

## 메밀 추출물의 기능성 화장품으로서의 응용가능성에 대한 연구

김진영 · 박수남<sup>†</sup>

서울산업대학교 정밀화학과  
(2007년 12월 26일 접수, 2008년 6월 14일 채택)

### A Study on Application for Cosmeceutical of *Fagopyrum esculentum* Extracts

Jin Young Kim and Soo Nam Park<sup>†</sup>

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  
(Received December 26, 2007; Accepted June 14, 2008)

**요약:** 본 연구에서는 기능성 화장품에의 응용하기 위하여, 메밀 추출물의 항산화, 미백 및 항주름 효능을 측정하고, 그 추출물의 성분 분석을 실시하였다. 씨앗 부분의 껍질과 껍질을 제거한 속으로 나누어 실험하였다. 항산화 효능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)을 이용한 free radical 소거 활성 측정, luminol-의존성 화학발광법을 이용한  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O$  계에서 생성된 활성산소종(ROS)의 소거 활성 측정, rose-bengal과 빛으로 유도된 사람 적혈구의 용혈에 대한 세포보호 효과를 측정하였다. 미백과 항주름 효능으로는 tyrosinase와 elastase의 활성 저해 능력을 측정하였다. 항산화 및 항노화 효능 측정 결과, 대부분 메밀 속 50 % ethanol 추출물을 제외한 나머지 분획 및 추출물에서 효과가 크게 나타났다. Free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)과 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 각각 메밀 껍질의 aglycone 분획( $3.5 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ )과 ethyl acetate 분획( $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ )이 가장 높은 것으로 나타났으며, 세포보호활성( $\tau_{50}$ )은 메밀 껍질의 ethyl acetate 분획이  $10 \mu\text{g/mL}$ 에서  $771.7 \pm 9.9 \text{ min}$ 으로  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호작용이 가장 크게 나타났다. Tyrosinase 활성 저해 능력(IC<sub>50</sub>)은 메밀 껍질과 속의 aglycone 분획이 각각  $53.6 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ ,  $35.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ 으로 arbutin보다 효과가 좋은 것으로 나타났다. Elastase 활성 저해 능력(IC<sub>50</sub>) 또한 메밀 껍질과 속의 aglycone 분획이 각각  $3.7 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $6.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다. 이러한 항산화 및 항노화 활성을 나타내는 메밀의 성분을 분석한 결과, 메밀 속의 ethyl acetate 분획에는 (+)-catechin, (-)-epicatechin이 함유되어 있었고, 껍질에는 hyperin의 함량이 가장 많은 것으로 나타났으며, 이외에도 quercetin, rutin 등의 많은 플라보노이드 성분들이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 메밀 속 및 껍질 추출물이  $^1O_2$  혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히, 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다. 또한 태양 자외선으로 인한 기미, 주근깨 과형성 및 주름 생성에 있어 상당한 저해 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase and elastase and components of *Fagopyrum esculentum* extracts were investigated. *Fagopyrum esculentum* used for this study is hulls and dehulled seeds. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH) scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) and reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of extract/fractions from *Fagopyrum esculentum* were measured. The aglycone ( $3.5 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ ) and ethyl acetate fractions ( $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) of hulls showed the most effective scavenging activities. The protective effects on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethyl acetate fraction exhibited the most prominent cellular protective effect ( $\tau_{50}$ ,  $771.7 \pm 9.9 \text{ min}$  at  $10 \mu\text{g/mL}$ ). The inhibitory effect of aglycone fraction of hull and dehulled seeds on tyrosinase were examined ( $53.6 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ ,  $35.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ , respectively). And The inhibitory effect of aglycone fraction of hull and dehulled seeds on elastase were investigated ( $3.7 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  and  $6.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$  respectively). But 50 % ethanol extract rarely exhibited the inhibitory activity on tyrosinase and elastase. (+)-Catechin and (-)-epicatechin were

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

contained in ethyl acetate fraction of dehulled seeds. And ethyl acetate fraction of hull contains flavonoids of hyperin, quercetin, rutin and so on. These results indicate that extract/fractions of *Fagopyrum esculentum* 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. *Fagopyrum esculentum* extract could be used as a new cosmeceutical for whitening and anti-wrinkle products.

**Keywords:** *Fagopyrum esculentum*, flavonoids, antioxidant, photohemolysis, 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  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROOH}$  및  $\text{HOCl}$  등을 포함한다. 이들은 고 에너지 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 피부노화를 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 광노화와 연관되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다.

메밀(*Fagopyrum esculentum*)은 마디풀과의 한해살이풀의 일종으로 유럽, 아메리카, 아프리카 남부, 오스트레일리아 등 전 세계적으로 널리 분포하고 있다[17]. 우

리나라에서는 전국 각지에서 재배하며, 음식에 대한 원재료로 많이 쓰이고 있다[18].

메밀에 함유된 성분에는 rutin, quercetin, isoorientin, orientin, vitexin 및 isovitexin 등이 알려져 있고[19], 그 중에서도 rutin 함량이 많은 것으로 보고되고 있다. Rutin은 고혈압, 동맥경화 등에 효과가 있어 예부터 혈관 질환에 사용되어 왔고[20,21], 항알러지와 항부종 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[24,25]. 또한 메밀은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 및 hypochlorous acid (HOCl)의 소거활성과 지질과산화 반응 억제 작용 등 항산화 효과가 있다[22,23].

상기에서와 같이 메밀 추출물을 이용한 일부의 항산화 작용에 관해서는 연구가 이루어졌으나, 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 각종 활성산소종( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  등)이 생성되는 계(Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계)에서의 각종 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 메밀 추출물(혹은 분획), 다시 말해 메밀 씨앗을 껍질과 껍질을 벗긴 속으로 분리하여 이를 대상으로 추출물 및 분획을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서의 총 항산화능, 이들 추출물(혹은 분획)의 성분 분석, 그리고 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과 및 멜라닌 생성에 핵심효소인 tyrosinase 활성 저해 효과를 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 메밀의 항산화능을 비교 평가하고 활성산소에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 가능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 100, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA)사, 화학발광기는 Berthold (Germany)사, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

성분 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm)로 Merck (USA)사에서 구입하였으며, high performance liquid chromatography (HPLC)의 column은 Luna C18, 5  $\mu$ m (250  $\times$  4.6 mm) (Phenomenex, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 메밀 추출물의 제조

실험에 사용된 메밀은 2007년 12월 경에 서울시 제기동에 위치한 경동시장에서 메밀 씨앗에서 껍질을 제거한 속과 메밀 껍질을 따로 구입하여 사용하였다. 메밀 껍질과 속은 Figure 1과 같은 방법으로 추출하였다. 메밀 속과 껍질은 50 % ethanol과 1 : 15의 비율로 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액의 일부는 감압·농축하여 50 % ethanol extract로 사용하였고, 일부는 hexane으로 비극성 성분을 제거하였고, 이후 ethyl acetate로 추출하여 얻은 추출액을 감압·농축하여 파우더를 얻어 실험에 사용하였다. 또한 ethyl acetate 분획의 일부는 산가수분해 시켜 당을 제거시킨 aglycone 분획을 만들었다. Ethyl acetate 분획에 함유되어 있는 배당체는 aglycone에 당이 결합되어 있어 수용성이 커 세포막의 투과가 용이하지 못하기 때문에 피부 또는 세포막으로의 투과를 향상시킬 목적으로 당 부분을 산가수분해 시켜 제거한 aglycone 분획을 제조하고 이를 제품에 응용 가능함을 검토하고자 하였다.

실험 방법은 ethyl acetate 분획 일정량에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류시킨 용액을 5 % KOH 용액으로 중화시킨 후, ethyl acetate 분획을 얻어 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

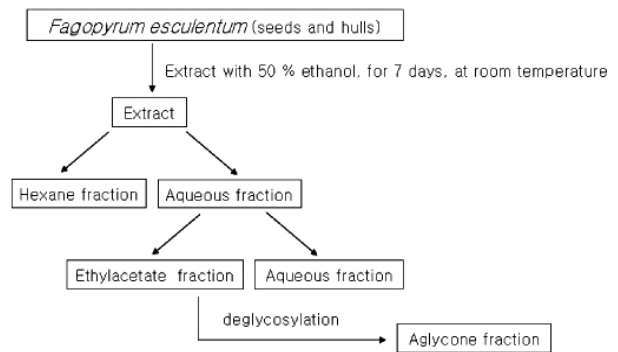


Figure 1. Scheme for preparation of compounds from *Fagopyrum esculentum* (seeds and hulls).

### 2.3. 메밀 추출물의 항산화 효과 측정

#### 2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

DPPH법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol과 추출물을 각각 1 mL씩 첨가한 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로서 표기하였다.

#### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

총항산화능은 luminol이 ROS에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 먼저 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 추출물을 농도별로 넣는다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu$ L 및 5 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu$ L를 넣고 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40  $\mu$ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 화학발광기의 6개의 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로서 표기하였다.

### 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포막과피 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 의한 세포손상(과피)에 대한 보호효과를 측정 할

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. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다.

#### 2.4.2. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL에 추출물을 농도별로 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (10.0  $\mu$ M) 0.5 mL를 가하고 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 비례하기 때문에 메밀 추출물의 광용혈에 미치는 효과를 투광도로부터 구할 수 있다. 결과는 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 로 나타내었다.

대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 31 min으로 오차범위  $\pm$  1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다.

### 2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌은 L-tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase가 핵심 효소로 작용하여 생성되기 때문에 tyrosinase의 활성을 저해하는 능력을 측정하였다. 실험방법은 potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.1 M에 L-tyrosine (0.3 mg/mL)을 용해시킨 용액 1.9 mL에 추출물 0.1 mL과 tyrosinase (1,250 units/mL) 0.1 mL를 가한 후 37  $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 항온 배양시킨다. 10 min 후 반응혼합물을 얼음 수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정한다. Tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로 표기하였다.

### 2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에 있어 주된 역할을 하는 matrix metalloproteinases (MMPs)인 elastase의 활성 저해 능력을 다음과 같이 측정하였다. 0.13 M (pH 8.0) Tris-Cl buffer에 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide 1.0 mM을 용해시킨 용액 1.9 mL에 추출물 0.1 mL를 첨가하여 25  $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 pre-incubation 시킨다. 10 min 후 elastase 용액을 100  $\mu$ L 첨가하고, 다시 25  $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 post-incubation 한 뒤 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해 활성은 elastase의 활성을 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로서 표기하였다.

### 2.7. 메밀 추출물의 성분 분석

#### 2.7.1. Thin Layer Chromatography (TLC)

메밀 속 및 껍질의 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 TLC로 분석하였다. 메밀 속의 ethyl acetate 분획의 TLC 분석에는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water를 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)의 비율로 만든 전개용매를 사용하였다. 껍질의 ethyl acetate 분획은 ethyl acetate : acetic acid : formic acid : distilled water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v), aglycone 분획은 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)을 사용하였으며, 예측되는 각종 기준물질들과 함께 전개시켜 성분 분석하였다.

#### 2.7.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

메밀 속의 ethyl acetate 분획의 HPLC 분석에는 0.9 % acetic acid 수용액과 acetonitrile을 95 : 5 ~ 70 : 30의 비율로 사용하였으며, 껍질의 ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획의 분석에는 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 각각 70 : 30 ~ 10 : 90, 50 : 50 ~ 0 : 100 비율로 분석하였다. 또한, 메밀 추출물의 성분 분석을 위하여 TLC로 분리된 각각의 띠를 긁은 후 50 % ethanol에 추출, 여과한 뒤 감압 농축하여 파우더를 얻어 100 % ethanol에 용해시킨 후, syringe filter (Millopore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과하고, 그 여액을 HPLC 분석에 사용하였다.

### 2.8. 통계처리

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

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 메밀 추출물의 수득률

메밀 속의 50 % ethanol extract의 수득률은 4.08 %, ethyl acetate 분획은 0.14 %, aglycone 분획은 0.063 % 이었다. 메밀 껍질의 50 % ethanol extract의 수득률은 2.12 %, ethyl acetate 분획은 0.24 %, aglycone 분획은 0.036 %이었다.

#### 3.2. 메밀 추출물의 항산화 활성

##### 3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

메밀 껍질 및 속의 추출물 및 분획에 대한 free radical 소거활성 측정 결과는 Figure 2에 나타내었다. Free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은, 메밀 속의 50 % ethanol 추출물은 92.2 µg/mL, ethyl acetate 분획은 8.3, aglycone 분획은 5.7로, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은 15.3 µg/mL, ethyl acetate 분획은 6.1, aglycone 분획은 3.5로 나타났다. 메밀 속의 50 % ethanol 추출물을 제외한 나머지 추출물 및 분획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid 및 (+)-α-tocopherol과 비교해 볼 때, 유사한 소거활성을 가진 것으로 나타내었다.

##### 3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 luminol 발광법을 이용한 메밀의 ethyl acetate 분획의 OCS<sub>50</sub> 값을 Figure 3에 나타내었다. 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)을 보면, 메밀 속의 50 % ethanol 추출물은 71.7 µg/mL, ethyl acetate 분획은 2.7, aglycone 분획은 4.7로, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은 0.7 µg/mL, ethyl acetate 분획은 0.2, aglycone 분획은 2.7로 나타났다. 메밀 속의 50 % ethanol 추출물을 제외한 나머지 추출물 및 분획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid 및 (+)-α-tocopherol과 비교해 볼 때, 총항산화능이 매우 큼을 알 수 있었다(Figure 3).

#### 3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 활성

활성산소에 대한 추출물의 세포보호활성은 rose-bengal 존재 하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min 광조사 후 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 등의 활성산소종으로 유도된 적혈구의 용혈정도를 암반응 시간에 따라 측정함으로 구하였다. 대조군의 경우 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)

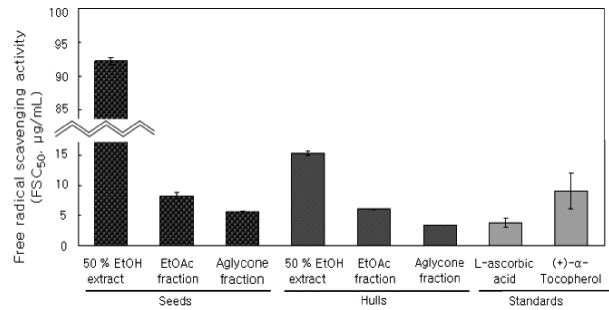


Figure 2. Free radical scavenging activity of extracts and fractions of *Fagopyrum esculentum* and references.

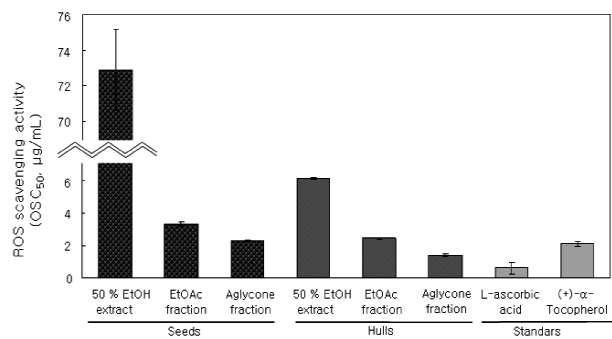
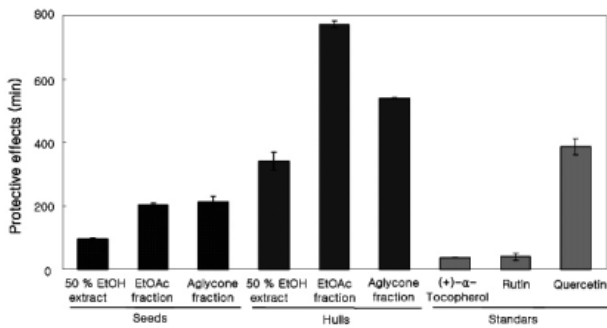


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of *Fagopyrum esculentum* extracts and references in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

은 약 31.0 ± 1.0 min으로 나타났다. 메밀 추출물의 용혈 억제 효과를 측정한 결과를 Table 1 및 Figure 4에 나타내었다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 세포보호 활성이 클수록 크게 나타난다. 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물과 ethyl acetate 분획은 농도 의존적으로 세포보호활성이 다른 추출물 및 분획에 비해 상당히 큰 것으로 나타났다. Table 1 중에 메밀 속의 ethyl acetate, aglycone 분획, 껍질의 aglycone 분획은 10 µg/mL보다 25 µg/mL에서 적혈구 용혈이 빠르게 일어나는 결과를 보여주었다. 이는 추출물의 농도가 클 때는 확인되지 않은 성분에 의한 세포막에 대한 교란작용에 기인된 가능성도 배재할 수 없다. 그래서 메밀 추출물 및 분획을 10 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub> 값을 비교하였다 (Figure 4). 이 그림에서와 같이 메밀 추출물 및 분획에서 세포보호활성은 50 % ethanol 추출물(hulls) > ethyl acetate 분획(hulls) > aglycone 분획(hulls) > ethyl acetate 분획(seeds) ≃ aglycone 분획(seeds) > 50 % ethanol 추출물(seeds) 순으로 나타나, 메밀 껍질의 추출

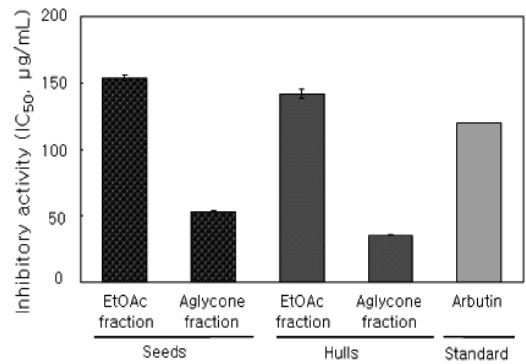


**Figure 4.** The effect of extracts and fractions from *Fagopyrum esculentum* (hulls and seeds) and standards at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

물 및 분획이 메밀 속보다 세포보호활성이 큰 것을 알 수 있다.

#### 3.4. Tyrosinase 저해 활성

메밀의 껍질 및 속의 추출물 및 분획의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과를 Figure 5에 나타내었다. 메밀 껍질 및 속의 50 % ethanol 추출물은 tyrosinase 저해 활성이 거의 나타나지 않았다(data not shown). 메밀 속의 ethyl acetate 분획의 tyrosinase 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )은 154.1



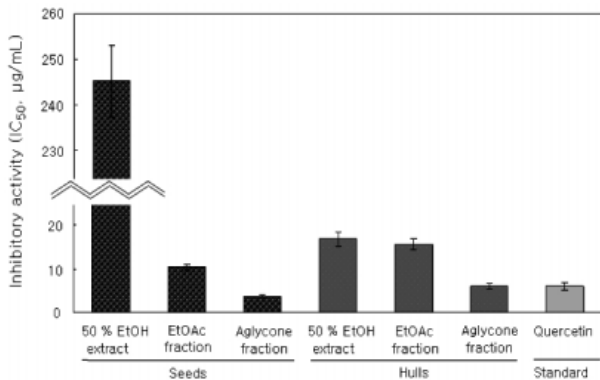
**Figure 5.** The effect of extracts and fractions from *Fagopyrum esculentum* (hulls and seeds) and standards on tyrosinase.

$\mu\text{g}/\text{mL}$ , aglycone 분획은 53.6로, 메밀 껍질의 ethyl acetate 분획은 142.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aglycone 분획은 35.6로 나타났다. 메밀 껍질 및 속의 ethyl acetate 분획은 미백 고시 원료인 arbutin (120.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 유사한 저해 활성을, aglycone 분획은 arbutin보다 약 3배 더 큰 저해 활성을 나타내었다. 따라서 메밀의 껍질 및 속의 ethyl acetate와 aglycone 분획이 미백 소재로서 개발 가능성이 있음을 시사한다.

**Table 1.** The effect of *Fagopyrum esculentum* Extracts on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

		$\tau_{50}$ (half time of hemolysis <sup>a)</sup> )			
		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
Compounds		1	5	10	25
Seeds	50 % Ethanol extract	45.4 $\pm 3.1$	46.6 $\pm 3.8$	96.4 $\pm 2.2$	134.0 $\pm 9.2$
	Ethyl acetate fraction	38.2 $\pm 0.4$	153.2 $\pm 12.4$	202.6 $\pm 5.5$	20.4 $\pm 1.0$
	Aglycone fraction	45.3 $\pm 3.3$	190.3 $\pm 6.3$	212.3 $\pm 18.5$	50.0 $\pm 0.4$
Hulls	50 % Ethanol extract	35.4 $\pm 1.0$	108.2 $\pm 19.9$	340.5 $\pm 29.0$	1440.7 $\pm 3.6$
	Ethyl acetate fraction	58.3 $\pm 1.7$	346.2 $\pm 24.1$	771.7 $\pm 9.9$	905.0 $\pm 15.1$
	Aglycone fraction	127.3 $\pm 7.6$	522.4 $\pm 14.5$	538.5 $\pm 1.5$	138.0 $\pm 3.7$
	(+)- $\alpha$ -Tocopherol	-	-	38.0 ( $\pm 1.8$ )	-
	Rutin	35.2 $\pm 1.4$	-	40.5 $\pm 10.44$	-
	Quercetin	46.0 $\pm 2.0$	153.5 $\pm 0.5$	387.0 $\pm 25.2$	776.8 $\pm 12.0$

<sup>a)</sup>Control,  $\tau_{50} = 31.0 \pm 1.0$  min



**Figure 6.** The effect of extracts and fractions from *Fagopyrum esculentum* (hulls and seeds) and standards on elastase.

### 3.5. Elastase 저해 활성

메밀 추출물의 elastase 저해 활성 측정 결과는 Figure 6에 나타내었다. 메밀 속의 50 % ethanol 추출물은 elastase 저해 활성이  $245.3 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획은 10.4, aglycone 분획은 3.7로 나타났으며, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은  $16.8 \mu\text{g/mL}$ , ethyl acetate 분획은 15.6, aglycone 분획은 6.0로 나타났다. 메밀 속의 50 % ethanol 추출물을 제외한 추출물 및 분획들은 매우 높은 elastase의 활성 저해 효과를 나타내었다. 특히 메밀 껍질과 속의 aglycone 분획은 효과적인 elastase 저해제로서 작용할 수 있다는 것을 알 수 있다(Figure 6).

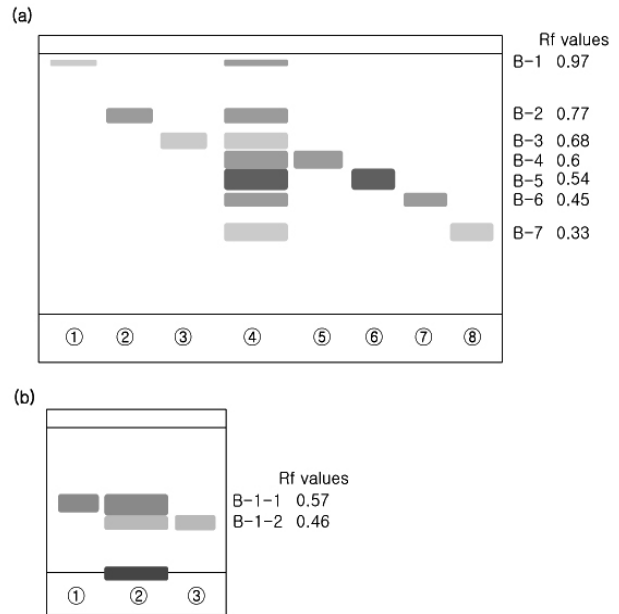
### 3.6. 메밀 추출물의 플라보노이드 성분 분석

#### 3.6.1. Thin Layer Chromatography (TLC)

메밀 속의 ethyl acetate 분획의 TLC 결과, R<sub>f</sub> value가 0.7 부근에서 (+)-catechin 및 (-)-epicatechin을 확인할 수 있었다(data not shown).

메밀 껍질의 ethyl acetate 분획의 TLC 결과는 Figure 7과 같다. Ethyl acetate 분획은 총 7개의 띠(B-1 ~ 7)로 분리되었다. 표준물질과 함께 전개시키고, UV 흡수 및 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색 등을 통해 분석한 결과, B-1은 quercetin, B-2는 quercitrin, B-3은 vitexin, B-4는 orientin, B-5는 hyperin, B-6은 isoorientin, B-7은 rutin으로 확인되었다(Figure 7(a)). 그 중 B-1은 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)의 비율의 용매로 전개시킨 결과 quercetin과 luteolin이 함께 존재함을 알았다(Figure 7(b)).

메밀 껍질의 aglycone 분획의 TLC 결과는 Figure 8와



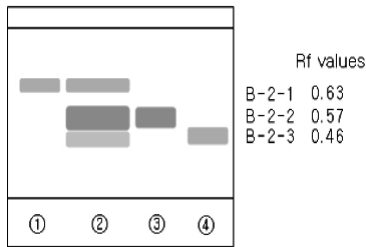
**Figure 7.** TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Fagopyrum esculentum* (hulls) and references. (a) ①: quercetin, ②: quercitrin, ③: vitexin, ④: ethyl acetate fraction, ⑤: orientin, ⑥: hyperin, ⑦: isoorientin, ⑧: rutin, Eluent system: ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v), (b) ①: quercetin, ②: ethyl acetate fraction, ③: luteolin, Eluent system: hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v).

같다. Aglycone 분획은 총 3개의 띠(B-1 ~ 3)로 분리되었다. 표준물질과 함께 전개시킨 결과 B-2-1은 kaempferol, B-2-2는 quercetin, B-2-3은 luteolin으로 확인되었다(Figure 8).

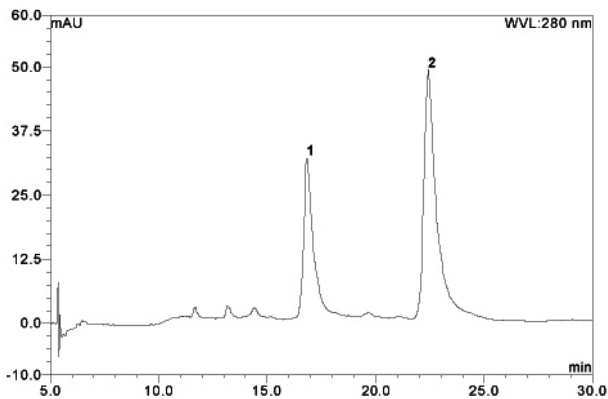
#### 3.6.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

메밀 속의 ethyl acetate 분획의 TLC chromatography 결과에서 (+)-catechin 또는 (-)-epicatechin으로 간주된 띠를 긁어 용출·여과하고, 농축시켜 얻은 용액을 HPLC로 분리한 결과를 Figure 9에 나타내었다. 크로마토그램은 2개의 피크를 나타내었다. 두 개의 피크를 최대 흡수 파장의 비교 및 표준물질을 이용해 분석한 결과 peak 1은 (+)-catechin, peak 2는 (-)-epicatechin으로 나타났다(Figure 9).

메밀 껍질의 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 10에 나타내었다. 크로마토그램은 9개의 피크를 나타내었다. 각각의 피크를 동정하기 위하여 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 7의 TLC 크로마토그



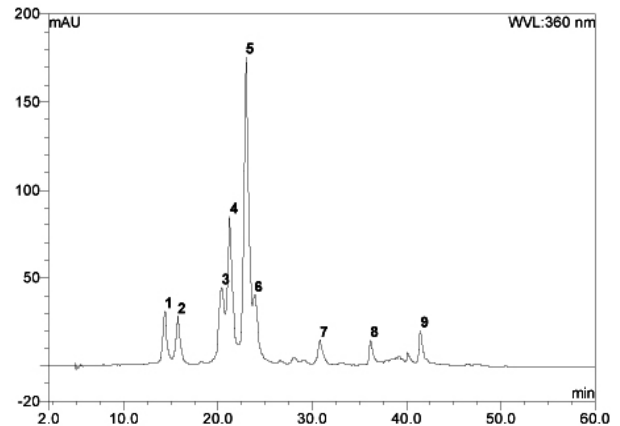
**Figure 8.** TLC chromatogram of aglycone fraction from *Fagopyrum esculentum* (hulls) and references. ①: kaempferol ②: aglycone fraction, ③: quercetin, ④: luteolin. Eluent system: hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v/v).



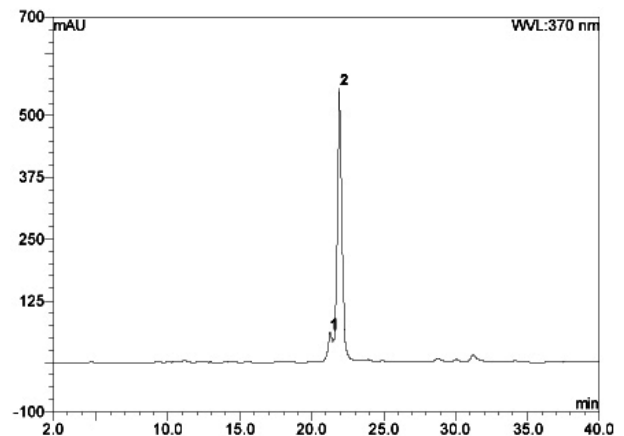
**Figure 9.** HPLC chromatogram of A-1 of ethyl acetate fraction from *Fagopyrum esculentum* (seeds).

램을 기준으로 하여 분리된 띠를 각각 긁어서 추출·여과하여 얻은 용액을 표준물질과 함께 UV-visible 흡수 스펙트럼을 비교하면서 HPLC로 분석하였다. Figure 10의 peak 1은 isoorientin, peak 2는 orientin, peak 3는 vitexin, peak 4는 rutin, peak 5는 hyperin, peak 6은 isoquercitrin, peak 7은 quercitrin, peak 8은 nicotiflorin, peak 9은 quercetin임을 확인하였다. 메밀 성분에 대한 연구들은 거의 대부분 rutin이 가장 많이 함유된 것으로 보고하고 있지만[17,19] 우리가 연구한 메밀 껍질에는 peak 5의 hypdrin 조성비가 20.23 %인 rutin보다 약 2.4 배 높은 47.71 %로 나타났다. 이는 재배지역에 따라 성분의 차이가 있는 것으로 생각된다[17].

메밀 껍질의 aglycone 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 11에 나타내었다. Figure 7과 비교한 결과 peak 1은 luteolin, peak 2는 quercetin임을 확인하였으며, 조성비는 전자의 경우 3.28 %, 후자는 96.72 %로 나타났다. Figure 7의 kaempferol로 나타난 B-1-1은 자외선 및 발



**Figure 10.** HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Fagopyrum esculentum* (hulls) (1: isoorientin, 2: orientin, 3: vitexin, 4: rutin, 5: hyperin, 6: isoquercitrin, 7: quercitrin, 8: nicotiflorin, 9: quercetin).



**Figure 11.** HPLC chromatogram of aglycone fraction from *Fagopyrum esculentum* (hulls) (1: luteolin, 2: quercetin).

색법을 이용하여 확인했을 때, TLC에서도 농도가 너무 얇어 HPLC에서 나타나지 않은 것으로 생각된다.

#### 4. 결 론

1) 메밀 속의 50 % ethanol extract의 수득률은 4.08 %, ethyl acetate 분획은 0.14 %, aglycone 분획은 0.063 % 이었다. 메밀 껍질의 50 % ethanol extract의 수득률은 2.12 %, ethyl acetate 분획은 0.24 %, aglycone 분획은 0.036 % 이었다.

2) Free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 메밀 속의 50 % ethanol 추출물이 92.2 µg/mL, ethyl acetate 분획 8.3,



aglycone 분획은 5.7로, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은 15.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Ethyl acetate 분획 6.1, aglycone 분획 3.5로 나타났다. Ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol 과 비교해 볼 때, 비슷한 소거활성을 가진 것으로 나타내었다.

3) 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 메밀 속의 50 % ethanol 추출물이 71.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethyl acetate 분획 2.7, aglycone 분획 4.7로, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethyl acetate 분획 0.2, aglycone 분획 2.7로 나타났다. 메밀 속의 50 % ethanol 추출물을 제외한 나머지 추출물 및 분획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교해 볼 때, 총항산화능이 큰 것으로 나타났다.

4) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 세포막 파괴에 대한 보호 활성에서 메밀 추출물 및 분획은 50 % ethanol 추출물 (hulls) > ethyl acetate 분획(hulls) > aglycone 분획(hulls) > ethyl acetate 분획(seeds) ≃ aglycone 분획(seeds) > 50 % ethanol 추출물(seeds) 순으로 나타났다.

5) Tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은, 메밀 속의 ethyl acetate 분획은 154.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aglycone 분획 53.6으로, 메밀 껍질의 ethyl acetate 분획은 142.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aglycone 분획 35.6로 나타났다. 메밀 껍질 및 속의 ethyl acetate 분획은 기준 물질인 arbutin과 유사한 활성을, aglycone 분획은 arbutin 보다 약 3배 더 큰 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다.

6) Elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은, 메밀 속의 ethyl acetate 분획은 10.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aglycone 분획은 3.7로, 메밀 껍질의 50 % ethanol 추출물은 16.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethyl acetate 분획 15.6, aglycone 분획 6.0로 매우 큰 elastase 활성 저해 효과를 나타내었다.

7) 메밀 속의 ethyl acetate 분획에는 (+)-catechin, (-)-epicatechin이, 껍질의 ethyl acetate 분획은 iso-orientin, orientin, vitexin, rutin, hyperin, isoquercitrin, quercitrin, nicotiflorin, quercetin, 및 luteolin이 함유되어 있었고, 이들 중 hyperin의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다.

이상의 결과들로부터 메밀의 ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획들은 총항산화능과 세포보호활성이 매우 큰 것으로 나타났으며, tyrosinase와 elastase 저해 활성도 큼을 확인하였다. 따라서 이들 추출물은 항산화 작용 등 기능성 소재로서 화장품에 응용 가능성이 있는만큼 보다 광범위한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 (재)서울테크노파크의 연구개발사업의 일환으로 서울테크노파크 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

## 참고 문헌

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. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, 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 connective 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. Scientist Korea*, **32**(3), 181 (2006).
  17. I. Kreft, N. Fabjan, and K. Yasumoto, Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, *Food Chemistry*, 508 (2006).
  18. H. Zielin'ski, A. Michalska, M. K. Piskula, and H. Kozłowska, Antioxidants in thermally treated buckwheat groats, *Mol. Nutr. Food. Res.*, **50**, 824 (2006).
  19. D. Dietry-Szostak and W. Oleszek, Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4384 (1999).
  20. Q. D. Christel, G. Bernard, V. Jacques, D. Thierry, B. Claude, L. Michel, C. Micheline, C. Jean-Claude, B. Francois Bailleul, and T. Francis, Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35 (2000).
  21. C. L. Liu, Y. S. Chen, J. H. Yang, B. H. Chiang, and C. K. Hsu, Trace element water improves the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) sprouts, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8934 (2007).
  22. T. Mukoda, B. Sun, and A. Ishiguro, Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**(3), 209 (2001).
  23. W. Mitsuru, O. Yasuo, and T. Tojiro, Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls, *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 1039 (1997).
  24. C. D. Kim, W. K. Lee, K. O. No, S. K. Park, M. H. Lee, S. R. Lim, and S. S. Roh, Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract, *International immunopharmacology*, **3**, 129 (2003).
  25. N. Ihme, H. Kiesewetter, F. Jung, K. Hoffmann, A. Birk, and A. Müller, Leg edema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 443 (1996).