

종가시나무 잎 추출물의 항산화 활성, 성분 분석

양희정 · 안유진 · 김재현 · 박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2008년 7월 9일 접수, 2008년 8월 13일 채택)

Antioxidative Activity and Component Analysis of *Quercus glauca* Leaf Extracts

Hee Jung Yang, You Jin Ahn, Jae Hyun 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 July 9, 2008; Accepted August 13, 2008)

요약: 본 연구에서는 종가시나무 잎 추출물의 항산화, 성분 분석 및 elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물(12.45 µg/mL) < ethyl acetate 분획(10.47) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(8.57) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 종가시나무 잎 추출물의 총항산화능은 50 % 에탄올 추출물(OSC₅₀, 4.2 µg/mL) < aglycone 분획(1.58) < ethyl acetate 분획(0.66) 순으로, ethyl acetate 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 종가시나무 잎 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 종가시나무 잎 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 50 µg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 aglycone 분획은 50 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 398.67 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC에서 2개의 띠로 분리되었으며, HPLC 실험(360 nm)에서도 2개의 피이크로 분리되었다. 분리된 2가지 성분은 quercetin 및 kaempferol이었으며, 그들의 성분비는 각각 55.77 %, 44.23 %로 quercetin의 함량이 큰 것으로 나타났다. 종가시나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램은 6개의 띠(QG 1 ~ QG 6)로 분리되었고, QG 3는 isoquercitrin, QG 4는 hyperin, QG 6는 rutin으로 확인되었다. Aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 73.5 µg/mL이고, elastase 저해활성(IC₅₀)은 16.2 µg/mL로 활성을 나타내었다. 이상의 결과들은 종가시나무 잎 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 종가시나무 잎 성분 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성으로부터 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on elastase, and components of *Quercus glauca* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀) of extract / fractions of *Quercus glauca* leaf was in the order: 50 % ethanol extract (12.45 µg/mL) < ethyl acetate fraction (10.47 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (8.57 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of some *Quercus glauca* leaf extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activity was 50 % ethanol extract (OSC₅₀, 4.2 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (1.58 µg/mL) < ethyl acetate fraction (0.66 µg/mL). Ethyl acetate fraction showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract / fractions of *Quercus glauca* leaf on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Quercus glauca* leaf extracts suppressed photohemolysis in a dose dependent

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

manner, particularly deglycosylated flavonoid aglycone fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ_{50} , 398.67 min at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aglycone fractions obtained from the deglycosylation reaction of ethyl acetate fraction among the *Quercus glauca* leaf extracts, showed 2 bands in TLC and 2 peaks in HPLC experiments (360 nm) as well. Two components were identified as quercetin (55.77 %), and kaempferol (44.23 %). TLC chromatogram of ethyl acetate fraction of *Quercus glauca* leaf extracts revealed 6 bands (QG1 ~ QG6). Among them, isoquercitrin (QG3), hyperin (QG4), and rutin (QG6) were identified. The inhibitory effect of aglycone fraction on tyrosinase (IC_{50} , 73.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and elastase (IC_{50} , 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was high. These results indicate that extract / fractions of *Quercus glauca* 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 *Quercus glauca* leaf extract and inhibitory activity on tyrosinase and elastase of the aglycone fraction could be applicable to new functional cosmetics.

Keywords: *quercus glauca*, flavonoid, antioxidative activity, tyrosinase, cosmetics

1. 서 론

피부는 환경과 항상 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 이러한 산화적 스트레스 요인으로는 공해, 태양 자외선, 화학산화제 및 미생물 등을 포함한다. 특히 자외선에 의한 광산화적 피부 손상은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해서 매개되며, 항산화제 고갈, 지질 과산화, 단백질 산화 및 DNA의 산화적 손상의 결과를 가져온다. ROS란 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. ROS 중에서 특히 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 ROS는 효소적 그리고 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화방어망을 붕괴시키고 생체 분자의 산화적 변형, 피부 장벽의 손상과 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성 등 피부노화를 가속시킨다[1-7].

사람 피부의 세포 구성 성분인 생체 분자의 산화 손상 뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 ROS가 포함되는 것으로 기술되고 있다. 피부 진피 층에서 콜라겐은 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 이 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다[8-11]. 또한, 사람 피부 표면을 코팅하고 있는 피부 표면 지질, 특히 squalene은 자외선(특히 UVA)의 첫 번째 공격 표적이며, UVA 조사에 의해 squalene mono-

hydroperoxide (SqOOH)가 생성됨이 보고되고 있다. Squalene은 $^1\text{O}_2$ 의 좋은 소광제로 피부 각질층의 항산화방어의 최전선을 형성하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되고 있다[12,13]. 이와 같은 사실은 광노화를 방어하고 자외선으로부터 피부 보호제를 개발하는데 있어서 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[14-23].

중가시나무(*Quercus glauca*)는 참나무과 식물의 일종으로 우리나라에서는 제주도에서 자생하며, 일본 및 중국 등에도 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 민간에서 중가시나무 추출물은 염증, 황달 및 종양 치료 등에 사용되어 왔다[24-26]. 중가시나무 추출물에 대한 항산화 연구로는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 라디칼 소거활성 및 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical) 소거활성이 있음이 보고되고 [27,28], 성분으로는 catechin, epicatechin, gallic acid, epigallocatechin, procyanidin B-4, catechin-3-O-rhamnoside, rutin, quercetin, isoquercetin 등의 플라보노이드들이 알려져 있다[28].

중가시나무 추출물의 DPPH 및 수퍼옥사이드 라디칼 소거능력에 대해서는 연구된 바 있으나, 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 다양한 ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 등)가 생성되는 계(Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계)에서의 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 중가시나무 잎 추출물 혹은

분획을 제조하고 이들의 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총항산화능, 성분 분석, 그리고 피부 미백과 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase, elastase 활성 저해 효과를 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 종가시나무 잎의 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-VIS spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 분광기는 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 rosebengal, 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 에탄올 (EtOH), 메탄올 (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 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 건조된 종가시나무 잎 재료는 원산지가 제주도로서 2008년 4월 청량리 경동시장에서 구입하였다.

2.2. 종가시나무 잎의 플라보노이드 분획 추출

건조된 종가시나무 잎 100 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 3 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 *n*-hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더

를 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.

2.3. 종가시나무 잎의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 종가시나무 잎에 대한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 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 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 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

μL 및 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL 를 가한 후 35 mM luminol 80 μL 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μL 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2 와 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 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.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의cpm} - \text{Sample의cpm})}{(\text{Control의cpm} - \text{Blank의cpm})} \times 100$$

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 % phosphate buffer saline (pH 7.4)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 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. 종가시나무 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL 씩 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.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate and Deglycosylated Fraction from *Quercus glauca* Leaf 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_2O : in 50 % acetonitrile solution (50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

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 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 종가시나무 잎 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 종가시나무 잎 추출물의 플라보노이드 분석

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

TLC 분석에서 전개용매는 ethyl acetate 분획의 경우 ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v)을 aglycone 분획은 n-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)를 사용하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 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 % 에탄올에 녹이고, syringe filter (Millopore 0.45 μ m)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

2.6. 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 1.85 mL에 추출물 0.05 mL와 tyrosinase (1,250 units/mL) 0.1 mL를 가한 후 37 °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, IC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

2.7. 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 1392.5 μ L에 측정시료용액 7.5 μ L를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 7.5 μ L 첨가하였다. Blank는 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M Tris-Cl buffer 1392.5 μ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

2.8. 통계처리

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

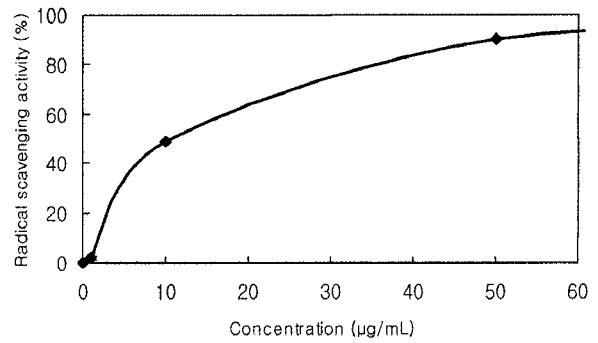


Figure 1. Free radical scavenging activity of *Quercus glauca* leaf extract (ethyl acetate fraction).

3. 결과 및 고찰

3.1. 종가시나무 잎 추출물의 수득물

3.1.1. 종가시나무(*Quercus glauca*) 잎 추출물

건조한 종가시나무 잎 100 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 3 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때 수득률은 12.26 %이었다. ethyl acetate 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 n-hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 1.77 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 aglycone의 수득률은 0.83 %였다. ethyl acetate 분획은 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 ethyl acetate 분획 플라보노이드에서 당을 제거한 플라보노이드가 존재한다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

3.2. 종가시나무 잎 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.

종가시나무(*Quercus glauca*) 잎 추출물 그리고 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol, quercetin 및 rutin의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 종가시나무 잎 추출물은 50 % 에탄올

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Quercus glauca* Leaf and References

Compounds	Scavenging activity (FSC ₅₀ , µg/mL)
<i>Quercus glauca</i> extract (50 % EtOH)	12.45 ± 0.30
<i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	10.47 ± 0.47
Deglycosylated extract from <i>Quercus glauca</i> (ethyl acetate fraction)	8.57 ± 0.10
L-Ascorbic acid (with 50 % EtOH solution)	3.79 ± 0.83
(+)-α-Tocopherol (with 100 % EtOH)	8.98 ± 2.93

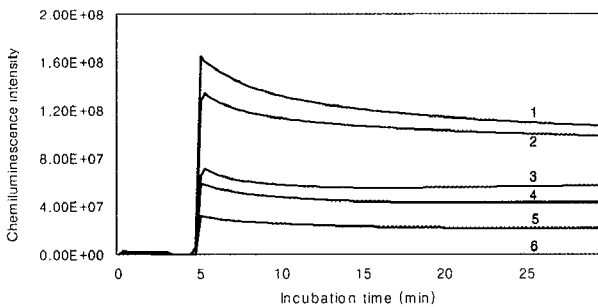


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *Quercus glauca* leaf ethyl acetate fraction in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. [FeCl₃ · 6H₂O] = 25 µM, [EDTA] = 50 µM, [H₂O₂] = 3 mM, [luminol] = 1.4 mM, concentrations of deglycosylated extract from *Quercus glauca* leaf ethyl acetate fraction: 1: control, 2: 0.1 µg/mL, 3: 0.5 µg/mL, 4: 1 µg/mL, 5: 2 µg/mL, 6: blank.

추출물인 경우 FSC₅₀가 12.45 µg/mL, ethyl acetate 분획은 10.47 µg/mL, aglycone 분획은 8.57 µg/mL을 나타냈다.

Aglycone 분획의 free radical 소거활성은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (FSC₅₀, 8.98 µg/mL)과 유사한 것으로 나타났다. 그 외에 비교물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid는 free radical 소거활성은 3.79 µg/mL이었다.

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

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂

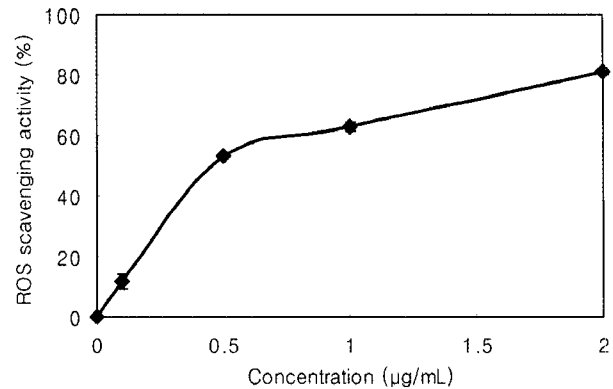


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of *Quercus glauca* leaf ethyl acetate fraction.

Table 3. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *Quercus glauca* Leaf and Reference

Compounds	Scavenging activity (OSC ₅₀ , µg/mL)
<i>Quercus glauca</i> extract (50 % EtOH)	4.2 ± 0.20
<i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	0.66 ± 0.01
Deglycosylated fraction of <i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	1.58 ± 0.38
L-Ascorbic acid (with 50 % EtOH solution)	1.50 ± 0.85

계에서 생성된 ROS 소거 활성은 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 µg/mL에서 농도 의존적으로 화학발광을 감소시킴을 Figure 2, Figure 3, Table 3에서 알 수 있다.

활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 종가시나무 50 % 에탄올 추출물이 4.20 µg/mL, ethyl acetate 분획 0.61 µg/mL, aglycon 추출물이 1.58 µg/mL로 나타났다. 이로부터 50 % 에탄올 추출물보다 ethyl acetate 추출물 및 aglycon의 활성산소 소거활성이 큼을 알 수 있다. ethyl acetate 추출물의 활성산소 소거활성은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다 높은 활성을 보였다. 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol은 이 실험의 용매로 사용되는 증류수에 용해되지 않기 때문에 활성산소 소거율은 측정할 수 없었다.

3.3. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

종가시나무 잎 추출물의 용혈 억제 효과를 측정한 결과 Table 4 및 Figure 5에 나와 있다.

Table 4. Effects of Extracts from *Quercus glauca* Leaf and Reference on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾ : min)			
	1	10	25	50
<i>Quercus glauca</i> extract (50 % EtOH)	32.53 ± 1.36	71.01 ± 1.61	146.63 ± 1.20	195.22 ± 3.82
<i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	44.13 ± 0.52	71.88 ± 1.64	145.21 ± 0.34	184.27 ± 3.36
Deglycosylated extract from <i>Quercus glauca</i> (ethyl acetate fraction)	40.60 ± 2.83	99.17 ± 2.66	201.40 ± 2.99	398.67 ± 6.9
(+)- α -Tocopherol	-	38.00 ± 1.80	-	74.33 ± 6.35

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

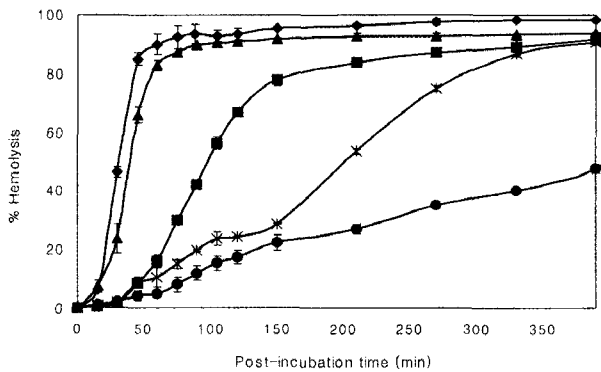


Figure 4. Effects of deglycosylated extract from *Quercus glauca* leaf ethyl acetate fraction on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time: 15 min, pre-incubation time: 30 min, [rose-bengal] = 1.5 μM , concentrations of deglycosylated extract from *Quercus glauca* leaf ethyl acetate fraction: \blacklozenge - \blacklozenge : control, \blacktriangle - \blacktriangle : 1 $\mu\text{g/mL}$, \blacksquare - \blacksquare : 10 $\mu\text{g/mL}$, \ast - \ast : 25 $\mu\text{g/mL}$, \bullet - \bullet : 50 $\mu\text{g/mL}$.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간 (τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 τ_{50} 이 크게 나타난다. 종가시나무 잎 50 % 에탄올 추출물의 세포보호 효과는 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 거의 농도 의존적(τ_{50} 이 각각 32.53, 71.01, 146.63, 195.22 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 위의 결과에서 보듯이 50 % 에탄올 추출물은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 가장 큰 세포보호 효과(195.22 min)를 보여주었다. 한편 ethyl acetate 분획의 경우는 세포보호 효과가 50 % 에탄올 추출물과 비슷하게 나타났다. Aglycone 분획의 세포보호 효과는 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 τ_{50} 이 각각 40.60, 99.17, 201.40, 398.67 min으로 나타났다.

따라서 만약 종가시나무 잎 추출물을 화장품에 사용하면 피부세포보호 활성에도 기여할 것으로 사료된다. 특히, aglycone 분획은 10 $\mu\text{g/mL}$ 정도의 낮은 농도에도 세포보호 효과가 우수함을 나타내었다.

비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol은 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 74.33 min을 나타내었다. 플라보노이드 배당체인 ethyl acetate 분획의 세포보호 효과는 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 184.27 min이고 그 aglycone 분획은 동일 농도에서 398.67 min임을 볼 때 플라보노이드 aglycone이 세포막으로의 침투가 더 용이해 세포보호 효과가 큼을 간접적으로 알 수 있다. 이상과 같이 종가시나무 ethyl acetate 분획의 당이 제거된 추출물이 (+)- α -tocopherol보다도 세포보호 효과가 큼을 알 수 있었다.

3.4. 종가시나무 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.4.1. 종가시나무 잎 추출물의 TLC 성분 분석

종가시나무 잎 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 5 및 Figure 6에 나타내었다. Figure 5는 50 % 에탄올로 추출한 종가시나무 잎 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획으로 6개의 띠(QG 1, QG 2, QG3, QG 4, QG 5, QG 6)로 분리되었다. 그 중 R_f 0.34인 QG 6는 자외선 및 플라보노이드 발색법으로 확인한 결과 농도가 가장 진한 것으로 나타났다. 본 TLC 조건에서 플라보노이드 aglycone은 QG 1과 동일한 위치에서 나타났고, QG 2 ~ QG 6 띠들은 플라보노이드 배당체(flavonoid glycosides)로 간주되었다.

Figure 5에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 각각 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시켜 얻은 띠별 파우더를 당 제거반응 시킨 후 에탄올 용액으로

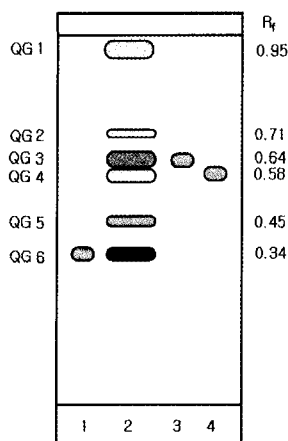


Figure 5. TLC chromatogram of ethylacetate fraction from *Quercus glauca* leaf and references. 1: rutin, 2: ethylacetate fraction, 3: isoquercitrin, 4: hyperoside. Eluent system: ethylacetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v).

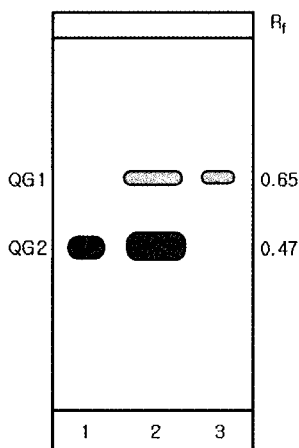


Figure 6. TLC chromatogram of deglycosylated extract from *Quercus glauca* leaf (ethyl acetate fraction) and references. 1: quercetin, 2: deglycosylated fraction (ethyl acetate fraction), 3: kaempferol. Eluent system: *n*-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v).

만들고 이들을 HPLC 분석에 사용함으로써 Figure 5에 있는 각 띠들이 어떤 플라보노이드인가를 알아보려고 하였다. Figure 5에서 용출된 QG 2와 QG 5는 당 제거반응을 통해 kaempferol임을 확인하였으며, QG 3, QG 4, QG 6은 quercetin임을 확인하였다. 따라서, 이와 함께 UV/VIS 흡수스펙트럼과 플라보노이드 발색법 등의 분광학적 데이터들과 표준물질을 이용하여 확인한 결과 QG 3는 isoquercitrin, QG 4는 hyperin, QG 6은 rutin으로 확인되었다. QG 2는 N. Fontana 등(1998)이 보고한 kaempferol-

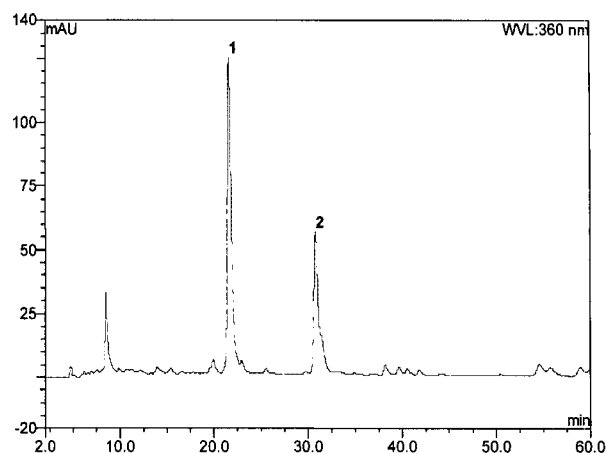


Figure 7. HPLC chromatogram of deglycosylated *Quercus glauca* leaf extract (ethyl acetate fraction). 1: quercetin, 2: kaempferol.

3-*O*- β -glucopyranoside로, QG5는 kaempferol-3-*O*- β -rutinoside으로 간주되었다[29].

Figure 6은 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획으로부터 얻어진 aglycone 분획의 TLC 크로마토그램이다. 이 aglycone 분획은 2개의 띠(QG 1 ~ QG 2)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 확인한 결과 QG 1은 kaempferol, QG 2는 quercetin임을 알 수 있었다.

3.4.2. 종가시나무 잎 추출물의 HPLC 성분 분석

현재 종가시나무 잎의 성분에 대한 보고는 이미 이루어져 있으나 ethyl acetate 분획으로부터 얻어진 aglycone 분획에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았다. 따라서 이를 HPLC 크로마토그램으로 Figure 7에 나타내었다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 6의 TLC 크로마토그램과 H. J. Yang 등(2007)에 의해 보고된 검량곡선 등을 이용하여 Figure 7의 각각의 피크를 분석하여 본 결과 peak 1은 quercetin, peak 2는 kaempferol임을 확인하였고, 2가지 플라보노이드의 조성비는 quercetin (peak 1) 55.77 %, kaempferol (peak 2) 44.23 %로 나타났다(Table 5).

3.5. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정에서, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다. 따라서 tyrosinase의 활성억제 작용은 미백용 화장품 원료로서 갖추어야 할 항목이 되고 있다.

Table 5. HPLC Quantitative Analysis Data of Deglycosylated *Quercus glauca* Leaf Extract (Aglycones of Ethyl Acetate Fraction)

No.	Ret. time (min)	Peak name	Area mAU (min)	Rel. ratio (%)	Amount (mM)
1	21.54	Quercetin	58,611	55.77	0.314
2	30.77	Kaempferol	34,490	44.23	0.249
Total			93,101	100.00	0.563

Table 6. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethyl Acetate Fraction of *Quercus glauca* Leaf Extract (ethyl acetate Fraction) on Tyrosinase

Compounds	Inhibition (IC ₅₀ , µg/mL)
Deglycosylated <i>Quercus glauca</i> extract obtained from ethyl acetate fraction	73.5 ± 6.0
<i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	123.0 ± 6.6
Arbutin	105.1 ± 3.3

Table 7. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethyl Acetate Fraction of *Quercus glauca* Leaf Extract and References Compounds on Elastase

Compounds	Inhibition (IC ₅₀ , µg/mL)
Deglycosylated <i>Quercus glauca</i> extract obtained from ethyl acetate fraction	16.2 ± 0.95 ¹
<i>Quercus glauca</i> extract (ethyl acetate fraction)	222.0 ± 3.54
Kaempferol	13.6 ± 2.4
Quercetin	6.1 ± 0.9

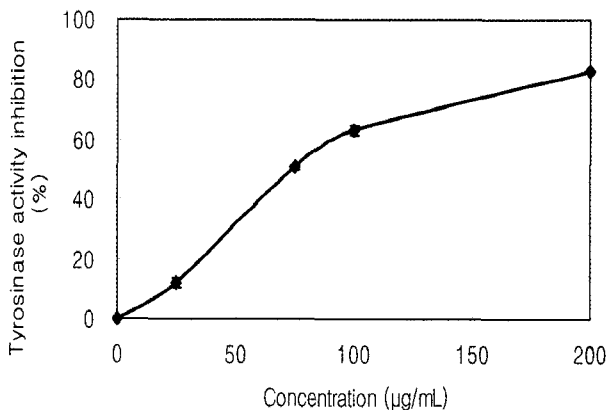


Figure 8. Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from ethyl acetate fraction of *Quercus glauca* leaf extract on tyrosinase.

종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 73.5 µg/mL, ethyl acetate 층은 123.0 µg/mL로 aglycone 분획이 ethyl acetate 층에 비해 훨씬 큰 저해활성을 보였다. 또한 종가시나무 잎 50% 에탄올 추출물에서는 tyrosinase 저해활성이 크게 나타나지 않았다. 비교물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성은 105.1 µg/mL이므로 종가시나무 잎 추출물의 당이 제거된 aglycone 분획은 tyrosinase 저해 활성이 arbutin에 비해 매우 큼을 알 수 있었다. 당이 제거된 추출물 분획은 피부 침투도 용이할 것으로 미루어 볼 때 이를 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료

된다(Table 6, Figure 8).

3.6. 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.

종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획으로부터 얻은 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC₅₀)이 16.20 µg/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다(Table 7, Figure 9).

비교물질로 사용한 kaempferol과 quercetin은 각각 IC₅₀이 13.6 µg/mL 및 6.1 µg/mL이었다. 이는 Table 7에 있는 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 플라보노이드 aglycone인 quercetin 및 kaempferol에 기인된 것으로 판단된다.

이미 종가시나무 잎에도 함유되어 있는 kaempferol 및 quercetin은 사람 포피 세포주에서 hyaluronan synthase mRNA를 발현시켜 농도 의존적으로 hyaluronan (HA) 합성을 증가시킨다는 것이 보고된 바 있다[30]. 또한 일반적으로 HA는 collagen 및 elastin 등과 같이 노화와 더불어 피부 내 함량이 감소되며, 피부 탄력저하 및 주름생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다[31,32]. 따라서 종가시나무 잎 추출물을 대상으로 주름개선 작용이 있는 항노화 기능성 소재로서 가능성이 있는지 알아

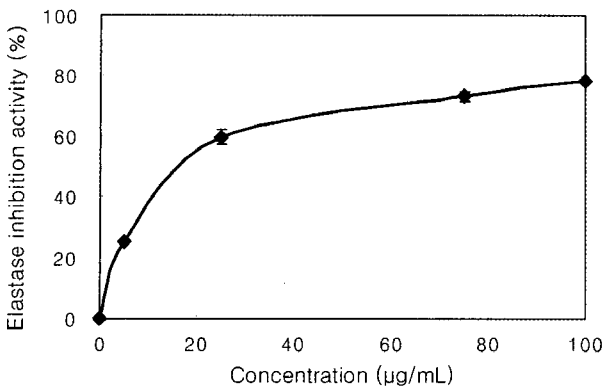


Figure 9. Inhibitory activity of deglycosylated fraction obtained from ethyl acetate fraction of *Quercus glauca* leaf extract on elastase.

보기 위한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

1) 종가시나무 잎 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 12.26 %, ethyl acetate 분획의 경우 1.77 % 이었다.

2) 종가시나무 잎 추출물의 free radical 소거능력 (FSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물 12.45 µg/mL, ethyl acetate 분획 10.47 µg/mL, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 8.57 µg/mL로 나타났다.

3) 종가시나무 잎 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 종가시나무 잎 에탄올 추출물, 4.20 µg/mL, ethyl acetate 분획, 0.66 µg/mL, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 1.58 µg/mL로 ethyl acetate 층이 가장 큰 활성을 나타냈다.

4) ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 종가시나무 잎 추출물은 µg/mL의 농도 범위(1 ~ 50 µg/mL)에서 농도-의존적으로 ¹O₂으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 종가시나무 ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 50 µg/mL 농도에서 398.67 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

5) 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 TLC는 6개의 띠(QG 1 ~ QG 6)로 분리되었고, 그 중에서 R_f 0.34인 QG 6 (rutin)의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

6) 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 2개의 띠(QG 1 ~ QG 2)를 나타내었고, 이 때 QG 1와 QG 2는 각각 kaempferol, quercetin으로 확인하였다.

7) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 2개의 피크를 나타냈고, 그 용리 순서는 quercetin, kaempferol이었으며 조성비는 quercetin 55.77 %, kaempferol 44.23 %로 quercetin과 kaempferol의 함량이 비슷한 것으로 나타났다.

8) Tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 종가시나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획은 123.0 µg/mL으로 큰 활성을 띄진 않지만, aglycone 분획은 73.5 µg/mL로 기준 물질인 arbutin보다 큰 활성을 나타내었다.

9) 종가시나무 잎 추출물 중 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC₅₀)이 16.2 µg/mL로 활성을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 종가시나무 잎 추출물의 항산화 작용과 더불어 종가시나무 잎의 성분 에 대한 분석과 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase, elastase의 좋은 저해활성에 의해 기능성 화장품원료로서 응용 가능성이 큼을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 (재)서울테크노파크 연구개발 사업의 일환으로 서울테크노파크 지원과(과제번호: R&BD-2008-001)에서 받아 수행된 연구 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. J. Thiele, C. O. Barland, R. Ghadially, and P. M. Elias, Skin aging, eds. B. A. Gilchrist and J. Krutmann, 65, Springer, Berlin Heidelberg, Germany (2006).
2. J. J. Threle, C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, and L. Packer, The antioxidant network of the stratum corneum, *Curr. Probl. Dermatol.*, **29**, 26 (2001).
3. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
4. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
 8. 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).
 9. 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).
 10. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, 331, 304 (1993).
 11. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
 12. Y. Kohno, Y. Egawa, S. Itoh, S. Nagaoka, M. Takahashi, and K. Mukai, Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1256, 52 (1995).
 13. S. E. Mudiyansele, M. Hamburger, P. Elsner, and J. J. Thiele, Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids *in vitro* and *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**(6), 915 (2003).
 14. 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).
 15. 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 native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 16. 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).
 17. 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).
 18. 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).
 19. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 165 (2007).
 20. H. J. Yang, B. R. Won, Y. J. Lim, S. K. Yoon, D. H. Ji, J. Y. Choi, S. J. Han, C. W. Lee, and S. N. Park, Antioxidative activity, component analysis, and anti-elastase effect of *Aspalathus linearis* Extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(4), 251 (2007).
 21. K. H. Lee and S. N. Park, Antioxidant activities and antiaging effect of *Geranium nepalense* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(1), 25 (2008).
 22. J. Y. Kim and S. N. Park, A study on application for cosmeceutical of *Fagopyrum esculentum* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(2), 83 (2008).
 23. H. J. Yang, E. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant activity and component analysis of *Cayratia japonica* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(2), 117 (2008).
 24. J. H. Park, Medical plants of Korea, 313, Shinil (2004).
 25. W. S. Kan, Pharmaceutical botany, National research institute of Chinese medicine, Taiwan, 170 (1986).
 26. H. Mitsuhashi, Illustrated medicinal plants of the world in colour, Tokyo, 14 (1998).

27. R. K. Ko, Isolation and identification of cosmetically active compounds from *Quercus glauca*, *Distylium racemosum* and *Nymphaea tetragona*, Graduate school Cheju National Univ. (2008).
28. S. Y. Sheu, Y. H. Tsuan, F. L. Hsu, F. J. Lu, and H. C. Chiang, Superoxide anion scavenging effect of *Quercus glauca* Thumb. in whole blood of patients with ankylosing spondylitis, *The American J. Chinese medicine*, **19**(10), 2193 (1971).
29. N. Fontana, A. Bisio, and G. Romussi, Triterpene saponins and flavonoids from *Quercus glauca* Thun. Part 23³: Constituents of Fagaceae (Cupuliferae), *Parmazie*, **53**(9), 653 (1998).
30. 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).
31. R. Fleischmajor, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glucosaminoglycans and aging, *Biochem. Biophys. Acta.*, **279**(2), 265 (1972).
32. 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).