

## 비파엽 추출물의 항산화 효능과 성분분석

김수지·박진오\*·박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실 화장품종합기술연구소, \*대봉엘에스(주)  
(2011년 11월 30일 접수, 2011년 12월 15일 수정, 2011년 12월 20일 채택)

### Antioxidative Effect and Component Analysis of *Eriobotrya japonica* Leaf Extracts

Su Ji Kim, Jino Park\*, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D Center,  
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea,  
\*DAEBONG LS

(Received November 30, 2011; Revised December 15, 2011; Accepted December 20, 2011)

**요약:** 본 연구에서는 비파엽 추출물의 항산화 활성, 타이로시네이즈 저해 활성, 및 추출물/분획의 성분 분석에 대한 연구를 수행하였다. 비파엽 추출물의 자유라디칼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물(22.63 µg/mL) < 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획(6.75) < 당을 제거시킨 아글리콘(aglycone) 분획(5.06) 순으로 증가하였다. 루미놀(luminol)-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 총항산화능은 에틸아세테이트 분획(OSC<sub>50</sub>, 0.75 µg/mL), 아글리콘 분획(0.79) 및 50 % 에탄올 추출물(1.61)에서 모두 큰 활성을 나타내었다. 비파엽 추출물의 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 보호효과를 조사하였다. 비파엽 추출물은 모든 분획에서 농도 의존적(5 ~ 50 µg/mL)으로 증가하였으며, 특히 에틸아세테이트 분획은 10 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub>이 390.8 min, 50 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub>이 1471.5 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 타이로시네이즈 저해 활성(IC<sub>50</sub>)은 에틸아세테이트 분획(75.25 µg/mL) < 50 % 에탄올 추출물(74.1 µg/mL) < 아글리콘 분획(43.35 µg/mL) 순으로 미백제로 알려진 알부틴보다 타이로시네이즈 저해활성이 크게 나타났다. 비파엽 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 TLC 분석 결과 7개의 띠(EJL 1 ~ EJL 7)가 나타났다. HPLC로 아글리콘 분획을 분석한 결과 kaempferol 및 quercetin이 각각 53.7 % 및 46.3 %였으며, 따라서 추출물 중에는 kaempferol 및 그 배당체 비율이 다소 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 비파엽 추출물 또는 분획이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 및 다른 ROS를 소거 또는 소광함으로써 그리고 ROS에 대항해서 세포막을 효과적으로 보호함으로써 태양 자외선에 노출된 피부를 보호하는 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 타이로시네이즈 저해 효과로부터 비파엽 추출물 및 분획물은 기능성 화장품 원료로서 응용가능성이 있음을 시사한다.

**Abstract:** In the present study, the antioxidative properties, inhibitory activity on tyrosinase, and active components of *Eriobotrya japonica* (*E. japonica*) leaf extract were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>) of extract/fraction of *E. japonica* leaf was in the order 50 % ethanol extract (22.625 µg/mL) < ethyl acetate fraction (6.75) < deglycosylated aglycone fraction (5.06). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of fraction/extract on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system using the luminol-dependent chemiluminescence assay were investigated. OSC<sub>50</sub> of the ethyl acetate fraction, deglycosylated aglycone fraction, and ethanol extract were 0.75, 0.79, and 1.61 µg/mL, respectively. The cellular protective effects of *E. japonica* leaf extract on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The protective effects of extract/fraction of *E. japonica* leaf were increased in a concentration dependent manner (5 ~ 50 µg/mL). Especially, τ<sub>50</sub> of ethyl acetate fraction at concentrations of 10 µg/mL and 50 µg/mL showed the most protective effects at 390.8 min and 1471.5 min. The inhibitory effect (IC<sub>50</sub>) on tyrosinase of *E. japonica*

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

leaf extracts was higher than arbutin, known as a skin-whitening agent. The order of inhibitory effects was acetate fraction (75.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 50 % extract (74.1) < deglycosylated aglycone fraction (43.35). TLC of the ethyl acetate fraction showed 7 bands (EJL 1 ~ EJL 7). HPLC of the aglycone fraction exhibited 2 peaks, kaempferol and quercetin. The amounts of kaempferol and quercetin were 53.7 and 46.3 %, respectively. Therefore, The amounts of kaempferol and its glucoside were a little bit higher than quercetin and its glucoside in *E. japonica* leaf extract. Accordingly, these findings suggest that extracts/fractions of *E. japonica* leaf can function as antioxidants in biological systems, especially skin exposed to UV radiation, and protect cellular membranes against ROS. Thus, the extract/fraction of *E. japonica* leaf may be used in novel functional cosmetics as antioxidants against skin photoaging.

**Keywords:** *Eriobotrya japonica*, skin, antioxidant, component analysis, reactive oxygen species

## 1. 서 론

최근 의학의 발달로 인한 평균 수명의 연장과 높아진 경제 수준으로 인해 일반인들의 건강한 피부와 용모에 대한 관심은 나날이 증대되고 있다. 특히, 젊고 건강한 피부에 대한 욕구가 커짐에 따라 피부 노화에 대한 관심도 높아지고 있다. 피부 노화의 가장 큰 원인으로서는 자외선에 의한 광노화를 들 수 있다. 자외선에 의해 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. ROS는 자외선 노출뿐만 아니라, 흡연, 공해, 약물 등에 의해서도 생성되고, 그 종류로는 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) 등과 위의 것들이 불포화 지방산과 반응하여 생성되는 alkoxy radical ( $\text{RO}\cdot$ ), peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ ) 등이 있다[1-4].

생체 내에서 반응성이 큰 활성산소종이 생성되고 정상적 과정을 통해 소거되지 않는다면 피부 항산화제의 파괴, 단백질 산화, DNA 산화, 지질 과산화 반응의 개시, 콜라겐과 같은 결합조직 성분의 사슬절단 및 비정상적인 교차 결합 등이 일어나 주름생성이나 멜라닌 생성 과정이 일어나게 된다[5]. 이러한 과정과 함께 생체막은 손상을 입게 되고 과산화지질이나 산화 생성물이 축적되어 피부 노화가 가속화된다[6-9].

한국·일본·중국 등지에 주로 분포되어 재생하는 비파엽은 장미과인 비파나무(*Eriobotrya japonica* Lindley)의 잎을 말하며 항염, 항산화, 항돌연변이 그리고 항암 효과 등 그 효능이 우수하여 전통 약재로서 널리 사용되어 왔다[10,11]. 비파엽의 성분으로는 quercetin, ursolic acid, oleanolic acid, tannin, chlorogenic acid, caffeoyl-quinic acid 등이 보고되어 있다[12-14].

비파엽 추출물의 활성에 대한 연구로는 항균활성, 항산화, 아질산염 소거 및 항돌연변이 효과와 항암효과 등이 보고되어 있으며 식품 재료로서의 연구 또한 이루어

지고 있다[15]. 최근, 생체 내 염증 관련 인자 발현에 미치는 비파엽 추출물의 영향에 관한 연구[16,17], 항산화 및 항염증 활성[18,19]에 관한 연구들이 일부 보고되고 있다. 하지만 비파엽 추출물이나 성분들을 대상으로 한 화장품에의 응용 연구는 아직 미흡한 실정이다. 특히 비파엽 추출물을 이용한 각종 ROS가 발생하는  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계에서의 총항산화능에 대한 연구나 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화 작용에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 비파엽 추출물과 분획을 이용하여 이들의 항산화 효능을 확인하고 미백과 관련이 있는 타이로시네이즈 활성 저해 효과를 측정함으로써 비파엽 추출물이 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다. 또한 강력한 항산화제인 플라보노이드 성분 중 비파엽 추출물에는 어느 성분이 많이 들어 있는지 확인하기 위해 비파엽 추출물에 대한 성분 분석을 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

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

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였

다. 완충용액제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ , 그리고 trizma base,  $\text{HCl}$ , 에탄올( $\text{EtOH}$ ), 메탄올( $\text{MeOH}$ ), 에틸아세테이트( $\text{EtOAc}$ ) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine, 효소로 사용된 tyrosinase (1881 mg solid, units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 비파엽(*Eriobotrya japonica* leaf) 성분 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60  $\text{F}_{254}$  (0.2 mm)로 Merck (USA)사에서 구입하였고, HPLC는 Dionex 사의 제품을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 비파엽은 2011년 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

## 2.2. 비파엽의 분획 추출

건조된 비파엽 50 g을 50 % 에탄올 1 L에 침적시킨 후 초음파 추출을 이용해 2 h 동안 추출하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

에탈 아세테이트 분획 중 일부는 산 가수분해 반응을 이용해 당을 제거시킨 후 얻은 아글리콘 파우더를 실험에 사용하였다. 아글리콘 제조 방법은 에틸아세테이트 분획 가용분 일정량에  $\text{H}_2\text{SO}_4$  및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨 후 그 용액을 5 %  $\text{KOH-MeOH}$  용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 증류수로 산, 염기 및 당 등을 제거한 후 다시 에틸아세테이트로 추출하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. 비파엽 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

자유라디칼은 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 따라서 비파엽 추출물에 대한 자유라디칼 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하여 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 방치 후 분광광도계로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군으로 하여 아래의 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한

시료의 농도(free radical scavenging activity,  $\text{FSC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )로서 표기하였다.

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

### 2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

$\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계에서는  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA의 촉매 작용으로  $^1\text{O}_2$ 를 제외한 대부분의 ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )가 생성된다. 그리고 루미놀은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광을 하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 생성된 ROS의 검출은 루미놀을 첨가하여 ROS와 루미놀이 반응할 때 방출되는 화학발광으로 측정할 수 있다. 그러므로 이 계를 이용하면 여러 가지 ROS에 대한 총 항산화능을 알 수 있다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물과 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu\text{L}$  및 5 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 35 mM 루미놀 80  $\mu\text{L}$ 를 넣은 다음 흔들어 섞어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣는다. 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  40  $\mu\text{L}$ 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험은 시료군과 조건이 동일하나  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity,  $\text{OSC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )로 표기하였다.

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

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 하여 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 측정 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합하다고 볼 수 있다. 이 실험방법은 사람 적혈구 세포를 이용해 자외선에 의한 피부 노화를 방지할 수 있는 천연물 추출물을 탐색하는 데 있어서 실질적이라고 볼 수 있다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상

**Table 1.** TLC Mobile Phase for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *E. japonica* Leaf

Eluent system	
Ethyl acetate fraction	Ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)
Aglycone fraction	Hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)

으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정 할 수 있다.

#### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

#### 2.4.2. 비파열 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 압소에서 30 min 동안 미리 항온배양 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu\text{M}$ ) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

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 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 비파열 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여

비교하였으며, 상대적인 광용혈 보호 효과는 아래와 같이 나타내었다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

#### 2.5. 타이로시네이즈 저해활성 측정

타이로시네이즈는 기질인 L-타이로신이 최종산물인 멜라닌이 되는 과정에 관여하는 가장 중요한 효소이며, 이러한 타이로시네이즈 반응은 멜라닌 생성과정에서 전체 반응 속도를 결정한다. 따라서 타이로시네이즈의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 유용하다. L-타이로신(0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C 수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타이로시네이즈 저해활성은 타이로시네이즈의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )로 표기하였다.

#### 2.6. TLC 및 HPLC를 이용한 비파열 추출물의 플라보노이드 분석

비파열 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45  $\mu\text{m}$ )를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC 및 비극성 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료와 플라보노이드 표준물질의 Rf 값과 자외선 및 발색법을 이용한 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고 HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다.

#### 2.7. 통계처리

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

**Table 2.** HPLC Condition for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *E. japonica* Leaf

Condition of HPLC analysis	
Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 mm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Detection wavelength	370 nm
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L
Mobile phase	2 % AA <sup>a)</sup> in water : 0.5 % AA <sup>a)</sup> in 50 % ACN <sup>b)</sup> = 70 : 30 ~ 10 : 90 (gradient)

<sup>a)</sup>AA : Acetic acid, <sup>b)</sup>ACN : Acetonitrile

### 3. 결과 및 고찰

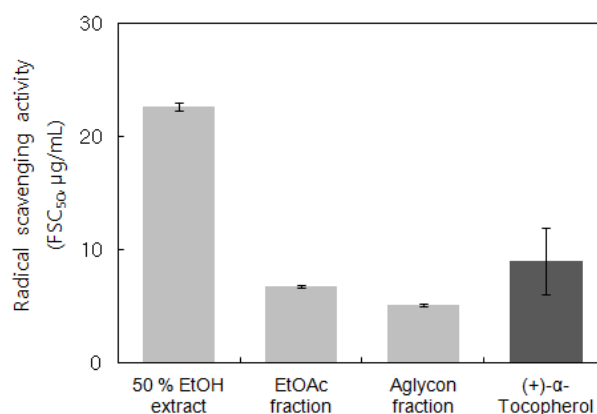
#### 3.1. 비파엽 추출물의 항산화 활성

##### 3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

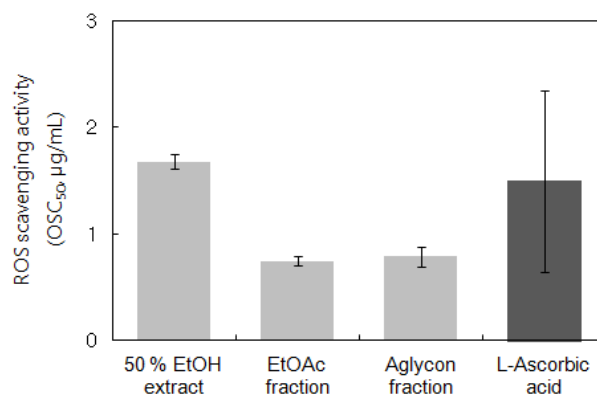
생체막에 있어서 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. 플라보노이드나 (+)- $\alpha$ -토코페롤 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때 수소 원자를 주는 능력을 갖는 항산화제는 환원제로 작용하고 환원력이 클수록 세포막 보호 효과가 크다. 라디칼을 환원하는 항산화제의 능력은 화합물 내 질소 중심의 안정한 라디칼 구조를 갖는 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

비파엽 추출물과 비교물질인 (+)- $\alpha$ -토코페롤의 자유라디칼 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 비파엽 추출물의 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>이 22.63  $\mu$ g/mL, 에틸아세테이트 분획은 6.75  $\mu$ g/mL, 아글리콘 분획은 5.06  $\mu$ g/mL로 나타났다. 비파엽 추출물의 아글리콘 분획이 가장 자유라디칼 소거활성이 높은 것으로 나타났고, 그 다음이 에틸아세테이트 분획으로 나타났고, 상대적으로 50 % 에탄올 추출물은 자유라디칼 소거활성이 낮은 것으로 나타났다. 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -토코페롤의 자유라디칼 소거활성은 8.98  $\mu$ g/mL이다. 따라서 비파엽 추출물 중 아글리콘 분획과 에틸아세테이트 분획은 비교물질인 (+)- $\alpha$ -토코페롤보다 우수한 자유라디칼 소거 능력이 있음을 확인하였다(Figure 1).

3.1.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)  
Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서는 대부분의 ROS가 생성되



**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extract and fractions of *E. japonica* leaf extract and reference.



**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of *E. japonica* leaf extract, fractions and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

고 루미놀은 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다.

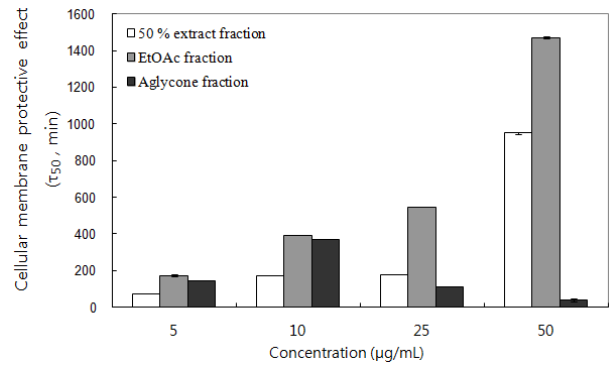
비파엽 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC<sub>50</sub>)을 Figure 2에 나타내었다. 비파엽의 50 % 에탄올 추출물의 활성산소 소거활성은 1.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 에틸아세테이트 분획은 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 아글리콘 분획은 0.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 비교물질은 대표적 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총 항산화능은 1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 비파엽의 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획 모두 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid보다 활성산소 소거활성이 크음을 확인할 수 있다. 특히 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 훨씬 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다.

### 3.2. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

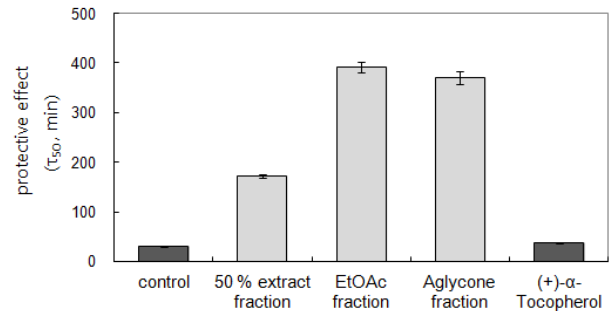
비파엽 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 세포보호 효과를 측정된 결과가 Figures 3, 4 및 Table 3에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는 데 걸리는 시간 ( $\tau_{50}$ )은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다.

대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 30.5 min으로 오차범위  $\pm 1.5$  min 이내로 모든 경우의 실험에서 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.

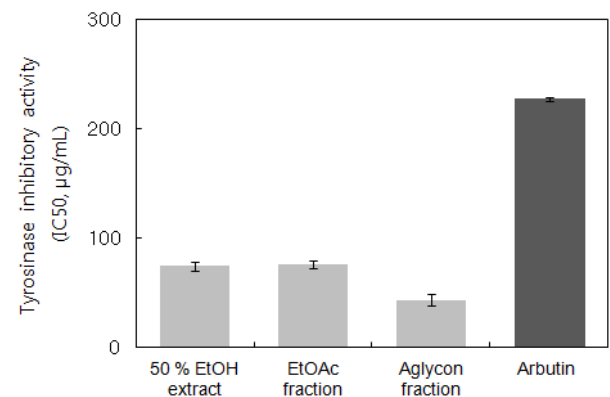
비파엽의 50 % 에탄올 추출물의 경우 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 74.3, 172.0, 174.8, 948.0 min, 에틸아세테이트 분획의 경우 172.6, 390.8, 544.3, 1471.5 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획의 매우 큰 세포보호 활성이 어느 성분에 의한 것인지 또는 분획 성분들 사이의 상호작용에 의한 상승적 보호 작용 결과인지를 밝혀야 할 필요가 있다고 생각된다. 한편 아글리콘 분획의 경우는 5와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $\tau_{50}$ 이 각각 145.2, 370.0 min으로 큰 세포 보호 활성을 보여주다가, 25와 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가함에 따라 각각 111.3, 37.2 min으로 감소하는 경향을 보였다. 아마도 그 이유는 아글리콘의 농도가 증가할 때 어느 아글리콘 성분에 의한 세포막 교란 작용의 결과일 수 있다고 사료된다. 이에 대해서는 그 성분 분석과 세포막 파괴 메커니즘에 대한 보다 더 구체적인 연구가 필요하다고 판단된다. 비파엽 추출물들의 세포보호 효과는 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 에탄올 추출물(172.0 min) < 아글리콘 분획(370.0 min) < 에틸아세테이트 분획(390.8 min) 순으로 증가하였고,



**Figure 3.** Cellular Protective Effects of Extracts from *E. japonica* Leaf and Reference Compounds on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes.

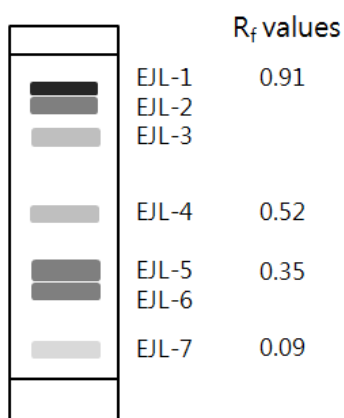


**Figure 4.** The effects of extract and fractions from *E. japonica* leaf and reference at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30.5  $\pm$  1.5 min).



**Figure 5.** The effect of fractions from *E. japonica* leaf and reference on tyrosinase.

비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -토코페롤(38.0 min)보다 훨씬 큰 세포 보호 작용을 나타내었다.



**Figure 6.** TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *E. japonica* leaf and references. Eluent system : ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v).

### 3.3. 타이로시네이즈 저해 활성

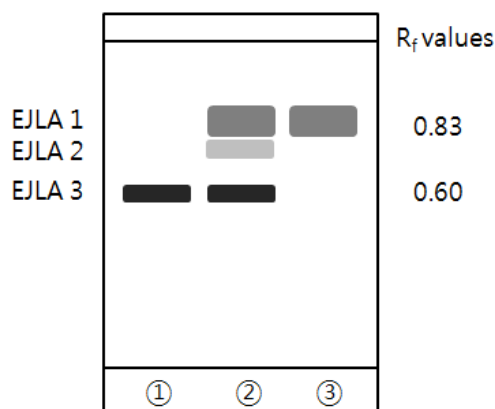
타이로시네이즈는 멜라닌 생성 과정에 있어서 핵심 효소로 작용한다. 이 효소는 타이로신으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중 타이로신을 DOPA, DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키면서 전체적인 반응을 조절한다.

비파엽의 50 % 에탄올 추출물(74.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 에틸아세테이트 분획(75.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 아글리콘 분획(43.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 모두 대표적인 미백제인 알부틴(226.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )보다 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 특히 아글리콘 분획은 비교 물질로 사용된 알부틴보다 약 5배 큰 타이로시네이즈 저해활성을 나타냈다(Figure 5). 알부틴은 기능성 미백 화장품에 널리 사용되는 물질로 잘 알려져 있으며, 따라서 비파엽 추출물의 아글리콘 분획을 화장품에 응용할 경우 우수한 미백효과를 보일 것으로 사료된다.

### 3.4. 비파엽 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

#### 3.4.1. 비파엽 추출물의 TLC 성분분석

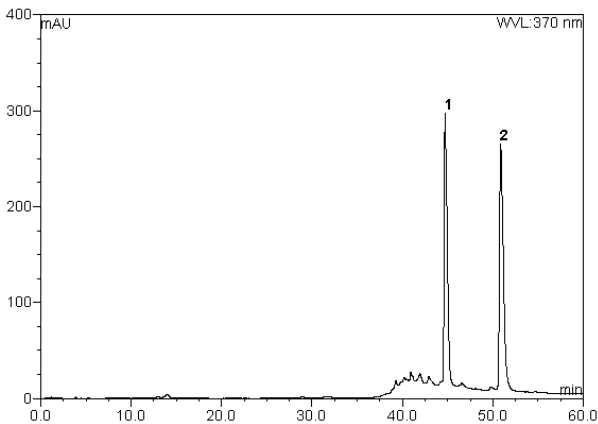
비파엽 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 6과 7에 나타내었다. Figure 6은 에틸아세테이트 분획의 TLC 크로마토그램이며 에틸아세테이트 분획과 여러 가지표준 물질의 TLC 크로마토그램을 자외선과 NP (2-aminoethyl diphenylbromate) - PEG (polyethylene glycol), 바닐린 및 황산 발색으로 확인하였다. 플라보노이드 배당체들을 분리할 수 있는 조건 하에서 비파엽의 에틸아세테이트 분획은 7개의 띠로 분리되었다. R<sub>f</sub>값이 0.91인



**Figure 7.** TLC chromatogram of aglycone fraction from *E. japonica* leaf and references. Eluent system : n-hexane : ethyl acetate : acetic acid (v/v). ① quercetin, ② aglycone fraction, ③ kaempferol.

EJL-1은 quercetin, 0.52인 EJL-4는 quercitrin, 0.35인 EJL-5는 isoquercitrin 그리고 0.09인 EJL-7은 rutin으로 확인하였으며, 이는 에틸아세테이트 분획과 표준물질을 함께 TLC 상에 올려봄으로써 확인할 수 있었다.

비파엽의 50 % 에탄올 추출물의 경우 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 74.3, 172.0, 174.8, 948.0 min, 에틸아세테이트 분획의 경우 172.6, 390.8, 544.3, 1471.5 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획의 매우 큰 세포보호 활성이 어느 성분에 의한 것인지 또는 분획 성분들 사이의 상호작용에 의한 상승적 보호 작용 결과인지를 밝혀야 할 필요가 있다고 생각된다. 한편 아글리콘 분획의 경우는 5와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $\tau$  50이 각각 145.2, 370.0 min으로 큰 세포보호 활성을 보여주다가, 25와 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가함에 따라 각각 111.3, 37.2 min으로 감소하는 경향을 보였다. 아마도 그 이유는 아글리콘의 농도가 증가할 때 어느 아글리콘 성분에 의한 세포막 교란 작용의 결과일 수 있다고 사료된다. 이에 대해서는 그 성분 분석과 세포막 파괴 메카니즘에 대한 보다 더 구체적 연구가 필요하다고 판단된다. 비파엽 추출물들의 세포보호 효과는 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 에탄올 추출물(172.0 min) < 아글리콘 분획(370.0 min) < 에틸아세테이트 분획(390.8 min) 순으로 증가하였고, 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -토코페롤(38.0 min)보다 훨씬 큰 세포 보호 작용을 나타내었다.



**Figure 8.** HPLC chromatogram of aglycone fraction from *E. japonica* leaf at  $\lambda = 370$  nm. ① quercetin, ② kaempferol.

#### 3.4.2. 비파엽 추출물의 HPLC 성분분석

비파엽 추출물 중 에틸아세테이트 분획에서 당이 제거된 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 8과 같다.  $\lambda = 370$  nm에서 크로마토그램은 2개의 피크를 나타내었고 이로부터 플라보노이드를 관찰하였다. 그 용리 순서는 quercetin과 kaempferol이었으며 조성비는 각 46.3%, 53.7%로 kaempferol의 함량이 더 많은 것으로 나타났다.

## 4. 결 론

1) 비파엽 추출물의 자유라디칼 소거활성( $FSC_{50}$ )은 50% 에탄올 추출물(22.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 에틸아세테이트 분획(6.75) < 아글리콘 분획(5.06) 순서로 나타났다.

2) 비파엽 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능,  $OSC_{50}$ )은 50% 에탄올 추출물(1.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < 아글리콘 분획(0.79) < 에틸아세테이트 분획(0.75) 순서로 나타났으며, 에틸아세테이트와 아글리콘 분획은 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )보다 뛰어난 활성산소 소거활성을 보였다.

3) 비파엽 추출물의  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 모든 분획에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 에틸아세테이트 분획의 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 390.8 min, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 1471.5 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다.

4) 비파엽 추출물의 타이로시네이즈 저해활성( $IC_{50}$ )은 에탄올 추출물(74.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 에틸아세테이트 분획(75.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 아글리콘 분획(43.35) 모두 기준물질인 알부틴

(226.88)보다 높게 나타났고, 특히 아글리콘 분획에서 뛰어난 효과를 보였다.

5) 비파엽 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 TLC에는 자외선 및 발색법을 통해 주황색의 여러 가지의 quercetin 배당체들이 존재함을 확인 할 수 있었다. 당을 제거시킨 아글리콘 분획의 TLC는 3개의 띠(EJLA 1 ~ EJLA 3)를 나타내었고, EJLA 1과 EJLA 3는 각각 kaempferol과 quercetin으로 확인되었다. 에틸아세테이트 분획의 TLC에서는 보이지 않았던 kaempferol이나 그 배당체들이 아글리콘 분획의 TLC에서 진하게 나타나는 것으로 보아, kaempferol의 배당체들은 비파엽에 존재하기는 하나 아주 미량 존재함을 예측 할 수 있었다.

6) 아글리콘 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 2개의 피크를 나타내었고 그 순서는 quercetin, kaempferol이었으며, 그 함량은 각 46.3%, 53.7%로 kaempferol의 함량이 약간 더 많은 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 통해 비파엽 추출물이 항산화 및 미백 효과를 가지고 있으며, 성분 분석을 통해 이러한 효능은 비파엽의 성분인 quercetin, kaempferol과 같은 강력한 항산화 효능을 가진 플라보노이드류 때문임을 알 수 있었다. 따라서 비파엽을 추출하여 얻은 분획물들은 화장품의 원료로서 우수한 응용 가능성이 있다고 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In: Free radical damage and its control, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, Elsevier Science B.V., 239 (1994).
2. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy, eds. H. Sies, Advances Pharmacology, (1997).
3. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
4. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
5. Y. J. Ahn, B. R. Won, M. K. Kang, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavendula angustifolia* ex-



- tracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 125 (2009).
6. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, In vitro skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from Suaeda asparagoides extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 680 (2012).
  7. Rajindar S. Sohal, William C. Orrb, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**(3), 539 (2012).
  8. L. C. Magdalena, and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
  9. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korea J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
  10. S. H. Kim and T. Y. Shin, Anti-inflammatory effect of leaves of *Eriobotrya japonica* correlating with attenuation of p38 MAPK, ERK, and NF- $\kappa$ B activation in mast cells, *Toxicology in Vitro*, **23**, 1215 (2009).
  11. D. S. Cha, T. Y. Shin, J. S. Eun, D. K. Kim, and H. Jeon, Anti-metastatic properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*, *Arch. Pharm. Res.*, **34**(3), 425 (2011).
  12. H. Ito, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, S. H. Li, T. Hatano, H. Sakagami, K. Kusama, K. Satoh, D. Sugita, S. Shimura, Y. Itoh, and T. Yoshida, Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and Their Cytotoxicity against Human Oral Tumor Cell Lines, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**(5), 687 (2000).
  13. F. Ferreres, D. Gomes, P. Valentao, R. Goncalves, R. Pio, E. A. Chagas, R. M. Seabra, and P. B. Andrade, Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars : Variation of phenolics and antioxidative potential, *Food Chemistry*, **114**, 1019 (2009).
  14. N. Banno, T. Akihisa, H. Tokuda, K. Yasukawa, Y. Taguchi, H. Akazawa, M. Ukiya, Y. Kimura, T. Suzuki, and H. Nishino, Anti-inflammatory and Antitumor-Promoting Effects of the Triterpene Acids from the Leaves of *Eriobotrya japonica*, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(10), 1995 (2005).
  15. Y. G. Hwang, J. J. Lee, A. R. Kim, and M. Y. Lee, Chemical components and antioxidative effects of *Eriobotrya japonica* Lindl. Leaf, *J. Life Science*, **20**(11), 1625 (2010).
  16. K. Z. Matalaka, D. Ali, A. E. Khawad, and F. Qa'dan, The differential effect of *Eriobotrya japonica* hydrophilic leaf extract on cytokines production and modulation, *Cytokine*, **40**, 235 (2007).
  17. T. Uto, N. Suangkaew, O. Morinaga, H. Kariyazono, S. Oiso, and Y. Shoyama, Eriobotryae Folium extract suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression by inhibition of NF-kappaB and MAPK activation in Murine Macrophages, *Am. J. Chin. Med.*, **38**(5), 985 (2010).
  18. K. I. Lee and S. M. Kim, Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. Leaf Extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(3), 267 (2009).
  19. Y. Huang, J. Li, Q. Cao, S. C. Yu, X. W. Lv, Y. Jin, L. Zhang, Y. H. Zou, and J. F. Ge, Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.), Lindl. leaf in chronic bronchitis rats, *Life Sciences*, **78**, 2749 (2006).