

## 울릉도 자생식물 삼나무(*Aruncus dioicus*)의 항산화 활성 검증

김동희 · 문용선 · 손준호

### Verification of anti-oxidative activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleungdo

Dong-Hee Kim · Yong-Sun Moon · Jun-Ho Son

Received: 9 March 2015 / Revised: 18 March 2015 / Accepted: 18 March 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The extracts of *Aruncus dioicus* were investigated for anti-oxidant and biological activities in order to verify its potential as functional ingredients of cosmetic products. The ethyl acetate (EtOAc) extract of *A. dioicus* showed excellent scavenging activity using DPPH and ABTS anti-oxidant analysis at the 1,000 µg/mL concentration. While tyrosinase inhibitory effect was measure for whitening assay and showed 59.2%, the suppression levels of elastase and collagenase were 56% and 90% respectively for anti-wrinkle activity. Therefore, it is plausible to conclude that *A. dioicus* extract, especially EtOAc fraction which has outstanding whitening, anti-oxidant, and anti-wrinkle activities, could be used as a new functional materials for cosmetics.

**Keywords** Anti-oxidant, Anti-wrinkle, *Aruncus dioicus*, Whitening

#### 서론

인체의 피부는 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 유도되며 산화적

스트레스를 받게 된다. 일부 활성산소에 의한 자유 라디칼 반응으로 단백질 변성과 유전자 손상으로 종양 및 노화 등이 발생한다(Park et al. 2008). 특히 자외선과 같은 외적 스트레스는 피부의 탄력과 윤택을 감소시키고(Voegeli 1996), 세포내의 tyrosinase라는 효소에 의해 만들어지는 멜라닌은 자외선·건조·극한 온도 등에 대한 피부 저항력을 높여주지만, 과도한 멜라닌 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 색소 침착을 일으키고, 피부의 노화를 유발한다(Invengar and Mcevely 1992). 또한 피부의 진피조직 속에는 피부의 탄력성과 관련된 collagen과 elastin이 그물망구조를 형성하고 있는데, collagenase와 elastase에 의해 이들이 분해되어 피부가 처지고 주름이 생겨 피부노화가 발생한다(Lee et al. 2003). 활성산소종과 자외선에 의한 피부노화 감소를 위해 피부에 적용 가능한 항산화제 연구 개발이 활발하게 이루어지고 있지만, 기존의 합성물질들은 만성독성, 발암, 돌연변이 유발 등의 이유로 사용이 제한적이기 때문에 안전하면서 효과가 뛰어난 천연물질 개발이 필요하게 되었다.

삼나무(*Aruncus dioicus*)은 울릉도에서 자생하는 장미과에 속하는 다년생 식물이다. 삼나무의 주성분은 사포닌, 살리실알데히드, 칼슘, 인, 지질, 비타민 A 등이 다량 함유되어 있다. 기능성 물질인 flavonoids 및 polyphenol 등이 유해 산소를 막아 항암, 면역증진과 간기능 강화 등에 효과가 있다는 연구결과가 보고되었다(Lee 2003). 삼나무에 관한 연구는 삼나무 ethanol 추출물이 당뇨에 미치는 영향에 관한 연구(Shin et al. 2008)와 삼나무 미백 및 주름효과에 대한 세포실험은 보고되었으나(Kim et al. 2012; Kim et al. 2013), 항산화에 관한 내용은 전무한 상태이다. 이에 본 연구에서 DPPH와 ABTS 실험을 통하여 삼나무 추출물의 항산화 효과를 확인하고 tyrosinase 및 collagenase와 elastase의 활성 억제 실험을 통해 미백 및 항주름 효과를

†Two authors equally contributed in this research.

D.-H. Kim<sup>†</sup> · Jun-Ho Son (✉)  
한국한방산업진흥원  
(Team of Herbal Product Development, Korea Promotion  
Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongbuk, 712-260,  
South Korea)  
e-mail: bio115@dgom.re.kr

Y.-S. Moon<sup>†</sup>  
영남대학교 원예생명과학과  
(Department of Horticulture & Life Science, Yeungnam University,  
214-1 Daedong, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-749, South Korea)

검증하여 새로운 화장품의 기능성 소재로서의 가능성을 확인코자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 추출물

본 실험에 사용한 삼나무(*A. dioicus*)은 경북 울릉군 울릉 웰빙 식품에서 식물분류가 검증된 재료를 구입하여 사용하였다. 실험재료인 건조 삼나무는 울릉도 서면에서 60×45 cm 간격으로 가을에 노지에 직파하여 차광재배하고, 2009년 4~5월경 수확 후 건조하였다. 삼나무 5 kg을 70% acetone을 가하여 상온에서 1주일간 3회 추출한 다음 거름종이(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압 농축하여 acetone 추출물(1,174 g)을 얻었다. 이 acetone 추출물을 증류수에 현탁 시킨 후 용매 극성 차를 이용해 서로 다른 용매(hexane, ethyl acetate; EtOAc, butanol)를 첨가하여 단계적으로 각각 hexane (15.8 g), EtOAc (129.7 g), butanol (182.9 g), 및 추출 후 수용액에서 854.6 g의 잔여물을 얻었다.

### DPPH 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability)은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 50  $\mu$ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) 100  $\mu$ L 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군, 및 비타민 C를 대조군으로 사용하여 흡광도 감소율을 나타내었다.

### ABTS+ cation radical scavenging activity 측정

2,2-azino-bis (3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ 양이온 탈색법을 변형하여 측정하였다(Roberta et al., 1999). 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 100  $\mu$ L의 ABTS+에 시료 50  $\mu$ L를 가하여 1분 동안 반응한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Tyrosinase 활성저해 측정

Tyrosinase 활성 저해를 측정하기 위해 Yagi 등(1986)의 방법을 변형하여 이용하였다. 반응구는 100  $\mu$ L의 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 10 mM L-DOPA 40  $\mu$ L와 시료 20  $\mu$ L의 혼합액에 버섯유래 tyrosinase (110 U/mL)

40  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해는 시료의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### Elastase 활성저해 측정

Elastase 활성 저해는 변형된 Cannell 등(1988)의 방법을 활용하였다. 기질로서 n-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 반응 후 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시료를 일정 농도가 되도록 조제하여 40  $\mu$ L씩 시험관에 취하고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (0.5 U/mL) 40  $\mu$ L를 가한 후 80  $\mu$ L의 기질 n-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide(mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. 시료의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 elastase 활성 저해 정도를 나타내었다.

### Collagenase 활성저해 측정

Collagenase 활성 저해 정도는 Lee와 An (2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 반응구는 4-phenylazobenzyl-oxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.5 mg/mL)를 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 녹이고, 이 기질 125  $\mu$ L와 시료 50  $\mu$ L의 혼합액에 75  $\mu$ L collagenase (0.2 mg/mL)를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후, EtOAc 1,500  $\mu$ L을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 활성 저해는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 삼나무 EtOAc 분획물의 우수한 DPPH 전자공여능

Free radical은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데, 폐놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다(Kim et al. 1995). DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cysteine·glutathion과 같은 함황 아미노산과 l-ascorbic acid·BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 삼나무 추출물의 전자공여능은 1,000  $\mu$ g/mL에서 acetone 추출물(88.5%), hexane 분획물(63.43%), EtOAc 분획물(99.3%), butanol 분획물(87.8%)과 59.9%의 수

용액 잔여물을 획득하였으며, 대조군인 vitamin C (Vit. C)에서는 96.9%의 전자공여능을 나타내었다(Fig. 1). 삼나물 분획물 중 EtOAc 분획물이 가장 강한 전자공여능을 나타내었으며, 이는 Lee와 Park (2008)의 제비꽃 추출물의 항산화 효과 실험에서 같은 농도 1 mg/mL에서 methanol 추출물(10.4%), ethanol 추출물(12.7%), acetone 추출물(21.1%)보다 현저히 높은 전자공여능을 확인하였다. 또한 Kwon 등 (2008)의 연구결과에서 같은 농도의 산겨릅나무 ethanol 추출물과 열수 추출물, 수용액 분획물이 보여준 각각 85.3%, 77.7%와 79.8%의 높은 항산화 효과보다 삼나물 EtOAc 분획물의 더욱 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

삼나물 농도에 따른 ABTS+ 양이온 radical 소거능 증가

ABTS 양이온 radical 소거능은 2,2-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)와 potassium persulfate

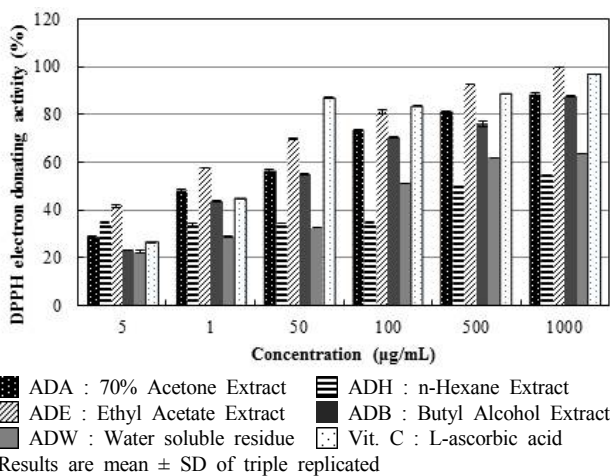


Fig. 1 DPPH electron donating ability of solvent fractions from *Aruncus dioicis* extract

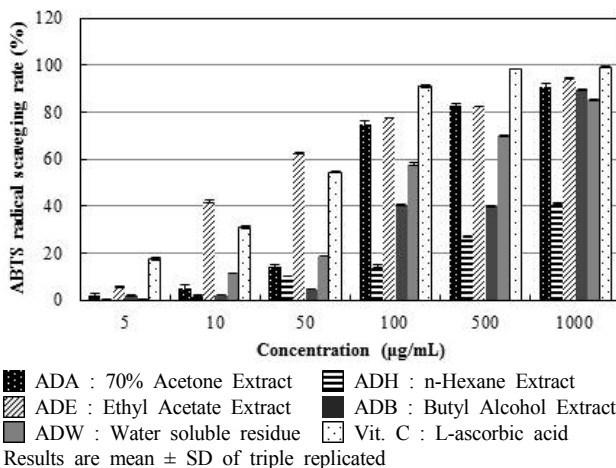


Fig. 2 ABTS<sup>+</sup> cation radical scavenging activity of solvent fractions from *Aruncus dioicis* extract

와의 반응으로 ABTS+ radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되는데, 시료를 첨가함에 따라 연한 녹색으로 탈색 되는 것을 측정하는 방법으로 hydrogen-donating anti-oxidant 와 chain breaking anti-oxidant 모두를 측정할 수 있다. 각 시료용액 1,000 µg/mL 농도에서 ABTS radical 소거능은 acetone 추출물은 90.9%, hexane 분획물 41.4%, EtOAc 분획물 94.0%, butanol 분획물 89.8%과 마지막 수용액에서 81.9% 각각 나타내었으며, 대조군에서는 99.1%의 radical 소거능을 나타내었다. 이와 같은 DPPH와 ABTS 항산화 실험 결과는 삼나물의 항산화 물질들은 대부분 ethyl acetate 층에 함유되어 있으며, Oh 등 (2010)의 울금과 강황 추출물(1,000 µg/mL)의 75% 이상의 효능 보다 훨씬 우수하다는 것을 나타냈다(Fig. 2).

Tyrosinase 활성 저해로 인한 미백효과

Tyrosinase는 melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하여 melanin을 합성하는데 중요한 효소로 작용한다(Lee et al. 2001). 이렇게 피부 내에서 melanin 중합체 생합성 억제효과를 측정하기 위하여 버섯유래의 tyrosinase 활성 억제 정도를 관찰하였다. 삼나물 EtOAc 분획물 1,000 µg/mL 농도에서 59.2% tyrosinase 활성 억제 효능을 나타냈으나 이외의 분획물에서는 미백효과가 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). An 등(2005)은 진달래꽃의 열수 및 EtOH 추출물의 tyrosinase 활성 저해를 측정된 결과 삼나물과 같은 농도 1,000 µg/mL에서 각각 24.0%와 48.0%의 저해를 나타낸 결과를 보고하였으며, 삼나물의 EtOAc 분획물의 미백효능이 더욱 우수함을 기대할 수 있었다.

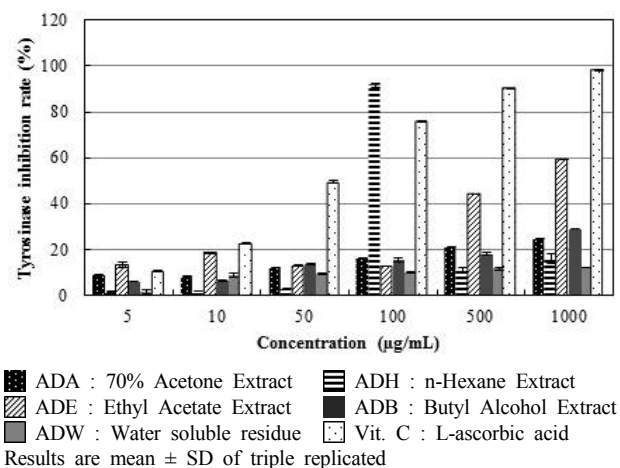


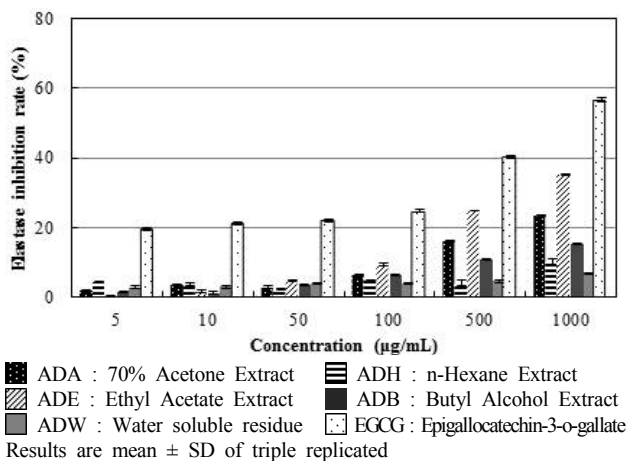
Fig. 3 Tyrosinase inhibition activity for whitening effect from *Aruncus dioicis* extracts

### Elastase 활성 억제로 인한 항주름 효과

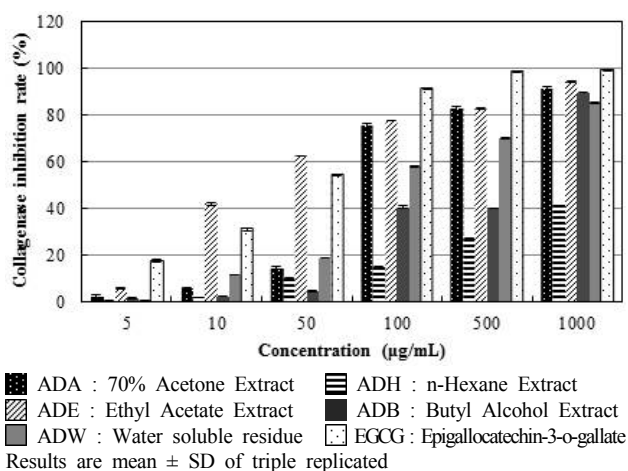
Elastase는 단백질인 elastin을 분해하는 효소이며, 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 주름 생성과 관련한 elastase 활성 저해를 측정한 결과 Fig. 4와 같이 나타났다. Lee 등(2010)은 백련 꽃, 뿌리, 잎 추출물의 1,000 µg/mL 농도에서 elastase 활성을 10-30% 저해를 확인하였다. 대조군인 epigallocatechin-3-o-gallate (EGCG)의 경우 1,000 µg/mL에서 56%의 elastase 활성 억제 효과와 비교해보면 삼나물의 여러 분획물들은 10.1~23.5%, 특히 EtOAc 분획물에서 35.2%의 높은 억제효과가 나타났다.

### Collagenase 활성 억제로 인한 항주름 효과

Collagen은 많은 섬유아세포(fibroblast)에 의해 생성되며 2~4%의 elastin, glycosamino-glycans와 같은 당단백질 등과



**Fig. 4** Elastase inhibition activity for anti-wrinkle effect from *Aruncus dioicis* extracts



**Fig. 5** Collagenase inhibition activity for anti-wrinkle effect from *Aruncus dioicis* extracts

함께 세포외기질(extracellular matrix)의 70~80%를 구성한다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선에 의한 광노화에 의해 감소하며 피부 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다(Kwak et al. 2005; Kim et al. 2004; Jeroma et al. 1998). 또한 collagen은 collagenase에 의해 분해되어 주름을 형성함으로써 삼나물 추출물의 collagenase 활성 억제 정도를 Fig. 5과 같이 측정하였다. 삼나물 acetone 추출물의 경우 1,000 µg/mL의 농도에서 87%, hexane 분획물(41%)을 제외한 대부분의 용매 분획물의 경우 82% 이상의 높은 효소활성 억제 효과가 나타났고, 특히 EtOAc 분획물은 90% 억제율로 대조군인 EGCG의 98%와 유사한 저해능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Kang (2007)의 토사자, 음양곽, 건지황 250 µg/mL에서 각각 40%, 37.5%, 35%의 저해능과 비교 시 삼나물 EtOAc 분획물은 100 µg/mL에서 거의 80%의 높은 collagenase 활성억제 효능을 확인할 수 있었다.

### 적 요

삼나물 추출물의 항산화 및 생리활성 효과를 검증하여 화장품의 기능성 소재로서의 가능성을 검증하였다. 항산화 실험 결과 삼나물의 ethyl acetate (EtOAc) 분획물 1,000 µg/mL 농도에서 DPPH, ABTS와 같은 전자 공여능 실험에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 미백효과 측정을 위한 tyrosinase 활성 억제도 삼나물 EtOAc 분획물에서 59.2%의 효과를 나타내었고, elastase 활성은 56% 그리고 collagenase 활성은 90% 저해효과로 항주름 효과가 검증되었다. 따라서 삼나물 추출물 특히 EtOAc 분획물은 우수한 항산화, 항주름 및 미백 생리활성으로 화장품의 새로운 기능성 소재로서 응용이 가능함을 확인하였다.

### References

- An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Choi CH, Park TS (2005) Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. J Kor Soc Appl Biol Chem 48:280-284
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1120
- Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM (1988) Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Media 54:10-14
- Invengar R, Mcevely AJ (1992) Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. Trends Food Sic Technol 3:60-63
- Jeroma SP, Gabrielle L, Raul F (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. J Invest Dermatol 90:48-54

- Kang KS (2007) The Evaluation of Anti-wrinkle Effects in Oriental Herb Extract. *J Life sci* 17:1147-1151
- Kim DH, Moon YS, AN BJ, Son JH (2012) Potent anti-aging activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleung-do, South Korea, in CCD-986sk fibroblsts via suppression of matrix metalloproteinases. *J Nat Med* 66:631-636
- Kim DH, Moon YS, Park TS, Son JH (2013) Potent whitening activity of *Aruncus dioicus* extract in B16F10 melanoma cell by suppression of melanin biosynthesis. *Kor J Kort Sci Technol* 31:813-820
- Kim HK, Kim YE, Do JR, LEE YC, Lee BY (1995) Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *J Food Sci Technol* 27:80-86
- Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KS (2004) Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J Soc Cosmet Sci Kor* 30:15-22
- Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, Lee JS (2005) Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Kor J Medi Crop Soc* 13:213-216
- Kwon HN, Park JR, Jeon JR (2008) Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *J Kor Soci Food Sci Nutri* 37:1389-1394
- Lee BB, Park SR (2008) Antioxidant activity and inhibition activity against a glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Kor Soci Food Sci Nutri* 37:405-409
- Lee CB (2003) Coloured flora of Korea. (Ed 1<sup>st</sup>) Hyangmoonsa, Seoul, Korea
- Lee JY, An BJ (2012) Whitening and Anti-wrinkling Effects of Fractions from *Prunus persica* Flos. *Kor J Microbiol Biotechnol* 40:364-370
- Lee JY, Yu MR, An BJ (2010) Comparison of biological activity between *Nelumbo nucifera* G. extracts and cosmetics adding *Nelumbo nucifera* G. *J Life Sci* 20:1241-1248
- Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, Riu KZ (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor J Pharma* 32:175-180
- Lee SY, An JH, Cho HY (2003) Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J Kor Soc Agric Chem Biotechnol* 46:60-65
- Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS (2010) Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcumae longae* radix and *Curcumae longae* rhizoma. *Kor J Herbol* 25:83-91
- Park K, Lee JP (2008) Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep* 19:413-417
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical boil Medi* 26:1231-1237
- Shin JW, Lee SI, Woo MH Kim SD (2008) Effect of Ethanol Extracts of Goat's beard on streptoxotocin induced diabetic symptoms and oxidative stress in rats. *J East Asian Soc Die Life* 18:939-948
- Voegeli R (1996) Elastase and tryptase determination on human skin surface. *Cos Toil* 111:51-58
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Media* 3981:517-519