Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2013), 41(3), 284–291
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1212.12001
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

삼지구엽초 추출물의 항균 및 항산화 활성에 대한 연구

원두현[1], 구현아[1], 김혜진[1], 한샛별[1], 박진오[2], 박수남[1]*

[1]서울과학기술대학교 정밀화학과, 나노바이오화장품연구실, 화장품종합기술연구소
[2]대봉엘에스(주)

Received : December 18, 2012 / Revised : May 20, 2013 / Accepted : May 21, 2013

Antibacterial and Antioxidative Activities of *Epimedium koreanum* Nakai Extracts. Won, Doo Hyun[1], Hyun A Gu[1], Hye Jin Kim[1], Saet Byeol Han[1], Jino Park[2], and Soo Nam Park[1]*. *[1]Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic Laboratory, and Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea, [2]DAEBONG LS, Incheon, Korea*

In this study, the antibacterial and antioxidative activities of *Epimedium koreanum* Nakai were investigated for applications as cosmetic ingredients. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of fraction-bacterium, that showed high antibacterial activity from disc diffusion assay on human skin pathogens, were tested. The ethyl acetate fraction on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes* and 50% ethanol extract on *S. aureus* exhibited higher antibacterial activities than methyl paraben, well known as a preservative. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities of 3 fractions of *E. koreanum* Nakai were lower than (+)-α-tocopherol, known as a typical antioxidant. From the results of the scavenging activities of various ROS generated in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 systems (OSC_{50}), 50% ethanol extract (OSC_{50} = 2.46 ± 0.06 μg/ml) and aglycone fraction (OSC_{50} = 1.45 ± 0.02 μg/ml) showed high activities similar to L-ascorbic acid (OSC_{50} = 1.50 ± 0.85 μg/ml), used as reference. The cellular protective effects (τ_{50}) on photohemolysis by $^1O_2$ generated by photosensitization reaction were tested. The cellular protective effect of 50% ethanol extract (τ_{50} = 37.0 ± 0.3 min) was similar to (+)-α-tocopherol (τ_{50} = 38.0 ± 1.8 min), used as reference. In particular, the τ_{50} of aglycone fraction results were 165.9 ± 7.2 min. This is a high cellular protective effect, more than 4 times that of (+)-α-tocopherol. These results indicate that *E. koreanum* Nakai extract, and its fractions, could be utilized as a cosmetic ingredient possessing antibacterial and antioxidative activities.

Keywords: *Epimedium koreanum* Nakai, antibacterial activity, *Propionibacterium acnes,* antioxidant, cosmetics

서 론

신체는 항상 다양한 유해물질에 노출되어 있으며 피부는 이러한 외부 유해물질로부터 체내를 보호하는 역할을 한다. 피부에 손상을 일으키는 대표적 요인으로는 자외선, 공해, 미생물 등을 들 수 있다. 미생물에 의해 피부가 손상되는 예로는 여드름 균(*P. acnes*)이 대표적이다. *P. acnes*는 모낭 내에서 성장하며 다량의 superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)을 형성시키고 linoleic acid를 감소시킨다. 이러한 작용은 피부의 방어 기능을 약화시키고 염증 부위를 더욱 확장시켜 여드름을 악화시킨다[9, 11, 12, 19, 22]. 이 외에도 피부상재균에는 비듬이나 지루성 피부염을 발생시키는 *Pityrosporum ovale*를 포함하여 *Escherichia coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* 등이 있다. 이러한 피부상재균은 피부의 항상성을 악화시키고 심할 경우 질병을 일으키기 때문에 화장품 분야에서는 이를 막기 위해 methyl paraben과 같은 방부제가 사용되고 있다. 하지만 최근 paraben 류를 포함하는 합성 방부제의 안전성에 대한 문제가 대두되면서 이를 대체할 수 있는 천연 방부제 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 4, 14, 21].

미생물 외에도 자외선과 공해는 피부에 산화적 스트레스를 유발한다. 특히 자외선에 의한 산화적 스트레스는 피부노화의 주요 요인이다. 피부가 자외선에 노출되면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되어 주요 조직을 손상시키고 결과적으로 주름과 같은 노화를 야기하게 된다[2, 8, 18, 20]. ROS란 유해한 산소종으로, hydroxyl radical (·OH), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), singlet oxygen ($^1O_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), peroxyl radical (ROO·), hydroperoxide (ROOH) 등이 포함된다. 이들은 높은 산화력

*Corresponding author
Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585
E-mail: snpark@seoultech.ac.kr
© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

을 바탕으로 세포 용혈, 지질 과산화, 피부 탄력 유지에 필수적인 콜라겐, 엘라스틴 섬유의 절단 등을 일으켜 노화를 가속화 시킨다[13, 15, 16].

이러한 손상으로부터 피부를 보호하기 위해 체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxide (GPx), catalase (CAT)와 같은 효소적 항산화제와, 비타민 C, 비타민 E와 같은 비효소적 항산화제들이 존재한다. 체내 항산화제들은 서로 상호보완적으로 작용하여 항산화 방어막을 형성하고 있다. 하지만 과량의 ROS가 생성될 경우 체내의 항산화 방어막은 무너지게 되며 외부에서 보충된 항산화제는 이러한 항산화 네트워크를 보호하고 회복시킨다. 따라서 화장품 산업에서는 오랜 기간 항산화제에 관한 연구가 진행되어 왔다[6, 7, 10]. 항산화제 연구에는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제가 있는데, 최근에는 천연 방부제와 동일한 이유로 천연물을 이용한 항산화제에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

이번 실험에서 사용한 삼지구엽초(*E. koreanum* Nakai)는 식용, 약용으로 사용되는 매자나무과 식물이다. 삼지구엽초에 대한 항산화 활성 연구는 일부 보고된 바가 있으나, 대부분이 라디칼 소거 활성에 집중되어 있고 제한된 추출 방법을 이용하였기 때문에 화장품 원료로서 가능성을 확인하는데 부족함이 있었다[5, 17]. 따라서 이번 연구에서는 다양한 추출, 분획 조건을 이용하여, 피부에서 생성되는 여러 ROS에 대한 총체적인 항산화 실험과 피부에 존재하는 균종에 대한 항균 효과를 확인함으로써 삼지구엽초의 화장품 원료로서 응용가능성을 복합적으로 확인해보았다.

재료 및 방법

기기 및 시약

Varian (Australia)사의 Cary 50을 UV-VIS spectrophotometer로, Milton Roy Co. (USA)의 Spectronic 20D는 적혈구 광용혈 실험에 사용하였다. 화학발광 실험에 사용한 6-channel LB9505 LT는 Berthold (Germany)사의 제품을 사용하였고, pH meter는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다.

비교물질로 사용한 (+)-α-토코페롤, L-ascorbic acid, 화학발광 실험에 사용한 EDTA, luminol, 적혈구 광용혈 실험에서 광증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거 활성에 사용한 DPPH radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

삼지구엽초의 분획 및 추출

실험에 사용된 삼지구엽초는 경동시장 약업사를 통해 한약재로 판매되는 원료를 구입하였다. 100 g의 건조된 삼지구엽초를 4 L의 50% 에탄올 용액에 24 h동안 침적시킨 후 여과 건조하였다. 이렇게 얻어진 분말 일부는 실험에 사용하였고, 일부는 에틸아세테이트 분획을 만드는데 사용하였다.

에틸아세테이트 분획을 만들기 위해, 50% 에탄올 추출물을 감압 농축하였다. 그 후 n-헥산을 사용해 50% 에탄올 추출물 내에 잠재적으로 광증감 반응을 일으킬 수 있는 chlorophyll을 제거하였다. 이 후 에틸아세테이트 분획을 감압해 분말을 얻은 후 실험에 사용하였다.

마지막으로 아글리콘 분획을 얻기 위하여 에틸아세테이트 분획에서 얻은 분말 일부를 사용하였다. 에틸아세테이트 분획을 산 가수분해 반응을 통해 당을 제거시켜 아글리콘 분획을 얻었다. 산 가수분해를 시키기 위해 에틸아세테이트 분말에 H_2SO_4 및 아세톤 용액을 넣고, 환류법을 이용해 4 h 동안 중탕 가열하였다. 환류 시킨 용액을 5% KOH/MeOH 용액으로 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트를 넣어 분획시켰다. 분획한 에틸아세테이트 층을 감압 · 농축하여 얻어진 분말을 당이 제거된 아글리콘 분말로 실험에 사용하였다.

이와 같이 얻어진 삼지구엽초 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 이용하여 항균 및 항산화 효능을 살펴보았고, 결과적으로 화장품 및 식품 원료로서 그 응용가능성을 확인하였다.

삼지구엽초 추출물의 항균활성 측정

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정: Gram (+)에 속하는 *S. aureus, B. subtilis,* Gram (–)에 속하는 *E. coli, P. aeruginosa,* 피부질환을 일으키는 *P. ovale, P. acnes*에 대한 항균활성을 disc diffusion assay로 측정하였다. 실험에 사용된 6종의 균주는 한국 미생물 보존센터

Table 1. List of strains and cultivation condition used for antimicrobial experiment.

Strains	Media	Temperature	Time
S. aureus ATCC6538	MH[a]	37°C	24 h
B. subtilis ATCC19659	MH	37°C	24 h
E. coli ATCC23736	MH	37°C	24 h
P. aeruginosa ATCC29336	MH	37°C	24 h
P. ovale ATCC12078	Pityrosporum medium[b]	30°C	72 h
P. acnes ATCC6919	RC[c]	37°C (CO_2)	72 h

[a]Mueller-Hinton medium.
[b]Malt extract agar 6%, oxbile 2%, tween 40 1%, glycerol monooleate 0.25%.
[c]Reinforced clostridial medium.

(KCCM)에서 분양받았다. 배양된 균주는 1×10^7 CFU/ml으로 조절하였고, 배지조성은 Table 1에 명시하였다. Paper disc (diameter 8 mm, Roshi Kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)에 0.5, 2.5 mg의 시료를 흡수, 건조시켰다. 배양된 각 균주를 100 µl씩 평판배지에 도말한 후, 시료를 흡수한 paper disc를 도말한 평판배지 위에 밀착시켜 배양하였다. 그 후 disc의 clear zone을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정: Paper disc 실험에서 낮은 농도(0.5 mg)에서도 항균 활성을 보인 분획 및 균주에 대해 더 자세한 활성을 측정하기 위해 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 확인하였다. 실험은 Castillo *et al.* [1]이 사용한 agar-dilution method을 참고하여 진행하였다. 각각의 균주는 1×10^7 CFU/ml로 조절한 후 사용하였다. 대조군으로 화장품에 사용되는 대표적 방부제인 methyl paraben을 사용해 비교하였다. 각 농도의 샘플 1 ml를 함유한 배지 10 ml를 petri dish에 주입하였고, 균을 100 µl씩 도말한 후 배양하였다. 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

삼지구엽초 추출물의 항산화 효과 측정

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성: DPPH 실험법은 라디칼의 소거 능력을 확인할 수 있는 대표적인 실험으로, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자공여효과(electron donating ability)를 통하여 환원력을 측정한다. 실험은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 1 ml, 에탄올 1 ml, 여러 농도의 추출물 1 ml을 vortexing한 다음 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 동일한 시간 동안 반응을 시킨 후, spectrophotometer로 517 nm에서 DPPH의 흡광도를 측정하였다. 아래의 식을 이용하여 DPPH 소거 활성을 계산하였으며 대조군(control)은 시료를 넣지 않았고, 공시험(blank)은 DPPH를 넣지 않고 시료의 영향을 보정해주었다. 데이터는 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity concentration, FSC_{50}, µg/ml)로 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \left[\frac{(A_{Experiment} - B_{Blank})}{A_{control}}\right]\times100$$

Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능): 실험에서 활성산소종에 의해 luminol이 나타내는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 증류수 1.78 ml에 시료를 농도별로 첨가한 후, 2.5 mM EDTA 40 µl, 5 mM $FeCl_3\cdot6H_2O$ 10 µl, 35 mM luminol 80 µl를 넣고 hand-mixing하였다. 5 min 동안 항온시킨 후 Fenton 반응을 일으키기 위해서 150 mM H_2O_2 40 µl를 넣고 25 min 동안 화학적 발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)으로 추출물 대신에 증류수를 넣었고, 공시험(blank)은 H_2O_2와 $FeCl_3\cdot6H_2O$ 대신 증류수를 첨가하여 측정하였다. 소거 활성은 다음 식을 이용해 계산하였고, 데이터에는 각종 활성산소 소거 활성에 의한 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity concentration, OSC_{50}, µg/ml)로서 표기하였다.

$$\text{inhibition (\%)} = \frac{(Control\text{의 } cpm - Sample\text{의 } cpm)}{(Control\text{의 } cpm - Blank\text{의 } cpm)}\times100$$

Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

적혈구 현탁액 제조: 적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 채혈하였고, 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣었다. 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였고, 분리한 혈구는 0.9% saline phosphate buffered saline (pH 7.4, $Na_2HPO_4\cdot12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4\cdot2H_2O$ 1.6 mM)으로 3회 반복하여 세척, 분리하였다. 분리한 적혈구는 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/ml이다.

삼지구엽초 추출물의 광용혈 억제 효과: 적혈구 현탁액 3.5 ml에 추출물을 농도별로 각각 50 µl씩 첨가한 후 30 min 동안 pre-incubation 시켰다. 그 후 광증감제로 사용된 12 µM rose-bengal 0.5 ml를 가하고 15 min 동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다. 15 min의 광조사가 끝난 후 암반응 시간에 따른 적혈구의 용혈정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하였다. 이 700 nm의 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온을 유지하며 진행하였다. 데이터는 적혈구의 50%가 용혈되는데 걸리는 시간인 τ_{50}으로 나타내었다.

대조군(control)은 τ_{50}이 31 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 하지 않았을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

결 과

삼지구엽초 추출물의 수득률

50% 에탄올 용액 4 L에 100 g의 건조한 삼지구엽초를 잘게 잘라 24 h동안 침적시킨 후 여과 감압하여 50% 에탄올

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1212.12001

추출물 분말을 얻었다. 50% 에탄올 추출물의 수득률은 4.11% 이었다. 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올로 추출물에서 n-헥산으로 비극성 물질을 제거한 뒤 에틸아세테이트 분획을 추출하여 감압 농축하였고 수득률이 1.71%로 확인되었다. 에틸아세테이트 분획 분말 0.2 g을 이용해 산 가수분해시켜 당을 제거한 아글리콘 분획을 얻었다. 에틸아세테이트 분획으로부터 얻어진 아글리콘 분획의 수득률은 13.40%였다. 이렇게 얻어진 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 이용해 실험을 진행하였다.

피부상재균의 항균활성

Disc diffusion assay에 의한 항균활성: 2종의 Gram (+) 세균(*S. aureus, B. subtilis*), 2종의 Gram (–) 세균(*E. coli, P. aeruginosa*), 2종의 대표적인 피부상재균(*P. ovale, P. acnes*), 총 6종의 세균에 대하여 삼지구엽초 추출물의 disc 확산 실험 결과를 Table 2에 나타내었다. 삼지구엽초의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 모두 Gram (+) 균(*S. aureus, B. subtilis*)에서 비교군으로 사용한 methyl paraben 보다 높은 항균활성을 나타내었다. 반면에 삼지구엽초의 두 분획 모두 Gram (–) 균(*E. coli, P. aeruginosa*)에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타났다. 피부상재균에 대해서는 두 분획 모두 비듬균인 *P. ovale*에 대한 항균활성이 없고, 여드름균인 *P. acnes*에 대해서는 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 이 중 에틸아세테이트 분획은 *P. acnes*에 대해서 methyl paraben보다 더 높은 항균활성을 나타낸 것으로 보아 여드름 개선용 화장품 원료로서 응용가능성이 있음을 확인하였다. 또한 *P. acnes*는 Gram (+) 균이기 때문에 삼지구엽초 추출물은 Gram (+) 균에 대해 선택적 항균효과를 나타내는 것으로 예측된다.

최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정: Disc diffusion assay에서 실험한 농도 중 낮은 농도였던 0.5 mg/disc에서도 우수한 항균효과를 나타낸 삼지구엽초 분획-균에 대해서 추가적으로 MIC 실험을 진행하였다. 실험을 진행한 삼지구엽초 분획-균 조건은 50% 에탄올 추출물-*S. aureus*, 에틸아세테이트 분획-*S. aureus*, 에틸아세테이트 분획-*B. subtilis*, 에틸아세테이트 분획-*P. acnes*, 총 4가지에 조건이다. 각각의 MIC는 Table 3에 나타내었다. *S. aureus, B. subtilis, P. acnes* 세가지 균에 대한 에틸아세테이트 분획의 MIC 값은 각각 625 μg/ml, 625 μg/ml, 1250 μg/ml으로 모두 비교군으로 사용한 methyl paraben보다 높은 항균활성을 보여주었다. 50% 에탄올 추출물의 *S. aureus*에 대한 MIC는 1250 μg/ml으로 methyl paraben과 같은 최소저해농도를 나타내었다.

삼지구엽초 추출물의 항산화 활성

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성: 피부에 자외선이 노출되었을 때 생성되는 ROS에는 ·OH, ROO·와 같은 라디칼 종이 포함되어 있다. 이러한 라디칼 종은 짝을 짓지 않은 홀 전자를 가지고 있기 때문에 매우 큰 반응성을 나타낸다. 라디칼의 불안정성은 피부 탄력을 유지시켜주는 주요 조직인 콜라겐, 엘라스틴 섬유를 산화시켜 손상을 가하게 되고 물리적인 탄력 구조를 유지하지 못하게 한다. 이러한 결과로 피부의 노화가 가속되기 때문에, 라디칼 소거능은 피부 손상을 막는 중요한 요인이다. 라디칼 종 외에도, $^1O_2$과 같은 ROS는 세포를 공격해 세포막에서 지질 라디칼을 형성시킨다. 이렇게 형성된 지질 라디칼은 지질과산화 연쇄반응

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC, μg/ml) of *E. koreanum* Nakai against various bacteria.

Strain	MIC (mg/ml)			
	Control		Fraction	
	DMSO	Methly paraben	Extract	Ethyl acetate
S. aureus	-	1250	1250	625
B. subtilis	-	2500		625
P. acnes	-	2500		1250

Table 2. Antibacterial activities of *E. koreanum* Nakai fractions against bacteria.

Bacterial strains	Size of clear zone (diameter, mm)						
	Control conc. (mg/disc)			Fraction conc. (mg/disc)			
	DMSO	Methly paraben		Extract		Ethyl acetate	
		0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5
S. aureus	-	-	12	10	16	15	19
B. subtilis	-	-	11	-	12	10	13
E. coli	-	10	18	-	-	-	-
P. aeruginosa	-	10	18	-	-	-	-
P. ovale	-	18	24	-	-	-	-
P. acnes	-	-	14	-	13	11	18

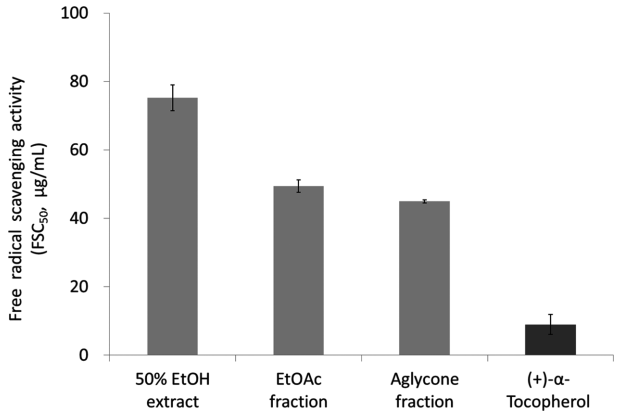

Fig. 1. Free radical scavenging activities of extracts of *E. koreanum* Nakai and (+)-α-Tocopherol.

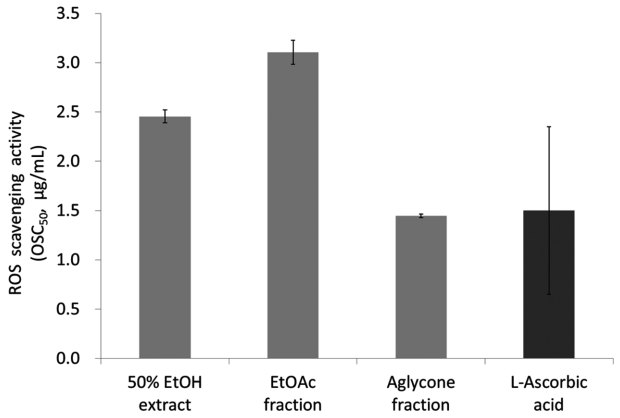

Fig. 2. ROS scavenging activities of *E. koreanum* Nakai extracts and L-Ascorbic acid by luminol-dependent chemiluminescence assay.

을 개시시켜 결과적으로 세포를 손상시킨다. 이러한 손상을 막기 위해 생체 내에서는 (+)-α-토코페롤 등의 항산화제가 라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이와 같이 라디칼 소거 능력을 알아보기 위해 삼지구엽초 추출물을 DPPH와 반응시켜 보았다. 이때 비교물질로는 (+)-α-토코페롤을 사용하였다.

3가지 분획의 삼지구엽초 추출물과 (+)-α-토코페롤의 free radical 소거 활성(FSC_{50})을 Fig. 1에 나타내었다. 50% 에탄올 추출물의 FSC_{50}은 75.25 ± 3.75 μg/ml, 에틸아세테이트 분획은 49.40 ± 1.80 μg/ml, 아글리콘 분획은 44.95 ± 0.45 μg/ml로 확인되었다. 반면에 세포막을 보호하는 강력한 지용성 항산화제인 (+)-α-토코페롤의 FSC_{50}은 8.98 ± 2.93 μg/ml으로 삼지구엽초 추출물에 비해 상당히 높은 라디칼 소거 능력이 있는 것으로 확인하였다. 따라서 삼지구엽초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 모두 라디칼 소거 능력은 있지만 (+)-α-토코페롤보다는 활성이 떨어지는 것으로 확인되었다.

Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능): 피부가 자외선에 노출되면 체내에서는 다양한 ROS들이 생성되기 때문에 여러 ROS에 대한 총체적인 소거 활성을 확인하는 것은 중요한 의의를 갖는다. 이번 실험에서는 다양한 ROS를 생성시키기 위해서 Fenton 반응을 이용하였다. Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계를 이용하면 Fenton 반응에 의해 각종 ROS ($O_2^{\cdot-}$ ·OH 그리고 H_2O_2)가 생성되는 조건을 만들 수 있다. 이렇게 생성된 ROS는 luminol을 산화시키고 형광을 일으킨다. 따라서 luminol의 화학발광 정도를 측정함으로써 삼지구엽초 추출물의 ROS 소거능력을 확인할 수 있다. 또한 Fenton 반응을 촉진시키기 위해서 EDTA를 사용하기 때문에 킬레이트 작용도 총 항산화능에 영향을 미치게 된다. 이러한 요소는 생체 내에서 일어나는 Fenton 반응과 유사하기 때문에 좀 더 유용한 항산화 능력을 측정할 수 있게 된다. 비교물질로는 체내의 강력한 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid를 사용하였다.

삼지구엽초 추출물의 ROS 소거 활성(총 항산화능, OSC_{50})은 Fig. 2에 나타내었다. 50% 에탄올 추출물의 OSC_{50}은 2.46 ± 0.06 μg/ml, 에틸아세테이트 분획은 3.11 ± 0.12 μg/ml, 아글리콘 분획은 1.45 ± 0.02 μg/ml로 나타났다. L-Ascorbic acid의 OSC_{50}은 1.50 ± 0.85 μg/ml으로 확인하였다. 따라서 총 항산화 능력은 아글리콘 분획 > 50% 에탄올 추출물 > 에틸아세테이트 분획 순서로 나타났다. 에틸아세테이트 분획은 L-ascorbic acid보다 낮은 총 항산화 활성을 나타냈으나, 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획은 L-ascorbic acid의 총 항산화 능력과 유사한 것으로 보아 상당한 ROS 소거 능력이 있음을 확인하였다.

$^1O_2$으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과

Photohemolysis법을 이용한 실험은 사람의 적혈구를 이용하기 때문에 좀 더 실질적인 효능을 확인할 수 있다. 광증감제에 빛을 조사하면 $^1O_2$이 주로 생성되고 부가적으로 다양한 ROS가 생성된다. 이러한 ROS들은 세포를 손상시키고 파괴시키는데, 세포가 용혈되는데 걸리는 시간을 측정함으로써 삼지구엽초 추출물의 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. 체내에는 다양한 광증감제들이 존재하는데, 이로 인해 발생하는 광증감 반응은 자외선이 유도하는 일반적인 ROS 생성에 비해 더 쉽고 빠르게 ROS를 생성한다. 따라서 삼지구엽초 추출물의 세포 보호 효과를 측정하는 것은 항산화제로써의 응용가능성을 판단하는데 유용한 척도가 될 수 있을 것이다.

광증감제인 rose-bengal을 함유한 적혈구 현탁액에 15 min 광 조사하여 $^1O_2$으로 유도된 적혈구의 용혈에 걸리는 시간을 측정하였다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우 적혈구 세

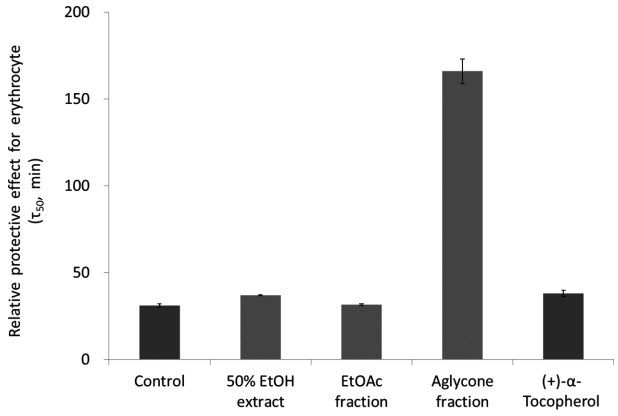

Fig. 3. Cell protective effects of extracts from *E. koreanum* Nakai and (+)-α-Tocopherol at 10 μg/ml on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 약 31 ± 1 min으로 나타났다. 시료의 세포 보호 효과가 클수록 τ_{50}은 크게 나타난다. 비교물질로는 세포 보호 효과가 있다고 알려져 있는 지용성 항산화제인 (+)-α-토코페롤을 사용하였다. 삼지구엽초 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획은 5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml의 농도 범위에서 농도 의존적인 τ_{50} 값을 보여주었다(자료 미제시). 10 μg/ml 농도를 기준으로 하여 삼지구엽초의 세 가지 분획과 (+)-α-토코페롤의 τ_{50} 값을 비교하였다(Fig. 3).

삼지구엽초 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 τ_{50}은 31.6 ± 0.5 min으로 대조군과 비교해 유의할만한 세포 보호 효과를 나타내지 않았다. 반면에 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획은 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다. 50% 에탄올 추출물의 τ_{50}은 37.0 ± 0.3 min으로 비교물질로 사용한 (+)-α-토코페롤과(τ_{50} = 38.0 ± 1.8 min) 비슷한 활성을 나타냈다. 아글리콘 분획의 τ_{50}은 165.9 ± 7.2 min으로 다른 분획 및 (+)-α-토코페롤과 비교하였을 때 월등한 세포 보호 효과를 확인하였다. 일반적으로 당이 제거된 아글리콘 분획의 성분들이 당이 포함된 에틸아세테이트 및 50% 에탄올 추출물 성분에 비해 비극성을 띄기 때문에, 비극성인 세포와 좀 더 상호작용이 원활할 것으로 예상된다. 따라서 아글리콘 분획이 월등한 세포 보호 효과를 나타낸 것은 이러한 비극성에 의한 결과일 것으로 추측해 볼 수 있다.

고 찰

이번 연구에서 우리는 삼지구엽초 추출물의 항균 효과 및 항산화 활성을 측정함으로써 화장품 원료로서의 응용가능성을 확인해보았다. 삼지구엽초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획, 총 세가지로 분획 조건을 다양화해서 실험을 진행하였다.

우선적으로 삼지구엽초 추출물이 항균 활성을 갖는지 여부를 알아내기 위해 *S. aureus, B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa, P. ovale, P. acnes,* 총 6가지 피부상재균에 대해 disc diffusion assay를 진행하였다. 에틸아세테이트 분획이 세가지 Gram (+)균(*S. aureus, B. subtilis, P. acnes*), 50% 에탄올 추출물이 *S. aureus*에 대하여 높은 항균 효과를 갖는 것을 확인하였다. 특히 에틸아세테이트 분획이 여드름 균(*P. acnes*)과 아토피를 일으키는 포도상구균(*S. aureus*)에 대해 높은 항균 효과를 나타 내었는데 이를 통해 삼지구엽초가 천연 방부제 뿐만 아니라 여드름, 아토피 개선용 화장품 소재로써 응용될 수 있을 것이라 예상된다.

다음으로는 피부에서 발생하는 다양한 ROS에 대한 항산화 효과를 측정해 보았다. 비교적 안정한 라디칼인 DPPH을 이용하여 라디칼 소거 활성을 살펴보았다. 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성은 비교물질로 사용된 (+)-α-토코페롤보다는 낮지만 실험에 사용된 세 분획 중 가장 높은 효과를 보여주었다. 에탄올, 에틸아세테이트, n-부탄올, 물 등을 이용한 다양한 용매 분획에 따른 삼지구엽초의 DPPH 소거 활성을 연구한 Zhang *et al.* [23]에 따르면 n-부탄올 분획이 가장 우수한 활성을 나타내었는데, 추후 연구에서 n-부탄올 분획과 본 연구에서 사용된 아글리콘 분획을 이용, 동일한 조건에서 DPPH 소거 활성을 비교 평가하여 가장 우수한 활성을 나타내는 분획을 탐색하는 것 또한 의의가 있을 것으로 여겨진다. 또한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서 발생하는 Fenton 반응을 이용하여 다양한 ROS에 대한 총 항산화능 평가에 대해서 아글리콘 분획은 비교 물질인 L-ascorhbic acid과 유사한 높은 활성을 보여주었다. 마지막으로 광증감 반응이 생성하는 $^1O_2$으로 유도된 적혈구의 용혈로부터 세포 보호 효과를 확인해 보았다. 세 분획 중 아글리콘 분획은 비교물질로 사용한 (+)-α-토코페롤보다 약 4배 더 우수한 세포 보호 효과를 보여주었다. 자외선 조사로 생성된 $^1O_2$은 반응성이 매우 큰 ROS로서 생체 막을 통과하여 자동산화반응을 개시시킨다. 때문에 이 실험법을 통한 활성산소에 의한 세포 보호 효과 측정은 자외선에 의한 피부 노화를 방어할 수 있는 물질을 탐색하는데 유용하다고 여겨진다[24]. 결과적으로 삼지구엽초 추출물 중 아글리콘 분획은 다양한 ROS에 대해 높은 소거 활성을 보여주었고, 반응성이 매우 큰 $^1O_2$으로부터 세포를 효과적으로 보호하였기 때문에 유용한 항산화제로서 화장품에 응용할 수 있을 것으로 보인다.

종합해보면 삼지구엽초 추출물의 에틸아세테이트 분획은 Gram (+)균에 대해 높은 항균 효과를 나타내었기 때문에 방부제로서 작용할 수 있을 것이라 예상된다. 특히 여드름균에 대한 항균 활성으로 보아 여드름 개선용 화장품에 응용할 수 있는 가능성이 있다. 항산화 활성에서는 아글리콘 분획이 높

은 총 항산화 활성과 $^1O_2$이 유도하는 세포 용혈을 효과적으로 막아주었기 때문에 항산화제로서 충분한 응용가능성이 있어 보인다. 따라서 삼지구엽초 추출물은 각 분획이 목적에 따라 화장품 원료로서 다양하게 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

본 연구에서는 화장품 원료로서 삼지구엽초의 응용가능성을 확인하기 위해 항균 효과와 항산화 효과를 확인하였다. 피부상재균에 대한 disc diffusion assay에서 높은 항균 효과를 나타낸 분획-균에 대해 최소저해농도를 측정하였다. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)에 대한 에틸아세테이트 분획의 항균 활성과, *S. aureus*에 대한 50% 에탄올 분획의 항균 활성은 대표적인 방부제인 methyl paraben보다 우수한 것으로 확인되었다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 라디칼 소거 활성에서는 삼지구엽초의 세 분획 모두 대표적 항산화제인 (+)-α-토코페롤보다 낮은 것으로 나타났다. Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계를 이용해 다양한 ROS에 대한 총 항산화 활성(OSC_{50})을 실험한 결과, 50% 에탄올 추출물(OSC_{50} = 2.46 ± 0.06 μg/ml)과 아글리콘 분획(OSC_{50} = 1.45 ± 0.02 μg/ml)은 비교 물질인 L-ascorbic acid(OSC_{50} = 1.50 ± 0.85 μg/ml)과 유사한 높은 활성을 보여주었다. 광증감 반응을 이용한 세포 보호 효과(τ_{50}) 실험에서 50% 에탄올 추출물(τ_{50} = 37.0 ± 0.3 min)은 비교 물질인 (+)-α-토코페롤(τ_{50} = 38.0 ± 1.8 min)과 유사한 값을 보여주었다. 특히 아글리콘 분획의 τ_{50}은 165.9 ± 7.2 min으로 비교 물질인 (+)-α-토코페롤에 비해 4배가 넘는 높은 세포 보호 효과를 나타내었다. 이러한 결과들을 종합해보았을 때, 삼지구엽초 추출물은 항균 또는 항산화 활성을 갖는 화장품 원료로서 응용가능성이 높은 것으로 확인하였다.

References

1. Castillo DN, Harcourt B, Hatcher C, Jackson M, Katz L, Mair R, *et al.* 2011. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, pp. 1-74, 2nd ed. *WHO/CDS/CSR/EDC/99.7*.
2. Choi HK, Kim DH, Kim JW, Ngadiran S, Sarmidi MR, Park CS. 2010. *Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. *J. Biosci. Bioeng.* **109**: 291-296.
3. Ham SS, Oh DH, Hong JK, Lee JH. 1997. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J. Food Sci. Nutr.* **2**: 155-161.
4. Jun S, Goto K, Nanjo F, Kawai S, Murata K. 2000. Antifungal activity of plant extract against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 442-446.
5. Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. 2008. Supercritical extraction of oriental herb: anti-aging and anti-wrinkle effects. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 529-534.
6. Kim SY, Won DH, Lim MS, Park SN. 2010. Cellular protective effect and component analysis of *Euphorbia humifusa* extracts. *Korean J. Pharmacogn.* **41**: 264-269.
7. Kohen R. 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* **53**: 181-192.
8. Kondo S. 2000. The roles of cytokines in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* **23**: S30-36.
9. Lee EJ, Bae SY, Nam KW, Lee YH. 2010. Antibacterial and anti-inflammatory effects of medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **36**: 57-63.
10. Lee HJ, Lim GN, Park MA, Park SN. 2011. Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. don extracts. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 63-69.
11. Lee KS, Lee JC, Han KH, Oh MJ. 1999. Antimicrobial acivities of extract of *Perilla frutescens* Briton var. acuta Kudo on food spoilage or foodborne disease microorganism. *Korean Soc. Food Preserv.* **6**: 239-244.
12. Lee SS, Imm JY, Han YS. 2012. The improvement effect of lotus leaf extracts on acne skin. *Korean J. Aesthet. Cosmetol.* **10**: 405-413.
13. Magdalena LC, Tak YA. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**: 749-762.
14. Marples RR. 1974. The microflora of the face and acne lesions. *J. Invest. Dermatol.* **62**: 326-331.
15. Masaki H. 2010. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* **58**: 85-90.
16. Michael JH, Frederick ED. 2007. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 1023-1036.
17. Oh MS, Kim DR, Kang JU, Kim SW, Yu TW, Park JY, *et al.* 2005. Study on antioxidant potency of *Cuscutae semen*, *Psoraleae fructus*, *Cnidii fructus* and *Epimedii herba* by DPPH method. *Korean J. Orient. Med. Prescription.* **13**: 101-110.
18. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herramann G, Ma W, Kuhr L, *et al.* 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* **35**: 307-316.
19. Seo MS, Kim KY. 2010. Effects of lithospermum erythrorhizon extracts on *P. acnes* induced cytokin gene expression in human monocytes. *Korean J. Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology Society* **23**: 57-68.
20. Yaar M, Gilchrest BA. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* **157**: 874-887.
21. Yang HG, Kim HJ, Kim HS, Park SN. 2012. Antibacterial and antioxidative activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 250-260.

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1212.12001

22. Yoshitama K, Hisada M, Ishikura N. 1984. Distribution pattern of anthocyanins in the Polygonaceae. *Bot. Mag. Tokyo* **97**: 31-38.
23. Zhang W, Chen H, Wang Z. 2011. Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractionas from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. *J. Food. Sci. Technol.* 1-8.
24. Park SN. 1997. Skin aging and antioxidant. *Korean. J. Soc. Cosmet. Scientist* **23**: 75-132.