

## 당근 지상부 추출물 유래 항염 및 항균 활성 성분

김정은·조연정·이남호<sup>†</sup>

제주대학교 화학·코스메틱스학과  
(2018년 10월 16일 접수, 2018년 10월 30일 수정, 2018년 11월 13일 채택)

### Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents from the Extracts of *Daucus carota var. sativa* Aerial Parts

Jung Eun Kim, Yeon Jeong Jo, and Nam Ho Lee<sup>†</sup>

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea  
(Received October 16, 2018; Revised October 30, 2018; Accepted November 13, 2018)

**요약:** 본 연구에서는 당근 지상부 추출물 및 용매 분획물의 항염, 항균 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 동정하였다. 당근 지상부 에탄올 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성 억제 활성을 확인하였다. 그 중 에틸아세테이트 분획물이 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 나타났고, 추가적인 항염 기전 연구를 위해 에틸아세테이트 분획물에 대해 PGE<sub>2</sub>, 전염증성 사이토카인의 생성량 및 iNOS, COX-2 단백질의 발현량을 측정하였다. 그 결과, 에틸아세테이트 분획물이 PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성을 감소시키고, iNOS, COX-2 단백질의 발현도 억제 시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 표피포도상구균과 여드름균을 이용한 활성 실험 결과, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 항균 활성이 나타났다. 이와 같은 결과를 바탕으로 에틸아세테이트 분획물에 대해 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 3개의 화합물을 분리하였으며, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 데이터 분석과 문헌을 통하여 화학구조를 동정하였다; diosmetin (1), disomin (2), cynaroside (3). 분리된 화합물 1-3에 대해 항염 및 항균 활성을 측정하였으며, 그 결과 화합물 1-3 모두 NO의 생성을 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 화합물 3은 여드름균에 대해 항균 활성이 우수하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 당근 지상부 추출물을 이용한 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

**Abstract:** In this study, we investigated anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from *Daucus carota* var. *sativa* (carrot) areal parts. For the extract and solvent fractions, the anti-inflammatory activities were examined by measuring the nitric oxide (NO) production using LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Among them, the ethyl acetate (EtOAc) fraction decreased the NO level in a dose-dependent manner. To elucidate further anti-inflammatory mechanisms, EtOAc fraction was evaluated by estimating their effects on the production of prostaglandin E<sub>2</sub> and pro-inflammatory cytokines as well as on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). As a result, the EtOAc fraction was determined to inhibit the production of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and reduce the iNOS, COX-2 protein expression. Upon the anti-bacterial tests using *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, *n*-hexane (Hex) and EtOAc fractions showed the most potent activities. Three phytochemicals were isolated from the EtOAc fraction;

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)  
call: 064)754-3548

diosmetin (1), diosmin (2), cynaroside (3). The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, as well as comparison of the data to the literatures. Anti-inflammatory and anti-bacterial effects were studied for the isolates. All of the compounds (1 - 3) decreased the NO production, effectively. Also, compound 3 showed anti-bacterial activity on *P. acnes*. Based on these results, *D. carota* var. *sativa* extract could be potentially applicable as anti-inflammatory and anti-bacterial ingredients in cosmetic formulations.

**Keywords:** *D. carota* var. *sativa*, anti-inflammation, anti-bacterial activity, isolation

## 1. 서 론

피부는 외부에서 유입되는 이물질로부터 인체를 보호하고, 피지와 땀의 분비, 약물과 화장품의 흡수, 촉각, 압각, 감각의 인지 기능이 있다. 그러나 이러한 피부는 생리적, 환경적 변화에 의해 여드름, 색소침착, 지루성 피부염, 아토피성 피부염, 비듬 등의 피부 이상 또는 질환이 발생한다[1]. 피부에서 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부질환, 여드름성 피부질환, 광 민감성 피부질환 및 민감성 피부질환의 생리학적인 기전은 염증반응의 과정을 거치며, 다양한 염증현상에 의해 진피층을 파괴하는 효소들인 hyaluronidase, elastase, collagenase 등의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주름형성에 직접적으로 영향을 준다. 다양한 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 이유와 반응조직의 차이에 상관없이 거의 비슷한 변화를 보인다. 그러므로 공통적인 물질요인의 존재가 있을 것으로 추정하며 그 매개체로는 활성산소, 산화질소, prostaglandin (PG), 여러 가지 사이토카인 등이 있다. 면역과 염증에 관련된 사이토카인 중 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다[2].

여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 피부질환으로, 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로젠은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 과각화를 일으키며, 이로 인해 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *P. acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다[3,4]. 동시에 *S. epidermidis*와

같은 다른 세균들이 모낭주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다[5]. 여드름 원인균인 *P. acnes*는 피부 내에 존재하는 상재균으로 정상상태에서는 피부연역시스템에 의해 관용된다. 그러나 안드로젠의 과다 분비에 의한 피부지방 조성의 불균형 및 *P. acnes*의 증식으로 인하여 여드름과 같은 피부질환이 발생한다[6]. 호기성균인 *S. epidermidis*는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 이러한 *P. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 주로 사용되고 있다. 현재 여드름 치료제로 쓰이고 있는 약제로는 retinoid, benzoyl peroxide, clindamycin, erythromycin, triclosan 등과 같이 화장품 응용이 부적합한 의료용 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 피부자극, 간독성, 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다[7,8]. 따라서 여드름 피부에 효과적이고 피부에 안전하며 부작용을 최소화할 수 있는 천연 항균물질에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이며, 많은 연구자들이 이러한 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다[9].

당근(*D. carota* var. *sativa*)은 미나리과(Apiaceae)의 식물이며, 아프가니스탄이 원산지이다. 유럽, 아시아, 북아프리카 등 전세계에서 재배되고 있으며, 우리나라에는 16세기부터 재배하기 시작했다고 알려져 있다. 대부분 식용으로는 당근의 뿌리 부분을 먹지만, 연한 잎과 줄기는 셀러리와 미나리를 조합한 맛이 나므로 생식으로 먹거나 상추 등의 쌈과 곁들여 먹으면 좋다고 알려져 있다. 서양에서는 당근의 줄기와 잎도 함께 먹기 때문에 전체로 판매를 하지만, 우리나라에서는 당근의 줄기 부분을 사람들이 잘 먹지 않기 때문에 수확 후 대부분이 폐기된다. 당근의 효능은 여러 가지 널

리 알려져 있지만, 대표적인 것 몇 가지를 들면, 비타민 A 보충, 면역력 증진, 간 보호 등이 있다. 또한 당근은 한방에서 이질, 백일해, 해수, 복부팽만, 홍역, 빈혈, 저혈압, 야맹증, 방광염에 효과가 있고 신장결석을 예방하기도 하며 구충제로도 사용한다. 그러나 아직까지 당근에 대한 연구는 뿌리 부분이 주를 이루고 있으며, 지상부인 줄기나 잎에 대한 생리활성 및 성분 연구는 많이 알려지지 않았다. 또한 수확 후 폐기되는 부분인 당근 지상부 추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 항염 및 항균 효과를 확인하여 화장품 원료 등의 자원으로 활용이 가능한지 알아보려고 본 연구를 진행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma, USA), gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, Fluka, USA)이 사용되었다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 AVANCE III (FT-NMR system, Bruker, Germany)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL 사의 NMR 전용 용매인 pyridine-*d*<sub>5</sub>, CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>을 사용하였다.

### 2.2. 당근 지상부의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 당근 지상부(시료번호 : 343)는 제주 서귀포시 표선면 소재 청초발영농조합에서 2014년 1월에 채집하였다. 채집한 시료는 동결건조 후, 분쇄하여 사용하였으며, 시료 2.5 kg을 70% 에탄올 17 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 812.2 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 173 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다.

### 2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

EtOAc 분획물 6.0 g을 극성에 따라 분획하기 위하여 VLC를 수행하였으며, *n*-Hex-EtOAc (0-100%), EtOAc-MeOH (0-50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-30). Fr. V12 (107.9 mg) 및 Fr. V25 (847.4 mg)는 메탄올을 사용해 재결정을 하여 화합물 **1** (8.4 mg)과 화합물 **3** (304.7 mg)을 얻었다. 그리고 Fr. V26 (630.4 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 4 : 1)을 수행하여 화합물 **2** (40.2 mg)를 분리하였다.

Diosmetin (**1**) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.66 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, H-6'), 7.62 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.29 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.98 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.77 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.84 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ<sub>C</sub>: 183.2 (C-4), 166.4 (C-2), 165.0 (C-7), 163.7 (C-5), 159.1 (C-9), 152.9 (C-4'), 149.5 (C-3'), 123.1 (C-1'), 121.8 (C-6'), 117.4 (C-5'), 110.8 (C-2'), 105.6 (C-10), 104.7 (C-3), 100.5 (C-6), 95.4 (C-8), 56.5 (4'-OCH<sub>3</sub>)

Diosmin (**2**) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.49 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-6'), 7.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.71 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-8), 6.61 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-6), 5.00 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 4.72 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1'''), 4.05 - 3.49 (10H, H-2'' - 6'', 2''' - 5''') 3.96 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 1.19 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 183.8 (C-4), 164.3 (C-2), 166.4 (C-7), 162.7 (C-5), 158.5 (C-9), 151.9 (C-4'), 149.1 (C-3'), 123.2 (C-1'), 121.8 (C-6'), 116.7 (C-2'), 110.4 (C-5'), 107.0 (C-10), 104.4 (C-3), 101.7 (C-1'''), 101.3 (C-1''), 100.9 (C-6), 96.3 (C-8), 77.5 (C-3''), 76.9 (C-5''), 74.3 (C-2''), 73.8 (C-4''), 72.1 (C-3'''), 71.7 (C-2'''), 70.9 (C-4'''), 69.4 (C-5'''), 67.2 (C-6''), 56.7 (4'-OCH<sub>3</sub>), 18.8 (C-6''')

Cynaroside (**3**) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.92 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.53 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-6'), 7.28 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 7.02 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.97 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 4.61 - 4.22 (6H, H-2'' - 6''); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

$\delta_c$ : 183.3 (C-4), 165.7 (C-2), 164.4 (C-7), 163.0 (C-5), 158.3 (C-9), 152.4 (C-4'), 148.3 (C-3'), 123.1 (C-1'), 120.1 (C-6'), 117.3 (C-5'), 115.2 (C-2'), 104.6 (C-3), 107.0 (C-10), 102.2 (C-6), 101.1 (C-1''), 95.7 (C-8), 79.7 (C-2''), 79.0 (C-5''), 75.3 (C-3''), 71.5 (C-4''), 62.8 (C-6'')

## 2.4. 항염 활성

### 2.4.1. 세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

### 2.4.2. NO 생성 억제 활성

24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1  $\mu$ g/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100  $\mu$ L를 혼합하여 96-well plate에서 10 min 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 사용하여 정량하였다.

### 2.4.3. PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성

24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1  $\mu$ g/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액의 사이토카인 생성 함량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 정량하였으며, PGE<sub>2</sub> ELISA kit (R&D

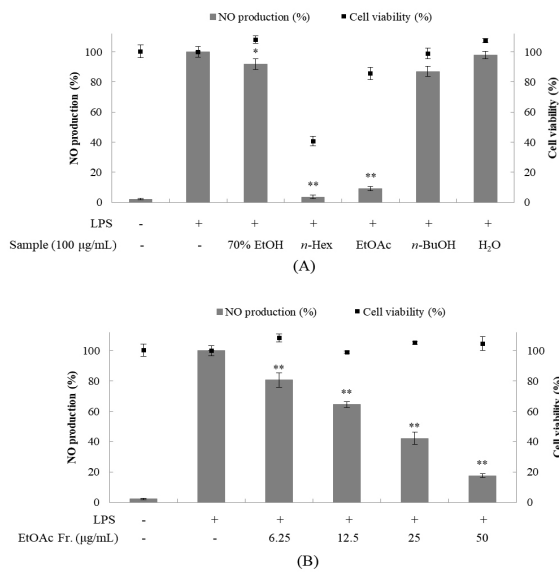
Systems, USA), TNF- $\alpha$  ELISA kit (Invitrogen, USA), IL-1 $\beta$  ELISA kit (R&D Systems, USA), IL-6 ELISA kit (Invitrogen, USA)를 사용하였다. Standard에 대한 표준 곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

### 2.4.4. Western Blot Analysis

60 mm dish에  $9 \times 10^5$  cells/dish로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1  $\mu$ g/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용해 4 °C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심 분리(15,000 rpm, 15 min, 4 °C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약(BIO-RAD, USA)을 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2 h blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1 : 1,000, SantaCruze, USA), COX-2 antibody (1 : 1,000, BD, USA),  $\beta$ -actin antibody clone AC-74 (1 : 20,000, Sigma, USA)를 이용하여 4 °C에서 overnight 반응 시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5회 세척 후, peroxidase-conjugated 2차 항체(1 : 5,000 또는 1 : 20,000, SantaCruze, USA)와 상온에서 1 h 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

## 2.5. 세포독성 평가(MTT Assay)

MTT assay는 RAW 264.7 cell을 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 전배양 후, LPS와 sample을 농도별로 동시에 처리하여 배양하였다. 이후 500  $\mu$ g/mL의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37 °C에서 3-4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세



**Figure 1.** Effects of extract, solvent fractions (A) and EtOAc fraction (B) from *D. carota* var. *sativa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *D. carota* var. *sativa* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *D. carota* var. *sativa*. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 계산하였다.

## 2.6. 항균 활성

### 2.6.1. 균주 배양

표피포도상구균인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37 °C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 37 °C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다.

### 2.6.2. 한천확산법(Paper Disc Diffusion Method)

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 한천확산법으로 clear zone의 크기를 확인하였다. 각 균주는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올린 후, *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 동안 배양하고, *P. acnes*는 37 °C에서 48 h 동안 혐기 배양한 후, 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

### 2.6.3. MIC 및 MBC

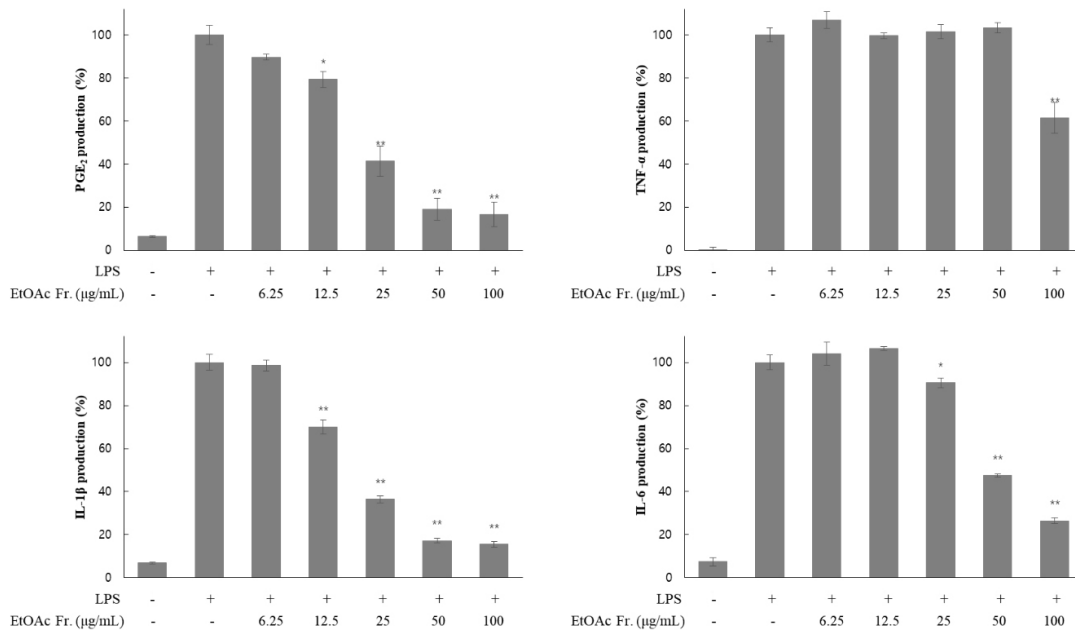
최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 실험하였다. 96-well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 시료를 포함하는 배지를 100 µL 넣어준 후, 균 현탁액의 농도를  $2 \times 10^5$  CFU/mL가 되도록 조절하여 100 µL씩 넣어준다. *S. epidermidis*는 37°C에서 24 h 배양하였으며, *P. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다. 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)는 MIC 값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드배지에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 것으로, MIC를 진행한 96-well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어내서 하드배지에 streaking 하였다. *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 배양하였으며, *P. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하여, colony가 형성되지 않는 최소농도를 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 당근 지상부 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

#### 3.1.1. NO 생성 억제 활성

당근 지상부 추출물 및 용매 분획물의 항염 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 LPS는



**Figure 2.** Effects of EtOAc fraction from *D. carota* var. *sativa* on production of PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction for 24 h. PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 produced and released into the culture medium was assayed using the ELISA method. The data represent the mean  $\pm$ SD of triplicate experiments (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01).

대식세포 또는 단핵구를 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 염증 매개성 사이토카인들의 분비를 촉진하며 NO의 대량 생성에 관여하게 되어 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다[10,11]. 따라서 시료에 대한 항염 효과를 확인하기 위해 대식세포에 LPS 자극을 가하여 NO 및 전염증성 사이토카인 생성 억제 효과를 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다. 본 연구를 위해 채집한 당근은 지상부와 뿌리 부분으로 나누어 추출하였으며, 각 추출물에 대해 NO 생성 억제 활성을 측정된 결과, 지상부 추출물이 뿌리 추출물보다 활성이 우수함을 확인하였다. 이를 바탕으로 당근 지상부 추출물의 항염, 항균 활성 및 성분 연구를 진행하게 되었다.

우선 당근 지상부 추출물 및 용매 분획물에 대하여 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 실험을 진행하였으며 그 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 91% 저해시키는 활성이 있음을 확인하였다(Figure 1A). 활성이 우수한 EtOAc 분획물에 대해 6.25-50  $\mu$ g/mL의 농도 범위로 다시 실험한 결과, NO의 생성을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 1B).

### 3.1.2. PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 활성이 우수한 당근 지상부 EtOAc 분획물에 대해 추가적인 항염 활성 기전 연구를 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 당근 지상부 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제에는 100  $\mu$ g/mL의 농도에서만 감소할 뿐 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Figure 2).

### 3.1.3. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성

대식세포가 interferon- $\gamma$  또는 LPS에 의해 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증 반응의 매개물질 역할을 하게 된다[12,13]. 또 다른 주요 염증 매개인자인 COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소이며, COX-2는 growth factor, 사이토카인 및 LPS 등 다양한 자극에 의해서 대식세포나

**Table 1.** Anti-bacterial Activities of *D. carota* var. *sativa*

	Clear zone (mm) <sup>1)</sup>						
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>			
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	10	-	-	10	9	9	9
<i>n</i> -Hex	16	10	11	17	14	16	11
EtOAc	14	9	10	17	16	18	10
<i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	22	-	31	50	-	-	30

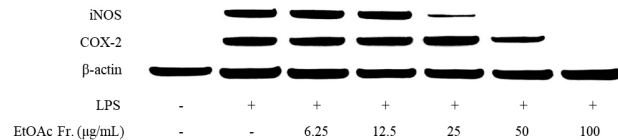
1) Concentration of sample : 2 mg, erythromycin : 20 µg

**Table 2.** MIC and MBC Values of *D. carota* var. *sativa*

		<i>n</i> -Hex <sup>1)</sup>	EtOAc <sup>1)</sup>
<i>S. epidermidis</i>	CCARM 3709	MIC 125	MBC 500
	CCARM 3710	MIC >1000	MBC >1000
	CCARM 3711	MIC >1000	MBC >1000
	CCARM 0081	MIC 1000	MBC 125
	CCARM 9009	MIC 1000	MBC 500
	CCARM 9010	MIC 500	MBC 250
<i>P. acnes</i>	CCARM 9089	MIC 500	MBC 250
	CCARM 9089	MIC >1000	MBC 1000

1) Concentration of sample : µg/mL

단핵구 등의 세포에서 다량 발현되고 이로 인해 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 관여한다고 알려져 있다 [14]. 이러한 염증반응에 관여하는 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현을 western blot 분석법을 통하여 측정된 결과, 당근지상부 EtOAc 분획물은 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다 (Figure 3). 이는 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 생성이 저해되는 것과 비슷한 경향으로 나타남을 확인하였다.



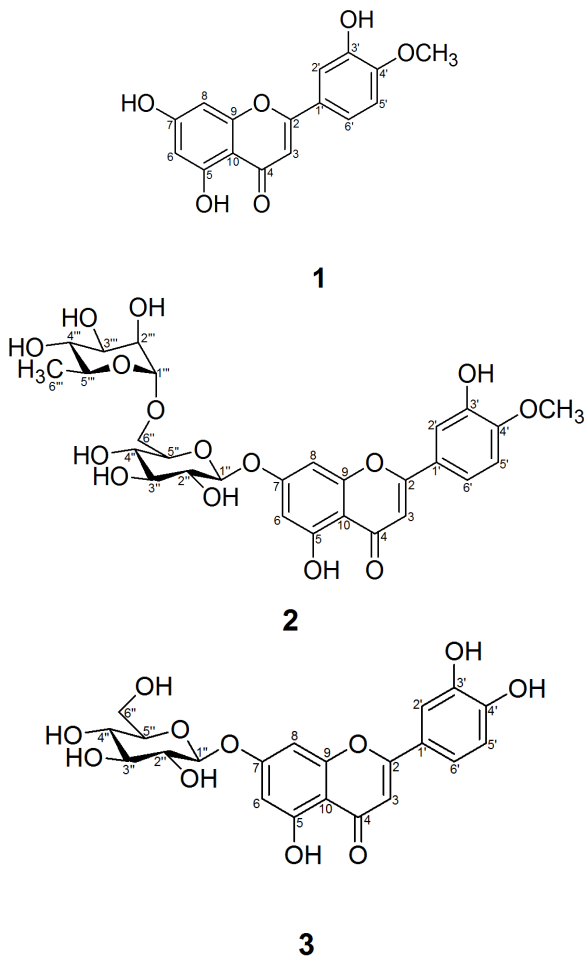
**Figure 3.** Effects of EtOAc fraction from *D. carota* var. *sativa* on levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction for 24 h. Whole cell lysates (20 µg) were prepared and the protein was subjected to 10% SDS-PAGE; expression of iNOS, COX-2 and β-actin were determined by western blotting. β-actin served as a loading control.

### 3.2. 당근 지상부 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성

당근 지상부 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* 및 *P. acnes*를 이용하여 한천확산법으로 clear zone을 확인하였다. 그 결과, 당근 지상부 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 나타났으며 (Table 1), 활성이 우수한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대해서는 추가적으로 최소억제농도(MIC) 및 최소사멸농도(MBC)를 확인하였다(Table 2).

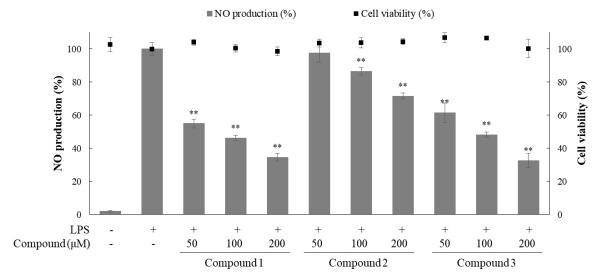
### 3.3. 당근 지상부로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항염 및 항균 활성이 우수했던 당근 지상부 EtOAc 분획물에 대해 VLC, Sephadex LH-20 CC 및 재결정을 수행하여 3개의 화합물을 분리하였으며, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였다. 화합물 1은 16개의 carbon 피크가 관찰되었고, 그중 δ<sub>c</sub>



**Figure 4.** Isolated compounds **1-3** from *D. carota* var. *sativa* aerial parts.

56.6 및  $\delta_H$  3.84 (3H, s)의 피크를 통해 methoxy group 이 결합되어 있는 flavonoid 구조일 것이라 예상하였으며, 문헌[15]을 통해 diosmetin (luteolin 4'-methyl ether) 으로 확인되었다. 화합물 **2**는  $\delta_H$  4.72 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz),  $\delta_H$  5.00 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz)에 해당하는 당의 anomeric proton 및 화합물 **1**과 유사한 16개의 피크 외에 12개의 carbon 피크가 더 관찰되는 것으로 보아, 화합물 **1**에 두 개의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였으며, 문헌[16]을 통하여 diosmin (diosmetin 7-O-rutinoside)으로 확인되었다. 화합물 **3**은 21개의 carbon 피크가 관찰되는 것으로 보아, flavonoid 에 6탄당이 결합되어 있는 골격으로 예상하였으며, 문헌[17]을 통해 cynaroside (luteolin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside)임을 확인하였다(Figure 4). 당근의 뿌리는 car-



**Figure 5.** Effects of isolated compounds **1-3** from *D. carota* var. *sativa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds **1-3** for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) in the presence of isolated compounds **1-3**. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

otene, lycopene, phytofluene 등 다종의 carotenoid가 주 성분으로, 그 외에 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, anthocyanidin, umbelliferone, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid 등이 함유되어 있다고 보고되어 있다[18]. 그러나 뿌리 성분과는 다르게 당근 지상부는 cynaroside (**3**)가 주성분으로, 플라보노이드 배당체 화합물들이 다량 함유된 것으로 본 연구를 통해 확인되었다.

### 3.4. 당근 지상부로부터 분리된 화합물의 항염 활성

당근 지상부에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, 화합물 **1-3** 모두 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하는 활성이 우수함을 확인하였다(Figure 5). 분리된 화합물 중 diosmin (**2**)은 치질, 혈관치료제 등으로 사용되고 있는 전문 의약품 성분이고, diosmetin (**1**)은 NO, TNF- $\alpha$ 의 생성 및 iNOS 단백질의 발현을 억제시키는 기전으로 항염 효과가 있으며[19], cynaroside (**3**)는 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성 및 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 억제시키는 기전으로 항염 효과가 있음이 보고되어 있다[20]. 따라서 분리된 화합물에 대한 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았으며, 당근 지상부 EtOAc 분획물의 항염 활성은 이러한 플라보노이드 계열의 화합물, 특히 당근 지상부에 다량 함유된 화합물 **3**에 기인한 것으로 판단된다.



**Table 3.** MIC and MBC Values of Isolated Compounds **1-3** from *D. carota* var. *sativa*

		1 <sup>1)</sup>	2 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>	
S. epidermidis	CCARM	MIC	>1000	>1000	>1000
	3709	MBC	>1000	>1000	>1000
	CCARM	MIC	>1000	>1000	>1000
	3710	MBC	>1000	>1000	>1000
	CCARM	MIC	>1000	>1000	>1000
	3711	MBC	>1000	>1000	>1000
P. acnes	CCARM	MIC	>1000	>1000	1000
	0081	MBC	>1000	>1000	1000
	CCARM	MIC	>1000	>1000	500
	9009	MBC	>1000	>1000	500
	CCARM	MIC	>1000	>1000	250
	9010	MBC	>1000	>1000	250
CCARM	MIC	>1000	>1000	500	
9089	MBC	>1000	>1000	1000	

1) Concentration of compound :  $\mu$ M

### 3.5 당근 지상부로부터 분리된 화합물의 항균 활성

당근 지상부에서 분리된 화합물 **1-3** 에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 MIC 및 MBC를 측정하였으며, 가장 높은 농도를 1000  $\mu$ M로 하여 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실험하였다. 그 결과, 화합물 **3**이 *P. acnes* 균주에 대해 항균 활성이 우수함을 확인하였다(Table 3).

## 4. 결 론

당근(*D. carota* var. *sativa*)의 지상부인 잎, 줄기에 대한 생리활성 및 성분 연구는 많이 알려지지 않았으며, 수확 후 폐기되는 부분인 당근 지상부를 이용하여 화장품 원료 등의 자원으로 활용 가능한지 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

우선 당근 지상부 70% 에탄올 추출물을 극성에 따라 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었으며, 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 기전 연구를 진행하였으며, ELISA를 통해 당근 지상부 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6)의 생성을 감소 시키는 효과가 우

수함을 확인하였다. Western blot 분석법을 이용하여 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현량을 확인한 결과, 당근 지상부 EtOAc 분획물은 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제 시키는 활성이 있었다. 또한 당근 지상부에 대한 항균 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 활성이 나타났으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 활성 성분을 찾고자 EtOAc 분획물에 대해 VLC, Sephadex LH-20 CC 및 재결정을 수행하여 3개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용해 화학구조를 동정하였으며, diosmetin (**1**), diosmin (**2**), cynaroside (**3**)로 확인되었다.

분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, 화합물 **1-3** 모두 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제 시키는 효과가 있었으며, 항균 활성 실험에서는 화합물 **3**이 *P. acnes* 균주에 대해 활성이 우수함을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 당근 지상부 추출물은 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업(No. P0002225, 천연물과 바이오기술을 이용한 민감성 피부 개선 화장품 개발)으로 수행된 연구결과입니다.

## Reference

1. H. S. Lee and M. S. Shin, Antimicrobial effects of *Luffa cylindrica* extract against 4 skin microorganisms, *J. Kor. Soc. Cosmet.*, **21**, 471 (2015).
2. H. Jung, Master's Thesis Dissertation, Chung-Ang Univ., Seoul, Korea (2011).
3. J. C. Harper, An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **51**, 36 (2004).
4. D. M. Thiboutot, Acne. an overview of clinical research findings, *Dermatol. Clin.*, **15**, 97 (1997).
5. S. Nishijima, I. Kurokawa, N. Katoh, and K. Watanabe, The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes*

- and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions, *J. Dermatol.*, **27**, 318 (2000).
6. A. Koreck, A. Pivarcsi, A. Dobozy, and L. Kemeny, The role of innate immunity in the pathogenesis of acne, *Dermatology*, **206**, 96 (2003).
  7. H. S. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2011).
  8. M. S. Kang, H. J. Oh, H. C. Lee, and J. S. Oh, Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, *Journal of Bacteriology and Virology*, **39**, 11 (2009).
  9. J. Y. Choi, S. Y. Song, and H. H. Lee, Antibacterial and anti-inflammatory activity of *Corni fructus* ethanol extract in *Propionibacterium acnes*, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**, 623 (2015).
  10. D. H. Kim, S. J. Park, J. Y. Jung, S. C. Kim, and S. H. Byun, Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedoktang in LPS-activated macrophage cells, *Korean J. Herbol.*, **24**, 39 (2009).
  11. M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett, Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**, 24 (1996).
  12. P. J. Bames and F. Y. Liew, Nitric oxide and asthmatic inflammation, *Immunol. Today*, **16**, 128 (1995).
  13. T. J. Guzik, R. Korbout, and T. Adamek-guzik, Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, *J. Physiol Pharmacol.*, **54**, 469 (2003).
  14. D. Bishop-Bailey, S. Calatayud, T. D. Warner, T. Hla, and J. A. Mitchell, Prostaglandins and the regulation of tumor growth, *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol.*, **21**, 93 (2002).
  15. Y. Liu, C. Zhang, S. Wei, H. Cui, and H. Huang, Compounds from the subterranean part of Johnsongrass and their allelopathic potential, *Weed Biol. Manag.*, **11**, 160 (2011).
  16. M. M. El-Domiaty, M. Wink, M. M. A. Aal, M. M. Abou-Hashem, and R. H. Abd-Alla, Antihepatotoxic activity and chemical constituents of *Buddleja asiatica* Lour, *Z. Naturforsch.*, **64**, 11 (2009).
  17. S. Shrestha, D. Y. Lee, J. H. Part, J. G. Cho, W. D. Seo, H. C. Kang, Y. J. Jeon, S. W. Yeon, M. H. Bang, and N. I. Baek, Flavonoid glycosides from the fruit of *Rhus parviflora* and inhibition of cyclin dependent kinases by hyperin, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **55**, 689 (2012).
  18. N. Y. Ko, Master's Thesis Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (2011).
  19. M. Comalada, I. Ballester, E. Bailon, S. Sierra, J. Xaus, J. Galvez, F. Sanchez de Medina, and A. Zarzuelo, Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship, *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 1010 (2006).
  20. C. M. Park and Y. S. Song, Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- $\kappa$ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells, *Nutr. Res. Pract.*, **7**, 423 (2013).