

오이풀 아세톤 추출물을 이용한 용매 분획물의 항산화 효과

김희영¹ · 여신일² · 이진태^{1*}

¹대구한의대학교 화장품약리학과, ²메가젠 임플란트

Antioxidant Effects of Solvent Fraction from *Sanguisorbae officinalis* L. with Acetone

Hui Yeong Kim¹, Shin Il Yeo², and Jin Tae Lee^{1*}

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Republic of Korea

²Megagen Implant Co., Ltd. Gyeongsan, 712-852, Republic of Korea

Received April 4, 2011; Accepted June 1, 2011

The solvent extracts of *Sanguisorbae officinalis* L. were investigated for the activities of antioxidants as a functional ingredient for cosmetic products. The electron donating effect of ethyl acetate layer and *n*-butyl alcohol layer was appeared similar activity with positive control butylated hydroxy anisole (BHA) at all concentrations. In addition, in 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical scavenging assay, ethyl acetate layer, *n*-butyl alcohol layer and water layer were over 99% effect at all concentrations and higher than that of BHA. Also in hydrogen peroxide scavenging assay, ethyl acetate layer and *n*-butyl alcohol layer were higher than that of positive control ascorbic acid. The measured superoxide dismutase (SOD)-like activity of *n*-butyl alcohol was more than 50% at concentration of 1,000 µg/mL and superoxide anion radical scavenging ability showed more than 45% at 1,000 µg/mL of *n*-butyl alcohol layer. All these findings suggested that ethyl acetate layer and *n*-butyl alcohol layer have a great potential as a cosmeceutical ingredient with an antioxidant effect.

Key words: anti-oxidant, hydrogen peroxide, *Sanguisorbae officinalis* L., superoxide dismutase

서 론

사람의 피부는 항산화 방어막으로 구축되어 있지만 지속적인 자외선 노출로 생성된 과잉의 활성산소는 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화막을 파괴시켜 세포의 성분들에 대한 손상을 야기하여 피부의 지질 과산화, 단백질 산화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성 반응 촉진, DNA 산화와 같은 피부 구성성분들의 손상이 일어나 주름 및 기미·주근깨 등의 피부 노화가 가속화 된다[Bailey 등, 1974]. 이러한 활성산소를 제거해 주는 대표적인 항산화제로서 베타-카로틴, 비타민 E, 코엔자임 Q10, 녹차의 카테킨 등이 쓰이고 있으며[Ha, 2001], 이와 같이 천연으로부터 산화반응 및 라디칼의 반응을 억제하는 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다[Larson, 1988; Kasuga, 1998].

오이풀은 중국, 일본, 우리나라 전지역에서 널리 분포하고 있는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 식물로 그 동속 식물의 뿌리를 생약에서 지유(*Sanguisorbae officinalis* L.)라 하고, 산과 들, 특히 산비탈의 습기가 적당한 곳에서 많이 자라는 것으로 알려져 있다. 지유의 약리성분으로는 뿌리에는 tannin, triterpenoid계 saponin이 함유되어 있고 가지에는 quercetin과 kaempferol의 배당체와 ursol 산 등 triterpenoid계 saponin이 함유되어 있으며 잎에는 vitamin C, 꽃에는 chrysanthemine, cyanin이 함유되어 있다[Kang 등, 1994]. 이에 본 연구는 오이풀 아세톤 추출물로부터 chloroform, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol를 사용하여 용매 분획하여 그 용매 분획물의 항산화 효과를 측정하여, 항산화 화장품에 이용 여부를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시료 제조. 오이풀(*S. officinalis* L.) 지상부(3 kg)를 70% acetone에 3일 침지시키고 이것을 3번 반복하여 농축 후 동결 건조한 시료를 다시 chloroform, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol를 이용하여 용매 분획하고 각 분획물을 얻어 이것을 농축, 동결 건조하여 시료를 얻었고, 이를 SC (*S. officinalis* L.

*Corresponding author
Phone: +82-53-819-1430; Fax: +82-53-819-1430
E-mail: jtlee@dhu.ac.kr

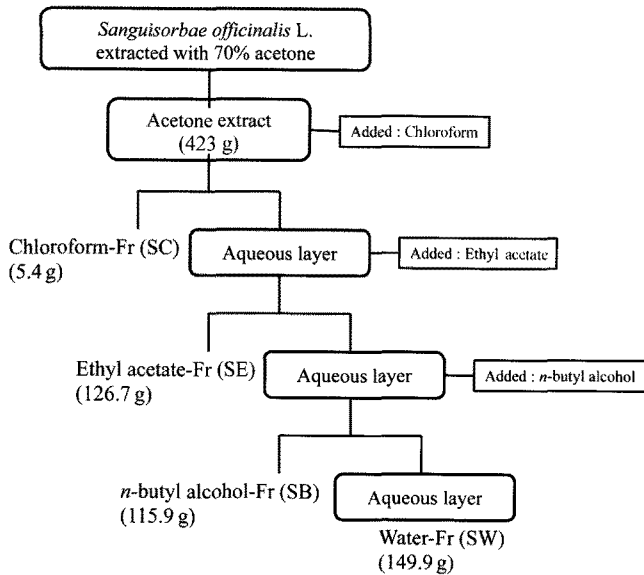


Fig. 1. Purification procedure for the fractions isolated from *S. officinalis* L. SC: Chloroform layer of *S. officinalis* L. extracted with acetone. SE: Ethyl acetate layer of *S. officinalis* L. extracted with acetone. SB: *n*-butyl alcohol layer of *S. officinalis* L. extracted with acetone. SW: Water layer of *S. officinalis* L. extracted with acetone.

chloroform layer), SE (*S. officinalis* L. ethyl acetate layer), SB (*S. officinalis* L. *n*-butyl alcohol layer), SW (*S. officinalis* L. water layer)라 칭했다(Fig. 1).

전자공여능 측정. 전자공여능 측정은 Blois [1958]의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100 μ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 50 μ L 넣고 30분 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) 라디칼 소거능 측정. ABTS 라디칼 소거능 측정은 Roberta 등 [1999]의 방법으로 측정하였다. 시료 100 μ L에 7 mM 2,2'-Azoni-bis(3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.4 mM potassium persulfate의 1:1 혼합시약 100 μ L을 넣고 7분 후 734 nm에서 측정하였다.

$$\text{라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소거능 측정. H₂O₂소거능 측정은 Jayaprakasha 등[2004]의 방법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL에 40 mM H₂O₂ 0.5 mL를 37°C에서 10분간 반응시킨 후 230 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정. SOD 유사 활성은 Marklund와 Marklund [1974]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 0.2 mL에 0.05 M Tris-HCl buffer 2.6 mL과 pyrogallol

0.2 mL을 넣고 37°C에서 10분간 반응을 시킨 다음 1 N-HCl 0.1 mL를 넣어 반응 정지 시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Superoxide anion 라디칼 소거능 측정. Superoxide anion 라디칼 소거능은 Fidovich [1970]의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 용액 0.1 mL과 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL에 0.4 mM xanthine과 0.24 mM nitro blue tetrazolium (NBT)를 녹인 기질액 1 mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.049 U/mL) 1 mL를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 1 N-HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

결과 및 고찰

전자공여능 측정. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 안정한 자유 라디칼로서, 만일 시료가 항산화 활성을 가지고 있다면 DPPH가 갖고 있는 지질산화에 관여하는 자유 라디칼의 비공유 결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, 보라색의 DPPH가 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정시 그 수치도 낮아진다[Ancerewicz 등, 1998]. 오이풀 분획물의 전자공여능 측정 결과 Fig. 2과 같다. 오이풀 ethyl acetate 층과 *n*-butyl alcohol 층은 전 농도에서 대조군인 butylated hydroxy anisole (BHA)와 유사한 활성을 나타내어 높은 활성이 있었고, water 층은 100 μ g/mL에서 81%로 BHA보다는 조금 낮았지만 500-1,000 μ g/mL에서는 BHA와 비슷한 활성을 나타내었다. 그에 비해 chloroform 층은 100 μ g/mL에서 26%, 500 μ g/mL은 48%, 1,000 μ g/mL이 66%로 다른 분획물에 비해 낮은 효과를 나타내었다. Chloroform층을 제외한 나머지 세 분획물인 오이풀 ethyl acetate 층, *n*-butyl alcohol 층, water 층은 대조군인 BHA와 유사한 활성으로 높은 항산화 효과가 있었다.

ABTS 라디칼 소거능 측정. ABTS 라디칼 소거능은 추출물들의 상대적인 항산화효과 측정인 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다. 또한 aqueous phase 모두에 적용이 가능하며 표준물질 사용으로 추출물의 상대비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS[•] free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한다. 오이풀 분획물의 ABTS radical cation decolorization을 측정한 결과 Fig. 3와 같다. 오이풀 ethyl acetate 층과 *n*-butyl alcohol 층은 10 μ g/mL의 농도에서 60% 이상의 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며 50-1,000 μ g/mL에서 대조군인 BHA와 유사한 소거 효과가 있었다. Water 층은 10 μ g/mL에서 38%의 소거능이 있었으며, 50 μ g/mL에서 72%,

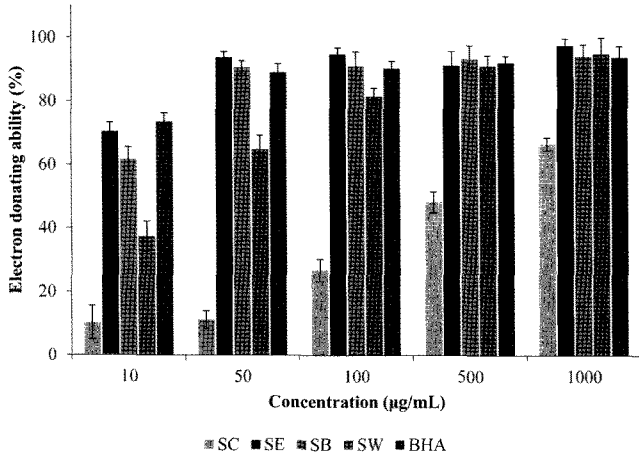


Fig. 2. Electron donating ability of solvent fractions from *S. officinalis* L. BHA: Butylated hydroxyanisole (positive control). Results are means±SD of triplicate data.

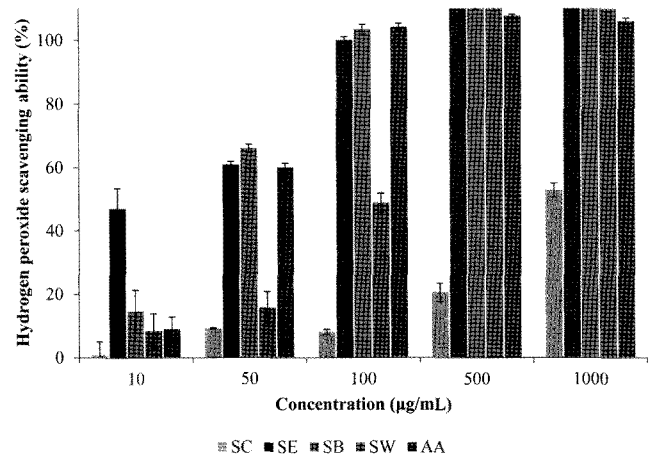


Fig. 4. Hydrogen peroxide scavenging activity of solvent fractions from *S. officinalis* L. AA: Ascorbic acid (positive control). Results are means±SD of triplicate data.

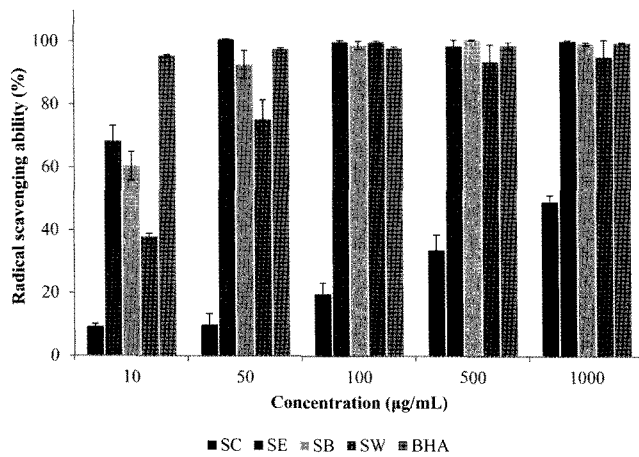


Fig. 3. Radical scavenging activity of solvent fractions from *S. officinalis* L. BHA: Butylated hydroxyanisole (positive control). Results are means±SD of triplicate data.

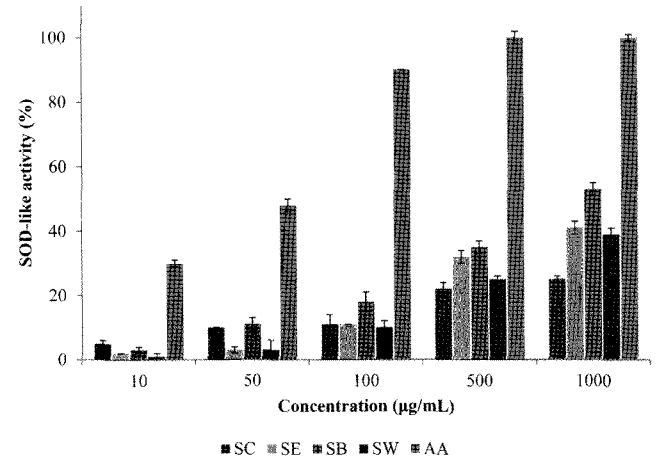


Fig. 5. SOD-like activity of solvent fractions from *S. officinalis* L. AA: Ascorbic acid (positive control). Results are means±SD of triplicate data.

100-1,000 µg/mL에서 BHA와 유사한 결과가 있었으나, chloroform층은 100-1,000 µg/mL의 농도에서 각각 19, 33, 49%의 효과를 나타내어 다른 분획물에 비해 항산화 효과가 낮았다.

H₂O₂ 소거능 측정. H₂O₂는 세포 독성 물질로 체내 각 기관들의 DNA에 심각한 손상을 초래해 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다[Park과 Kang, 2002]. 또한 H₂O₂ 자체의 독성은 낮지만 세포막을 통과할 수 있고, 금속이온과 반응하여 독성이 강한 hydroxyl radical을 생성하기에 생체에서 문제가 되고 있다[Park, 1997; Cho, 1999; Halliwell과 Gutteridge, 1999]. 오이풀 분획물의 H₂O₂ 소거능 결과 Fig. 4과 같다. 오이풀 분획물 중 ethyl acetate 층은 10 µg/mL의 농도에서 45%의 효과를 나타내어 대조군 ascorbic acid와 같은 농도에서 10%보다 아주 우수한 효과를 나타내었으나, 50 µg/mL부터는 ascorbic acid와 유사한 효과를 나타내었다. *n*-butyl alcohol 층은 전 농도에서 대조군인 ascorbic acid보다 효과가 높았고, water 층은 100 µg/mL의 농도에서 48%로 ascorbic acid 보다 효과가 낮았지만 500 µg/mL부터 대조군보다 효과가 높았다. 그러나

chloroform 층은 100 µg/mL에서 8%, 500 µg/mL에서 20%, 1,000 µg/mL에서 52%로 다른 분획물들에 비해 효과가 현저히 낮았다. Ethyl acetate 층과 *n*-butyl alcohol 층이 낮은 농도에서부터 H₂O₂ 소거능이 아주 우수하였다.

SOD 유사 활성 측정. 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응을 촉매로 하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 산소 상해로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다[Klug 등, 1972]. 또한 SOD는 자유 라디칼을 근본적으로 제거하는 효소이고 다른 종류의 항산화제 보다 우수한 효과를 나타내기 때문에 의학제제로서 많은 관심을 일으키고 있으며, 현재 항염증 제제나 피부 노화방지를 위한 미용제제로 화장품 등에 이용되고 있다. 오이풀 분획물의 SOD 유사 활성은 Fig. 5와 같이 분획물 중 ethyl acetate 층과 water 층이 1,000 µg/mL의 농도에서 40% 정도의 효과를 보였고, *n*-butyl alcohol 층은 50% 이상의 효과를 나타내었다.

Superoxide anion 라디칼 소거능 측정. Superoxide anion 라

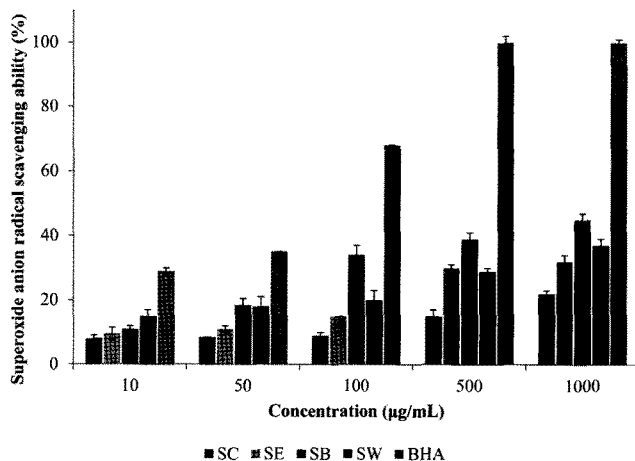


Fig. 6. Superoxide anion radical scavenging ability of solvent fractions from *S. officinalis* L. BHA: Butylated hydroxyanisole (positive control). Results are means±SD of triplicate data.

다칼은 활성산소 중 가장 중요하게 여겨지는데 이는 다른 활성산소의 상당부분이 superoxide anion 라디칼로부터 생성되며 세포손상, 신경세포사멸, 암 및 노화 등을 초래하는 주된 라디칼로 알려져 있기 때문이다[Yoon 등, 2006; One 등, 2009]. Superoxide anion 라디칼 소거능 측정은 xanthine과 xanthine oxidase가 반응하면 $\cdot O_2$ 를 제거할 수 있는 항산화 물질이 존재하면 발색이 저해되는 원리를 이용하였다[Nagai 등, 2002]. 오이풀 분획물의 superoxide anion 라디칼 소거능은 Fig. 6 과 같다. 모든 오이풀 분획물에서 농도의존적으로 superoxide anion 라디칼 소거능을 나타내었으며, 오이풀 분획물 중 *n*-butyl alcohol 층이 100 µg/mL의 농도에서 32%, 500 µg/mL에서 38%, 1,000 µg/mL 44%의 효과를 나타내었다. Chloroform 층과 ethyl acetate 층, water 층은 모두 40% 이하의 효과를 나타내었다.

초 록

오이풀 아세톤 추출물로부터 용매분획물의 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 항산화 효과를 측정한 후 화장품 소재로서의 가능성을 검증하였다. 항산화 효과를 확인하기 위하여 electron donating ability을 측정한 결과 ethyl acetate 층과 *n*-butyl alcohol 층이 전 농도에서 대조군 BHA와 유사한 활성을 나타내었으며, ABTS radical cation decolorization assay 결과 ethyl acetate 층, *n*-butyl alcohol 층, water 층 모두 전 농도에서 99% 이상의 효과를 나타내어 BHA 와 유사하였다. 또한 hydrogen peroxide scavenging assay 결과 ethyl acetate 층, *n*-butyl alcohol 층이 대조군 ascorbic acid 보다 효과가 높았다. Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정 결과, *n*-butyl alcohol 층이 1,000 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 효능이 있었으며, superoxide anion 라디칼 소거능은 *n*-butyl alcohol 층의 1,000 µg/mL에서 45%의 효과가 있었다. 이상의 결과로 미루어 보아 오이풀 아세톤 추출물의 분획물 중 ethyl acetate 층과 *n*-butyl alcohol 층에서 항산화 효과가 있었으며, 새로운 항

산화 화장품의 소재로서 가능성을 확인 할 수 있었다.

Key words: anti-oxidant, hydrogen peroxide, *Sanguisorbae officinalis* L., superoxide dismutase

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

- Ancerevicz, JE, Migliavacca PA, Carrupt B, Testa F, Bree R, Zini JP, Tillernent S, Labidalle D, Guyot AM, Chauvent-Monges CA, and Ridant AL (1998) Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Rad Biol Med* **25**, 113-120.
- Bailey AJ, Robinson SP, and Balian G (1974) Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen, *Nature* **251**, 105-109.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Cho TY (1999) Free radical scavenging activity of tryptophan metabolites. MS Thesis, Yonsei University, Seoul, Korea.
- Fidovich I (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* **245**, 4053-4057.
- Ha BJ (2001) In *Cosmeceuticals*, p. 55, Shingwang Press, Seoul, Korea.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1999) In *Free Radical in Biology and Medicine*, (3rd ed.), Oxford University Press, New York, NY.
- Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, and Sakariah KK (2004) Antioxidant activities of flavin in different *in vitro* model systems. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 5141-5146.
- Kang BS, Ko UC, Kim SH, No SH, Shin YB, Song HJ, Shin MG, Ann DG, Lee SI, Lee YJ, Lee TH, and Ju YS (1994) Collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. In *Herbology*, pp. 392-393, Yonglim Press, Seoul, Korea.
- Kasuga A, Aoyagi Y, and Sugahara T (1998) Antioxidants activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakk* **35**, 22.
- Klug D, Rabani J, and Fridovich I (1972) A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* **247**, 4839-4842.
- Larson RA (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969.
- Marklund S and Marklund G (1974) Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* **47**, 468.
- Nagai T, Inoue R, Inoue H, and Suzuki N (2002) Scavenging capacities of pollen extract from *Cistus Ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. *Nutr Res* **22**, 519-526.
- One T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, Wakatsuki J, Aoki T, Kobayashi C, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, and Maekawa T (2009) Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after

- reperfusion in rats with forebrain inchemia/reperfusion. *Brain Res* **1305**, 158-167.
- Park EJ and Kang MH (2002) Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **35**, 213-222.
- Park SN (1997) Skin aging and antioxidants. *J Soc Cos Chem Korea* **23**, 75-132.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Anath P, Min Y, and Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* **26**, 1231-1237.
- Yoon WJ, Lee JA, Kim JY, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, and Park SY (2006) Anti-oxidant activities and anti-inflammatory effects on *Artemisia scoparia*. *Kor J Pharmacogn* **37**, 235-240.