

야관문 잎 페놀 추출물의 항산화능 및 미백 효과

조은정^{1,2} · 주현미^{1,2} · 정창호^{1,2} · 엄석현³ · 허호진⁴ · 김대옥^{1,2*}

¹경희대학교 식품공학과, ²경희대학교 생명자원과학연구원, ³경희대학교 원예생명공학과, ⁴경상대학교 식품공학과

Effect of Phenolic Extract of Dry Leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on Antioxidant Capacity and Tyrosinase Inhibition

Eun Jung Cho^{1,2}, Hyun-Mi Ju^{1,2}, Chang Ho Jeong^{1,2}, Seok Hyun Eom³, Ho Jin Heo⁴, and Dae-Ok Kim^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

²Institute of Life Sciences and Resources, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

³Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

⁴Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract. *Lespedeza cuneata* G. Don is a plant commonly grown in Asian countries, which has been widely used as an oriental medicinal herb to treat diabetes, diarrhea and various other inflammatory diseases. The phenolics of dry leaves of *L. cuneata* G. Don were extracted by using 80% (v/v) aqueous methanol in assistance with homogenization and sonification. The phenolic extract and its five different fractions (*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, and water) were used to evaluate the levels of total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity as well as the inhibitory effect of tyrosinase activity. Ethyl acetate fraction (1 g) had the highest levels of total phenolics at 240.8 mg gallic acid equivalents (GAE), total flavonoids as 90.4 mg catechin equivalents (CE) as well as antioxidant capacity at 523.4 mg vitamin C equivalents (VCE) on ABTS assay and 329.5 mg VCE on DPPH assay among fractions. One g of water fraction contained total phenolics at 133.1 mg GAE, total flavonoids at 34.5 mg CE, and antioxidant capacity at 333.4 mg VCE for ABTS assay and 313.2 mg VCE for DPPH assay. Inhibition of tyrosinase activity of water fraction at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was at 47.2% and 21.1% for *L*-tyrosine and *L*-DOPA as its substrate, respectively. On the other hand, ethyl acetate fraction at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed tyrosinase inhibition of 10.2% for *L*-tyrosine and 11.9% for *L*-DOPA. These results suggested that the phenolics from dry leaves of *L. cuneata* G. Don may be utilized as a potent source of antioxidants and skin whitening agents.

Additional key words: *L*-DOPA, liquid-liquid extraction, *L*-tyrosine, total phenolics, vitamin C equivalent antioxidant capacity

서 언

피부와 머리카락의 색을 결정짓는 중요한 요소인 멜라닌은 UV광선으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다(Riley, 1997). 하지만 멜라닌의 과도한 형성은 기미, 주근깨와 같은 색소침착 등 균일하지 못한 피부색을 띄게 하고, 피부암과 같은 질병과 주름 발생과 같은 노화의 원인이 되기도 한다. 또한, 식품산업에서는 페놀성 화합물(phenolic phytochemicals)을 함

유한 과채류와 이들의 가공 식품인 음료 등에서 바람직하지 못한 효소적 갈변화 반응을 일으켜 상품의 가치 하락과 영양학적인 손실을 초래하기도 한다(Kim and Uyama, 2005). 멜라닌의 생합성은 tyrosinase에 의해 기질인 tyrosine을 *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine(*L*-DOPA)으로, 이어서 *L*-DOPA를 *L*-DOPA quinone으로 전환되는 것으로 시작하여, 이후 일련의 다양한 산화적 중합 반응을 거친 뒤 멜라닌이 형성된다. Tyrosinase에 의해 tyrosine에서 *L*-DOPA로 대사되는 가

*Corresponding author: DOKIM05@khu.ac.kr

※ Received 24 January 2011; Accepted 24 May 2011. 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원(No. 108037-03-2-CG000)에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사를 드립니다.

역적 산화 반응 과정이 멜라닌 합성의 초기속도결정 단계이며, tyrosinase 외에도 tyrosinase related protein-1(TRP-1), TRP-2와 같은 단백질이 멜라닌 생성에 관여한다. 따라서, 최근에는 멜라닌 합성 억제에 관한 연구로 tyrosinase를 비롯하여 TRP-1, TRP-2 등과 같은 단백질에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(Parvez et al., 2006).

Lespedeza(싸리)속 식물인 야관문은 콩과(Leguminosae)에 속하는 여러해살이 초본이다. 우리나라 곳곳의 산과 들을 비롯하여 일본, 중국, 대만 등지에 널리 분포하며, 황폐지와 절개사면의 지피식물로서 지력을 증진하는데 이용되는 녹화용 식물로 연구되고 있다(Kim and Ryu, 2008; Kwon et al., 2007; Wang et al., 2008). 우리 말로는 ‘비수리’라고 하며 절엽철소추(截葉鐵掃帚), 삼엽초(三葉草), 야계초(野鷄草) 등의 여러 가지 이름으로 불려진다. 지상부는 한약명으로 야관문(夜關門)이라 하는데(Kwon et al., 2007) 밤에 대문 빛장(關)을 열어주는 약초라는 뜻으로 이것을 먹으면 ‘천리 밖에서도 빛이 난다’고 하여 ‘천리광’, ‘큰 힘을 낸다’ 하여 ‘대력왕’ 등으로 지역에 따라 불리기도 한다. 예로부터 민간에서는 간과 콩팥의 기능을 보호하고 천식, 종기, 유방암의 완화와 치료를 목적으로 야관문을 이용하였다(Ahn, 1998). 또한, 당뇨, 남성질환, 양기부족 등에도 뛰어난 효과가 있다고 알려져 있으며(Huang, 1993), 야관문에 의한 성기능 향상이 보고된 바 있다(Chung and Lim, 2005).

야관문의 생리활성물질로서 β -sitosterol, quercetin, kaempferol, pinitol, avicularin, juglanin, trifolin 등이 밝혀졌고(Matsuura et al., 1978), 야관문의 뿌리와 잎에 존재하는 여러 종류의 플라보노이드(flavonoids)가 보고되었다(Numata et al., 1980). 또한, 야관문 종자의 열수 및 에탄올 추출물과 항산화 효과, 야관문의 지상부로부터 분리한 플라본 배당체(flavone glycosides), 야관문에 존재하는 미네랄, 아미노산, 비타민 등에 대해서도 보고된 바 있다(Deng et al., 2007; Ding et al., 2006; Kim and Kim, 2007; Kim and Ryu, 2008; Kwon and Bae, 2009; Kwon et al., 2007).

그러나, 풍부한 천연생물자원으로서 다양한 약리작용과 더불어 여러 생리활성물질을 함유하고 있음에도 불구하고 야관문의 효능에 관한 구체적인 연구는 여전히 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구의 목적은 생약제로 사용되고 있는 야관문의 추출물 및 분획층을 이용하여 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 항산화능을 정량분석하고, tyrosinase 활성 억제능을 비교 평가하여 야관문의 기능성 식품소재로서의 가치를 확인하고, 미백소재로서의 가능성을 평가하고자 하는 것이다.

재료

시험재료는 2007년 9월 하순경 경기도 가평군 설악면 일대와 양평군 서동면 일대의 10년 이상된 도로 절개지에 자생하는 개화 후 결실기의 야생야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don) 잎을 채취하였다. 채취시 야관문의 초장은 약 1m 정도의 성숙한 상태였으며, 생육지의 토양은 마사토로 이뤄졌다. 채취된 잎은 멸균수에서 2회 빠른 세척을 한 후 약 0.5cm 길이로 세절하여 동결 건조하였다. 동결건조된 재료는 분석 실험 전까지 -18°C에서 보관하였다.

시약

본 연구에서는 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), arbutin, ascorbic acid, catechin, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), kojic acid, L-tyrosine, mushroom tyrosinase를 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 2,2'-Azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride(AAPH)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다.

추출 및 분획

야관문 잎으로부터 페놀성 화합물(phenolic phytochemicals)의 추출을 위해 80%(v/v) 수용성 메탄올하에서 균질화(homogenization) 및 초음파(sonication)를 활용한 방법을 사용하였다(Kim and Lee, 2002). 시료(18g)를 80%(v/v) 수용성 메탄올 용액에 넣고 2분간 homogenizer(Polytron RT-2100, KINEMATICA AG, Littau-Luzern, Switzerland)로 15,000rpm에서 균질화하였다. 질소(N₂)가스를 충전시켜 sonicator(Ultrasonic Cleaner ESW-2825B, e-Science, Seoul)에서 20분간 처리 후, Whatman No. 2 여과지(Whatman International Limited, Kent, England)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 여과박(filter cake)을 회수하여 동일 농도의 메탄올 동량을 이용하여 반복추출하였고, 여과된 추출물을 vacuum rotary evaporator(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 분말형태의 고형물을 제조하였다. 분획은 이전의 과정에서 얻은 추출물을 증류수로 현탁한 후에 Fig. 1과 같이 극성이 서로 상이한 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, 물을 이용하여 5개의 층으로 분획하여 같은 방법으로 농축한 후 실험에 사용하였다.

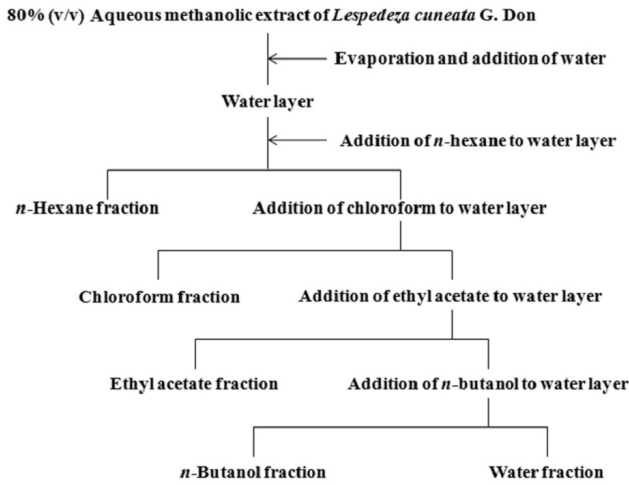


Fig. 1. Procedure of liquid-liquid extraction of whole phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don.

총페놀 함량 분석

총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 이용한 발색법(Singleton and Rossi, 1965)을 변형하여 이용하였다. 추출물 200 μ L에 증류수 2.5mL과 200 μ L의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합 후 6분간 상온에서 반응시켰다. 혼합한 용액에 7% Na₂CO₃ 용액을 2mL를 첨가하였다. 총 90분 동안 반응시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 표준곡선의 검량선을 작성하였다. 야관문 페놀 추출물 및 5개 분획층에 대한 총페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE) \cdot g⁻¹ dry weight(혹은 fraction)으로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 분석

총플라보노이드 함량의 측정은 AlCl₃ 용액을 이용한 발색법(Zhishen et al., 1999)을 이용하였다. 추출물 0.5mL에 증류수 3.2mL를 첨가한 후 5% NaNO₂ 용액 0.15mL을 더하여 5분간 반응시켰다. 이어서 10% AlCl₃용액 0.15mL을 첨가하여 다시 1분간 반응시킨 후 1M NaOH를 넣고 혼합하여 곧바로 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 catechin을 이용하여 만들어진 표준곡선을 이용하였고, 야관문 페놀 추출물 및 5개 분획층의 함량은 mg catechin equivalents(CE) \cdot g⁻¹ dry weight(혹은 fraction)로 나타내었다.

항산화능 측정

ABTS 법. 야관문의 항산화능은 ABTS radical을 이용하여 측정하였다(Kim et al., 2003). 1.0mM AAPH에 2.5mM ABTS와 PBS용액 100mL를 섞어서 70 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 반응시켜 ABTS radical용액을 만들고 완충용액인 PBS 용액을 이용하여 734nm에서 0.650 \pm 0.020의 흡광도로 ABTS

radical용액을 희석하였다. ABTS radical 용액 980 μ L와 시료 20 μ L를 10분간 반응 후 37 $^{\circ}$ C에서 734nm에서 흡광도 감소율을 측정하였다. 야관문 페놀 추출물 및 5개 분획층에 대한 항산화능은 mg vitamin C equivalents(VCE) \cdot g⁻¹ dry weight(혹은 fraction)로 나타내었다.

DPPH 법. DPPH radical 소거능 실험은 Brand-Williams et al.(1995)의 방법을 변형하여 측정하였다. 80%(v/v) 수용성 메탄올을 사용하여 100 μ M의 DPPH radical 용액을 제조한 후에, 이 DPPH radical 용액을 80%(v/v) 수용성 메탄올을 이용하여 517nm에서 0.650 \pm 0.020의 흡광도로 희석하였다. 각 시료 50 μ L와 DPPH radical 용액 2.95mL를 첨가하여 23 $^{\circ}$ C에서 30분간 빛이 차단된 장소에서 반응시킨 후 DPPH radical 감소량을 517nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거능을 통한 야관문 페놀 추출물 및 5개 분획층에 대한 항산화능은 mg VCE \cdot g⁻¹ dry weight(혹은 fraction)로 나타내었다.

Tyrosinase 활성 저해 분석

야관문 추출물 및 각 분획층의 멜라닌 합성 저해능을 평가하기 위해 tyrosinase의 활성을 측정하였다(Mason and Peterson, 1965). L-Tyrosine과 L-DOPA를 기질로 사용하였고 490nm에서 dopachrome의 형성을 확인하여 결과를 나타내었다. Tyrosinase의 기질로 L-tyrosine을 사용하여 hydroxylation 억제 활성을 측정하는 방법은 다음의 과정과 같다. 1.66mM의 L-tyrosine 용액 50 μ L와 300 μ g \cdot mL⁻¹의 야관문 추출액 혹은 각 분획층 50 μ L의 혼합액에 tyrosinase(200unit/mL) 50 μ L를 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 490nm에서 흡광도를 측정한 후 효소활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. 또 다른 기질로 L-DOPA를 사용하여, L-DOPA를 산화시키는 tyrosinase의 활성 저해 측정시, 300 μ g \cdot mL⁻¹야관문 추출액 혹은 각 분획층의 40 μ L와 8.3mM의 L-DOPA 용액 120 μ L의 혼합액에 40 μ L의 tyrosinase(125unit/mL)를 같은 방법으로 첨가하여 효소활성 저해를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해능 평가시, L-tyrosine을 기질로 사용할 경우에는 arbutin(100 μ g \cdot mL⁻¹)을 양성대조구로 하였으며, 반면에 L-DOPA를 기질로 사용했을 때는 kojic acid(100 μ g \cdot mL⁻¹)을 양성대조구로 이용하였다. 방향족 고리에 하나의 hydroxyl기를 갖는 L-tyrosine과 2개의 hydroxyl기를 갖는 L-DOPA산화를 일으키는 tyrosinase의 활성 저해능은 다음과 같은 방법으로 나타내었다.

효소활성 저해(%)

$$= (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

통계처리

모든 실험은 3반복한 결과를 나타내었고, 통계학적 분석은 SAS software(version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였다. 결과의 유의적 차이는 Duncan's multiple range tests에 의해 95%의 신뢰구간에서 검증하였다.

결과 및 고찰

추출 및 분획

본 연구에서는 야관문의 잎에 존재하는 페놀성 화합물(phenolic phytochemicals)을 추출하기 위하여 80%(v/v) 수용성 메탄올을 용매로 사용하였다. 메탄올은 페놀성 화합물을 추출하는데 흔히 사용하는 용매로서, 에탄올보다 끓는점이 낮기 때문에 낮은 온도에서 추출 후 사용한 용매의 제거가 더욱 용이하다는 장점이 있다. 야관문 잎을 80%(v/v) 수용성 메탄올로 추출한 뒤, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, 물과 같이 극성이 서로 다른 용매를 이용하여 용매 분획한 결과는 Table 1과 같다. 추출과 분획의 과정을 거쳐 18g의 야관문 잎으로부터 다섯개 분획물의 무게 합은 평균 4.25g이었으며, 이때 획득한 모든 분획물들의 총수율은 평균 23.6%를 보였다. 각 분획층은 0.19g(*n*-hexane층)에

서 2.68g(물층)의 광범위한 범위에 해당하는 무게 함량을 가졌고, 물층으로 가장 많은 페놀성 화합물이 이동하여 추출 후의 무게(2.68g)와 분획층 습득 총무게 대비 수율(59.8%)이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 야관문에 존재하는 페놀성 화합물들은 비교적 극성이 높아, 물과 같은 높은 극성을 갖는 용매로 이동했다는 것을 의미한다.

총페놀 및 총플라보노이드 함량

야관문의 페놀 추출물과 각 분획층의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Gallic acid를 표준물질로 하여 총페놀 함량을 분석한 결과 1g의 야관문 추출물은 199.4mg GAE의 함량을 가졌고, 각 분획층들은 29.6mg GAE(*n*-hexane층)에서 240.8mg GAE(ethyl acetate층)로 큰 폭의 범위에 해당하는 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났다. Ethyl acetate 분획층에서 유의적으로 가장 높은 함량을 보인 반면, *n*-hexane층에서는 유의적으로 가장 낮은 총페놀 함량을 가졌다. 서로 다른 극성을 갖는 5개 분획층의 총페놀 함량은 ethyl acetate층 > 물층 > *n*-butanol층 > chloroform층 > *n*-hexane층의 순서로 낮아졌다. 분획물의 단위 무게(1g) 당 총페놀 함량은 *n*-hexane층에 비해 ethyl acetate층에서 약 8.1배의 높은 값을 보였다.

Table 1. Fraction weights and yields from fractionation of whole phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don.

Fraction	Weight (g)	Yield (%)
<i>n</i> -Hexane	0.19 ± 0.03 c ^z	3.7 ± 0.5
Chloroform	0.23 ± 0.01 c	5.3 ± 0.8
Ethyl acetate	0.28 ± 0.01 c	6.3 ± 0.4
<i>n</i> -Butanol	1.04 ± 0.17 b	23.1 ± 2.1
Water	2.68 ± 0.20 a	59.8 ± 3.9
Total	4.25 ± 0.35	

^zValues are expressed as mean ± standard deviation of triplicate experiments. The different letters in the same column shows the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 2. Contents of total phenolics and total flavonoids of whole phenolic extract and its solvent fractions of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don.

Sample	Total phenolics (mg gallic acid eq·g ⁻¹)	Total flavonoids (mg catechin eq·g ⁻¹)
Extract	199.4 ± 3.8 ^z	60.4 ± 2.3
Fraction		
<i>n</i> -Hexane	29.6 ± 6.6 cy	47.4 ± 5.2 b
Chloroform	91.8 ± 11.1 b	39.2 ± 4.8 b
Ethyl acetate	240.8 ± 55.9 a	90.4 ± 1.9 a
<i>n</i> -Butanol	125.9 ± 7.3 b	35.3 ± 3.6 b
Water	133.1 ± 38.4 b	34.5 ± 4.1 b

^zValues are expressed as mean ± standard deviation of triplicate experiments.

^yThe different letters in the same column of five different fractions shows the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 3. Contents of antioxidant capacity of whole phenolic extract and its solvent fractions of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don.

Sample	Antioxidant capacity (mg vitamin C eq·g ⁻¹)	
	DPPH ^z	ABTS ^y
Extract	366.8 ± 10.2 ^x	416.6 ± 31.0
Fraction		
<i>n</i> -Hexane	65.8 ± 4.2 c ^w	81.0 ± 7.0 d
Chloroform	130.5 ± 18.9 b,c	177.7 ± 2.0 c
Ethyl acetate	329.5 ± 30.5 a	523.4 ± 46.8 a
<i>n</i> -Butanol	152.2 ± 19.9 b	211.0 ± 14.5 c
Water	313.2 ± 55.5 a	333.4 ± 14.5 b

^z1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl is abbreviated as DPPH.

^y2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt is abbreviated as ABTS.

^xValues are expressed as mean ± standard deviation of triplicate experiments.

^wThe different letters in the same column of five different fractions shows the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

야관문의 총플라보노이드 함량을 분석한 결과는 catechin 을 표준물질로 나타내었다. 총페놀 함량의 결과와 같이 ethyl acetate 분획층 1g의 총플라보노이드 함량은 90.4mg CE로 다른 분획층과 비교하여 유의적으로 가장 높았다. Ethyl acetate 분획층 외에, 각각의 *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol, 물 분획층 1g은 34.5mg CE(물층)에서 47.4mg CE(*n*-hexane층)의 범위의 총플라보노이드 함량을 가졌다(Table 2). 본 연구의 결과는 기발표된 연구(Kim and Kim, 2010)에서와 같이, 야관문 추출물의 ethyl acetate 분획층에서 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량이 가장 높았다는 결과와 일치하였다.

항산화능

야관문의 페놀 추출물과 각 분획층의 항산화능은 DPPH radical과 ABTS radical 소거능을 근거로 평가하였고 결과는 Table 3과 같다. DPPH radical 소거능을 평가한 결과, 페놀 추출물 1g은 366.8mg VCE의 항산화능을 보였다. 각기 다른 극성의 용매를 이용한 야관문의 분획층에 대한 DPPH radical 소거능으로 측정된 항산화능은 ethyl acetate층이 329.5mg VCE로 가장 높은 항산화능을 보였고, 물층은 313.2mg VCE, *n*-butanol층은 152.2mg VCE, chloroform층은 130.5mg VCE, *n*-hexane이 65.8mg VCE의 항산화능을 보였다. 가장 높은 항산화능을 갖는 ethyl acetate층은 가장 낮은 항산화능을 보인 *n*-hexane층에 비해 약 5.0배 정도 높은 값을 보였다.

ABTS radical을 이용하여 항산화능을 평가한 결과는 DPPH radical을 이용한 항산화능 평가법의 결과와 유사한 경향성을 보였다(Table 3). 야관문의 페놀 추출물 1g은 416.6mg VCE를 가졌고, 각 분획층 1g당 항산화능은 ethyl acetate층, 물층, *n*-butanol층, chloroform층, *n*-hexane층의 순서로 각각 523.4mg VCE, 333.4mg VCE, 211.0mgVCE, 177.7mg VCE,

81.0mg VCE를 보였다. DPPH radical 소거능의 결과와 같이, ABTS radical을 이용하여 분석한 경우에서도 ethyl acetate 분획층의 항산화능이 유의적으로 가장 높았으며, 가장 항산화능이 낮은 *n*-hexane층과 비교하여 약 6.5배 정도 더 높은 항산화능을 나타냈다.

위의 연구 결과를 바탕으로 하여, 야관문의 5개 분획층의 총페놀 함량과 항산화능, 총플라보노이드 함량과 항산화능의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 총페놀 함량과 항산화능의 상관 관계에서(Fig. 2A), 총페놀 함량이 높은 분획층에서는 ABTS와 DPPH radical을 효과적으로 소거하여 높은 항산화능을 가졌고, 총페놀 함량이 낮은 분획층에서는 상대적으로 낮은 radical 소거능을 보이는 양의 기울기를 갖는 직선의 상관관계를 보였다. 야관문의 총페놀 함량과 ABTS로 측정된 항산화능의 상관계수(correlation coefficient, r^2)는 0.953이었으며, 반면에 DPPH radical로 측정된 항산화능과 총페놀 함량의 상관계수는 0.741이었다(Fig. 2A). 또한, 각 분획층의 총플라보노이드 함량과 항산화능의 상관관계를 분석한 결과(Fig. 2B)에 의하면 야관문 분획층의 총플라보노이드 함량과 항산화능은 총페놀 함량과 항산화능의 상관관계와 비교시 상대적으로 낮은 상관계수를 보였다. ABTS radical 및 DPPH radical를 이용하여 측정된 항산화능과 총플라보노이드 함량의 상관계수는 각각 0.506(ABTS 분석)과 0.198(DPPH 분석)로 나타났다. 식물체에 존재하는 많은 페놀성 물질들은 항산화능을 보유하여 생체 내의 산화환원 반응에서 free radical을 소거함으로써 다양한 질병들로부터 보호효과를 기대할 수 있으며(Kim and Lee, 2004; Szeto and Benzie, 2002), 본 연구에서와 마찬가지로 이전의 여러 연구들에서도 총페놀 함량과 항산화능 사이에는 양의 기울기를 갖는 1차적 상관관계가 있음이 보고된 바가 있다(Siddiqui

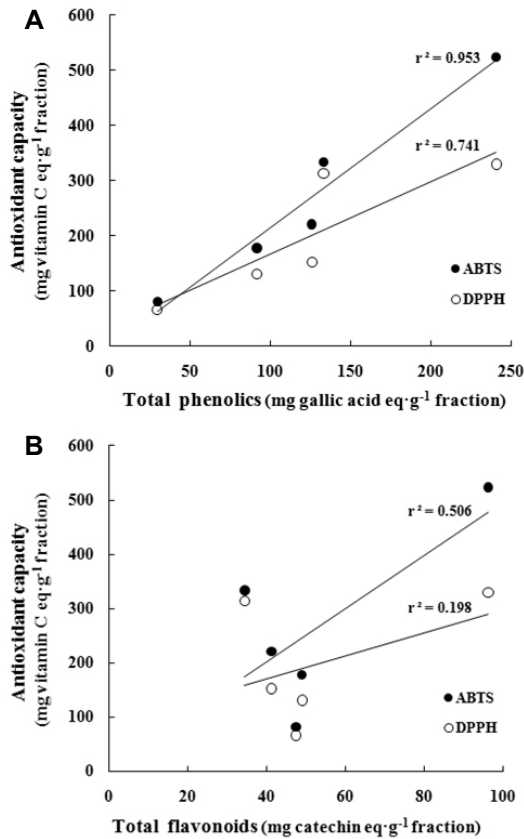


Fig. 2. Correlation between antioxidant capacity and total phenolics (A) and total flavonoids (B) of five different fractions from whole phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don. Antioxidant capacity was measured by using two different radicals like 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

et al., 2004; Vinson et al., 1995).

Tyrosinase 활성 저해 평가

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정의 초기 단계에 관여하는 중요한 효소로서, 산화적 hydroxylation 반응을 통해 기질인 *L*-tyrosine을 *L*-DOPA로 만들고, 이어서 *L*-DOPA를 *L*-DOPA quinone으로 산화시키는 역할을 한다(Kim and Uyama, 2005). 따라서 본 연구에서는, 야관문의 추출물과 각 분획층에 존재하는 생리활성 물질의 미백효능을 평가하고자, tyrosinase의 기질인 *L*-tyrosine과 *L*-DOPA를 이용하여 멜라닌 생성 과정의 초기 단계인 가역적 산화반응에 대한 억제능을 측정하였고 그 결과는 Fig. 3과 같다. 페놀 추출물과 각 분획층들이 *L*-tyrosine에 hydroxylation을 시키는 tyrosinase의 활성 저해능 측정시, 야관문의 페놀 추출물은 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 48.4%의 억제 효과를 보였다(Fig. 3A). 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 동일 농도에서 chloroform 분획층과 물 분획층은 각각 47.4%와 47.2%의 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타내었다. 한편,

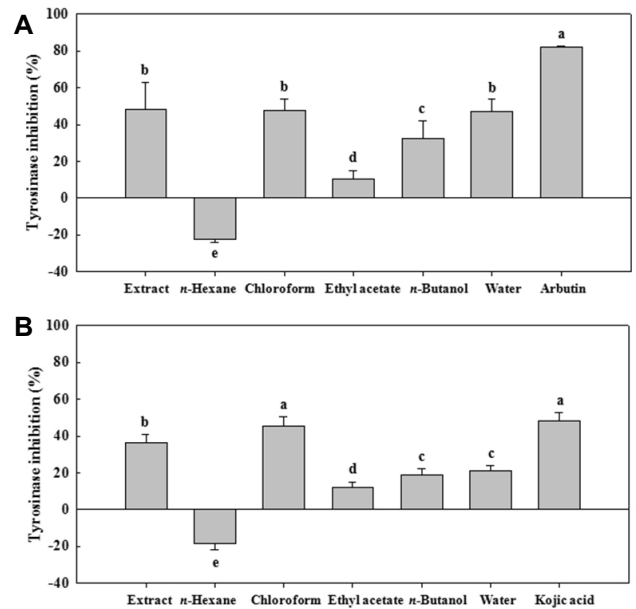


Fig. 3. Inhibitory effects of whole phenolic extract and its five solvent fractions of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on tyrosinase for *L*-tyrosine (A) and *L*-DOPA (B) as substrate. The concentrations of phenolic extract and its five fractions were used at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Arbutin and kojic acid as positive control were used at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *L*-tyrosine (A) and *L*-DOPA (B) as substrates of tyrosinase, respectively. The different letters on bars show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

n-butanol 분획층과 ethyl acetate 분획층은 32.2%와 10.2%의 tyrosinase 활성 저해를 보였다. 하지만, *n*-hexane 분획층에서는 오히려 tyrosinase의 활성을 증가시켜 멜라닌 생성 반응이 촉진되는 결과를 보였다. 양성대조구로 사용한 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 arbutin은 tyrosinase 활성을 약 68.9% 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 상업적으로 사용되는 미백 소재인 arbutin이 tyrosine을 기질로 한 tyrosinase의 산화 반응을 억제하는 기작에서 페놀 추출물 및 각 분획층과 비교하여 유의적으로 높은 효소활성 저해를 보였다.

L-DOPA가 *L*-DOPA quinone으로 산화되는 반응에서 야관문 페놀 추출물이 *L*-DOPA의 가역적 산화반응에 관여하는 tyrosinase 활성 억제 효과를 평가한 결과는 Fig. 3B와 같다. 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 야관문 추출물은 *L*-DOPA의 산화를 약 36.4%의 수준에서 억제하였다. 동일 농도의 chloroform 분획층이 다른 분획층들과 비교하여 약 45.6%의 가장 높은 저해율을 보였다. 하지만, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 물 분획층, *n*-butanol 분획층, ethyl acetate 분획층이 각각 21.1%, 19.0%, 11.9%의 효과를 가졌으며, 이들의 tyrosinase 활성 저해는 chloroform 분획층에 비해서 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. *L*-Tyrosine의 hydroxylation 억제능의 결과와 마찬가지로, *n*-hexane 분획층(300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)을 처리하였을 때,

L-DOPA의 산화 반응 또한 증가시켰고 멜라닌 생성을 가속화 시키는 결과를 보였다. 양성대조구로 100 μ g/mL⁻¹의 kojic acid를 처리했을 때, *L*-DOPA의 가역적 산화에 관여하는 tyrosinase를 약 50.0% 저해하는 효과를 보였다. *L*-DOPA를 tyrosinase 기질로 사용하여 산화 억제능을 평가하는데 주로 양성대조구로 이용하는 kojic acid의 효소 저해능과 비교하여 특히, chloroform 분획층이 유의적 차이를 보이지 않는 수준에서 유사한 효소활성 저해능을 보였다(Fig. 3B).

식물체에 존재하는 페놀성 화합물이 tyrosinase 활성을 저해한다는 사실이 이전의 연구들을 통해 밝혀진 바가 있다(Boissy and Manga, 2004; Sugumaran, 2002). 일반적으로, 페놀성 화합물을 다량으로 함유하는 식물체와 그 추출물은 높은 항산화능을 갖기 때문에, tyrosinase에 의한 가역적 산화반응을 통해 발생하는 물질들은 환원시켜 멜라닌 생합성 반응을 억제시키는 특성을 나타낸다(Kim and Uyama, 2005). 또한, 페놀성 화합물은 tyrosinase의 기질인 tyrosine과 구조적으로 유사하여 기질 유사체의 역할을 함으로써, tyrosinase의 활성을 저해하고 미백효과를 갖는다(Boissy and Manga, 2004). 하지만 페놀성 화합물을 다량 함유하고 있는 식물체가 모두 높은 항산화능과 효과적인 tyrosinase 활성 저해효과를 동시에 갖는 것은 아니다. 이전의 연구들에서도 역시, 상대적으로 높은 페놀성 화합물을 함유하는 자초, 진교, 감초의 경우 free radical을 효과적으로 소거하여 효과적인 항산화제의 특성을 가졌지만, tyrosinase 활성 저해에는 큰 효과가 없었다(Chan et al., 2008; Wang et al., 2006). 본 연구에서도 야관문의 chloroform 분획층은 ethyl acetate 분획층과 *n*-butanol 분획층보다 상대적으로 낮은 총페놀 함량과 항산화능을 가졌지만 더 효과적으로 tyrosinase의 활성을 저해시켰다. 이것은 기질 유사체로서 tyrosinase의 활성을 저해하고 항산화능을 갖는 페놀성 물질들 혹은 다른 유용한 효소활성 저해 성분들의 작용으로 가역적 산화반응이 억제되어 멜라닌의 생성이 저해되었다고 여겨지며, chloroform 분획층에 이러한 성분이 다른 분획층들 보다 더 많이 존재하고 있을 것이라고 생각되어진다.

L-Tyrosine과 *L*-DOPA를 멜라닌 생성의 초기 단계에 관여하는 효소인 tyrosinase의 기질로 한 실험 결과에 나타난 것 처럼(Fig. 3), 야관문의 추출물과 chloroform 분획층은 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제시켰고, 이러한 결과는 야관문 페놀 추출물과 특히 이의 chloroform 분획층이 멜라닌의 합성을 저해할 수 있는 소재로서 활용이 가능하다는 것을 의미한다. 하지만 야관문 추출물과 chloroform 분획층이 멜라닌의 합성을 저해한다는 것을 보다 구체적으로 증명하기 위하여 향후 tyrosinase와 연관된 단백질, mRNA 등의

발현량과 세포 내에서의 멜라닌 생성 억제능에 관해 분자생물학적 수준에서 연구를 해 볼 여지가 남아있다. 아울러, 야관문의 항산화 효과와 미백효과를 좀 더 명확하게 밝히기 위해서는 야관문에 존재하는 개별 생리활성물질의 정제와 정량적 연구가 더 필요하며 현재 이에 대한 연구를 본 연구실에서 진행 중에 있다. 이상의 연구 결과를 통하여 항산화제와 기능성 미백 소재로서 야관문이 잠재적 가능성을 갖는 것으로 확인하였다.

초 록

야관문은 당뇨병, 설사, 여러 염증성 질병의 치료에 널리 이용되어진 약초로서 아시아 지역에서 흔히 자라는 식물이다. 야관문의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능과 tyrosinase 활성 저해능 평가를 통한 미백효과를 연구하고자 80%(v/v) 수용성 메탄올을 이용한 페놀 추출물과 이 추출물로부터 극성이 서로 다른 5개 분획층(*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, 물)의 기능성을 평가하고자 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량을 측정하였고, 아울러 항산화능을 ABTS와 DPPH radical 소거능을 이용하여 정량 평가하였다. 건조 야관문 잎 1g의 추출물은 총페놀 함량이 199.4mg GAE, 총플라보노이드 함량이 60.4mg CE, 항산화능은 416.6mg VCE(ABTS 분석)와 366.8mg VCE(DPPH 분석)을 보였다. 극성이 서로 다른 5개의 분획층에서 ethyl acetate 분획층이 총페놀 함량(240.8mg GAE), 총플라보노이드 함량(90.4mg CE), 그리고 항산화능(523.4mg VCE(ABTS 분석), 329.5mg VCE(DPPH 분석))에서 유의적으로 가장 높은 수준을 가졌다. 멜라닌 생성 초기 단계에서 가역적 산화반응에 관여하는 tyrosinase 활성 억제능을 평가하는 미백 실험에서는 야관문 페놀 추출물과 chloroform 분획층이 tyrosinase를 효과적으로 억제하였다. 본 연구는 야관문에 생리활성을 부여하는 페놀성 화합물의 항산화능 및 미백효과에 관한 기본적인 정보를 제공함과 아울러 기능성 소재로서 활용 가능성을 제시하였다는데 큰 의미가 있겠다.

추가 주요어 : *L*-DOPA, 액상액상추출, *L*-타이로신, 총페놀, 비타민 C 등량 항산화능

인용문헌

- Ahn, D.K. 1998. Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyohaksa Publishing Co., Ltd., Seoul, Korea.
Boissy, R.E. and P. Manga. 2004. On the etiology of contact/occupational vitiligo. Pigment Cell Res. 17:208-214.

- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28:25-30.
- Chan, E.W.C., Y.Y. Lim, L.F. Wong, F.S. Lianto, S.K. Wong, K.K. Lim, C.E. Joe, and T.Y. Lim. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem.* 109:477-483.
- Chung, Y.-H. and C.-H. Lim. 2005. Bioactivity of an extract of *Lespedeza cuneata* G. Don to rabbit corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Agric. Sci.* 32:63-70.
- Deng, F., J. Chang, and J.-S. Zhang. 2007. New flavonoids and other constituents from *Lespedeza cuneata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 9:655-658.
- Ding, J.-L., I.-J. Lim, H.-D. Lee, and W.-S. Cha. 2006. Analysis of minerals, amino acids and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21:414-417.
- Huang, K.C. 1993. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press, LLC, Boca Raton, Florida, USA.
- Kim, D.-O., S.W. Jeong, and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81:321-326.
- Kim, D.-O. and C.Y. Lee. 2002. Extraction and isolation of polyphenolics. p. 11.2.1-11.2.12. In: R.E. Wrolstad (ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Kim, D.-O. and C.Y. Lee. 2004. Comprehensive study of vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:253-273.
- Kim, J.-S. and M.-J. Kim. 2010. In vitro antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. *J. Med. Plant. Res.* 4:674-679.
- Kim, S.-J. and D.-W. Kim. 2007. Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. *Kor. J. Food Preserv.* 14:332-335.
- Kim, Y.-J. and H. Uyama. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1707-1723.
- Kim, Y.H. and S.N. Ryu. 2008. Antioxidant activity of methanol extract from aerial parts in *Lespedeza cuneata* G. Don. *Kor. J. Crop Sci.* 53:121-123.
- Kwon, D.-J. and Y.-S. Bae. 2009. Flavonoids from the aerial parts of *Lespedeza cuneata*. *Biochem. Syst. Ecol.* 37:46-48.
- Kwon, D.-J., J.-K. Kim, Y.-H. Ham, and Y.-S. Bae. 2007. Flavone glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* G. Don. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50:344-347.
- Mason, H.S. and E.W. Peterson. 1965. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 111:134-146.
- Matsuura, S., M. Iinuma, E. Ito, H. Takami, and K. Kagei. 1978. Studies on the constituents of the useful plants. VIII. The constituents of *Lespedeza cuneata* G. Don. *Yakugaku Zasshi* 98:1542-1544.
- Numata, A., K. Hokimoto, and H. Yamaguchi. 1980. C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. *Chem. Pharm. Bull.* 28:964-965.
- Parvez, S., M. Kang, H.-S. Chung, C. Cho, M.-C. Hong, M.-K. Shin, and H. Bae. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 20:921-934.
- Riley, P.A. 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:1235-1239.
- Siddiqui, I.A., F. Afaq, V.M. Adhami, N. Ahmad, and H. Mukhtar. 2004. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. *Antioxid. Redox Signal.* 6:571-582.
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi, Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Sugumaran, M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15:2-9.
- Szeto, Y.-T. and I.F.F. Benzie. 2002. Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo. *Free Radic. Res.* 36:113-118.
- Vinson, J.A., Y.A. Dabbagh, M.M. Serry, and J. Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* 43:2800-2802.
- Wang, C., B. Zhou, and H.L. Palm. 2008. Detecting invasive sericea *Lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) in mid-Missouri pastureland using hyperspectral imagery. *Environ. Manage* 41:853-862.
- Wang, K.-H., R.-D. Lin, F.-L. Hsu, Y.-H. Huang, H.-C. Chang, C.-Y. Huang, and M.-H. Lee. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* 106:353-359.
- Zhishen, J., T. Mengcheng, and W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.