

대황의 항산화 효과 및 타이로시네이즈 저해 활성

김정은·박찬하*·오대석*·이승연*·장세훈*·홍지연*·민혜진·박수아·원두현·박수남[†]

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과 나노바이오화장품연구실 화장품종합기술연구소, *한성과학고등학교
(2011년 11월 2일 접수, 2011년 11월 11일 수정, 2011년 11월 14일 채택)

Antioxidative Effect and Tyrosinase Inhibitory Activity of *Rheum undulatum* L. Extracts

Jung Eun Kim, Chan Ha Park*, Dae Seok Oh*, Seung Yeon Lee*, Se Hun Jang*, Jee Yeon Hong*,
Hye Jin Min, Su Ah Park, Doo Hyun Won, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobioscience Lab., Cosmetic R&D Center, College of Nature and Life Science,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

*Hansung Science High School

(Received November 2, 2011; Revised November 11, 2011; Accepted November 14, 2011)

요약: 본 연구에서는 대황 추출물의 항산화 활성, 타이로시네이즈(tyrosinase) 저해 활성을 확인하였다. 대황의 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획, 아글리콘(aglycone) 분획으로 실험을 진행하였다. 대황 추출물들의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성(FSC₅₀)은 대표적인 항산화제인 (+)- α -tocopherol보다 낮은 것으로 나타났다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종에 대한 아글리콘 분획의 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 0.265 μ g/mL로 매우 큰 활성을 나타내었다. 대황 추출물의 rose-bengal로 증감된 ¹O₂에 의한 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 모든 분획에서 농도 의존적(1~50 μ g/mL)으로 증가하였으며, 특히 아글리콘 분획은 10 μ g/mL 농도에서 τ_{50} 이 757.0 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 대황 추출물 중 아글리콘 분획의 타이로시네이즈 저해활성(IC₅₀)은 11.20 μ g/mL로 226.88 μ g/mL인 알부틴(arbutin)보다 큰 활성을 보여주었다. 이상의 결과들로부터 대황 추출물은 활성산소종을 소거하는 항산화제로 이용가능하며, 특히 아글리콘 분획의 현저한 항산화 작용 및 큰 타이로시네이즈 저해 효과로부터 이들 분획 또한 화장품원료로서 응용 가능성이 큼을 알 수 있었다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects and inhibitory activities on tyrosinase of *Rheum undulatum* (*R. undulatum*) L. extracts were investigated, 50 % ethanol extract, ethyl acetate and aglycone fractions of *R. undulatum* L. were used in experiments. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities (FSC₅₀) of *R. undulatum* L. extracts was lower than (+)- α -tocopherol, known as a typical antioxidant. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of aglycone fraction on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system using the luminol-dependent chemiluminescence assay showed the most prominent effect at a concentration of 0.265 μ g/mL. The cellular protective effects of extract/fractions of *R. undulatum* L. on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were increased in a concentration dependent manner (1 ~ 50 μ g/mL). Especially, aglycone fraction in 10 μ g/mL concentration showed the most protective effect among extracts (τ_{50} , 757.0 min). The inhibitory effects (IC₅₀, 11.20 μ g/mL) on tyrosinase of aglycone fraction was much higher than arbutin (226.88 μ g/mL), known as a whitening agent. These results indicate that *R. undulatum* L. extracts can be used as antioxidant. Particularly, aglycone fraction of *R. undulatum* L. showed superior antioxidative activity and high inhibitory effect on tyrosinase. Therefore, aglycone fraction of *R. undulatum* L. could be applicable to new functional cosmetics.

Keywords: *R. undulatum* L., antioxidative activity, tyrosinase, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

1. 서 론

피부가 노화하는 원인으로 크게 내인성 노화와 광 노화를 들 수 있다[1]. 이 중 시간에 의한 자연적 현상인 내인성 노화를 제외하고, 광범위한 연구가 광 노화에 집중되고 있다[2-4]. 광 노화에 대한 여러 이론들 중 자유 라디칼 반응(free radical theory)에 의해 노화가 진행된다고 주장하는 자유 라디칼 설은 오랜 기간 다양한 연구로 인해 많은 근거가 뒷받침된 이론이다[5-7]. 자유 라디칼 설에 의하면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 방사선, 자외선 등에의 노출, 대기오염 물질, 체내의 생화학적 반응에 의해 생성된다. 이렇게 생성된 ROS는 피부의 많은 조직들을 산화시키고 MMPs 등의 효소 생성을 과발현시켜 피부 구성 물질의 분해를 촉진시킨다. 사람의 피부에는 ROS와 같은 산화적 환경으로부터 자신을 보호하는 항산화 네트워크가 존재하는데, ROS가 과도하게 생성될 경우 이러한 항산화 네트워크를 망가뜨리고 여러 가지 문제를 야기시킨다고 알려져 있다[8-10].

활성산소종은 일반적인 삼중항 상태의 산소($^3\text{O}_2$)보다 반응성이 커서 인체 내의 성분들을 산화시키는 물질로, superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) 등과 이들이 불포화 지방산과 반응하면서 생성되는 peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$), hydroperoxide (ROOH) 등을 포함한다[11,12]. 이러한 활성산소종은 높은 반응성과 산화력으로 피부 조직들을 손상시키면서 노화를 가속화시킨다[13]. 이와 같은 산화적 환경에 노출된 피부에 합성 또는 천연 항산화제를 보충시켜주면, 피부 자체의 항산화 네트워크를 회복시키고, 높은 환원력으로 인해 자신이 먼저 산화되면서 피부 조직을 보호한다. 이 중 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 같은 합성 항산화제들의 경우엔 과량 사용 시 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현재는 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제 개발이 활발하게 이루어지고 있다[14].

대황(*R. undulatum* L.)은 마디풀과(polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 노란빛이 도는 갈색의 뿌리를 건조시켜 약재로 사용한다. 일반적으로 사하, 구어혈, 진통 등 여러 가지 목적으로 사용되고 있다[15]. 대황에 대해서는 다양한 연구[16-20]가 진행되어 왔다. 그 중에는 항산화[16,18]와, 타이로시네이즈 활성 저해에 관한 연구[19,20]도 포함되어 있다. 하지만 각종 ROS가 생성되

는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총항산화능과 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화 작용은 보고되어 있지 않았기에 이에 대한 연구를 통해 좀 더 직접적으로 피부 손상과 연관된 대황의 항산화 능력을 살펴보고자 하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 등 3가지 분획 대한 타이로시네이즈 저해 효과 차이를 살펴보고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH 미터는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

EDTA, 루미놀, 헤파린, 증감제로 사용된 rose-bengal, 자유라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼은 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. 완충용액 제조에 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 , H_2SO_4 , 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), 헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-타이로신과 N-succinyl-(Ala) $_3$ -p-nitroanilide, 효소로 사용된 타이로시네이즈(11.9 mg solid, 4,276 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, 알부틴은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 대황 재료는 2011년 6월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 대황의 분획 및 추출

건조된 대황 100 g을 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 1 h 동안 초음파 추출 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조 후 파우더를 얻었고 이를 실험에 사용하였다. 이 때 수율은 13.65 %로 나타났다. 또한 8 g의 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 헥산은 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 따라서 50 % 에탄올 추출물의 건조 중량당 에틸아세테이트 분획의 수율은 50.49 %로 확인되

었다. 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획을 얻는 과정은 모두 40 °C 이하에서 진행하였다.

에틸아세테이트 분획에서 얻은 파우더 0.2 g을 산 가수분해 반응시켜 당이 제거된 아글리콘 파우더 얻고 실험에 사용하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 파우더를 H₂SO₄ 및 아세톤 용액을 넣고, 70 °C에서 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다. 에틸아세테이트에서 아글리콘으로의 수율은 43.70 %로 얻어졌다.

2.3. 대황 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로 실험에 응용하기 용이한 물질이고, 자유라디칼은 그 높은 에너지로 인해 피부의 여러 물질을 화학적으로 변질시킴으로 피부노화와 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 DPPH를 이용하여 대황 추출물에 대한 자유라디칼의 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해된 0.2 mM DPPH 용액 1 mL, 에탄올 1 mL, 다양한 농도의 대황 추출물 1 mL을 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시간을 주고 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다. 자유라디칼(DPPH) 소거 능력(%)은 다음 식을 통해 계산하였다.

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

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

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 Fe³⁺-EDTA의 촉매 작용으로 ¹O₂만 제외하고 대부분의 ROS (O₂^{•-}, •OH, H₂O₂)가 생성된다. 이렇게 생성된 ROS의 검출은 루미놀을 첨가하여 ROS와 루미놀이 반응할 때 방출되는 화학발광으로 측정할 수 있다. 따라서 이 계를 이용하면 여러 가지 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL와 추출물을 넣고 25 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM 루미놀 80 µL를 넣고 섞어 주었다.

5 min 동안 항온 시킨 후 반응 개시제로서 H₂O₂ (150 mM) 40 µL를 넣고 화학발광기를 이용해 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 제외하고 시료에 해당하는 용매를 넣었고, 공시험(blank)은 ROS를 생성시키는 주요 물질인 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 제외하고 나머지는 실험군과 조건이 동일하게 하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다. 활성산소 저해율(%)은 다음 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4. 광용혈법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 이 실험법을 이용하여 알아볼 수 있다. 무엇보다 사람 피부의 자외선에 의한 노화를 방어할 수 있는 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 사람 유래 적혈구 세포를 이용한다는 점이 실질적이다. 따라서 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 헤파린이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 24 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 대황 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 농도가 다른 대황 추출물을 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 미리 항온배양시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라

필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

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)에 의한 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 대항 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

2.5. 타이로시네이즈 저해활성 측정

기질인 L-타이로신이 최종산물인 멜라닌이 되는 과정에서 가장 중요한 반응은 타이로시네이즈라는 효소가 관여하는 초기의 두 번에 걸친 산화반응이다. 그 이후의 반응은 자발적으로 진행되기 때문에 타이로시네이즈 반응이 전체 반응 속도를 결정하는 단계이다. 따라서 타이로시네이즈의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-타이로신 (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL, 0.1 mL 타이로시네이즈를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 타이로시네이즈 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.6. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 대항 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

(+)- α -Tocopherol, 플라보노이드 등의 항산화제는 지질과산화 반응과 같이 산소 유래 라디칼에 의해 생체막에서 일어나는 여러 가지 손상 반응에서 라디칼에 수

소 주개로 작용하여 산화 반응을 방지하고 지질과산화 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때 수소 원자를 주는 능력을 갖는 항산화제는 환원제로 작용하고 환원력이 클수록 세포막 보호 효과가 크다. 라디칼을 환원하는 항산화제의 능력은 상대적으로 안정한 라디칼 구조를 갖는 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

대항 추출물과 기존에 강력한 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성 측정 결과를 Figure 1에 나타내었다. 결과는 자유라디칼을 50 % 소거하는데 필요한 농도인 FSC_{50} (free radical scavenging concentration)로 나타내었다. 대항의 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC_{50} 이 $19.23 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획은 $18.98 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획은 $19.55 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다. 대항의 에틸아세테이트 분획이 가장 자유라디칼 소거활성이 높은 것으로 나타났고, 그 다음이 50 % 에탄올 추출물, 아글리콘 분획 순서로 나타났지만 오차범위를 고려했을 때 유의할만한 차이가 있다고 보기 어렵다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성은 $8.98 \pm 2.93 \mu\text{g/mL}$ 이다. 이와 같은 데이터에 의하면, 자유라디칼 소거활성에서는 대항의 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획이 비교물질인 (+)- α -tocopherol보다 낮은 활성을 갖는 것으로 나타났다(Table 1). 하지만 이 값은 대두에 많이 포함되어있는 항산화 물질로 잘 알려진 제니스테인(1756.56 ± 10.02)과 비교하였을 때는[21] 월등히 높은 수치로, 대항 추출물에 자유 라디칼 소거 능력이 있음을 확인하였다.

Table 1. Free Radical Scavenging Activities of Extract and Fractions of *R. undulatum* L. and Reference Compounds Using DPPH Method

Compounds	Scavenging activity
	(FSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
Extract and fractions of <i>R. undulatum</i> L.	
50 % EtOH extract	19.23 ± 0.53
Ethyl acetate fraction	18.98 ± 1.03
Aglycone fraction	19.55 ± 0.05
References	
(+)- α -Tocopherol	8.98 ± 2.93
Genistein	1756.56 ± 10.02

3.1.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서는 Fenton 반응에 의해 ROS가 생성되고, 생성된 ROS는 루미놀을 산화시킨다. 산화된 루미놀은 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고, 다시 바닥 상태로 떨어지면서 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 대황 추출물의 총 항산화능에 해당하는 활성산소 소거활성을 Figure 1에 나타내었다. 결과값은 ROS를 50 % 소거하는 농도인 OSC₅₀ (reactive oxygen species scavenging activities)로 나타내었다. 대황 50 % 에탄올 추출물의 OSC₅₀은 2.520 ± 0.010 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 0.335 ± 0.005 µg/mL이고 아글리콘 분획은 0.265 ± 0.015 µg/mL으로 나타났다. 비교물질은 대표적 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 OSC₅₀은 1.50 ± 0.85 µg/mL로 나타났다. 대황의 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획이 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid보다 활성산소 소거활성이 큼을 확인할 수 있었다. 특히 이것은 L-ascorbic acid과 비교하였을 때, 에틸아세테이트 분획의 경우 약 4 ~ 5배, 아글리콘 분획의 경우 약 5 ~ 6배 높은 값으로서 각각의 분획이 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

대황 추출물들이 DPPH 소거능에서는 상대적으로 기준 물질인 (+)-α-tocopherol보다 낮은 효과를 보였지만, 루미놀 발광법을 이용한 계에서는 활성산소 소거 활성이 우수한 것으로 나타났다. DPPH의 경우 단순한 자유 라디칼을 소거하는 능력을 시험하는 반면, 루미놀 발광법을 이용한 계에서는 ¹O₂을 제외한 대부분의 ROS가 생성되기 때문에 다양한 ROS에 대한 환원력을 시험해 볼 수 있는 시험법이다. 또한, Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서의 항산화 메커니즘은 단순한 환원 작용 외에도 킬레이트 작용 등 다양한 메커니즘들이 존재하기 때문에 좀 더 종합적인 항산화 활성을 볼 수 있다. 따라서 대황의 에틸아세테이트와 아글리콘 분획은 자유 라디칼 소거 메커니즘이 아닌 다른 메커니즘을 통해 항산화 능력을 나타낸다고 사료된다.

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

대황 추출물을 이용해서 활성산소에 의해 발생하는 세포 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다.

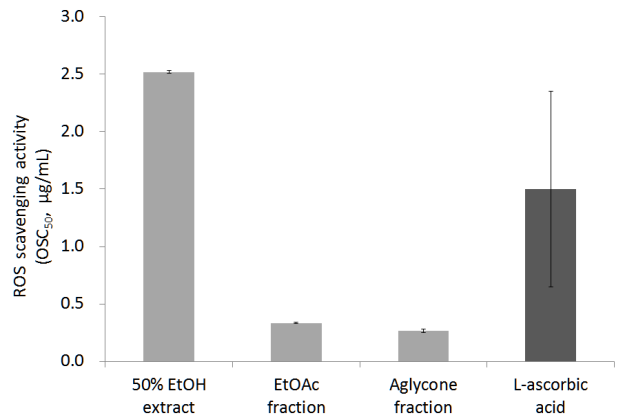


Figure 1. Reactive oxygen species scavenging activities of *R. undulatum* L. extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

대조군으로 시료 또는 기준 물질과 같은 항산화제를 넣어주지 않았을 경우에 rose-bengal로 유도된 ¹O₂ 상에서 적혈구의 τ₅₀을 확인하였다. 대조군은 시료 대신 각 시료에 해당하는 용매를 넣어주고 다른 조건은 실험군과 같게 하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ₅₀이 33 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광 조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

대황 50 % 에탄올 추출물의 경우 τ₅₀이 1, 10, 25 µg/mL의 농도에서 각각 54.8, 271.3, 1282.0 min, 에틸아세테이트 분획의 경우 37.2, 301.4, 1817.0 min, 아글리콘 분획의 경우 106.1, 757.0, 1991.5 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다(Table 2). 10 µg/mL의 농도에서 아글리콘 분획이 가장 우수한 세포 보호 활성을 나타내었고, 에틸아세테이트 분획과 50 % 에탄올 추출물에서는 비슷한 세포 보호 활성을 나타내었다. 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol의 세포 보호 효과는 10 µg/mL의 농도에서 38.0 min로, 대황 추출물들이 (+)-α-tocopherol보다 세포 보호 효과가 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2). 특히 아글리콘 분획은 다른 분획들과 비교하여도 주목할 만한 세포 보호 효과를 나타내었다.

3.3. 타이로시네이즈 저해 활성

멜라닌 생성과정에서 타이로시네이즈는 전체적인 반

Table 2. Cellular Protective Effects of Extracts from *R. undulatum* L. and Reference Compounds on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	τ_{50} (Half time of hemolysis ¹⁾)		
	1	10	50
50 % EtOH extract	54.8 \pm 0.5	271.3 \pm 13.8	1282.0 \pm 44.0
Ethyl acetate fraction	37.2 \pm 0.8	301.4 \pm 2.8	1817.0 \pm 38.0
Aglycone fraction	106.1 \pm 0.2	757.0 \pm 5.0	1991.5 \pm 9.5
(+) - α -Tocopherol	-	38.00 \pm 1.80	-

¹⁾Control, τ_{50} = 33.00 \pm 1.00 min

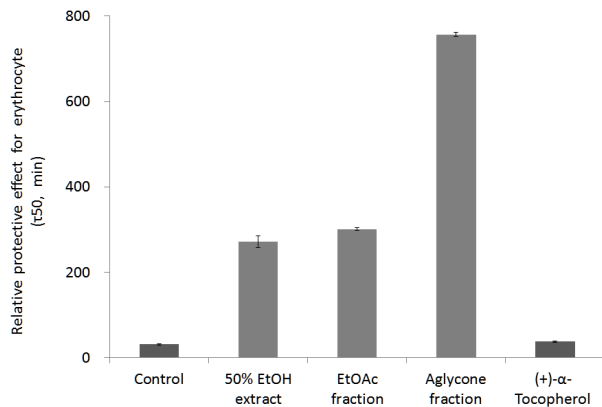


Figure 2. The effects of extract and fractions from *R. undulatum* L. and references at 10 $\mu\text{g/mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 33.00 \pm 1.00 min).

응을 결정하는 효소다. 이 효소는 기질인 L-타이로신을 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA를 DOPAquinone으로 산화시키며 전체적인 반응을 조절한다.

대황의 50 % 에탄올 추출물(108.50 $\mu\text{g/mL}$), 에틸아세테이트 분획(37.72 $\mu\text{g/mL}$), 아글리콘 분획(11.20 $\mu\text{g/mL}$) 모두 대표적인 미백제인 알부틴(226.88 $\mu\text{g/mL}$) 보다 낮은 IC_{50} 값을 나타내었다. 특히 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 알부틴에 비해 각각 약 6배, 20 배 큰 타이로시네이즈 저해활성을 나타내었다(Figure 3). 알부틴은 기능성 미백 화장품에 널리 사용되는 물질이기 때문에 대황 추출물은 미백제로서 화장품에 응용 가능성이 있다고 생각되어진다.

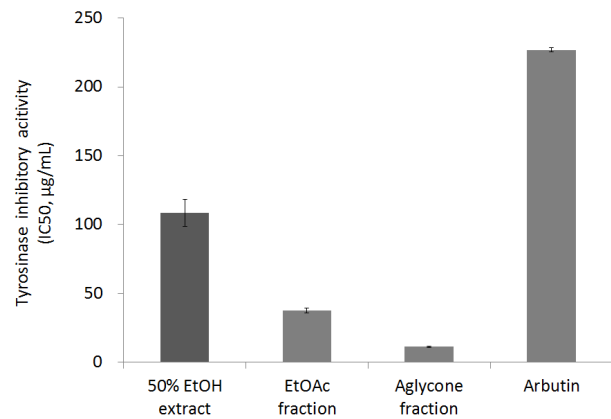


Figure 3. The inhibitory effects of fractions from *R. undulatum* L. and reference on tyrosinase.

4. 결 론

1) 대황 추출물의 자유라디칼 소거활성(FSC_{50}) 측정 결과 에틸아세테이트 분획(18.98 $\mu\text{g/mL}$) > 50 % 에탄올 추출물(19.23 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획(19.55 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다.

2) 대황 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC_{50})은 아글리콘 분획(0.265 $\mu\text{g/mL}$) > 에틸아세테이트 분획(0.335 $\mu\text{g/mL}$) > 50 % 에탄올 추출물(2.520 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났으며, 에틸아세테이트와 아글리콘 분획은 기준 물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$) 보다 뛰어난 활성산소 소거활성을 보였다.

3) 대황 추출물의 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 모든 분획에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 아글리콘 분획의 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 757.0 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다.

4) 대황 추출물의 타이로시네이즈 저해활성(IC_{50})은 아글리콘 분획(11.20 $\mu\text{g/mL}$)과 에틸아세테이트 분획(37.72 $\mu\text{g/mL}$), 50 % 에탄올 추출물(108.50 $\mu\text{g/mL}$)에서 모두 기준물질인 알부틴(226.88 $\mu\text{g/mL}$)보다 높게 나타났다, 특히 아글리콘 분획에서 뛰어난 효과를 보였다.

이상의 결과들로부터 대황 추출물의 항산화 효과 미백 효과를 확인하였다. 대황 추출물 중 특히 아글리콘 분획의 뛰어난 항산화 효과 및 높은 타이로시네이즈 저해 효과가 확인되었고 이는 아글리콘 분획이 화장품원료로서 응용 가능성이 크음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
2. K. Scharffetter-Kochanek, P. Brenneisen, J. Wenk, *et al.*, Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Experimental Gerontology*, **35**(3), 307 (2000).
3. S. Kondo, The roles of cytokines in photoaging, *J. Dermatol. Science*, **23**(1), S30 (2000).
4. H. K. Choi, D. H. Kim, J. W. Kim, S. Ngadiran, M. R. Sarmidi, and C. S. Park, Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation, *J. Biosci. Bioeng.*, **109**(3), 291 (2010).
5. D. Harman, Free radical theory of aging, *Mutat. Res.*, **275**, 257 (1992).
6. B. T. Ashok and R. Ali, The aging paradox: free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, **34**, 293 (1999).
7. A. P. Wickens, Ageing and the free radical theory, *Respiration Physiology*, **128**, 379 (2001).
8. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
9. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti-oxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**, 1 (2002).
10. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
11. J. H. Michael and E. D. Frederick, An epigenetic perspective on the free radical theory of development, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1023 (2007).
12. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
13. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin : Anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 85 (2010).
14. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Activeoxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
15. J. H. Park, The encyclopedia of chinese crude drugs, 180, Shinilbooks Publication, Seoul (2002).
16. S. J. Oh, N. I. Beak, and H. Y. Kim, Piceatannol, antioxidant compound isolated from the root of *Rheum undulatum* L., *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **44**(3), 208 (2001).
17. S. M. Kwon, D. H. Kim, T. H. Chang, M. G. Jeon, I. S. Kim, and I. H. Kim, Screening of antifungal medicinal plants for turfgrass fungal disease control, *Kor. Turfgrass Sci.*, **24**(2), 176 (2010).
18. S. M. Park, G. W. Lee, and Y. H. Cho, Effect of *Rheum undulatum* extract on antioxidant activity and activity of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts, *J. of Life Sci.*, **18**(12), 1700 (2008).
19. J. W. Lee, J. S. Lee, and J. S. Lee, Extraction and characterization of an anti-wrinkle elastase inhibitor from *Rheum undulatum* L., *Korean J. Food & Nutr.*, **21**(2), 143 (2008).
20. J. C. Lee and K. J. Kim, The effect of elastase inhibition and tyrosinase by *Rheum undulatum* stokes extracts, *The J. of Kor. Ori. Med. Oph. & Oto. & Derma.*, **22**(3), 36 (2009).
21. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Koean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).