

루이보스 추출물의 항산화 활성, 성분 분석 및 엘라스테이즈 저해 효과

양희정·원보령·임영진*·윤선경*·지동환*·최지연*·한승주*·이충우*·박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, *의정부과학고
(2007년 8월 28일 접수, 2007년 9월 30일 채택)

Antioxidative Activity, Component Analysis, and Anti-elastase Effect of *Aspalathus linearis* Extract

Hee Jung Yang, Bo Ryoung Won, Young Jin Lim*, Sun Kyeong Yoon*, Dong Hwan Ji*, Jee Yeon Choi*,
Seung Joo Han*, Chung Woo Lee*, and Soo Nam Park[†]

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

*Uijeongbu Science High School

(Received August 28, 2007; Accepted September 30, 2007)

요약: 본 연구에서는 루이보스 추출물의 항산화, 성분 분석 및 elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물(11.50 µg/mL) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(8.47) < ethylacetate 분획(4.76) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 루이보스 추출물의 총항산화능은 ethylacetate 분획(OSC₅₀, 4.58 µg/mL) < aglycone 분획(2.20) < 50 % ethanol 추출물(1.09)순으로, 50 % ethanol 추출물에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 루이보스 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 루이보스 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 100 µg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 50 % ethanol 추출물은 50 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 272.00 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC에서 3개의 띠로 분리되었으며, HPLC 실험(360 nm)에서 3개의 피이크로 분리되었다. 분리된 3가지 성분은 luteolin, quercetin 및 kaempferol이었으며, 그들의 성분비는 각각 18.24 %, 58.79 %, 22.97 %로 quercetin의 함량이 가장 큰 것으로 나타났다. 루이보스 추출물의 ethylacetate 분획의 TLC 크로마토그램은 7개의 띠로 분리되었고, HPLC 크로마토그램은 9개의 피이크를 보여주었다. TLC와 HPLC의 띠와 피이크를 확인한 결과, HPLC의 9개의 피이크는 용리순서로 peak 1 (조성비 14.71 %)은 isoorientin, peak 2 (28.84 %)는 orientin, peak 3 (5.63 %)은 vitexin, peak 4 (12.73 %)는 rutin과 isovitexin, peak 5 (9.24 %)는 hyperoside, peak 6 (5.40 %)은 isoquercitrin, peak 7 (1.48 %)은 luteolin, peak 8 (17.61 %)은 quercetin 및 peak 9 (4.59 %)는 kaempferol로 확인되었다. Aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC₅₀)이 9.08 µg/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다. 이상의 결과들은 루이보스 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 루이보스 성분에 대한 분석과 ethylacetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 큰 elastase 저해활성으로부터 주름개선 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on elastase, and components of *Aspalathus linearis* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC₅₀) of extract/fractions of *Aspalathus linearis* were in the order: 50 % ethanol extract (11.50 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (8.47 µg/mL) < ethylacetate fraction (4.76 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of some *Aspalathus linearis* extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activities were ethylacetate fraction (OSC₅₀, 4.58 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (2.20 µg/mL) < 50 % ethanol extract (1.09 µg/mL). 50 % Ethanol extract showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Aspalathus linearis* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Aspalathus linearis* extracts suppressed

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

photohemolysis in a concentration dependent manner, particularly 50 % ethanol extract exhibited the most prominent cellular protective effect (τ_{50} , 272.00 min at 50 $\mu\text{g/mL}$). Aglycone fractions obtained from the deglycosylation reaction of ethylacetate fraction among the *Aspalathus linearis* extracts, showed 3 bands in TLC and 3 peaks in HPLC experiments (360 nm). Three components were identified as luteolin (composition ratio, 18.24 %), quercetin (58.79), and kaempferol (22.97). TLC chromatogram of ethylacetate fraction of *Aspalathus linearis* extract revealed 7 bands and HPLC chromatogram showed 9 peaks, which were identified as isoorientin (composition ratio, 14.71 %), orientin (28.84 %), vitexin (5.63 %), rutin and isovitexin (12.73 %), hyperoside (9.24 %), isoquercitrin (5.40 %), luteolin (1.48 %), quercetin (17.61 %) and kaempferol (4.59 %) in the order of elution time. The inhibitory effect of aglycone fraction on elastase (IC_{50} , 9.08 $\mu\text{g/mL}$) was very high. These results indicate that extract/fractions of *Aspalathus linearis* 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 component analysis of *Aspalathus linearis* extract and inhibitory activity on elastase of the aglycone fraction could be applicable to new functional cosmetics for smoothing wrinkles.

Keywords: *Aspalathus linearis*, flavonoid, antioxidative activity, elastase, cosmetics

1. 서 론

피부는 항상 산소와 접촉하고 있고 태양 자외선에 노출됨으로써 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 계속 받게 된다. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 이들 활성산소종 중에서 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부 노화를 가속시킨다[1-7].

사람 피부세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다 [8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[17-21].

루이보스(*Aspalathus linearis*)는 콩과식물의 일종으로 남아프리카 산간 지역에 자생하는 식물이다. 루이보스의 잎과 줄기는 루이보스 차를 만드는데 사용되고 있다. 녹차(*Camellia sinensis* tea)와는 달리 루이보스 차에는 카페인 함유되어 있지 않고 탄닌 함량이 적으며, 폴리페놀 및 미네랄 등이 풍부하여 세계 시장에서 건강 음료로서 각광을 받고 있다. 루이보스 차에는 발효시킨 것과 발효시키지 않은 것이 있으며, 발효시킨 루이보스 차는 소화기 질환을 진정시키고, 알러지를 완화시키는 등 다양한 생물학적 특성이 알려져 있다. 또한 베헤트 질환(Behcet's disease) 및 광민감성 피부염과 같은 피부질환의 국소적 치료에도 사용되는 것으로 보고되고 있다[22,23].

루이보스 차 추출물은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성, β -carotene 탈색, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 소거활성 및 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS $^{\cdot+}$) 소거활성을 측정할 수 있는 항산화 실험에서 항산화 활성이 있는 것으로 최근 보고되고 있다[24-26]. 이러한 루이보스 차 추출물의 항산화 활성은 루이보스에 함유된 폴리 페놀성 화합물, 특히 플라보노이드의 존재에 기인될 수 있다. 루이보스에 함유된 주요 플라보노이드로는 aspalathin, isoorientin, orientin, rutin, isovitexin, vitexin, isoquercitrin, hyperoside, quercetin, luteolin, chrysoeryol이 알려져 있다[19,26-28].

상기에서와 같이 루이보스 추출물과 성분의 항산화 작용 연구는 루이보스 차에 대한 건강 음료로서의 이용 측면에서 이루어졌다. 그러나 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 각종 활성산소종(H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 등)이 생성되는 계(Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계)에서의 각종 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 루이보스 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들

추출물(혹은 분획)의 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능, 이들 추출물(혹은 분획)의 성분 분석, 그리고 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 루이보스의 항산화능을 비교 평가하고 활성산소에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 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 (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, 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), ethylacetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

기질로 사용된 *N*-succinyl-(Ala) $_3$ -*p*-nitroanilide, 효소로 사용된 elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F $_{254}$ (0.2 mm)로 Merck (USA)사에서 구입하였다. 플라보노이드 비교물질로 사용한 apigenin, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin, hyperin, isoquercitrin 그리고 발색시약으로 사용한 2-aminoethyl-diphenylborinate (NP)와 polyethylene glycol (PEG)은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용한 루이보스 재료는 발효시킨 루이보스 어린잎을 말려서 만든 루이보스 차로 알루미늄과 폴리에틸렌으로 포장된 제품을 2007년 5월 (주)루이보스코리아에서 구입하였다.

2.2. 루이보스의 플라보노이드 분획 추출

건조된 루이보스 잎 210 g을 잘게 자른 후 50 % ethanol 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % ethanol 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethylacetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethylacetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethylacetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethylacetate 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 증탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethylacetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 루이보스 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 루이보스 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol 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_{50} , $\mu\text{g/mL}$)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^{3+} -EDTA/ H_2O_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 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 이 총항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 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 μ L 및 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μ L를 가한 후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μ L를 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 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, 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. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 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 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 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 루이보스 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 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. 루이보스 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 31 min으로 오차범위 ± 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. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

2.5. TLC 및 HPLC를 이용한 루이보스 추출물의 플라보노이드 분석

루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획과 aglycone 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 μm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다.

TLC 분석에서 전개용매는 ethylacetate 분획의 경우 ethylacetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v)을 aglycone 분획은 *n*-hexane : ethylacetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)를 사용하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 치와 자외선, NP/PEG 발색을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다.

HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 또한 제조된 aglycone 분말은 100 % 에탄올에 녹이고, syringe filter (Milipore 0.45 μm)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethylacetate and Deglycosylated Fraction from *Aspalathus linearis* (AL) Extract

Column	Luna 5 μ C18 (L; 250 nm, LD; 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2 % acetic acid : 0.5 % acetic acid in H ₂ O in 50 % acetonitrile solution
	(70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for ethylacetate fraction
	(50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μ L에 측정시료용액 7.5 μ L와 buffer 92.5 μ L를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300 μ L를 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. 루이보스 추출물의 수득률

3.1.1. 루이보스(*Aspalathus linearis*) 추출물

건조한 루이보스 210 g을 잘게 잘라 50 % ethanol 2 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득률은 17.78 %이었다. Ethylacetate 분획은 50 % ethanol로 추출한 것을 1차 hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethylacetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 1.36 %이었으며, ethylacetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.45 %였다. Ethylacetate 분획은 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 ethylacetate 분획 플라보노이드에서 당을 제거한 플라보노이드가 존재한다. 본 연구에서는 50 % ethanol 추출물, ethylacetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Aspalathus linearis* (AL) and References

Compounds	Scavenging activity (FSC ₅₀ , μ g/mL)
<i>Aspalathus linearis</i> extract (50 % EtOH)	11.50 (\pm 0.38)
<i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	4.76 (\pm 0.13)
Deglycosylated fraction of <i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	8.47 (\pm 0.36)
L-Ascorbic acid	3.79 (\pm 0.83)
(+)- α -Tocopherol	8.98 (\pm 2.93)
Quercetin	3.43 (\pm 0.15)
Rutin	5.03 (\pm 0.23)

3.2. 루이보스 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 free radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)- α -Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

루이보스(*Aspalathus linearis*) 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol, quercetin 및 rutin의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 루이보스 추출물은 50 % ethanol 추출물인 경우 FSC₅₀가 11.50 μ g/mL, ethylacetate 분획은 4.76 μ g/mL, aglycone 분획은 8.47 μ g/mL을 나타냈다. Ethylacetate 분획 및 aglycone 분획에서 free radical 소거활성이 큰 것으로 나타났고, 이는 비교 물질인 (+)- α -tocopherol 보다도 크음을 보여주고 있다. 그 외에 비교 물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid의 free radical 소거활성은 3.79 μ g/mL, 플라보노이드 비교물질로 사용되는 quercetin은 3.43 μ g/mL, 그의 배당체인 rutin은 5.03 μ g/mL이었다.

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

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Figure 2 및 Figure 3에서 보는 바와 같이 루이보스 추출물의 ethylacetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 1, 5, 10 및 50

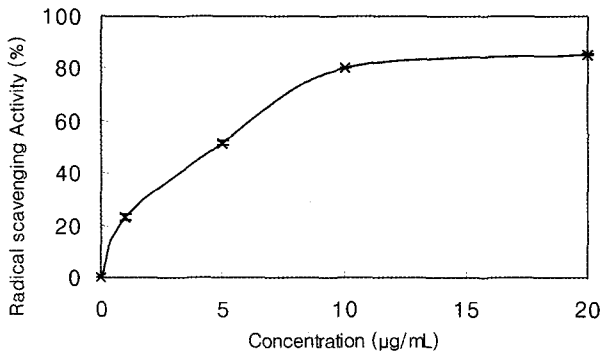


Figure 1. Free radical scavenging activity of *Aspalathus linearis* ethylacetate fraction.

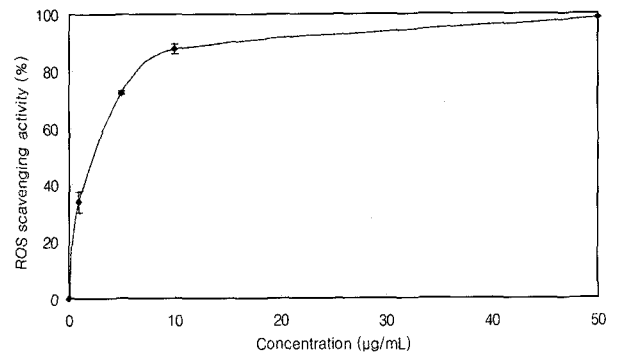


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated fraction from *Aspalathus linearis* extract (EtOAc fraction).

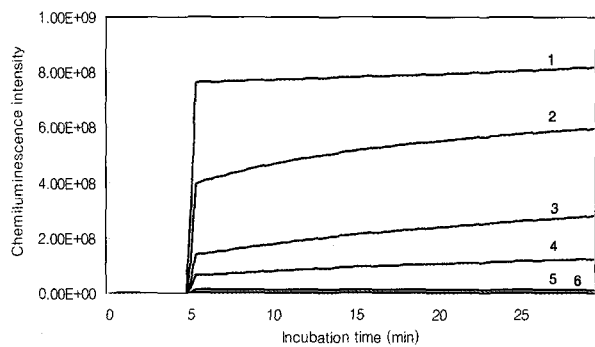


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated fraction from *Aspalathus linearis* extract (EtOAc fraction) in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay. $[FeCl_3 \cdot 6H_2O] = 25 \mu M$, $[EDTA] = 50 \mu M$, $[H_2O_2] = 3 mM$, $[luminol] = 1.4 mM$, concentrations of deglycosylated extract from *Aspalathus linearis* EtOAc fraction: 1: control, 2: $1 \mu g/mL$, 3: $5 \mu g/mL$, 4: $10 \mu g/mL$, 5: $50 \mu g/mL$, 6: blank.

$\mu g/mL$ 에서 농도 의존적으로 화학발광을 감소시켰다. 이로부터 당이 제거된 분획(deglycosylated fraction)의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 Table 3에서와 같이 $2.20 \mu g/mL$ 이었다. Table 3에서 루이보스 50% ethanol 추출물은 $1.09 \mu g/mL$, ethylacetate 분획 $4.58 \mu g/mL$ 로 나타났다. 따라서 총항산화능은 50% ethanol 추출물이 ethylacetate 분획이나 당을 제거시킨 분획보다 활성산소 소거활성이 보다 큼을 보여주었다. 50% Ethanol 추출물은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid ($1.50 \mu g/mL$) 보다 그 이상의 활성을 보였다.

3.3. 1O_2 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

루이보스 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Figure 4 및 Table 4에

Table 3. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *Aspalathus linearis* and References

Compounds	Scavenging Activity (OSC ₅₀ , $\mu g/mL$)
<i>Aspalathus linearis</i> extract (50% EtOH)	$1.09 (\pm 0.20)$
<i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	$4.58 (\pm 0.83)$
Deglycosylated fraction of <i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	$2.20 (\pm 0.15)$
L-Ascorbic acid	$1.50 (\pm 0.85)$
Quercetin	$0.05 (\pm 0.02)$
Rutin	$0.13 (\pm 0.12)$

나와 있다.

적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 루이보스 50% ethanol 추출물은 1, 10, 50, $100 \mu g/mL$ 의 농도에서 거의 농도 의존적(τ_{50} 이 각각 36.20, 80.80, 272.00, 200.00 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 위의 결과에서 보듯이 50% ethanol 추출물은 $50 \mu g/mL$ 의 농도에서 가장 큰 세포보호 효과(272.00 min)를 보여주었고, 농도가 $100 \mu g/mL$ 에서 200.00 min으로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출물의 농도가 클 때는 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용)을 나타낼 수 있는 물질이 존재할 가능성도 생각할 수 있다. 한편 ethylacetate 분획의 경우는 세포보호 효과가 다른 추출물이나 분획보다도 작게 나타났다. 당을 제거시킨 분획의 세포보호 효과는 1, 10, $50 \mu g/mL$ 에서 τ_{50} 이 각각 30.80, 103.80, 81.30 min으로 나타났다.

비교물질로 사용한 플라보노이드 배당체인 rutin은 $10 \mu g/mL$ 에서 40.50 min, quercetin은 동일농도에서 147 min

Table 4. Effects of Extracts from *Aspalathus linearis* and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)			
	1	10	50	100
<i>Aspalathus linearis</i> extract (50 % EtOH)	36.20 (\pm 1.35)	80.80 (\pm 3.24)	272.00 (\pm 6.20)	200.00 (\pm 3.16)
<i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	36.20 (\pm 2.84)	41.30 (\pm 6.29)	59.80 (\pm 10.40)	68.00 (\pm 1.28)
Deglycosylated fraction from <i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	30.80 (\pm 3.63)	103.80 (\pm 3.56)	81.30 (\pm 6.30)	-
Rutin	35.20 (\pm 1.40)	40.50 (\pm 10.44)	-	-
Quercetin	51 (\pm 3.03)	147 (\pm 15.01)	-	-
(+)- α -Tocopherol	-	38.00 (\pm 1.80)	74.33 (\pm 6.35)	-

¹⁾Control, $\tau_{50} = 31 \pm 1.0$ min

을 나타내었다. Quercetin이 quercetin 배당체인 rutin 보다도 세포보호 효과가 훨씬 큼을 보여주고 있다. 이는 rutin 보다도 quercetin이 세포막의 접근과 세포막 내로의 침투가 더 용이함을 나타내며 이는 세포막에서 일어나는 활성산소에 의한 인지질의 산화와 세포막 파괴를 aglycone인 quercetin이 보다 더 효율적으로 억제함을 보여주고 있다. Rutin은 2개의 당(rutinose)이 결합한 형태로 rutin 분자 주위에서 큰 물결질이 형성되어 세포막 내로의 접근에 상당한 어려움이 있어 세포보호 효과도 낮게 나타난 것으로 판단되어진다. 비교물질에서와 같이 주 성분들이 플라보노이드 배당체인 루이보스 ethylacetate 분획의 세포보호 효과는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 41.30 min이고, 당이 제거된 분획(aglycone)은 동일 농도에서 103.80 min으로 플라보노이드 aglycone이 세포막으로의 침투가 용이해 세포보호 효과가 큼을 보여주고 있다.

하지만 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 보면 세포보호 효과는 ethylacetate 분획(τ_{50} , 59.80 min) < 당이 제거된 분획 (81.30) < 50 % ethanol 추출물(272.00) 순으로 증가하였다. 이러한 경향은 Table 3에서의 활성산소 소거활성(총항산화능) 순위[ethylacetate 분획(OSC₅₀, 4.58 $\mu\text{g/mL}$) < 당이 제거된 분획(2.20) < 50 % ethanol 추출물(1.09)]와 일치하고 있다. 즉, 세포보호 효과 및 총항산화능은 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50 % ethanol 추출물에서 가장 큼을 알 수 있다. 일반적으로 ethylacetate 분획이나 aglycone 분획에서 그 항산화 활성이나 세포막 보호 효과가 크게 나타나는 것에 비추어 볼 때, ethylacetate 분획이나 aglycone 분획에는 없지만 루이보스 50 % ethanol 추출물 중에 강력한 항산화 물질이 존재할 가능성을 시사한다. 다시말해 50 % ethanol 추출물 중에 활성산소에 대한 세포보호효과가 큰 또는

총항산화능이 큰 물질이 있음을 시사하고 앞으로 이 물질에 대한 확인 연구가 필요하다고 사료된다.

10 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 루이보스 50 % ethanol 추출물과 당이 제거된 분획(aglycone) 모두 비교물질로 사용한 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- α -tocopherol보다도 세포보호 효과가 큼을 알 수 있었다.

3.4. 루이보스 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.4.1. 루이보스 추출물의 TLC 성분 분석

루이보스 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 5 및 Figure 6에 나타내었다. Figure 5은 50 % 에탄올로 추출한 루이보스 추출물로부터 얻은 ethylacetate 분획의 TLC 크로마토그램이며 7개의 띠(AL1, AL2, AL3, AL4, AL5, AL6, AL7)로 분리되었다. 그 중 R_f 0.66인 AL4는 자외선 및 황산 발색법 등으로 확인한 결과 농도가 가장 큰 것으로 나타났다. 본 TLC 조건에서 플라보노이드 aglycone은 AL1과 동일한 위치에서 나타났고, AL2 ~ AL7 띠들은 플라보노이드 배당체(flavonoid glycosides)임을 확인하였다. NP/PEG 발색 시약 사용 시 AL3, AL5 및 AL7 띠는 주황색을 AL4 및 AL6는 노란-주황색, AL2 띠는 노란-연두를 나타냈다. 일반적으로 quercetin과 같은 플라보노이드류는 NP/PEG 발색에서 주황색을, luteolin은 노란-주황색을, apigenin 및 그 배당체들은 노란-연두를 나타내었다. 또한 표준물질을 이용하여 AL2는 vitexin, AL3는 isoquercitrin, AL7는 rutin임을 확인할 수 있었으며, AL5는 NP/PEG 발색으로 hyperoside임을 확인하였고, 이와 동일한 R_f 0.63인 isovitexin은 UV 흡수스펙트럼의 최대 흡수 파장(UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 272, 340$ nm)과 Figure 8에

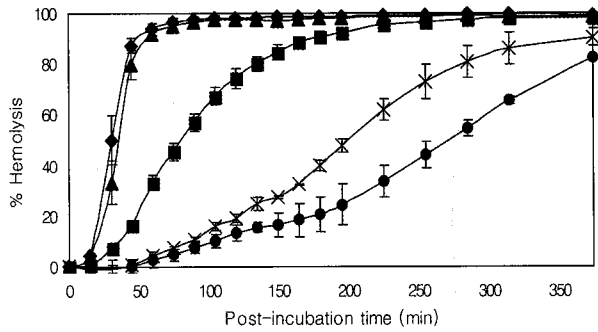


Figure 4. Effects of *Aspalathus linearis* extract (50 % ethanol) on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time ; 15 min, pre-incubation time; 30 min, [rose-bengal] = 1.5 µM, concentrations of deglycosylated fraction from *Aspalathus linearis* extract (EtOAc fraction); ◆-◆: control, ▲-▲: 1 µg/mL, ■-■: 10 µg/mL, *-*: 100 µg/mL, ●-●: 50 µg/mL.

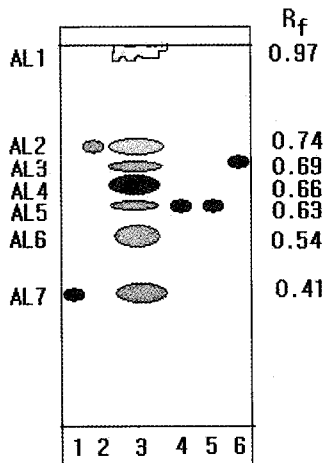


Figure 5. TLC chromatogram of ethylacetate fraction from *Aspalathus linearis* (AL) and references. 1: rutin, 2: vitexin, 3: ethylacetate fraction, 4: hyperoside, 5: isovitexin, 6: isoquercitrin. Eluent system; ethylacetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v).

서 HPLC 크로마토그램으로부터 같이 존재함을 확인할 수 있었다. 따라서 AL5가 NP/PEG 발색에서 주황색을 띠는 isovitexin의 함량이 너무 작아 나타나지 않은 것으로 이미 Bramati 등 (2002)에 의해 함량이 보고된 바 있다. AL4 및 AL6은 각각 orientin 및 isoorientin으로 발색법, UV 흡수스펙트럼의 최대 흡수 파장($UV \lambda_{max}^{EtOH} = 270, 344 \text{ nm}$), 그리고 Figure 8의 HPLC 크로마토그램으로부터 확인하였다. Figure 6은 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획을 당 가수분해시켜서 얻은 당이 제거된 분획(aglycone 분획)의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone

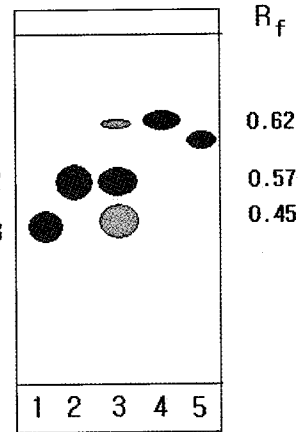


Figure 6. TLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Aspalathus linearis* extract (EtOAc fraction) and references. 1: luteolin, 2: quercetin, 3: deglycosylated fraction (EtOAc fraction), 4: kaempferol, 5: apigenin. Eluent system; *n*-hexane : ethylacetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v).

분획은 3개의 띠(AA1 ~ AA3)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 AA1은 kaempferol, AA2는 quercetin 그리고 AA3는 luteolin임을 알 수 있었다. 한편, ethylacetate 분획을 당 가수분해시켜서 얻은 당이 제거된 분획(aglycone 분획)에는 플라보노이드 배당체(rutin, isoquercitrin, hyperoside) 및 C-glycosyl flavones인 orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin은 존재하지 않았다.

3.4.2. 루이보스 추출물의 HPLC 성분 분석

루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 7에 나타내었다. 크로마토그램은 9개의 피이크를 보여주었다. 각각의 피이크의 동정은 표준물질을 사용하여 비교하였고, 또한 Figure 5의 TLC에서 각각의 띠를 끊어 용매로 용출하여 얻은 시료용액은 동일 조건의 HPLC로 분리하여 Figure 7의 피이크들을 확인하는데 사용하였다. 따라서 Figure 7의 peak 1은 isoorientin, peak 2 (orientin), peak 3 (vitexin), peak 4 (rutin + isovitexin), peak 5 (hyperoside), peak 6 (isoquercitrin), peak 7 (luteolin), peak 8 (quercetin), peak 9 (kaempferol)로 확인되었다. 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻어진 당이 제거된 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 8에 나타내었다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 6의 TLC 크로마토그램과 Yang 등(2007)에 의해 보고된 검량곡선 등을 이용하여 Figure 8의 각각의 피이크를 분석하여 본 결과 peak 1은 luteolin, peak 2는 quercetin, peak 3는 kaempferol임을 확인하였고, 3가지 플라보노이드의 조성비는 luteolin (peak 1)

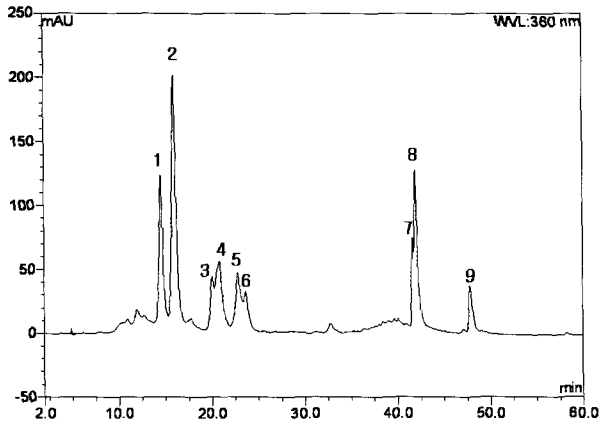


Figure 7. HPLC chromatogram of ethylacetate fraction from *Aspalathus linearis* (AL), at $\lambda = 360$ nm. 1: isoorientin, 2: orientin, 3: vitexin, 4: rutin + isovitexin, 5: hyperoside, 6: isoquercitrin, 7: luteolin, 8: quercetin, 9: kaempferol.

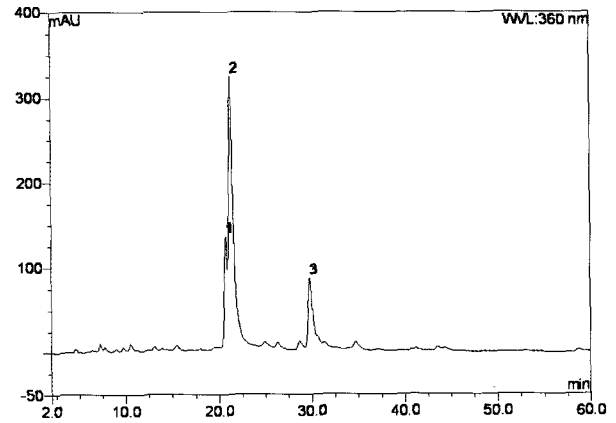


Figure 8. HPLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Aspalathus linearis* (AL) extract (EtOAc fraction). 1: luteolin, 2: quercetin, 3: kaempferol.

18.24 %, quercetin (peak 2) 58.79 %, kaempferol (peak 3) 22.97 %로 나타났다(Table 5). Ethylacetate 분획의 HPLC 크로마토그램과 비교하여 isoorientin, orientin의 조성비가 큼에도 불구하고 luteolin의 조성비가 18.24 %가 되는 것은 isoorientin, orientin의 탄소-탄소 결합으로 이루어진 glucoside가 산 가수분해 반응을 통한 당 제거가 이루어지지 않아 aglycone인 luteolin이 생성되지 못했기 때문으로 판단된다. 마찬가지로 vitexin과 isovitexin도 apigenin에 당이 탄소-탄소 결합으로 이루어져 있는 플라보노이드 배당체이기 때문에 isoorientin과 orientin에서와 같이 HPLC 크로마토그램(Figure 8)에서 apigenin에 대한 피크가 나오지 않음을 알 수 있다.

3.5. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부 노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC₅₀)이 9.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 매우 큰 활성을 나타내었다(Table 6, Figure 9).

비교물질로 사용한 kaempferol과 quercetin은 각각 IC₅₀이 13.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 6.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이는 Table 5에 있는 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획에서 당을 제거한 플라보노이드 aglycones인 luteolin, quercetin 및 kaempferol에 기인된 것으로 판단된다.

Table 5. HPLC Quantitative Analysis Data of Deglycosylated Fraction from *Aspalathus linearis* (AL) Extract (Aglycones of Ethylacetate Fraction)

Peak No.	Identified compound	Ret. time (min)	Rel. area (%)	Amount (mM)	Rel. ratio (%)
1	Luteolin	20.79	16.16	0.27	18.24
2	Quercetin	21.33	67.16	0.87	58.79
3	Kaempferol	29.81	16.68	0.34	22.97
Total			100.00	1.48	100.0

이미 루이보스에도 함유되어 있는 kaempferol 및 quercetin은 사람 표피 세포주에서 hyaluronan synthase mRNA를 발현시켜 농도 의존적으로 hyaluronan (HA) 합성을 증가시킨다는 것이 보고되어져 있다[29]. 또한 일반적으로 HA는 collagen 및 elastin 등과 같이 노화와 더불어 피부 내 함량도 감소되며, 피부 탄력저하 및 주름생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다[30,31]. 따라서 루이보스 추출물을 대상으로 주름개선 작용이 있는 항노화 기능성 소재로서 가능성이 있는지 알아보기 위한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

1) 루이보스 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 17.78 %, ethylacetate 분획의 경우 1.36 %이었다.

2) 루이보스 추출물의 free radical 소거능력(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물 11.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethylacetate 분획 4.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethylacetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 8.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

3) 루이보스 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 루

Table 6. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethylacetate Fraction of *Aspalathus linearis* (AL) extract and Reference Compounds on Elastase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
Deglycosylated fraction from <i>Aspalathus linearis</i> extract (EtOAc fraction)	9.08 ± 3.68
Kaempferol	13.6 ± 2.4
Quercetin	6.1 ± 0.9

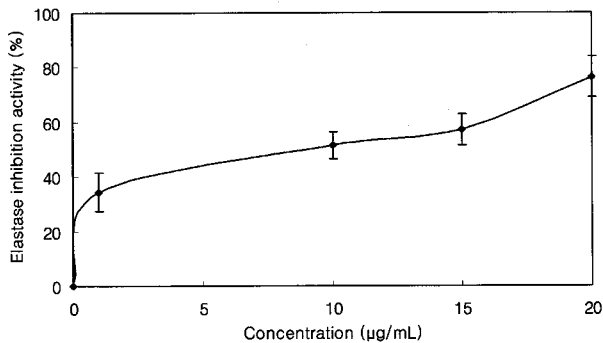


Figure 9. Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from EtOAc fraction of *Aspalathus linearis* extract on elastase.

이보스 에탄올 추출물, 1.09 µg/mL, ethylacetate 분획, 4.58 µg/mL, ethylacetate 분획의 당 제거한 아글리콘 추출물은 2.20 µg/mL로 루이보스 에탄올 추출물이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 루이보스 추출물은 µg/mL의 농도 범위(1 ~ 100 µg/mL)에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 루이보스 에탄올 추출물은 50 µg/mL 농도에서 272.00 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

5) 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획의 TLC는 7개의 띠(AL1 ~ AL7)로 분리되었고, 그 중에서 R_f 0.66인 AL4의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

6) 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 3개의 띠(AA1 ~ AA3)를 나타내었고, 이 때 AA1, AA2 및 AA3는 각각 kaempferol, quercetin, luteolin으로 확인하였다.

7) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 3개의 피이크를 나타냈고, 그 용리 순서는 luteolin, quercetin, kaempferol이었으며 조성비는 luteolin 18.24 %, quercetin 58.79 %, kaempferol 22.97 %로 quercetin 함량이 가장 큰 것으로 나타났다.

8) 루이보스 추출물 중 ethylacetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 360 nm에서 9개의 피이크를 나타내었고, peak 1 (조성비 14.71 %)은 isoorientin, peak 2 (28.84 %)는 orientin, peak 3 (5.63 %)은 vitexin, peak 4 (12.73 %)는 rutin과 isovitexin, peak 5 (9.24 %)는 hyperoside, peak 6 (5.40 %)은 isoquercitrin, peak 7 (1.48 %)은 luteolin, peak 8 (17.61 %)은 quercetin 및 peak 9 (4.59 %)는 kaempferol 으로 확인되었다.

9) 루이보스 추출물 중 aglycone 분획은 elastase 저해 활성(IC₅₀)이 9.08 µg/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다.

이상의 결과들은 루이보스 추출물의 항산화 작용과 더불어 루이보스 성분에 대한 분석과 ethylacetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 큰 elastase 저해활성으로부터 주름개선 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 큼을 시사한다.

감 사

본 연구 논문은 한국과학재단 “2007년 과학고 영재교육 내실화지원사업(R&E)”에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 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).
2. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
3. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85, Academic press, New York (1976).
4. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
8. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connec-

- tive tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
9. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
 10. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
 11. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
 12. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
 13. 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).
 14. A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
 15. 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).
 16. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 17. J. W. Choi, S. I. Kim, S. M. Jeon, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 18. H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of antioxidant potential of extract/fractions of *Equisetum areense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
 19. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum areense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
 20. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative potencies of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).
 21. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiangiogenic effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 22. J. F. Morton, Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage, *Econ. Bot.*, **37**(2), 164 (1983).
 23. Y. Shindo and K. Kato, Effect of rooibos tea on some dermatological diseases, *ISTS*, 385 (1991).
 24. A. V. Gadow, E. Joubert, and C. F. Hansmann, Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea, *Food chemistry*, **60**(1), 73 (1997).
 25. E. Joubert, P. Winterton, T. J. Britz, and D. Ferreira, Superoxide anion and α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids, *Food Research International*, **37**, 133 (2004).
 26. L. Bramati, F. Aquilano, and P. Pietta, Unfermented rooibos tea: quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7472 (2003).
 27. L. Bramati, M. Minoggio, C. Gardana, P. Simonetti, P. Mauri, and P. Pietta, Quantitative characterization of flavonoid compounds in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5513 (2002).
 28. E. Joubert, HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing, *Food Chemistry*, **55**(4), 403 (1996).
 29. S. H. Kim, G. W. Nam, B. Y. Kang, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang, The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Soc. Cosmet.*

- Scientists Korea*, **33**(1), 97 (2005).
30. R. Fleischmajor, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glucosaminoglycans and aging, *Biochem. Biophys. Acta*, **279**(2), 265 (1972).
31. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**(1), 127 (1987).