

## 큰뻬무 추출물의 항산화 활성 및 항노화에 관한 연구

김민지·양현갑·박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2011년 6월 8일 접수, 2011년 6월 14일 수정, 2011년 6월 17일 채택)

### Antioxidative Activities and Antiaging Effects of *Geum aleppicum* Jacq. Extracts

Min Ji Kim, Hyun Gab Yang, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology,  
232, Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received June 8, 2011; Revised June 14, 2011; Accepted June 17, 2011)

**요약:** 본 연구에서는 큰뻬무 추출물의 항산화 활성 및 미백과 주름에 관련된 tyrosinase, elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 ethyl acetate 분획에서 4.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 큰뻬무 추출물의 총 항산화능은 ethyl acetate 분획 0.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로, ethyl acetate 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 큰뻬무 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 큰뻬무 추출물의 경우 1 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 광용혈을 억제하였다. 특히 ethyl acetate 분획은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $\tau_{50}$ 이 416.20 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 미백 효과측정으로는 tyrosinase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)를 측정하였는데 ethyl acetate 분획에서 95.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며 elastase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 50 % 에탄올 추출물과 ethyl acetate 분획이 각각 6.27, 4.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 이상의 결과들은 큰뻬무 추출물이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써, 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다. 또한 큰뻬무 추출물의 ethyl acetate 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성으로부터 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, antioxidative effects and inhibitory effects of *Geum aleppicum* Jacq. extracts on tyrosinase and elastase were investigated. The ethyl acetate fraction of *G. aleppicum* Jacq. extract (4.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed the most prominent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of some *G. aleppicum* Jacq. extracts on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction showed the most prominent ROS scavenging activity (0.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The protective effects of extract/fraction of *G. aleppicum* Jacq. against the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *G. aleppicum* Jacq. extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), particularly the ethyl acetate fraction exhibited the most prominent cellular protective effect ( $\tau_{50}$ , 416.20 min at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The inhibitory effect of *G. aleppicum* Jacq. extracts on tyrosinase and elastase were investigated to assess their whitening and anti-winkle efficacy. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the ethyl acetate fraction on tyrosinase was 95.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The IC<sub>50</sub> of 50 % ethanol extract and the ethyl acetate fraction on elastase were 6.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 4.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. These results indicate that extract/fraction of *G. aleppicum* Jacq. can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. Especially the ethyl acetate fraction of *G. aleppicum* Jacq. extracts could be applicable to new functional cosmetics for antioxidant, antiaging.

**Keywords:** *Geum aleppicum* Jacq., reactive oxygen species, antioxidative activity, antiaging, cosmetics

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

## 1. 서 론

현대인들의 생활수준의 향상과 함께 소비자들의 첨가물에 대한 관심도가 높아짐에 따라 인체에 무해한 천연물 유래의 항산화제 및 항균제 개발이 절실히 요구되고 있다. 따라서 최근 기능성 화장품 소재로서의 사용을 목적으로 한 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 천연물의 항균, 항산화, 미백 및 피부노화 억제 등을 목적으로 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[1,2].

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에서 활성산소종(ROS)이 과잉으로 생성되고 이어서 항산화 방어체는 붕괴되며, 결과적으로 산화적 스트레스에 의한 세포손상을 야기되고, 이어 노화가 가속화된다[3-7].

여기서 말하는 활성산소종은  $^1\text{O}_2$  (singlet oxygen) 및  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hydrogen peroxide)와 같은 몇 종류의 비라디칼들을 비롯하여  $\text{O}_2^-$  (superoxide anion radical)이나  $\cdot\text{OH}$  (hydroxy radical)과 같은 산소 라디칼들이 있고, 광범위한 범위에서는 생체성분과의 반응으로 유래된  $\text{ROO}\cdot$  (peroxyl radical),  $\text{RO}\cdot$  (alkoxyl radical),  $\text{ROOH}$  (hydroperoxide) 및  $\text{HOCl}$  (hypochlorous acid) 등을 포함한다[8,9].

$^1\text{O}_2$ 은 수명이 짧은 특히 해로운 분자이며, 주로 광증감 반응으로 피부에서 생성되고, 광노화에 있어서 핵심적 역할을 한다. 특히  $^1\text{O}_2$ 은  $\cdot\text{OH}$ 과 함께 ROS 중에서 반응성이 가장 큰 활성산소종으로 막을 통해 확산하며, 일차적으로 생체 내에 존재하는 항산화제들을 파괴시켜 항산화 방어체계를 붕괴시키는 메카니즘으로 피부 노화를 주도하는 것으로 보고되고 있다[10-12].  $\text{O}_2^-$ 는 superoxide dismutase (SOD)에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 전환된다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 catalase에 의해 물과 산소로 분해되기도 하고, 직접적으로 조직손상에 참여하는 경우는 드물지만 비교적 수명이 길고 세포막들을 쉽게 통과하며, 활성산소종을 생성시키는 화합물로서 중요하다. 또한  $\text{O}_2^-$ 는  $\text{Fe(III)}$ 와 같은 전이금속을 환원시킬 수 있고, 환원된  $\text{Fe(II)}$ 은 과산화수소와 반응하여  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시킨다(Fenton 반응)[13].  $^1\text{O}_2$ 과 같이  $\cdot\text{OH}$ 은 생체 내에서 이들을 소거할 수 있는 항산화 효소는 없고, 반응성이 매우 크다. 피부가 태양 자외선에 노출되면 노출부위에 철 수준이 증가하기 때문에[14,15],  $\cdot\text{OH}$ 도  $^1\text{O}_2$ 와 함께 피부 광손상에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 활성산소종은 멜라닌 생성을 촉진시킨다. 멜라닌 생성과정

에서 핵심 효소인 tyrosinase 등의 효소작용과 자동산화 반응은 자외선에 의해서 촉진된다. 종래의 미백제 개발은 주로 tyrosinase 저해 활성에 관심을 두었으나, 최근에는 tyrosinase 저해 활성뿐만 아니라 자동산화반응의 억제도 크게 부각되고 있다[16].

결과적으로 활성산소종은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 엘라스틴, 히아루론산 등의 사슬 전단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속화시킨다[17].

큰땀무(*Geum aleppicum* Jacq.)는 장미과의 여러해살이풀로 전국의 산골짜기에서 자라며, 일본, 만주, 몽고, 시베리아, 유럽에 분포한다. 전초는 오기조양초(五氣朝陽草)라고 하며, 같은 과 식물인 땀무에 비해 작은 꽃자루에 퍼진 털이 있고 과탁의 털이 짧다[18]. 중국에 자생하는 큰땀무의 성분으로는 benzoic acid, gallate acid, salicylic acid, vanilin, 3,4,5-trihydroxybenzoic dehyde, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester 등이 알려져 있으며[19], 큰땀무의 메탄올 추출물은 항산화 효능이 있는 것으로 보고되었다[20]. 큰땀무는 동양에서 거풍제습, 활혈소종의 효능이 있고, 오토비통, 이질, 붕루백대(崩漏白帶), 질타손상, 인통 나락을 치료하는데 쓰인다[18].

중국의 큰땀무 추출물의 성분에 대한 연구는 보고되어 있으나 국내에 자생하는 큰땀무 추출물에 대한 성분 연구 및  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 큰땀무 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호 활성과 free radical 소거활성,  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, tyrosinase, elastase 활성 저해 효과를 측정함으로써 항산화 및 항노화 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 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, arbutin, oleanolic 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  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine, N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid), elastase (4.0 mg protein/mL, 6.0 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험 재료인 큰뽕나무는 한국식물추출물은행에서 2002년 4월경에 채취하여 건조한 것을 구입하여 사용하였다.

2.2. 큰뽕나무의 플라보노이드 분획 추출

건조된 큰뽕나무 20 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 400 mL를 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.

2.3. 큰뽕나무 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 큰뽕나무 추출물에 대한 free radical 소거활성 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, FSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )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 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계는 각종 ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ , 그리고  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 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  $\mu\text{L}$  및 5 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu\text{L}$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  40  $\mu\text{L}$ 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 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, OSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )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, 분리

한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer로 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  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

#### 2.4.2. 큰뺨무 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu$ 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 × 20 × 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. 큰뺨무 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 31 min으로 오차범위  $\pm 1$  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.

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

#### 2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에는 tyrosinase가 핵심효소로 작용한다. 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) 1.8 mL, 시료 0.1 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 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(IC<sub>50</sub>,  $\mu$ 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 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300  $\mu$ L에 측정시료용액 7.5  $\mu$ L와 buffer 92.5  $\mu$ L를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation한 뒤 여기에 elastase 용액을 100  $\mu$ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수용상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100  $\mu$ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300  $\mu$ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

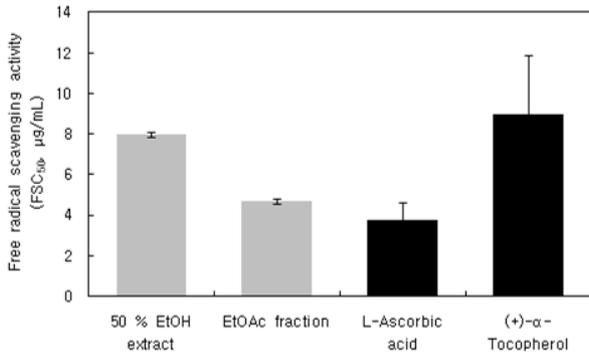
#### 2.7. 통계처리

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

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 큰뺨무(*Geum aleppicum* Jacq.) 추출물의 수득율

건조된 큰뺨무 20 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 400 mL에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이때 수득률은 21.56 %이었다. Ethyl acetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 *n*-hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 4.38 %이었다.



**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extract/fraction of *G. aleppicum* Jacq. and references.

### 3.2. 큰뻬무 추출물의 항산화 활성

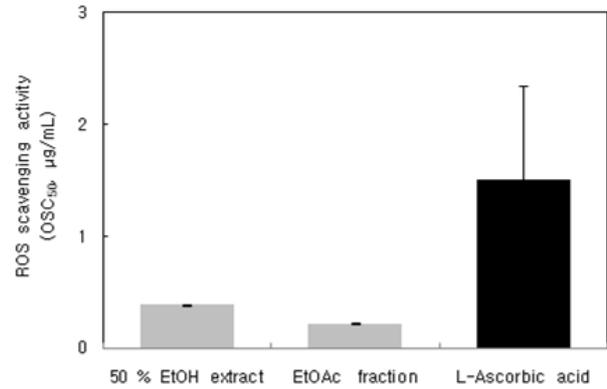
#### 3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)- $\alpha$ -Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킴으로써 세포막을 보호한다. 이와 같이 세포막에서 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

큰뻬무(*Geum aleppicum* Jacq.) 추출물, 그리고 비교 물질인 L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1과 같다. 큰뻬무 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>이 8.00  $\mu$ g/mL, ethyl acetate 분획은 4.70  $\mu$ g/mL을 나타냈다. 비교 물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid의 free radical 소거활성은 3.79  $\mu$ g/mL, (+)- $\alpha$ -tocopherol은 8.98  $\mu$ g/mL이었다. 50 % 에탄올 추출물의 free radical 소거활성은 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 유사한 것으로 나타났고, ethyl acetate 분획의 free radical 소거활성은 L-ascorbic acid와 유사한 것으로 나타났다.

#### 3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 생성된 ROS 소거 활성은 큰뻬무 추출물에 의해 소거되어 화학발광을 감소시킴을 Figure 2에서 알 수 있다. 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 큰뻬무 50



**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of *G. aleppicum* Jacq. extracts and L-ascorbic acid in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

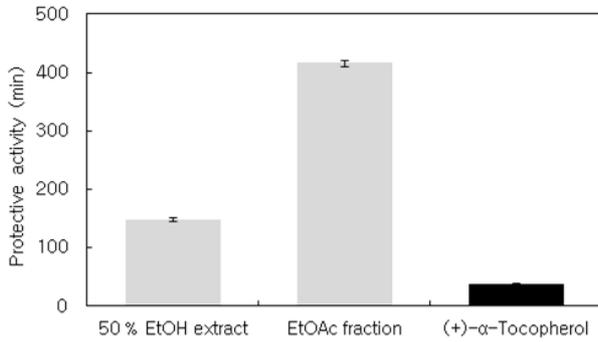
% 에탄올 추출물이 0.39  $\mu$ g/mL, ethyl acetate 분획이 0.22  $\mu$ g/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 ethyl acetate 추출물이 50 % 에탄올 추출물보다 활성산소 소거활성이 크을 알 수 있다. 50 % 에탄올 추출물과 ethyl acetate 분획 모두 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50  $\mu$ g/mL)보다 큰 활성을 보였다.

### 3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

큰뻬무 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Figure 3 및 Table 1에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 큰뻬무의 ethyl acetate 분획은 5, 10, 25  $\mu$ g/mL의 농도 범위에서 농도 의존적( $\tau_{50}$ 이 각각 265.70, 416.20, 517.30 min)으로 세포보호 효과를 나타냈다. 50 % 에탄올 추출물의 경우 1, 5, 10, 25  $\mu$ g/mL의 농도 범위에서 35.15, 81.45, 148.20, 412.85 min로 ethyl acetate 분획에 비해 낮은 효과를 나타내었다. 따라서 세포보호 효과는 10  $\mu$ g/mL에서 50 % 에탄올 추출물(148.20 min) < ethyl acetate 분획(416.20 min) 순으로 나타났고, 이는 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- $\alpha$ -tocopherol에 비해 매우 큰 세포보호 활성을 보여주었다. 만약 ethyl acetate 분획을 화장품 등에 사용하면 피부세포보호 활성에 크게 기여할 것으로 생각된다.

### 3.4. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이



**Figure 3.** The effect of extract/fraction from *G. aleppicum* Jacq. extracts and (+)- $\alpha$ -tocopherol at 10  $\mu\text{g/mL}$  on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

**Table 1.** Effects of Extracts from *G. aleppicum* Jacq. and Reference Compounds on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	$\tau_{50}$ (Half time of hemolysis <sup>1)</sup> )			
	1	5	10	25
<i>G. aleppicum</i> Jacq. extract (50 % EtOH)	35.15 $\pm$ 1.95	81.45 $\pm$ 5.05	148.20 $\pm$ 3.21	412.85 $\pm$ 2.95
<i>G. aleppicum</i> Jacq. extract (EtOAc fraction)	-	265.70 $\pm$ 0.90	416.20 $\pm$ 5.60	517.30 $\pm$ 14.70
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	-	-	38.00 $\pm$ 1.80	-

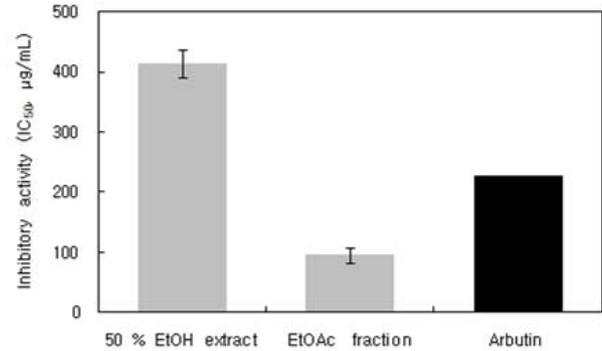
1) Control,  $\tau_{50} = 31 \pm 1.0$  min

효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정에서, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다.

큰뽕추출물 중 ethyl acetate 분획의 경우 tyrosinase 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )이 95.23  $\mu\text{g/mL}$ 로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88  $\mu\text{g/mL}$ 에 비해서도 훨씬 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다. 따라서 ethyl acetate 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 4).

### 3.5. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되어 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부 노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이



**Figure 4.** The effect of extract/fraction from *G. aleppicum* Jacq. and reference on tyrosinase.

**Table 2.** Inhibitory Activity of Extracts from *G. aleppicum* Jacq. and References Compound on Elastase

Compounds	Inhibition
	( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$ )
<i>G. aleppicum</i> Jacq. extract (50 % EtOH)	6.27 $\pm$ 0.34
<i>G. aleppicum</i> Jacq. extract (EtOAc fraction)	4.31 $\pm$ 0.06
Oleanolic acid	15.9 $\pm$ 1.03

루는 주요성분으로는 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

큰뽕추출물에서 50 % 에탄올 추출물은 6.27  $\mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획은 4.31  $\mu\text{g/mL}$ 에서 elastase 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )을 나타내었다(Table 2). 비교 물질로 사용한 수용성의 oleanolic acid의 elastase 저해활성은 15.9  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 따라서 큰뽕추출물의 50 % 에탄올 추출물과 ethyl acetate 분획의 elastase 저해활성은 비교물질로 사용한 oleanolic acid보다 크을 알 수 있다.

## 4. 결 론

1) 큰뽕추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 21.56 %, ethyl acetate 분획은 4.38 %이었다.

2) 큰뽕추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물 8.00  $\mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획 4.70  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

3) 큰뽕추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 큰

뻬무 50 % 에탄올 추출물, 0.39  $\mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획, 0.22  $\mu\text{g/mL}$ 로 큰뻬무 추출물 중 ethyl acetate 분획이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4)  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 큰뻬무 추출물은  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위(1 ~ 25  $\mu\text{g/mL}$ )에서 농도-의존적으로  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 ethyl acetate 분획은 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $\tau_{50}$ 이 416.20 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다.

5) 큰뻬무 추출물 중 ethyl acetate 분획은 tyrosinase 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )이 95.23  $\mu\text{g/mL}$ 으로 우수한 저해 활성을 나타냈다.

6) 큰뻬무 추출물의 elastase 저해 활성( $\text{IC}_{50}$ )은 50 % 에탄올 추출물에서 6.27  $\mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획에서는 4.31  $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다.

이상의 결과들은 큰뻬무 추출물의 항산화 작용과 더불어 ethyl acetate 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성 측정으로부터 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

### 참 고 문 헌

1. D. Y. Kang, M. O. Shin, J. H. Son, and S. J. Bae, The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*, *J. Life Science*, **19**(1), 52 (2009).
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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, *Photochem. Photobiol.*, **54**(2), 215 (2008).
6. M. Kubo and H. Matsuda, Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis, *Fragrance J.*, **8**, 48 (1995).
7. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982).
8. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
9. C. Garrel and M. Fontecave, Analysis of free radicals in biological systems, eds. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, and J. L. Pierre, 21, Birkhauser-Verlag, Basel (1995).
10. N. Hogg, Analysis of free radicals in biological systems, eds. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, and J. L. Pierre, 21, Birkhauser-Verlag, Basel (1995).
11. J. L. Pierre, Analysis of free radicals in biological systems, eds. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, and J. L. Pierre, 21, Birkhauser-Verlag, Basel (1995).
12. G. W. Burton and K. U. Ingold, Vitamin E: application of the principles of physics organic chemistry to the exploration of its structure and function, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 194 (1986).
13. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, *Advances in Pharmacology*, **38**, 639 (1997).
14. D. L. Bissett, R. Chatterjee, and D. P. Hannon, Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators, *Photochem. Photobiol.*, **54**, 215 (1991).
15. D. L. Bissett and J. F. McBride, Iron content of human epidermis from sun-exposed and non-exposed body sites, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **43**, 215 (1992).
16. C. Joshi, C. Carrarob, and A. Pathak, Involvement of reactive oxygen species in the oxidation of tyrosine and dopa to melanin and in skin tanning, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **142**(1), (1987).
17. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc.*

- Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
18. K. H. Bae, The medicinal plants of Korea, J. S. Hwang, Kyo-Hak Publishing Co., Seoul (2000).
  19. G. LI, X. Yang, Y. Wang, F. Mu, L. Dong, D. Chen, and H. LI, Isolation and structure identification of phenolic compounds from *Geum aleppi-*  
*cum Jacq.*, *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, **2**, (2006).
  20. Y. H. Choi, M. J. Kim, H. S. Lee, C. Hu, and S. S. Kwak, Antioxidants in leaves of *Rosa rugosa*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**, 179 (1997).