

여뀌 추출물의 항산화 및 항노화에 관한 연구

김 은 희 · 김 정 은 · 박 수 남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2009년 12월 3일 접수, 2009년 12월 9일 수정, 2009년 12월 11일 채택)

Antioxidative and Antiaging Effects of *Persicaria hydropiper* L. Extracts

Eun Hee Kim, Jung Eun Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology,
172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received December 3, 2009; Revised December 9, 2009; Accepted December 11, 2009)

요약: 본 연구에서는 여뀌 추출물의 항산화, 미백, 항주름 효과를 통한 항노화 활성을 조사하였다. 여뀌 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 분획물 중 ethyl acetate 분획에서 5.23 µg/mL로 가장 큰 활성을 나타내었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 여뀌 추출물의 총 항산화능은 분획물 중 ethyl acetate 분획(0.40 µg/mL)이 큰 활성을 나타내었다. 여뀌 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 여뀌 추출물의 경우 1 ~ 10 µg/mL의 농도에서 광용혈을 억제하였다. 미백 및 주름억제 효과측정으로는 각각 tyrosinase 및 elastase의 활성 저해 효과를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 aglycone 분획(8.90 µg/mL)에서, elastase의 활성 저해 효과(IC₅₀)도 aglycone 분획(2.37 µg/mL)에서 가장 큰 저해활성을 나타냈다. 여뀌 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획에 대한 실험 결과로부터 항산화, 항노화 화장품 원료로서의 가능성을 확인하였다.

Abstract: In this study, we investigated the antioxidative activity and inhibitory effects on elastase and tyrosinase of *Persicaria hydropiper* L. extracts. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC₅₀) of ethyl acetate fractions of *Persicaria hydropiper* L. was 5.23 µg/mL. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of some *Persicaria hydropiper* L. extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol - dependent chemiluminescence assay. The ROS scavenging activities (OSC₅₀) of ethyl acetate fractions of *Persicaria hydropiper* L. was 0.40 µg/mL. The protective effects of extract / fractions of *Persicaria hydropiper* L. on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Persicaria hydropiper* L. extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 10 µg/mL). Inhibitory effects (IC₅₀) on tyrosinase of aglycone fraction of *Persicaria hydropiper* L. extracts was 8.90 µg/mL. Inhibitory effects (IC₅₀) on elastase of aglycone fraction of *Persicaria hydropiper* L. extracts was 2.37 µg/mL. These results indicate that extract / fractions of *Persicaria hydropiper* L. can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by anti-oxidative activity and protect cellular membranes against ROS. *Persicaria hydropiper* L. extract / fractions could be used as a new cosmeceutical for whitening and anti-wrinkle products.

Keywords: *Persicaria hydropiper*, flavonoid, antiaging, antioxidant, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인(자외선, 공해, 산화제)에 의한 빈번한 접촉에 기인한 산화적 스트레스에 민감하다. 산화적 스트레스는 주 원인이 태양 자외선(UVA 및 UVB)에 의한 노출이며, 자외선에 의해 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 피부의 항산화제를 압도할 때 일어난다. ROS란 반응성이 매우 큰 1O_2 및 $\cdot OH$ 를 비롯하여 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등을 포함한다[1,2]. 이들은 포르피린과 같은 광증감제에 의한 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다[3]. 1O_2 및 $\cdot OH$ 를 포함하는 ROS는 피부 광손상을 주도하며, 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속시킨다[4-7].

사람 피부세포에 있어서 지질 및 생체 고분자 물질 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA-의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 ROS가 포함되는 것으로 알려져 있다. 콜라겐은 피부 진피 층의 매트릭스 성분 중 가장 많은 성분으로 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 1O_2 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 1O_2 이 매개할 수 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 1O_2 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. 1O_2 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[17-21].

여뀌(*Persicaria hydropiper*)는 마디풀목 마디풀과의 쌍떡잎 식물로, 원산지는 일본 및 중국이며, 주로 북반구의 열대지방 및 온대지역의 냇가와 습지의 야생지역에 분포하고 있다[22]. 여뀌의 건조한 잎의 추출물의 주성분으로는 quercetin 3-O- β -L-rhamnoside (quercitrin), kaempferol-3-glucoside, 6-hydroxy-apigenin, galloyl kaempferol 3-glucoside, scutillarein, 6-hydroxyluteolin, 6-hydroxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- β -D-glucuronide, galloyl quercetin, quercetin 등이 함유된 것으로 보고되었다[23]. 이러한 플라보노이드가

함유된 여뀌는 항산화 활성과 지질과산화 억제 작용을 하는 것으로 보고되고 있고[24], 또한 항균작용 및 지혈작용을 한다[22].

하지만 여뀌 추출물을 이용한 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 등)가 생성되는 계(Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계)에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 우리나라 여뀌를 구입하여 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능, 미백과 관련 있는 tyrosinase와 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 측정하였고, 항산화 및 항노화 활성을 가지는 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지 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, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- α -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, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F₂₅₄ (0.2 mm)로 Merck (USA)사에서 구입하였다. 플라보노이드 비교물질로 사용한 quercetin, kaempferol,

quercitrin, hyperin, isoquercitrin은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 실험 재료인 여뀌는 2008년 6월경 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 여뀌의 플라보노이드 분획 추출

건조된 여뀌 200 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H₂SO₄ 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 여뀌 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 여뀌 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, FSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)
철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hy-

droxyl radical (·OH)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정 할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 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 µL 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 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, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

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

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate 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 0.6이

었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 여뀌 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 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 $^{\circ}$ C 항온실에서 행하였다. 여뀌 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 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.

$$\text{Relative protective effect} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}} \times 100$$

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 $^{\circ}$ 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(IC₅₀, μ 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 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris HCl (pH 8.0) 0.13 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μ L에 측정시료용액 7.5 μ L와 buffer 92.5 μ L를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M Tris HCl buffer 1,300 μ 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. 여뀌 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

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

여뀌(*P. hydropiper*) 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 1과 같다. 여뀌 추출물은 50% 에탄올 추출물인 경우 FSC₅₀이 8.15 μ g/mL, ethyl acetate 분획은 5.23 μ g/mL, aglycone 분획은 6.25 μ g/

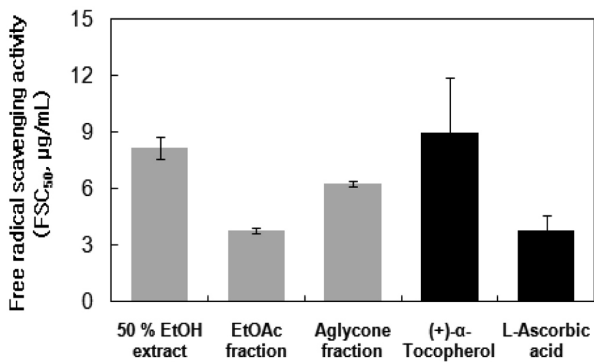


Figure 1. Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *P. hydropiper* L. and standards.

mL을 나타냈다. Ethyl acetate 분획과 aglycon 분획은 비교 물질인 (+)-α-tocopherol과 비교했을 때 free radical 소거활성이 큰 것으로 나타내었다. 비교 물질로 (+)-α-tocopherol은 8.98 µg/mL이었다.

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Aglycon 분획의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 Figure 2에서와 같이 1.12 µg/mL이었으며, 50 % 에탄올 추출물은 2.33 µg/mL, ethyl acetate 분획 0.40 µg/mL로 나타났다. 따라서 ethyl acetate 분획의 총항산화능은 50 % 에탄올 추출물이나 aglycon 분획보다 큼을 보여주었다. 또한 Ethyl acetate 분획과 aglycon 분획 추출물은 비교 물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다 큰 활성을 나타내었다.

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

여뀌 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정한 결과가 Table 1 및 Figures 3, 4에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 여뀌의 aglycone 분획은 1, 2.5, 5, 10 µg/mL의 농도에서 τ₅₀이 각각 144.60, 345.0, 391.67, 393.93 min으로 세포 파괴를 억제하였고, 위의 결과에서 보듯이 10 µg/mL의 농도에서 가장 큰 세포보호 효과(393.93 min)를 보여주었다. Ethyl acetate 분획의 경우 38.83, 108.05, 250.9, 327.50 min, 50 % 에탄올 추출물의 경우는 43.87, 60.03, 105.40, 287.50

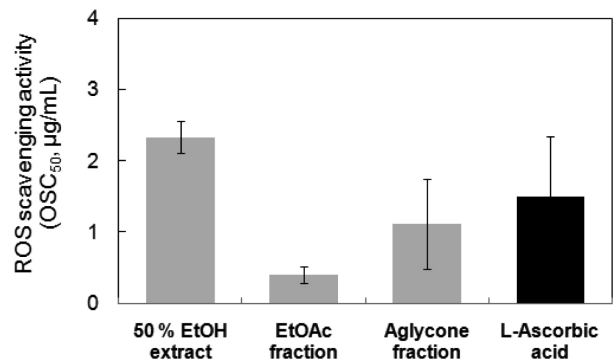


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *P. hydropiper* L. extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

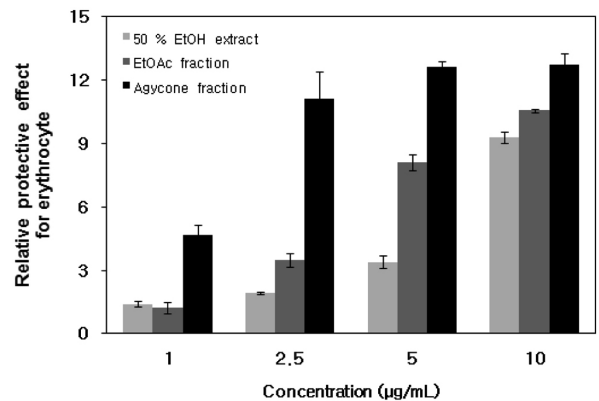


Figure 3. Cellular protective effects of *Persicaria hydropiper* L. extracts against ¹O₂ induced photohemolysis of human erythrocytes, relative protective effect = sample τ₅₀/control τ₅₀ (Control = 31.0 ± 1.0 min).

min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었지만, aglycone 분획에 비해 낮은 효과를 나타내었다.

따라서 세포보호 효과는 10 µg/mL에서 50 % 에탄올 추출물(τ₅₀, 287.50 min) < ethyl acetate 분획(327.50) < 당이 제거된 분획(393.93) 순으로 증가하였다. 1 ~ 10 µg/mL 농도에서 여뀌 추출물의 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)-α-tocopherol과 비교할 수 없을 정도의 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

3.3. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정에서, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데

Table 1. Effects of Extracts from *P. hydropiper* and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)			
	1	2.5	5	10
<i>P. hydropiper</i> L. extract (50 % EtOH)	43.87 \pm 3.85	60.03 \pm 1.39	105.40 \pm 9.00	287.50 \pm 8.50
<i>P. hydropiper</i> L. extract (EtOAc fraction)	38.83 \pm 8.17	108.05 \pm 10.3	250.9 \pm 11.7	327.50 \pm 2.50
Deglycosylated fraction from <i>P. hydropiper</i> L. extract (EtOAc fraction)	144.6 \pm 15.6	345.0 \pm 40.0	391.67 \pm 7.73	393.93 \pm 16.59
Rutin	35.20 \pm 1.40	-	-	40.50 \pm 10.44
(+)- α -Tocopherol	-	-	-	38.00 \pm 1.80

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

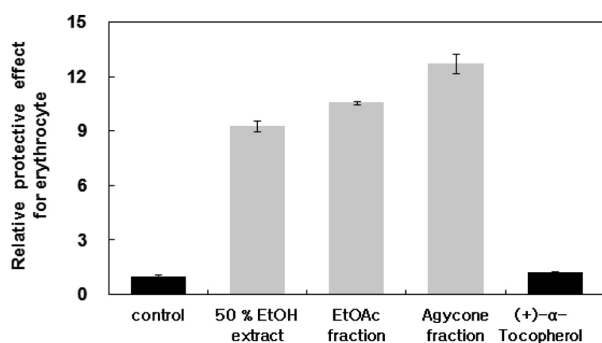


Figure 4. The effect of extracts and fractions from of *Persicaria hydropiper* L. and (+)- α -tocopherol at 10 $\mu\text{g/mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes, relative protective effect = sample τ_{50} /control τ_{50} .

관여한다.

여뀌 추출물 중 ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 추출물은 tyrosinase 저해활성(IC_{50})이 8.90 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. Ethyl acetate 분획의 경우에도 tyrosinase 저해활성(IC_{50})이 22.80 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해활성 226.88 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해서도 훨씬 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다. 따라서 당이 제거된 추출물과 ethyl acetate 분획 등을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 5).

3.4. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부 노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

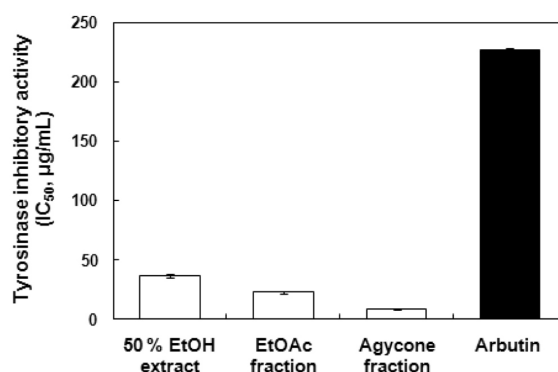


Figure 5. The effect of extracts and fractions from of *Persicaria hydropiper* L. and reference on tyrosinase.

여뀌 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 elastase 저해활성(IC_{50})이 4.82 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획은 4.66 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획은 2.37 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타냈으며, 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 저해활성 13.70 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해서도 큰 elastase 저해활성을 보였다. 또한 50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 비교물질 quercetin에 비해 그보다 더 큰 elastase 저해활성이 보였다(Figure 6).

4. 결 론

1) 여뀌 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물 8.15 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획 5.23 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

2) 여뀌 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 여뀌 50 % 에탄올 추출물 2.33 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획 0.40 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 1.12 $\mu\text{g/mL}$ 로 ethyl acetate 분획이 가장 큰

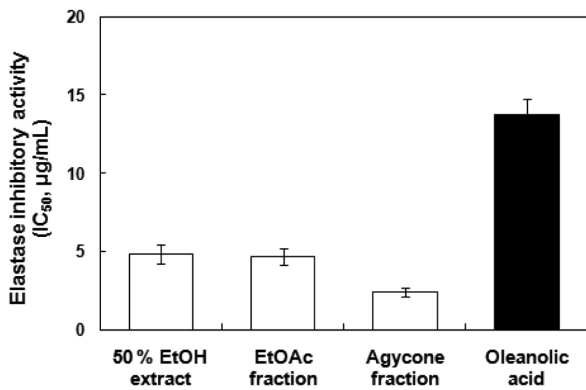


Figure 6. The effect of extracts and fractions from of *Persicaria hydropiper* L. and reference on elastase.

활성을 나타냈다.

3) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 여뀌 추출물은 µg/mL의 농도 범위(1 ~ 10 µg/mL)에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 1 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 144.6 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다.

4) 여뀌 추출물의 멜라닌 생성에 있어서 핵심효소인 tyrosinase 저해 활성(IC₅₀)을 측정한 결과 분획물 중 aglycone 분획은 8.90 µg/mL로 가장 큰 활성을 나타내었으며, 미백관련 화장품 원료로 알려진 arbutin(IC₅₀ : 226.88 µg/mL)에 비해 높은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다.

5) 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다. 여뀌 추출물의 elastase 저해 활성(IC₅₀)을 측정한 결과 추출물 중 aglycone 분획이 2.37 µg/mL로 가장 큰 활성을 나타내었으며 비고분질인 oleanolic acid가 89.0 µg/mL인 것에 비해 elastase 억제 효능이 상당히 큰 것을 확인할 수 있었고, 뛰어난 주름개선 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과들은 여뀌 추출물의 항산화 작용과 더불어 여뀌 성분에 대한 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성으로부터 미백 및 주름개선을 위한 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. E. H. Witt, P. Motchnik, L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin, eds J.

Fuchs and L. Packer, *Oxidative Stress in Dermatology*. 29, New York, Dekker (1993).
 2. I. Emerit, Free radicals and aging of the skin, eds L. Emerit and B. Chance, *Free radicals and aging*, 328, Basel, Birkhauser (1992).
 3. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976).
 4. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
 5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
 6. 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).
 7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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).
 11. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
 12. 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).
 13. 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).
14. A. Oikarinen and M. Kalliainen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
 15. 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).
 16. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 17. H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of antioxidant potential of extract/fractions of *Equisetum arense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
 18. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum arense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
 19. 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 antiangiogenic effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 21. M. Miyazawa and N. Tamura, Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade), *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(3), 595 (2007).
 22. Z. F. Peng, D. Strack, A. Baumert, R. Subramaniam, N. K. Goh, T. F. Chia, S. N. Tan, and L. S. Chia, Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L., *Phytochemistry*, **62**, 219 (2003).
 23. H. Haraguchi, I. Ohmi, S. Sakai, and A. Fukuda, Effect of *Polygonum hydropiper* sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes, *J. Nat. Prod.*, **59**, 443 (1996).