

참가시나무의 항산화 효과 및 활성 성분 분석

이혜진·박수남[†]

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2011년 6월 3일 접수, 2011년 6월 9일 수정, 2011년 6월 13일 채택)

Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts

Hye Jin Lee and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of
Technology and Science, 232, Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received June 3, 2011; Revised June 9, 2011; Accepted June 13, 2011)

요약: 본 연구에서는 참가시나무 추출물의 항산화 활성, tyrosinase 및 elastase 저해 활성, 그리고 추출물들의 성분을 확인하였다. 참가시나무는 50 % ethanol을 이용해 추출하였으며, 이 추출물을 이용해 ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 만들어 실험에 사용하였다. 참가시나무 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성(FSC₅₀)은 aglycone 분획(8.25 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종에 대한 aglycone 분획의 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 0.039 µg/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다. 참가시나무 추출물의 rose-bengal로 증감된 ¹O₂에 의한 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 모든 분획에서 농도 의존적(1 ~ 25 µg/mL)으로 증가하였으며, 특히 aglycone 분획은 10 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 259.9 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 참가시나무 추출물중 aglycone 분획의 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)과 elastase 저해활성(IC₅₀)은 각각 21.82 µg/mL 및 41.18 µg/mL 큰 활성을 보여주었다. TLC와 HPLC를 이용한 성분분석 결과 quercetin, keampferol, catechin, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside 등이 존재함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 참가시나무 추출물은 활성산소종을 소거하는 항산화제로 이용가능하며, 특히 aglycone 분획의 현저한 항산화 작용 및 큰 tyrosinase 및 elastase 저해 효과로부터 이들 분획 또한 화장품원료로서 응용 가능성이 큼을 알 수 있었다.

Abstract: In this study, the antioxidative activity, inhibitory effects on tyrosinase and elastase, and active components of *Quercus salicina* Blume extracts were investigated. *Q. salicina* Blume was extracted using 50 % ethanol, from which ethyl acetate and aglycone fractions were prepared. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activity (FSC₅₀) of *Q. salicina* Blume aglycone fraction was the highest (8.25 µg/mL). The luminol-dependent chemiluminescence assay showed that reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of *Q. salicina* Blume aglycone fraction on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system was the most prominent at 0.039 µg/mL. The protective effects of extract/fractions of *Q. salicina* Blume against the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were increased in a concentration dependent manner (1 ~ 25 µg/mL). Especially, τ₅₀ of aglycone fraction in 10 µg/mL concentration showed the most protective effect at 259.9 min. The inhibitory effects (IC₅₀) on tyrosinase and elastase of *Q. salicina* Blume extracts were higher at aglycone fraction (respectively, 21.82 µg/mL, 41.18 µg/mL). Active component analysis by TLC and HPLC showed quercetin, keampferol, catechin, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, and etc. These results indicate that *Q. salicina* Blume extract has strong antioxidative activity and can be used as antioxidant. Particularly, aglycone fraction of *Q. salicina* Blume showed superior antioxidative activity and high inhibitory effect on tyrosinase and elastase. Therefore, aglycone fraction of *Q. salicina* Blume could be applicable to new functional cosmetics.

Keywords: *Quercus salicina* Blume, antioxidative activity, flavonoid, cosmetics

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

1. 서 론

자유 라디칼 반응(free radical theory)에 의해 노화가 진행된다고 주장하는 자유 라디칼 설은 현재 가장 주목 받고 있는 이론이다[1-3]. 자유 라디칼 설에 의하면 나이에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 손상이 증가하게 되는데, 이들 ROS는 방사선, 자외선 등에서의 노출, 대기오염 물질, 항생제의 남용과 더불어 체내의 생화학적 반응에 의해 생성되며, 체내에서 여러 가지 문제를 야기 시킨다고 알려져 있다[4-6].

이러한 활성산소종의 종류로는 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, $ROO\cdot$, $RO\cdot$ 등의 라디칼을 가진 것과 H_2O_2 와 같이 라디칼을 나타내지 않는 것이 있다[7,8]. 이러한 활성산소종 중 1O_2 및 $\cdot OH$ 는 피부 광 손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 이러한 활성산소종으로부터 발생하는 손상을 억제하기 위해 다양한 항산화 물질을 사용해왔고 이러한 물질에는 BHA (butylated hydroxy anisol)와 BHT (butylate hydroxy toluene) 등의 합성 항산화제나 천연물에서 유래된 천연 항산화제 등이 있다[10-12]. 합성 항산화제들의 경우에는 과량 사용 시 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제 개발이 점점 더 활발하게 이루어지고 있다[13].

이렇게 인체에 무해하면서도 보다 강한 항산화 효과를 나타내는 천연 항산화제에 대한 연구는 50여 년 전부터 진행되어 왔다. 이러한 천연 소재 중의 많은 부분을 차지하고 있는 flavonoids, catechins, phenolic acids 등의 phenolic antioxidant들은 지질과산화물을 줄여주고 superoxide와 같은 활성산소종에 의한 손상을 줄여준다[14-16].

참가시나무(*Quercus salicina* Blume)는 참나무과(fagaceae)에 속하는 상록의 작은 교목으로 일본과 우리나라 제주도, 울릉도 및 남쪽 섬에 분포한다[17]. *Quercus* 종은 민간에서 설사, 피부염, 출혈 치료 등에 사용되어 왔고, 이 중 특히 참가시나무는 이노제, 항염제, 결석 치료제로 사용되어 왔다. *Quercus* 종에 속하는 참가시나무의 항산화 능력은 polyphenol과 관련이 있다. 이러한 자연적인 polyphenol은 자유 라디칼을 포획할 수 있는 고유의 구조를 가지고 있고 이 구조로 인해 vitamin A나 vitamin E보다 더 높은 항산화 능력을 나타내는 것으로 알려져 있다. 참가시나무의 주요 성분으로는 tannin, methyl galate, quercetin, galic acid, ellagic acid 등이 보고되어 있다[18-20].

하지만 참가시나무 추출물을 이용한 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화 작용에 대한 연구나 각종 ROS가 발생하는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총항산화능에 대한 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 참가시나무 추출물과 분획을 이용하여 이들의 항산화 효능을 확인하고 미백과 관련이 있는 tyrosinase 활성 저해 효과와 피부 주름 생성과 관련이 있는 elastase 활성 저해 효과를 측정함으로써 참가시나무 추출물이 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다. 그리고 강력한 항산화제인 flavonoid 성분 중 어느 성분이 참가시나무 추출물 속에 많이 존재하는지를 확인하기 위해 참가시나무 추출물의 성분 분석을 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였고, HPLC는 Dionex사의 제품을 사용하였다.

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)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, trizma base, HCl, 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), *n*-hexane 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. HPLC 용매 제조에 사용된 Acetonitrile은 J. T. Baker사와 B&J사의 HPLC grade 제품을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (11.9 mg solid, 4,276 units/mg solid), elastase (4.5 mg protein/mL, 6.5 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. Flavonoid 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet gel 60 F254 (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, arbutin, oleanolic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다.

실험에 사용한 참가시나무 재료는 2010년 9월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 참가시나무의 분획 및 추출

건조된 참가시나무 100 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 aglycone을 제조하였다. ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부를 산 가수분해 반응을 이용하여 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. 참가시나무 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 피부노화의 원인 물질로 알려져 있는 물질이다. 따라서 DPPH를 이용하여 참가시나무 추출물에 대한 free radical의 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 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/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH, 그리

고 H₂O₂)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있는데 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 참가시나무 추출물을 넣었다. 여기에 25 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 min동안 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 채널 간의 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. 따라서 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, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)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. 참가시나무 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μ M) 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 \times 20 cm \times 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 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 $^{\circ}$ C 항온실에서 행하였다. 참가시나무 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 33 min으로 오차범위 \pm 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광 조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에서 전체 반응 속도를 결정하는데 작용하는 핵심효소는 tyrosinase다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , μ g/mL)로 표기하였다.

2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름 생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 매우 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 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 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 참가시나무 추출물의 플라보노이드 분석

참가시나무 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 TLC 및 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개용매는 Table 1에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 발색법을 이용한 띠의 색상 등으로 확인하였다. HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고 HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다.

2.8. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 참가시나무 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

(+)- α -Tocopherol, flavonoid 등의 항산화제는 생체막에서 일어나는 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주

Table 1. TLC Mobile Phase for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *Quercus salicina* Blume

Eluent system	
Ethyl acetate fraction	Ethyl acetate : Chloroform : Formic acid : Water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)
Aglycone fraction	Hexane : Ethyl acetate : Acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)

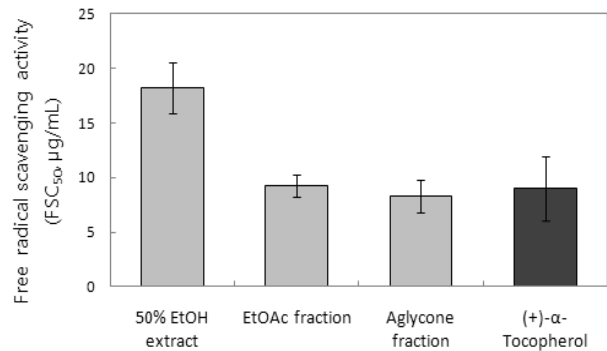
Table 2. HPLC Condition for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *Quercus salicina* Blume

Condition of HPLC analysis	
Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 mm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Detection wavelength	370 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μ L
Mobile phase	2 % AA ^{a)} in water : 0.5 % AA ^{a)} in 50 % ACN ^{b)} = 70 : 30 ~ 10 : 90 (gradient)

a) AA : Acetic acid, b) ACN : Acetonitrile

개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 항산화제에 의해 연쇄반응이 종결됨으로써 세포막이 보호된다. 이 때 수소 원자를 주는 능력을 갖는 항산화제는 환원제로 작용하고 환원력이 클수록 세포막 보호 효과가 크다. 항산화제의 능력은 안정화된 구조의 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

참가시나무(*Quercus salicina* Blume) 추출물과 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 참가시나무 추출물의 50 % EtOH 추출물인 경우 FSC₅₀이 18.21 μ g/mL, ethyl acetate 분획은 9.28 μ g/mL, aglycone 분획은 8.25 μ g/mL으로 나타났다. 참가시나무 추출물의 aglycone 분획이 가장 free radical 소거활성이 높은 것으로 나타났고, 그 다음이 ethyl acetate 분획으로 나타났고, 상대적으로 50 % EtOH 추출물은 free radical 소거활성이 낮은 것으로 나타났다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성은 8.98 μ g/mL이다. 따라서 참

**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extract and fractions of *Quercus salicina* Blume and references.

가시나무 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 비교물질인 (+)- α -tocopherol과 비슷한 free radical 소거활성을 나타내었다(Figure 1).

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 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. 참가시나무 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)을 Figure 2에 나타내었다. 참가시나무의 50 % EtOH extract 추출물의 활성산소 소거활성은 0.87 μ g/mL, ethyl acetate 분획은 0.054 μ g/mL이고 aglycone 분획은 0.039 μ g/mL으로 나타났다. 비교물질은 대표적 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총 항산화능은 1.50 μ g/mL로 나타났다. 참가시나무의 50 % EtOH extract 추출물과 ethyl acetate 및 aglycone 분획 모두 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid보다 활성산소 소거활성이 크을 알 수 있다. 특히 ethyl acetate 및 aglycone 분획에서 훨씬 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다.

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

참가시나무 추출물을 이용해서 활성산소에 의해 발생하는 세포 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포 보호활성이 클수록 크게 나타난다. 참가시나무의 50 % EtOH extract의 경우 1, 5, 10, 25 μ g/mL의 농도에서 각각 38.9, 64.8, 82.4, 326.0 min, ethyl acetate 분획의 경우 33.3, 53.3, 96.3, 205.3 min, aglycone 분획의 경우 45.3,

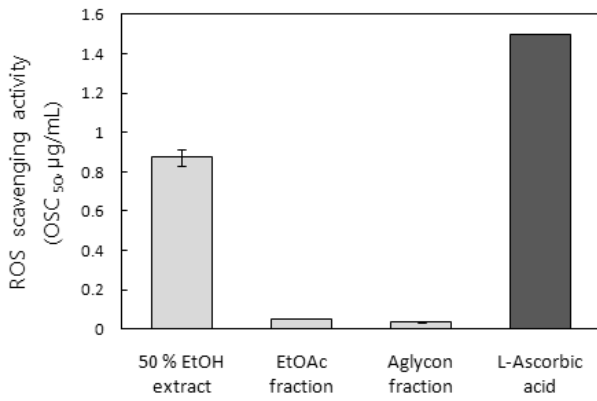


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *Quercus salicina* Blume extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

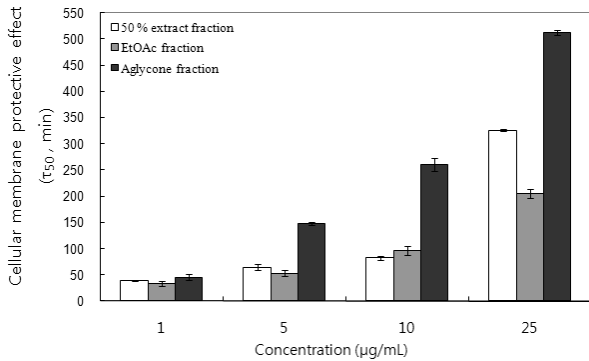


Figure 3. Cell protective effects of *Quercus salicina* Blume extract and fractions against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (control = 33.0 ± 1.0 min).

147.9, 259.9, 512.5 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다(Figure 3). 10 µg/mL의 농도에서 aglycone 분획이 가장 우수한 세포 보호 활성을 나타내었고, ethyl acetate 분획과 50 % EtOH 추출물에서는 비슷한 세포 보호 활성을 나타내었다. 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol의 세포 보호 효과는 10 µg/mL의 농도에서 38.0 min으로 나타났으며 참가시나무 추출물들은 (+)-α-tocopherol보다 세포 보호 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있다(Figure 4). 특히 aglycone 분획은 (+)-α-tocopherol과 비교하여 동일 농도에서 훨씬 뛰어난 세포 보호 효과를 나타내었다.

3.3. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성과정의 핵심적인 효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 L-tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성

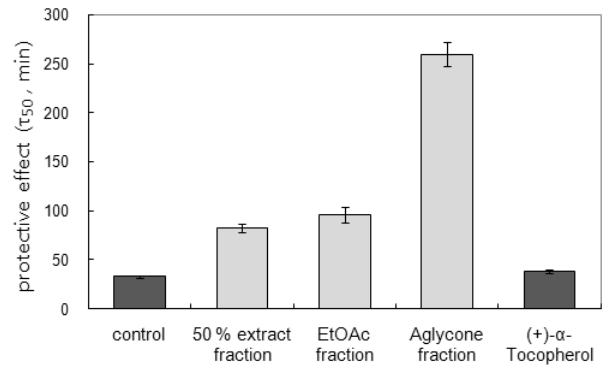


Figure 4. The effects of extract and fractions from *Quercus salicina* Blume and references at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

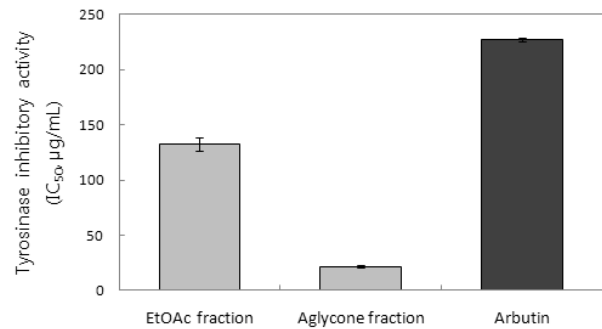


Figure 5. The effect of fractions from *Quercus salicina* Blume and reference on tyrosinase.

과정 중, L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA에서 DOPAquinone으로 산화되는 과정과 dihydroxyindole (DHI)로부터 eumelanin으로 전환되는 과정에서 촉매역할을 한다.

참가시나무 추출물 중 ethyl acetate 분획의 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 132.60 µg/mL로 나타났고, aglycone 분획의 경우에는 21.82 µg/mL로 나타났다. 비교물질로 사용한 arbutin은 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려져 있으며, tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 226.88 µg/mL이다. 참가시나무 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획 모두 arbutin에 비해서 tyrosinase 저해활성이 더 큰 것으로 나타났으며, 특히 aglycone 분획은 훨씬 큰 tyrosinase 저해활성을 나타낸다(Figure 5). 따라서 참가시나무 추출물의 aglycone 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료된다.

3.4. Elastase 저해 활성

피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases

Table 3. Inhibitory Activity of Extracts from *Quercus salicina* Blume and References Compound on Elastase

Compounds	Inhibition (IC ₅₀ , µg/mL)
<i>Q. salicina</i> Blume EtOAc fraction	241.43 ± 56.05
<i>Q. salicina</i> Blume aglycone fraction	41.18 ± 1.98
Oleanolic acid	13.70 ± 1.03

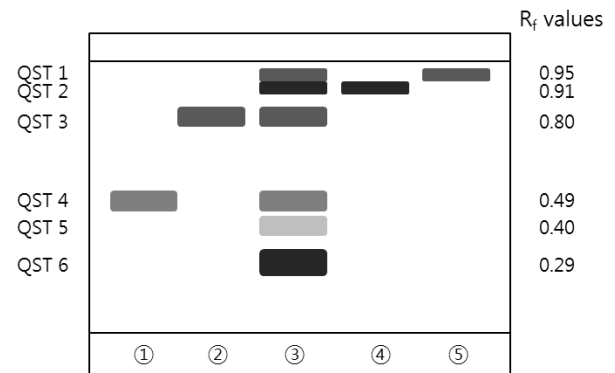
(MMPs)는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있으며, 자외선 및 활성산소 등에 의해 유발된다. MMPs를 이루고 있는 주요성분으로는 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 이 중 elastase는 elastin을 파괴하는 효소이므로 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

참가시나무 추출물 ethyl acetate 분획의 elastase 저해 활성(IC₅₀)은 241.43 µg/mL로 나타났으며, aglycone 분획은 41.18 µg/mL로 나타났다(Table 3). 따라서 참가시나무 추출물의 aglycone 분획이 ethyl acetate 분획보다 elastase 저해활성이 훨씬 뛰어남을 알 수 있다. 참가시나무 추출물의 aglycone 분획은 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 elastase 저해활성보다는 낮은 활성을 보였지만, elastase 저해물질로 알려진 ursolic acid의 elastase 저해활성(782.95 µg/mL)[21]보다는 매우 높은 저해활성을 나타내므로 elastase를 충분히 저해하여 피부의 탄력감소 및 주름생성 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

3.5. 참가시나무 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.5.1. 참가시나무 추출물의 TLC 성분분석

참가시나무 추출물의 ethyl acetate 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. Ethyl acetate 분획은 6개의 띠로 분리되었으며, ethyl acetate 분획과 다양한 표준물질의 TLC 크로마토그램을 자외선과 NP (2-aminoethyl diphenylbroinate) - PEG (polyethylene glycol) 및 황산 발색으로 확인하였다. 그 결과, 총 6개의 띠가 확인되었으며, R_f값이 0.95인 QST 1은 keampferol, R_f값이 0.91인 QST 2는 quercetin, R_f값이 0.80인 QST 3는 catechin, R_f값이 0.49인 QST 4는 quercitrin으로 나타났다. 그리고 R_f값이 0.29인 QST 6는 TLC의 길이를 길게 하여 크로마토그램을 했을 경우, 두 물질로 나뉠 것으로 확인되었다(data not shown). 두 물질을 확인해 본 결과 각각 isoquercitrin (QST 6-1, R_f값 0.32)과 hypero-

**Figure 6.** TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Quercus salicina* Blume and references. Eluent system : ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v). ① quercitrin, ② catechin, ③ ethyl acetate fraction, ④ quercetin, ⑤ keampferol.

side (QST 6-2, R_f값 0.28)로 나타났다. Isoquercitrin과 hyperoside는 구조상 극성도에 큰 차이가 없으므로 TLC의 길이가 길지 않을 경우에 분리가 잘 일어나지 않으므로 예상된다.

참가시나무 추출물의 aglycone 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 7에 나타내었다. Aglycone 분획은 2개의 띠로 분리되었으며, ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램과 동일한 방법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 QSA 1은 ethyl acetate 분획 중 QST 1과 동일한 성분인 keampferol로 나타났고, QSA 2는 QST 2와 동일한 quercetin으로 나타났다.

3.5.2. 참가시나무 추출물의 HPLC 성분분석

HPLC 크로마토그램을 이용하여 참가시나무 추출물 속 성분을 재확인하였다. TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 각각 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시켜 얻은 파우더와 표준물질을 이용해 HPLC 분석을 하였다. Ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램을 확인해 본 결과 TLC 크로마토그램과 동일한 결과를 나타내었다(Figure 8). 참가시나무 추출물 속 가장 높은 농도를 나타내는 성분은 quercetin으로 나타났고, 그 다음은 hyperoside와 isoquercitrin이 비슷한 농도로 나타났다. Ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 9에 나타내었다. 표준물질을 사용하여 확인한 결과 peak 1은 quercetin이고 peak 2는 keampferol인 것으로 나타났다. 이를 통해 참가시나무에는 quercetin 및 quercetin 배당체들과 keampferol 및 keampferol 배당체들이 존재함을 확인하였다.

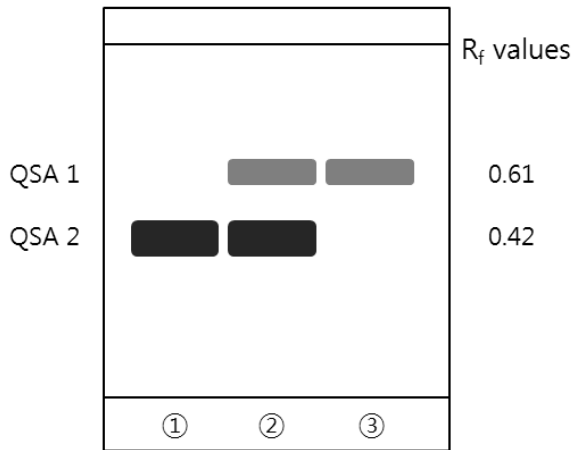


Figure 7. TLC chromatogram of aglycone fraction from *Quercus salicina* Blume and references. Eluent system : n-hexane : ethyl acetate : acetic acid (v/v). ① quercetin, ② aglycone fraction, ③ keampferol.

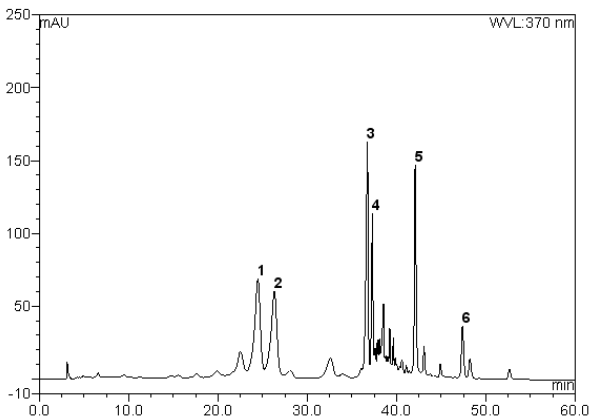


Figure 8. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Quercus salicina* Blume at $\lambda = 370$ nm. ① hyperoside, ② isoquercitrin, ③ quercitrin, ④ catechin, ⑤ quercetin, ⑥ keampferol.

참가시나무 속 quercetin 및 그 배당체(peak 1)는 52.48%가 존재하고 keampferol 및 그 배당체(peak 2)는 45.61%가 존재하며 두 물질 중 quercetin의 함량이 더 많음을 확인하였다.

4. 결 론

1) 참가시나무 추출물의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과 aglycone 분획(8.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > ethyl acetate 분획(9.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 50% EtOH 추출물(18.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

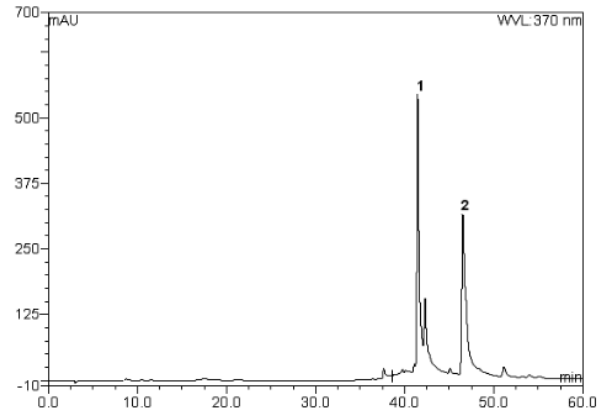


Figure 9. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *Quercus salicina* Blume at $\lambda = 370$ nm. ① quercetin, ② keampferol.

순서로 나타났다.

2) 참가시나무 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 aglycone 분획(0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > ethyl acetate 분획(0.054 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 50% EtOH extract 추출물(0.873 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 순서로 나타났으며, 모두 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 뛰어난 활성산소 소거활성을 보였다.

3) 참가시나무 추출물의 ¹O₂으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 모든 분획에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 aglycone 분획의 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 259.9 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다.

4) 참가시나무 추출물의 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 aglycone 분획(21.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 ethyl acetate 분획(132.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 모두 기준물질인 arbutin(226.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 높게 나타났고, 특히 aglycone 분획에서 뛰어난 효과를 보였다.

5) 참가시나무 추출물의 elastase 저해활성(IC₅₀)은 ethyl acetate 분획(241.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서는 높은 저해활성을 나타내지 않았지만, aglycone 분획(41.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서는 비교적 높은 저해활성을 나타내었다.

6) TLC를 이용한 참가시나무의 성분분석 결과 quercetin (QST 2)과 isoquercitrin (QST 6-1) 및 hyperoside (QST 6-2)의 농도가 가장 진한 것으로 나타났으며, quercetin 배당체들과 keampferol 배당체들이 존재하는 것으로 나타났다.

7) HPLC를 이용한 참가시나무의 성분분석 결과 quercetin 및 그 배당체의 함량(52.48%)과 keampferol 및 그 배당체의 함량(45.61%)이 비슷한 것으로 나타났다.

이상의 결과들로부터 참가시나무 추출물의 항산화 효과와 이러한 효과를 나타내는 flavonoids의 존재를 확인하였다. 참가시나무 추출물 중 특히 aglycone 분획의 뛰어난 항산화 효과 및 높은 tyrosinase와 elastase 저해 효과가 확인되었고 이는 aglycone 분획이 화장품원료로서 응용 가능성이 큼을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(과제 고유번호 : A103017).

참고 문헌

1. D. Harman, Free radical theory of aging, *Mutat. Res.*, **275**, 257 (1992).
2. B. T. Ashok and R. Ali, The aging paradox: free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, **34**, 293 (1999).
3. A. P. Wickens, Ageing and the free radical theory, *Respiration Physiology*, **128**, 379 (2001).
4. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
5. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti-oxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**, 1 (2002).
6. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
7. J. H. Michael and E. D. Frederick, An epigenetic perspective on the free radical theory of development, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1023 (2007).
8. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
9. H. J. Yang, Y. J. Ahn, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Quercus glauca* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(3), 189 (2008).
10. A. L. Branen, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene, *J. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1975).
11. S. J. Jung, J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baek, Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **47**(1), 135 (2004).
12. H. J. Lee, G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts, *Korean J. Microbial. Biotechnol.*, **39**(1), 63 (2011).
13. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Activeoxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
14. Y. J. Ahn, S. Y. Kim, J. H. Ok, H. Wang, C. H. Park, S. H. Kim, Y. S. Heo, Y. H. Jeon, and S. N. Park, Antioxidant activity of *Persicaria perfoliata* extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(3), 235 (2009).
15. K. M. Yoo, C. H. Lee, H. J. Lee, B. K. Moon, and C. Y. Lee, Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs, *Food Chemistry*, **106**, 929 (2008).
16. A. Wojdyło, J. Oszmiański, and R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, **105**, 940 (2007).
17. S. H. Chong, D. J. Jung, B. S. Park, D. S. Lee, S. T. Cho, J. W. Seo, and Y. H. Kwon, Wood properties of *Quercus salicina*, *J. Korean For. Soc.*, **93**(3), 230 (2004).
18. J. I. Kim, H. H. Kim, S. U. Kim, K. T. Lee, I. H. Ham, and W. K. Whang, Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blume Stem, *Arch Pharm Res.*, **31**(3), 274 (2008).
19. M. S. Jung, K. A. Kang, R. Zhang, S. W. Chae, B. S. Yoo, Y. T. Yang, N. H. Lee, J. W. Park, and J. W. Hyun, Protective activity against ionizing radiation of antioxidative plants indigenous to Korea, *Natural Product Sciences*, **12**(1), 1 (2006).
20. M. Sokmen, M. Angelova, E. Krumova, S. Pashova, S. Ivancheva, A. Sokmen, and J. Serkedjieva, *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with

- antiviral properties from *Geranium sanguineum* L., *Life Sciences*, **76**, 2981 (2005).
21. J. O. Kim, M. J. Jung, H. J. Choi, J. T. Lee, A. K. Lim, J. H. Hong, and D. I. Kim, Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(6), 684 (2008).