

초두구와 빈랑 추출물의 자유라디칼 소거 활성 효과와 특성에 관한 연구

강순옥*, 이건국, 최정도*

주)코리아나화장품, 충북대학교 자연과학대학 생명과학부*

Free radical scavenging activity and characterization of the extracts from *Alpinia katsumadai* and *Areca catechu*

Soon-OK Kang*, Kun-Kook Lee, and Jung-DO Choi*

R&D Center, Coreana Cosmetics Co. Ltd.

Department of Biochemistry, Chungbuk National University*

요 약

자유라디칼은 반응성이 커서 세포의 구성 물질인 단백질, 지질, 당, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직을 손상시킴으로서 노화를 가져온다. 이러한 자유라디칼들은 자외선, 일반 대사, 스트레스, 질병, 흡연 등에 의해 생성되고 특히, 활성 산소 종인

hydroxyl radical, superoxide radical, lipid peroxide radical 등은 피부 노화를 발생시키는 원인이 된다. 따라서 본 연구에서는 한방 식물로부터 유해한 활성 산소종을 소거하는 활성을 가진 물질을 찾기 위해 1차 스크리닝 하였고, 이 중 육두구, 관중, 초두구, 빈랑, 금은화, 포공영, 우롱차, 황금, 녹차 추출물이 효과가 높게 나타났으며, 그중 초두구 와 빈랑 90% 메탄을 추출물에서 가장 우수한 소거 활성을 나타냄으로써 이 추출물에 대하여 자유라디칼 소거 활성에 대하여 여러 가지 생물학적 활성을 조사하였다. 초두구과 빈랑추출물 에 대한 hydroxyl radical, superoxide radical, lipid peroxide radical을 소거하는 활성을 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물층으로 분획하여 조사한 결과 에틸아세테이트층에서 가장 우수한 활성을 보였다. 에틸아세테이트 분획에 대한 lipid peroxide radical 소거에 있어서 빈랑 추출물이 IC₅₀ 값 50 µg/ml, 초두구 추출물은 IC₅₀ 값 59 µg/ml로서 기준물질로 사용되는 vitamin C (120 µg/ml)나 butylated hydroxyl toluene (80 µg/ml) 보다 더 우수한 소거 효과를 보여주었고, hydroxyl radical을 소거하는 능력은 25 µg/ml와 150 µg/ml로 hydroxyl radical의 소거 능이 좋은 vitamin C (180 µg/ml) 보다 뛰어난 소거 활성을 나타내었다. Superoxide radical을 소거하는 효과는 초두구 추출물의 IC₅₀ 값이 10 µg/ml, 빈랑 추출물이 15 µg/ml을 나타냈고, 이는 기준 물질인 vitamin C (35 µg/ml)보다 좋은 소거 활성을 보여주었으며, gallic acid 9 µg/ml과 유사한 효과를 나타내었다. 사람 섬유아 세포를 배양하여 hydroxyl radical과 superoxide radical를 발생시킨 후 초두구와 빈랑 추출물의 세포 보호 효과를 실험한 결과 25 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 각각 85% 이상의 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다. 초두구로부터는 자유라디칼 소거 활성이 있는 물질을 분리하기 위하여 분획한 후 가장 높은 소거 활성을 보인 에틸아세테이트 층에 대하여 silica column chromatography, preparative TLC를 수행하였다. 초두구로부터 분리된 물질은 HPLC를 이용한 분리에서 phenolic 물질인 gallic acid와 동일한 retention time을 보여줌으로써 초두구로부터 분리된 물질은 gallic acid와 유사한 phenolic 물질이거나 그의 유도체일 것으로 추측된다. 따라서, 초두구와 빈랑 추출물은 피부 노화의 주요인 이 되고 있는 lipid radical, hydroxyl radical, superoxide radical을 소거하는 활성이 뛰어나 자유라디칼에 의하여 발생하는 피부노화를 방지할 수 있는 물질로서의 효과가 기대된다.

I. 서 론

활성 산소종은 반응성이 매우 높아 피부의 주요 구성 물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산과 반응하여 세포에 손상을 주고 피부 노화를 가져오게 된다 (5). 활성 산소의 종류로는 일반적으로 lipid radical ($\text{LOO}\cdot$), superoxide radical ($\text{O}_2\cdot^-$) 과 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)과 같은 radical 뿐만 아니라 비 라디칼인 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), lipid peroxide (LOOH), N-chloramine 성분들을 포함한다 (2). 이들 활성 산소종은 노화, 특히 피부 노화와 각종 성인병의 원인으로 관심의 대상이 되고 있다. 지속적인 자외선에의 노출은 피부에 존재하는 유리 산소 분자와 반응하여 superoxide radical을 만들 수 있으며, superoxide radical은 여러 반응 경로를 거쳐서 singlet oxygen, hydroxyl radical, 또는 hydrogen peroxide와 같은 유해 활성 산소종을 만든다 (3). 활성 산소종은 피부의 결합조직의 고분자들을 손상시킬 수 있다. 특히, hydroxyl radical의 경우는 결합조직 고분자 기질들인 collagen, hyaluronic acid, elastin, proteoglycan, laminin, fibronectin 등을 순차적으로 절단할 수 있다 (4). 또한 활성 산소종은 matrix metalloproteases (MMPs)를 유도함으로써 이들 결합조직 구성 분자들을 분해한다 (5). $^1\text{O}_2$ 는 배양된 사람의 섬유아 세포에 노출시켰을 때 농도 의존적으로 collagenase (MMP-1) mRNA가 유도됨을 보여 주었으며, $\text{O}_2\cdot^-$ 는 MMP-1의 합성을 유도하는 것으로 보고되었다 (4). 결합조직 성분인 hyaluronic acid 또한 활성 산소 종과의 반응으로 손상을 받는데, 최근 피부 노화와 관련해서 관심의 대상이 되고 있다. 활성 산소종에 의한 손상은 이러한 결합조직 성분들뿐 아니라 DNA도 활성 산소종에 의해 DNA를 이루고 있는 성분들이 공격을 받아 돌연변이, 암의 유발 등 다양한 손상을 입을 수 있다 (6).

본 연구에서는 피부 노화의 주원인이 되고 있는 활성 산소종을 소거할 수 있는 물질을 찾아내기 위하여 여러 한방 식물 추출물의 소거 활성을 조사한 결과 초두구가 활성이 가장 뛰어남으로써 초두구 추출물로부터 자유라디칼을 소거 할 수 있는 물질을 찾아내고, 이 추출물들에 대한 자유라디칼 소거 활성을 활성 산소 중 세포 및 조직 손상을 초래하여 피부 노화의 주원인으로 관심의 대상이 되고 있는 lipid peroxide radical, superoxide radical, hydroxyl radical들에 대한 각각의 소거 능력을 in vivo와

in vitro에서 폭넓게 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

생약 식물들은 한약 재료상에서 구입하였고, 녹차, 금은화, 황금, 포공영, 우롱차는 화장품 원료회사인 바이오랜드로부터 제공받았다.

자유라디칼 소거 작용에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 lipid radical소거 작용에 필요한 linolenic acid, superoxide radical소거 작용에 필요한 xanthine, xanthine oxidase, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 그리고 기준물질로서 사용된 vitamin C, butylated hydroxyl toluene (BHT)과 gallic acid는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. Ferric chloride와 hydroxyl radical소거 작용에 사용된 hydrogen peroxide와 ferrous chloride는 Junsei Chemical Co.로 구입하였다. TBA assay에 사용된 4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine은 ACROS Organics에서 구입하였다. 사람 섬유아 세포는 충북대 이찬희 교수의 바이러스 연구실로부터 제공받았고, MTT solution은 Boehringer Mannheim Science로부터 구입하여 사용하였다.

2. 사용기기

자유라디칼 소거 작용에 필요한 모든 분광학적 측정은 UV-VIS Spectrometer (Beckman)를 사용하였다. HPLC는 Jasco pu-980, pu-975를 사용하였고, column은 Hichrom RPB (250 x10 mm)를 사용하였다.

3. 한방 식물 추출물의 자유라디칼 소거 효과 측정

1) DPPH radical 소거 효과 측정

자유라디칼을 소거하는 효과에 대한 측정은 0.3 M DPPH 100 μ l에 메탄올 추출 용액 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 반응 시킨 후 517 nm에서 흡광도를

측정하였다 (7). 소거 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{\text{sample 흡광도값}}{\text{control 흡광도값}} \times 100$$

2) Lipid peroxide radical 소거 효과 측정

지질 과산화 반응을 위해 불포화 지방산인 linolenic acid 5 μl 에 에탄올 80 μl , 0.5 M glycine-HCl buffer (PH 3.6), 메탄올 추출 용액 20 μl , 30 mM FeCl₃ 8 μl 를 가한 후 1.5% 4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine 용액 20 μl 을 첨가하여 95 °C에서 15분 동안 끓여주었다. 이 반응액을 냉각시켜 반응 정지 후 부탄올 400 μl 를 가한 다음 3,000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하였다.. 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

3) Hydroxyl radical 소거효과 측정

펜톤 반응 (Fenton reaction)에 의한 지질 과산화 반응계를 이용한 TBA assay 로 측정하였다 (8). 리놀레이트산 5 μl 에 30 mM 염화제일철 8 μl , 30 mM 과산화수소 8 μl 그리고 식물추출액 20 μl 를 가한 후 TBA를 넣고 15분간 가열한 다음 냉각시키고, 부탄올을 첨가하여 532 nm에서 흡광을 측정하였다.

4) Superoxide radical 소거효과 측정

Xanthine, xanthine oxidase system에서 형성된 superoxide radical를 소거하는 능력을 SOD Test Wako 방법에 의해 측정하였다 (9).

0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) 2.5 ml에 1 mM NBT 용액 0.1 ml, 1.5 mM xanthine 용액 0.2 ml를 가하고 여기에 식물 추출용액을 0.1 ml 가한 다음 25 °C에서 5 분간 반응시킨다. 이 반응액에 xanthine oxidase 0.1 ml를 가하여 반응을 개시시킨다. 2 분 동안의 흡광도의 변화를 550 nm에서 측정하였다.

4. 사람 섬유아 세포배양에 의한 자유라디칼 보호 효과 측정

1) hydroxyl radical에 대한 세포 보호 효과 측정

사람 섬유아 세포를 2 x 10⁵ cells/well로 well plate에 놓고 10% FBS를 함유하는 EMEM 배지 0.2 ml을 공급한 후 24 시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한다. 여기에

DMSO에 녹인 식물 추출액을 처리한 다음 hydroxyl radical를 발생시키기 위하여 30 mM H₂O₂를 가한 후 24시간 동안 배양한다. 세포의 증식을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행한다. MTT assay는 배양한 세포에 MTT 용액 0.1 ml을 가한 후 4시간 동안 배양한 다음 배지는 제거하고 DMSO 0.5 ml를 넣어 형성된 formazan을 ELISA reader를 사용해 570 nm에서 흡광을 측정하였다 (10).

2) superoxide radical에 대한 세포 보호 효과측정

2 x 10⁵ cells/well을 well plate에 놓고 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 섬유아 세포에 DMSO에 녹인 식물 추출액을 처리하고 30 분 동안 배양하였다. 이 배양된 세포에 1.5mM xanthine 10 μ l 과 0.25 U xanthine oxidase 10 μ l 를 가하여 superoxide radical을 발생 시킨 후 24 시간 동안 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거한 후에 MTT assay를 수행하였다.

6. 자유라디칼 소거 작용이 있는 물질의 분리

(1) 분획

초두구 메탄올 추출물로부터 자유라디칼 소거 활성이 있는 물질을 분리하기 위하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물층으로 분획한 후 silica 크로마토그래피와 thin layer chromatography 그리고 HPLC를 수행하였다.

(2) Silica gel 컬럼 크로마토그래피

Silica gel (70-230 mesh) 850 g을 column (7 x 80cm)에 클로로포름을 넣어 충전한 다음 초두구의 분획중 에틸아세테이트 층 분말을 10 g 취하여 메탄올에 녹인 후 loading한다. Elution은 클로로포름 : 메탄올 : 물을 단계적으로 극성을 증가시키면서 2 l 씩 용출시켰다.

(3) Thin layer chromatography (TLC)

Column chromatography를 통하여 얻은 활성이 있는 분획을 클로로포름 : 메탄올

: 물 = 12 : 6 : 1 조건으로 preparative TLC를 행하여 활성 있는 부분만을 분취하여 메탄올에 녹인 후 거름종이로 여과하여 감압 농축하였다.

(4) High performance liquid chromatography

Preparative TLC를 통해 얻은 Hichrom RPB (250 x 10 mm)를 사용하였고, 용매는 메탄올: 물 = 40:60 (v:v), flow rate는 1 ml/min이었고, 280 nm에서 측정하였다. 대조로 사용된 gallic acid도 동일한 HPLC 조건하에서 수행하였다.

(5) 성분확인 실험

① 아미노산 : 추출액에 0.2% 닌히드린 시액을 넣고 수용액상에서 끓였을 때 자색으로 나타나는지를 관찰하였다.

② 페놀성 물질 : 추출액에 ferric chloride (1방울)를 가하면 암녹색을 나타내다가 여기에 hydrochloric acid를 한 방울 첨가했을 때 노란색으로 변화하는지를 관찰하였다.

③ 당 : 추출액에 5% α -나프톨 알콜시액을 2-3 방울 넣고, 황산 2 ml에 이 액을 천천히 가했을 때 접계면에 적자색을 나타내는지 관찰하였다.

④ Triterpenoids, saponins : 추출액에 무수초산을 가하고, 2분 동안 가열한 후 황산을 넣어 적갈색을 나타내는지 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 한방 식물 추출물들로부터 자유라디칼 소거 작용 측정

육두구, 관중, 초두구, 빈랑, 금은화, 포공영, 우롱차, 황금, 녹차의 90% 메탄올 추출액을 가지고 DPPH Test에 의한 자유라디칼 소거 활성은 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 그리고, 지질과산화에 의해 발생된 lipid radical을 소거하는 활성은 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ

g/ml의 농도에서 각각 측정하여 IC₅₀ 값을 계산 하였다.(Table 1). 각각의 추출물에 대한 자유라디칼 소거 활성을 측정한 결과 빈랑 추출물이 8 μg/ml의 IC₅₀ 값으로 가장 높았으며, 초두구 추출물이 높은 활성을 나타내었는데 IC₅₀ 값은 17 μg/ml이었다. 녹차 추출물도 초두구와 비슷한 소거 활성을 보여주었다. 지질과산화로부터 생성된 lipid radical에 대한 소거 활성의 측정에 있어서는 빈랑과 초두구 추출물의 IC₅₀ 값이 각각 60 μg/ml 과 100 μg/ml로 역시 좋은 활성을 나타내었다. 자유라디칼 소거에 있어서 초두구와 비슷한 활성을 나타낸 녹차 추출물은 lipid radical소거에 있어서는 IC₅₀ 값이 300 μg/ml로서 빈랑 및 초두구 추출물과 비교하였을 때 낮은 소거 활성을 보여 줌으로써 자유라디칼 뿐 아니라 lipid radical 소거 활성도 좋은 효과를 나타낸 것으로 조사되었다. 최근 자유라디칼들에 의한 피부 노화를 방지하는 물질들이 많은 식물 추출물로부터 보고되고 있고, 대표적인 물질로는 vitamin E와 vitamin C 그리고 카로티노이드, 플라보노이드 등이 있다. 이들은 대부분의 식물에 많이 함유되어 있는 성분으로서 자유라디칼의 소거활성 뿐만 아니라 항산화작용을 가진 물질로 화장품 및 의약품에 사용되고 있다. 따라서, 빈랑과 초두구 추출물은 자유라디칼과 lipid peroxide radical 소거 활성에 있어 한방 식물 추출물 중 뛰어난 소거효과를 나타냄으로서 이 추출물에 대한 자유라디칼 소거 활성에 관한 심도 있는 연구를 통하여 피부 노화를 방지하는 물질로 활용 될 수 있으리라고 사려된다.

Table 1. IC₅₀ values of plant extracts for free radical and lipid peroxide radical scavenging activity.

Materials	IC ₅₀ (μg/ml)	
	Free radical scavenging	Lipid peroxide scavenging
육두구	75	790
관중	22	>1000
초두구	17	100
녹차	18	300
금은화	42	>1000
황금	49	380
우롱차	38	670
빈랑	10	60

2. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 활성 측정

1) DPPH radical의 소거효과

초두구 (*Alpinia katsumadai*)는 생강과 (*zingiberaceae*) 식물로서 열대지방에서 자생한다. 약재로는 종자를 주로 사용하는데, 장관의 흥분 작용, 세균의 억제 작용 등의 약리 작용을 가지고 있어 한방 약재로 널리 사용되고 있는 식물이다 (11). 초두구의 성분으로는 α -caryophyllene, cardamomin, alpinetin 등이 알려졌다 (12).

초두구와 빈랑 추출물, 그리고 각 분획에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다 (Table 2). 빈랑과 초두구의 90% 메탄올 추출물에 대한 IC_{50} 값이 각각 $10 \mu\text{g/ml}$ $75 \mu\text{g/ml}$ 로 상당히 강력한 DPPH radical 소거 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 초두구와 빈랑의 에틸아세테이트 층에 대한 자유라디칼 소거 활성의 IC_{50} 값은 각각 $6 \mu\text{g/ml}$ 과 $20 \mu\text{g/ml}$ 로 나타내었다. 초두구 추출물 에틸아세테이트 층과 물층에서만 소거 활성을 나타내었고, 그 외 hexan과 크로로포름 층에서는 소거 활성이 나타나지 않았다. 소거 활성이 가장 높은 초두구의 에틸아세테이트 층은 기준물질인 vitamin C ($19 \mu\text{g/ml}$) 그리고 BHT ($18 \mu\text{g/ml}$)와 높거나 비슷한 소거활성을 보여줌으로써 빈랑 및 초두구추출물이 우수한 자유라디칼 소거 물질임을 알 수 있었다. DPPH radical 소거 활성 측정을 통하여 초두구 추출물이 자유라디칼을 소거하는 활성이 비교물질인 천연 항산화제로서 알려진 vitamin C나 합성 항산화제인 BHT보다 좋은 소거 활성을 나타냄으로써 자유라디칼로 발생되는 피부 노화를 방지하는 물질로 천연 한방 식물인 빈랑과 초두구 추출물이 자유라디칼소거 물질로서 효과가 있으리라고 생각한다.

2) Lipid Peroxide radical 에 대한 소거 활성

지질 과산화로부터 유도된 lipid peroxide radical을 소거하는 효과를 빈랑과 초두구 추출물 그리고 각 분획들에 대하여 측정하였다 (Table 2). 빈랑과 초두구의 90% 메탄올 추출물의 IC_{50} 값이 각각 $60 \mu\text{g/ml}$ 과 $260 \mu\text{g/ml}$ 로 lipid radical 소거활성을 보여 주었다. 에틸아세테이트 층에서의 IC_{50} 값은 각각 $50 \mu\text{g/ml}$ 과 $59 \mu\text{g/ml}$ 로 다른 분획들보다 높게 나타났다. Vitamin C나 BHT는 항산화 물질로 lipid peroxide radical을 소거하는 능력이 뛰어나 다양한 농도에서 비교하였다. Vitamin C의 lipid

radical소거에 대한 IC₅₀ 값은 120 $\mu\text{g/ml}$ 이고, BHT는 80 $\mu\text{g/ml}$ 로 에틸아세테이트 층은 vitamin C, BHT보다도 강력한 소거 활성을 보여주었다. 세포막의 손상은 활성 산소에 의해 개시되어 lipid radical등에 의하여 연쇄적으로 반응이 진행되어 세포에 더 커다란 손상을 가져 오게된다. 따라서 최근 항산화제 개발에 있어 활성 산소종의 소거뿐만 아니라 지질과산화의 연쇄반응을 차단하는 항산화제가 요구되고 있다. 따라서, 이들 결과로부터 빈랑과 초두구의 에틸아세테이트층은 지질 과산화로부터 유도된 lipid peroxide radical들을 효과적으로 제거하는 능력을 가지고 있어, 세포막의 손상을 보호하는 항산화제로서 빈랑과 초두구 추출물의 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

3) Hydroxyl radical 에 대한 소거 활성

환원 상태의 Fe(II)는 H₂O₂를 환원시켜 hydroxyl radical을 생성시키며 이렇게 생성된 hydroxyl radical은 매우 짧은 반감기를 가짐으로서 생체 물질들과 무작위적으로 반응한다. 그림으로 hydroxyl radical은 자유라디칼 중 가장 강력한 세포 손상을 가져 오는 radical의 하나로 피부 노화를 야기시키는 주원인으로 알려져 있다(13). 이러한 hydroxyl radical을 소거하는 효과를 빈랑, 초두구 90% 메탄올 추출물과 각 분획들에 대하여 측정하였다 (Table 2). 빈랑과 초두구 추출물의 IC₅₀ 값이 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 260 $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 소거 활성을 나타내었다. 분획들에 대한 소거 능의 측정 결과는 빈랑과 초두구 추출물 각각의 분획 중 에틸아세테이트 층의 소거 효과가 가장 높게 나타났다. 에틸아세테이트 층의 IC₅₀ 값은 25 $\mu\text{g/ml}$ 과 150 $\mu\text{g/ml}$ 로 hydroxyl radical을 소거하는 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 기준 물질인 vitamin C (180 $\mu\text{g/ml}$) 보다는 높은 소거 효과를 보여주었고, gallic acid (23 $\mu\text{g/ml}$) 와 비슷하거나 낮은 소거 활성을 나타내었다. 세포 및 조직의 손상에 대단히 커다란 손상을 주는 hydroxyl radical에 대한 소거 활성이 뛰어남을 확인하였다. Hydroxyl radical은 피부노화에 미치는 영향이 큰 반면 생체 내에는 이를 제거하는 효소가 존재하지 않음으로서 피부노화를 방지하기 위하여 소거가 필수적인 활성 산소종의 하나이다. 이들의 소거에 있어서 천연물로부터 분리된 phenolic 물질인 gallic acid와 vitamin C의 효과가 알려져 있는데, 이 두 물질보다 소거하는 작용이 뛰어난 빈랑, 초두구 추출물은 hydroxyl

radical을 효과적으로 소거하는 물질로서의 개발이 기대된다.

4) Superoxide radical에 대한 소거활성

Xanthine 과 xanthine oxidase system을 이용한 superoxide radical 의 생성은 NBT라는, superoxide radical에 의하여 환원시 푸른색을 띄는 시약을 사용하여 superoxide radical의 소거 활성을 측정하였다 (Table 2). 빈랑과 초두구의 90% 메탄올 추출물에 대한 superoxide radical 소거 활성 측정 결과 IC₅₀ 값이 각각 50 μ g/ml 과 25 μ g/ml로서 superoxide radical 소거 활성이 우수한 효과를 나타내었다. 각 분획들에 대한 소거 활성 측정에서도 다른 radical 소거 작용 측정에서와 마찬가지로 superoxide radical 소거 활성도 에틸아세테이트 층에서 가장 높게 나타났다. 반면에 다른 층에서는 거의 소거 활성을 보여주지 않았다. 에틸아세테이트 층에 대한 소거 활성은 15 μ g/ml과 10 μ g/ml의 IC₅₀ 값을 나타내었다. 기준 물질인 vitamin C 와 gallic acid로 소거 활성을 비교하였다. 초두구는 gallic acid (9 μ g/ml)와 비슷한 활성을 보였고, vitamin C (35 μ g/ml)보다는 3배 이상의 좋은 소거 활성을 나타내었다.

Superoxide radical은 세포막의 불포화 지방산들의 지질 과산화반응을 개시시켜 세포막 손상을 야기시킬 뿐 아니라 결합조직 단백질 중 특히, collagen을 분해할 수 있는 radical로 이를 소거하는 물질의 개발은 피부 노화의 방지에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2. Free radical scavenging activities of solvent fractions from *A. katsumadai*(*Areca catechu*).

Solvent	IC ₅₀ (μ g/ml)			
	Fractions	DPPH	Lipid peroxide	Hydroxyl radical
90%Methanol	75(10)	260(60)	260(50)	25(50)
Hexane	>100	0	>100	>100
Chloroform	>100	0	>100	>100
Ethyl acetate	20(6)	59(50)	150(25)	10(15)
Water	32(8)	300(50)	750	>100
Prep.TLC	8	25	24	7

3. 사람 섬유아 세포배양에 의한 보호 효과 측정

1) 사람 섬유아 세포에서 hydroxyl radical에 대한 세포 보호 효과 측정

세포에 가장 큰 손상을 주는 hydroxyl radical 작용에 대한 빈랑, 초두구 추출물의 섬유아 세포의 보호 효과를 알아보기 위하여 사람 섬유아 세포에 과산화수소로부터 hydroxyl radical을 유도하였고, 빈랑과 초두구 추출물을 각각 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 주었다. 사람 섬유아 세포에서의 빈랑과 초두구 추출물의 세포 보호 효과는 각각 98%와 87%로 나타내었다 (Fig. 1). Fig. 2에서는 사람 섬유아 세포에 hydroxyl radical을 발생시킨 후 이에 대한 빈랑, 초두구 추출물의 세포 보호 효과를 세포의 형태 변화로서 관찰하였다. Fig. 2의 A는 정상적인 사람 섬유아 세포이고, B는 hydroxyl radical에 의하여 손상된 세포의 형태를 보여주며 여기에 빈랑, 초두구 추출물을 각각 처리하여 주었을 때의 보호 효과는 C와 D로서 정상적인 사람 섬유아 세포와 같은 세포의 형태를 보여주었다. 이와 같은 결과로부터 빈랑, 초두구 추출물은 hydroxyl radical로부터의 세포 보호 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 이는 빈랑, 초두구 추출물이 *in vitro*에서의 hydroxyl radical을 소거하는 작용이 우수함을 보여주었듯이, *in vivo*에서도 hydroxyl radical로부터의 세포 보호 효과가 뛰어났다. 기존에 많은 소거 물질이 식물로부터 분리되었지만 세포 독성으로 문제가 되어 왔다. 따라서, 생체 내에서 발생된 hydroxyl radical의 소거를 위하여 초두구 추출물은 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한다면 세포 독성 없이 hydroxyl radical을 효과적으로 소거 할 수 있을 것이다.

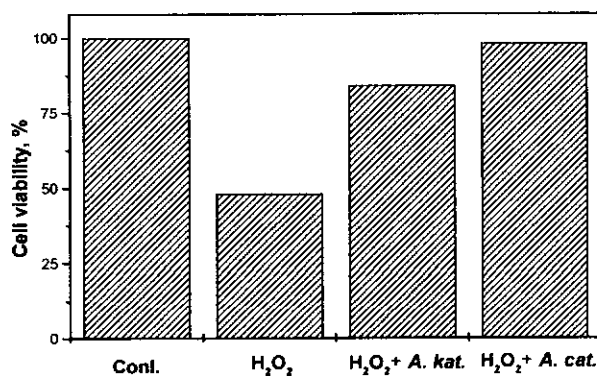


Fig. 1. Protection effect of *A. katumadai* and *Areca catechu* against hydroxyl radical on the human fibroblast, using MTT assay. The concentration of both tested extracts were $0.25 \mu\text{g/ml}$.

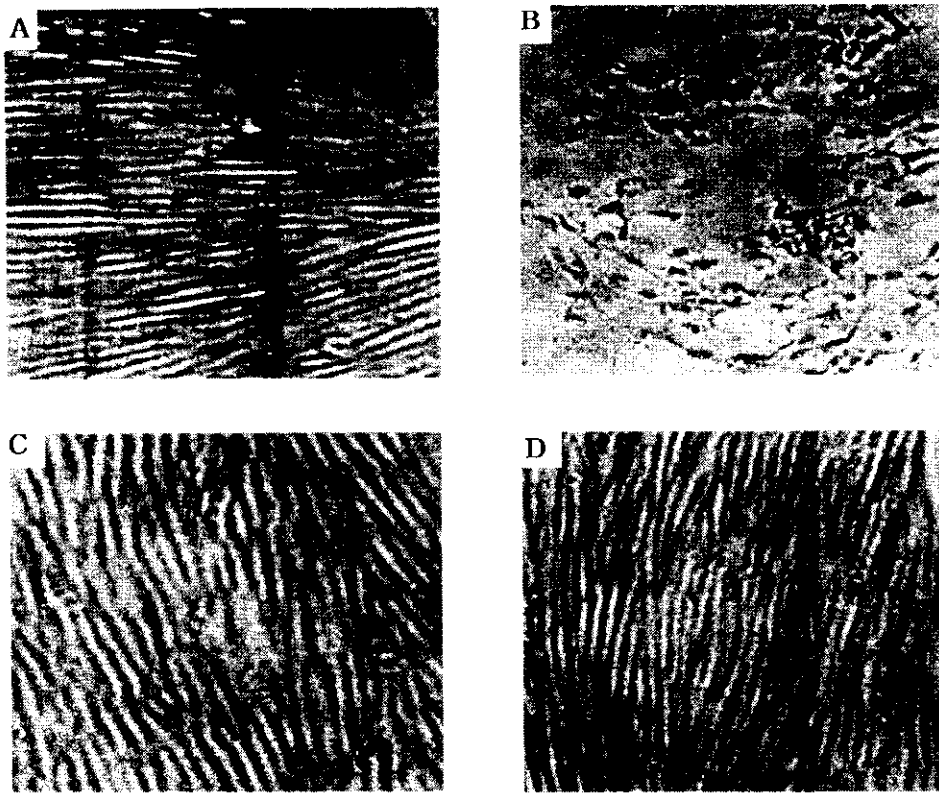


Fig. 2. Protection effect of *A. katsumadai* against hydroxyl radical (HR) on the human fibroblast., A:control; B: HR only; C: *A. katsumadai* + HR ,D: *Areca catechu* + HR. The concentration of both tested extracts were 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

2) 사람 섬유아 세포 배양에서 superoxide radical에 대한 보호 효과 측정

사람 섬유아 세포에 xanthine과 xanthine oxidase를 이용하여 superoxide radical을 발생시키고, 여기에 빈랑, 초두구 추출물을 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 처리하였을 때의 세포 보호 효과를 관찰하였다. superoxide radical에 대한 세포 보호 효과는 대조군에 대하여 97%의 보호 효과를 보여주었다 (Fig. 3). 세포의 형태적 변화에 대하여 관찰하였는데 Fig. 4에서 A는 정상적인 사람 섬유아 세포를 보여주고 B는 superoxide radical에 의하여 손상을 입은 세포의 형태를 나타내고 있다. C와 D는 초두구, 빈랑추출물을

superoxide radical과 함께 처리하여 주었을 때의 세포의 모습으로 정상 세포와 비교 하였을 때 superoxide radical로부터의 보호 효과가 뛰어남을 확인 수 있었다. Superoxide radical은 지질과산화 반응을 유도하는 radical로서 세포막에 있는 불포화 지방산으로부터 수소를 탈취하여 이 반응이 연쇄적으로 진행되도록 함으로써 결국은 세포막의 손상을 가져와 피부의 노화에 영향을 주고, 결합조직 단백질을 분해하여 피부의 탄력을 저하시킴으로써 피부를 노화시키는 활성 산소 중의 하나이다. 따라서 초두구 추출물은 피부의 노화를 가져오는 유해한 radical인 superoxide radical로부터 유도된 세포의 손상으로부터 세포를 보호하는 효과가 뛰어날 뿐만 아니라 세포의 증식 효과도 가지고 있어 피부 노화를 방지하는 자유라디칼 소거 물질과 항산화 물질로서의 효과를 기대한다.

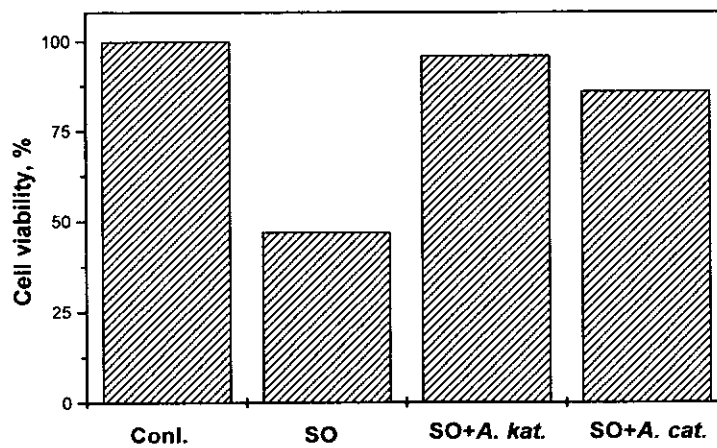


Fig. 3. Protection effect of *A. katumadai* and *A. catechu* against superoxide radical on the human fibroblast, using MTT assay. The concentration of both tested extracts were $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$. SO means superoxide radical.

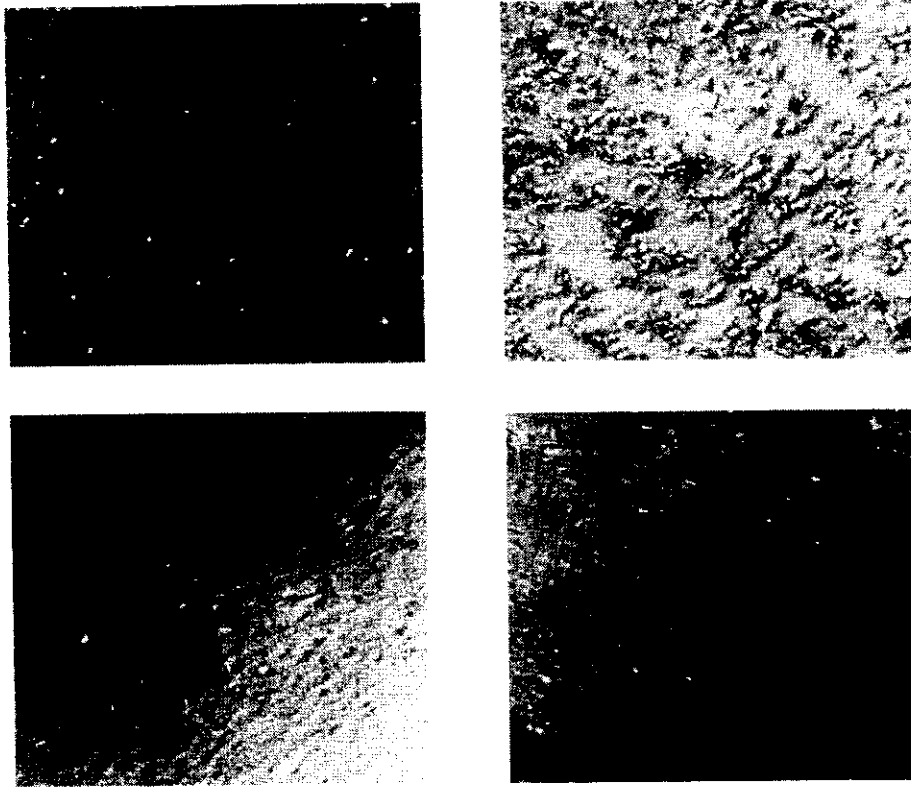


Fig. 4. Protection effect of *A. katumadai* against superoxide radical (SR) on the human fibroblast., A: control; B: SR only; C: *A. katumadai* + SR, D: *Areca catechu* + SR. The concentration of both test extracts were 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

5. 초두구로부터 자유라디칼 소거 활성이 있는 물질의 분리 및 분석.

초두구로부터 자유라디칼 소거 작용이 있는 물질을 분리 하기 위하여 초두구를 90% 메탄올에서 7일 동안 추출한 다음 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물층으로 분획하였다. 분획된 각층에 대하여 자유라디칼 소거 작용을 측정한 결과 에틸아세테이트 층에서 가장 높은 소거 활성을 보였고 이 분획물을 가지고 silica column chromatography를 수행하였다. 활성 물질의 용출을 위해 클로로포름: 메탄올: 물을 가

지고 극성을 단계적으로 증가 시켰다. 이렇게 정제된 물질을 가지고 preparative TLC (Prep. TLC)를 행하였다. Prep. TLC로 얻은 부분 정제된 물질은 페놀성 물질인 gallic acid와 HPLC를 동일한 조건에서 수행하였다. 조건은 HPLC column으로는 Hichrom RPB (250 x 10 mm)을 사용했으며, eluent는 메탄올: 물 = 40: 60 (v:v)에서 수행하였다. HPLC의 결과 초두구로부터 부분 정제된 물질은 gallic acid와 동일한 retention time을 보여주었다 (Fig. 5). 초두구로부터 분리된 물질에 대하여 여러 가지 정색 반응을 수행하였는데 2.5% FeCl₃을 가했을 때 초두구로부터 분리된 물질은 일반적인 페놀성 물질들과 같이 이 반응에서 노란색을 나타냄으로써 페놀성 물질임을 확인할 수 있었다. 따라서, 초두구로부터 부분 정제된 물질은 gallic acid와 유사한 페놀성 물질이거나 그의 유도체일 것이라고 추측된다. 초두구로부터 분리된 물질에 대한 자유라디칼 소거 효과의 측정에서는 정제될수록 소거 활성이 증가됨을 보여주었다.

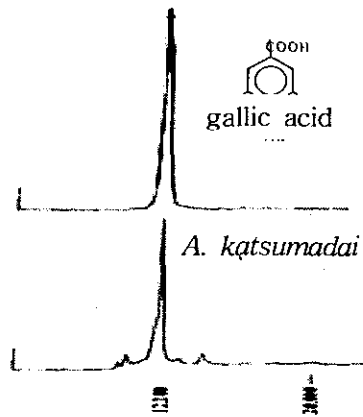
페놀성 물질들은 대부분의 식물에 많이 존재하는 성분으로서 하나 또는 둘 이상의 OH기로 치환된 방향족환을 가지고 있으며, 일반적으로 수용성이다. 페놀성 물질은 항암 작용, 간 보호 작용, 혈압 강화 작용 등 여러 가지 생리 활성을 가진 물질로 알려져 있다 (14). 이와 같은 페놀성 물질 중의 하나인 gallic acid는 식물에 많이 함유된 다른 성분인 carotinoids나 flavonoids처럼 항산화 작용을 하는 물질로 좋은 자유라디칼 소거작용에 대해 보고되고 있다 (15, 16). 따라서, 초두구로부터 분리된 물질은 페놀 정색 반응과 페놀성 물질인 gallic acid와 HPLC에서 동일한 retention time을 보여줌으로써 gallic acid와 유사한 구조를 갖는 페놀성 물질이거나 그의 유도체일 것이라고 추측할 수 있으며 초두구에 함유된 또 다른 활성 성분의 분리도 필요하리라 생각된다.

IV. 결 론

1. DPPH radical 소거에 있어서 빈랑과 초두구의 에틸아세테이트 층의 IC₅₀ 값은 각각 6 µg/ml과 20 µg/ml로 기준물질인 vitamin C (19 µg/ml), BHT (18 µg/ml)와 비슷한 소거활성을 보여주었다.

2. 빈랑과 초두구의 에틸아세테이트 층에 대한 lipid radical 소거활성의 IC₅₀ 값은 각각 50 µg/ml과 80 µg/ml로서 lipid radical 소거의 기준물질인 vitamin C, BHT보다 좋은 소거 활성을 나타내었다.

3. Hydroxyl radical 소거효과는 빈랑과 초두구의 에틸아세테이트 층에 대한 각각 IC₅₀ 값은 25 µg/ml과 150 µg/ml로 기준물질인 vitamin C (180 µg/ml)보다는 높은 활성을 나타내었고 gallic acid (23 µg/ml)와 비슷하거나 낮은 활성을 보여주었다.



4. Superoxide radical 소거활성에서는 빈랑, 초두구의 에틸아세테이트 층에 대한 각각 IC₅₀ 값이 15 µg/ml과 10 µg/ml 이었고, 기준물질인 gallic acid (9 µg/ml)와는 비슷한 효과를, vitamin C (27 µg/ml)보다는 높은 소거 활성을 나타내었다.

Fig. 5. HPLC chromatogram of the active sample from preparative TLC and gallic acid.

5. 초두구 추출물을 0.25 µg/ml 처리하였을 때 hydroxyl radical에 대한 세포 보호 효과는 87%의 보호효과를 보였고, Superoxide radical에 대한 세포보호 효과에서는 초두구가 97%로 두 종류의 radical에 대해 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다.

6. Hydroxyl radical과 superoxide radical에 대한 세포의 형태적 변화는 초두구 추출물을 0.25 µg/ml의 농도 처리하였을 때 정상 세포와 유사함을 보여주어 세포 보호 효과가 우수함을 확인하였다.

7. TLC단계를 거쳐 분리된 물질은 페놀성 물질인 gallic acid와 HPLC에서 동일한 retention time을 나타내었다.

V. 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 (산학협력과제 번호 : 2000-20900-001-1) 및 교육부 보건의료 생명과학 과제 (97R-2-3 그리고 98R-L-1)로 부터 연구비 지원을 받아서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

V. 참고 문헌

1. Tesuo N., 약학잡지 (일), **111**, 103-109
2. Harman D. (1992). *Ann. N. Y. Acade. Sci.*, **163**, 126-141.
3. William A. P. (1973). *Fed Proc.*, **32** (8), 1862-1869.
4. Wlaschek, M., Briviba, K. (1995). *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194-198.
5. Bisset, D. L., Chatterjee, R. and Hannon, D. P. (1991). *Photochem. Photobiol.*, **54**, 215-223.
6. Kasai, H. and Nishimura, S. (1991). Formation of 8-OH-dG in DNA by Oxygen radicals and its significance, Academic Press, 99-116.
7. Y. Fugita., I. Uehara., Y. Morimoto., and T. Okud. (1988). *Yakugak Zasshi*, **108**, 129-135.
8. Ohkawa, H., Ohishi, H. (1979). *Anal. Biochem.*, **95**, 351.
9. Murakami, A., Ohura, S., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1990). *Oncology*, **53**, 386-391.
10. Vanni, A., Gastaldi, D. and Giunata, G. (1990). *Annali. di Chinica*, **80**, 35.
11. 김재필, Illustrated natural drugs encyclopedia, 남산당, **2**, 195
12. 김재길, 소매근, Traditional drugs of the east, 영림사, 275
13. 강상진, 대한 화장품 학회지 (1999). **25(2)**, 59-77.
14. Friend, J. (1977). Biochemistry and plant phenolics, Plenum, N. Y., 557-588.
15. Kun-Kook Lee (1999). Isolation and Chatacterization of Anti-aging Agent from Medicinal Plant Extracts, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **24(2)**, 71.
16. Joe A. Vinson, Yousef A. Dabbagh, Mamdouh M. Serry, and Jinhee Jang, (1995). *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2880-2883.