

# 대황(*Rheum undulatum* L.)으로부터 항주름성 Elastase 저해제의 추출 및 특성

이재원\* · 이지수 · †이종수

\* (주)더마프로 피부과학연구소, 배재대학교 생명유전공학과

## Extraction and Characterization of an Anti-wrinkle Elastase Inhibitor from *Rheum undulatum* L.

Jae-Won Lee\*, Ji-Su Lee and †Jong-Soo Lee

\*Dermapro Skin Research Center, Seoul 137-060, Korea

Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

### Abstract

To develop a new anti-wrinkle agent from medicinal plants, this study investigated the optimal conditions for extracting elastase inhibitor from *Rheum undulatum* L. Maximal extraction occurred by using 70% methanol at 50°C for 24 hr; the elastase inhibitory activity was 60.4% (IC<sub>50</sub>: 6.7×10<sup>3</sup> μg/ml). Systematic solvent extraction, thin layer chromatography, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and reverse-phase high performance liquid chromatography were used in the partial purification of the elastase inhibitor. The compound was soluble in dimethylsulfoxide, methanol, and ethanol, and had maximum absorption spectra at 231.5 nm and 275.5 nm.

Key words: *Rheum undulatum* L., anti-wrinkle agent, elastase inhibitor.

### 서 론

최근 인간의 수명이 늘어나고 건강과 노화에 대한 관심이 증가함에 따라 피부 노화 예방을 위한 많은 기능성 화장품 (cosmeceuticals)들이 개발되어 시판되고 있다. 기능성 화장품은 과거에는 단순한 미용의 개념이었지만, 최근에는 주름 개선, 미백, 자외선 차단 등의 다양한 기능이 요구되고 있으며, 특히 미용식품에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>1)</sup>.

한편, 신체의 노화 중에서 피부 노화는 크게 2종류로 나눌 수 있다. 첫째는, 내인성 피부 노화로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상을 말하며, 두 번째는 광노화 및 외인성 피부 노화로서 햇빛에 지속적으로 노출되어 생기는 피부손상을 말한다<sup>2)</sup>. 피부의 진피조직 속에는 콜라겐과 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하면서 피부의 탄력성을 유지시켜 주는데, 나이, 자외선과 같은 내외적 스트레스로 인하여 탄력

성, 윤택성이 감소하고, 과다 발현된 elastase에 의하여 엘라스틴의 그물망 구조가 깨지게 되면 피부가 처지고 주름이 생기므로 피부 노화가 발생하게 된다<sup>3,4)</sup>. 그러므로, 피부 노화의 주 원인중의 하나인 엘라스틴 분해효소인 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다<sup>2,5)</sup>.

Elastase[EC 3.4.4.7]는 동물결합 조직의 불용성 탄성 섬유경단백질인 엘라스틴을 분해할 수 있는 유일한 효소이며, 콜라겐과 엘라스틴 같은 결합조직을 지지하고 구성하는 모든 단백질들을 가수분해 한다<sup>6,7)</sup>. Elastase는 다형 핵 백혈구 (PMNs)와 췌장 이외에도 혈소판, 단핵구 및 평활근 세포에서도 확인되었다<sup>8,9)</sup>. 다형 핵 백혈구 elastase는 췌장 elastase와 같이 serine proteinase이며, 섬유아세포 elastase처럼 당단백질이지만, 섬유아세포 elastase는 활성자리에 금속 이온을 포함하고 있는 metallo proteinase에 속한다<sup>10)</sup>. Elastase의 기질은 엘라스틴이며 결합 조직에서 proteoglycan 분자들의 core protein

† Corresponding author: Jong-Soo Lee, Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea.

Tel: +82-42-520-5388, Fax: +82-42-520-5388, E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

을 분해할 수 있어서 proteoglycan 복합체에 의해 물을 보유하는 것을 방해하며, 연골에서 압력에 저항하는 것과 같은 기계적 기능을 손상시킬 수 있다<sup>11)</sup>.

대황(*Rheum undulatum* L.)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 약리 성분은 주로 노란색의 뿌리에 함유되어 있다<sup>12)</sup>. 대황의 약리 효능으로는 진정, 지혈, 구충, 항종양과 혈압강하활성 등이 알려져 있고<sup>13)</sup>, 한방에서는 토혈과 혈뇨, 만성설사, 복막염 등을 치료하는데 이용되고 있다<sup>14~16)</sup>. 지금까지 대황의 주요 성분으로 많은 종류의 glucoside 화합물들과 sennoside, tannin, gallic acid 등이 보고되었고, 최근에는 신장 상피세포주<sup>17)</sup>에 대한 세포 독성과 대황 뿌리의 항산화 물질로 piceatannol 등이 보고되었다<sup>18)</sup>. 그러나 이와 같은 다양한 생리 및 약리효과가 알려져 있지만, 주름 생성 억제와 같은 피부미용효과에 관한 연구는 아직까지 실시되지 않았다.

한편, 현재까지 개발되거나 시판된 주름 생성 억제제는 효능이 적고 부작용이 있으며, 가격이 비교적 비싸다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구진은 기존의 피부 노화 억제 성분의 단점을 보완할 수 있는 새로운 소재를 다양한 식용식물 자원으로부터 생산하여 이를 미용식품 개발에 응용할 목적의 연속기획 연구로 전보<sup>19)</sup>의 복분자 elastase 저해 물질의 생산에 이어 본 연구에서는 비교적 피부 주름 생성 억제 활성이 우수했던 대황으로부터 elastase 저해제의 추출조건을 최적화하고 미용식품 산업으로의 응용성을 고려하여 이를 부분 정제하여 특성을 조사하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 약용 식물 및 시약

본 실험에서 사용한 대황은 2005년에 재배된 것을 충남 금산에 있는 약초시장에서 구입하여 바로 동결 건조하여 분쇄시킨 후 분말로 만들어 시료로 사용하였다. Elastase 저해활성 측정을 위한 p-nitroanilide 전환효소는 porcine pancreatic elastase (Sigma, MO, USA)를, 기질로는 Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNa(Sigma, MO, USA)를 사용하였다.

HPLC에 사용한 용매와 trifluoroacetic acid는 Sigma사 제품의 HPLC 등급을 사용하였고, 기타 시약과 유기 용매는 일급 또는 특급품을 사용하였다.

### 2. 메탄올 추출물 제조

대황 분말 시료에 70%의 메탄올을 20배의 비율로 첨가하여 섞은 후 30°C에서 200 rpm으로 12시간 동안 진탕시켜 추출하였다. 이 추출액을 원심 분리(16,000×g/10 min)하여 상등액을 취하고 이를 Whatman No. 2로 여과한 후 rotary va-

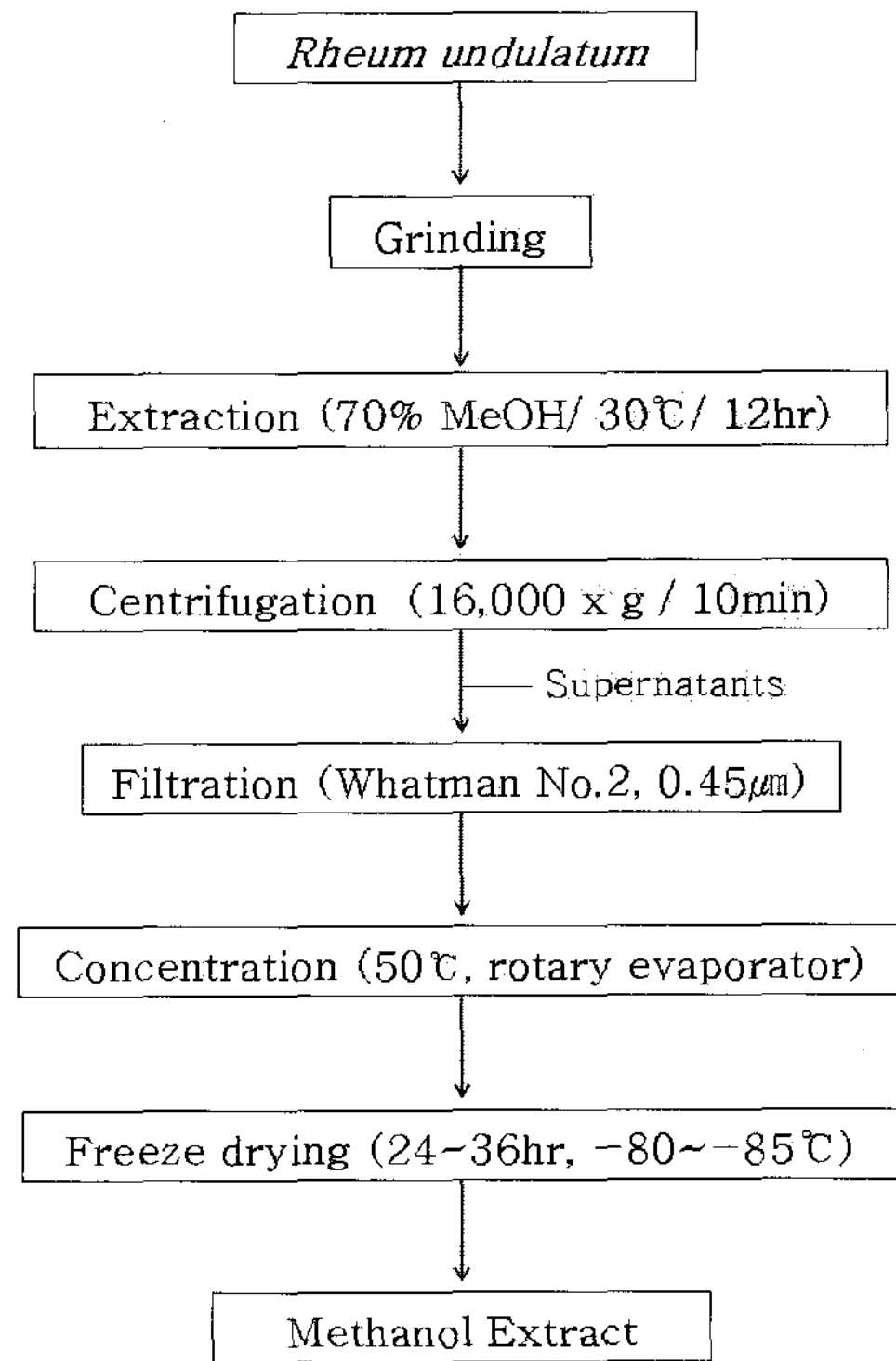


Fig. 1. Preparation of methanol extract from *Rheum undulatum* L.

cuum evaporator(EYELA, Rotary vacuum evaporator N-N series, Tokyo, Japan)로 유기 용매를 완전히 제거한 후 동결 건조(Operon, Gimpo, Korea)하여 메탄올 추출 시료로 사용하였다 (Fig. 1)<sup>12,13)</sup>.

### 3. Elastase 저해 활성 측정

0.2 M Tris-HCl 완충 용액(pH 8.0)에 0.8 mM suc-ala-ala-ala-p-nitroanilide를 녹여서 기질로 사용하였다. 또한, 돼지 췌장으로부터 얻은 elastase 1 unit을 동일 완충 용액에 녹여 효소액으로 하였다.

효소저해활성은 0.2 M Tris-HCl 완충 용액(pH 8.0) 760 µl에 30 µl(1 unit) elastase와 0.8 mM suc-ala-ala-ala-p-nitroanilide 100 µl를 넣어 37°C에서 10분간 예열시킨 후 3분간 반응시키고 410 nm에서 흡광도를 측정(Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA)하여 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 양을 정량하였다. Elastase 저해활성 1 unit은 분당 1 µM의 p-nitroanilide를 생성하는 elastase의 효소의 양으로 하였다. 또한 inhibitory activity는 다음의 식으로부터 계산한다.

Elastase inhibitory activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Elastase activity with sample}}{\text{Elastase activity without sample}}\right) \times 100$$

#### 4. Elastase 저해 물질의 부분 정제 및 특성

대황 elastase 저해제의 미용식품 응용성을 검토하기 위해 아래와 같이 부분 정제하여 물리화학적 특성을 조사하였다. 먼저, 동결건조한 대황의 메탄올 추출물에 1 : 100으로 물을 가한 후 다시 1 : 1로 hexane을 첨가하여 3회 추출한 후 hexane 층과 물층을 분리한 후 다시 물층을 위와 동일하게 순차적으로 chloroform층, ethyl acetate층, buthanol층 및 물층으로 나누어 비극성에서 극성쪽으로 유기 용매 분획을 실시한 다음, 이들 분획물들에 대하여 elastase 저해활성을 측정하여 활성 분획을 얻었다. 유기 용매 분획을 통해 얻어진 활성 분획인 ethyl acetate 농축액을 박층 크로마토그래피를 실시하여 용매 혼합 비율을 확립하고, 가로 6.5 cm, 세로 6.5 cm, 높이 66 cm의 컬럼에 silica gel을 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH를 17 : 2 : 1로 충전시킨 후, 활성 분획인 ethyl acetate 농축액을 loading 하였다. 가로 6.5 cm, 세로 6.5 cm, 높이 66 cm의 column에 Sephadex LH-20을 충전한 후 활성 분획물을 loading하여 크로마토그래피를 실시하였다. 활성 분획을 다시  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column에 loading하여 HPLC (YOUNGLIN, Anyang, Korea)를 실시하였다. 이때 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 acetonitrile을 1 ml/min의 유속으로 0%에서 100%까지 gradient를 실시하여 부분 정제하였다.

한편, 부분 정제된 elastase 저해제의 특성으로 외형의 색상과 용해도 및 UV 최대 흡수파장 등을 상법으로 측정하였다<sup>21)</sup>.

### 결과 및 고찰

#### 1. 대황 Elastase 저해제의 추출 최적 조건

각종 식물들의 다양한 추출물에 대한 elastase 저해활성을 측정한 결과, 전보<sup>19)</sup>에서와 같이 대황의 메탄올 추출물이 비교적 높은 활성을 보여 시료로 사용하였다. 대황으로부터 elastase 저해제를 대량으로 얻기 위해 추출 최적 온도와 추출 최적 시간을 검토한 결과, 추출 최적 온도는 50°C이었고, 그 이상의 추출 온도에서는 오히려 활성이 낮아졌으며 최적 추출시간은 24시간이었다(Fig. 2, 3). 이상의 결과로부터 대황 elastase 저해제는 대황의 동결 건조 분말을 70% 메탄올에 1 : 20으로 현탁시킨 후 50°C에서 24시간 추출하였을 때 가장 높은 저해 활성을 보여 가장 많이 추출되었으며, 이때 활성은 60.4%(IC<sub>50</sub>값;  $6.7 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ )이었다. 이 결과를 대황의 건조뿌리 분말에 80% 메탄올을 첨가한 후 실온에서 2일간 처리했을 때 항산화 활성물질이 대량으로 추출되었다는 오 등<sup>18)</sup>의 결과와 비교했을 때 추출온도는 50°C로 높았으나, 추출시간이 24시간으로 매우 짧은 결과이었다.

한편, 선정된 대황의 일반성분을 AOAC법<sup>22)</sup>으로 조사한 결과, 수분 9.1%, 회분 5.7%, 조단백질 1.1%, 조지방 8.0%, 탄수화물 76.1%이었다.

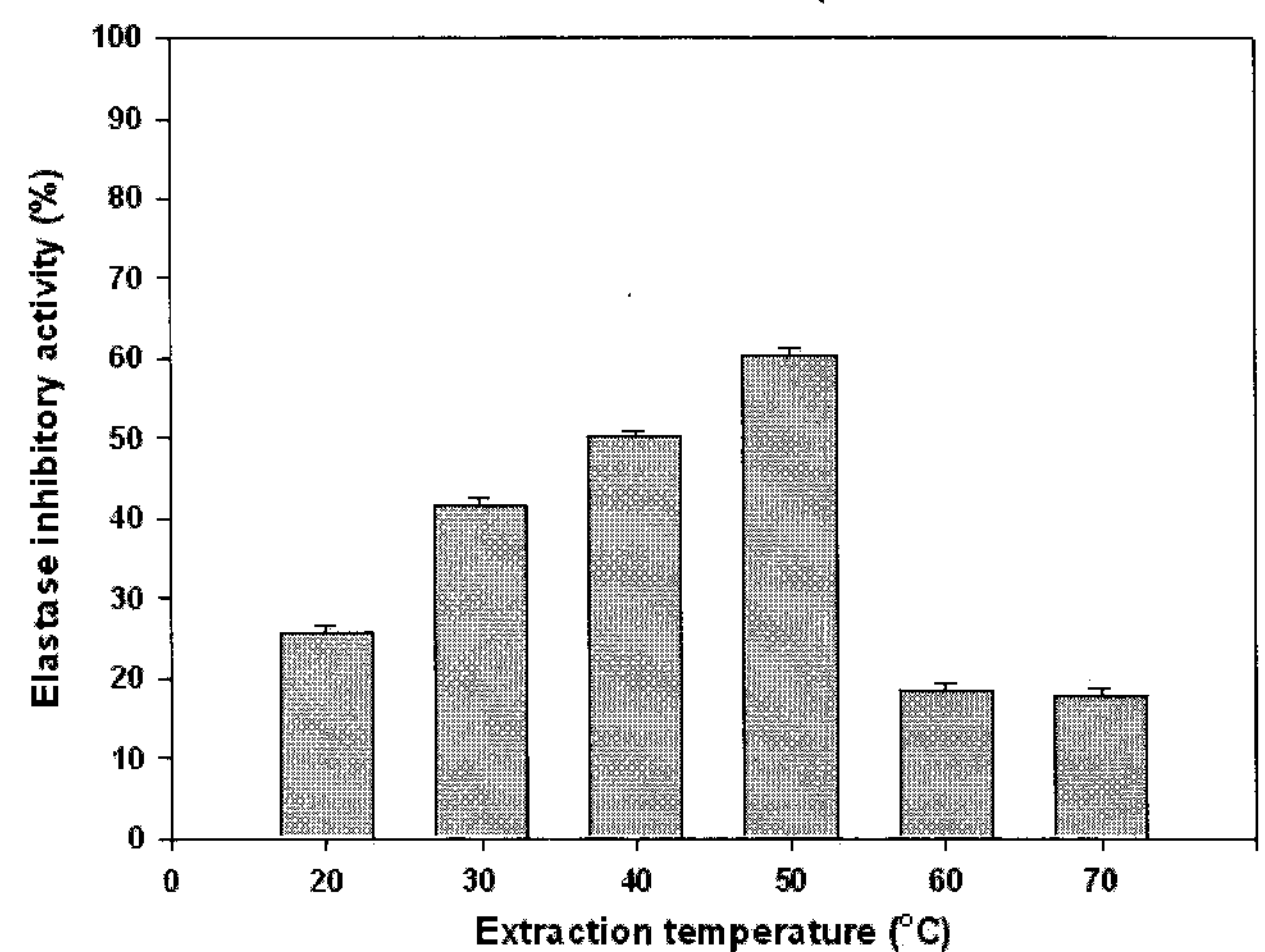


Fig. 2. Effects of extraction temperature on the elastase inhibitory activity of the methanol extracts from *Rheum undulatum* L.

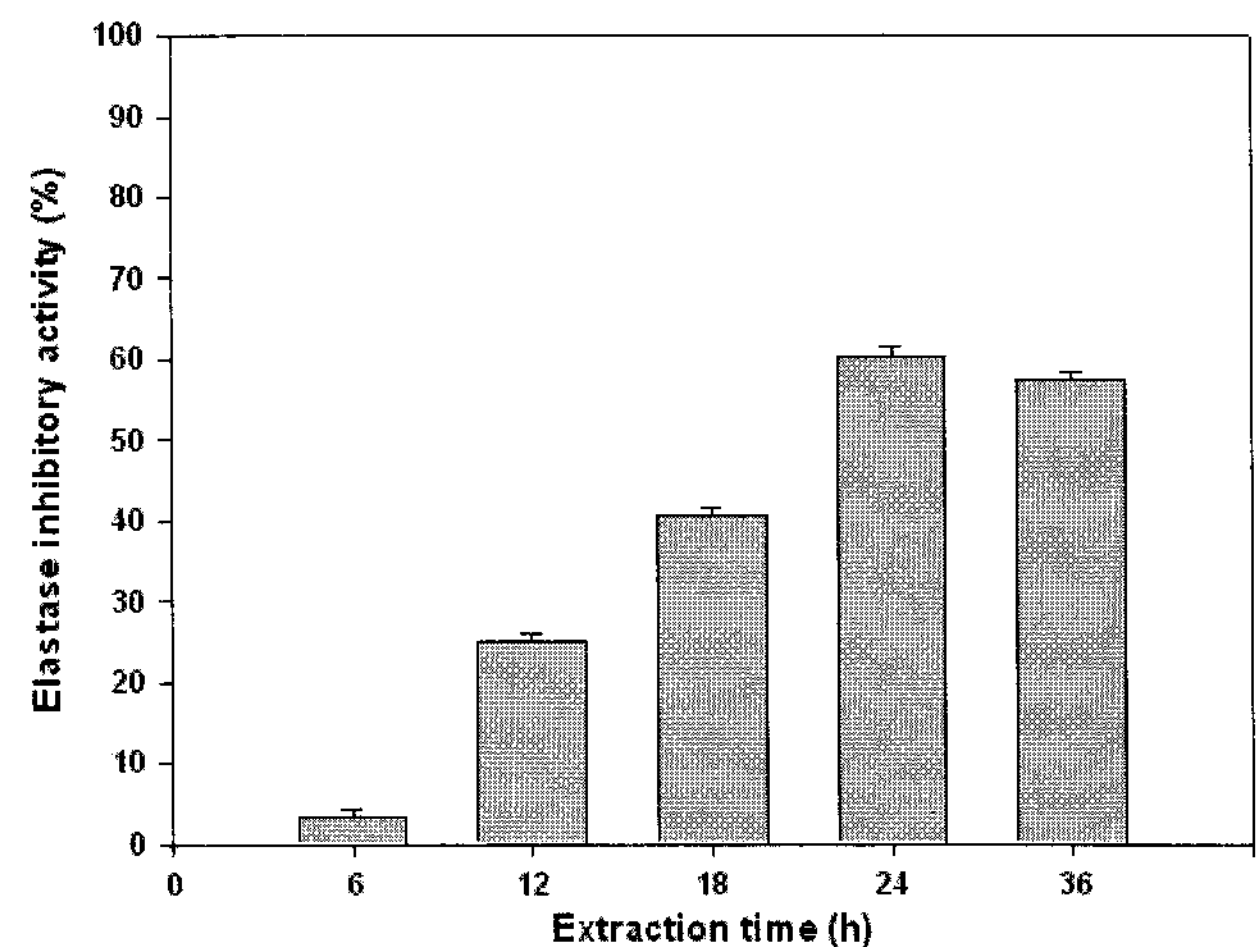


Fig. 3. Effects of extraction time on the elastase inhibitory activity of the methanol extracts from *Rheum undulatum* L.

#### 2. 대황 Elastase 저해제의 부분 정제

대황 elastase 저해제의 미용식품 산업으로의 응용을 위해 부분 정제한 결과는 다음과 같다. 대황의 메탄올 추출물에 대하여 각종 유기 용매로 분별 추출한 결과 ethyl acetate 분획물에서 83.2%로 가장 높은 활성을 보였고, buthanol 분획물에서는 16.0%, hexane 분획물에서는 12.2%를 보였으며, chloroform층에서는 활성이 없었다. 이 결과는 오 등<sup>18)</sup>이 대황 뿌리의 80% 메탄올 추출물을 연속 용매 분배추출하였을 때 ethyl acetate 추출물에서 항산화활성이 가장 높았다는 결과와 같은 것으로 대황에 함유되어 있는 기능성 물질들이 대체로 극성이 낮은 것으로 추정된다.

유기 용매 계층 추출의 활성 분획인 ethyl acetate 추출물을 연속적으로 Silica gel 컬럼 크로마토그래피, Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피, C<sub>18</sub> gradient pump 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 활성 분획인 C1를 분리하였다. 이 C1 활성 분획물을 동결건조 시킨 후 일정량의 Tris-HCl 완충 용액(pH 8.0)에 녹인 다음 0.45 μm의 HPLC prefilter로 여과하여 불순물을 제거시켰다. 이어서 μ-Bondapak C<sub>18</sub> column에 loading하여 HPLC를 실시하였고, 이어서 두 번의 RP-HPLC를 수행한 결과, 단일

peak를 보여(Fig. 4) 정제된 것으로 추정하였으나, 이어진 H-, C-NMR 및 GC-Mass spectrophotometry 결과 완전 정제가 되지 않고 부분 정제되었으며(Fig. 5), 이 부분 정제된 elastase 저해제의 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 1×10<sup>3</sup> μg/ml이었다.

3. Elastase 저해 물질의 특성

부분 정제된 elastase 저해제의 물리화학적 특성을 조사한 결과 Table 1과 같이 농황색 분말이었고, dimethyl sulfoxide와 메탄올, 에탄올 등에는 잘 녹았으나, 물, 헥산, 클로로포름 등의 용매에는 녹지 않았다. 또한 UV 최대흡수 파장은 231.5 nm와 275.5 nm이었다.

부분 정제된 elastase 저해제는 이들의 GC-Mass spectrophotometry(Fig. 5) 결과로 볼 때 분자량은 약 317Da의 식물 천연색소류인 안트라퀴논(anthraquinone)으로 추정되었지만, 확실한 물질 동정을 위해서는 추가의 고순도 정제가 필요하였다.

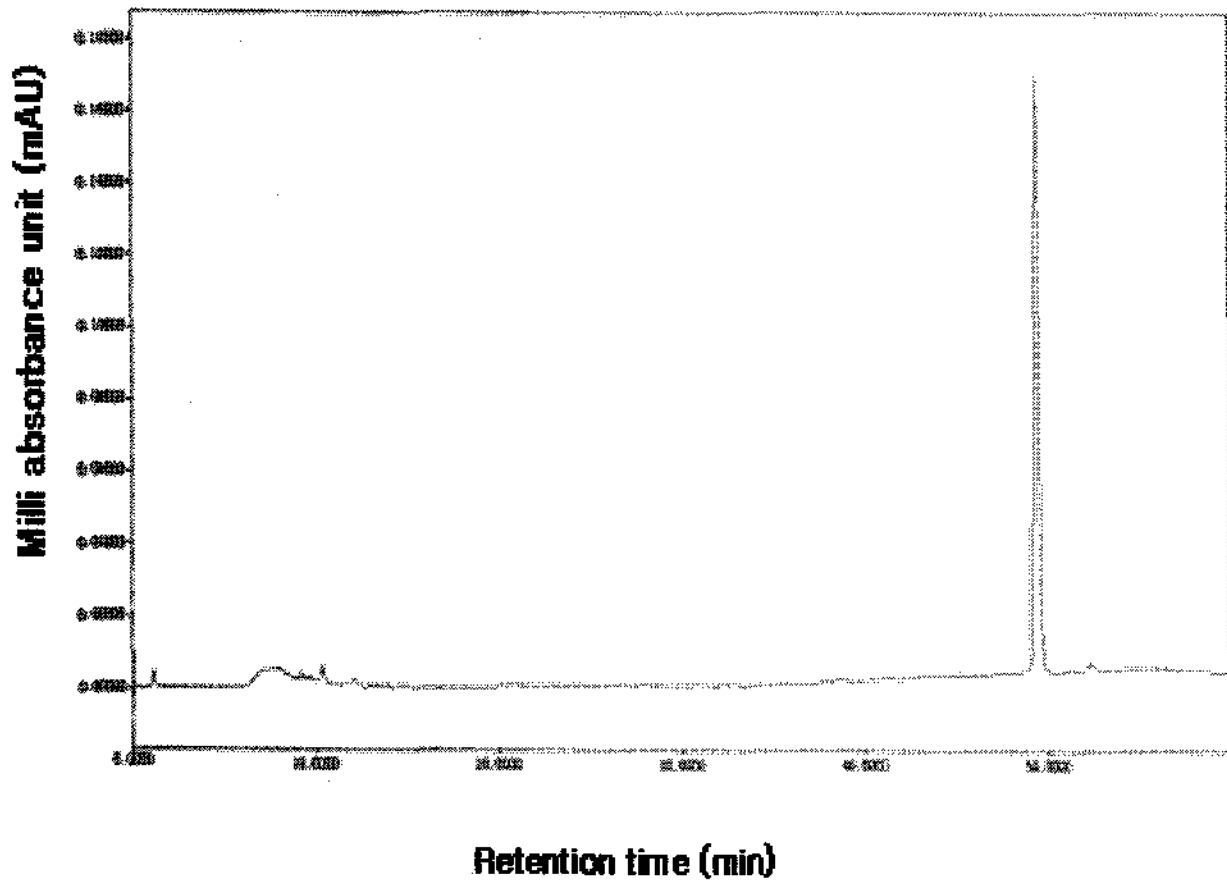


Fig. 4. Reverse-phase HPLC profile of the partial purified elastase inhibitor.

Table 1. Physicochemical properties of the partial purified elastase inhibitor

Appearance	Dark yellow powder
Solubility	Soluble - Dimethyl sulfoxide, methanol, ethanol
	Insoluble - Water, hexane, chloroform
UV( λ max)	231.5 nm
	275.5 nm

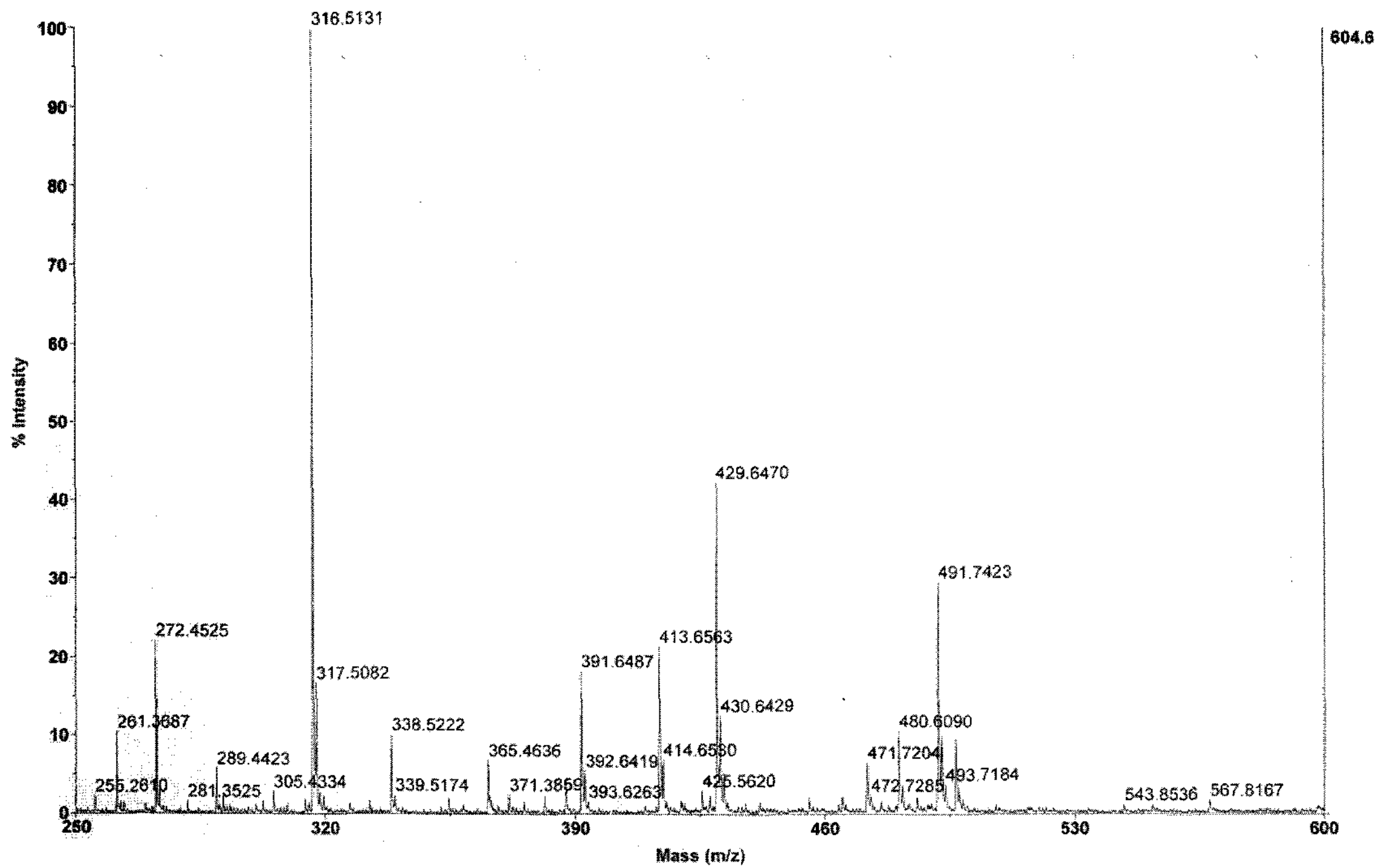


Fig. 5. GC-Mass spectrum of the partial purified elastase inhibitor.



## 요약 및 결론

본 연구에서는 약용 식물로부터 새로운 항주름성 미용식품을 개발하기 위하여 먼저 전보에서 elastase 저해활성이 우수하였던 대황의 메탄올 추출물로부터 elastase 저해제의 추출 최적 조건을 검토한 결과, 추출 최적 온도는 50°C, 추출 최적 시간은 24시간이었다. 이와 같은 최적 조건에서 대황으로 elastase 저해제를 추출하여 TLC와 Sephadex LH20 column chromatography, RP-HPLC 등으로 부분 정제한 후 물리화학적 특성을 조사한 결과, 본 연구의 대황 elastase 저해제는 dimethyl sulfoxide, 메탄올, 에탄올에 잘 녹았으나 물, hexan, 클로로포름에는 녹지 않았다. 또한, UV 최대 흡수 파장은 231.5 nm와 275.5 nm이었다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 한국산업기술재단의 지역혁신 인력양성사업(2004~2006)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- An, BJ, Lee, JY, Park, TS, Pyeon, JR, Bae, HJ, Song, MA, Baek, EJ, Park, JM, Son, JH, Lee, C and Choi, KI. Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14: 168-172. 2006 *J. Food Sci.* 67:218-222. 2002
- Lee, KK, Kim, JH, Cho, JJ and Choi, JD. Inhibitory effect of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* 21:71-82. 1999
- Lee, SY, An, JH and Cho, HY. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol.* 46:60-65. 2003
- Voegeli, R. Elastase and tryptase determination on human skin surface. *Cosmetic & Toiletries.* 111:51-58. 1996
- Lee, SH, Shin, DJ, Kim, DW, Jun, JB, Kim, JC and Chung, SL. Level of plasma elastase- $\alpha$ 1-proteinase inhibitor in patients with Behcet's disease. *Annals of Dermatology.* 11:9-2. 1999
- Balo, J and Banga, I. The elastolytic activity of pancreatic extracts. *J. Biochem.* 46:384-387. 1950
- Mainardi, CL and Kang, AH. Degradation of type IV(basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J. Biol. Chem.* 255:5435-5441. 1980
- Janoff, A. Elastase in tissue injury. *Annual Review Medicine.* 36:207-216. 1985
- Lee, KK and Choi, JD. Inactivation of spinach glycolate oxidase by arginine-specific reagent. *Kor. Biochem. J.* 119:86-92
- Kaiser, H, Greenwald, RA, Feinstein, G and Janoff, A. Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan. *J. Clinical. Investigation.* 57:625-632. 1976
- Hata, RI, Sumada, H and Seno, H. Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and abcobate in cultured human skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 173:261-267. 1988
- Shan, CS, Qadry, JS and Bhatt, JG. Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivatives in Indian rhubarb. *Planta Med.* 22:103-108. 1972
- 육창수. 원색 한국약용 식물도감, p158. 아카데미서적. 1993
- 육창수. 한약학 II, p206. 동명사. 1992
- 허준. 국역증보동의보감, p1204. 남산당. 1981
- 유시명, 한대석. 본초학, p83. 동명사
- Ra, MS, Chin, JE and Cho, NC. Cytotoxicity of crude extracts of *Rheum undulatum* L. with human kidney epithelial cell A498. *Korean J. Food & Nutr.* 13:460-464. 2000
- Oh, SJ, Baek, NI and Kim, HY. Piceatannol, antioxidant compound isolated from the root of *Rheum undulatum* L. *J. Kor. Soc. Agri. Chem. Biotechnol.* 44:208-210. 2001
- Kwak, YJ, Lee, DH, Kim, NM and Lee, JS. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 13: 213-216. 2005
- Park, WJ, Lee, BC, Lee, JC, Lee, EN, Song, JE, Lee, DH and Lee, JS. Cardiovascular biofunctional activity and antioxidant activity of Gugija(*Lycium chinensis* Mill) species and its hybrids. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 15:391-397. 2007
- Yoon, I, Cho, JY, Kuk, JH, Wee, JH, Jang, MY, Ahn, TH and Park, KH. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34:898-904. 2002
- AOAC. Official Methods of Analysis, 15th ed, pp.777-788. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1995

(2008년 5월 15일 접수; 2008년 6월 20일 채택)