

## 며느리배꼽 추출물의 항산화 활성

안 유 진 · 김 선 영 · 옥 주 형\* · 왕 현\* · 박 창 화\* · 김 성 호\* · 허 윤 석\* · 전 영 희\* · 박 수 남<sup>†</sup>

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학학과, \*서울과학기술대학교  
(2009년 8월 18일 접수, 2009년 8월 31일 수정, 2009년 9월 2일 채택)

### Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts

You Jin Ahn, Sun Young Kim, Ju Hyung Ok\*, Hyun Wang\*, Chang Hwa Park\*, Sung Ho Kim\*, Yun Suk Heo\*,  
Young Hee Jeon\*, 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

\*Seoul Science High School

(Received August 18, 2009; Revised August 31, 2009; Accepted September 2, 2009)

**요약:** 본 연구에서는 며느리배꼽 추출물들의 항산화 효능 및 tyrosinase, elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 며느리배꼽 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 aglycon 분획(12.38 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었고, 또한 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 며느리배꼽 추출물의 총항산화능은 추출물의 ethyl acetate 분획(0.35 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 며느리배꼽 추출물에 대하여 광증감제인 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였을 때, 추출물의 aglycon 분획을 제외하고 다른 추출물들은 농도 의존적(1 ~ 50 µg/mL)으로 세포보호 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 며느리배꼽 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획이 각각 136.00 µg/mL, 68.10 µg/mL로 나타났으며, elastase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획이 각각 67.20 µg/mL, 43.50 µg/mL로 나타났다. 이상의 며느리배꼽 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, 며느리배꼽 추출물의 tyrosinase 및 elastase 저해 활성으로부터 항산화, 항노화 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase, elastase of *Persicaria perfoliata* extracts were investigated. The deglycosylated fraction of extract (12.38 µg/mL) showed the most prominent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of *P. perfoliata* 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 ethyl acetate fraction of extract (0.35 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of *P. perfoliata* extract/fractions on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *P. perfoliata* extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 50 µg/mL) except the deglycosylated fraction of extract. The inhibitory effect of *P. perfoliata* extracts on tyrosinase was investigated to assess their whitening efficacy. Inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) on tyrosinase were determined with ethyl acetate fraction of *P. perfoliata* extract (136.00 µg/mL) and deglycosylated fraction of extract (68.10 µg/mL). Finally, their anti-elastase activities were measured to predict the anti-wrinkle efficacy in the human skin. Inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) on elastase were determined with ethyl acetate fraction of *P. perfoliata* extract (67.20 µg/mL) and deglycosylated fraction of extract (43.50 µg/mL). These results indicate that extract/fractions of *P. perfoliata* can function as antioxidants in biological systems.

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

particularly skin exposed to UV radiation by scavenging  $^1O_2$  and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. Extract/fractions of *P. perfoliata* can be applicable to new functional cosmetics for antioxidant, antiaging.

**Keywords:** *Persicaria perfoliata*, antioxidative activity, antiaging activity, cosmetics, reactive oxygen species

## 1. 서 론

대기 중에 존재하는 산소는 생명유지에 필수불가결한 요소이나 그 이면에 산화변성이라는 위험한 성질을 지니고 있어 이를 잘 제어하는 것이 중요하다. 아울러 현재 노화연구 분야에서 가장 주목을 받고 있는 free radical 설[1]에 의하면 생물은 나이에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 손상이 증가하는데, 이들 ROS는 생체가 외부로부터의 방사선, 자외선 등의 노출, 대기오염 물질, 항생제의 남용과 더불어 체내의 생화학적 반응에 의해 생성되며, 여러 가지 문제를 야기시킨다고 알려져 있다[2,3]. 광노화는 특히 태양광선에 노출되는 신체 부위에서 자외선에 의해 야기될 수 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 ROS가 생성된다.  $^1O_2$ 은 주로 광증감반응으로 피부에서 생성되고, 광노화에 있어서 핵심적 역할을 한다.  $^1O_2$ 은  $\cdot OH$ 과 함께 ROS 중에서 반응성이 가장 큰 활성산소종으로 생체 내에는 이들 활성산소종을 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않으며 특히 피부노화를 주도하는 것으로 보고되어 있다[4]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1O_2$ 의 중요한 역할을 시사하는 것이다[4,5]. 주로 UVA에 의해 유도되는  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화의 원인이 되기 때문에 자외선 노출 후 항산화제에 의한 ROS의 감소는 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위해서 계속적으로 연구되어야 할 것이다. 즉, 항산화 물질들은 활성산소를 제거시키거나 생성을 억제시킴으로써 과량 생성된 활성산소에 의해 발생한 각종 질병의 예방 및 치료와 피부 노화억제를 목적으로 이용될 수 있을 것으로 추정되고 있다[6]. 이러한 항산화제에 대한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich가 superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD를 발견한 이후 시작되어 최근에는 식품첨가물로서의 항산화제 개발, 각종 질병의 예방을 위한 건강식품, 노화억제를 목적으로 하는 의약품 및 화장품산업으로까지 다양화되고 있는 상태이다. 따라서 인체에 무해하면서도 보다 강한 항산화 효과를 나타내는 천연 항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있다[7,8].

머느리배꼽(*Persicaria perfoliata*)은 원산지가 아시아 지역인 마디풀과의 한 종류이다. 머느리배꼽은 전통적으로 해독제, 해열제, 이뇨제 등으로 사용되어 왔으며, 기침이나 백일해 등 호흡기 질환에도 사용되어 왔다[9,10]. 머느리배꼽 추출물의 주요 성분으로는 ferulic acid, vanillic acid, quercetin, caffeic acid, protocatechuic acid 등이 함유되어 있다고 알려져 있다[11-13].

그러나 머느리배꼽 추출물을 이용하여 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 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 머느리배꼽을 구입하여 머느리배꼽 추출물과 분획을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성,  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, tyrosinase 활성 저해 효과, 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 측정하여 ROS에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 항산화, 항노화 화장품 소재로서의 가능성을 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.

EDTA, luminol, 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) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl, trizma base, HCl 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH),

ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid), elastase (4.5 mg protein/mL, 6.5 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol, L-ascorbic acid, arbutin, oleanolic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 머느리배꼽은 2008년 12월 청량리 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 머느리배꼽의 분획 및 추출

건조된 머느리배꼽 50 g을 잘게 자른 후 50 % EtOH 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % EtOH 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 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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. 머느리배꼽 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH 실험법은 매우 간편하고 짧은 시간에 결과를 알 수 있기 때문에, 천연물 추출물의 항산화 물질을 검색하는 경우나 항노화 화장품 원료들의 비교 평가 시에 이용하기 적합하다. 머느리배꼽 추출물 대한 이러한 free radical 소거활성 측정은 DPPH법을 통하여 확인하였다. 실험방법은 MeOH에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 EtOH 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>,  $\mu$ 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<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 의해 각종 ROS (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성되며, 철은 이 반응을 촉매한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 총항산화능은 luminol이 ROS에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 머느리배꼽 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu$ L 및 5 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu$ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 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 실험 전에 보정하여 채널 간의 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, 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 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 이 실험법을 이용하여 조사할 수 있다. 무엇보다 자외선에 의한 피부노화를 방어할 수 있는 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 유익할 것으로 생각된다. 따라서 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과

를 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 buffer (pH 7.4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.6 mM)로 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. 머느리배꼽 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 첨가하고 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 °C 항온실에서 행하였다. 머느리배꼽 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 30 min으로 오차범위  $\pm$  2.8 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.

#### 2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌 생성과정에서 tyrosinase는 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 걸쳐 DOPA quinone으로 산화되는 과정의 전체 반응 속도를 결정하는 핵심효소로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 유용하다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )로 표기하였다.

#### 2.6. Elastase 저해활성 측정

피부의 섬유상 단백질 중 collagen은 세포외 매트릭스의 주요한 단백질로서 조직의 형태를 유지하는 작용을 하며, elastin은 상호 가교 결합을 만들어 조직의 탄성을 유지하는 작용을 한다. 피부의 주름 생성에는 활성산소종에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs: collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 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  $\mu\text{L}$ 에 측정시료용액 7.5  $\mu\text{L}$ 와 buffer 92.5  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100  $\mu\text{L}$  첨가 (최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신 시료용액으로 사용된 용매를 100  $\mu\text{L}$  첨가하였다. 공시험(blank)은 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300  $\mu\text{L}$ 를 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. 머느리배꼽 추출물의 항산화 활성

##### 3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

(+) -  $\alpha$  -Tocopherol, flavonoids 등의 항산화제는 활성 산소종 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응인 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때 수소 원자를 주는 능력이 환원력이며 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다. 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

머느리배꼽 (*P. perfoliata*) 추출물들의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 머느리배꼽 50 % EtOH 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>가 39.94  $\mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획인 경우는 16.25  $\mu\text{g/mL}$ , aglycon 분획은 12.38  $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+) -  $\alpha$  -tocopherol의 FSC<sub>50</sub>는 8.98  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 따라서 머느리배꼽 추출물 중 aglycon 분획은 대표적인 지용성 항산화제인 (+) -  $\alpha$  -tocopherol과 비슷한 free radical 소거활성을 나타내었다.

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

Luminol은 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Figure 2에서 머느리배꼽 50 % EtOH 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 0.41  $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며 ethyl acetate 분획의 총항산화능은 0.59  $\mu\text{g/mL}$ , aglycon 분획의 총항산화능은 0.35  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 비교물질은 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총항산화능은 1.50  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 머느리배꼽의 50 % EtOH 추출물과 ethyl acetate 분획 및 aglycon 분획 모두 L-ascorbic acid 보다 훨씬 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다.

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

머느리배꼽 추출물을 비롯한 대표적인 항산화제의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 Figure 3, 4에 나타내었다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은

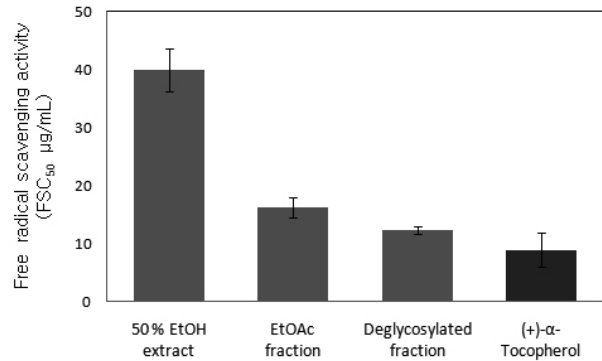


Figure 1. Free radical scavenging activity of extract and fractions of *P. perfoliata* and reference.

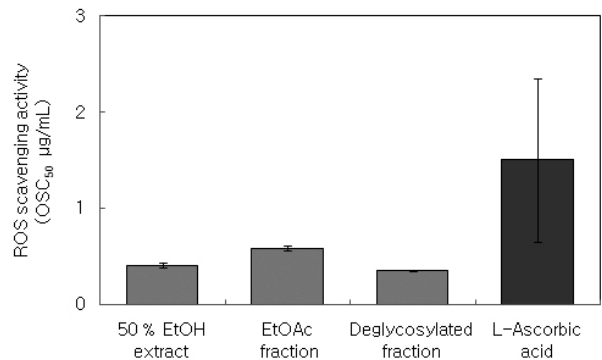
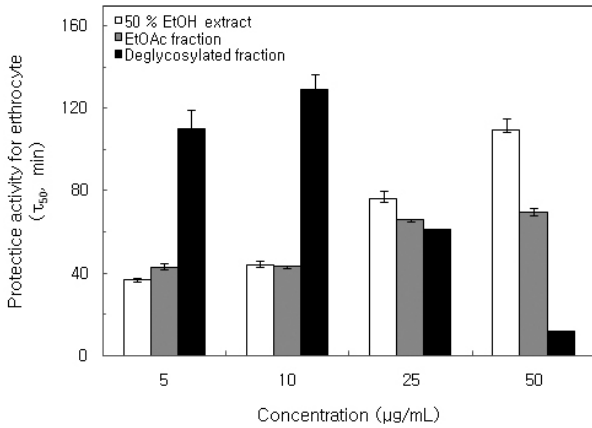
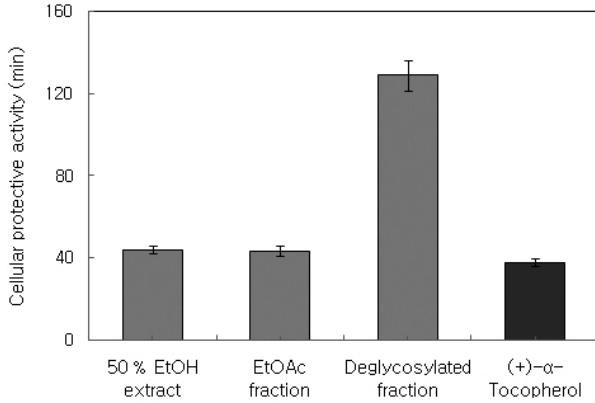


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *P. perfoliata* extracts and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 머느리배꼽 50 % EtOH 추출물의 경우는 36.90, 44.30, 76.00, 109.70 min, ethyl acetate 분획의 경우는 42.70, 43.70, 66.10, 69.40 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 한편 aglycon 분획의 경우는 혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )이 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 109.90, 129.20 min으로 큰 세포보호 활성을 보여주다가 농도가 25  $\mu\text{g/mL}$ 와 50  $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가함에 따라 각각 61.10, 11.90 min으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출용매에 따른 추출물의 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용 등)에 기인된 영향으로 생각된다. 이 메커니즘은 더 연구해 볼 필요가 있다고 사료된다. 머느리배꼽 추출물들의 세포보호 효과는 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 ethyl acetate 분획 (43.70 min) < 50 % EtOH 추출물 (44.30 min) < aglycon 분획 (129.20 min) 순으로 증가하였고, 비교물질로 사용한 지용성 항산화제 (+) -  $\alpha$  - tocopherol의 세포 보호효과는 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서



**Figure 3.** Cellular protective effects of *P. perfoliata* extracts against  $^1O_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes (control =  $30 \pm 2.80$  min).



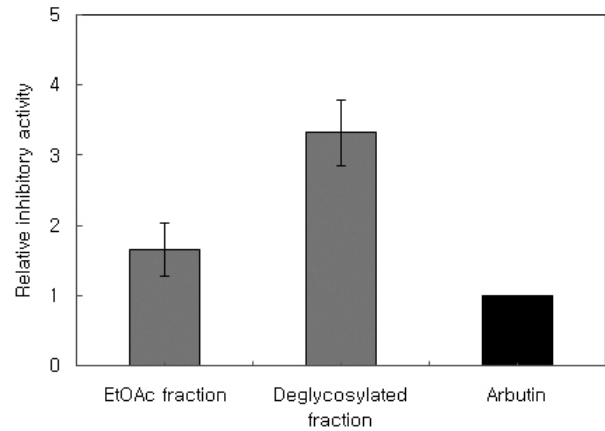
**Figure 4.** The effect of extract and fractions from *P. perfoliata* and reference at  $10 \mu\text{g/mL}$  on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

38.00 min으로 나타났다. 특히 머느리배꼽의 aglycon 분획은 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교하여 볼 때 동일 농도에서 우수한 세포보호 활성을 나타내었다.

### 3.3. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase는 멜라닌 생성에 핵심적인 효소이다. Tyrosinase는 L-tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정에서, L-tyrosine에서 DOPA로의 산화, DOPA에서 DOPAquinone으로의 산화, 그리고 dihydroxyindole (DHI)로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는 효소이다.

머느리배꼽 추출물 중 ethyl acetate 분획의 경우에 tyrosinase 저해활성( $IC_{50}$ )이  $136.00 \mu\text{g/mL}$ , aglycon 분획의 tyrosinase 저해활성은  $68.10 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다



**Figure 5.** The effect of fractions from *P. perfoliata* and reference on tyrosinase.

**Table 1.** Inhibitory Activity of Extracts from *P. perfoliata* and Reference on Elastase

Compounds	Inhibition
	( $IC_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$ )
<i>P. perfoliata</i> extract (EtOAc fraction)	$67.20 \pm 6.20$
<i>P. perfoliata</i> extract (deglycosylaged fraction)	$43.50 \pm 0.25$
Oleanolic acid	$13.70 \pm 1.03$

며, 비교물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성  $226.88 \mu\text{g/mL}$ 에 비해서도 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다(Figure 5). 비교물질인 arbutin에 비해 머느리배꼽 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획의 tyrosinase 저해활성은 각각 1.67배, 3.33배 더 크다는 것을 알 수 있다. 따라서 머느리배꼽 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료된다.

### 3.4. Elastase 저해 활성

피부 진피층에 존재하는 MMPs는 자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되며, 피부노화, 특히 주름생성과 피부 탄력감소와 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로는 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

머느리배꼽 추출물들 중에서 elastase 저해활성( $IC_{50}$ )은 ethyl acetate 분획인 경우  $67.20 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며, aglycon 분획의 경우  $43.50 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타내었다. 머느리배꼽 추출물들 중에서 aglycon 분획은 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 elastase 저해활성( $13.70$

μg/mL) 보다는 낮은 활성을 보였지만, 피부 탄력 및 주름생성에 관여하는 elastase를 충분히 저해할 수 있다고 사료된다(Table 1).

#### 4. 결 론

1) 머느리배꼽 추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 50 % EtOH 추출물인 경우 39.94 μg/mL, ethyl acetate 분획은 16.25 μg/mL, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycon 분획은 12.38 μg/mL으로 aglycone 분획이 가장 우수한 free radical 소거능력을 나타냈다.

2) 머느리배꼽 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 50 % EtOH 추출물 0.41 μg/mL, ethyl acetate 분획 0.59 μg/mL, aglycon 분획 0.35 μg/mL로 나타났다.

3) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 머느리배꼽 추출물 중에서 50 % EtOH 추출물과 ethyl acetate 분획은 농도 범위(1 ~ 50 μg/mL)에서 농도-의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 억제하였으며, 머느리배꼽 추출물의 aglycon 분획은 1 ~ 10 μg/mL의 농도범위에서 다른 추출물 및 분획보다 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 더 크게 억제하였다.

4) 머느리배꼽 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 136.00 μg/mL, 68.10 μg/mL로 나타났다. 또한 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 ethyl acetate 분획이 67.20 μg/mL, aglycon 분획이 43.50 μg/mL을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 머느리배꼽 추출물의 항산화 활성과 항균 활성 그리고 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획의 tyrosinase와 elastase의 저해활성으로부터 머느리배꼽 추출물의 항산화, 항노화 및 항균 화장품으로의 응용 가능성을 시사한다.

#### 참 고 문 헌

1. D. Harman, Free radical theory of aging, *Mutat. Res.*, **275** (1992).
2. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
3. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti

- of oophorectomized rat : oxidative stress and anti oxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**, 1 (2002).
4. R. S. Corfran, V. Kumar, and S. L. Robbins, Robins pathologic basis of disease, W. B. Saunders, 1, Philadelphia (1989).
5. 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).
6. 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).
7. K. H. Cheseaman and T. F. Slater, Free radicals in medicine, *British Medical Bulletin*, **49**, 3, Churchill Livingstone (1993).
8. J. M. McCord and I. Fridovich, Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, **244** (1969).
9. A. L. Branen, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. AOCS.*, **52** (1975).
10. L. N. Li, Biologically active components from traditional Chinese medicines, *Pure Appl. Chem.*, **70**, 547 (1998).
11. F. Yuzhi, Determination of bioactive components in *Polygonum perfoliatum* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Chinese J. Chemistry*, **27**, 773 (2009).
12. S. V. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, and M. G. Simic, Reduction potentials of flavonoid and model phenoyl radicals, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 2497 (1996).
13. J. H. Mun and C. W. Park, Flavonoid chemistry of *Polygonum* sect. *Tovara* (Polygonaceae): a systematic survey, *Pl. Syst. Evol.*, **196**, 153 (1995).
14. K. Yoshitama, M. Hisada, and N. Ishikura, Distribution pattern of anthocyanins in the polygonaceae, *Bot. Mag. Tokyo*, **97**, 31 (1984).