

광대싸리 줄기 추출물의 항산화 활성

김재현 · 안유진 · 박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2009년 6월 3일 접수 ; 2009년 8월 16일 채택)

Antioxidative Activity of *Securinega suffruticosa* Extract

Jai-Hyun Kim · You-Jin Ahn · 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
(Reception June 3, 2009 ; Accepted August 16, 2009)

Abstract : In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on elastase, and components of *Securinega suffruticosa* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC₅₀) and reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of extract/fractions from *Securinega suffruticosa* were measured. The aglycone fraction (9.04 ± 0.51 µg/mL) and 50 % ethanol extract (1.05 ± 0.41 µg/mL) showed the most effective scavenging activities. The protective effects on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The aglycone fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ₅₀, 102.77 ± 5.37 min at 10 µg/mL). The inhibitory effect of ethyl acetate fraction on tyrosinase were of examined (210.0 ± 1.02 µg/mL). The inhibitory effect of aglycone fraction on elastase were also investigated (17.6 ± 1.26 µg/mL). These results indicate that extract/fractions of *Securinega suffruticosa* can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging ¹O₂ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. *Securinega suffruticosa* extract could be used as a new cosmeceutical ingredient for whitening and anti-wrinkle products.

Keywords : *Securinega suffruticosa*, antioxidative activity, elastase, tyrosinase, cosmetics

1. 서론

피부는 태양 자외선, 공해 등의 다양한 환경적 요인에 노출됨으로써 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손

상을 지속적으로 받게 된다. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰 ¹O₂ 및 ·OH를 비롯하여 O₂^{-·}, H₂O₂, ROO·, RO·, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다[1,2]. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다[3]. ¹O₂ 및 ·OH을 포함하는 ROS는 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백

[†]주저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정에 참여하는 등 피부노화를 가속시킨다[4-7].

사람 피부세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 ROS가 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분의 가장 많은 부분을 차지하기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 1O_2 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, 1O_2 이 UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 매개할 수 있다고 보고된 바 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선 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[17-19].

광대싸리(*securiniga suffruticosa*)는 대극과에 속하는 낙엽 관목으로, 높이는 1-3 m이며 줄기는 회갈색, 뿌리는 적갈색을 띠고 우리나라, 중국, 일본 등지의 넓은 지역에 걸쳐 분포한다. 한방에서는 일엽추(一葉萩)라 하여 활혈(活血), 서근(舒筋), 건비(健脾) 작용을 가져 류머티즘에 의한 요통(腰痛), 신경통(神經痛)이나 사지마비, 반신불수, 음위증, 안면신경마비, 소아마비 후유증, 허약체질, 혈액순환 등의 치료에 널리 이용되어 왔다[20].

광대싸리의 성분으로는 잎에서 securinine, allosecurinine, securineginine 등이 분리되었고, 줄기, 종자에서는 rutin, free fatty acid, sterol 등이 분리되어 보고된 바 있다[20,21]. 광대싸리의 주성분은 alkaloid인 securinine으로 중추신경 흥분제로 작용하여 소아마비 후유증 등에 유효하고[22], 최근에는 Beutler 등이 광대싸리의 주성분인 securinine이 GABA receptor antagonist의 한 부류[23]라고 보고한 바 있다. 그리고 광대싸리 잎의 acetylcholinesterase 활성 저해 성분에 관한 연구[24], 잎의 tannin 및 관련화합물에 대한 화학적 연구[25] 등이 보고되었다.

상기에서와 같이 광대싸리의 잎, 줄기 추출물 성분 분석과 폐놀성 화합물에 관한 연구[26,27]는 수차례 이루어 졌다. 저자의 지난 논문에서 보고된 바와 같이 광대싸리는 우수한 free radical 소거 활성과 ROS 저해 활성, 세포보호 효과 등을 보였다[28]. 그러나 ethyl acetate, aglycone 분획 추출물에 대한 각 실험이 진행된 적은 없었다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 광대싸리 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총항산화능, 그리고 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과 등을 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 광대싸리의 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 모델을, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy (USA)사 제품을, 화학 발광기는 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 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 시약은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical (Japan)사 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다.

완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , trizma base, ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethylacetate (EtOAc), 그리고 HCl 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase

(12.7 mg solid, 3,960 units/mg solid), elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험 재료인 광대싸리는 2008년 3월 서울 경동시장에서 구매하여 사용하였다.

2.2. 광대싸리 줄기의 성분 분획 및 추출

광대싸리 줄기는 Fig. 1과 같은 방법으로 추출하였다. 껍질 제거 후 건조된 광대싸리 줄기 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 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시켰다. 이를 감압 농축하여 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 산 가수분해 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H₂SO₄ 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류 시킨 용액을 5 % KOH/MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압 농축하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

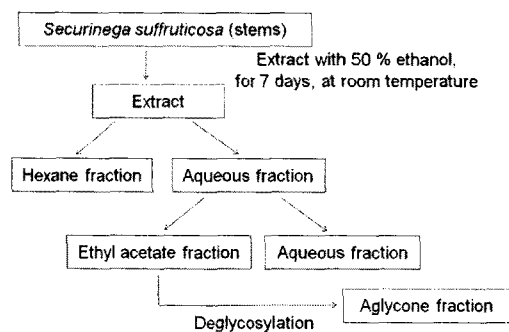


Fig. 1. Scheme for preparation of compounds from *Securinega suffruticosa* (stems).

2.3. 광대싸리 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인

물질로 간주되고 있다. 광대싸리 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical을 이용하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 흡광도를 spectrophotometer로 517 nm에서 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, FSC₅₀, µg/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

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성 산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계는 각종 ROS (O₂^{•-}, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H₂O₂)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 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 FeCl₃·6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 혼합하였다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 첨가하지 않았다. 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, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

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 의한 세포손상(파괴)에 대한 보호효과를 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 °C의 냉장고에 보관하여 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 optical density(O.D.)가 0.6 이었으며, 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 광대사리 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 광조사하였다. 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. 광대사리 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 % 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ₅₀이 31 min으로 오차범위 ± 1.0 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. 세포보호 활성의 크기는 대조군의 50 % 용혈시간 τ₅₀에 대한 시료의 τ₅₀의 상대적 값(relative protective effects)으로 표기하였다.

Relative protective effects =

$$\frac{\text{Sample } \tau_{50} \text{ (min)}}{\text{Control } \tau_{50} \text{ (31.0 } \pm \text{ 1.0 min)}}$$

2.5. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌은 L-tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase가 핵심 효소로 작용하여 생성되기 때문에 tyrosinase의 저해활성 능력을 측정하여 미백효과를 평가하였다. 실험방법은 potassium phosphate buffer (PBS, 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, µg/mL)로 표기하였다.

2.6. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포의 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 μ L에 측정시료용액 7.5 μ L와 buffer 92.5 μ L를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 $^{\circ}$ C 수용상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300 μ L를 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. 광대싸리 추출물의 수득율

광대싸리 줄기의 50 % ethanol extract의 수득율은 18.9 %, ethyl acetate 분획은 0.25 %, aglycone 분획은 0.24 %이었다.

3.2. 광대싸리 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

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 수소 주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

광대싸리 줄기의 추출물 및 분획에 대한 free radical 소거활성 측정 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 광대싸리 줄기의 free radical 소거활성 (FSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물은 43.12 \pm 1.96 μ g/mL, ethyl acetate 분획은 12.8 \pm 1.41 μ g/mL, aglycone 분획은 9.04 \pm 0.51 μ g/mL로 나타났다. 광대싸리 줄기의 aglycone 분획은 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (8.89 \pm 2.93 μ g/mL)과 비교해 볼 때, 유사한 소거 활성을 가진 것으로 확인되었다.

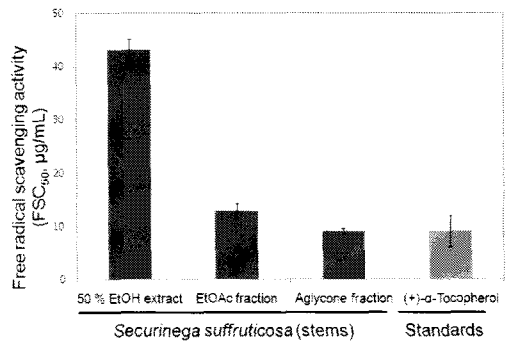


Fig. 2. Free radical scavenging activity of extracts and fractions of *Securinega suffruticosa* and references.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성 산소 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. 광대싸리 잎 추출물과 분획의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물이 1.05 \pm 0.42 μ g/mL, ethyl acetate 분획이 8.05 \pm 1.39 μ g/mL, 그리고 aglycone 분획이 3.05 \pm 1.35 μ g/mL으로 나타났다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 광대싸리 줄기의 50 % ethanol 추출물이 ethyl acetate 분획이나 당을 제거시킨 분획보다 활성산소 소거활성이 큼을 보여주었다. 50 % ethanol 추출물은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 \pm 0.85 μ g/mL) 보다 큰 활성을 나타내었다.

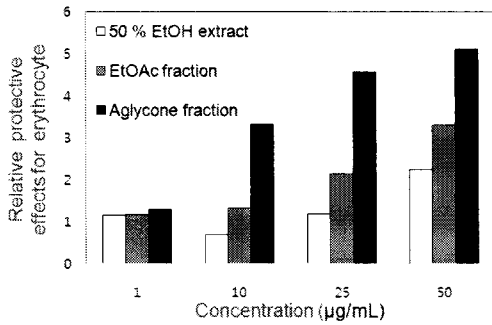


Fig. 3. Reactive oxygen species scavenging activity of *Securinega suffruticosa* and references in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

3.3. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

활성산소에 대한 추출물의 세포보호활성은 rose-bengal 존재 하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min 광조사 후 $^1\text{O}_2$ 등의 활성산소종으로 유도된 적혈구의 용혈정도를 암반응 시간에 따라 측정함으로써 구하였다. 대조군의 경우 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 약 31.0 ± 1.0 min으로 나타났다. 광대싸리 추출물의 용혈 억제 효과 측정 결과를 Fig. 4와 5에 나타냈다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 광대싸리 추출물의 ethyl acetate 분획에서 당을 제거시킨 분획물은 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 농도 의존적(τ_{50} 이 각각 39.90, 102.77, 141.25, 158.27 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 이를 대조군 (τ_{50} , 31.0 min)으로 나눈 상대적 값으로 Fig. 4에 나타내었다. 동일 농도에서 당을 제거한 aglycone 분획이 ethyl acetate 분획보다 높은 세포보호활성을 보인 것은 광대싸리 줄기 aglycone 분획이 세포막에의 접근과 세포막 내로의 침투가 더 용이함을 나타내며 이는 세포막에서 일어나는 활성산소에 의한 인지질의 산화와 세포막 파괴를 aglycone 분획이 보다 더 효율적으로 억제함을 보여주고 있다. 광대싸리의 성분인 rutin은 2개의 당(rutinose)이 결합한 형태로 rutin 분자 주위에서 큰 물결질이 형성되어 세포막 내로의 접근에 상당한 어려움이 있어 세포보호 효과도 낮게 나타난

것으로 판단되어진다. 세포보호활성은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 50 % ethanol 추출물 (τ_{50} , 21.03 min) < ethyl acetate 분획 (40.73 min) < aglycone 분획(102.77 min) 순으로 증가하였다. 이를 대조군 (τ_{50} = 31.0 min)으로 나눈 상대적 값으로 Fig. 5에 나타내었다. 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid는 수용성 항산화제로서 세포막에서 세포보호효과를 나타내지 못했다.

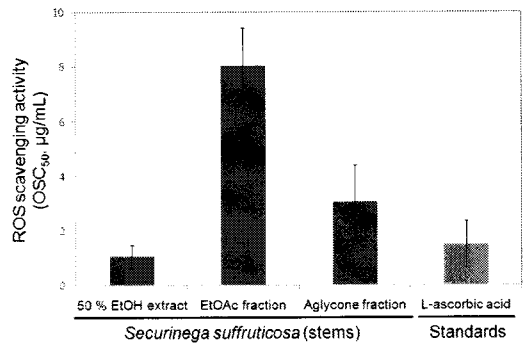


Fig. 4. Cellular protective effects of *Securinega suffruticosa* against $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effects = sample τ_{50} /control τ_{50} (Control; τ_{50} = 31.0 ± 1.0 min).

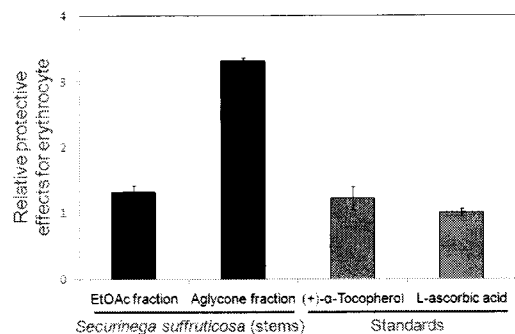


Fig. 5. The effect of extracts and fractions from *Securinega suffruticosa* and standards at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effects = sample τ_{50} /control τ_{50} (Control; τ_{50} = 31.0 ± 1.0 min).

광대싸리 줄기의 ethyl acetate 분획은 비교물질인 (+)- α -tocopherol과 동일한 세포보호 효과를 보였고, aglycone 분획은 1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 (+)- α -tocopherol 보다 큰 세포보호 효과를 나타냈다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 동일 농도에서 광대싸리 줄기의 aglycone 분획은 (+)- α -tocopherol의 두 배 이상의 세포보호 효과를 보였다.

3.4. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPA quinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다.

광대싸리 줄기 추출물 및 분획의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 광대싸리의 50 % ethanol 추출물은 tyrosinase 저해활성이 거의 나타나지 않았다(data not shown). ethyl acetate 분획의 tyrosinase 저해 활성(IC_{50})은 210.00 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획은 302.00 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 ethyl acetate 분획은 미백 고시 원료인 arbutin의 저해 활성(226.88 $\mu\text{g/mL}$)과 유사한 저해 활성을 보였다. 따라서 광대싸리의 ethyl acetate 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다.

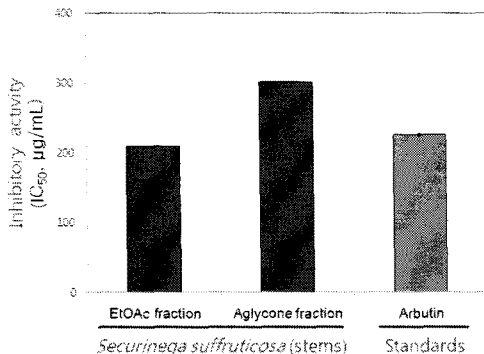


Fig. 6. The effect of extracts and fractions from *Securinega suffruticosa* and standards on tyrosinase.

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

광대싸리 추출물의 elastase 저해 활성 측정 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 광대싸리의 50 % ethanol 추출물은 elastase 저해활성이 거의 나타나지 않았다(data not shown). Ethyl acetate 분획의 elastase 저해활성(IC_{50})은 65.2 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획은 17.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 aglycone 분획은 비교물질인 주름개선 성분 kaempferol (13.6 $\mu\text{g/mL}$)과 oleanolic acid (13.7 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 저해 활성을 보였다. 따라서 광대싸리의 aglycone 분획을 화장품에 응용할 경우 주름개선 효과가 있을 것으로 사료된다.

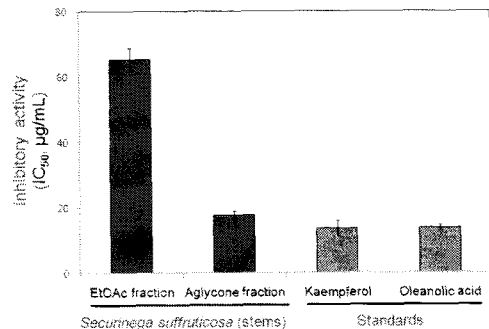


Fig. 7. The effect of extracts and fractions from *Securinega suffruticosa* and standards on elastase.

4. 결론

- 1) 광대싸리 줄기의 50 % ethanol 추출물의 수득률은 18.90 %, ethyl acetate 분획은 0.25 %, aglycone 분획은 0.24 %이었다.
- 2) Free radical 소거활성(FSC_{50})은 50 % 에탄올 추출물이 43.12 $\mu\text{g/mL}$, ethyl

acetate 분획이 12.8 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획은 9.04 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 aglycone 분획은 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (8.89 $\mu\text{g/mL}$)과 비교해 볼 때, 유사한 소거 활성을 가진 것으로 확인되었다.

- 3) 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물이 1.05 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획이 8.05 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획이 3.05 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 50 % ethanol 추출물이 ethyl acetate 분획이나 당을 제거시킨 분획보다 활성산소 소거활성이 큼을 보여주었다. 50 % ethanol 추출물은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$) 보다 큰 활성을 나타내었다.
- 4) ¹O₂으로 유도된 세포막 파괴에 대한 보호 활성 실험에서 광대싸리 추출물 및 분획은 50 % ethanol 추출물 ($\tau_{50} = 21.03 \text{ min}$) < ethyl acetate 분획 (40.73 min) < aglycone 분획 (102.77 min) 순으로 증가하였다. 광대싸리 줄기의 ethyl acetate 분획은 비교물질인 rutin과 동일한 세포보호 효과를 보였고, aglycone 분획은 1-50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 rutin, (+)- α -Tocopherol 과 비교했을 때 큰 세포보호 효과를 나타냈다.
- 5) Tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 ethyl acetate 분획이 210.0 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획이 302.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 ethyl acetate 분획은 미백 고시 원료인 arbutin의 저해 활성(226.88 $\mu\text{g/mL}$)과 유사한 저해 활성을 보였다.
- 6) Elastase 저해활성(IC₅₀)은 ethyl acetate 분획이 65.2 $\mu\text{g/mL}$, aglycone 분획이 17.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 광대싸리 줄기의 aglycone 분획은 비교물질인 주름개선 성분 kaempferol (13.6 $\mu\text{g/mL}$)과 oleanolic acid (13.7 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 저해 활성을 보였다.

이상의 결과들로부터 광대싸리 줄기의 추출물과 분획은 총항산화능과 세포보호 활성이 매우 크고, tyrosinase와 elastase 저해 활성이 현재 사용되고 있는 화장품 원료와 유사한 활성이 있음을 확인하였다. 따라서 이들 추출물은

항산화 작용 등 기능성 소재로서 화장품에 응용 가능성이 있는 만큼 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. K. J. A. Davies, Protein Damage and Degradation by Oxygen Radical, *J. Biol. Chem.*, 262, 9895 (1987).
2. I. C. Kim, Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Polygoni Multiflori Radix*, *Polygonati Rhizoma* and *Ephedrae Herba*, *J. the Korean Oil Chemists Soc.*, 25(4), 533 (2008).
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. 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: 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. Parkang, K. H. tive and Cellular Protective Effects of Jeju Native Plant Extracts Against Reactive Oxygen Species (I), *J. Soc. Cosmet. Sci. J. Ysts Korea*, **32**(3), 181 (2006).
 17. 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).
 18. 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).
 19. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidive Potenties of Extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* Extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).
 20. Z. Horii, M. Ikeda, M. Hanaoka, M. Yamauchi, and Y. Tamura, Structure of Securitinine, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1633 (1967).
 21. S. G. Yunosova, S. D. Gusakova, and A. I. Glushenkova, A Comparative Investigation of the Fatty Acid Compositions of the Seeds of a Number of Lines of a Genetic Collection of *Securinega suffruticosa*, *Khim. Prir. Soedin.*, **3**, 277 (1986).
 22. V. Snieckus, The Alkaloids: Chemistry and Physiology, Ed. by R. H. F. Manske, *Academic press, New York*, **14**, 425 (1973).
 23. J. A. Beutler, E. W. Karbon, A. N. Brubaker, R. Malik, D. R. Curtis, and S. J. Enna, Securinine Alkaloids: a New Class of GABA Receptor Antagonist, *Brain Research*, **330**, 135 (1985).
 24. J. S. Eun, H. W. Park, S. M. Seo, J. H. Yang, K. H. Leem, S. H. Oh, C. H. Oh, N. I. Baek, and D. K. Kim, An Acetylcholinesterase Inhibitor from the Leaves of *Securinega suffruticosa*, *Kor. J. Pharamacogn.*, **34**(1), 14 (2003).
 25. S. C. Lee, Chemical Studies of Tannin and Related Compounds from the Leave of *Securinega suffruticosa*, a collection of learned Pharm. papers, Chung-Buk Univ., **7**, 9, (1992).
 26. S. C. Lee, B. T. Ahn, W. Y. Park, S. H. Lee, J. S. Ro, and K. S. Lee, Chemical Study on the Phenolic Compounds from the Leave of *Securinega suffruticosa*, *Kor. J. Pharamacogn.*, **25**(2), 105 (1994).
 27. S. C. Lee, B. T. Ahn, W. Y. Park, S. H. Lee, J. S. Ro, and K. S. Lee, Phenolic Compounds from Stems of *Securinega suffruticosa*, *Kor. J. Pharamacogn.*, **27**(1),

1 (1996).

28. 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).