

## 금불초 꽃 추출물의 항균 및 항산화 활성

김 은 희 · 김 정 은 · 김 규 희\* · 나 의 연\* · 이 상 기\* · 정 현 민\* · 이 현 준\* · 박 수 남<sup>†</sup>

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, \*한성과학고등학교  
(2009년 8월 17일 접수, 2009년 8월 28일 수정, 2009년 9월 4일 채택)

### Antibacterial and Antioxidative Activities of *Inula britannica* Flower Extract

Eun Hee Kim, Jung Eun Kim, Kyu Hee Kim\*, EuI Yeon Na\*, Sang Ki Lee\*, Hyun Min Jeong\*, Hyun Jun Lee\*,  
and Soo Nam Park<sup>†</sup>

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

\*Hansung Science High School

(Received August 17, 2009; Revised August 28, 2009; Accepted September 4, 2009)

**요 약:** 본 연구에서는 금불초 꽃 추출물의 피부 상재균에 대한 항균작용과 항산화, tyrosinase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 피부 상재균에 대한 항균활성 측정결과, *P. acnes*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 0.25 %로 나타났으며, methyl paraben과 비슷한 활성을 나타냈고 quercetin보다는 큰 항균활성을 나타내었다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 ethyl acetate 분획에서 8.55 µg/mL로 측정되었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 금불초 꽃 추출물의 총 항산화능은 ethyl acetate 분획 0.24 µg/mL로, 50 % EtOH extract와 aglycone 분획 보다 ethyl acetate 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 금불초 꽃 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 금불초 꽃 추출물의 경우 5 ~ 100 µg/mL의 농도에서 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 25 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub>이 164.15 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 미백 효과측정으로는 각각 tyrosinase의 활성 저해 효과를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 ethyl acetate 분획에서 87.03 µg/mL로 나타났다. 이상의 결과들은 금불초 꽃 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, 금불초 꽃 성분 분석, ethyl acetate 분획의 tyrosinase 저해활성 그리고 피부 상재균에 대한 항균작용으로부터 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, the antibacterial activity, antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase of *Inula britannica* flower extracts were investigated. MIC values of ethyl acetate fraction from *Inula britannica* flower on *P. acnes* 0.25 %, respectively. The results showed that the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction was the highest in the *P. acnes*. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) of ethyl acetate fraction of *Inula britannica* flower was 8.55 µg/mL. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of some *Inula britannica* flower 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 ethyl acetate fraction 0.24 µg/mL. Ethyl acetate fraction showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Inula britannica* flower on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Inula britannica* flower extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (5 ~ 100 µg/mL), particularly deglycosylated flavonoid aglycone fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ<sub>50</sub>, 164.15 min at 25 µg/mL). The inhibitory effect of *Inula britannica* flower extracts on

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

tyrosinase was investigated to assess their whitening efficacy. Inhibitory effects ( $IC_{50}$ ) on tyrosinase of some *Inula britannica* flower extracts were high. Ethyl acetate fraction has  $IC_{50}$  of 87.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These results indicate that extract/fractions of *Inula britannica* flower 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 inhibitory activity on tyrosinase of the ethyl acetate fraction and high potential as bactericide against the skin pathogenic bacteria could be applicable to new functional cosmetics for antioxidant, antiaging, antibacterial activity.

**Keywords:** *Inula britannica* flower, antibacterial activity, reactive oxygen species, antioxidative activity, cosmetics

## 1. 서 론

피부는 피부 상재균에 의해서 많은 피부질환이 발생되며, 여드름균, 비듬균 등이 대표적이다[1]. 여드름균은 일반적으로 호르몬과 외부적 영향에 의해 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 피부 모공이 막힌 경우 증식하여 여드름의 원인이 되며[2], 비듬균은 등, 목덜미와 같은 피부에서 이상적으로 증식하여 지루성 피부염을 유발한다[3]. 피부 상재균 이외에도 화장품을 변질시키는 세균이 피부에 악영향을 주고 있으며, 이를 사멸하기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 사용되고 있다. 화장품에 이용되는 방부제나 항균제는 필수적이지만 기존에 사용되고 있는 합성물질들은 피부에 알러지를 유발할 수 있으므로 비교적 인체에 무해한 물질을 사용하는 것이 중요하다[4].

또한, 피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에, 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되며 이어서 항산화 방어계는 붕괴되고, 결과적으로 피부에 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 야기시키며, 노화를 가속화시킨다[5-8]. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰  $^1\text{O}_2$  및  $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROOH}$  및  $\text{HOCl}$  등을 포함한다[9,10].

이러한 산화적 스트레스에 의한 항산화 방어막의 붕괴와 미생물로부터 피부를 보호하기 위한 항산화, 항균, 미백 및 항노화 효과를 가진 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있다[11-16].

금불초 꽃(*Inula britannica* flower)은 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과의 여러해살이풀로 각지의 들판, 산기슭에서 흔히 자란다. 한국을 포함한 동아시아와 일본, 중국 등에 분포하는 야생식물이다[17,18]. 금불초 꽃의 성분으로는 patuletin 7-O-(6"-isobutyryl)glucoside, patuletin 7-O-[6"-(2-methylbutyryl)]glucoside, patuletin 7-

O-(6"-isovaleryl)-glucoside, astragaloside, isorhamnetin 3-glucoside, hispidulin 7-glucoside, patulitrin, nepitrin, kaempferol, axillarin, patuletin, luteolin 등의 플라보노이드가 함유된 것으로 나타났으며[17], 금불초 꽃의 buthanol 추출물은 DPPH법에서 항산화 효능을 나타낸다고 보고되었다[19]. 또한, 금불초 꽃이 함유하고 있는 sesquiterpene lactone이 iNOS 저해활동을 할 뿐만 아니라[20], 혈압상승을 주도하는 효소인 angiotensin converting enzyme (ACE)의 저해활성이 보고되었다[21]. 금불초 꽃은 동양에서 신경질병을 치료하는데 쓰였으며, 구토를 멈추게 하고, 소화장애, 기관지염과 같은 염증치료 등에 민간 처방으로 사용된 것으로 전해지고 있다[17,22].

금불초 꽃 추출물의 성분과 작용에 대한 연구는 보고되어 있으나 금불초 꽃 추출물에 대하여 피부 상재균에 대한 항균 활성이나  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 금불초 꽃 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의 항균 활성과  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성,  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, 미백에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정함으로써 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있는지를 검토하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는

Istek (Korea) 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine, 효소로 사용된 tyrosinase (9.3 mg solid, 5370 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험 재료인 금불초 꽃은 중국에서 자생한 것을 2009년 4월경 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

## 2.2. 금불초 꽃의 플라보노이드 분획 추출

건조된 금불초 꽃 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 *n*-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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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. 금불초 꽃 추출물의 항균 활성 측정

### 2.3.1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919와 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078, 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

ATCC6538, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736는 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다.

### 2.3.2. 배지 및 배양조건

*P. acnes*의 배양 배지는 reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4 °C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37 °C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24 h 동안 배양하면서 사용하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar 6 %, ox-bile 2 %, tween-40 1 %, glycerol mono-oleate 0.25 %)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30 °C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

### 2.3.3. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

최소억제농도(MIC)는 한천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 분획물들을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고, 시험균을 평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *P. acnes*는 37 °C에서 72 h 후에, *S. aureus*와 *E. coli*는 37 °C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30 °C에서 48 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

## 2.4. 금불초 꽃 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 금불초 꽃 추출물에 대한 free radical 소거 활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g/mL}$ )로서 표기

하였다.

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

#### 2.4.2. Luminol 발광법을 이용한 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계는 각종 ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  그리고  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다.  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 사이의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu\text{L}$  및 5 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu\text{L}$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  40  $\mu\text{L}$ 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity,  $\text{OSC}_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로서 표기하였다.

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

### 2.5. 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.

#### 2.5.1. 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  $^{\circ}\text{C}$ 의 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.

#### 2.5.2. 금불초 꽃 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu\text{M}$ ) 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  $^{\circ}\text{C}$  항온실에서 행하였다. 금불초 꽃 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 31 min으로 오차범위  $\pm 1$  min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 상대적인 광용혈 보호 효과는 아래와 같이 나타내었다.

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

### 2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에는 tyrosinase

가 핵심효소로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.8 mL, 시료 0.1 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase를 첨가하지 않은 것을 공시험(blank)으로 하여 효소활성 저해를 계산하였다. 활성의 크기는 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

## 2.7. 통계처리

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

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 금불초 꽃(*Inula britannica* Flower) 추출물의 수득율

건조한 금불초 꽃 200 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 2 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득률은 19.89 %이었다. Ethyl acetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 *n*-hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압농축하였고 수득률이 약 3.39 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해 시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.88 %였다. Ethyl acetate 분획은 플라보노이드 배당체를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 플라보노이드 배당체로 이루어진 ethyl acetate 분획에서 당이 제거시킨 것으로 aglycone이 주성분으로 존재한다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

### 3.2. 금불초 꽃 추출물의 항균 활성 측정

비듬균인 *P. ovale*에 대한 금불초 꽃 분획물 중 ethyl acetate 분획의 MIC는 0.25 %로 나타났다. 여드름균인 *P. acnes*에 대한 상수리나무 잎 분획물 중 ethyl acetate 분획은 0.25 %로 나타났다. ethyl acetate 분획의 경우 MP (0.25 %)와 비교하여 동일한 항여드름균 활성을 나타내었고, 천연 플라보노이드 성분인 quercetin (0.30 %)과 비교하였을 경우 큰 항여드름균 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 금불초 꽃 분획물의 현저한 항산화 및 세포보호 활성과 함께, 여드름에 유효한 소재 및 화장품 개발에 응용가능성이 높음을 시사한다(Table 1). 여드름

**Table 1.** Minimum Inhibitory Concentration (MIC, w/v%) of Ethyl Acetate Fraction from *I. britannica* Flower Against Various Bacteria

Strains	<i>I. britannica</i> flower extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben	Quercetin
<i>E. coli</i>	0.50	0.13	0.06
<i>P. ovale</i>	0.25	0.13	0.15
<i>P. acnes</i>	0.25	0.25	0.30
<i>S. aureus</i>	0.50	0.25	0.15

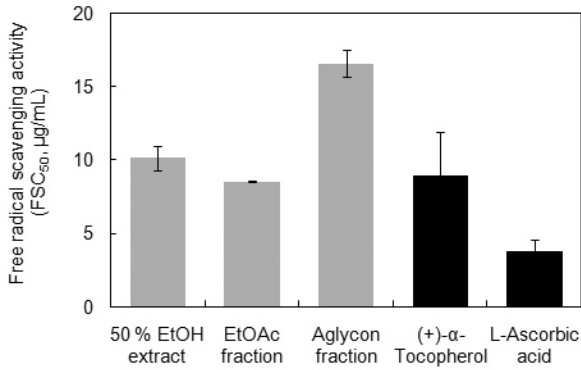
균처럼 특정 세균의 기능이나 생리활동을 약화 또는 억제시키거나 세균자체를 사멸시키기 위한 목적의 항균제 이외에도, 화장품에서는 제품의 변질이나 오염을 막기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 사용되고 있다. 일반적으로 세균의 세포막을 파괴하여 세균을 사멸시키는 기작을 응용하여 화장품에 응용되고 있는 방부제나 항균제들은 직접적으로 인체 피부와 접촉하여 반응하게 되므로 인체 피부에 영향을 주지 않는 가능한 한 최소량을 사용하여 최대의 효과를 얻을 수 있는 물질을 선택 사용하는 것이 중요하다. 이러한 관점에서 대조군으로 사용된 호기성 균주인 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 금불초 꽃의 항균활성 측정 결과, 비교물질에 비하여 낮은 활성을 나타내었지만, 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.2 ~ 0.4 % 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 금불초 꽃 분획물은 낮은 농도에서도 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

### 3.3. 금불초 꽃 추출물의 항산화 활성

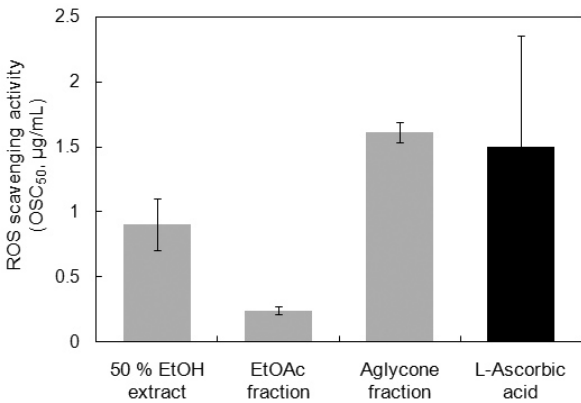
#### 3.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

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 종결시킴으로써 세포막을 보호한다. 이와 같이 세포막에서 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

금불초 꽃(*Inula britannica* flower) 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1과 같다. 금불초 꽃 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>



**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *I. britannica* flower extracts and references.



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

이 10.16 µg/mL, ethyl acetate 분획은 8.55 µg/mL, aglycone 분획은 16.59 µg/mL을 나타냈다. Ethyl acetate 분획 free radical 소거활성이 (+)-α-tocopherol과 유사한 것으로 나타났다. 비교 물질로 사용한 수용성의

L-ascorbic acid의 free radical 소거활성은 3.79 µg/mL, (+)-α-tocopherol은 8.98 µg/mL이었다.

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

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS 소거 활성은 금불초 꽃 추출물은 화학발광을 감소시킴을 Figure 2에서 알 수 있다. 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 금불초 꽃 50 % 에탄올 추출물이 0.90 µg/mL, ethyl acetate 분획이 0.24 µg/mL, aglycone 분획이 1.61 µg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 ethyl acetate 추출물이 당을 제거시킨 aglycone 분획 및 50 % 에탄올 추출물보다 활성산소 소거활성이 큰을 알 수 있다. Ethyl acetate 분획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다 큰 활성을 보였다.

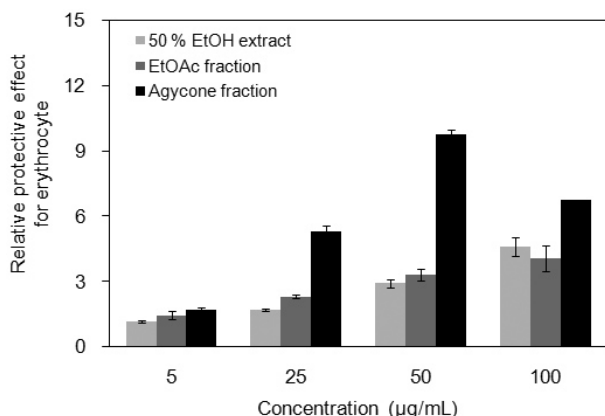
3.4. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

금불초 꽃 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Figure 3, 4 및 Table 2에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간 (τ<sub>50</sub>)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 금불초 꽃의 aglycone 분획은 5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도 범위에서 τ<sub>50</sub>이 각각 53.27, 164.15, 302.55, 210.05 min으로 세포보호 효과를 나타냈고, 농도가 100 µg/mL에서 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출물의 농도가 클 때는 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용)을 나타낼 수 있는 물질이 존재할 가능성도 생각할 수 있다. Ethyl acetate 분획의 경우 45.53, 71.63, 103.00, 126.33 min, 50 % 에탄올 추출물의 경우 36.47,

**Table 2.** Effects of Extracts from *I. britannica* Flower 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> )			
	5	25	50	100
<i>I. britannica</i> flower extract (50 % EtOH)	36.47 ± 1.97	52.83 ± 1.96	90.75 ± 5.55	143.30 ± 13.23
<i>I. britannica</i> flower extract (EtOAc fraction)	45.53 ± 5.83	71.63 ± 2.53	103.00 ± 7.80	126.33 ± 18.01
Deglycosylated fraction from <i>I. britannica</i> flower extract (EtOAc fraction)	53.27 ± 2.85	164.15 ± 8.05	302.55 ± 7.45	210.05 ± 0.15
(+)-α-Tocopherol	-	-	74.33 ± 6.35	-

1) Control, τ<sub>50</sub> = 31 ± 1.0 min



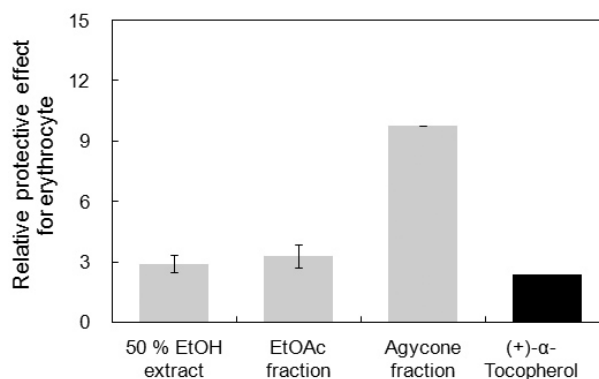
**Figure 3.** Cellular protective effects of *I. britannica* flower extracts against  $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effect = sample  $\tau_{50}$ /control  $\tau_{50}$ .

52.83, 90.75, 143.30 min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었지만, aglycone 분획에 비해 낮은 효과를 나타내었다. 따라서 세포보호 효과는 50 µg/mL에서 50 % 에탄올 추출물(90.75 min) < ethyl acetate 분획(103.00 min) < aglycone 분획(305.55 min) 순으로 나타났고, 이는 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- $\alpha$ -tocopherol에 비해 매우 큰 세포보호 활성을 보여주었다. 만약 당이 제거된 aglycone 분획을 화장품 등에 사용하면 피부세포보호 활성에 크게 기여할 것으로 생각된다.

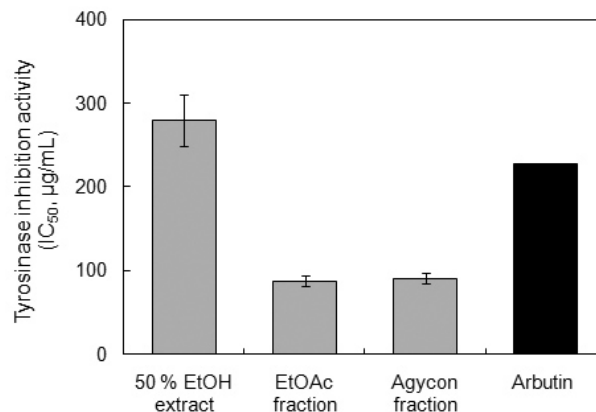
### 3.5. Tyrosinase 저해 활성

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

금불초 꽃 추출물중 ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 추출물은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 90.57 µg/mL로 나타났다. ethyl acetate 분획의 경우에도 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 87.03 µg/mL로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 훨씬 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다. 따라서 당이 제거된 추출물과 ethyl acetate 분획 등을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 5).



**Figure 4.** The effect of extracts and fractions of *I. britannica* flower extracts and (+)- $\alpha$ -tocopherol at 50 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effect = sample  $\tau_{50}$ /control  $\tau_{50}$ .



**Figure 5.** The effect of extracts and fractions from *I. britannica* flower and reference on tyrosinase.

## 4. 결 론

- 1) 금불초 꽃 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 19.89 %, ethyl acetate 분획은 3.39 %, aglycone 분획의 경우 0.88 %이었다.
- 2) 금불초 꽃 추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물 10.16 µg/mL, ethyl acetate 분획 8.55 µg/mL, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 16.59 µg/mL로 나타났다.
- 3) 금불초 꽃 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 금불초 꽃 50 % 에탄올 추출물, 0.90 µg/mL, ethyl acetate 분획, 0.24 µg/mL, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 1.61 µg/mL로 금불초 꽃 추출물 중 ethyl acetate 분획이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4)  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 금불초 꽃 추출물은  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위(5 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 농도-의존적으로  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $\tau_{50}$ 이 164.15 min으로 매우 큰 세포 보호 효과를 나타내었다.

5) 금불초 꽃의 항균활성 측정결과, *E. coli*, *P. ovale*, *P. acnes*, *S. aureus*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 각각 0.50 %, 0.25 %, 0.25 %, 0.50 %로 나타났으며, *P. acnes*에서 methyl paraben과 비슷한 항균활성을 나타내었으며, 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

이상의 결과들은 금불초 꽃 추출물의 항균 활성과 더불어 항산화 작용, ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase 저해활성으로부터 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Y. M. Ha, B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim, J. S. Choi, and I. S. Choi, Anti-microbial activity of grapefruit sees extract and processed sulfur solution against human skin pathogens, *J. Life Science*, **19**(1), 94 (2009).
2. R. R. Marples, The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 326 (1974).
3. C. M. Gemmer, Y. M. DeAngelis, B. Theelen, T. Boekhout, and T. L. Dawson, Fast, non-invasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3350 (2002).
4. C. K. Zhoh, B. N. Kim, S. H. Hong, and C. G. Han, The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens, *J. Soc. Cosmetic, Scientist Korea*, **28**(1), 166 (2002).
5. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, N. Takeda, and T. Nagahata, The skin-lightening effects of artocarpin on UVB-induced pigmentation, *Planta Med.*, **68**(1), 79 (2002).
6. B. A. Jukiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buettner, Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
7. D. L. Black, R. Chatterjee, and D. P. Hannon, Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators, *Photochemistry and Photobiology*, **54**(2), 215 (2008).
8. M. Kubo and H. Matsuda, Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis, *Fragrance J.*, **8**, 48 (1995).
9. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Pathol.*, **107**, 397 (1982).
10. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
11. Korea Dermatological Association, Dermatological Science, 325, Yeomungak, Seoul (2001).
12. S. S. Ham, D. H. Oh, J. K. Hong, and J. H. Lee, Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs, *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 155 (1997).
13. S. Jun, K. Goto, F. Nanjo, S. Kawai, and K. Murata, Antifungal activity of plant extract against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 442 (2000).
14. S. T. Kim, K. T. Lee, and T. J. Min, Characteristics of antimicrobial activities for the human pathogenic microorganism by extracts from Korean mushrooms, *Kor. J. Mycol.*, **31**, 67 (2003).
15. K. S. Lee, J. C. Lee, K. H. Han, and M. J. Oh, Antimicrobial activities of extract of *Perilla frutescens Britton var. acuta* Kudo on food spoilage or foodborne disease microorganism, *Kor. Soc. Food Preserv.*, **6**, 239 (1999).
16. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
17. S. R. Kim, M. J. Park, M. K. Lee, S. H. Sung, E. J. Park, J. W. Kim, S. Y. Kim, T. H. Oh, G. J. Markelonis, and Y. C. Kim, Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate, *Free Radical Bio-*



- logy & Medicine*, **32**(7), 596 (2002).
18. K. S. Moon and O. J. Choi, Ingredient and use of medicinal herbs, 741, Ilwolsugak, Seoul (1991).
  19. E. J. Park, Y. L. Kim, and J. W. Kim, Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*, *J. Nat. Prod.*, **63**, 34 (2000).
  20. A. R. Han, W. C. Mar, and E. K. Seo, X-Ray crystallography of a new wewquiterpene lactone isolated from *Inula britannica* var. *chinensis*, *Natural Product Sciences*, **9**, 28 (2003).
  20. J. D. Kim, N. Y. Kim, H. Y. Lee, J. H. Lee, N. S. Sung, and B. H. Jung, Angiotensin converting enzyme inhibitory activities from plant resource, *The Korean Society of Medicinal Crop Science*, **11**(3), 246 (2003).
  22. H. T. Lee, S. W. Yang, K. H. Kim, E. K. Seo, and W. C. Mar, Pseudoguaianolides isolated from *Inula britannica* var. *chinensis* as inhibitory constituents against inducible nitric oxide synthase, *Arch. Pharm. Res.*, **25**(2), 151 (2002).