

## 현초 추출물의 항산화 활성 및 항노화에 관한 연구

이근하·박수남<sup>†</sup>

서울산업대학교 정밀화학과  
(2007년 8월 30일 접수, 2008년 1월 23일 채택)

### Antioxidative Activities and Antiaging Effects of *Geranium nepalense* Extracts

Keun Ha Lee and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea  
(Received August 30, 2007; Accepted January 23, 2008)

**요약:** 본 연구에서는 현초 추출물의 항산화, 성분 분석 및 elastase와 tyrosinase 저해효과에 관한 실험을 수행하였다. Free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물(15.0 µg/mL) < ethylacetate 분획(4.5 µg/mL) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(0.9 µg/mL) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용하여 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 현초 추출물의 총항산화능은 50 % 에탄올 추출물(OSC<sub>50</sub>, 0.23 µg/mL) < ethylacetate 분획(0.16 µg/mL) < aglycone 분획(0.04 µg/mL) 순으로, aglycone 추출물에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 현초 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 현초 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 50 µg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획에서 50 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub>이 676.7 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. Aglycone 분획은 tyrosinase와 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 70.0, 19.9 µg/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다. 현초 추출물 중 ethylacetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC에서 2개의 띠로 분리되었으며 HPLC 실험(370 nm)에서도 2개의 피크로 분리되었다. 분리된 2가지 성분은 quercetin, kaempferol이었으며, 그들의 성분비는 각각 15.3 %, 82.8 %로 kaempferol의 함량이 가장 큰 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 현초 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 가리키며, 현초 성분에 대한 분석과 ethylacetate분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 큰 elastase 저해활성으로부터 주름개선 기능성 화장품원료로서도 응용 가능성이 있음을 시사한다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects and inhibitory effects on elastase and tyrosinase of *Geranium nepalense* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) of extract/fractions of *Geranium nepalense* were in the order: 50 % ethanol extract (15.0 µg/mL) < ethylacetate fraction (4.5 µg/mL). < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (0.9 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of some *Geranium nepalense* 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 order of ROS scavenging activities were 50 % ethanol extract (OSC<sub>50</sub>, 0.23 µg/mL) < ethylacetate fraction (0.16 µg/mL) < deglycosylated flavonoid fraction (0.04 µg/mL). Deglycosylated flavonoid fraction showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Geranium nepalense* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Geranium nepalense* extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner, particularly deglycosylated flavonoid fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ<sub>50</sub>, 676.7 min at 50 µg/mL). The inhibitory effect of aglycone fraction on tyrosinase (IC<sub>50</sub>, 70.0 µg/mL) and elastase (IC<sub>50</sub>, 19.9 µg/mL) was very high. Aglycone fractions obtained from the deglycosylation reaction of ethyl-

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

acetate fraction among the *Geranium nepalense* extracts, showed 2 bands in TLC and 2 peaks in HPLC experiments (370 nm). Two components were identified as quercetin (composition ratio, 15.3 %), kaempferol (82.8 %). These results indicate that extract/fractions of *Geranium nepalense* can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging  $^1\text{O}_2$  and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. And component analysis of *Geranium nepalense* extract and inhibitory activity on elastase of the aglycone fraction could be applicable to new functional cosmetics for smoothing wrinkles.

**Keywords:** *Geranium nepalense*, flavonoid, antioxidative, elastase, cosmetics

## 1. 서 론

태양광선에 노출된 피부에서는 자외선의 작용으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 따라서, ROS로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 실질적으로 증가하고 있다. ROS란  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 같은 비라디칼종과  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ 와 같은 산소중심의 라디칼들 그리고 생체 성분과 ROS와의 반응에서 유래된  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROOH}$  및  $\text{ROCl}$  등이 포함된다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 생체 내에서 과잉의 활성산소가 생성되면 돌연변이, 염증, 세포살상, 발암과 피부노화 등이 나타난다[1-7].

광노화는 특히 태양광선에 노출되는 신체부위에서 자외선에 의해 야기될 수 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 ROS가 생성된다. 피부는 복잡한 항산화 방어망이 발달되어 있어서 ROS에 대하여 보호작용을 나타낸다. 하지만 계속된 활성산소의 공격은 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어계를 붕괴시킨다. 결과적으로 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분들은 ROS에 의한 작용으로 손상을 받게 된다. 특히 광노화는 ROS에 기인된 진피 결합조직의 심각한 손상과 관련되어 있다. 이러한 ROS의 생성은 주로 광증감제에 의해 이루어진다. 광증감반응은 Type I 혹은 Type II 형태로 일어나며, Type I 반응의 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, 반면에 Type II 반응은  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ , 그리고  $^1\text{O}_2$ 을 포함하는 ROS를 생성시킨다. 이러한 ROS는 생체 내에서 superoxide dismutase (SOD), catalase 혹은 Fe(II) 등의 촉매 작용으로 상호 전환이 가능하다[8].

$^1\text{O}_2$ 은 수명이 짧은 특히 해로운 분자이며, 주로 광증감 반응으로 피부에서 생성되고, 광노화에 있어서 핵심적 역할을 한다.  $^1\text{O}_2$ 은  $\cdot\text{OH}$ 과 함께 ROS 중에서 반응성이 가장 큰 활성종으로 생체 내에는 이들 활성산소를 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않으며 특히 피부노화를 주

도하는 것으로 보고되고 있다. 광증감반응 외에도  $^1\text{O}_2$  생성은 사람 백혈구인 호중구와 호산구에서도 확인되었다. 사람 피부 세포에 있어서 지질과산화물의 생성, 단백질 산화 및 DNA 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포 사멸이나 유전자 활성화에도  $^1\text{O}_2$ 이 포함되는 것으로 기술되고 있다[9].

특히 사람 피부 섬유아세포에서  $^1\text{O}_2$ 이 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다고 보고되고 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1\text{O}_2$ 의 중요한 역할을 시사하는 것이다.  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에[13-16] 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소는 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[16-20].

현초(*Geranium nepalense*)는 쥐손이풀과로 황해 이남에 자생하며, 전초가 약용으로 이용되는 식물이다[21]. 현초는 향균성 식물로서 많은 연구가 이루어져 있으나[22-24], 아직 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 각종 활성산소종( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  등)이 생성되는 계( $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계)에서 각종 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 또한 현초 추출물을 이용한 화장품에서의 항노화 기능성 소재로서 가능성에 관한 연구 역시 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 현초 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 손상에 대한 보호활성, 총 항산화능, 이들 추출물(혹은 분획)의 성분 분석, 그리고 미백 및 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase, elastase 활성 저해 효과를 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 현초의 항산화능을 비교 평가하고 활성산소에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서

가능성이 있는지를 검토하였다.

## 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, HPLC는 Dionex (Germany)사, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic 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  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 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,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , Trizma base, HCl 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

기질로 사용된 L-tyrosine, *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (from Mushroom, Sigma, 50,000 units, 12.7 mg solid, 3,960 units/mg solid), elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. Flavonoid의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm)로 Merck (USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용한 현초 재료는 2006년 9월 국내 약초시장에서 건조시킨 것을 구입하였다.

### 2.2. 현초의 플라보노이드 분획 추출

건조된 현초 500 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 5 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethylacetate 분획을 감압 농축하여 파우더를 얻었다.

Ethylacetate 분획으로부터 aglycone 제조 : ethylacetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을

이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 만들고 이를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethylacetate 가용분 일정량에  $H_2SO_4$  및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethylacetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 현초 추출물의 항산화 효과 측정

#### 2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 현초 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 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. 소거활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>,  $\mu g/mL$ )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 $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계는 각종 ROS (reactive oxygen species,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$  그리고  $H_2O_2$ )를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다.  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 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  $\mu L$  및 5 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  10  $\mu L$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu L$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발

광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40  $\mu$ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광 측정 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

#### 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호효과 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 rpm에서 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 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. 현초 추출물의 광용혈 억제효과

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-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu$ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후

15 min 동안 광조사 하였다. 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. 현초 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 32 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 min 까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

#### 2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosin으로부터 멜라닌 생성과정에는 tyrosinase가 핵심효소로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-Tyrosin (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 배양하였다.

0.1 mL tyrosinase 용액(1,250 units/mL)을 반응혼합물에 가하고 37 °C에서 10 min 동안 항온배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에서 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 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제에 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 Units/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100  $\mu$ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitro-anilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1.300  $\mu$ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

2.7. TLC 및 HPLC를 이용한 현초 추출물의 플라보노이드 분석

현초 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 aglycone 분획을 얻어 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Millopore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC분석을 위한 시료로 이용하였다.

TLC 분석에서 전개용매는 benzene : pyridine : formic acid = 72 : 18 : 10 (v/v)를 사용하였다. 성분확인 은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R<sub>f</sub>치와 발색을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인 하였다.

HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

2.8. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 현초 추출물의 수득율

3.1.1. 현초(*Geranium nepalense*) 추출물

건조한 현초 500 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 5 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득율은 12.50 %였다. Ethylacetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethylacetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득율이 약 1.60 %이었으며, ethylacetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득율은 0.16 %였다. Ethylactate 분획은 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 ethylacetate 분획 플라보노이드에서 당을 제거한 플라보노이드가 존재한다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethylacetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Deglycosylated Fraction from *Geranium nepalense* (GN) Extract

Column	Luna 5 $\mu$ C18 (L: 250 nm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2 % acetic acid in H <sub>2</sub> O : 0.5 % acetic acid in 50 % acetonitrile solution (70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for deglycosylated fraction

3.2. 현초 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 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 자유 라디칼인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

현초(*Geranium nepalense*) 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol, quercetin 및 rutin의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 현초 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>가 15.0  $\mu$ g/mL, ethylacetate 분획은 4.5  $\mu$ g/mL, aglycone 분획은 0.9  $\mu$ g/mL을 나타냈다.

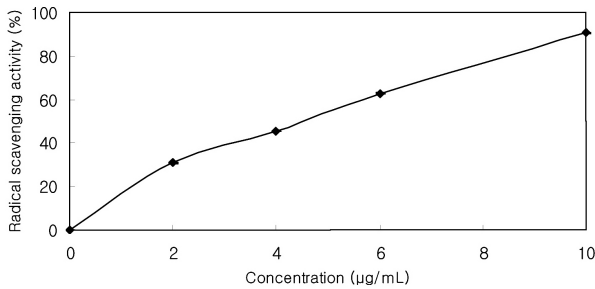
Aglycone 분획의 free radical 소거활성은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol (FSC<sub>50</sub>, 9.0  $\mu$ g/mL)보다도 큼을 보여주고 있다. 본 연구에서 화장품 원료로 사용하고자 하는 ethylacetate 분획 역시 큰 활성(FSC<sub>50</sub>, 4.5  $\mu$ g/mL)을 나타내고 있다. 그 외에 비교물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid는 free radical 소거활성은 3.8  $\mu$ g/mL, 플라보노이드 비교물질로 사용되는 quercetin은 3.4  $\mu$ g/mL, 그의 배당체인 rutin은 5.0  $\mu$ g/mL로 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. Figure 2 및 Figure 3에서 보는 바와 같이 0.01, 0.1, 0.5 및 1  $\mu$ g/mL의 농도범위에서 농도 의존적으로 화학발광을 감소시켰다.

**Table 2.** Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Geranium nepalense* and References

Compounds	Scavenging activity (FSC <sub>50</sub> , µg/mL)
<i>Geranium nepalense</i> extract (50 % EtOH)	15.0 (± 0.5)
<i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	4.5 (± 0.1)
Deglycosylated <i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	0.9 (± 0.02)
L-Ascorbic acid	3.8 (± 0.8)
(+) - $\alpha$ -Tocopherol	9.0 (± 2.9)
Quercetin	3.4 (± 0.2)
Rutin	5.0 (± 0.2)

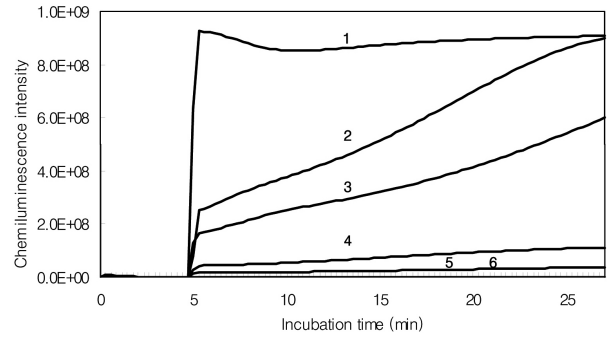
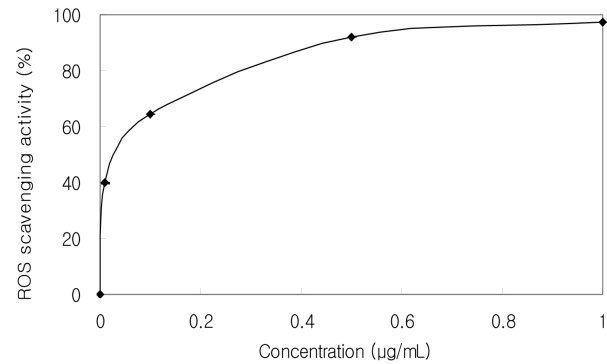
**Figure 1.** Free radical scavenging activity of *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction).

활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 현초 50 % 에탄올 추출물의 활성은 0.23 µg/mL, ethylacetate 분획, 0.16 µg/mL, ethylacetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 0.04 µg/mL로 나타났다. 이로부터 ethylacetate 추출물 및 aglycone의 활성산소 소거활성이 매우 큼을 알 수 있다(Table 3). 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)보다 그 이상의 활성을 보였다.

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

현초 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Table 4 및 Figure 4에 나와 있다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은 세포보호활성이 클수록  $\tau_{50}$ 이 크게 나타난다. 현초 추출물(50 % 에탄올 추출물)의 세포보호 효과는 1 ~ 100 µg/mL의 농도범위에서 거의 농도 의존적( $\tau_{50}$ 이 각각 32.0, 34.2, 49.0, 66.8 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 한편

**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction) in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay. [EDTA] = 50 µM, [FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O] = 25 µM, [luminol] = 1.4 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 3.0 mM, concentrations of deglycosylated *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction): 1: control, 2: 0.01 µg/mL, 3: 0.1 µg/mL, 4: 0.5 µg/mL, 5: 1 µg/mL, 6: blank.**Figure 3.** Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated fraction from *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction).

ethylacetate 분획의 경우는 세포보호 활성이 미약한 것으로 나타났으나 당을 제거시킨 분획의 세포보호효과는 매우 크게 나타났다. 당을 제거시킨 분획의 경우 1 ~ 50 µg/mL의 농도 범위에서 농도 의존적으로 세포보호 활성을 나타냈다. 이 중 50 µg/mL의 농도에서 가장 큰 세포보호효과(676.7 min)를 보여주었고, 농도가 100 µg/mL에서 613.3 min으로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출물의 농도가 클 때는 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용)을 나타낼 수 있는 물질이 존재할 가능성도 생각할 수 있다.

비교물질로 사용한 플라보노이드 배당체인 rutin은 10 µg/mL에서 40.5 min, quercetin은 동일농도에서 147.0 min을 나타내었다. Quercetin이 quercetin 배당체인

**Table 3.** Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *Geranium nepalense* and References

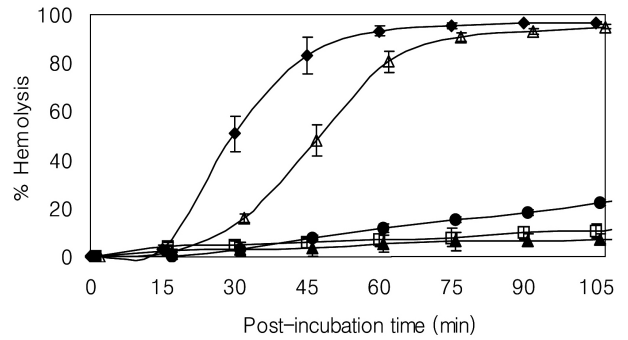
Compounds	Scavenging activity (OSC <sub>50</sub> , µg/mL)
<i>Geranium nepalense</i> extract (50 % EtOH)	0.23 (± 0.08)
<i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	0.16 (± 0.05)
Deglycosylated <i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	0.04 (± 0.03)
L-Ascorbic acid	1.50 (± 0.85)
Quercetin	0.05 (± 0.02)
Rutin	0.13 (± 0.12)

rutin보다도 세포보호 활성이 훨씬 큼을 보여주고 있다. 이는 rutin보다도 quercetin이 세포막에의 접근과 세포막 내로의 침투가 더 용이함을 나타내며 이는 세포막에서 일어나는 활성산소에 의한 인지질의 산화와 세포막 파괴를 플라보노이드 aglycone인 quercetin이 보다 더 효율적으로 억제함을 보여주고 있다. Rutin은 2개의 당(rutinose)이 결합한 형태로 rutin 분자 주위에서 큰 물결질이 형성되어 세포막 내로의 접근에 상당한 어려움이 있어 세포보호 활성도 낮게 나타난 것으로 판단되어 진다. 비교물질에서와 같이 주성분들이 플라보노이드 배당체인 현초 ethylacetate 분획의 세포보호 효과는 10 µg/mL에서 40.5 min이고, 당이 제거된 분획(aglycone)은 동일 농도에서 159.3 min으로 플라보노이드 aglycone이 세포막으로의 침투가 용이해 세포보호 효과가 큼을 보여주고 있다. 이는 비타민 E 성분인 (+)-α-tocopherol보다도 세

**Table 4.** Effects of *Geranium nepalense* Extracts and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, µg/mL	τ <sub>50</sub> (half time of hemolysis <sup>1)</sup> )			
	1	10	50	100
<i>Geranium nepalense</i> extract (50 % EtOH)	32.0 (± 4.4)	34.2 (± 1.4)	49.0 (± 1.0)	66.8 (± 6.3)
<i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	42.2 (± 3.8)	40.5 (± 1.3)	50.3 (± 2.3)	45.5 (± 2.8)
Deglycosylated <i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	47.7 (± 2.9)	159.3 (± 5.1)	676.7 (± 60.3)	613.3 (± 45.1)
Rutin	35.2 (± 1.4)	40.5 (± 10.4)	-	-
Quercetin	51.0 (± 3.0)	147.0 (± 15.0)	-	-
(+)-α-Tocopherol	-	38.0 (± 1.8)	74.3 (± 6.4)	-

<sup>1)</sup>Control, τ<sub>50</sub> = 32.0 ± 0.6 min

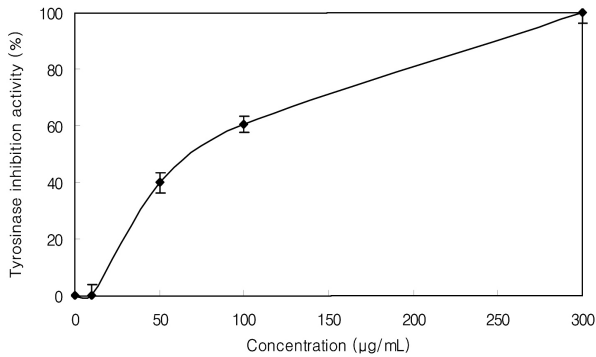


**Figure 4.** Effect of deglycosylated *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction) on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time : 15 min, pre-incubation time: 30 min, [rose-bengal] = 1.5 µM, concentrations of deglycosylated *Geranium nepalense* extract (EtOAc fraction) : ◆-◆: control, △-△: 1 µg/mL ●-●: 10 µg/mL, □-□: 50 µg/mL, ▲-▲: 100 µg/mL.

**Table 5.** Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethylacetate Fraction of *Geranium nepalense* Extract (EtOAc fraction) on Tyrosinase

Compounds	Inhibition (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
Deglycosylated fraction from <i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	70.0 (± 3.7)
<i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	350.1 (± 4.5)
Arbutin	105.1 (± 3.3)

세포보호효과가 훨씬 큼을 알 수 있었다.



**Figure 5.** Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from EtOAc fraction of *Geranium nepalense* extract on tyrosinase.

### 3.4. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosin으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosin에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다. 따라서 tyrosinase의 활성억제 작용은 미백용 화장품 원료로서 갖추어야 할 항목이 되고 있다.

현초 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성( $IC_{50}$ )이  $70.0 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 그 외에 현초의 에탄올 추출물(50 % EtOH)과 ethylacetate 층에서는 큰 활성을 나타내지는 못했다. 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin은 저해 활성은  $105.1 \mu\text{g/mL}$ 이었다. 따라서 현초 추출물의 당이 제거된 aglycone 분획은 tyrosinase 저해 활성이 arbutin에 비해 매우 큼을 알 수 있다. 당이 제거된 추출물 분획은 피부 침투도 용이할 것으로 미루어 볼 때 이를 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Table 5, Figure 5).

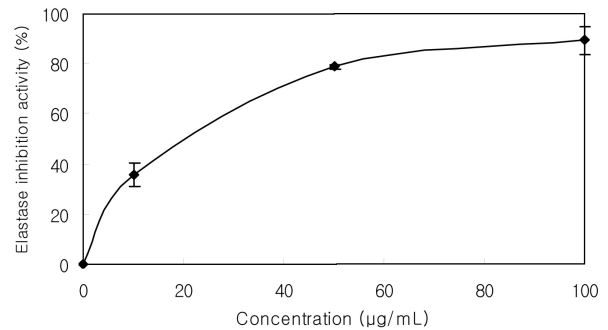
### 3.5. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 MMPs는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있다. 그래서 피부의 탄력감소 및 주름생성에의 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

현초 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 elastase 저해활성( $IC_{50}$ )이  $19.9 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 큰 활성을 나타내었다(Table 6, Figure 6). 비교물질로 사용한 kaempferol과 quercetin은 각각  $IC_{50}$ 이 13.6

**Table 6.** Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethylacetate Fraction of *Geranium nepalense* extract and Reference Compounds on Elastase

Compounds	Inhibition ( $IC_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$ )
Deglycosylated fraction from <i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	19.9 ( $\pm 2.7$ )
<i>Geranium nepalense</i> extract (EtOAc fraction)	39.5 ( $\pm 3.4$ )
Kaempferol	13.6 ( $\pm 2.4$ )
Quercetin	6.1 ( $\pm 0.9$ )



**Figure 6.** Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from EtOAc fraction of *Geranium nepalense* extract on elastase.

$\mu\text{g/mL}$  및  $6.1 \mu\text{g/mL}$ 이었다.

### 3.6. 현초 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

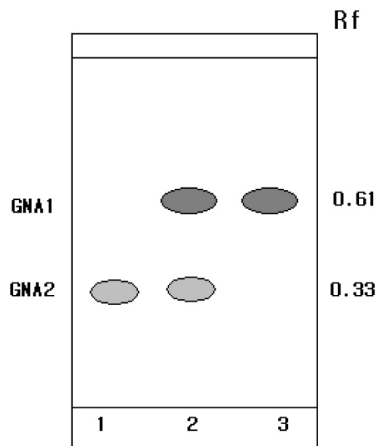
#### 3.6.1. 현초 추출물의 TLC 성분 분석

현초 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 7에 나타내었다. Figure 7은 현초 추출물 중 ethylacetate 분획을 당 가수분해시켜서 얻은 당이 제거된 분획(aglycone 분획)의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone 분획은 2개의 띠(GNA1 ~ GNA2)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 GNA1은 kaempferol, GNA2는 quercetin임을 알 수 있었다.

#### 3.6.2. 현초 추출물의 HPLC 성분 분석

현초 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻어진 당이 제거된 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 8에 나타내었다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 7의 TLC 크로마토그램과 검량곡선을 이용하여 Figure 8의 각각의 피크를 분석하여 본 결과 peak 1은 quercetin, peak 2는 kaempferol임을 확인하였고 2가지





**Figure 7.** TLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Geranium nepalense* (GN) extract (EtOAc fraction) and references 1: quercetin, 2: deglycosylated fraction (EtOAc fraction), 3: kaempferol. Eluent system: benzene : pyridine : formic acid = 72 : 18 : 10 (v/v).

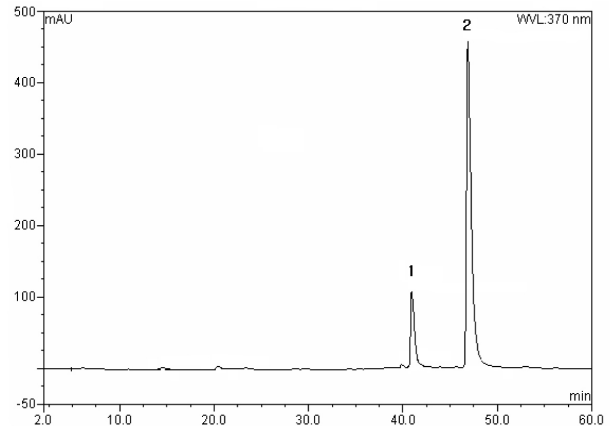
플라보노이드의 조성비는 quercetin (peak 1) 15.3 %, kaempferol (peak 2) 82.8 %로 나타났다.

Aglycone 분획에 kaempferol의 조성비가 큰 것은 ethylacetate 분획 중에 많이 포함되어 있는 kaempferol의 배당체가 산 가수분해 반응을 통한 당 제거가 이루어져 많은 양의 kaempferol이 존재하는 것으로 판단된다.

또한 이러한 결과는 현초 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획의 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 큰 것에 영향을 준 것으로 판단된다. 또한 현초 추출물의 aglycone 분획의 주성분인 kaempferol은 사람 표피 세포주에서 hyaluronan synthase mRNA를 발현시켜 농도 의존적으로 hyaluronan (HA) 합성을 증가시킨다는 보고도 있다[25]. 일반적으로 HA의 양은 노화(또는 광노화)와 함께 감소되며, 피부 탄력저하 및 주름생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다[26,27]. 따라서 이러한 결과를 통하여 현초 추출물을 대상으로 주름개선 작용이 있는 항노화 기능성 소재로서 가능성이 있는지 알아보기 위한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

#### 4. 결 론

1) 현초 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 12.50 %, ethylacetate 분획의 경우 1.60 %이었다. Ethylacetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.16 %였다.



**Figure 8.** HPLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Geranium nepalense* (GN) extract (EtOAc fraction) 1: quercetin, 2: kaempferol.

2) 현초 추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물 15.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethylacetate 분획 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethylacetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

3) 현초 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물 0.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethylacetate 분획, 0.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethylacetate 분획에서 당 제거한 aglycone 추출물은 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 aglycone 추출물이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 현초 추출물은  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위(1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 농도-의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 ethylacetate 분획에서 당 제거한 aglycone 추출물은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 676.7 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

5) 현초 추출물 중 aglycone 분획은 tyrosinase와 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 70.0, 19.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 매우 큰 활성을 나타내었다.

6) 현초 추출물 중 ethylacetate 분획에 대하여 당제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 2개의 띠(GNA1 ~ GNA2)를 나타내었고, 이 때 GNA1, GNA2는 각각 kaempferol, quercetin로 확인하였다.

7) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 2개의 피크를 나타냈고, 그 용리 순서는 quercetin, kaempferol이었으며, 조성비는 quercetin 15.3 %, kaempferol 82.8 %로 kaempferol의 함량이 가장 큰 것으로 나타났다.

이상의 결과들은 현초 추출물의 항산화 작용과 더불어

현초 성분에 대한 분석과 ethylacetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 큰 tyrosinase, elastase 저해활성으로부터 미백 및 주름개선 기능성 화장품원료로서 응용가능성이 큼을 시사한다.

## 감 사

본 연구 논문은 (재) 제주하이테크 산업진흥원에서 시행한 “2005년도 제주생물자원공동연구개발사업”에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 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).
- K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
- C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85, Academic press, New York (1976).
- S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
- S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
- S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
- S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
- K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
- R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
- G. F. Vile and R. M. Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
- K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
- M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
- A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
- A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
- L. H. Kligman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: a contrast to UVB effects, ed. F. Urbach, 209, Valdemar, Overland Park (1992).
- J. W. Choi, S. I. Kim, S. M. Jeon, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
- H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of antioxidant potential of extract/fractions of *Equisetum areense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
- H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum areense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
- S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative potencies of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).

20. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 181 (2007).
21. M. H. Jung and M. Y. Lee, Effect of *Geranii herba* water extract on gastric secretion and experimental ulceration in rats, *J. Korean Pharm. Sci.*, **10**(4), 1 (1980).
22. Y. H. Choi, O. H. Kwon, and J. G. Moon, Dyeability and antibacterial activity of the fabrics with Elm-bark extracts, *J. Kor. Soc. Dyers & Finishers*, **15**, 140 (2003).
23. J. H. Kim and H. J. Yoo, Dyeability and antibacterial activity of fabrics using balsamine extracts, *J. Kor. Soc. Dyers & Finishers*, **15**, 15 (2003).
24. K. J. Yong, I. H. Kim, and S. W. Nam, Antibacterial and deodorization activities of cotton fabrics by amur cork tree extracts, *J. Kor. Soc. Dyers & Finishers*, **11**, 9 (1999).
25. S. H. Kim, G. W. Nam, B. Y. Kang, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang, The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(1), 97 (2005).
26. R. Fleischmajor, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glucosaminoglycans and aging, *Biochem. Biophys. Acta.*, **279**(2), 265 (1972).
27. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**(1), 127 (1987).