

약용식물의 Tyrosinase, Hyaluronidase 저해효과 및 항산화 활성

차배천*

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

Tyrosinase, Hyaluronidase Inhibitory Effect and Antioxidant Activity of Medicinal Plants

Bae Cheon Cha*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

Abstract – This study was conducted to investigate tyrosinase inhibitory effect, hyaluronidase inhibitory effect and antioxidant activity by DPPH radical scavenging method on the MeOH extract of 50 species medicinal plant for screening of functional properties. As a result, *Chaenomeles sinensis* Koehne extract among 50 species medicinal plant turned out to be having tyrosinase, hyaluronidase inhibitory effect and antioxidant activity. The major component of tyrosinase and hyaluronidase inhibitory effect was isolated from EtOAc extract of *Chaenomeles sinensis* Koehne. And the component of antioxidant activity was isolated from *n*-BuOH extract of *Chaenomeles sinensis* Koehne. Their structure of compounds were identified as oleanolic acid and (-)-epicatechin by spectroscopic evidence, respectively.

Key words – Tyrosinase inhibitory effect, Hyaluronidase inhibitory effect, Antioxidant activity, Medicinal plant, *Chaenomeles sinensis* Koehne, Oleanolic acid, (-)-Epicatechin

생체 내에서는 필요한 에너지 공급을 위해 생화학적 산화 반응은 끊임없이 일어나며 이 과정에서 항상 발생하는 흔히 유해산소라 불리는 활성산소는 성인병으로 잘 알려진 류머티스성 관절염, 심장병, 파킨슨씨병, 순환기장애, 암 뿐만 아니라 피부 면역 기능을 억제시켜 피부 염증을 유발시키고 주름살 및 기미, 주근깨 등의 피부 노화를 가속화시킨다.^{1,2)} 따라서 활성산소를 조절하는 물질로 알려진 항산화제의 개발과 hydroxylation 또는 산화 환원 반응에 의해 L-tyrosine 을 분해하여 L-DOPA를 거쳐 melanin 색소의 생성에 관여하는 효소인 tyrosinase의 저해에 의해 미백 효과를 발휘하는 tyrosinase 저해제³⁾의 개발은 성인병 예방 및 피부 노화를 억제할 수 있다. 활성산소 이외에도 성인병의 하나인 류머티스성 관절염 등과 같은 염증 발생의 원인에 관여하는 것은 glucuronic acid와 glucosamine이 반복하여 연결된 고분자 다당류인 hyaluronic acid로서 이의 분해효소인 hyaluronidase에 의해 생성되는 저분자의 hyaluronic acid라고 알려져 있다.⁴⁾ 이는 결국 고분자 hyaluronic acid의 분해 효소인 hyaluronidase의 저해에 의해 hyaluronic acid의 고분

자 형태를 유지하게 함으로서 항염증효과를 기대할 수 있다.⁵⁾

따라서 본 연구에서는 자연계 존재하는 다양한 약용식물로부터 미백과 항염증 및 항산화에 관여하는 새로운 기능성 활성 물질 탐색 연구를 위해 50종의 약용식물 MeOH 추출물과 활성을 나타낸 약용식물의 용매별 분획물에 대하여 tyrosinase의 저해에 의한 미백 효과 실험³⁾과 염증 반응을 억제하여 상처 치유 및 조절에 중요한 역할을 하고 있는 고분자 다당류인 hyaluronic acid의 분해에 관여하여 류머티스 관절염 등의 염증을 일으키게 하는 효소인 hyaluronidase의 저해에 의한 항염증 효과를 추정할 수 있는 hyaluronidase 저해 실험⁵⁾ 및 안정한 free radical인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 scavenging 효과에 의해 항산화 효과를 측정할 수 있는 DPPH 항산화 실험⁶⁻⁸⁾을 실시하였고, 미백과 항염증 및 항산화 활성 주성분을 단리 후 화학적 구조 및 활성을 규명하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 약용식물은 강원도 원주에서 시판되고 있는 약용식물을 구입하여 감별 후 음건하

*교신저자 (E-mail): bccha@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0554

고 각 부위별로 분리한 후 세절하여 사용하였다. 이 식물들의 표본은 상지대학교 제약공학과 의약화학실험실에 보관 중이다.

기기 및 시약 - 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, Lipophilic Sephadex-LH 20은 Sigma사, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (ART.5715, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 시약을 사용하였다. Free radical 소거효과 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며, 항산화 효과 대조군인 α -tocopherol, BHA(butylated hydroxyanisole)와 항염증 효과 측정 대조군인 ketoprofen 및 미백 효과 측정 대조군인 ascorbic acid는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 효소 반응을 위한 효소인 hyaluronidase, tyrosinase와 기질인 hyaluronic acid, L-tyrosine과 반응용 시약 및 완충 용액용 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다. 분석용매는 spectrometer용 용매를 사용하고 추출 용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 흡광도는 Milton-Roy spectronic Genesys-5 UV 측정기를 사용하였고, FT-NMR은 Varian Mercury 300MHz를 사용하였다. 용점은 Mettler FP-5 용점측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. 선평도 측정기기로서는 Optical Activity사의 AA-55 Automatic Polarimeter를 사용하여 측정하였다.

추출 및 분획 - 음건 세절한 약용식물 100-200 g에 MeOH 500 ml를 가하여 수욕상에서 3시간 동안 환류 냉각하면서 3회 추출하여 얻어진 MeOH 용액을 농축하여 MeOH 엑스(17.5-106 g)를 얻었다. 모과 분획은 얻어진 모과 MeOH 엑스 45.3 g을 *n*-hexane과 H₂O 1:1로 분배하여 얻어지는 *n*-hexane 용액을 농축하여 *n*-hexane 엑스(1.5 g)를 얻고, 계속하여 잔여 H₂O 층에 EtOAc 용액을 H₂O 층과 1:1이 되게 가한 후 분배하여 얻어지는 EtOAc 용액을 농축하여 EtOAc 엑스(3.6 g)를 얻고, 잔여의 H₂O 층에 *n*-BuOH을 H₂O 층과 1:1이 되도록 가한 후 분배시켜 얻어지는 *n*-BuOH 용액과 H₂O 층을 농축하여 *n*-BuOH 엑스(9.3 g)와 H₂O 엑스(29.2 g)를 각각 얻었다. 분획물 중 가장 우수한 tyrosinase 및 hyaluronidase 저해 활성 효과를 나타낸 EtOAc 엑스(3.0 g)를 CHCl₃ : MeOH = 60 : 1부터 단계적으로 극성을 높인 전개 용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 활성 소분획인 fraction 1 (0.1 g), fraction 2 (1.1 g), fraction 3 (0.2 g) 및 fraction 4 (0.3 g)로 나누었다. Tyrosinase 저해 효과를 나타낸 fraction 2로부터 재차 silica gel column chromatography를 실시하여 tyrosinase 및 hyaluronidase 저해 활성 주성분 화합물 **1**(21 mg)을 분리하였다. 또한 분획물 중 가장 우수한 항산화 효과를 나타낸 *n*-BuOH 엑스(9.0 g)를 CHCl₃ : MeOH = 20 : 1에서 7 : 1로 단계적으로 극성을 높인 용출 용매를 이용하여 silica gel

column chromatography로 정제한 후 다시 MeOH : H₂O = 4 : 6에서 6 : 4로 극성을 높여가는 용매를 사용하여 Lipophilic Sephadex LH-20으로 정제하여 화합물 **2**(37 mg)를 얻었다.

화합물 1 - White powder; m.p : 311-314°C; $[\alpha]_D^{25} = +75.8^\circ$ (c 0.5, CHCl₃); IR(KBr, cm⁻¹) 3451 (OH), 1702 (COOH), 1040 (C-O) ; ¹H-NMR (300 MHz, pyridine-d₅) δ : 5.50(1H, m, H-12), 3.46(1H, m, H-3a), 3.33(1H, dd, *J*=4, 14 Hz, H-18) 1.30(3H, s, H-23), 1.24(3H, s, H-27), 1.06(3H, s, H-24), 1.04(3H, s, H-26), 1.02(3H, s, H-29), 0.97(3H, s, H-30), 0.91(3H, s, H-25); ¹³C-NMR(75 MHz, pyridine-d₅) δ : 180.3(C-28), 145.1(C-13), 122.5(C-12), 78.5(C-3), 56.2(C-5), 48.5(C-9), 47.1(C-19), 47.1(C-17), 42.3(C-18), 42.3(C-14), 40.0(C-8), 39.6(C-4), 39.3(C-1), 37.6(C-10), 34.6(C-21), 33.5(C-29), 33.5(C-22), 33.5(C-7), 31.2(C-20), 29.1(C-29), 28.5(C-15), 28.1(C-2), 26.5(C-27), 23.7(C-30), 23.7(C-16), 23.7(C-11), 19.0(C-6), 17.3(C-26), 16.4(C-24), 15.5(C-25); EI-MS *m/z* 456 [M]⁺

화합물 2 - Light yellow powder; m.p : 235-237°C; $[\alpha]_D^{25} = -21.2^\circ$ (c 0.5, MeOH); UV λ_{max} : 234, 281(MeOH); IR(KBr)cm⁻¹ : 3450(OH), 1467 (aromatic C=C); ¹H-NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ : 2.54(2H, m, H-4), 4.05(1H, t-like, *J*=3 Hz, H-3), 4.75(1H, br. s, H-2), 5.73(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 5.92(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-8), 6.67(2H, br. s, H-5',6'), 6.91(1H, br. s, H-2'); ¹³C-NMR(75 MHz, Acetone-d₆) δ : 157.0(C-9), 156.9(C-5), 156.5(C-7), 144.7(C-3'), 144.6(C-4'), 131.6(C-1'), 118.7(C-6'), 114.8(C-5'), 114.6(C-2'), 99.1(C-10), 95.5(C-6), 95.0(C-8), 78.8(C-2), 66.3(C-3), 28.3(C-4); EI-MS *m/z* 290 [M]⁺

Tyrosinase 저해 활성 측정 - Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome 방법⁹⁾을 이용하여 측정하였다. 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 2.3 ml와 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 ml에 약용식물 MeOH 추출물 및 모과 분획물은 15 mg을 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종 농도가 500 μ g/ml가 되도록 0.2 ml를 가하고, 활성 주성분은 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종 농도가 0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 μ g/ml가 되도록 0.2 ml를 가한 후 mushroom tyrosinase (220 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 37°C 수욕상에서 20분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = [1 - \{(B - C) / (A - D)\}] \times 100$$

여기서 A는 효소만 첨가된 반응 용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액, C는 시료만 첨가된 반응 용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 475 nm에서의 흡광도 값이다.

Hyaluronidase의 저해 활성 측정 - Hyaluronidase 억제

효과는 Rooster Comb에서 형성되는 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정함에 의해 활성을 판단하였다.¹⁰⁾ 0.1 M Acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase(7,900 unit/ml) 50 μ l에 20 μ l의 약용식물 MeOH 추출물 및 모과 분획물 용액(25 mg/ml : 최종농도 125 μ g/ml) 또는 활성 주성분을 DMSO 1 ml에 녹인 후 최종 농도가 0, 50, 125, 250, 500 μ g/ml가 되도록 20 μ l를 가하고, 그리고 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 200 μ l를 혼합한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 시료 용액 대신에 DMSO 용액을 넣고 수욕상에서 20분간 배양하였다. Ca²⁺로 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid(12 mg/5 ml) 250 μ l를 첨가하여 다시 수욕상에서 40분간 배양하였다. 배양 후 0.4 N NaOH 용액 100 μ l와 0.4 M potassium tetraborate 100 μ l를 반응

혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethylaminobenzaldehyde 용액 (p-dimethylaminobenzaldehyde 4 g, 100 % acetic acid 350 ml 및 10 N HCl 50 ml 혼합액) 3.28 ml를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양한 후 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해비율 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition (\%)} = \frac{(\text{ODc} - \text{ODs})}{\text{ODc}} \times 100$$

여기서 ODc는 대조군의 OD(optical density)이고, ODs는 시료 용액의 585 nm에서의 OD값이다.

DPPH 라디칼 소거작용의 측정 - Uchiyama 등⁸⁾의 방법을 약간 변형시킨 Choi⁷⁾와 Yoshikawa 등¹¹⁾의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M의 초산 완충액(pH 5.5, 2.0 ml)에 약용식물 MeOH 추출물 및 모과 분획물들의 용액(2.0

Table I. Tyrosinase inhibitory effect of MeOH extract of medicinal plants

Sample	Inhibitory effect(%)	Sample	Inhibitory effect(%)
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	55.74	<i>Inula japonica</i> Thunberg	63.70
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim	35.87	<i>Lilium lancifolium</i> Thunberg	70.07
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	65.90	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	63.45
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i> Nakai	75.56	<i>Lysimachia christinae</i> Hance	73.99
<i>Acorus gramineus</i> Solander	30.08	<i>Melia azedarach</i> Linne var. <i>japonica</i> Makino	48.77
<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> Hara	45.64	<i>Melia toosendan</i> Sied. et Zucc.	70.23
<i>Amomum villosum</i> Loureiro	65.57	<i>Orostachys japonicus</i> A. Berger	73.56
<i>Angelica gigas</i> Nakai	52.51	<i>Paeonia obovata</i> Max.	66.38
<i>Aristolochia contorta</i> Bunge	54.97	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.	49.67
<i>Aster tataricus</i> Linne fil.	55.71	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	24.80
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	76.30	<i>Plantago asiatica</i> Linne	-37.77
<i>Atractylodes lancea</i> D.C	-95.00	<i>Prunella vulgaris</i> Linne var. <i>lilacina</i> Nakai	54.06
<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	74.79	<i>Prunus nakaii</i> Leveille	54.17
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	80.23	<i>Prunus persica</i> Batsch var. <i> davidiana</i> Maximowicz	10.87
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	48.66	<i>Quisqualis indica</i> Linne	65.52
<i>Codonopsis pilosula</i> Franch	61.34	<i>Raphanus sativus</i> Linne	75.35
<i>Curculigo orchiioides</i> Gaertner	67.57	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	27.87
<i>Dioscorea tokora</i> Makino	51.04	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon	75.10
<i>Dolichos lablab</i> Linne	23.53	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	63.49
<i>Equisetum hyemale</i> Linne	63.27	<i>Smilax china</i> Linne	65.81
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindley	58.54	<i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep.	74.22
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	40.43	<i>Stemona japonica</i> Miquel	61.22
<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	97.51	<i>Thuja orientalis</i> Linne	43.17
<i>Hordeum vulgare</i> Linne	27.79	<i>Trigonella foenum-graecum</i> Linne	59.59
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	55.63	<i>Tussilago farfara</i> Linne	55.00
Ascorbic acid	99.00		

Concentration of samples were 500 μ g/ml.

ml) 및 2×10^{-4} M DPPH EtOH 용액(1.0 ml)을 가하여 전량을 5 ml로 하고 실온에 방치한 후, 30분 후 517 nm에서의 흡광도 감소를 3회 반복하여 측정하였다. 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 (mg)을 tocopherol 및 BHA와 같은 기존의 항산화제를 대조군으로 하여 시험하였다.

결과 및 고찰

약용식물들의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구는 기존에 많은 연구가 활발히 수행되어져 왔다. 예를 들면 최근의 Park 등¹²⁾의 참죽나무 추출물을 필두로 Jeong 등¹³⁾의 감잎 추출물, Koo 등¹⁴⁾의 수종 생약 추출물, Miliauskas 등¹⁵⁾의 생약 및 방향성 식물 등의 약용식물에 대한 항산화 연구가

수행되었으며, 항염증 효과에 대해서는 Han 등¹⁶⁾의 산초 추출물의 항염증 효과, Jeong 등¹⁷⁾의 조구등의 hyaluronidase 저해물질과 Kim 등¹⁸⁾의 약용식물들의 hyaluronidase 저해효과에 대한 연구 보문과 함께 항산화 효과를 가지는 물질들이 항염증 효과를 가질 수 있다는 연구와 연계하여 항산화 효과와 함께 hyaluronidase 저해에 의한 항염증 효과를 가진 물질들을 천연자원으로부터 검토한 연구 결과도 다수 보고되어져 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 또한 항산화 활성과 연계되어 있는 tyrosinase 저해 활성에 의한 미백 효과 탐색에 있어서도 최근의 복분자 추출물의 미백 효과 연구²²⁾ 등 지금까지 많은 연구가 진행되어져 왔으며,²³⁻²⁵⁾ 그 대표적인 화합물로서는 우수한 tyrosinase 저해 활성을 보이는 비타민 C, kojic acid, arbutin, hydroquinone 등의 천연 및 합성 미백제가 개발 연구되어 미백 화장품에 응용되고 있다.²⁶⁾

Table II. Hyaluronidase inhibitory effect of MeOH extract of medicinal plants

Sample	Inhibitory effect(%)	Sample	Inhibitory effect(%)
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	24.28	<i>Inula japonica</i> Thunberg	3.39
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim	5.87	<i>Lilium lancifolium</i> Thunberg	8.09
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	0.50	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	17.17
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i> Nakai	-9.07	<i>Lysimachia christinae</i> Hance	7.30
<i>Acorus gramineus</i> Solander	53.57	<i>Melia azedarach</i> Linne var. <i>japonica</i> Makino	3.37
<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> Hara	2.27	<i>Melia toosendan</i> Sied. et Zucc.	1.44
<i>Amomum villosum</i> Loureiro	11.45	<i>Orostachys japonicus</i> A. Berger	4.12
<i>Angelica gigas</i> Nakai	-1.85	<i>Paeonia obovata</i> Max.	0.31
<i>Aristolochia contorta</i> Bunge	7.22	<i>Patrinia scabiosaeifolia</i> Fisch. ex Trevir.	4.49
<i>Aster tataricus</i> Linne fil.	7.69	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	10.45
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	7.63	<i>Plantago asiatica</i> Linne	-16.58
<i>Atractylodes lancea</i> D.C	-37.3	<i>Prunella vulgaris</i> Linne var. <i>lilacina</i> Nakai	10.51
<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	7.03	<i>Prunus nakaii</i> Leveille	17.69
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	39.82	<i>Prunus persica</i> Batsch var. <i> davidiana</i> Maximowicz	35.41
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	5.28	<i>Quisqualis indica</i> Linne	-1.28
<i>Codonopsis pilosula</i> Franch	0.32	<i>Raphanus sativus</i> Linne	15.54
<i>Curculigo orchiioides</i> Gaertner	-11.12	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	-1.47
<i>Dioscorea tokora</i> Makino	14.33	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon	3.20
<i>Dolichos lablab</i> Linne	4.50	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	3.41
<i>Equisetum hyemale</i> Linne	16.12	<i>Smilax china</i> Linne	9.65
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindley	16.04	<i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep.	-5.56
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	-38.18	<i>Stemona japonica</i> Miquel	3.17
<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	-8.62	<i>Thuja orientalis</i> Linne	0.43
<i>Hordeum vulgare</i> Linne	6.21	<i>Trigonella foenum-graecum</i> Linne	6.34
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb	4.39	<i>Tussilago farfara</i> Linne	16.03
Ketoprofen	60.10		

Concentration of samples were 125 µg/ml.

본 연구는 대부분의 약용식물들에 대하여 항산화 및 항염증 효과 연구가 수행되어져 있음에도 불구하고 아직도 상업적으로 널리 이용되는 항산화제는 BHA 및 BHT와 같은 합성항산화제와 천연항산화제인 tocopherol이 상용되고 있고, 항염증제로서는 ibuprofen과 ketoprofen 등의 합성 약물들이, 그리고 미백제에 있어서도 비타민 C와 kojic acid와 같이 제한적인 물질들만이 상용되고 있음에 주목하여 기 연구된 약용식물 외에 연구가 미진한 약용식물들에 있어서도 강력한 미백효과와 항염증 효과 및 항산화 효과를 가지는 천연자원이 있으리라는 기대 속에 50 종 약용식물에 대하여 미백과 항염증 및 항산화 효과를 검토하였다.

Tyrosinase 저해 효과 - 50 종의 약용식물들의 MeOH 추출물에 대하여 미백활성을 탐색하기 위하여 비타민 C를 대조군으로 하여 tyrosinase의 저해 활성을 실험한 결과 Table

에 나타난 바와 같이 팽이버섯[*Flammulina velutipes* (Curtis) Singer] > 모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne) > 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 순으로 tyrosinase 저해 효과가 나타났으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 비슷하거나 조금 약한 활성을 보였다.

Hyaluronidase 저해 효과 - 50 종의 약용식물들의 MeOH 추출물에 대하여 항염증 효과 여부를 확인하기 위하여 ketoprofen을 대조군으로 하여 hyaluronidase 저해 활성을 실험한 결과 Table II에 나타난 바와 같이 석창포(*Acorus gramineus* Solander) > 모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne) > 개복숭아(*Prunus persica* Batsch var. *dauidiana* Maximowicz) 순으로 활성을 보였으며, 석창포는 대조군으로 사용된 ketoprofen과 비슷한 우수한 효과를 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성 - 50 종의 약용식물들의 MeOH

Table III. Radical scavenging activity of MeOH extracts of medicinal plants on DPPH method

Sample	50% Reduction (mg/ml)	Sample	50% Reduction ^a (mg/ml)
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	0.066	<i>Inula japonica</i> Thunberg	0.036
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim	0.045	<i>Lilium lancifolium</i> Thunberg	0.091
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	0.083	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	0.116
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i> Nakai	0.046	<i>Lysimachia christinae</i> Hance	0.070
<i>Acorus gramineus</i> Solander	0.056	<i>Melia azedarach</i> Linne var. <i>japonica</i> Makino	0.043
<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> Hara	0.085	<i>Melia toosendan</i> Sied. et Zucc.	0.085
<i>Amomum villosum</i> Loureiro	0.066	<i>Orostachys japonicus</i> A. Berger	0.048
<i>Angelica gigas</i> Nakai	0.082	<i>Paeonia obovata</i> Max.	0.040
<i>Aristolochia contorta</i> Bunge	0.072	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.	0.082
<i>Aster tataricus</i> Linne fil.	0.078	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	0.072
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	0.048	<i>Plantago asiatica</i> Linne	0.068
<i>Atractylodes lancea</i> D.C	0.081	<i>Prunella vulgaris</i> Linne var. <i>lilacina</i> Nakai	0.068
<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	0.070	<i>Prunus nakaii</i> Leveille	0.101
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	0.029	<i>Prunus persica</i> Batsch var. <i>dauidiana</i> Maximowicz	0.024
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	0.074	<i>Quisqualis indica</i> Linne	0.077
<i>Codonopsis pilosula</i> Franch	0.090	<i>Raphanus sativus</i> Linne	0.073
<i>Curculigo orchioides</i> Gaertner	0.067	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	0.030
<i>Dioscorea tokora</i> Makino	0.030	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon	0.052
<i>Dolichos lablab</i> Linne	0.086	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	0.041
<i>Equisetum hyemale</i> Linne	0.084	<i>Smilax china</i> Linne	0.022
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindley	0.081	<i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep.	0.083
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	0.093	<i>Stemona japonica</i> Miquel	0.083
<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	0.082	<i>Thuja orientalis</i> Linne	0.115
<i>Hordeum vulgare</i> Linne	0.082	<i>Trigonella foenum-graecum</i> Linne	0.081
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	0.048	<i>Tussilago farfara</i> Linne	0.065
α -Tocopherol	0.020	BHA	0.015

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} mM, 0.079 mg/L) solution.

추출물에 대하여 항산화 효과를 DPPH 법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과 Table III에 나타난 바와 같이 토복령 (*Smilax china* Linne) > 개복숭아(*Prunus persica* Batsch var. *davidiana* Maximowicz) > 모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne) 순으로 합성항산화제인 BHA 보다는 다소 약하나 천연항산화제인 α -tocopherol 보다는 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

이상의 실험 결과 50 종 약용식물 가운데 모과는 가장 강력한 효과는 아니지만 미백과 항염증 효과 및 항산화 활성을 동시에 가지는 유일한 약용식물로 확인되어졌다. 모과 (*Chaenomeles sinensis* Koehne)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽교목의 성숙 과실로서, 한방에서는 기관지염, 폐렴, 천식 인후염 등에 이용하며 진해거담제로서 사용되기도 한다.²⁷⁾ 모과의 성분으로서는 flavonoid 류와 유기산 등이 함유되어져 있는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 이에 모과의 미백과 항염증 및 항산화 활성 주성분이 어떠한 물성의 화합물 인지를 확인하기 위하여 모과의 MeOH 추출물로부터 용매 극성별 분획물을 제조하고, 이들 분획물에 대하여 미백과 항염증 및 항산화 활성 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 보였다.

모과 분획물의 미백과 항염증 및 항산화 활성 - 모과 분획물에 대한 미백 실험의 결과 Table IV에 나타낸 것과 같이 모과의 EtOAc 엑스가 대조군인 ascorbic acid 보다는 약하나 우수한 tyrosinase 저해효과를 보였다. 염증 반응을 유발하는 효소인 hyaluronidase 저해에 의한 항염증 효과 시험에서는 Table IV에 나타낸바와 같이 모과의 EtOAc 엑스가 대조군인 ketoprofen 보다는 약하나 우수한 hyaluronidase 저해효과를 나타내었다. 한편 DPPH 법을 이용한 항산화 실험에서는 Table IV에서와 같이 미백과 항염증 효과와 달리 모과의 BuOH 엑스가 대조군인 합성 항산화제인 BHA 보다는 약하나 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다는 강한 항산화 효과 보였다. 이는 모과가 항산화 효과를 가지고 있다는

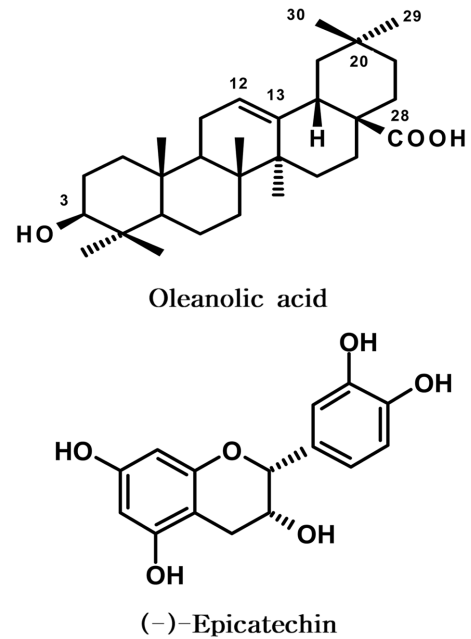


Fig. 1. Structure of compound 1 and compound 2 isolated from *Chaenomeles sinensis* Koehne.

Lee 등²⁹⁾의 결과와 일치하였다.

모과의 미백, 항염증, 항산화 활성 성분 및 활성 - 미백 및 항염증 활성을 나타낸 모과의 EtOAc 엑스로부터 단리된 화합물 1은 Liebermann-Burchard 반응에서 양성을 나타내며 IR spectrum에서 OH와 COOH의 존재를 추정할 수 있으므로 triterpenoid계 화합물로 추정하였다. ¹H-NMR spectrum에 나타낸 것과 같이 δ 0.91-1.30에서 7개의 CH₃기와 δ 5.50에서 olefin methine기가, δ 3.33에서 oleanolic acid의 특징적인 H-18의 signal이 관측되어짐에 따라 기존 문헌치^{30,31)}와 비교 검토한 결과 Park 등³²⁾이 모과의 주성분으로 보고한 미백 효과³³⁾와 항염증 활성³⁴⁾이 알려진 oleanolic acid로 확인하였으며 구조는 Fig. 1에 나타내었다. 항산화 활

Table IV. Tyrosinase, hyaluronidase inhibitory effect and antioxidant activity of 5-class solvent fractions obtained from *Chaenomeles sinensis* Koehne

Sample	Tyrosinase inhibitory effect(%) (500 μ g/ml)	Hyaluronidase inhibitory effect(%) (125 μ g/ml)	Antioxidant activity IC ₅₀ (mg/ml)
MeOH ext.	80.23	39.82	0.029
n-Hexane ext.	40.65	25.65	0.076
EtOAc ext.	89.34	49.33	0.032
n-BuOH ext.	49.65	12.68	0.012
H ₂ O ext.	23.05	11.26	0.064
Ascorbic acid	99.00		
Ketoprofen		60.10	
α -Tocopherol			0.020
BHA			0.015

Table V. Tyrosinase, hyaluronidase inhibitory effect and antioxidant activity of oleanolic acid and (-)-epicatechin obtained from *Chaenomeles sinensis* Koehne

Sample	Tyrosinase inhibitory effect IC ₅₀ (μg/ml)	Hyaluronidase inhibitory effect IC ₅₀ (μg/ml)	Antioxidant activity IC ₅₀ (μg/ml)
Oleanolic acid	291.3	127.6	-
(-)-Epicatechin	-	-	17
Ascorbic acid	35.7	-	-
Ketoprofen	-	104.2	-
α-Tocopherol	-	-	20
BHA	-	-	15

성을 나타낸 모과의 *n*-BuOH 엑스로부터 얻어진 화합물 **2**는 미황색 분말로 FeCl₃ 시험에서 녹색을, 아니스알데히드-황산시액에서 오렌지색을 나타내어 flavan계 물질로 추정되었고, IR에서 수산기가 확인되고 UV에서 벤젠환의 존재를 확인할 수 있었으며, 또한 TLC 및 HPLC 분석에서 표준품과 비교 분석한 결과 (-)-epicatechin임을 추정할 수 있었다. 최종적으로 화합물 **2**의 ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치³⁵⁻³⁷⁾와 비교 분석한 결과 화합물 **2**의 구조는 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 항산화 활성이 알려진³⁸⁾ (-)-epicatechin으로 동정하였다.

모과의 미백과 항염증 및 항산화 활성 주성분으로 단리된 oleanolic acid와 (-)-epicatechin에 대해서도 분획물과 같은 tyrosinase, hyaluronidase 저해 실험과 항산화 실험을 실시한 결과, Table V에 나타낸 바와 같이 미백 효과는 대조군인 ascorbic acid보다는 약한 미백 효과를 나타내었고, 항염증 효과는 대조군인 ketoprofen보다 약하나 우수한 항염증 효과를 보였다. 또한 DPPH법을 이용한 free radical 소거효과는 α-tocopherol 보다는 우수하고 BHA와는 유사한 효과를 나타내었다.

결 론

피부 노화와 같은 다양한 성인병을 예방 치료할 수 있는 미백과 항염증 및 항산화 활성을 가진 천연 물질을 약용식물로부터 개발하기 위한 연구의 일환으로 50종의 약용식물에 대하여 미백과 항염증 및 항산화 효과와 이들 활성 주성분에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. 50종 약용식물의 MeOH 추출물에 대하여 tyrosinase와 hyaluronidase 저해에 의한 미백과 항염증 효과 및 DPPH법에 의한 항산화 활성을 측정된 결과, 모과가 미백과 항염증 및 항산화 활성을 동시에 가지는 약용식물로 판명되었다.

2. 모과의 용매별 분획물에 대하여 미백과 항염증 효과 및 항산화 활성을 측정된 결과 모과 EtOAc 엑스가 미백 및 항염증 효과를 *n*-BuOH 엑스가 항산화 활성을 가짐을 알 수 있었다.

3. 미백과 항염증 효과 및 항산화 활성 주성분을 규명하기 위하여 우수한 미백과 항염증 효과를 나타낸 모과 EtOAc 엑스로부터 활성 주성분인 oleanolic acid를 분리하였고, 항산화 효과를 나타낸 모과의 *n*-BuOH 엑스로부터 (-)-epicatechin을 분리하여 동정하였다.

4. 단리된 oleanolic acid와 (-)-epicatechin는 대조군과 유사 또는 조금 약한 미백과 항염증 및 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되어짐에 따라, 모과에 함유된 이들 활성 성분을 활용하여 피부 노화의 예방 및 치료 등과 같은 다양한 성인병에 이용 가능한 새로운 기능성 천연자원 개발이 가능함을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2009년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Masaki, H. (2010) Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* **58**: 85-90.
- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs* **42**: 569-605.
- Korner, A. and Pawelek, J. (1982) Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**: 1163-1165.
- Meyer, K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* **27**: 335-359.
- Ghosh, P. (1994) The role of hyaluronic acid(hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluids. *Clin. Exp. Rheumatol.* **12**: 75-82.
- Yang, S. W., Park, S. R., Ahn, D. R., Yang, J. H., Cho, C. H., Hwang, Y. H., Park, J. H. and Kim, D. K. (2010) DPPH free radical scavenging effect of the aerial parts of *Desmodium oldhami*. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 180-184.
- Choi, S. S., Yim, D. S. and Lee, S. Y. (2009) Radical scavenging activities and protective effects against oxidative dam-

- age to DNA of extracts from medicinal plants with known osteoprotective effects. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 143-149.
8. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K. (1968) Biochemical studies of physiological function of tocopheronolactone. 1. *Yakugaku Zasshi* **88**: 678-683.
 9. Hearing, J. R. and Hearing, V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase(Tyrosinase) : Purification, properties and reaction catalyzed. *Method on Enzymology* **142**: 154-165.
 10. Lee, N. H., Lee, S. J., Jung, D. S., Bu, H. J., Yang, H. C. and Riu, K. Z. (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 175-180.
 11. Yoshikawa, M., Harada, E., Miki, A., Tsukamoto, K., Liang, S. Q., Yamahara, J. and Murakami, N. (1994) Antioxidant constituents from the fruit hulls of Mangosteen(*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam. *Yakugaku Zasshi* **114**: 129-133.
 12. Park, S. R., Yang, S. W., Ahn, D. R., Yang, J. H., Cho, C. H., Kim, H. Y., Lee, J. H., Park, J. S. and Kim, D. K. (2010) Antioxidant Constituents of the heartwood of *Cedrela sinensis* A. Juss. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 245-249.
 13. Jeong, S. I., Cho, J. K., Mok, J. Y., Kim, S. J., Park, J. M., Jeon, I. H., Kim, H. S. and Jang, S. I. (2010) Antioxidant activity of Persimmon leaves during growth. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 255-263.
 14. Koo, U., Lee, H. J., Lee, D. H., Lee, H. J., Ham, A. R., Cho, E. Y. and Mar, W. C. (2008) Anti-oxidative effect of some plant extracts against nitric oxide-induced oxidative stress on neuronal cell. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 290-294.
 15. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Van-Beek, T. A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **85**: 231-237.
 16. Han, W. and Wang, M. H. (2010) Radical scavenging and anti- inflammation activities from different extracts of *Zanthoxylum schinifolium* fruits. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 250-254.
 17. Jeong, S. J., Ko, Y. S., Ahn, N. H. and Kim, Y. C. (1998) Hyaluronidase inhibitor from *Uncariae ramulus* et *Uncus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 169-172.
 18. Kim, Y. S., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S. and Min, K. R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 265-272.
 19. Cha, B. C. and Lee, E. H. (2004) Antioxidant and antiinflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **12**: 289-294.
 20. Marquina, M. A., Corao, G. M., Araujo, L., Buitrago, D. and Sosa, M. (2002) Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Fitoterapia* **73**: 727-729.
 21. Hanninen, O., Kaartinen, K., Rauma, A. L., Nenonen, M., Torronen, R., Hakkinen, S., Adlercreutz, H. and Laakso, J. (2000) Antioxidants in vegan diet and rheumatic disorders. *Toxicology* **155**: 45-53.
 22. Jeong, H. S., Han, J. G., Ha, J. H., Kim, Y., Oh, S. H., Kim, S. S., Jeong, M. H., Choi, G. P, Park, U. Y. and Lee, H. Y. (2009) Antioxidant activities and skin-whitening effect of nano-encapsuled water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **17**: 83-89.
 23. Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K., Joe, C. E. and Lim, T. Y. (2008) Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem.* **109**: 477-483.
 24. Karioti, A., Protopappa, A., Megoulas, N. and Skaltsa, H. (2007) Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutium* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 2708-2714.
 25. Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B. and Ploypradith, P. (2006) Chemical transformations of oxyresveratrol (*trans*-2,4,3',5'-tetra hydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and strong cytotoxic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 5650-5653.
 26. Maeda, K. and Fukuda, M. (1991) *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**: 361-368.
 27. Lee, C. B. (1982) Forest Economics-mokchogangmok. Korean plant map. 29, Hyangmunsa, Seoul, Korea.
 28. Lee, D. H., Kim, J. H., Kim, N. M., Choi, J. S. and Lee, J. S. (2002) Physiological functionality of chinese quince wine and liquors. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 266-270.
 29. Lee, Y. M., Shin, H. D., Lee, J. J. and Lee, M. Y. (2007) Antioxidative effect of *Chaenomeles Fructus* ethanol extract. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 177-182.
 30. Baek, M. Y., Cho, J. G., Lee, D. Y., Ahn, E. M., Jeong, T. S. and Baek, N. I. (2010) Isolation of triterpenoids from the stem bark of *Albizia julibrissin* and their inhibition activity on ACAT-1 and ACAT-2. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 310-315.
 31. Kim, J. S., Kim, Y. J., Lee, S. Y. and Kang, S. S. (2008) Phytochemical studies on Paeoniae radix (3) - Triterpenoids. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 37-42.
 32. Park, J. C., Lee, J. I. and Ahn, S. D. (1989) Study on the constituents in the fruit of *Chaenomeles sinensis* Koehne. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**: 10-12.
 33. Bae, J. H., Lee, W. W., Suh, K. S. and Kim, S. T. (2000) The effect of oleanolic acid and ursodeoxycholic acid on the pigmentation in the mouse by ultraviolet-B(UVB) irradiation. *Korean J. Investigative dermatology* **7**: 223-229.
 34. Liu, J. (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**: 57-68.
 35. Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T. and Terao, J. (2003) Structure of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin : differences between

- human and rat. *Free Radical Biol. Med.* **34**: 840-849.
36. Berregi, I., Santos, J. I., Campo, G. and Miranda, J. I. (2003) Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ^1H NMR. *Talanta*, **61**: 139-145.
37. Cren-Olive, C., Wieruszkeski, J. M., Maes, E. and Rolando, C. (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by ^{13}C NMR. *Tetrahedron Lett.* **43**: 4545-4549.
38. Cha, B. C., Lee, E. H. and Noh, M. A. (2005) Antioxidant activity of *Spatholobus suberectus* Dunn. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 50-55.
- (2011. 2. 11 접수; 2011. 3. 21 심사; 2011. 3. 21 게재확정)