

가시연꽃 종자 추출물의 화장품 원료로서의 특성

추 수 진 · 김 영 희 · 류 인 자 · 허 광 화 · 유 익 동[†]

한국생명공학연구원 기능성화장품신소재개발센터
(2009년 12월 1일 접수, 2009년 12월 13일 수정, 2009년 12월 15일 채택)

Application as a Cosmeceutical Ingredient of *Euryale ferox* Seed Extract

Soo-Jin Choo, Young-Hee Kim, In-Ja Ryoo, Guang-Hua Xu, and Ick-Dong Yoo[†]

National Cosmeceuticals Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

(Received December 1, 2009; Revised December 13, 2009; Accepted December 15, 2009)

요 약: 천연물로부터 새로운 기능성 화장품 소재를 개발하기 위하여 국내외 천연물을 대상으로 항산화 활성을 평가한 결과, 가시연꽃의 종자 추출물이 우수한 활성을 나타내는 것을 발견하였다. 가시연꽃 종자의 추출물로부터 유효 성분을 분리하기 위하여 각종 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC 등의 기법을 실시하여 순수하게 정제된 화합물 5종을 획득하였다. 각종 NMR 및 MS 스펙트럼 등을 분석하여 이들의 화학구조를 규명한 결과 fucosterol (1), 3-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-4-[(7R),5'-dihydroxy-3'-methoxybenzyl]tetrahydrofuran (2), resorcinol (3), pyrogallol (4) and 4-O-methyl gallic acid (5)로 동정하였다. 이들 화합물의 화장품 원료로서의 특성을 조사하고자 각 화합물들을 대상으로 항산화 활성, 엘라스타아제 저해활성, 미백활성 등을 평가하였다. 이들 화합물의 자유라디칼소거활성은 SC₅₀ 값이 17.0 ~ 100.2 μ M이었고, 특히 화합물 4 및 5는 양성대조구인 ferulic acid보다 6배 이상 강력한 활성을 나타내었다. 또한 엘라스타아제 저해활성에 대한 IC₅₀ 값은 18.8 ~ 78.2 μ M로써 특히 화합물 4는 양성대조구인 EGCG와 비슷한 활성을 나타내었으며, B16F10 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생성 저해활성에 대해 화합물 3은 양성대조구인 arbutin보다 약 2배 이상 강력한 미백활성을 나타내었다. 따라서 가시연꽃 종자 추출물은 강력한 항산화활성, 엘라스타아제 저해활성 및 미백활성을 나타내는 유효성분들을 다량 함유하므로, 복합 기능성을 나타내는 화장품 원료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In our search for the natural cosmetic ingredients, we found that *Euryale ferox* seed extract exhibited the strong antioxidative activity. Five active compounds were isolated from the ethyl acetate extract through various chromatographic methods and their structures were determined by NMR and MS spectral analysis. These compounds were identified as fucosterol (1), 3-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-4-[(7R),5'-dihydroxy-3'-methoxybenzyl]tetrahydrofuran (2), resorcinol (3), pyrogallol (4) and 4-O-methylgallicacid (5). We evaluated the antioxidative, antielastase activities and melanogenesis inhibitory effects of these compounds. The SC₅₀ values of compounds 2 ~ 5 for free radical scavenging activity were 17.0 ~ 100.2 μ M and especially compounds 4 and 5 were 6-fold more effective than ferulic acid as a positive control. And compounds 2 ~ 4 inhibited human neutrophil elastase with IC₅₀ values of 18.8 ~ 78.2 μ M and compound 3 also inhibited melanin synthesis in B16F10 melanoma cells with an IC₅₀ value of 492.8 μ M. These results suggest that *Euryale ferox* extract having a lot of various active ingredients may be useful as a natural multi-functioning agent.

Keywords: *Euryale ferox*, antioxidative, antielastase, melanogenesis, elastase inhibition

[†] 주 저자 (e-mail: idyoo@kribb.re.kr)

1. 서 론

가시연꽃(*Euryale ferox* Salisb.)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 식물로써, 개연이라고도 하며 전체에 가시가 있는 1년생 수초이다[1,2]. 한방에서는 가시연꽃의 종자를 검인(莢仁)이라 하여 강장제로 사용하며 특히 신장질환, 만성설사, 백대하, 비장질환 등에 사용되었다. 검인은 냄새가 없고 맛은 달고 떫으며 성질이 한쪽으로 치우치지 않고 평이한 특징이 있다[3]. 가시연꽃 종자는 과량의 tocopherol을 함유하고 있어 자유라디칼 소거활성 및 항산화효소활성을 나타내어 산화적 손상에 대해 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다[4,5]. 또한 항산화 단백질의 일종인 thioredoxin-1 (Trx-1) 및 thioredoxin-related protein-32 (TRP32)의 양을 증가시키고 reactive oxygen species (ROS)를 제거함으로써 심장질환에 효능을 나타내는 한편, 면역증진에도 도움을 주는 것으로 보고되어 있다[6,7]. 하지만, 이러한 항산화활성은 나타내지는 가시연꽃의 활성성분에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다. 한편, 가시연꽃 종자의 성분으로는 tocopherol을 비롯하여 glucosylsterol 및 cerebroside 계열의 화합물들이 존재하는 것으로 알려져 있다[8-10].

본 연구에서는 다양한 천연물을 대상으로 항산화 활성을 평가하여 화장품 원료로서의 효능을 평가한 결과, 항산화 활성이 우수한 가시연꽃을 선별하였고, 종자의 추출물로부터 각종 컬럼 크로마토그래피를 통해 유효성분을 분리하여 자유라디칼 소거활성, 엘라스타아제 저해활성, 그리고 멜라닌 생성 억제 활성 등을 측정하여 화장품 원료로서의 이용 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 가시연꽃 종자(검인)는 중국산으로 2008년 4월 서울 소재 삼흥건재약업사에서 구입하여 사용하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), ferulic acid, epigallocatechin gallate (EGCG), N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide, soybean trypsin inhibitor, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), arbutin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical (USA)에서 구입하여 사용하였다. Human neutrophil elastase (HNE, EC 3.4.21.37)는 Calbio-

chem-Novabiochem (Germany)에서 구입하여 사용하였다. B16F10 melanoma 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였고, 세포배양에 필요한 Dulbecco's modified eagle media (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Gibco BRL (USA) 제품을 사용하였다. 유효성분 분석에 사용된 methanol, hexane, ethyl acetate 등은 공업용 용매와 HPLC 용매는 SK chemical (South Korea) 제품을 사용하였다. 각종 크로마토그래피에 사용한 수지는 Merck (Germany) 제품을 사용하였다.

2.2. 사용기기

본 실험에 사용한 high performance liquid chromatography (HPLC)는 Waters Millenium System (Waters 515 pump, 2996 photodiode array detector, USA)을 사용하였고, HPLC column은 분석용 ϕ 4.6 × 150 mm와 분취용 ϕ 20 × 150 mm (YMC, RP-18, Japan)을 사용하였다. 유효성분의 화학구조 결정을 위한 핵자기공명 (Nuclear Magnetic Resonance) 스펙트럼은 Varian Inova-400 spectrometer (Varian Inc., USA) 및 Bruker Advance-300 spectrometer (Bruker Biospin, Germany)를 사용하여 측정하였다. 화합물의 분자량은 EI-MS spectrometer (JEOL GC Mate2, Japan)를 이용하여 측정하였다. 흡광도 측정을 위한 ELISA reader는 Versa Max (Molecular Devices, USA) 기기를 사용하였다.

2.3. 유효 성분의 추출 및 순수 분리

건조된 가시연꽃 종자를 80 % methanol의 조건으로 실온에서 일주일 동안 침적시키고 감압 건조하여 물에 현탁시킨 후, 핵산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸 아세테이트로 추출된 분획물을 감압 농축하여 활성성분의 분리에 사용하였다. Figure 1에 나타난 바와 같이 농축된 분획물을 methylene chloride : methanol (50 : 1 ~ 1 : 1)의 조건으로 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 극성에 따라 분리한 후 3개의 분획으로 그룹화하였다. 이후 각 그룹별로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 각각 반복하여 실시하고, 분취용 HPLC를 순차적으로 실시하여 최종적으로 순수한 화합물 1 ~ 5를 분리하였다.

2.4. 항산화 활성 측정

항산화 활성은 DPPH 및 ABTS를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성

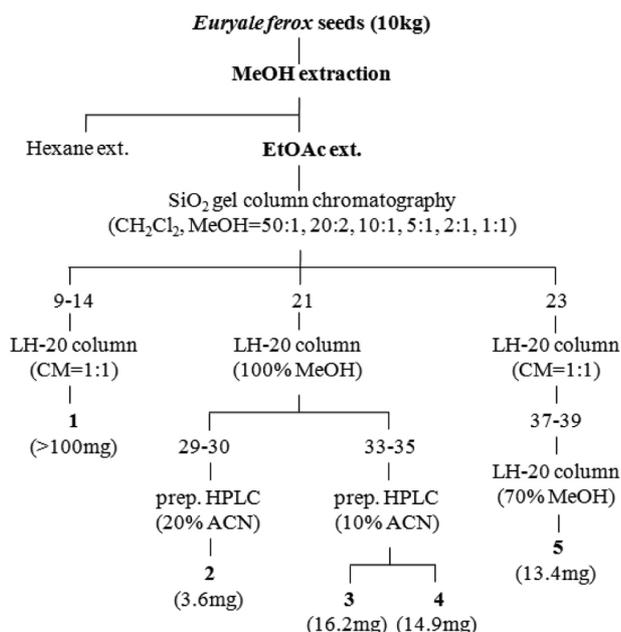


Figure 1. Isolation procedure of compounds 1 ~ 5 from *Euryale ferox*.

을 측정하기 위하여 96-well plate에 ethanol에 녹인 150 μM DPPH 용액 198 μL 와 DMSO에 녹인 각 시료를 농도별로 2 μL 첨가하였으며, 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO를 2 μL 첨가하였다. 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거활성(%)을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 4.9 mM potassium persulfate 용액에 녹인 14 mM ABTS 용액을 하루 동안 암실에 방치하여 ABTS $\cdot+$ 를 형성시킨 후, 증류수를 이용하여 희석하여 200 μM ABTS $\cdot+$ 용액을 제조한다. ABTS $\cdot+$ 용액 198 μL 와 DMSO에 녹인 각 시료를 농도별로 2 μL 첨가하였으며 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO를 2 μL 첨가하여 실온에서 7 min 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS 라디칼 소거활성(%)을 나타내었다. 양성 대조구로써 ferulic acid를 사용하였다. 라디칼 소거활성(%)은 측정된 흡광도에 대하여 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{라디칼 소거활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.5. 엘라스타아제 저해활성 측정

엘라스타아제 저해활성은 human neutrophil elastase (HNE)를 이용하여 측정하였다. 즉 기질로써 Tris-HCl

(pH 7.5)에 녹인 1.4 mM N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide 용액 40 μL 와 DMSO에 용해되어 있는 각 시료가 농도별로 포함된 Tris-HCl 용액(pH 7.5) 50 μL 을 잘 혼합한 후, 0.18 U elastase 용액 10 μL 을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온기에서 1 h 동안 배양하였다. 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO 1 μL 를 첨가하였다. 0.2 mg/mL soybean trypsin inhibitor 용액 100 μL 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 의하여 엘라스타아제 저해활성(%)을 계산하여 나타내었다. 양성 대조구로써 epigallocatechin gallate (EGCG)를 사용하였다.

$$\text{엘라스타아제 저해활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.6. 멜라닌 저해활성 측정

2.6.1. 세포독성 시험

시료의 세포에 대한 독성은 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 B16F10 mouse melanoma cell을 6-well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24 h 동안 배양한 후 시료를 농도별로 첨가한 배지로 교환하여 재배양한다. 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO를 처리하였다. 다시 24 h 후 각 well마다 MTT 용액(5 mg/mL in PBS)을 20 μL 씩 첨가하여 3 h 동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 후, 배지를 걷어내고 PBS로 세척한 후 DMSO를 1 mL씩 첨가하여 생존한 세포에서 생성되는 불용성의 blue formazan을 용해시켰다. 96-well plate에 녹여진 formazan을 200 μL 씩 회수하여 옮긴 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 세포 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6.2. 멜라닌 생성 저해활성

멜라닌 생성 저해활성은 B16F10 mouse melanoma cell line (KCTC80008, 한국세포주은행)을 이용하여 측정하였다. 세포를 10 % heat-inactivated FBS가 함유된 DMEM으로 배양하였으며 6-well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 배양한다. 24 h 후 phenol-red free DMEM으로 교환하여 시료를 농도별로 처리한 후

α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)을 100 nM이 되도록 처리하여 배양한다. 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO를 처리하였다. 48 h 후 배지로 용출된 멜라닌의 양을 측정하기 위하여, 96-well plate에 배지 200 μ L를 회수하여 옮긴 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 멜라닌 저해활성(%)을 계산하였다. 양성 대조구로써 arbutin을 사용하였다.

$$\text{멜라닌 저해활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시험용액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 유효성분의 분리 및 화학구조 결정

항산화 활성 및 엘라스타아제 저해활성을 나타내는 가시연꽃 종자의 에틸 아세테이트 추출물로부터 분리된 유효성분의 화학구조를 결정하기 위하여 각종 NMR 및 MS spectrum 등을 측정 해석하여 화학구조를 규명하였다(Figure 2).

화합물 1은 기존에 *Pelvetia siliquosa*를 비롯한 해조류 등으로부터[11], 화합물 2는 *Rubia cordifolia*로부터[12], 그리고 화합물 5는 *Rhus glabra*로부터 보고된 바 있으나[13], 가시연꽃으로부터 분리된 것은 본 연구가 처음이다.

Fucosterol (1): white powder: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ H (ppm): 5.36 (1H, br d, J = 5.2 Hz, H-6), 5.19 (1H, q, J = 6.7 Hz, H-28), 3.53 (1H, m, H-3), 1.58 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-29), 1.02 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, br s, H-21), 1.00 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-27), 0.98 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-26), 0.70 (3H, s, H-18): ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ C (ppm): 146.9 (C-24), 140.7 (C-5), 121.6 (C-6), 115.5 (C-28), 71.7 (C-3), 56.7 (C-14), 55.7 (C-17), 50.1 (C-9), 42.3 (C-13), 42.2 (C-4), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.4 (C-20), 35.2 (C-22), 34.7 (C-25), 31.8 (C-7,8), 31.5 (C-2), 28.2 (C-16), 25.6 (C-23), 24.3 (C-15), 22.2 (C-26), 22.1 (C-27), 21.0 (C-11), 19.4 (C-19), 18.7 (C-21), 13.1 (C-29), 11.8 (C-18)

3-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-4-[(7R),5'-dihydroxy-3'-methoxybenzyl]tetrahydrofuran (2): yellow crystal: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ H (ppm): 2.37 (1H, dt, J = 7.0, 14.0 Hz, H-8'), 2.48 (1H, dd, J = 12.1, 12.5 Hz, H-7a), 2.74 (1H, m, H-8), 2.93 (1H,

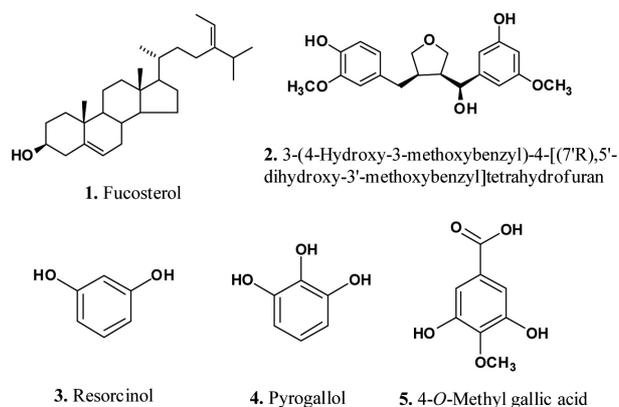


Figure 2. Chemical structures of compounds 1 ~ 5.

dd, J = 4.5, 12.5 Hz, H-7b), 3.62 (1H, dd, J = 6.4, 10.8 Hz, H-9'a), 3.72 (1H, dd, J = 5.9, 7.5 Hz, H-9a), 3.82 (1H, dd, J = 7.0, 10.5 Hz, H-9'b), 3.82 (3H, s, 3-OMe), 3.83 (3H, s, 3'-OMe), 3.97 (1H, dd, J = 6.4, 7.5 Hz, H-9b), 4.73 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-7'), 6.63 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.71 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.75 (2H, overlapped s, H-4', 6'), 6.78 (1H, s, H-2), 6.89 (1H, s, H-2'): ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ C (ppm): 33.6 (C-7a, 7b), 43.9 (C-8), 54.1 (C-8'), 56.3 (3, 3'-OMe), 60.4 (C-9'a, 9'b), 73.5 (C-9a, 9b), 84.1 (C-7'), 110.6 (C-2'), 113.3 (C-2), 116.1 (C-5), 116.2 (C-4'), 119.8 (C-6'), 122.2 (C-6), 133.3 (C-1), 135.1 (C-1'), 146.0 (C-4), 147.6 (C-5'), 149.1 (C-3'), 149.2 (C-3)

Resorcinol (3): white powder: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ H (ppm): 6.24 (1H, s, H-2), 6.29 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4, 6), 6.94 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-5): ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ C (ppm): 103.5 (C-2), 107.7 (C-4, 6), 130.8 (C-5), 159.6 (C-1, 3)

Pyrogallol (4): yellow powder: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ H (ppm): 6.30 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4, 6), 6.48 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-5): ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ C (ppm): 108.3 (C-4, 6), 120.1 (C-5), 134.3 (C-2), 147.1 (C-1, 3)

4-O-Methyl gallic acid (5): brown powder: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ H (ppm): 3.80 (3H, s, 4-OMe), 7.03 (2H, s, H-2, 6): ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ C (ppm): 52.3 (4-OMe), 110.0 (C-2, 6), 121.5 (C-1), 139.8 (C-4), 146.5 (C-3, 5)

Table 1. Effects of *Euryale ferox* on The Antioxidative and Anti-elastase Activity

	Radical scavenging activity (SC ₅₀ , µg/mL)		HNE ^a inhibitory activity (IC ₅₀ , µg/mL)
	DPPH radical	ABTS radical	
<i>Euryale ferox</i> (Ethyl acetate extract)	8.7	4.1	24.2
Ferulic acid	22.4	5.9	N.D. ^c
EGCG ^b	N.D.	N.D.	5.26

^{a)} Human neutrophil elastase

^{b)} Epigallocatechin gallate

^{c)} Not determined

3.2. 가시연꽃 추출물의 항산화 활성 및 엘라스타아제 저해활성

가시연꽃 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 화장품 원료로서의 특성을 평가하기 위하여 항산화 활성 및 엘라스타아제 저해활성을 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 가시연꽃 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 강력한 자유라디칼 소거활성을 나타내었는데, DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼에 대한 SC₅₀ 값은 각각 8.7 µg/mL 및 4.1 µg/mL로써 양성 대조구로서 강력한 항산화제인 ferulic acid보다 각각 2.6배 및 1.4배 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 또한 HNE를 이용하여 엘라스타아제 저해활성을 측정한 결과, 24.2 µg/mL의 IC₅₀ 값을 가지며 강력한 활성을 나타내었다. 한편 가시연꽃 종자의 열 추출물이 지질과산화물을 억제하며 산화적 손상에 대해 보호하는 효능을 나타낸다는 보고가 있으나[5] 엘라스타아제 저해효과에 대해서는 보고된 바 없다.

3.3. 화합물 1 ~ 5의 항산화 효과

가시연꽃 종자의 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리한 활성 화합물 1 ~ 5의 항산화 활성을 평가하기 위하여 자유라디칼 소거활성을 측정하였다. Figure 3(a)에 나타낸 바와 같이 DPPH 라디칼 소거활성에 대해 화합물 2는 110.2 µM의 IC₅₀ 값을 가지며 IC₅₀ 115.3 µM로 나타난 양성 대조구인 강력한 항산화제 ferulic acid와 비슷한 활성을 나타내었고, 화합물 4 및 5의 IC₅₀ 값은 각각 17.0 µM 및 17.2 µM로써 ferulic acid와 비교하여 약 6.7배 이상 강력한 항산화 활성을 나타내었다. Figure 3(b)에 나타낸 바와 같이 ABTS 라디칼 소거활성에 대한 화합물 2 ~ 5의 IC₅₀ 값은 각각 12.7, 8.1, 4.7, 및 8.3 µM로써 30.2 µM의 IC₅₀ 값을 갖는 ferulic acid보다 약 2.4 ~ 6.4

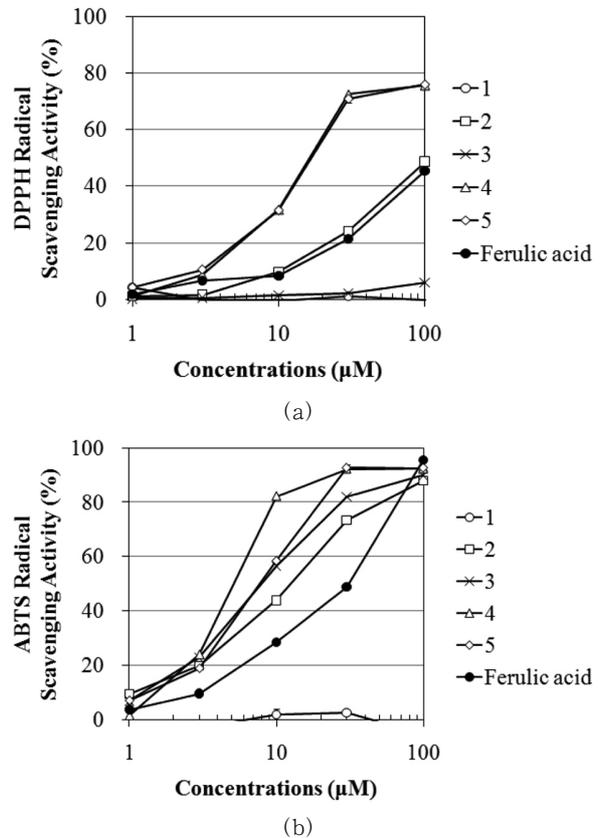


Figure 3. Effect of compounds 1 ~ 5 on free radical scavenging activity. (a) DPPH radical, (b) ABTS radical.

배 이상 우수한 활성을 나타내었다. 화합물 2는 *Rubia cordifolia*로부터 처음 보고된 화합물이지만 생물활성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았고, 본 연구에 의해 가시연꽃으로부터 분리되어 항산화 효능을 나타냄이 처음 밝혀졌다.

3.4. 화합물 1 ~ 5의 엘라스타아제 저해 효과

가시연꽃 종자 추출물의 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리한 활성 화합물 1 ~ 5의 엘라스타아제 저해활성을 평가하기 위하여 HNE를 이용한 저해활성을 측정하였다. Figure 4에 나타낸 바와 같이 화합물 2, 3 및 4의 IC₅₀ 값은 각각 22.3, 78.2 및 18.8 µM로써 특히 화합물 4는 12.8 µM의 IC₅₀ 값을 갖는 양성 대조구인 EGCG와 비슷한 활성을 나타내었다. 화합물 4는 엘라스타아제와 같은 serine protease의 일종인 prolyl endopeptidase (PEP) 저해작용에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만[14] 엘라스타아제 저해활성에 대한 보고는 본 연구가 처음이다.

Table 2. Effects of Compounds 1 ~ 5 on Antioxidative, Antielastase and Melanogenesis Inhibitory Activity

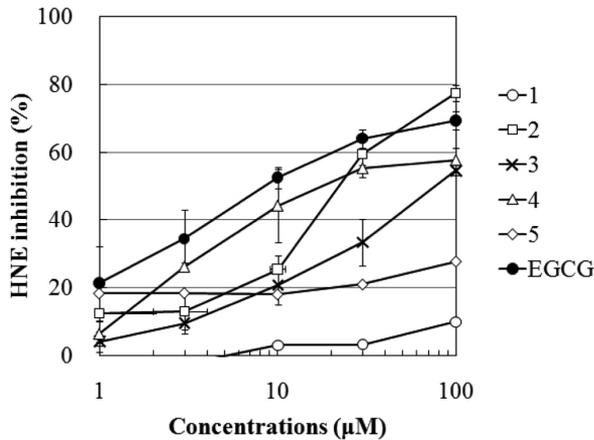
Compounds	Radical scavenging activity (SC ₅₀ , μ M)		HNE ^a inhibitory activity (IC ₅₀ , μ M)	Melanogenesis inhibitory activity (IC ₅₀ , μ M)
	DPPH radical	ABTS radical		
1	N.A. ^c	N.A.	N.A.	N.A.
2	110.2	12.7	22.3	N.A.
3	N.A.	8.1	78.2	492.8
4	17.0	4.7	18.8	N.A.
5	17.2	8.3	N.A.	N.A.
Ferulic acid	115.3	30.2	N.D. ^d	N.D.
EGCG ^b	N.D.	N.D.	12.8	N.D.
Arbuin	N.D.	N.D.	N.D.	1003.9

a) Human neutrophil elastase

b) Epigallocatechin gallate

c) Not active

d) Not determined

**Figure 4.** Inhibitory activity of compounds 1 ~ 5 on human neutrophil elastase.

3.5. 화합물 1 ~ 5의 미백 효과

B16F10 melanoma 세포주를 이용하여 가시연꽃 종자 추출물의 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리한 화합물의 멜라닌 저해활성을 평가하였다. 그 결과 화합물 3은 1 mM의 농도까지 세포독성을 나타내지 않으면서 멜라닌 생성을 저해하였으며 멜라닌 생성 저해활성에 대한 IC₅₀ 값은 492.8 μ M로써, 이는 1003.9 μ M의 IC₅₀ 값을 갖는 양성 대조구인 알부틴보다 2.0 배 이상 우수한 활성이다.

4. 결 론

본 연구에서는 가시연꽃 종자 추출물의 용매 분획물의

화장품 원료로서의 특성을 조사하고, 그로부터 분리한 유효 성분들의 화학구조를 규명하며 각 화합물의 항산화 활성, 엘라스타아제 저해활성 및 미백 활성을 평가하였다.

1) 가시연꽃 종자의 에틸 아세테이트 분획물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성에 대한 SC₅₀ 값은 각각 8.7 및 4.1 μ g/mL이고 엘라스타아제 저해활성에 대한 IC₅₀ 값은 24.2 μ g/mL로써 가시연꽃은 강력한 자유라디칼 소거활성 및 엘라스타아제 저해활성을 나타내었다.

2) 가시연꽃 종자의 에틸 아세테이트 분획물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 다양한 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC 기법을 통해 순수한 화합물 5종을 분리하였다. 각종 NMR 및 MS 스펙트럼을 분석하여 각 화합물의 화학구조를 규명하였으며 fucosterol (1), 3-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-4[(7'R),5'-dihydroxy-3'-methoxybenzyl]tetrahydrofuran (2), resorcinol (3), pyrogallol (4) 및 4-O-methyl gallic acid (5)로 동정하였다.

3) 가시연꽃 종자의 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리한 화합물 1 ~ 5는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성에 대해 4.7 ~ 110.2 μ M의 SC₅₀ 값을 가지며 강력한 항산화활성을 나타내었으며, 엘라스타아제 저해활성에 대한 IC₅₀ 값은 18.8 ~ 78.2 μ M로 나타났다. 또한 화합물 3은 B16F10 melanoma 세포주에서 492.8 μ M의 IC₅₀ 값을 나타내며 양성대조구인 알부틴보다 약 2배 강력한 미백활성을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때, 가시연꽃 종자 추출물 및 그로부터 분리한 유효성분은 항산화 활성과 더불어 주름개선 활성 및 미백활성을 갖는 복합 기능성 원료로 응용 가능성이 큼을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제고유번호 : A050432).

참 고 문 헌

1. D. Hou, Flora of Taiwan, 2nd ed.; Editorial Committee of the Flora of Taiwan, **2**, 547 (1996).
2. M. McGuffin, C. Hobbs, and R. Upton, American products association's botanical safety handbook, p 51, CRC Press, Boca Raton, Florida (1997).
3. J. Heo, Dongui Bongam, *Yeokang, Co.*, Seoul (1994).
4. J. D. Su, T. Osawa, and M. Namiki, Screening for antioxidative activity of crude drugs, *Agric. Biol. Chem.*, **50**(1), 199 (1986).
5. S. E. Lee, E. M. Ju, and J. H. Kim, Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed, *Exp. Mol. Med.*, **34**(2), 100 (2002).
6. S. Das, P. Der, U. Raychaudhuri, N. Maulik, and D. K. Das, The effect of *Euryale ferox* (makhana), and herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury, *Mol. Cell. Biochem.*, **289**(1), 55 (2006).
7. A. Puri, R. Sahai, K. L. Singh, R. P. Singh, J. S. Tanson, and K. C. Saxena, Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in Indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids, *J. Ethnopharmacol.*, **71**(1), 89 (2000).
8. H. Zhao, S. Zhao, C. Sun, and D. Guillaume, Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and mass spectrometry, *J. Lipid. Res.*, **30**(10), 1633 (1989).
9. H. Zhao, S. Zhao, D. Guillaume, and C. Sun, New cerebrosides from *Euryale ferox*, *J. Nat. Prod.*, **57**(1), 138 (1994).
10. L. C. Row, J. C. Ho, and C. M. Chen, Cerebrosides and tocopherol trimers from the seeds of *Euryale ferox*, *J. Nat. Prod.*, **70**(7), 1214 (2007).
11. S. Lee, Y. S. Lee, S. H. Jung, S. S. Kang, and K. H. Shin, Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*, *Arch. Pharm. Res.*, **26**(9), 719 (2003).
12. J. K. Son, J. H. Jung, C. S. Lee, D. C. Moon, S. W. Choi, B. S. Min, and M. H. Woo, DNA topoisomerases I and II inhibition and cytotoxicity of constituents from the roots of *Rubia cordifolia*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **27**(8), 1231 (2006).
13. G. Saxena, A. R. McCutcheon, S. Farmer, G. H. Towers, and R. E. W. Hancock, Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*, *J. Ethnopharmacol.*, **42**(2), 95 (1994).
14. S. H. Lee, M. Jun, J. Y. Choi, E. J. Yang, J. N. Hur, K. Bae, Y. H. Seong, T. L. Huh, and K. S. Song, Plant phenolics as prolyl endopeptidase inhibitors, *Arch. Pharm. Res.*, **30**(7), 827 (2007).