 관련된 분야에 활용하기 위한 기초 자료로 이용하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 및 시약

Human dermal fibroblasts는 CCD-986sk으로 한국세포주은행(KCLB)로부터 동결 상태로 구입하였다. 또한 melanocyte인 Clone-M3 (KCLB No. 10053.1)도 한국 세포주은행으로부터 동결상태로 구입하였다. 한국세포주은행으로부터 구입한 CCD-986sk와 Clone-M3 cell을 각각 DMEM배지와 RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건하에서 배양하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험재료

본 실험에서 사용된 고로쇠, 우산고로쇠 수액은 2010년 2월~4월에 채취된 것을 바로 실험실로 옮겨 실험에 사용하였다. 채취 방법은 천공법으로 하였으며 나무와 나무사이를 호스로 연결하여 채취하는 연결식으로 하였다. 천공은 드릴로 직경 12 mm, 길이 15 m로 수간부에 구멍을 뚫어 수액을 채취하였다. 천공 위치는 지면으로부터 1 m 이내로 하였다 (Moon and

Kwon, 2004). 채취한 수액은 곧바로 냉동상태로 보관하였고 실험을 할 때마다 해동하여 사용하였다.

### 3. 나노입자화 공정

등근바닥플라스크에 식용 가능한 lecithin 50 mg을 chloroform (minimum, 99%, USA)에 녹여 감압기를 사용해 multilayer를 형성시킨다. 질소가스를 이용하여 유화제를 완전히 건조시킨 후 건조된 layer가 형성된 등근바닥플라스크에 고로쇠 및 우산고로쇠 수액 50 ml 넣고, 초음파 분산기 (VCX-500, SONIC, USA)를 이용하여 상온에서 20 kHz로 2시간 동안 균질화시켜 수용성 나노입자를 제조하였다 (Kang *et al.*, 2005).

### 4. 나노입자 측정

고로쇠 수액 나노입자의 크기와 균일성, 크기별 분포 측정을 위해 DLS (Dynamic light scattering, Brookhaven Instrument Co.)를 이용하였다. TEM 사진을 찍기 위해서 phosphotungstic acid solution을 이용하여 negative staining을 하였다. 나노 입자가 충분히 염색이 된 후, formvar/carbon으로 코팅된 grid에 얇게 펴서 말린 뒤 EFTEM (LEO 912AB OMEGA, Carl Zeiss, Germany), 120 kV에서 관찰 하였다 (Saxena *et al.*, 2005).

### 5. 세포독성 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann 방법을 변형하여 실시하였다 (Mosmann, 1983). CCD-986sk 세포를  $2 \times 10^4$  cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 70-80% confluency 배양시점에 시료를 투여하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액 (5  $\mu$ g/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였으며, 다시 10  $\mu$ l acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대적인 세포 생존율은 MTT에 의해 formazan 크리스탈로 변환된 양을 대조군에 대한 백분율로 계산한다.

### 6. Tyrosinase 억제효과 탐색

Tyrosinase 억제효과는 dopachrome 방법을 이용하여 측정하였다. 150  $\mu$ l의 mushroom tyrosinase-150 unit, 225  $\mu$ l의 2.5 mM L-tyrosine, 225  $\mu$ l의 0.4 M hepes buffer (pH 6.8), 그리고 300  $\mu$ l의 ethanol 용액 혹은 시료 (1 mg/ml) 용액을 섞은 후 배양 전과 15분간 배양 후 각각의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 억제되는 정도를 살펴보았다. Tyrosinase의 억제 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = (D - C) - (B - A) / (D - C) \times 100$$

A와 B는 각각 시료가 첨가된 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액 (기준 용액)의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제 효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

### 7. Clone M-3 세포로부터 melanin 생성량 측정

쥐 유래 melanocyte인 Clone-M3 세포는 melanin을 생성한다. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 소기관인 melanosome에서 생합성되며 이는 가시광선 영역대의 흡광도를 측정함으로써 생성량을 비교할 수 있다 (Lim *et al.*, 2006). Clone M-3 세포 집종 후 3일간 시료를 처리하고 배지를 제거한 다음 세포를 PBS로 세척하고, 각 well 당 1 ml의 1 N NaOH를 첨가한 후 교반하여 세포막을 용해함으로써 melanin 성분을 녹여 나오게 하여, 가시광선 영역대 중 가장 파장이 짧은 푸른색 가시광선 영역인, 400 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생성량을 비교하였다.

### 8. 환원력 측정

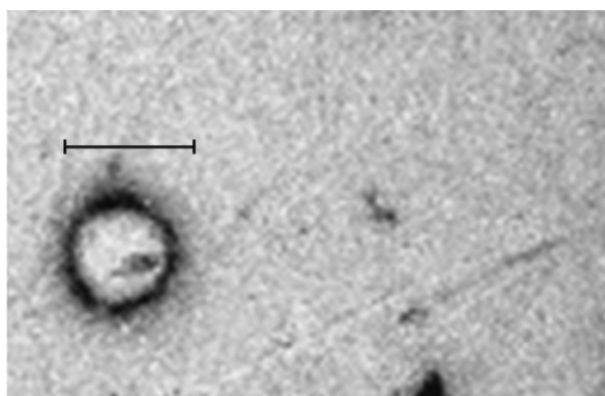
환원력은 고로쇠 수액 및 수액 함유 나노입자 시료 2.5 ml에 200 mM sodium phosphate buffer (2.5 ml, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide 2.5 ml를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 2.5 ml trichloroacetic acid (10%, w/v)를 첨가하여 650  $\times$  g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리한 상정액 5 ml에 탈이온수 5 ml와 1% ferric chloride 1 ml를 첨가시킨 후 UV-vis Spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Oyaizu, 1986).

### 9. DPPH 소거활성 측정

고로쇠 수액 나노입자의 항산화 활성 측정은 메탄올 0.5 ml에 각각 50, 100, 250, 500  $\mu$ g/ml의 농도로 추출물을 녹여 시료를 조제하였으며, 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 이후 0.15 mM의 DPPH 용액 2 ml을 첨가한다. 반응액을 완전히 섞기 위해서 10초간 vortexing한 다음, 실온에서 30분간 반응시킨다. 남아있는 DPPH의 양을 측정하기 위해서 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정한다.

### 10. 통계처리

초고압 처리된 고로쇠 수액 나노입자의 피부 면역 및 미백 활성 효과는 Microsoft excel의 student t-test에 의해 유의성을 검정하였다. 또한 각 활성 실험 등에 대한 결과는 3반복



**Fig. 1.** The nanoparticles of lecithin by TEM. TEM micrograph of nanoparticle from *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation. Scale of bar is 200 nm.

실험에 의한 Mean ± SD로 표시했으며 각 평균치 간의 차이는 student t-test에 의해 p = 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

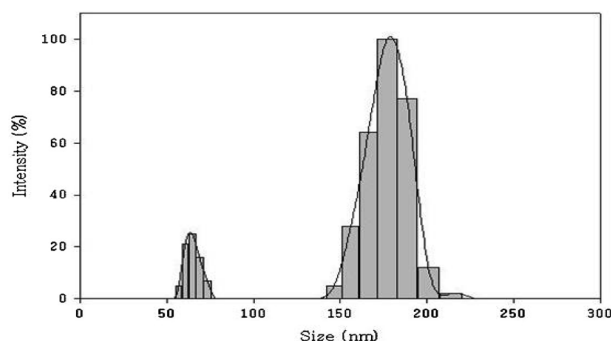
## 결과 및 고찰

### 1. 나노입자의 확인

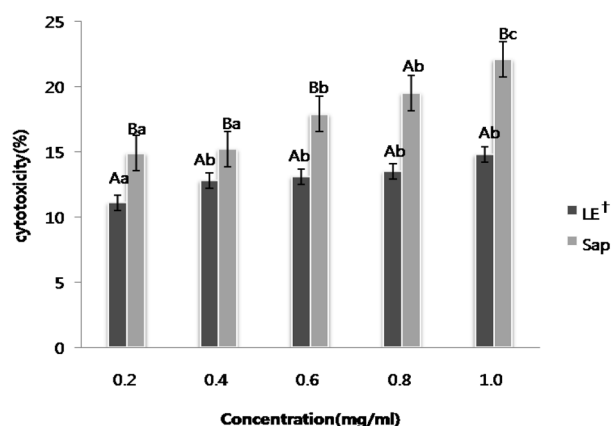
항산화 활성 및 미백 효능의 증진을 목적으로 하여 제조된 고로쇠 수액 나노입자는 수용성 추출물을 유상이 포집한 W/O 형태의 리포솜으로 구성된다. 제조된 고로쇠 나노입자의 형태를 확인하기 위하여 TEM을 이용하여 관찰하였다 (Fig. 1). 나노입자들은 negative staining에 의해서 하얗게 보이는 구형들이다. 염색에 사용한 phosphotungstic acid는 수용성 부분을 염색시키므로 지질이 포함되어 있는 나노입자에는 염색이 되지 않아 하얗게 보인다. 만들어진 입자가 나노수준으로 제조되었는지 확인하기 위하여 DLS로 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. DLS 측정 결과, 레시틴으로 포집한 고로쇠 수액의 나노입자는 150~200 nm의 범위로 형성된 것을 알 수 있다. 이는 일반적으로 인체에 투과가 가능한 100~500 nm 범위 내에 있으며, 균일한 크기로 분포하고 있으므로 이 고로쇠 나노입자가 연구의 목적에 알맞게 제조되었음을 알 수 있다. 평균 200 nm 인 표피와 크기를 고려한다면 제조된 나노입자는 생체에 효과적으로 흡수 가능한 제형이라고 판단된다.

### 2. 나노입자의 세포독성

실험에 사용된 고로쇠 나노 시료의 농도는 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성을 검토하였다. Fig. 3은 CCD-986sk 정상 세포에 대한 독성을 나타낸 것으로 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 레시틴 고로쇠 나노입자가 14.8%로 일반 고로쇠 수액이 22.1%인 것과 비교했을 때 낮은 세포 독성을 보였다. 전반적으로 20% 이하로 나타난 고로쇠 나노입자 시료의 세포 독성 값은 HEK293 세포를 이용하여 천연알칼로이



**Fig. 2.** Size distribution of *Acer mono* sap nanoparticles with lecithin using dynamic light scattering (DLS).

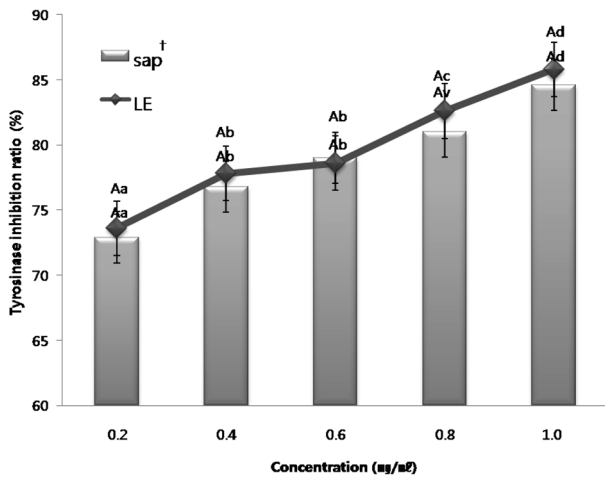


**Fig. 3.** Cytotoxicity of the *Acer mono* sap and nano particle of *Acer mono* sap at 1.0 mg/ml. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-B) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ . †LE: *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation, sap: *Acer mono* sap.

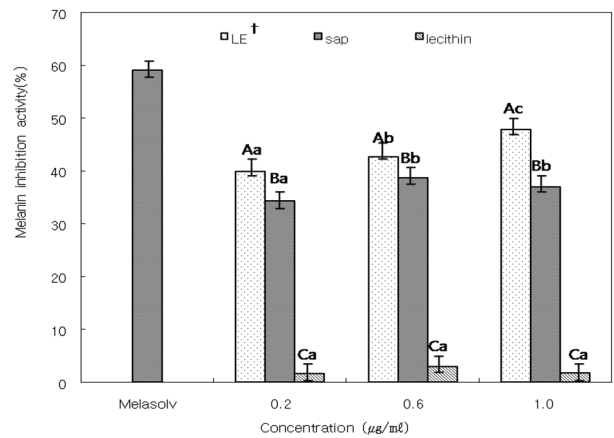
드의 세포 독성을 연구한 결과인 40%와 비교했을 때 레시틴으로 포집한 고로쇠 나노입자는 세포 수준에서 큰 영향을 주지 않으며, 미미한 독성을 보이므로 (Ji *et al.*, 2008), 인체에 적용 시에도 부작용이 거의 없이 안전하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. Tyrosinase 억제효과 탐색

Tyrosinase는 피부의 멜라닌 색소를 생성하는 효소로 tyrosinase의 저해활성을 측정함으로써 제조된 고로쇠 나노입자의 미백 효과를 예측할 수 있다. 나노입자의 농도를 각각 달리하여 tyrosinase의 저해 활성을 Fig. 4에 나타내었다. 즉, 실험 결과를 보면 수액의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase의 저해 활성도 증가하는 경향을 보였으며, 1 mg/ml의 농도에서 85.8%의 높은 저해율을 나타냈다. 가래나무 추출물의 미백 효



**Fig. 4.** Tyrosinase inhibitory activity of the nano-particle of *Acer mono* sap. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ . †LE: *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation, sap: *Acer mono* sap.



**Fig. 5.** Melanin contents inhibitory activity of the nanoparticles of *Acer mono* sap in Clone M-3 cells. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-b) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ . †LE: *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation, sap: *Acer mono* sap; lecithin: only lecithin particles.

과 연구에서 300 µg/ml의 농도에서 가래나무 추출물의 tyrosinase 저해율이 60% 정도였으나, 고로쇠 나노입자는 200 µg/ml의 농도에서 73.6%의 높은 저해율을 나타내었다 (Lee et al., 2010). 고로쇠가 포집되지 않은 순수 레시틴 입자에 대해서는 tyrosinase 저해활성이 5% 미만으로 거의 나타나지 않는 것으로 보아, 레시틴 자체는 미백활성에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 멜라닌 색소를 생성하는 효소인 tyrosinase는 활성이 적을수록 좋은 미백 효과를 가진다고 볼 수 있으므로, 고로쇠 수액 레시틴 나노입자는 기능성 미백 향장 소재로서 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

#### 4. Clone M-3 세포로부터 melanin 생성량 측정

고로쇠 수액 나노입자의 Clone M-3 세포주 melanin 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 100%의 농도로 샘플 처리하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. 대조군으로 사용된 Melasolv는 미백제로 알려진 합성물질이며 처리 시 59%의 저해활성을 보였다. Fig. 5를 보면 고로쇠 수액 나노입자는 1.0 mg/ml의 농도에서 47.8%의 높은 멜라닌 생성 저해 활성을 보였으며 일반 고로쇠 수액의 경우 36.9%의 저해활성을 보였다. 고로쇠가 포집되지 않은 순수 레시틴 입자에 대해서는 멜라닌 생성 저해율이 2% 미만으로 거의 나타나지 않았다. 고로쇠 수액 나노입자의 경우, 유용생리활성 물질이 나노 제조 공정을 통해 세포막 안쪽으로의 흡수가 효과적으로 이루어져 높은 멜라닌 생성 저해율을 나타낸 것으로 사료된다. 이를 통해 나노 제조 공정을 통해 효과적으로 세포 내 투과가 이루어질 수 있음을 확인할 수 있다.

#### 5. 환원력

고로쇠 나노입자의 농도를 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정 한 결과 Table 1과 같았다. 환원력 측정에서의 흡광도 수치는 그 수치 자체가 추출물의 환원력을 나타내어, 높은 환원력을 가지는 추출물은 흡광도의 수치가 높게 나타난다. 실험 결과를 보면 추출물 농도가 점차적으로 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 1.0 mg/ml의 농도에서 레시틴 나노입자의 O.D.값은 1.885, 일반 고로쇠 수액의 O.D.값은 1.814로 측정되었다. 레시틴으로 포집한 고로쇠 수액 나노입자와 나노입자화 되지 않은 일반 고로쇠 수액의 환원력의 차이는 미미하지만 나노입자의 환원력이 더 높았으며, 이와 같은 결과는 고추잎 용매 분획물의 생리활성 연구에서 에틸아세테이트 고추잎 분획물이 1.5 mg/ml의 농도에서 0.8의 흡광도값을 갖는 것과 비교하여 보다 높은 환원력을 나타내므로 (Kim et al., 2003), 고로쇠 나노입자가 높은 항산화 활성을 가질 것으로 사료되며, 나노 제조 공정이 병행되면서 인체에 효과적으로 흡수됨에 따라 더 높은 활성을 낼 수 있을 것으로 기대된다.

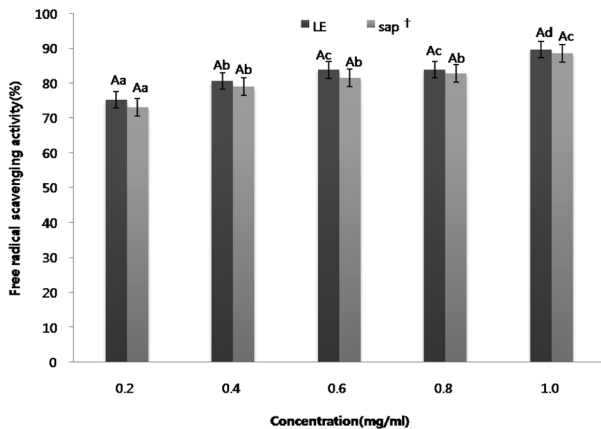
#### 6. DPPH 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정법은 항산화 활성 측정방법의 하나이다. DPPH가 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 보라색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 측정 한 고로쇠 수액의 레시틴 나노입자의 전자공여능 효과는 1 mg/ml의 농도에서 89.7%의 수치를

**Table 1.** Reducing power of *Acer mono* sap and its nanoparticles by lecithin.

Sample	Reducing power (O.D.) <sup>†</sup>				
	Concentration (mg/ml)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
LE	1.566±0.035 <sup>Aa</sup>	1.620±0.065 <sup>Aa</sup>	1.698±0.046 <sup>Aa</sup>	1.715±0.048 <sup>Ab</sup>	1.885±0.050 <sup>Ac*</sup>
sap	1.570±0.040 <sup>Aa</sup>	1.618±0.051 <sup>Aa</sup>	1.658±0.046 <sup>Ab</sup>	1.705±0.049 <sup>Ab</sup>	1.814±0.014 <sup>Bb</sup>
Lecithin	0.340±0.065 <sup>Ba</sup>	0.375±0.014 <sup>Ba</sup>	0.315±0.065 <sup>Ba</sup>	0.340±0.048 <sup>Ba</sup>	0.321±0.049 <sup>Ca</sup>

\*Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-b) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ . LE: *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation, sap: *Acer mono* sap, Lecithin: Only lecithin particle.



**Fig. 6.** DPPH radical scavenging activity on *Acer mono* sap nanoparticles. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ . <sup>†</sup>LE: *Acer mono* sap by lecithin-encapsulation, sap: *Acer mono* sap.

나타내었는데(Fig. 6), 짙신나물 잎의 물 추출물의 83.4%와 비교했을 때 연구가치가 있는 의미 있는 결과임을 알 수 있다 (Seo *et al.*, 2008). 또한, 항산화 효능이 뛰어나다고 알려진 땅콩의 전자 공여능이 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 26% 정도에 머무는 것에 비하여, 고로쇠 나노입자는 같은 농도에서 거의 2.5 배에 이르는 활성산소 소거력을 확인할 수 있었다 (Kang *et al.*, 2010). 따라서 고로쇠 수액에는 항산화 활성을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며, 이는 활성산소의 제거가 멜라닌 색소 형성억제에 효과적이라는 연구보고 (Tobin *et al.*, 1994; Bernadette *et al.*, 1998)에 근거하여 고로쇠 나노입자가 피부 내 활성산소를 소거함으로써 이에 연속적인 기작으로 인하여 미백작용을 나타낼 수 있을 것으로 추측된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하

여 이루어진 것 (과제고유번호 : A103017)으로 이에 감사드립니다.

### LITERATURE CITED

Ahn WH. (1975). Color index and coloring substances in Korean sugar maple, *Acer mono* Max. syrup. Journal of Korea Forest Research. 26:7-12

Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K and Hearing VJ. (1993). Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. Journal of Biological Chemistry. 268:25650-25655.

Bernadette EK, Marianne D and Bernhard P. (1998). Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. Experimental Dermatology. 38:45-48.

Cabane J, Chazara S and Garcia CF. (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 46:982-985.

Halliwell B. (1991). Drug antioxidant effect. A basis for drug selection? Drugs. 42:569-605.

Hwang JS, Shin HJ, Noh HS, Choi HJ, Ahn SM, Park DS, Kim DH, Lee BG, Chang IS and Kang HH. (2002). The inhibitory effects of 3,4,5-Trimethoxy cinamate thymol ester(TCTE, Melsolv®) on Melanogenesis. Journal of the Society of Cosmetic Scientist of Korea. 28:135-149.

Jeong SW, Lee NK, Kim SJ and Han DS. (1995). Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Journal of Food Science and Nutrition. 27:891-896.

Kang HI, Kim JY, Kwon SJ, Park KW, Kang JS and Seo KI. (2010). Antioxidative effects of peanut sprout extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 39:941-946.

Kang KC, Lee CI, Pyo HB and Jeong NH. (2005). Preparation and characterization of nano-liposomes using phosphatidylcholine. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 11:847-851.

Kim CM, Jung DL and Sheo HJ. (1991). A study on the ingredients in the sap of *Acer mono* Max. and *Betula costata* T. in Mt. Jiri area. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 20:479-482.

Kim DM and Kwak HS. (2004). Nano food materials and approachable development of nanofunctional dairy products

- Korean Journal of Dairy Technology Science. 22:1-12.
- Kim JH, Jeong CH and Shim KW.** (2003). Biological activities of solvent fractions of capsicum annum leaves. Korean Journal of Food Preservation. 10:540-546.
- Kim NI.** (2005). Role of vitamins and minerals on skin care and beauty. Food Science and Industry. 38:16-25.
- Kim YR.** (2006). Nanotechnology in food safety. Food Science and Industry. 41:10-16.
- Korea Forest Service.** (2002). Statistical Yearbook of forestry. Korea Forest Service. 32:407.
- Lee CH, Nho JW, Hwang IG, Shin CS, Lee JS and Jeong HS.** (2010). Shelf-life extension of *Acer mono* sap using ultra filtration. Journal of Korean Society Food Science Nutrition. 39:455-460.
- Lee GW, Lee JY and Cho YH.** (2010). Whitening effect of the extracts from *Juglans mandshurica*. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 25:18-24.
- Lee TB.** (1982). Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa. 522-524.
- Lim E, Browing J, MacGregor D, Davis ID and Cebon JS.** (2006). Desmoplastic melanoma: comparison of expression of differentiation antigens and cancer testis antigens. Melanoma Research. 16:347-355.
- Maeda K and Fukuda M.** (1991). In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. Journal of Society Cosmetic Chemistry. 42:361-368.
- Moon HS and Kwon SD.** (2004). Sap collection and major compounds of *Acer okamotoanum* Nakai native in Ullungdo. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 12:249-254.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65:55-63.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44:307-315.
- Park SN.** (1997). Skin aging and antioxidants. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 23:75-132.
- Park YJ, Kim HJ and Heo BG.** (2007). Anti-microbial, anti-oxidant and anti-inflammation effect with of the flower and the young seaf extracts in oriental cherry plant. Korea Society for People, Plants and Environment. 10:43-49.
- Saxena A, Sachin K, Bohidar HB and Verma AK.** (2005). Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 45:42-48.
- Seo HS, Chung BH and Cho YG.** (2008). Antioxidant and anticancer effects of agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and chinese lizardtail (*Saururus chinensis* Baill). Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:139-143.
- Tobin D and Thody AJ.** (1994). The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. Journal of the American Academy of Dermatology. 3:99-105.
- Tomita K, Oda N, Kamel M, Miyaki T and Oki T.** (1990). A new screening method for melanin biosynthesis inhibitor using *Streptomyces bikiniensis*. Journal of Antibiotics. 12: 1601-1605.
- Yoon SL, Jo JS and Kim TO.** (1992). Utilization and tapping of the sap from birches and maples. Mokchae Konghak. 20:15-20.