

참죽나무 새순 추출물의 항산화 활성과 미백 작용에 관한 연구

김 선 영 · 김 채 린* · 김 현 민* · 공 명* · 이 지 희* · 이 현 준* · 임 명 선 · 조 나 래 · 박 수 남[†]

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, *한성과학고등학교
(2010년 9월 20일 접수, 2010년 9월 24일 수정, 2010년 9월 25일 채택)

Antioxidant Activity and Whitening Effect of *Cedrela sinensis* A. Juss Shoots Extracts

Sun Young Kim, Chae Rin Kim*, Hyun Min Kim*, Myung Kong*, Ji Hee Lee*,
Hyun Jun Lee*, Myoung Sun Lim, Na Rae Jo, and Soo Nam Park[†]

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

*Hansung Science High School

(Received September 20, 2010; Revised September 24, 2010; Accepted September 25, 2010)

요약: 본 연구에서는 참죽나무 새순 추출물의 항산화 효과와 tyrosinase 저해 활성을 측정함으로써 기능성 화장품에서의 이용 가능성을 평가하였다. 참죽나무 새순 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 저해활성(FSC₅₀)은 ethyl acetate 분획(3.54 µg/mL)과 aglycone 분획(2.15 µg/mL) 모두 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (8.98 µg/mL)에 비해 우수한 활성을 나타내었다. 또한 luminol 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 참죽나무 추출물의 총항산화능은 추출물의 ethyl acetate 분획(0.15 µg/mL)과 aglycone 분획(0.12 µg/mL)에서 모두 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL) 보다 약 10배 더 큰 것으로 나타내었다. Rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 참죽나무 새순 추출물의 억제 효과를 측정하였을 때 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획 모두 농도 의존적(5 ~ 25 µg/mL)으로 세포보호 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 참죽나무 새순 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획에서 각각 48.00 µg/mL, 5.88 µg/mL으로 나타났으며 aglycone 분획의 경우 강력한 미백제인 arbutin (226.88 µg/mL)에 비해 약 40배 정도 더 우수한 활성을 갖는다. 이상의 결과들은 참죽나무 새순 추출물이 활성산소종을 소거하고 활성산소종에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 의해 손상된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, tyrosinase 저해활성으로부터 미백 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase of *Cedrela sinensis* extracts were investigated. The ethyl acetate fraction of extract (3.54 µg/mL) and aglycone fraction of extract (2.15 µg/mL) showed more excellent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀) than the activity of (+)-α-tocopherol (8.98 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of *Cedrela sinensis* extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction of extract (0.15 µg/mL) and aglycone fraction of extract (0.12 µg/mL) showed 10 times more excellent ROS scavenging activity than activity of L-ascorbic acid (1.50 µg/mL). The protective effects of fractions of *Cedrela sinensis* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethyl acetate fraction of extract and aglycone fraction of extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (5 ~ 25 µg/mL). The inhibitory effect of *Cedrela sinensis* extracts on tyrosinase was investigated to assess their whitening efficacy. Inhibitory effects (IC₅₀) on tyrosinase were determined with ethyl acetate fraction of *Cedrela sinensis* extract (48.00 µg/mL) and aglycone fraction of extract (5.88 µg/mL). The aglycone fraction showed 40 times more remarkable tyrosinase inhibitory effect than whitening agent.

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

arbutin (226.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$) These results indicate that fractions of *Cedrela sinensis* can be used 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. The fractions of *Cedrela sinensis* can be applicable to new functional cosmetics for antioxidant and whitening.

Keywords: *Cedrela sinensis*, antioxidative activity, whitening effect, flavonoids, cosmetics

1. 서 론

인체의 노화현상은 자연스럽게 나타나는 과정이다. 세포들의 성장과 퇴화를 거듭하다 20대 이후로 성장이 멈추게 되면 이후부터 근본적인 노화과정을 맞이하게 된다. 피부노화란 인체의 노화와 더불어 피부에 나타나는 변화를 말하며 노화에 미치는 요인에 따라 내적원인 또는 생리적 원인과 자외선 등의 외적요인으로 나뉜다. 외적인 요인에 의한 피부노화 중에서 가장 주된 요인은 자외선이다. 자외선을 통해 생성되는 활성산소종(ROS)과 이로 인한 피부의 광산화적 손상과 광노화는 실질적으로 증가하고 있다. 활성산소종이란 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분을 산화시키고, 산소장해를 일으키며 삼중항 상태의 산소($^3\text{O}_2$)보다도 반응성이 훨씬 큰 산소종을 일컫는다[1-4]. 비라디칼종인 $^1\text{O}_2$, H_2O_2 와 산소중심의 라디칼인 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, 그리고 이들 활성산소종과의 생체성분들과의 반응으로 발생된 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등이 활성산소종에 포함된다. 이들은 정상적 대사과정을 포함하는 다양한 생체반응, 자외선에 의한 광반응으로 생성될 수 있다[5-7]. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 는 반응성이 크지 않기 때문에 실질적으로 생체 내에는 이들을 처리할 수 있는 효소(superoxide dismutase, catalase)가 발달되어 있으나 $^1\text{O}_2$ 과 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 를 처리할 수 있는 효소는 생체 내에 존재하지 않는다. 특히 $^1\text{O}_2$ 은 수명이 짧은 해로운 분자이며, 주로 광증감반응으로 피부에서 생성되고, 광노화에 있어서 핵심적인 역할을 한다[8]. 또한 이러한 활성산소에 의해서 멜라닌 생성이 촉진된다. 멜라닌 생성 과정에서 자외선은 tyrosinase와 자동산화반응 과정 모두를 촉진시킨다. 대표적인 미백제인 알부틴은 tyrosinase의 기질로서 작용하며 또 다른 미백제인 코직산은 tyrosinase의 활성자리에 있는 구리를 킬레이트화 함으로써 tyrosinase의 활성을 저해한다. 미백제 개발은 주로 tyrosinase 저해 활성에 관심을 두었으나, 현재는 tyrosinase 저해 활성뿐만 아니라 자동산화반응의 억제도 크게 부각되고 있다. 또한 tyrosinase가 효소적 작용을 나타내는 동안 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 가 생성됨이 확인되었

다[9].

이렇듯 활성산소가 피부노화의 주요원인으로 밝혀짐에 따라 활성산소를 제거하는 항산화제의 개발이 중요한 연구과제가 되고 있으며 인체에 무해하면서도 보다 강한 항산화 효과를 나타내는 천연 항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있다[10,11].

참죽나무(*Cedrela sinensis* A. Juss.)는 원산지가 아시아지역인 멸구슬나무과의 낙엽교목이다. 참죽나무의 순을 참죽이라고 하는데 잎이나 줄기에 독특한 향기가 있어서 중국에서는 향춘 또는 저항이라고 불리며 고급 나물로 취급하고 있으며 우리나라에서도 참죽을 여러 가지 방법으로 조리하여 식용으로 사용한다. 또한 전통적으로 참죽나무 잎은 장염, 이질, 개선 등의 치료에 약용되어 왔다[12,13]. 참죽에는 카로틴 및 비타민 B와 비타민 C가 함유되어 있으며 칼슘과 칼륨도 다량 함유되어 있다고 보고되어 있다[14]. 또한 참죽나무 잎에는 (+)-catechin, quercetin, afzelin, quercitrin, isoquercitrin 등의 페놀성 화합물이 포함되어 있다고 보고되어 있다[15-17]. 참죽나무에 관한 또 다른 연구로는 종자성분 연구, 김치로 가공했을 때의 저장중의 화학성분의 변화, 참죽나무잎의 조리시 quercitrin의 함량 변화[18] 등의 연구가 보고 되어있을 뿐, 참죽나무 새순 추출물을 이용하여 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능 및 미백작용에 관한 연구는 아직 되어있지 않다.

따라서 참죽나무 새순을 구입하여 참죽나무 새순 추출물과 분획을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, 그리고 tyrosinase 저해 활성을 측정하여 ROS에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 항산화 화장품, 그리고 미백 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 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, L-ascorbic acid, arbutin, EDTA, luminol, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 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 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), hexane 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 효소로 사용된 tyrosinase (9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 참죽나무 새순은 2010년 3월 청량리 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 참죽나무 새순의 분획 및 추출

건조된 참죽나무 새순 100 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 50 % 에탄올 추출물은 감압·농축한 후 hexane을 이용하여 엽록소 등 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate로 flavonoid를 추출한 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. Ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. Aglycone 분획 제조 방법은 ethyl acetate 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 물로 세척하고 다시 ethyl acetate로 추출하여 이를 감압·농축한 후 실험에 사용하였다.

2.3. 참죽나무 새순 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical 소거활성을 측정하는 DPPH 실험법은

매우 간편하고 짧은 시간에 결과를 알 수 있기 때문에, 선정된 식물 추출물의 항산화 물질을 검색하는 경우나 항산화 화장품 원료들의 비교 평가 시에 이용하기 적합하다. 참죽나무 새순 추출물 또한 free radical 소거활성을 DPPH법을 통하여 확인하였다. 실험방법은 methanol에 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. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)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(총 항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 의해 각종 ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, 그리고 H_2O_2)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 참죽나무 새순 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL 를 가한 후 35 mM luminol 80 μL 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μL 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2 와 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 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_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)로서 표기하였다.

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

2.4. 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 등이 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 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 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 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 참죽나무 새순 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

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 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투

광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 참죽나무 새순 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 32 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

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, IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.6. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 참죽나무 새순 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

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

참죽나무 새순(*C. sinensis*) 추출물들의 free radical

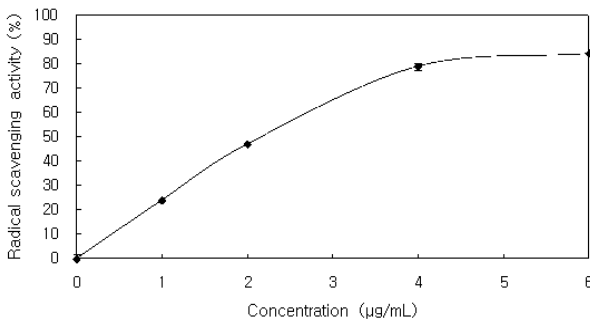


Figure 1. Free radical scavenging activity of aglycone fraction of *C. sinensis*.

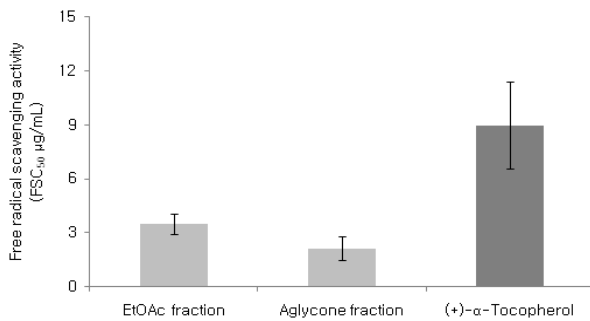


Figure 2. Free radical scavenging activity of extract and fractions of *C. sinensis* and reference.

소거활성(FSC₅₀) 측정 결과를 측정하였을 때 참죽나무 새순 ethyl acetate 분획인 경우는 3.54 µg/mL, aglycon 분획(Figure 1)은 2.15 µg/mL으로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol의 FSC₅₀는 8.98 µg/mL로 나타났다. 참죽나무 새순 추출물의 ethyl acetate 분획은 (+)-α-tocopherol보다 약 2.5배, aglycone 분획은 약 4배 더 우수한 free radical 소거활성을 나타내었다(Figure 2).

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420 ~ 450 nm에서 발광한다. 참죽나무 새순 추출물 ethyl acetate 분획의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 0.15 µg/mL으로 나타났으며 aglycon 분획(Figure 3)의 총항산화능은 0.12 µg/mL로 나타났다. 비교물질은 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총항산화능은 1.50 µg/mL로 나타났다. 참죽나무 새순 추출물의 ethyl ace-

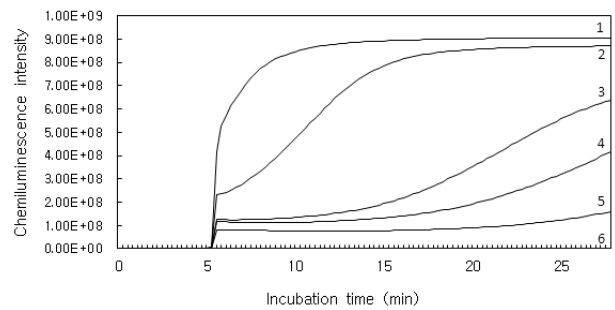


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of *C. sinensis* extract (Aglycone fraction) in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. [FeCl₃ · 6H₂O] = 25 µM, [EDTA] = 50 µM, [H₂O₂] = 3 mM, [luminol] = 1.4 mM, concentrations of aglycone extract from *C. sinensis* EtOAc fraction: 1: control, 2: 0.05 µg/mL, 3: 0.1 µg/mL, 4: 0.25 µg/mL, 5: 0.5 µg/mL, 6: blank.

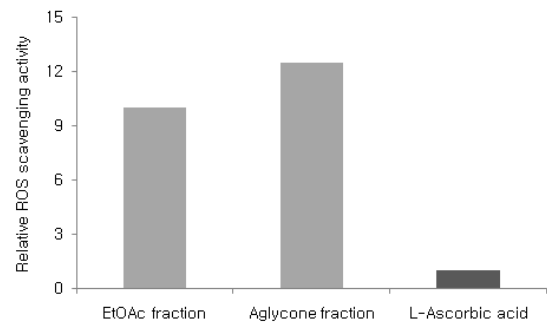


Figure 4. Relative reactive oxygen species scavenging activity of *C. sinensis* extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

tate 분획 및 aglycon 분획 모두 L-ascorbic acid 보다 약 10배 정도의 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다(Figure 4).

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

참죽나무 새순 추출물 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 적혈구 광용혈법으로 측정하였고 ethyl acetate 분획의 농도에 따른 세포 보호 효과를 Figure 5에 나타내었다.

적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 참죽나무 새순 추출물의 ethyl acetate 분획 경우는 적혈구 세포가 50

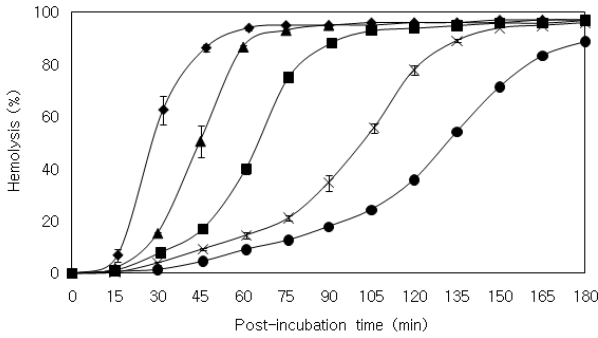


Figure 5. Cellular protective effects of *C. sinensis* extracts (ethyl acetate fraction) against 1O_2 -induced photo-hemolysis of human erythrocytes (Control = 30 ± 2.80). Irradiation time : 15 min, pre-incubation time: 30 min, [rose-bengal] = 11 μ M, concentrations of ethyl acetate fraction from *C. sinensis* extract: \blacklozenge - \blacklozenge : control, \blacktriangle - \blacktriangle : 5 μ g/mL, \bullet - \bullet : 10 μ g/mL, X-X : 25 μ g/mL, \blacksquare - \blacksquare : 50 μ g/mL.

% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})이 농도 범위 5, 10, 25 μ g/mL에서 각각 44.70, 65.50, 101.80 min으로, aglycone 분획의 경우 같은 농도 범위에서 각각 96.80, 155.30, 358.40 min으로 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었다. 참죽나무 새순 추출물들의 세포보호 효과는 10 μ g/mL에서 ethyl acetate 분획(65.50 min)에 비하여 aglycon 분획(155.30 min)이 우수하게 나타났고, 비교물질로 사용한 지용성 항산화제 (+)- α -tocopherol의 세포 보호효과는 동일농도 10 μ g/mL에서 38.00 min으로 나타났다. 특히 참죽나무 새순의 aglycon 분획은 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol과 비교하여 볼 때 동일 농도에서 약 4배 정도 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. 따라서 tyrosinase 저해 활성을 통하여 미백 효능을 측정할 수 있다.

참죽나무 새순 추출물 중 ethyl acetate 분획의 경우에 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 48.00 μ g/mL, aglycon 분획의 tyrosinase 저해활성은 5.88 μ g/mL으로 나타났으며, 비교물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘

Table 1. Effects of extracts from *C. sinensis* and reference compounds on the Rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes

	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)		
Concentration (μ g/mL)	5	10	25
<i>Cedrela sinensis</i> extract (ethyl acetate fraction)	44.70 \pm 1.80	65.5 \pm 2.66	101.80 \pm 1.63
Aglycone fraction from <i>Cedrela sinensis</i> extract (ethyl acetate fraction)	96.80 \pm 0.67	155.30 \pm 4.41	358.40 \pm 8.42
(+)- α -Tocopherol	-	38.00 \pm 1.80	-

¹⁾Control, τ_{50} = 31.00 \pm 1.00 min

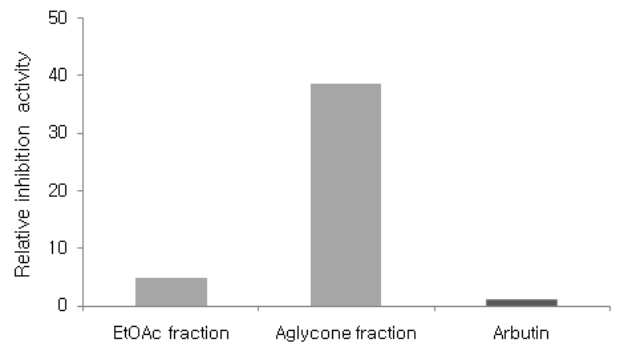


Figure 6. Relative inhibition activity of fractions from *C. sinensis* and arbutin on tyrosinase.

알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 μ g/m에 비해서도 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다(Table 2). 비교물질인 arbutin에 비해 참죽나무 새순 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획의 tyrosinase 저해활성은 각각 4.72배, 38.59배 더 크다는 것을 알 수 있다(Figure 6). 따라서 참죽나무 새순 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획은 미백 기능성 화장품의 원료로 사용하기에 우수한 효능을 갖는다고 사료된다.

4. 결 론

1) 참죽나무 새순 추출물의 free radical 소거 능력(FSC₅₀)은 ethyl acetate 분획의 경우 3.54 μ g/mL, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycon 분획의 경우 2.15 μ g/mL으로 모두 (+)- α -tocopherol (8.98 μ g/mL)에 비하여 우수한 free radical 소거능력을 나타냈다.

2) 참죽나무 새순 추출물의 활성산소 소거활성

Table 2. Inhibitory Activity of Extracts from *C. sinensis* and Reference on Tyrosinase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
<i>C. sinensis</i> extract (EtOAc fraction)	48.00 ± 1.42
<i>C. sinensis</i> extract (Aglycone fraction)	5.88 ± 0.18
Arbutin	226.88 ± 1.03

(OSC₅₀)은 ethyl acetate 분획 0.15 µg/mL, aglycon 분획 0.12 µg/mL로 나타났으며 이는 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)에 비하여 약 10배 더 우수한 활성산소 소거 능력을 나타냈다.

3) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 참죽나무 새순 추출물 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 농도 범위(5 ~ 25 µg/mL)에서 농도-의존적으로 ¹O₂에 의해 유도된 용혈을 크게 억제하였다.

4) 참죽나무 새순 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 각각 48.00 µg/mL, 5.88 µg/mL로 나타났고 aglycone 분획의 경우 arbutin (226.88 µg/mL)에 비해 40배 정도 더 우수한 tyrosinase 저해 활성을 나타냈다.

참죽나무 새순 추출물의 항산화 활성과 ethyl acetate 분획과 aglycon 분획의 tyrosinase 저해활성은 참죽나무 새순 추출물의 항산화 및 미백 화장품으로의 응용 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. D. Harman, Free radical theory of aging, *Mutat. Res.*, **275** (1992).
2. B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettner, Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: An electron paramagnetic resonance study, *Photochem Photobiol.*, **59**(1) (1994).
3. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UAB) and skin antioxidants, In *Free Radical Damage and its Control*, 239, C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, Elsevier Science B. V. (1994).
4. B. A. Jurkiewicz, D L. Bissett, and G. R. Buetter, Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J.*

- Invest. Dermatol.*, **104**(484) (1995).
5. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**(79) (1989)
6. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, Reactive oxygen intermediate in biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**(137) (1986).
7. 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).
8. A. Oikarinen, J. Kavonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**(15) (1985).
9. C. Joshi, C. Carrarob, and A. Pathak, Involvement of reactive oxygen species in the oxidation of tyrosine and dopa to melanin and in skin tanning, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **142**(1) (1987).
10. J. M. McCord and I. Fridovich, Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, **244**(22) (1969).
11. A. L. branen, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. AOCS*, **52**, 59 (1975).
12. Y. J. Choi, How to use and methods of cultivation of wild greens, Osung, Seoul (1992).
13. K. Yoshimura, Irradiance heterogeneity within crown affects photosynthetic capacity and nitrogen distribution of leaves in *Cedrela sinensis*, *Plant Cell Environ.*, **33**(5) (2010).
14. M. H. Lee, J. K. Cho, K. S. Kim, B. Y. Kim, and K. S. Park, Survey on the content go calcium, copper, lead and zinc in edible herbs in Korea, *Nongsa Sihom Yongu pogo*, **25**(69) (1983).
15. I. S. Lee, C. W. T. T, K. S. Song, Y. H. Seong, and K. H. Bae, Antioxidant constituents from the leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **14**(5) (2006).
16. J. C. Park and S. H. Kim, Seasonal variation of flavonoid contents in the leaves of *Cedrela sinensis*, *Korean J. Soc. Food Nutr.*, **24**(4) (1995).
17. J. C. Park, H. S. Young, Y. B. Yu, and J. H. Lee, Studies on the chemical components and biological

- activities of edible plants in Korea(I), *Yakkak Hoeji*, **37**(3) (1993).
18. J. C. Park, S. S. Chun, and S. H. Kim, Changes on the quercitrin content in the preparation for the leaves of *Cedrela sinensis*, *Korean J. Soc. Food Sci.*, **11**(3) (1995).