

생강나무 추출물의 항산화 효과 및 타이로시네이즈 저해 활성

원 두 현 · 한 셋 별 · 황 준 필 · 김 수 지 · 박 진 오* · 박 수 남[†]

서울과학기술대학교 에너지바이오대학 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, *대봉엘에스(주)
(2012년 6월 11일 접수, 2012년 8월 16일 수정, 2012년 12월 24일 채택)

Antioxidative Effect and Tyrosinase Inhibitory Activity of *Lindera obtusiloba* Blume Extracts

Doo Hyun Won, Saet Byeol Han, Jun Pil Hwang, Su Ji Kim, Jino Park*, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, College of Energy and Biotechnology,
Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

*DAEBONG LS

(Received June 11, 2012; Revised August 16, 2012; Accepted December 24, 2012)

요약: 본 연구의 목적은 생강나무 추출물의 항산화 활성과 타이로시네이즈 저해 활성을 살펴봄으로써 화장품 원료로서의 응용 가능성을 확인하는 것이다. 모든 실험은 생강나무의 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획, 아글리콘(aglycone) 분획을 이용하여 진행하였다. 에틸아세테이트 분획의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성은 기존에 잘 알려져 있는 항산화제인 (+)- α -tocopherol 보다 높은 것으로 나타났다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종에 대한 세 분획의 소거활성(총항산화능)은 대표적인 항산화제인 L-ascorbic acid와 비슷한 것으로 나타났다. Rose-bengal로 증감된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 적혈구 파괴에서, 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 세포보호 효과는 농도 의존적(1 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 증가하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 기준으로 비교하였을 때 에틸아세테이트 분획의 τ_{50} 은 361.0 min으로 가장 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 타이로시네이즈 저해활성에서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 알부틴보다 높은 저해 효과를 나타내었다. 이상의 결과들로부터 생강나무 추출물은 활성산소종을 소거하는 항산화제로 여러 산업 분야에 응용 가능할 것이라 생각된다. 또한 알부틴을 대체하는 미백 기능성 소재로서 응용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects and inhibitory activities on tyrosinase of *Lindera obtusiloba* Blume (*L. obtusiloba* Blume) extracts were investigated. 50 % ethanol extract, ethyl acetate and aglycone fractions of *L. obtusiloba* Blume were used in experiments. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities of ethyl acetate fraction of *L. obtusiloba* Blume was higher than (+)- α -tocopherol, known as a typical antioxidant. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities of extract and fractions of *L. obtusiloba* Blume on ROS generated in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system were similar to L-ascorbic acid, well known as a strong antioxidant. The cellular protective effects of 50 % ethanol extract and ethyl acetate of *L. obtusiloba* Blume on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were increased in a concentration dependent manner (1 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ethyl acetate fraction in 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration showed the most protective effect among extracts ($\tau_{50} = 361.0$ min). The inhibitory effects on tyrosinase of ethyl acetate and aglycone fractions were higher than arbutin, known as a whitening agent. These results indicate that *L. obtusiloba* Blume extracts can be used as antioxidant, and could be applicable to functional cosmetic ingredient.

Keywords: *Lindera obtusiloba* Blume, antioxidative activity, tyrosinase, photoaging

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

1. 서 론

최근 기능성 화장품 산업에서 연구가 가장 활발하게 진행되고 있는 분야는 노화 방지와 미백 효능이라 할 수 있다. 피부가 노화하는 데 가장 큰 영향을 미치는 요인으로는 자외선을 꼽을 수 있다[1]. 광 노화에 대한 여러 이론들 중 가장 유력한 이론은 자유 라디칼 설이다. 자유 라디칼 설은 자유 라디칼 반응(free radical theory)에 의해 노화가 진행된다고 주장하는 이론으로 오랜 기간 다양한 연구를 통해 많은 근거가 뒷받침된 이론이다[2-4]. 자유 라디칼 설에 의하면 자외선, 공해와 같은 외부 요인 및 체내의 생화학적 반응과 같은 내부 요인의 영향으로 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다[5-8].

ROS란 높은 산화력을 갖는 산소 종으로 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등과 이들이 불포화 지방산과 반응하면서 생성되는 peroxy radical ($ROO\cdot$), alkoxy radical ($RO\cdot$), hydroperoxide ($ROOH$) 등이 포함된다[9,10]. ROS는 강력한 반응성으로 세포막을 이루고 있는 인지질을 산화시켜 세포를 파괴할뿐만 아니라, MMPs의 발현을 촉진시켜 콜라겐, 엘라스틴 섬유를 분해시킨다. 콜라겐 및 엘라스틴 섬유가 물리적 구조를 유지하지 못하면 피부는 탄력을 나타내지 못하고 결과적으로 주름이 생기게 된다[11-14].

피부에는 이러한 산화적 환경으로부터 자신을 보호하기 위한 여러 가지 항산화 물질이 존재한다. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT)와 같은 효소적 항산화제와, 비타민 C, 비타민 E와 같은 비효소적 항산화제들이 서로 상호보완하며 피부에 항산화 네트워크를 형성한다. 하지만 광증감 반응 등에 의해 과도한 ROS가 생성되면 항산화 네트워크가 붕괴되고 손상을 일어나게 된다[15-17]. 이러한 산화적 환경에서 항산화 물질을 보충하면 피부 손상을 막아주고 항산화 네트워크를 보호할 수 있다. 항산화 연구는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제에 대한 연구로 나누어지는데, 최근에는 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제 연구가 활발하게 이루어지고 있다[18,19].

미백에 관한 연구에서 중요한 요소로 타이로시네이즈 저해활성을 들 수 있다. 멜라노사이트는 기질인 L-타이로신을 사용하여 멜라닌을 생성하는데, 여기에 관

여하는 일련의 과정 중 가장 중요한 반응은 최초 두 번의 산화 반응이다. 이 두 번의 산화 반응 모두에 타이로시네이즈 효소가 관여하기 때문에 타이로시네이즈 저해활성은 미백 효능에 결정적인 역할을 한다[20]. 따라서 본 연구에서 사용한 천연 항산화제가 이러한 산화 반응을 방지하여 멜라닌 합성에 영향을 줄 수 있는지 확인해보았다.

본 연구에서 사용한 생강나무(*L. obtusiloba* Blume)는 약용으로 이용되고 있는 녹나무과 식물이다. 생강나무의 항산화효과와 미백 연구는 일부 진행된 바 있으나[21-24], 피부에서 생성되는 다양한 ROS와 이것이 야기하는 손상들에 대해 초점이 맞춰져 있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 각종 ROS가 생성되는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총항산화능과 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과를 확인하였다. 또한 기존의 생강나무 연구에서는 유효성분의 추출 효율을 높이기 위해서 주로 70 % 에탄올 추출물을 사용하여 단편적인 항산화 효과를 확인하였다. 하지만 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 이용한 다양한 분획 조건에서 항산화 효능을 비교해 보았다. 70 % 에탄올보다 수상의 비율을 높인 50 % 에탄올 추출물과, 유효성분을 정제한 에틸아세테이트 분획을 비교하였고, 이를 통해 수상에 포함된 물질들이 항산화 효과에 미치는 영향을 확인하였다. 이에 더하여, 당을 제거시킨 아글리콘 분획과 에틸아세테이트 분획을 비교함으로써 유효물질 구조에서 당의 유무가 항산화 효과에 미치는 영향을 확인하였다. 이와 같은 다양한 분획 조건을 이용하여 항산화 및 타이로시네이즈 저해 효과 실험을 진행하였다.

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) 제품을 사용하였고, 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) 제품을 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Che-

mical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl, H₂SO₄, 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), *n*-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약으로 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 생강나무 재료는 2011년 6월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 생강나무의 분획 및 추출

건조된 생강나무 100 g을 50 % 에탄올 1.6 L에 넣고 24 h 동안 침적시켜 추출한 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조시켜 파우더를 얻었고 수율은 3.79 %가 얻어졌다. 이렇게 얻어진 50 % 에탄올 추출물 파우더의 질반은, 물과 헥산을 이용한 분액과정을 거쳐 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 50 % 에탄올 추출물의 건조중량당 에틸아세테이트 분획의 수율은 10.95 %로 확인되었다. 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획을 얻는 과정은 모두 20 ~ 40 °C 온도 조건에서 진행하였다.

에틸아세테이트 분획에서 얻은 파우더 중 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 증탕 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 13.40 %로 얻어졌다.

2.3. 생강나무 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

메탄올에 용해된 0.2 mM DPPH 용액 1 mL, 에탄올 1 mL, 생강나무 추출물 1 mL을 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 반응시간이 지난 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 넣지 않고 10 min 후에 흡광도를 측정하여 라디칼 소거가 이루어지지 않았을 때의 값을 측

정하였다. 공시험(blank)으로 DPPH를 용매로 대체한 후 흡광도를 측정하여 517 nm에서 시료와 용매의 영향을 보정해주었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는 데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μ g/mL)로서 표기하였다. 자유라디칼(DPPH) 소거 능력(%)을 계산하는 데 사용한 식은 다음과 같다.

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

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

증류수 1.78 mL, 시료 50 μ L, 25 mM EDTA 40 μ L, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L, 및 35 mM 루미놀 80 μ L를 화학발광 측정용 튜브에 넣고 섞어 주었다. 5 min 동안 상온에서 유지시킨 후 Fenton 반응 개시제로서 H₂O₂ (150 mM) 40 μ L를 넣고 화학발광기를 이용해 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 제외하고 해당 용매로 대체하였다. 공시험(blank)은 ROS를 생성시키는 주요 물질인 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 제외하고 나머지는 실험군과 동일한 조건으로 진행하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는 데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μ g/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

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

건강한 성인 남녀로부터 채혈한 후 헤파린이 첨가된 시험관에 넣었다. 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/mL이다.

2.4.2. 생강나무 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL에 시료 50 μ L를 첨가한 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시켰다. 광증감제인 rose-bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 15 min 동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm \times 20 cm \times 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 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하여 암반응(post-incubation)에 의한 적혈구의 파괴 정도를 확인하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 상온에서 진행하였다. 생강나무 추출물의 세포 보호 효과는 post-incubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

2.5. 타이로시네이즈 저해활성 측정

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 혼합하여 vortexing하였다. 37 $^{\circ}$ C 항온 조건에서 10 min 동안 반응시킨 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 타이로시네이즈 활성을 50 % 감소시키는 데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생강나무 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

자유라디칼은 홀전자를 갖는 반응성이 높은 화학종이다. 피부에서 생성되는 ROS에는 hydroxyl radical (\cdot OH)과 같은 라디칼종이 포함되어 있다. 이렇게 생성된 라디칼은 높은 반응성으로 인해 피부의 여러 구성물질과 반응함으로 조직 손상을 야기한다. (+)- α -Tocopherol과 같은 항산화제는 피부에 존재하면서 지질과산화 반응과 같이 산소 유래 라디칼이 일으키는 여러 가지 손상 반응으로부터 조직을 보호한다. 이러한 항산화 물질들은 라디칼에 수소 주개로 작용하여 산화

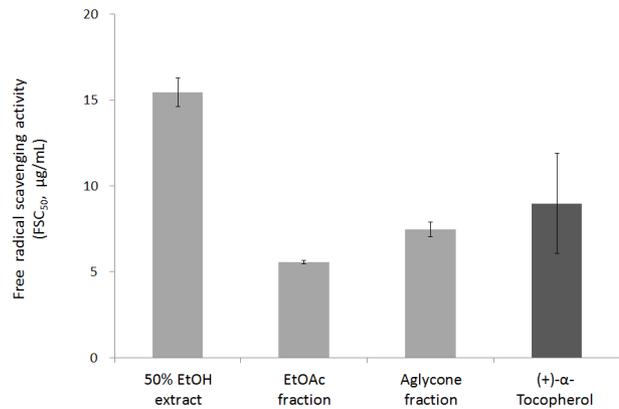


Figure 1. Free radical scavenging activities of extracts of *L. obtusiloba* Blume and (+)- α -tocopherol.

반응을 방지하고 라디칼로 야기된 지질과산화 연쇄반응을 종결시킨다. 따라서 항산화제의 환원력이 클수록 세포막 보호 효과가 커진다. 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력은 DPPH를 이용해 알아볼 수 있다. DPPH는 상대적으로 안정한 자유라디칼이기 때문에 실험에 많이 응용되는 산화제이다. DPPH 소거 반응을 이용하여 생강나무 추출물에 대한 자유라디칼의 소거활성을 측정하였다.

피부를 보호하는 대표적 항산화제인 (+)- α -tocopherol과 생강나무 추출물의 자유라디칼 소거활성을 Figure 1에서 비교하였다. 그래프는 자유라디칼을 50 % 소거하는 데 필요한 농도인 FSC₅₀ (Free radical scavenging concentration)로 나타내었다. FSC₅₀은 생강나무 50 % 에탄올 추출물인 경우 15.46 \pm 0.83 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획은 5.55 \pm 0.11 μ g/mL, 아글리콘 분획은 7.48 \pm 0.43 μ g/mL으로 나타났다. 이와 같은 결과값들을 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (FSC₅₀ = 8.98 \pm 2.93 μ g/mL)과 비교해 보았다. 50 % 에탄올 추출물은 (+)- α -tocopherol보다는 낮았지만 상당한 라디칼 소거 효과를 보여주었다. 아글리콘 분획은 (+)- α -tocopherol과 비슷한 정도의 높은 라디칼 소거능을 가진 것으로 확인하였다. 에틸아세테이트 분획은 (+)- α -tocopherol보다 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. 위의 결과를 통해 (+)- α -tocopherol을 대체하는 라디칼 소거제로서 생강나무의 에틸아세테이트 분획이 사용될 수 있음을 확인하였다.

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

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서는 Fe과 H₂O₂에 의해 Fenton

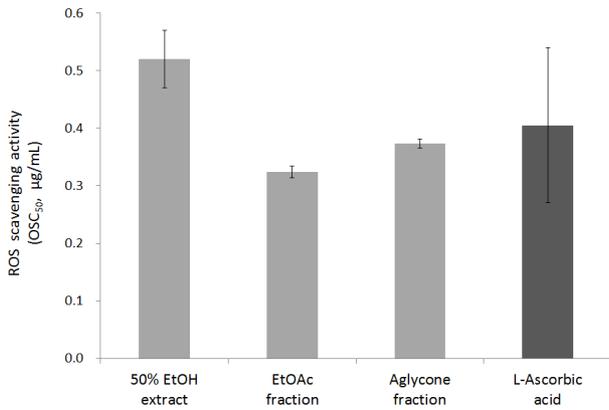


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of *L. obtusiloba* Blume extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

반응이 일어난다. Fenton 반응에서는 ¹O₂을 제외한 대부분의 ROS (O₂^{•-}, •OH, H₂O₂)가 생성된다. 피부에서도 Fenton 반응이 일어나 주변 조직에 손상을 가하기 때문에 다양한 ROS에 대한 항산화 능력을 측정하는 것은 큰 의미를 갖는다. 본 실험에서는 루미놀 발광법을 이용하여 여러 가지 ROS에 대한 총항산화능을 측정하였다. 루미놀은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되고 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된다. 아미노프탈산은 다시 바닥상태로 떨어지면서 발광(420 ~ 450 nm)을 하기 때문에 이를 이용하여 ROS의 소거능을 측정하였다.

생강나무 추출물의 총 항산화능 실험 결과를 Figure 2에 나타내었다. 데이터는 ROS를 50% 소거하는 농도인 OSC₅₀ (Reactive oxygen species scavenging activities)로 나타내었다. 생강나무 50% 에탄올 추출물의 OSC₅₀은 0.52 ± 0.05 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 0.32 ± 0.01 µg/mL, 아글리콘 분획은 0.37 ± 0.01 µg/mL로 나타났다. 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid은 체내에 존재하는 대표적인 수용성 항산화제다. L-Ascorbic acid의 OSC₅₀은 0.41 ± 0.14 µg/mL로 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 실험에 사용한 생강나무의 추출물과 분획 모두 L-ascorbic acid와 유사한 높은 ROS 소거 능력을 갖는 것으로 확인하였다.

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

활성산소에 의한 세포손상 모델로 사람 적혈구와 광

증감 반응을 사용하였다. 피부에 존재하는 여러 가지 광증감제에 자외선이 조사되면 광증감 반응이 일어나며 빠르게 ¹O₂과 ROS들을 생성한다. ¹O₂은 반응성이 매우 큰 ROS로서 세포 막 구성성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 연쇄반응을 개시시킨다. 이렇게 개시된 연쇄 반응은 세포를 파괴시켜 피부의 노화를 촉진시킨다. 이외에도 다양한 ROS가 부가적으로 생성되면서 세포의 형태를 유지시켜주는 단백질을 산화하면서 세포 용해를 유도한다. 따라서 해당 실험을 통해 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화, 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 알아볼 수 있다. 생강나무 추출물과 (+)-α-tocopherol로 실험을 진행하였고, 결과 값은 적혈구 세포가 50% 파괴되는 데 걸리는 시간 (τ₅₀)으로 표시하였다. 이 값은 시료의 세포 보호 활성이 클수록 높게 나타난다.

대조군으로 시료를 넣어주지 않고 혈구만 존재할 때의 τ₅₀을 확인하였다. 대조군은 시료 대신 각 시료에 해당하는 용매를 넣어주고 다른 조건은 실험군과 같게 하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ₅₀이 30 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.

생강나무 50% 에탄올 추출물의 경우 τ₅₀이 5, 10, 25 µg/mL의 농도에서 각각 62.5, 124.1, 308.8 min, 에틸아세테이트 분획의 경우 141.9, 361.0, 757.2 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다(Table 1). 반면에 아글리콘 분획의 경우 99.0, 155.2, 94.6 min으로 10 µg/mL 농도 이상에서 더 낮은 세포 보호 효과를 나타내었다. 25 µg/mL보다 더 높은 농도인 50 µg/mL에서의 τ₅₀을 확인해 본 결과 22.9 ± 0.8 min으로 대조군보다 더 빨리 세포가 파괴되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 보아 아글리콘 분획은 고농도에서 세포 독성을 가지는 것으로 예상된다.

10 µg/mL 농도를 기준으로 각각의 분획과 (+)-α-tocopherol의 τ₅₀을 비교하였다(Figure 3). 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획은 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol (τ₅₀ = 38.0 ± 1.8 min)보다 각각 약 3.3배, 9.5배, 4.1배 높은 세포보호 효과를 나타내었다. 특히 세포 손상을 막는 주요 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 9배가 넘는 높은 세포보호 효과를 나타낸 에틸아세테이트 분획은 응용가능성이 매우 클 것으로 보인다.

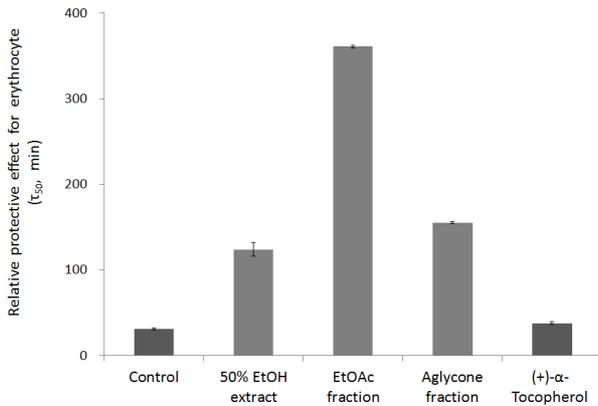


Figure 3. The cellular protective effects of extract and fractions from *L. obtusiloba* Blume and references at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 30.0 ± 1.0 min).

3.3. 타이로시네이즈 저해 활성

기질인 L-타이로신이 멜라닌이 되는 과정 중 결정적인 반응은 타이로시네이즈라는 효소가 관여하는 초기의 두 번에 걸친 산화반응이다. 이 두 번의 산화반응이 끝나면 후속 반응이 자발적으로 일어난다. 따라서 타이로시네이즈가 관여하는 반응이 전체 반응 속도를 결정하게 된다. 이러한 이유로 타이로시네이즈의 저해활성은 미백활성을 측정하는 데 매우 중요한 요소이다. 본 연구에서 생강나무의 추출물 및 분획과 대표적인 미백제로 알려져있는 알부틴의 타이로시네이즈 저해활성을 비교해보았다(Figure 4). 데이터는 타이로시네이즈 활성을 50% 저해하는 농도인 IC₅₀ (inhibitory concentration)으로 나타내었다.

생강나무 50% 에탄올 추출물의 IC₅₀은 297.0 ± 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 에틸아세테이트 분획은 147.9 ± 9.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 아글리콘 분획은 172.1 ± 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 50%

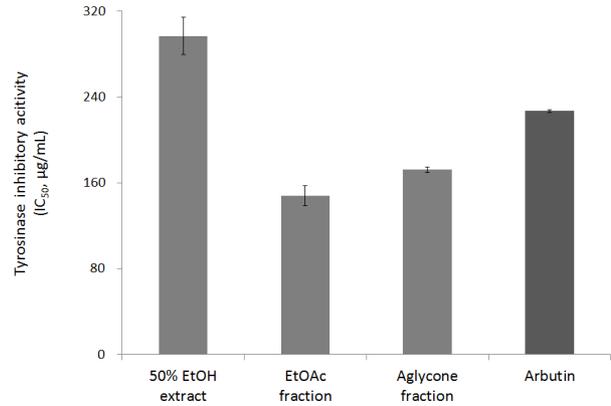


Figure 4. The inhibitory effects of fractions from *L. obtusiloba* Blume and reference on tyrosinase.

에탄올 추출물은 비교물질로 사용한 알부틴(226.9 ± 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 낮은 타이로시네이즈 저해활성을 나타냈다. 반면에 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 알부틴에 비해 각각 약 1.5배, 1.3배 높은 타이로시네이즈 저해활성을 나타내었다. 따라서 생강나무의 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 미백 기능성 원료로서 화장품에 응용될 가능성이 있다고 보여진다.

4. 결 론

1) 생강나무 추출물의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과 에틸아세테이트 분획(5.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 아글리콘 분획(7.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > (+)- α -tocopherol (8.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 50% 에탄올 추출물(15.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 순서로 나타났다. 따라서 에틸아세테이트와 아글리콘 분획은 (+)- α -tocopherol보다 높은 라디칼 소거 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

Table 1. Cellular Protective Effects of Extracts from *L. obtusiloba* Blume and Reference Compounds on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)		
	5	10	25
50 % EtOH extract	62.5 ± 1.5	124.1 ± 8.0	308.8 ± 7.8
Ethyl acetate fraction	141.9 ± 5.2	361.0 ± 1.8	757.2 ± 23.3
Aglycone fraction	99.0 ± 0.9	155.2 ± 1.3	94.6 ± 2.6
(+)- α -Tocopherol	-	38.00 ± 1.80	-

¹⁾Control, $\tau_{50} = 30.0 \pm 1.0$ min

2) 생강나무 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(0.32 µg/mL) > 아글리콘 분획(0.37 µg/mL) > L-ascorbic acid (0.41 µg/mL) > 50 % 에탄올 추출물(0.52 µg/mL) 순서로 나타났다. 하지만 세 분획 모두 L-ascorbic acid보다 유의할 만큼 높은 총항산화능을 보이지 못하였다. 하지만 L-ascorbic acid는 매우 강력한 항산화 능력을 가진 물질이기 때문에 이와 유사한 소거활성을 보여준 생강나무 추출물도 상당히 높은 활성산소 소거활성을 갖는다고 볼 수 있다.

3) 생강나무 추출물의 ¹O₂으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과 실험에서 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 농도 의존적으로 증가하였다. 하지만 아글리콘 분획은 10 µg/mL 이상의 농도에서 점점 세포보호 효과가 감소하는 것으로 보아 고농도에서 세포 독성을 갖는 것으로 보인다. 10 µg/mL 농도를 기준으로 에틸아세테이트 분획의 τ₅₀은 361.0 min으로 매우 높은 세포 보호 활성을 나타내었다.

4) 생강나무 추출물의 타이로시네이즈 저해활성(IC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(147.9 µg/mL) > 아글리콘 분획(172.1 µg/mL) > 50 % 에탄올 추출물(297.0 µg/mL) 순서로 확인되었다. 이 중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 기준물질인 알부틴(226.88 µg/mL)보다 높게 나타났다.

이상의 결과들로부터 생강나무 추출물의 항산화 효과 미백 효과를 확인하였다. 진행된 모든 실험에서 에틸아세테이트 분획이 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 생강나무의 에틸아세테이트 분획은 뛰어난 항산화 효과 및 높은 타이로시네이즈 저해 활성을 갖는 화장품원료로서 응용 가능성이 있음을 보고한다.

참 고 문 헌

1. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
2. D. Harman, Free radical theory of aging, *Mutat. Res.*, **275**, 257 (1992).
3. B. T. Ashok and R. Ali, The aging paradox: free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, **34**, 293 (1999).
4. A. P. Wickens, Ageing and the free radical theory, *Respiration Physiology*, **128**, 379 (2001).
5. A. Klaus and H. Heribert, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373 (2004).
6. D. J. Kang, S. H. Song, C. H. Kim, S. K. Lee, and C. B. Kang, Production of reactive oxygen species and nitric oxide by anticancer agents in rat polymorphonuclear leukocytes, *J. Vet. Clin.*, **26**(1), 8 (2009)
7. T. Florence, G. F. Beatriz, and K. Lester, Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates, *Free Radic. Biol. Med.*, **35**(4), 327 (2003)
8. H. J. Jee, H. J. Kim, A. J. Kim, Y. S. Bae, S. S. Bae, and J. Yun, UV light induces premature senescence in Akt1-null mouse embryonic fibroblasts by increasing intracellular levels of ROS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**, 358 (2009)
9. J. H. Michael and E. D. Frederick, An epigenetic perspective on the free radical theory of development, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1023 (2007).
10. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
11. H. J. Lee, G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. don extracts, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(1), 63 (2011).
12. S. Y. Kim, D. H. Won, M. S. Lim, and S. N. Park, Cellular protective effect and component analysis of *Euphorbia humifusa* extracts, *Kor. J. Pharmacogn.*, **41**(4), 264 (2010).
13. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation, *Biomed. & Pharmacother.*, **53**, 181 (1999).
14. S. Valentina, M. Soren, M. Britta, B. Sascha, B. Alexander, B. Jurgen, and J. Marina, Aging of different avian cultured cells: Lack of ROS-induced damage and quality control mechanisms, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 48 (2010).
15. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
16. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and

- anti of oophorectomized rat : oxidative stress and antioxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**, 1 (2002).
17. 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).
 18. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai., Active oxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
 19. C. H. Choi, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. N. Park, Antioxidative effect of extracts from different parts of *Juncus effusus* L., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(3), 275 (2012).
 20. J. C. Cho, H. S. Rho, Y. H. Joo, S. M. Ahn, D. H. Won, S. S. Shin, Y. H. Park, K. D. Suh, and S. N. Park, The depigmenting activities of hydroxyl carboxamide derivatives containing hydrophobic moiety, *Bull Korean Chem. Soc.*, **33**(4), 1333 (2012).
 21. C. Y. Bang, E. K. Won, K. W. Park, G. W. Lee, and S. Y. Choung, Antioxidant activities and whitening effect from *Lindera obtusiloba* BL. extract, *Yakhak Hoeji*, **52**(5) 355 (2008).
 22. K. J. Park, S. H. Park, and J. K. Kim, Anti-wrinkle of *Lindera obtusiloba* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(4), 317 (2009).
 23. S. H. Kim, J. H. Son, and S. H. Lee, Inhibitory effects of water extract of *Lindera obtusiloba* on the mast cell-mediated allergic inflammation, *Kor. J. Pharmacogn.*, **40**(3), 233 (2009).
 24. Y. J. Lee, Pharmacological properties of *Lindera obtusiloba*, Ph. D. Dissertation, Woosuk Univ., (2011).