

## 양파껍질 추출물의 항균, 항산화 및 항노화 효과에 관한 연구

김정은 · 김아름 · 김민지 · 박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2010년 12월 7일 접수, 2011년 1월 13일 채택)

### Antibacterial, Antioxidative and Antiaging Effects of *Allium cepa* Peel Extracts

Jung Eun Kim, A Reum Kim, Min Ji Kim, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Science and Technology,  
Seoul 139-743, Korea

(Received December 7, 2010; Accepted January 13, 2011)

본 연구에서는 양파껍질 추출물의 항균, 항산화활성과 tyrosinase 및 elastase 저해활성을 측정하였다. 피부 상재균에 대한 양파껍질 추출물의 항균활성 측정결과, 황색포도상구균(*S. aureus*)에 대한 에틸아세테이트 분획의 MIC는 0.06%로 매우 큰 항균활성을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획 중 aglycone 분획은 우수한 free radical [1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)] 소거활성(FSC<sub>50</sub> = 5.05 µg/mL)을 나타내었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 에틸아세테이트 분획과 aglycone 분획의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 각각 0.05 및 0.03 µg/mL이었다. Rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 용혈 실험에서 aglycone 분획은 25 µg/mL의 농도에서 매우 큰 세포보호활성(τ<sub>50</sub> = 480.3 ± 0.2 min)을 나타냈다. 양파껍질 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 9.16, 8.68 µg/mL이었고, aglycone 분획의 elastase의 저해활성은 14.12 µg/mL이었다. 양파껍질 추출물 중 ethyl acetate 분획 0.1% 함유하는 크림의 경표피 수분 손실량은 추출물 함유 크림이 6.8 g/m<sup>2</sup>h로 대조군(8.3 g/m<sup>2</sup>h)에 비해 경표피 수분 손실량 감소 효과를 나타내었다. 이상의 결과들은 양파껍질 추출물이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히, 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 그리고 항노화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다. 따라서 양파껍질 추출물은 미백이나 항주름관련 새로운 기능성화장품에의 응용이 가능함을 나타낸다.

In this study, the antibacterial, antioxidative and inhibitory effects of *Allium cepa* peel extracts on tyrosinase and elastase were investigated. MIC values of the ethyl acetate fraction of *Allium cepa* peel on especially, *S. aureus* among the skin resident flora (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*; *Propionibacterium acnes*, *P. acnes*; *Pityrosporum ovale*, *P. ovale*; *Escherichia coli*, *E. coli*) were 0.06%. The aglycone fraction showed more excellent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub> = 5.05 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of the ethyl acetate fraction and aglycone fraction in the luminol-dependent Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system were 0.05 and 0.03 µg/mL, respectively. The cellular protective effect of the aglycone fraction on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes exhibited more prominent (τ<sub>50</sub>, 480 min at 25 µg/mL). The inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) of the ethyl acetate fraction and aglycone fraction on tyrosinase were 9.16 and 8.68 µg/mL, the inhibitory effect (IC<sub>50</sub>) of the aglycone fraction on elastase was 14.12 µg/mL. The transepidermal water loss of the cream containing 0.1% ethyl acetate fraction was decreased from 8.3 g/m<sup>2</sup>h in control to 6.8 g/m<sup>2</sup>h in the subjects applied with cream containing the ethyl acetate fraction. These results indicate that extract/fractions of *Allium cepa* peel can function as antioxidant in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other ROS, and protect cellular membranes against ROS, and possibly as antiaging agents. *Allium cepa* peel extract could be used as a new cosmeceutical for whitening and anti-wrinkle products.

**Keywords:** *Allium cepa* peel, antibacterial activity, antioxidant, antiaging, cosmetics

### 1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인(오염물질, 세균, 스트레스 등)뿐만 아니라 특히 태양 자외선에 노출됨으로써 반응성이 매우 큰 활성산소종

(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 지속적으로 받게 된다. 활성산소종이란 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (singlet oxygen) 및 ·OH (hydroxy radical)를 비롯하여 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (superoxide anion radical), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide)가 있고, 그 외에 ROO·, RO·, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다[1,2]. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수도

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

있다[3]. 이들 활성산소종 중에서  $O_2^{\cdot-}$  및  $\cdot OH$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 결합조직 성분(콜라겐, 히아루론산 등)의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 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 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서  $O_2^{\cdot-}$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $O_2^{\cdot-}$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $O_2^{\cdot-}$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다.  $O_2^{\cdot-}$ 을 비롯한 ROS가 광노화와 연관되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[17-20].

활성산소를 조절할 수 있는 항산화제에는 일반적으로 흔히 사용되는 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)와 butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 탁월한 항산화력과 경제성 등으로 널리 이용되어 왔으나 안정성 논란으로 인하여 대부분 사용 규제를 받고 있는 실정이다. 화장품에서는 주로 (+)- $\alpha$ -tocopherol 및 L-ascorbic acid가 주목받고 있으며, 제품 중에서의 안정성 때문에 이들 대신 (+)- $\alpha$ -tocopherol 유도체나 L-ascorbic acid 유도체가 많이 사용되고 있다. 그러나 이들 또한 항산화 효과 측면에서 미흡한 점이 많아 새로운 천연 항산화제를 개발하여 응용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 이와 함께 자연 지향적이고 환경 친화적인 소비 추세에 따라 다양한 천연 소재를 이용한 미백, 항노화(주름), 자외선 차단 기능을 가진 기능성 화장품의 개발도 활발히 이루어지고 있다[21,22].

양파(*Allium cepa*)는 용도가 넓은 식물 중 하나로, 최근에는 함유되어 있는 항산화제로 인해 새롭게 주목을 받고 있다. 음식에서 양파의 규칙적인 소비는 신경퇴행성 장애, 암, 백내장 형성, 궤양의 위험을 줄이고 골다공증과 관련된 증상의 감소, 혈관 및 심장 질환의 예방 등과 관련이 있다[21-24]. 양파는 phenolic acids, flavonoids, cepaenes, thio-sulfonates 그리고 anthocyanins 같은 다양한 생물학적 활성 분자의 주된 식물 중의 하나로[25] 보통 폐기물로 인식되어지는 건조된 양파껍질에서는 효과적인 항산화제로 작용하는 플라보노이드 배당체 등이 있는 것으로 알려져 있다[26-29]. 이들 플라보노이드 배당체들은 간 보호 효과, 면역 향상 가능성 그리고 항암, 항스트레스, 항암 등과 같은 약리작용의 성질을 가지고 있다고 보고되어 있다[30,31]. 양파껍질에는 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ )의 소거활성 등의 항산화 효과와 항돌연변이성 효과가 있다고 보고되어 있다[29].

상기에서와 같이 양파껍질 추출물을 이용한 일부의 항산화작용에 관해서는 연구가 이루어졌으나, 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $O_2^{\cdot-}$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 생체에서와 같이 다양한 활성산소종( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  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 양파껍질 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $O_2^{\cdot-}$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성,  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계에서의 총항산화능, 이들 추출물(혹은 분획)의 성분 분석, 그

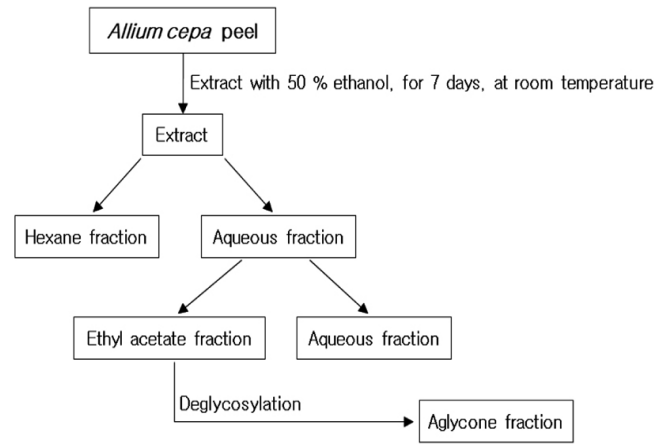


Figure 1. Scheme for preparation of extract/fractions obtained from *Allium cepa* peel.

리고 피부주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 저해활성 및 멜라닌 생성에 핵심효소인 tyrosinase 저해활성을 알아보고자 하였다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 양파껍질의 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)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학 발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea) 제품을 사용하였다. (+)- $\alpha$ -Tocopherol (1000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic 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,  $H_2O_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide, 효소로 사용된 elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 인체실험을 위하여 CK electronic (Germany)제품인 Tewameter (TM210)를 사용하였다. 실험에 사용한 양파 껍질(*A. cepa* peel)은 가락동 농수산물시장에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 양파껍질 추출물의 제조

실험에 사용된 양파껍질은 Figure 1과 같은 방법으로 추출하였다. 양파껍질 중량당 50% 에탄올을 1 : 30의 비율로 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액의 일부는 감압·농축하여 50% 에탄올 추출물로 사용하였고, 일부는 n-헥산으로 비극성 성분을 제거한 후 에틸 아세테이트로 추출하여 얻은 추출액을 감압·농축하여 파우더를 얻어 실험에 사용하였다. 또한 에틸아세테이트 분획의 일부는 산 가수분해 반응으로 당을 제거시켜 얻은 아글리콘(aglycone) 분획을 만들어

사용하였다.

일반적으로 에틸아세테이트 분획은 주로 플라보노이드 배당체 형태로 극성이 커서 피부 흡수가 용이하지 못한 반면, 산 가수분해로 얻은 aglycone 분획은 피부 또는 세포막에 대한 투과성이 양호하여 이를 제품에 응용할 목적으로 실험에 사용하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 분획 일정량에 10 mL의 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -50% 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류 · 냉각시켰다. 환류시킨 용액을 5% KOH 용액으로 중화시킨 후, 에틸아세테이트 분획을 얻어 이를 감압 · 농축하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 양파껍질 추출물의 항균 활성 측정

#### 2.3.1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919와 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078, 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC6538, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736는 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다.

#### 2.3.2. 배지 및 배양조건

*P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4 °C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37 °C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24 h 배양하면서 사용하였다. 또한 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar : 6%, ox-bile : 2%, tween 40 : 1%, glycerol mono-oleate : 0.25%)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30 °C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

#### 2.3.3. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

최소억제농도(MIC)는 환천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 분획물들을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고, 시험균을 평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *P. acnes*는 37 °C에서 72 h 후에, *S. aureus*와 *E. coli*는 37 °C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30 °C에서 48 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

### 2.4. 양파껍질 추출물의 항산화효과 측정

#### 2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

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

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

총항산화능은 luminol이 ROS에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 먼저 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 추출물을 농도별로 넣는다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol

80 µL를 넣고 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 화학발광기의 6개의 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

### 2.5. Photohemolysis 법을 이용한 세포보호효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포막 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 의한 세포손상(파괴)에 대한 보호 효과를 측정 할 수 있다.

#### 2.5.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남자로 부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다.

#### 2.5.2. Photohemolysis 법을 이용한 세포보호효과

적혈구 현탁액 3.5 mL에 추출물을 농도별로 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광감제 rose-bengal (10.0 µM) 0.5 mL를 가하고 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 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례하기 때문에 양파껍질 추출물의 광용혈에 미치는 효과를 투광도로부터 구할 수 있다. 결과는 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ<sub>50</sub>로 나타내었다. 대조군(control)은 τ<sub>50</sub>이 30.27 min으로 오차범위 ± 0.37 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다.

### 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 1.9 mL에 추출물 0.1 mL과 tyrosinase (1250 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, IC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

### 2.7. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에 있어 주된 역할을 하는 matrix metalloproteinases (MMPs) 중 하나인 elastase의 활성저해 능력을 다음과 같이 측정하였다. 0.13 M (pH 8.0) Tris-Cl buffer에 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide 1.0 mM을 용해시킨 용액 1.9 mL에 추출물 0.1

**Table 1. Formulation of Cream Containing EtOAc Fraction of *Allium cepa* Peel Extract**

Commercial name	Content (%)
Distilled water	Up to 100
Glycerine	7.0
1,3-Butylene glycol	5.0
Xanthan gum (Keltrol-F)	0.1
TEA	0.2
Methyl paraben	0.1
Ceto-stearyl alcohol (Lanette-o)	2.0
Stearic acid	1.0
Glyceryl stearate / PEG-100 stearate (Alracel #165)	1.5
Bees wax	1.0
Glyceryl monostearate (GMS-205)	1.0
Squalane (Pripure R 3759)	8.0
Caprylic capric triglyceride	5.0
Paraffin wax	2.5
Dimethicone (Si-200 / 100 CS)	0.3
<i>Allium cepa</i> peel extract (EtOAc fraction)	0.25

mL를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 시킨다. 10 min 후 elastase 용액을 100 µL 첨가하고, 다시 25 °C에서 10 min 동안 post-incubation 한 뒤 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해 활성은 elastase의 활성을 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (inhibition concentration, IC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

**2.8. 인체시험**

**2.8.1. 양파껍질 추출물 함유 크림의 제조**

인체시험에 사용된 양파껍질 추출물은 높은 항산화 활성을 나타내는 에틸아세테이트 분획을 사용하였다. 실험에 사용한 크림은 Table 1의 처방을 사용하여 제조하였다. 양파껍질 추출물은 EtOH : 1,3-butylene glycol (1,3-BG) = 1 : 4 비율의 용액에 10%가 되도록 stock solution 용액을 만들고 처방에는 이 stock solution이 0.1%가 되도록 하여 최종 양파껍질 추출물(건조 중량 기준)이 0.25% 함유된 크림을 제조하여 실험군(experimental)으로 사용하였다. 대조군(placebo)은 양파껍질 추출물 없이 크림에 EtOH : 1,3-BG = 1 : 4 비율인 용액을 0.1% 함유하는 처방으로 하였다.

**2.8.2. 피부 경표피 수분 손실량 측정**

양파껍질 추출물 중 에틸아세테이트 분획을 포함하여 제조된 크림의 효능 시험을 위하여 20대의 피시험자 14명을 선정하여 평가를 실시하였다. 평가는 Tewameter (TM210)를 이용하여 경표피 수분 손실량 (transepidermal waterloss, TEWL)을 측정하였다.

시험 시작 30 min 전부터 항온항습조건(20~22 °C, 40~60%)의 실내에서 대기하고 피시험자들에게 주의 사항과 사용방법을 설명하여 숙지시켰다. 양파껍질 추출물 함유 크림과 대조군을 도포하기 전의 피부 수분 보유량과 경표피 수분 손실량을 측정하고 팔 안쪽에 도포한 후, 60 min 간격으로 총 180 min 동안 측정하였다.

**Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC, w/v%) of 50% Ethanol Extract and Ethyl Acetate Fraction from *A. cepa* Peel Against Various Bacteria**

Strains	AC extract (50% EtOH)	AC extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben
<i>P. ovale</i>	0.50	0.25	0.13
<i>P. acnes</i>	0.50	0.25	0.25
<i>S. aureus</i>	0.03	0.06	0.25
<i>E. coli</i>	0.50	0.25	0.13

**2.9. 통계처리**

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

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 양파껍질(*A. cepa* Peel) 추출물의 수득률**

건조한 양파 껍질 100 g을 50% 에탄올 3 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·압착하여 파우더를 얻었다. 이때 수득률은 8.26%이었으며, 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올로 추출한 것을 1차 n-헥산으로 비극성 물질을 제거한 뒤 에틸아세테이트 분획을 추출하여 감압·농축한 결과 수득률이 2.44%이었다. 에틸아세테이트 분획을 산가수 분해시켜 당을 제거하고 얻은 aglycone 분획의 수득률은 1.26%이었다. 에틸아세테이트 분획은 주로 플라보노이드 배당체가 많이 함유되어 있다. 이들 양파껍질 추출물은 이들을 화장품 소재로 이용하기에 적합한 수득률을 보여주었다. 본 연구에서는 50% 에탄올 추출물, 아글리콘 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

**3.2. 양파껍질 추출물의 항균활성 측정**

피부 상재균인 *P. ovale*, *P. acnes*, *S. aureus* 및 *E. coli*에 대한 양파껍질 추출물의 항균활성은 Table 2와 같다. 50% 에탄올 추출물의 항균활성보다도 에틸아세테이트 분획(MIC : 0.25%)에서 보다 높은 활성을 나타내었다. 이는 화장품에서 방부제로 사용하고 있는 methyl paraben (MP, MIC : 0.25%)과 비교하였을 때 비슷한 항균활성을 나타낼 수 있다. 황색포도상구균인 *S. aureus*에 대한 양파껍질 추출물의 항균활성은 매우 큰 것으로 나타났다. 50% 에탄올 추출물의 MIC는 0.03%, 에틸아세테이트 분획은 0.06%로 나타났다. 이는 MP (MIC : 0.25%)와 비교하였을 때, 황색포도상구균에 대해서 항균 활성이 매우 큼을 보여주고 있으며, 양파껍질 분획물이 황색포도상구균에 유효한 소재 및 화장품 개발에 응용 가능성이 높음을 시사한다. 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.2~0.4% 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 양파껍질 분획물은 비교적 낮은 농도에서도 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

**3.3. 양파껍질 추출물의 항산화활성**

**3.3.1. DPPH 법을 이용한 Free Radical 소거활성**

양파껍질 추출물 및 분획에 대한 free radical 소거활성 측정 결과는 Figure 2에 나타내었다. Free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은, 양파껍질의 50% 에탄올 추출물은 16.09 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 7.57 µg/mL, aglycone 분획은 5.05 µg/mL로 나타났다. 이는 비교물질로 사용한 (+)-*α*-tocopherol보다도 더 큰 라디칼 소거활성이 있음을 보여준다.

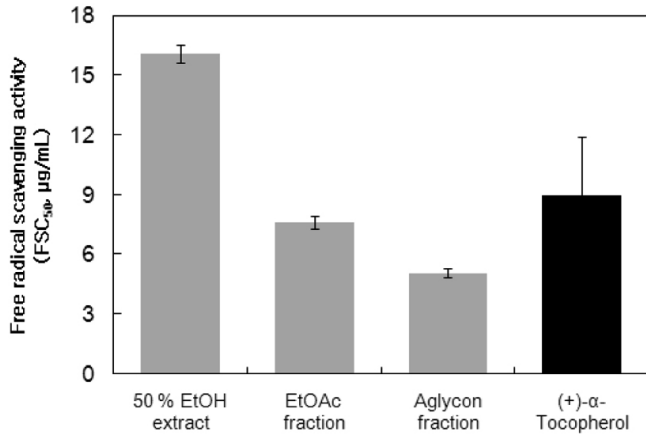


Figure 2. Free radical scavenging activities of extract/fractions of *Allium cepa* peel and (+)- $\alpha$ -tocopherol.

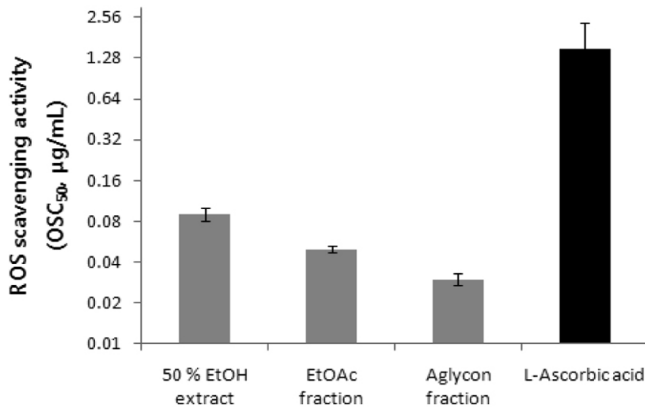


Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of *Allium cepa* peel extracts and L-ascorbic acid in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

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

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420~450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS 소거 활성에서 양파껍질 추출물이 화학발광을 감소시킴을 Figure 3에서 알 수 있다. 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 양파껍질 50% 에탄올 추출물이 0.09 µg/mL, 에틸아세테이트 분획이 0.05 µg/mL, aglycone 분획이 0.03 µg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 aglycone 분획, 에틸아세테이트 분획 및 50% 추출물 모두 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다도 매우 큼을 보여주었다.

3.4. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람적혈구의 파괴에 대한 세포보호활성

활성산소에 대한 추출물의 세포보호활성은 rose-bengal 존재 하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min 동안 광조사 후 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 등의 활성산소종으로 유도된 적혈구의 용혈정도를 암반응 시간에 따라 측정함으로써 구하였다. 대조군의 경우 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은 약 30.27 ± 0.37 min으로 나타났다. 양파껍질 추출물의 용혈억제 효과를 측정할 결과를 Table 3 및 Figure 4에 나타내었다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은 세포보호 활성이 클수록

Table 3. The Protective Effect of *Allium cepa* Peel Extract/Fractions on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Extract/fractions	$\tau_{50}$ (Half time of hemolysis <sup>a)</sup> )			
	Concentration (µg/mL)			
	1	5	10	25
50% Ethanol extract	53.9 ± 0.1	115.7 ± 0.9	189.2 ± 6.3	229.1 ± 1.3
Ethyl acetate fraction	72.5 ± 0.7	100.5 ± 9.5	158.1 ± 2.5	328.0 ± 21.1
Aglycone fraction	56.0 ± 2.2	102.1 ± 2.8	220.7 ± 7.5	480.3 ± 0.2
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	-	-	38.00 ± 1.8	-

<sup>a)</sup> Control,  $\tau_{50}$  = 30.27 ± 0.37 min

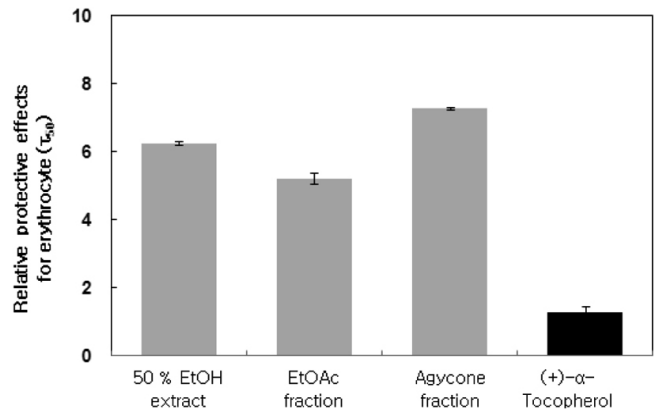


Figure 4. The protective effect of extract/fractions from *Allium cepa* peel and (+)- $\alpha$ -tocopherol at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes, Relative protective effect = sample  $\tau_{50}$ /control  $\tau_{50}$ .

크게 나타난다. 양파껍질의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 농도 의존적으로 세포보호활성이 다른 추출물 및 분획에 비해 상당히 큰 것으로 나타났다. 이 그림에서와 같이 양파껍질 추출물 및 분획에서 세포보호활성은 aglycone 분획 > 에틸아세테이트 분획 > 50% 에탄올 추출물 순으로 나타난다.

3.5. Tyrosinase 저해 활성

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

양파껍질 추출물 중 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 에틸아세테이트 분획 중 당을 제거한 aglycone 분획이 8.68 µg/mL, 50% 에탄올 추출물이 8.79 µg/mL, 에틸아세테이트 분획이 9.16 µg/mL의 순서로 나타났으며, 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 월등히 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다. 따라서 당이 제거된 추출물과 에틸아세테이트 분획 등을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 5).

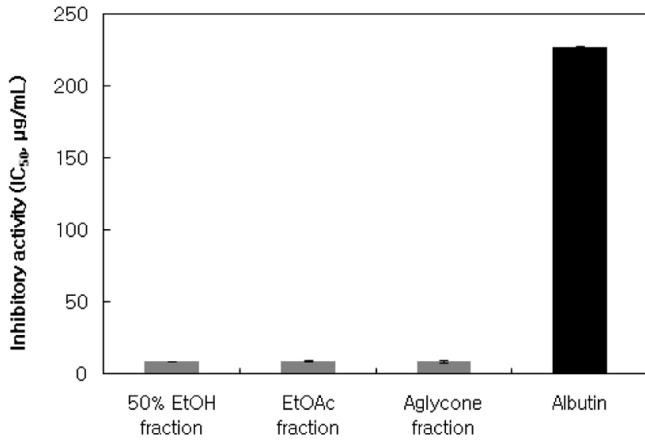


Figure 5. The inhibitory effect of extract/fractions from *Allium cepa* peel and reference on tyrosinase.

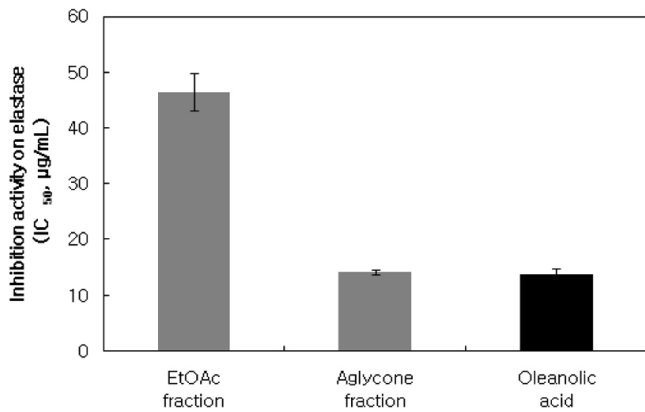


Figure 6. The inhibitory effect of extract/fractions from of *Allium cepa* peel and reference on elastase.

### 3.6. 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.

양파껍질 추출물은 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 에틸아세테이트 분획에서 46.41 µg/mL, aglycone 분획은 14.12 µg/mL을 나타냈으며, 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 저해 활성 13.70 µg/mL과 비교하여 보았을 때, ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 aglycone 분획이 oleanolic acid와 비슷한 elastase 저해활성을 보였다(Figure 6).

### 3.7. 인체시험

#### 3.7.1. Tewameter를 이용한 경표피 수분 손실량 측정

경표피 수분 손실량(TEWL)은 추출물 함유 크림 도포 후, 60 min 간격으로 180 min 동안 측정하였다(Figure 7). 그 결과 180 min이 지난 후 무도포한 부분의 수분 손실량은 8.3 g/m<sup>2</sup>h, placebo 크림은 7.3 g/m<sup>2</sup>h, 양파껍질 추출물을 함유한 크림은 6.8 g/m<sup>2</sup>h으로, 추출물 함유 크림은 무도포 대조군 보다는 18.1%, placebo 크림보다는 6.8% 경표피 수분 손실량의 감소를 나타내었다. 따라서 양파껍질 추출물을 함유한 크림은 경표피 수분 손실량을 유의적으로 감소시키는 보습효과가 있음을

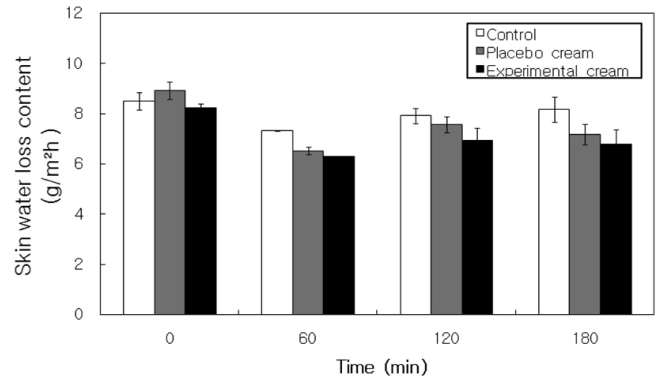


Figure 7. Representation of TEWL by Tewameter (TM 300) measurement. The zero is before use and at intervals of 60 min was measured after use of cream containing the ethyl acetate fraction of *Allium cepa* peel extract. (0 = before application)

알 수 있었다.

## 4. 결 론

1) 양파껍질의 50% 에탄올 추출물의 수득률은 8.26%, 에틸아세테이트 분획은 2.44%, aglycone 분획은 1.26%이었다.

2) 피부 상재균인 *P. ovale*, *P. acnes*, *S. aureus* 및 *E. coli*에 대한 양파껍질 추출물의 항균활성은 에틸아세테이트 분획(MIC : 0.25%)에서 보다 높은 활성을 나타내었다. 황색포도상구균인 *S. aureus*에 대한 양파껍질 추출물의 항균활성은 50% 에탄올 추출물(MIC = 0.03%), 에틸아세테이트 분획(0.06%)에서 큰 항균활성을 나타내었다.

3) Free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 양파껍질의 50% 에탄올 추출물이 16.09 µg/mL, 에틸아세테이트 분획 7.57 µg/mL, aglycone 분획은 5.05 µg/mL로 나타났다. 에틸아세테이트 분획 및 aglycone 분획은 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 더 큰 소거활성을 나타내었다.

4) 양파껍질 추출물의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 양파껍질 에탄올 추출물이 0.09 µg/mL, 에틸아세테이트 분획이 0.05 µg/mL, aglycone은 0.03 µg/mL로 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다도 추출물 모두 매우 큰 항산화능을 보여 주었다.

5) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 양파껍질 추출물은 µg/mL의 농도 범위(1~25 µg/mL)에서 농도 의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈에서 세포보호 활성을 나타내었다. 특히 양파껍질 aglycone 분획은 25 µg/mL 농도에서 480.3 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다. 세포보호 활성은 aglycone 분획 > 에틸아세테이트 분획 > 50% ethanol 추출물 > (+)- $\alpha$ -tocopherol 순으로 나타났다.

6) 양파껍질 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 9.16 µg/mL, 8.68 µg/mL로 미백제로 알려진 arbutin (IC<sub>50</sub>: 226.88 µg/mL)에 비하여 매우 큰 활성을 나타내었다.

7) 양파껍질 추출물 중 aglycone 분획은 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 14.12 µg/mL로 큰 활성을 나타내었다.

8) 양파껍질 추출물 중 에틸아세테이트 분획을 함유하고 있는 크림 (6.8 g/m<sup>2</sup>h)은 무도포 대조군 크림(8.3 g/m<sup>2</sup>h)이나 placebo 크림 (7.3 g/m<sup>2</sup>h)보다 경표피 수분 손실량이 감소하였다. 즉, 추출물 함유 크림은 무도포 대조군 보다는 18.1%, placebo 크림보다는 6.8% 경표피 수분 손실량의 감소를 나타내었다. 따라서 양파껍질 추출물을 함

유한 크립은 경표피 수분 손실량을 유의적으로 감소시키는 보습효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과들로부터 양과겹질의 에틸아세테이트 분획 및 aglycone 분획들은 총항산화능과 세포보호활성이 매우 큰 것으로 나타났으며, tyrosinase와 elastase 저해 활성도 크다는 것을 확인하였다. 따라서 이들 추출물은 항산화 작용 등 기능성 소재로서 화장품에 응용 가능성이 있는 만큼 보다 광범위한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- E. H. Witt, P. Motchnik, and L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin, eds. J. Fuchs and L. Packer, *Oxidative Stress in Dermatology*, 29, New York, Dekker (1993).
- I. Emerit, Free radicals and aging of the skin, eds. L. Emerit and B. Chance, *Free radicals and aging*, 328, Basel, Birkhauser (1992).
- C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976).
- S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
- S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
- S. N. Park, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 510 (2003).
- S. N. Park, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 657 (2003).
- 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).
- R. M. Tyrrell and M. Pidoux, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
- G. F. Vile and R. M. Tyrrell, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
- K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
- M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
- A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
- A. Oikarinen and M. Kallioinen, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
- 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).
- J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**, 181 (2006).
- H. J. Yang and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 61 (2007).
- H. J. Yang and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 139 (2007).
- S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 145 (2007).
- J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Le, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**, 181 (2006).
- Y. J. Cho, I. S. Ju, O. J. Kwon, S. S. Chun, B. J. An, and J. H. Kim, *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.*, **51**, 49 (2008).
- D. Y. Kang, M. O. Shin, J. H. Shon, and S. J. Bae, *J. Life Science*, **19**, 52 (2009).
- T. Kaneko and N. Baba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 323 (1999).
- S. Kawai, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 896 (1999).
- J. Sanderson, W. Mclauchlin, and G. Williamson, *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 639 (1999).
- Z. Shutenko, Y. Henry, E. Pinard, J. Seylaz, P. Potier, F. Berthet, P. Girard, and R. Sercombe, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 199 (1999).
- I. Goldman, M. Kopelberg, J. Devaene, and B. Schwartz, *Throm. Haemo.*, 450 (1996).
- A. Gulsen, D. P. Makris, and P. Kefalas, *Food Res. Int.*, **40**, 7 (2007).
- D. Prakash, G. Upadhyay, B. N. Singh, and H. B. Singh, *Food Chem.*, **104**, 783 (2007).
- T. C. Lines and M. Ono, *Phytomedicine*, **13**, 236 (2006).
- Brahma N. Singh, B. R. Singh, R. L. Singh, D. Prakash, D. P. Singh, B. K. Sarma, G. Upadhyay, and H. B. Singh, *Food Chem. Toxic.*, **47**, 1161 (2009).
- S. Balasenthil, S. Arivazhagan, C. R. Ramachandran, V. Ramachandran, and S. Nagini, *J. Ethnopharmacol.*, **67**, 189 (1999).
- M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola, M. T. D. Cronin, M. Mazura, and J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44 (2007).