J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 34, No. 2, June 2008, 117-127

오렴매 추출물의 항산화 활성, 성분 분석

양 희 정 · 김 은 희 · 박 수 남†

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2008년 1월 4일 접수, 2008년 6월 10일 채택)

Antioxidative Activity and Component Analysis of *Cayratia japonica* Extract

Hee Jung Yang, Eun Hee Kim, 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
(Received January 4, 2008: Accepted June 10, 2008)

요 약: 본 논문에서는 오렴매 추출물의 항산화, 성분 분석 및 elastase 저해 효과를 알아보았다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC_{50})은 50 % ethanol 추출물(114.3 μg/mL) < ethyl acetate 분획(59.4) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(58.8) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 오렴매 추출물의 총항산화능은 aglycone 분획(OSC_{50}, 3.30 μg/mL) < 50 % ethanol 추출물(1.21) < ethyl acetate 분획(0.34)순으로, ethyl acetate 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 오렴매 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 오렴매 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 25 μg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획은 25 μg/mL 농도에서 τ_{50}이 175.05 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC에서 2개의 띠로 분리되었으며, HPLC 실험(360 nm)에서 2개의 피이크로 분리되었다. 분리된 2가지 성분은 luteolin, apigenin이었으며, 그들의 성분비는 각각 47.50 %, 52.50 %로 나타났다. 오렴매 추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램은 3개의 띠로 분리되었고, HPLC 크로마토그램은 4개의 피이크를 보여주었다. TLC와 HPLC의 띠와 피이크를 확인한 결과, HPLC의 4개의 피이크는 용리순서로 peak 1 (조성비 11.14 %)은 luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside, peak 2 (15.38 %)는 apigenin-7-*O*-*β*-D-glucuronopyranoside, peak 3 (23.55 %)는 luteolin, peak 4 (49.92 %)는 apigenin로 확인되었다. Aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC_{50})이 70.5 μg/mL로 활성을 나타내었다. 이상의 결과들은 오렴매 추출물이 $^1O_2$ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 성분 분석과 이와 같은 항산화 활성을 통하여 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on elastase, and components of *Cayratia japonica* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC_{50}) of extract/fractions of *Cayratia japonica* were in the order: 50 % ethanol extract (114.3 μg/mL) < ethyl acetate fraction (59.4 μg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (58.8 μg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC_{50}) of some *Cayratia japonica* extracts in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activities were deglycosylated flavonoid aglycone fraction (OSC_{50}, 3.30 μg/mL) < 50 % ethanol extract (1.21 μg/mL)< ethyl acetate fraction (0.34 μg/mL). Ethyl acetate fraction showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Cayratia japonica* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Cayratia japonica* extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 25 μg/mL), particularly deglycosylated flavonoid aglycone fraction exhibited the most prominent celluar protective effect (τ_{50}, 175.05

† 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

min at 25 μg/mL). Aglycone fractions obtained from the deglycosylation reaction of ethyl acetate fraction among the *Cayratia japonica* extracts, showed 2 bands in TLC and 2 peaks in HPLC experiments (360 nm). Two components were identified as luteolin (composition ratio, 47.50 %), apigenin (52.50). TLC chromatogram of ethyl acetate fraction of *Cayratia japonica* extract revealed 3 bands and HPLC chromatogram showed 4 peaks, which were identified as luteolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (composition ratio, 11.14 %), apigenin-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside (15.38 %), luteolin (23.55 %) and apigenin (49.92 %) in the order of elution time. The inhibitory effect of aglycone fraction on elastase (IC_{50}, 70.5 μg/mL) was very high. These results indicate that extract/fractions of *Cayratia japonica* can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging $^1O_2$ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. And component analysis of *Cayratia japonica* extract and antioxidative effects could be applicable to new cosmetics.

Keywords: *Cayratia japonica, 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 $^1O_2$ 및 ·OH를 비롯하여 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, ROO·, RO·, 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 $^1O_2$ 및 ·OH은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라젠, 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. 콜라젠은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라젠의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 $^1O_2$을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1O_2$이 매개할 수 있다는 보고도 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 $^1O_2$을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. $^1O_2$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].

오렴매(*Cayratia japonica*)는 갈매나무목 포도과의 다년생 덩굴식물로, 주로 한국, 중국 그리고 일본 등의 온난한 기후의 지역에 분포하며, 황달, 류머티즘, 단독(丹毒), 설사(泄瀉), 부종(浮腫), 혈뇨(血尿) 등에 민간 처방으로 사용된 것으로 전해지고 있다[22]. 오렴매의 dichloromethane 추출물은 cytotoxic activity의 낮은 활성 및 Hep G2 세포에서의 glutathione-S-transfer (GST) 효소 유도 활성이 있고[23,24], monoamine oxidase (MAO)에 대한 저해 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 오렴매에 함유된 주요 플라보노이드로는 apigenin-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside, apigenin, luteolin, luteolin-7-*O*-glucoside, (+)-dihydroquercetin (taxifolin), (+)-dihydrokeampferol (aromaendrin) 및 quercetin 등이 알려져 있으며[25], 그 외 cayratintin, lupeol 및 β-sitosterol 등도 함유된 것으로 보고 되었다[26,27].

상기에서와 같이 오렴매 추출물을 이용한 항암작용 및 세포 독성에 관해서는 연구가 이루어졌으나, 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 $^1O_2$으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 각종 활성산소종(H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$, ·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 오렴매 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 $^1O_2$으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계에서의 총 항산화능, 이들 추출물(혹은 분획)의 성분분석, 그리고 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 알아보고자 하였다. 또한 몇

가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 오렴매의 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 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다.

완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (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, ethanol, methanol, ethyl acetate 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, luteolin은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용한 오렴매 재료는 2007년 6월경 서울숲에서 채취, 건조시킨 후 사용하였다.

2.2. 오렴매의 플라보노이드 분획 추출

건조된 오렴매 잎 200 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 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다. 이렇게 얻은 ethyl acetate 분획과 aglycone을 이용하여 항상화 효과 측정 및 이를 통한 화장품에서의 응용 가능성을 알아보았다.

2.3. 오렴매 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 오렴매 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 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}, μg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - [\frac{(A_{Experiment} - A_{Blank})}{A_{Control}}]\} \times 100$$

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 (·OH)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계는 각종 ROS ($O_2^{\cdot -}$, ·OH 그리고 H_2O_2)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정 할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서

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 μL 및 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$을 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정한 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50}, μg/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 ℃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. 오렴매 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL씩 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 × 20 cm × 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 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 ℃ 항온실에서 행하였다. 오렴매 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 오렴매 추출물의 플라보노이드 분석

오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 100 % ethanol에 녹인 후, syringe filter (Millipore 0.45 μm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다.

TLC 분석에서 전개용매는 ethyl acetate 분획의 경우 chloroform : acetone : formic acid = 75 : 16.5 : 8.5 (v/v)과 ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v)을 사용하여 분석하였으며, aglycone 분획은 *n*-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)를 사용하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f값과 자외선, 플라보노이드 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 % ethanol에 녹이고, syringe filter (Millopore 0.45 μm)로 여과한 후

Table 1. HPLC Conditions for Separation of ethyl acetate and Deglycosylated Fraction from *Cayratia japonica* (CJ) 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 H2O in 50 % acetonitrile solution
	(70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for ethyl acetate fraction
	(50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

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-$(Ala)_3$-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μL에 측정시료용액 7.5 μL와 buffer 92.5 μL를 첨가하여 25 ℃에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μL 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 ℃ 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-$(Ala)_3$-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M Tris-Cl buffer 1,300 μL를 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. 오렴매 추출물의 수득율

3.1.1. 오렴매(*Cayratia japonica*) 추출물

건조한 오렴매 200 g을 잘게 잘라 50 % ethanol 2 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득률은 19.89 %이었다. ethyl acetate 분획은 50 % ethanol로 추출한 것을 1차 hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 3.19 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.56 %였다. ethyl acetate 분획은 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 ethyl acetate 분획 플라보노이드에서 당을 제거한 플라보노이드가 존재한다. 본 연구에서는 화장품에 응용할 목적으로 50 % ethanol 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

3.2. 오렴매 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.

오렴매(*Cayratia japonica*) 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)-α-tocopherol의 free radical 소거활성(FSC_{50}) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 오렴매 추출물은 50 % ethanol 추출물인 경우 FSC_{50}가 114.3 μg/mL, ethyl acetate 분획은 59.4 μg/mL, aglycone 분획은 58.8 μg/mL을 나타냈다. ethyl acetate 분획과 aglycone 분획은 free radical 소거활성이 유사한 것으로 나타났으나, 다른 비교 물질에 비해 비교적 큰 효과를 나타내지는 못했다. 비교 물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid의 free radical 소거활성은 3.79 μg/mL, (+)-α-tocopherol은 8.98 μg/mL이었다.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 당이 제거된 분획(deglycosylated fraction)의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC_{50})은 Table 3에서와 같이 3.30 μg/mL이었다. Table 3에서 오렴매 50 % ethanol 추출물은 1.21

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Cayratia japonica* (CJ) and References

Compounds	Scavenging activity (FSC_{50}, μg/mL)
Cayratia japonica extract (50 % EtOH)	114.3 (± 1.47)
Cayratia japonica extract (EtOAc fraction)	59.4 (± 1.77)
Deglycosylated fraction of *Cayratia japonica extract* (EtOAc fraction)	58.8 (± 1.03)
L-Ascorbic acid	3.79 (± 0.83)
(+)-α-Tocopherol	8.98 (± 2.93)

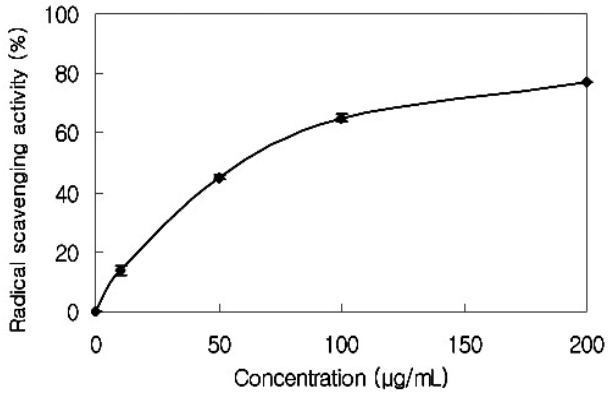

Figure 1. Free radical scavenging activity of deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction).

μg/mL, ethyl acetate 분획 0.34 μg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 ethyl acetate 분획이 50 % ethanol 추출물이나 당을 제거시킨 분획보다 활성산소 소거활성이 보다 큼을 보여주었다. ethyl acetate 분획 추출물은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 μg/mL)보다 그 이상의 활성을 보였다.

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

오렴매 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정한 결과가 Figure 3 및 Table 4에 나와 있다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 오렴매 추출물의 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 1, 10, 25 μg/mL의 농도에서 농도 의존적(τ_{50}이 각각 42.37, 76.00, 175.05 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 위의 결과에서 보듯이 25 μg/mL의 농도에서 가장 큰 세포보호 효과(175.05 min)를 보여주었다. 한편 50 % ethanol 추출물과 ethyl acetate 분획의 경우는 세포보호 효과가 농도에 따라 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출물의 농도가 클 때는 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용)을 나타낼 수 있는 물질이 존재할 가능성도 생각할 수 있다.

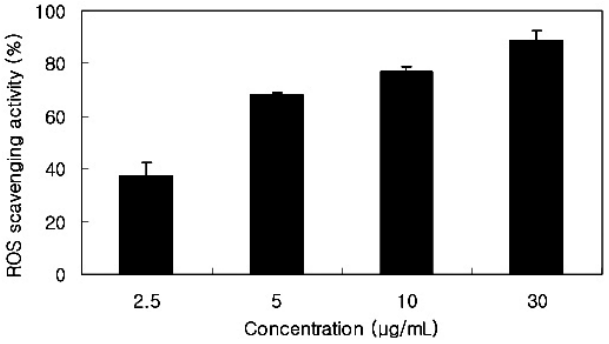

Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction).

Table 3. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *Cayratia japonica* and References

Compounds	Scavenging activity (OSC_{50}, μg/mL)
Cayratia japonica extract (50 % EtOH)	1.21 (± 0.48)
Cayratia japonica extract (EtOAc fraction)	0.34 (± 0.75)
Deglycosylated fraction of *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction)	3.30 (± 1.36)
L-Ascorbic acid	1.50 (± 0.85)

또한 플라보노이드 배당체가 들어있는 오렴매 ethyl acetate 분획의 세포보호 효과는 25 μg/mL에서 42.67 min 이고, 당이 제거된 분획(aglycone)은 동일 농도에서 175.05 min으로 결과가 나타났는데, 이는 플라보노이드 aglycone이 세포막으로의 침투가 용이함을 나타내며 이는 세포막에서 일어나는 활성산소에 의한 인지질의 산화와 세포막 파괴를 aglycone이 보다 더 효율적으로 억제함을 보여주고 있다.

따라서 세포보호 효과는 25 μg/mL에서 50 % ethanol 추출물(τ_{50}, 38.47 min) < ethyl acetate 분획 (42.67) <

Table 4. Effects of Extracts from *Cayratia japonica* and References on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

τ_{50} (half time of hemolysis[a)])			
Concentration, μg/mL	1	10	25
Cayratia japonica extract (50 % EtOH)	43.15 (± 8.35)	40.63 (± 3.18)	38.47 (± 3.49)
Cayratia japonica extract (EtOAc fraction)	43.80 (± 1.20)	47.58 (± 1.11)	42.67 (± 5.40)
Deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction)	42.37 (± 5.56)	76.00 (± 8.26)	175.05 (± 13.15)
(+)-α-Tocopherol	-	38.00 (± 1.80)	74.33 (± 6.35)

[a)]Control, τ_{50} = 31 ± 1.0 min

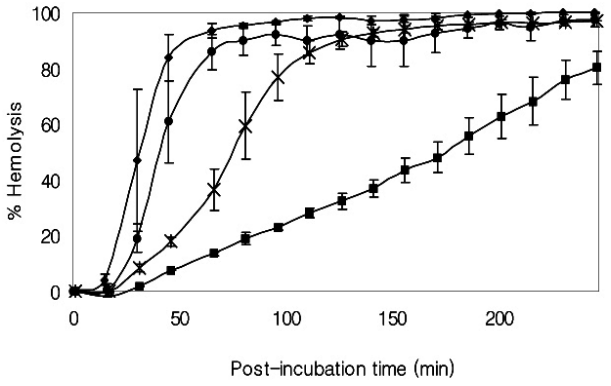

Figure 3. Effects of deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction) on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time : 15 min, pre-incubation time: 30 min, [rose-bengal] = 1.5 μM, concentrations of deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction): ◆-◆: control, ●-●: 1 μg/mL, ∗-∗: 10 μg/mL, ■-■: 25 μg/mL.

당이 제거된 분획(175.05) 순으로 증가하였다. 10 ~ 50 μg/mL 농도에서 오렴매 추출물의 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)-α-tocopherol보다도 세포보호 효과가 큼을 알 수 있었다.

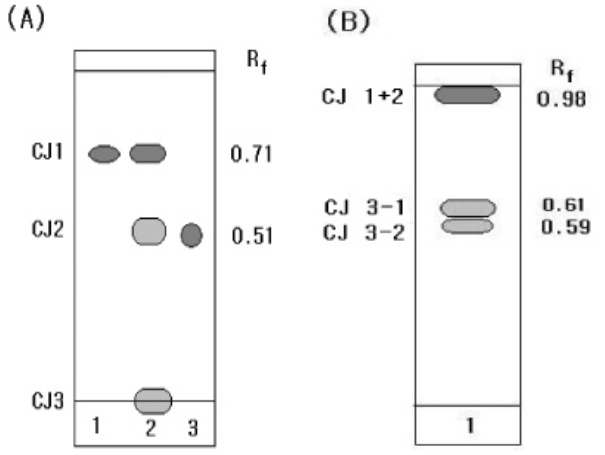

Figure 4. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Cayratia japonica* (CJ) and references. (A) Eluent system; chloroform : acetone : formic acid = 75 : 16.5 : 8.5 (v/v). 1: apigenin, 2: ethyl acetate fraction, 3: luteolin. (B) Eluent system; ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v). 1: ethyl acetate fraction.

3.4. 오렴매 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.4.1. 오렴매 추출물의 TLC 성분 분석

오렴매 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 4 및 Figure 5에 나타내었다. Figure 4에 A는 전개용매 조건 chloroform : acetone : formic acid = 75 : 16.5 : 8.5 (v/v)으로 50 % 에탄올로 추출한 오렴매 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램으로, 3개의 띠(CJ1, CJ2, CJ3)로 분리되었다. 그 중 R_f 0.71인 CJ1는 자외선 및 황산 발색법 등으로 확인한 결과 농도가 가장 큰 것으로 나타났다.

또한 UV-Visible 흡수스펙트럼, IR 스펙트럼, NMR 등의 분광학적 데이터들과 표준물질을 이용하여 확인한 결과 CJ1은 apigenin, CJ2는 luteolin으로 확인되었으며, 이 성분들은 Han 등(2007)에 의해서 보고된바 있다[25]. CJ3는 플라보노이드 배당체로, 이는 Figure 4(B)에서 전개용매 조건 ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v)으로 분리했을 때 CJ3-1, CJ3-2로 나타났으며, 플라보노이드 발색법과 분광학적 자료로부터 CJ3-1은 luteolin 배당체(flavonoid glycosides), CJ3-2띠는 apigenin 배당체(flavonoid glycosides)임을 확인하였다. 또한 CJ1과 CJ2는 Figure 4(B)에서 CJ1+2로 표시한 부분에서 함께 나타났다.

Figure 5은 오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획을 당가수분해시켜서 얻은 당이 제거된 분획(aglycone 분획)

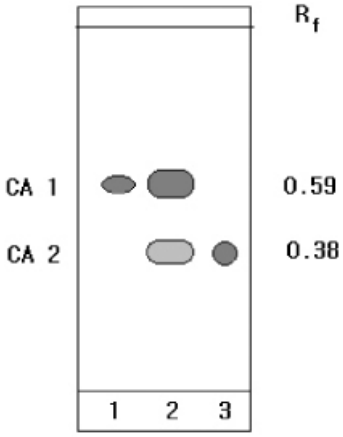

Figure 5. TLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction) and references. 1: apigenin, 2: deglycosylated fraction (EtOAc fraction), 3: luteolin. Eluent system; *n*-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v).

의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone 분획은 2개의 띠(CA1, CA2)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 CA1은 apigenin, CA2는 luteolin 임을 알 수 있었다. 따라서 ethyl acetate 분획을 당 가수분해시켜서 얻은 당이 제거된 분획(aglycone 분획)에는 플라보노이드 배당체는 존재하지 않았다.

3.4.2. 오렴매 추출물의 HPLC 성분 분석

오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 6과 같다. 크로마토그램은 4개의 피이크를 나타내었다. Figure 5와 함께 표준 물질을 사용하여 peak 3 및 peak 4는 각각 luteolin 및 apigenin 임을 확인하였다.

Figure 4(B)에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 각각 긁어서 추출 · 여과하고 용매를 감압 · 건조시켜 얻은 띠별 파우더를 당 제거반응 시킨 후 에탄올 용액으로 만들고 이들을 HPLC 분석에 사용함으로써 Figure 6에 있는 피이크들이 어떤 플라보노이드인가를 알아보고자 하였다. 또한 분리된 TLC 띠 성분과 HPLC 피이크, UV-Visible 흡수스펙트럼, IR 스펙트럼 등의 분광학적 데이터로부터 Figure 6에서 peak 1 (조성비, 11.14 %)은 luteolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside, peak 2 (15.38 %)는 apigenin-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다. 나머지 peak 3 및 4은 표준물질을 통해 각각 luteolin (23.55 %)과 apigenin (49.92 %)임을 확인하였다.

오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거반응 후

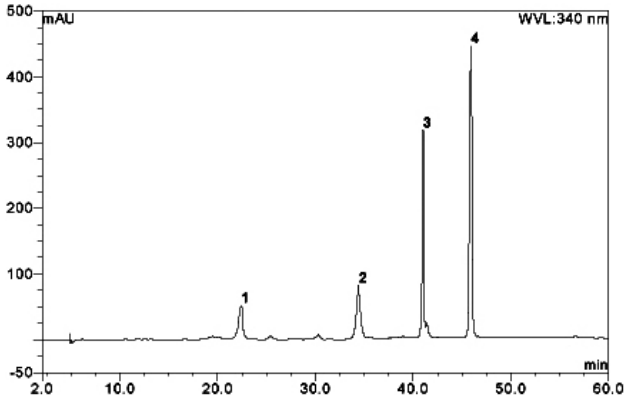

Figure 6. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Cayratia japonica* (CJ), at λ = 340 nm. 1: luteolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside, 2: apigenin-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside, 3: luteolin, 4: apigenin.

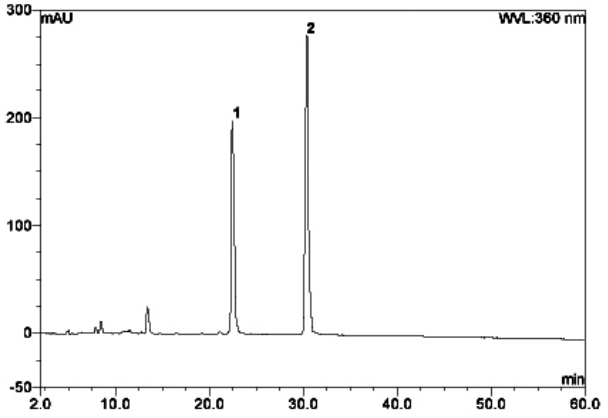

Figure 7. HPLC chromatogram of deglycosylated fraction (aglycone fraction) from *Cayratia japonica* (CJ) extract (EtOAc fraction). 1: luteolin, 2: apigenin.

얻어진 aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 7과 같다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 5의 TLC 크로마토그램과 Table 6을 통한 검량곡선, 그리고 Figure 7에서 확인한 바와 같이 Figure 7의 peak 1은 luteolin, peak 2는 apigenin 임을 확인하였고, 2가지 플라보노이드의 조성비는 luteolin (peak 1) 47.50 %, apigenin (peak 2) 52.50 %로 나타났다(Table 5).

3.5. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등

Table 5. HPLC Quantitative Analysis Data of Deglycosylated Fraction from *Cayratia japonica* (CJ) Extract (Aglycones of Ethyl Acetate Fraction)

No.	Ret. time (min)	Peak name	Height (mAU)	Area mAU* (min)	Rel. area (%)	Amount mM
1	22.46	Luteolin	197.567	69.518	47.50	0.390
2	30.37	Apigenin	277.955	108.340	52.50	0.431
Total			475.522	177.859	100.00	0.822

Table 6. Equations of Calibration Curves Obtained for Flavonoid Standards (λ = 360 nm)

Standard	Calibration curves	R^2
Luteolin	y = 195.352x - 7.248	99.967
Apigenin	y = 239.772x + 4.898	99.995

이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC_{50})이 70.5 μg/mL로 활성을 나타내었다(Table 7). 비교물질로 사용한 주름개선제 oleanolic acid는 저해 활성이 13.70 μg/mL이었다.

4. 결 론

1) 오렴매 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 19.89 %, ethyl acetate 분획의 경우 3.19 %이였다.

2) 오렴매 추출물의 free radical 소거능력(FSC_{50})은 50 % 에탄올 추출물 114.3 μg/mL, ethyl acetate 분획 59.4, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 58.8로 나타났다.

3) 오렴매 추출물의 활성산소 소거활성(OSC_{50})은 오렴매 에탄올 추출물, 1.21 μg/mL, ethyl acetate 분획, 0.34, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 3.30으로 오렴매 ethyl acetate 분획이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4) $^1O_2$으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 오렴매 추출물은 μg/mL의 농도 범위(1 ~ 25 μg/mL)에서 농도-의존적으로 $^1O_2$으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 오렴매 ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 25 μg/mL 농도에서 175.05 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

Table 7. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethyl Acetate Fraction of *Cayratia japonica* (CJ) Extract and Reference Compounds on Elastase

Compounds	Inhibition (IC_{50}, μg/mL)
Deglycosylated fraction from *Cayratia japonica* extract (EtOAc fraction)	70.5 ± 2.08
Oleanolic acid	13.70 ± 1.03

5) 오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획의 TLC는 3개의 띠(CJ1 ~ CJ3)로 분리되었고, 그 중에서 R_f 0.71인 CJ1의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

6) 오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 2개의 띠(CA1 ~ CA2)를 나타내었고, 이 때 CA1, CA2는 각각 apigenin, luteolin으로 확인하였다.

6) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 2개의 피이크를 나타냈고, 그 용리 순서는 luteolin, apigenin이었으며 조성비는 luteolin 47.50 %, apigenin 52.50 %로 나타났다.

7) 오렴매 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 340 nm에서 4개의 피이크를 나타내었고, peak 1 (조성비 11.14 %)은 luteolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside, peak 2 (15.38 %)는 apigenin-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside으로 peak 3 (23.55 %)는 luteolin 및 peak 4 (49.92 %)는 apigenin으로 확인되었다[25].

8) 오렴매 추출물 중 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC_{50})이 70.5 μg/mL로 활성을 나타내었다.

이상의 결과들은 오렴매 추출물의 항산화 작용과 더불어 오렴매 성분에 대한 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 elastase 저해활성으로부터 항산화 활성이 있는 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 (재)서울테크노파크의 연구개발사업의 일환으로 서울테크노파크 지원을 받아 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, Acdemic 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 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, *Adr. Pharmacol.*, **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. Le, 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 arense* (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 arense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
20. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidtive potenties 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 antiagiang effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
22. B. S. Jung and M. K. Shin., Encyclopedia of illustrated Korean natural grugs. Younglimsa, Seoul, 300 (1990).

23. C. C. Lee and P. Houghton, Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer, *J. Ethnopharmacology*, **100**, 237 (2005).
24. P. Houghton, R. Fang, I. Techatanawat, G. Steventon, P. J. Hylands, and C. C. Lee, The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity, P. Houghton *et al*. Methods, **42**, 377 (2007).
25. X. H. Han, S. S. Hong, J. S. Hwang, M. K. Lee, B. Y. Hwang, and J. S. Ro, Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia Japonica*, *Arch Pharm*., **30**(1), 13 (2007).
26. N. Ishikura and M. Shibata, Cayratinin, a new anthocyanin from the pericarp of Cayratia japonica. *Shokubutsugaku Zasshi*, **83**, 179 (1970).
27. F. Y. He and L. Q. Ling, Phytochemical study of *Cayratia japonica*. Zhong Cheng Yao Yan Jiu, **4**, 30 (1987).