

마테(*Ilex paraguariensis*) 추출물/분획물의 항산화능 및 타이로시네이즈 저해 활성

공봉주·김용재*·백지선*·이다빈*·이지원*·민나영*·김아영·박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품종합기술연구소, *한성과학고등학교
(2015년 10월 18일 접수, 2015년 11월 2일 수정, 2015년 11월 22일 채택)

Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Mate (*Ilex paraguariensis*) Extract/Fractions

Bong Ju Kong, Yong Jae Kim*, Jee Seon Baek*, Da Bin Lee*, Ji Won Lee*,
Na Young Min*, A Young Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and
Technology, 232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*Hansung Science High School, Seoul 03732, Korea

(Received October 18, 2015; Revised November 2, 2015; Accepted November 22, 2015)

요약: 본 연구에서는 마테(*Ilex paraguariensis*)로부터 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물을 제조하였고 이들 추출물/분획물에 대하여 항산화능을 평가하였다. 추출물 및 분획물의 수율은 건조 분말 당 각각 32.0, 4.48 및 0.82%를 나타냈다. 1,1-Phenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성과 루미놀 발광법을 이용한 총 항산화능을 평가하였다. 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물의 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 각각 8.83, 5.84 및 6.05 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 추출물 및 분획물의 총항산화능(OSC₅₀)은 모든 추출물이 비교 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (1.72 $\mu\text{g/mL}$)과 유사한 항산화능을 나타냈으며, 50% 에탄올 추출물의 경우 OSC₅₀은 1.03 $\mu\text{g/mL}$ 로 활성이 가장 큰 것으로 평가되었다. ¹O₂로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과 실험에서 모든 추출물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 비교 대조군인 (+)- α -tocopherol과 유의적으로 큰 세포 보호 활성(τ_{50})을 나타내었다. 특히 아글리콘 분획물은 10 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 세포 보호 효과가 (+)- α -tocopherol 보다 약 5배나 크게 나타났다. 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 tyrosinase에 대한 저해 효과는 미백제로 알려진 알부틴과 유사하였다. 이상의 결과들은 마테 추출물이 항산화 및 항노화 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In the present study, 50% ethanol extract, the ethyl acetate and aglycone fraction were prepared from mate (*Ilex paraguariensis*) and their antioxidative ability was evaluated. The yields of extract and fractions were 32.0, 4.48 and 0.82% per dried powder, respectively. Free radical scavenging activities were performed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and total antioxidant capacity was estimated using luminol-dependent chemiluminescence assay. Free radical scavenging activities (FSC₅₀) of 50 % ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction were 8.83, 5.84 and 6.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Their total antioxidant capacities (OSC₅₀) were similar to that of L-ascorbic acid (1.72 $\mu\text{g/mL}$), known as a prominent water soluble antioxidant, in all extracts and 50% ethanol extract (1.03 $\mu\text{g/mL}$) was the most effective. The cellular protective effects on the ¹O₂-induced cellular damage of erythrocytes were evaluated and the results showed that all extracts were significantly higher than (+)- α -tocopherol at 10 $\mu\text{g/mL}$. Especially, the τ_{50} value of aglycone fraction was 5 times higher than (+)- α -tocopherol at 10 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$. The inhibitory

[†] 주 저자(e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6968

effects of the ethyl acetate and aglycone fractions on tyrosinase were similar to arbutin, known as the whitening agent in cosmetics. These results suggest that the extracts of mate have the applicability as antioxidant and anti-aging cosmetic ingredients.

Keywords: *Ilex paraguayensis*, antioxidant activity, DPPH, cellular protective effect

1. 서 론

피부는 항시 산소와 접촉하고 있고 태양 자외선에 노출되어 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 계속해서 증가하게 된다. ROS란 슈퍼옥사이드 음이온(O_2^-)과 히드록실 라디칼($\cdot OH$)과 같은 산소 중심의 라디칼을 포함할 뿐만 아니라, 과산화수소(H_2O_2)나 싱글렛 옥시전(1O_2)과 같은 비라디칼종들, 그 외에 ROS와 생체 성분과의 반응으로부터 유래된 과산화 라디칼($ROO\cdot$), 알콕실 라디칼($ROO\cdot$), 하이드로과산화물($ROOH$)과 식세포에서 살균작용을 나타내는 $HOCl$ 등을 포함한다[1,2]. ROS는 자외선 뿐만 아니라 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병상태나 스트레스를 받을 때 과잉으로 생성된다. 또한 공해, 흡연 및 세균에 의해서도 ROS가 생성되는 것으로 알려져 있다. ROS 중에서 반응성이 가장 큰 1O_2 와 $\cdot OH$ 등은 피부 세포 및 조직 손상을 야기하는데 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3-6].

피부에는 항산화제들로 구성된 항산화 방어망이 발달되어 ROS에 대항하여 피부 세포 및 조직을 보호한다. Superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소와 α -토코페롤, 아스코르브산, 카로티노이드 등의 비효소적 항산화 물질들이 피부 항산화 방어망을 구축하고 있다[7]. 그러나 계속된 자외선에의 노출로 생성된 과잉의 ROS는 실질적으로 피부의 효소 및 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 한다. 과잉의 ROS로 유도된 피부의 산화적 스트레스는 세포 성분들에 대한 손상을 야기시킨다. 지질 과산화, 단백질 산화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상이 일어난다. 결국에는 탄력감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징지어지는 피부노화가 가속화된다[8-11].

지표면에 도달하는 자외선이 증가함에 따라 자외선

에 의한 광노화와 피부질환에 대한 관심은 점차 증가하고 있다. 광노화를 지연시키고 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 ROS를 제거하는 것은 매우 주요한 전략으로 간주되고 있다. 특히, $\cdot OH$ 및 1O_2 은 반응성이 가장 큰 활성산소종으로써 생체내 Fenton 반응 및 광증감 반응을 통해 피부에서 생성되며, 피부 세포의 지질 과산화, 단백질 손상시킬 뿐만 아니라 사람 피부의 섬유아세포에서 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 발현 등에도 관여하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이들 활성산소를 소거시키고, 이들 ROS에 의한 피부 손상을 감소시킬 수 있는 항산화제의 개발에 대한 요구가 지속적으로 증가하고 있다. 본 연구실에서도 광노화를 억제할 목적으로 피부 항산화방어망 구축에 적합한 항산화 소재들을 천연 식물 추출물로부터 개발하고자 하는 연구들을 계속해오고 있다. 또한 활성소재의 안정화 및 효능 증대를 위한 피부흡수증진 시스템 개발 연구도 지속해오고 있다[12,13].

마테(*Ilex paraguayensis*)는 감탕나무과의 상록 소고목으로 남아메리카의 파라과이나 브라질에 주로 분포한다. 마테는 주로 건조시킨 잎과 줄기를 우려내어 차나 음료로 이용된다. 민간요법으로는 두통, 고혈압, 소화기 질환 및 염증성 질환 등에 이용된 것으로 알려져 있다. 국내에서는 최근 다이어트에도 효과가 있다는 보고와 함께 주목을 받기도 하였다[14,15]. 마테의 약리학적 효과는 높은 함량의 페놀성 화합물에 기인된 것으로, chlorogenic acid류 및 dicaffeoylquinic acid의 유도체가 많이 함유되어 있는 것으로 알려진다. 또한 rutin 등의 플라보노이드 성분들도 보고되고 있다[16].

마테에 대한 연구로는 마테 차 추출물에 대한 항산화능과 사람 대장암 세포 증식 저해효과, 생쥐에 있어서 H_2O_2 로 유도된 DNA 손상에 대한 보호효과, 건강한 여성에 있어서 항산화효소들의 mRNA 발현, 지질과산화 및 항산화 상태, 그리고 마테에서 추출한 항산화제를 캡슐화하기 위한 키토산 나노입자 및 마이크로스피어 제조에 관한 연구 등, 주로 마테 차 음료의 항산화능과 관련된 연구들이 보고되었다[17-20]. 그러나 마테

추출물의 피부노화와 관련된 연구들, 예를 들면, 각종 ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 등)가 생성되는 계에서 이들 ROS에 대한 총항산화능 평가나 피부 광노화 과정에서 가장 중요한 활성산소인 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과 등 세포 수준에서 항산화나 항노화 활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 마테 추출물 및 분획물들에 대하여 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종에 대한 총항산화능, 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호효과를 측정하였으며, tyrosinase 및 elastase 저해 활성도 측정하여 마테 추출물이 항산화 또는 미백 및 주름 등의 항노화 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있는지를 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

자유 라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 화학발광 실험에 사용한 luminol과 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H_2O_2 그리고 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol과 L-ascorbic acid는 Sigma-Aldrich (Korea)에서 구입하였다. 또한 화학발광 실험에 사용한 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하였으며, 에탄올, 에틸아세테이트 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. UV-VIS spectrophotometer는 Varian (Australia), 화학발광 실험에 사용된 6-channel LB9505 LT는 Berthold (Germany)사의 제품을 사용하였다.

2.2. 마테 추출물 및 분획물 제조

마테(아르헨티나산, 자연토종약초)는 2015년 9월경 경동시장에서 구입하였다. 마테 100 g을 50% 에탄올 1 L에 침적시키고 24 h 동안 교반하여 추출 하였다. 50% 에탄올 추출물 50 mL를 40 °C에서 감압 증류하여 추출물 파우더(수율 32.0%)를 얻었다. 남은 50% 에탄올 추출물은 감압 증류하여 수증만 남긴 후, 이를 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)와 1:1 비율로 3번 추출하였다. 망초산(Na_2SO_4)를 이용하여 물을 제거하고 감압 증류하여 에틸아세테이트 분획 파우더(수율 4.48%)를 얻었다.

또한 에틸아세테이트 분획 파우더 일부를 산 가수분

해 반응을 이용하여 당을 제거시키고자 하였다. 에틸아세테이트 분획 파우더 일정량에 H_2SO_4 및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화시킨 후, 다시 에틸아세테이트를 이용하여 분획하고 이를 감압 증류하여 아글리콘 파우더를 제조하였으며, 수율은 0.82%이었다.

2.3. 마테 추출물 및 분획물의 항산화 활성 측정

2.3.1. DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 한 개 또는 그 이상의 비공유전자를 갖는 화학종으로 매우 불안정하며 반응성이 매우 크다. 라디칼은 생체 구성성분과 쉽게 반응할 수 있고, 연쇄반응을 일으켜서 세포 및 조직을 손상시킬 수 있다. 마테 추출물의 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH 시험법을 이용하여 측정하였다. 0.2 mM의 DPPH 시약 1 mL와 에탄올 1 mL 그리고 특정 농도의 추출물 또는 분획물 1 mL를 혼합하여 10 min 방치 후, UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 마테 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 저해율은 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 blank, 추출물 또는 분획물을 넣지 않은 것을 대조군(control)으로 하여 계산하였다.

$$Inhibition (\%) = \left\{ 1 - \frac{(A_{exp} - A_{blank})}{A_{control}} \right\} \times 100$$

A_{exp} 는 실험군의 흡광도(absorbance), A_{blank} 는 blank의 흡광도, $A_{control}$ 는 control의 흡광도를 의미한다. 농도에 따라 각각 세 번씩 측정하였으며, 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging concentration, FSC₅₀, $\mu g/mL$)를 구하여 비교하였다.

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 활성산소종($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 그리고 H_2O_2)를 생성시키며 철과 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 $\cdot OH$ 를 생성시키는데 중요한 역할을 한다. 이 실험에서는 이러한 활성산소에 의해 루미놀

이 발광하는 현상을 이용하여 활성산소 저해 활성을 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 특정 농도의 마테 추출물 또는 분획물을 50 μ L 첨가한 후, 2.5 mM EDTA 40 μ L, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L, 35 mM 루미놀 80 μ L를 넣고 혼합시키고 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소종 생성을 위해 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 첨가하였으며, 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 추출물 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)은 FeCl₃ · 6H₂O와 H₂O₂ 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식을 통해 저해율을 계산하였으며, 활성산소 소거 활성의 크기는 저해율이 50%가 되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

Inhibition (%) =

$$\left\{ \frac{(\text{control의 CPM} - \text{experiment의 CPM})}{(\text{control의 CPM} - \text{blank의 CPM})} \right\} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

실험에 사용된 토끼 적혈구는 삼육축산농원(경기도 화성군)에서 구입한 생후 6개월 된 건강한 토끼로부터 얻어 채혈 후 heparin이 첨가된 시험관에 넣어 4 °C의 냉장고에 보관 하고 12 h 이내에 실험에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6가 되도록 제조되었으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL로 계산된다.

2.4.2. 마테 추출물 및 분획물의 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물 용액을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 간 pre-in-

cubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (13 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 14 min 30 sec 동안 광 조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 상온에서 진행되었다.

마테 추출물 및 분획물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50} 이 29.88 min 으로 오차 범위 ± 0.7 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. 광 증감제로 사용된 rose bengal을 첨가하고 광조사를 하지 않은 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우, 모두 암반응 120 min 까지 거의 용혈이 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

2.5. Mushroom Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase는 멜라닌 생성 과정의 핵심 효소로 tyrosinase의 저해활성은 미백 활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.8 mL, 시료 0.1 mL, 및 tyrosinase 용액(1,250 unit/mL) 0.1 mL 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-Tyrosine을 첨가하지 않은 것을 공시험(blank)으로 하여 효소활성 저해를 계산하였다. 활성의 크기는 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소 시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

2.6. Elastase 저해 활성 측정

피부노화, 특히 주름 생성에는 자외선 및 활성산소에 의한 matrix metalloproteinases (MMPs: collagenase, elastase 등)의 발현과 세포외 매트릭스의 구성 성분의

파괴가 주 원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해 활성 측정은 피부 노화 억제 평가에 있어서 매우 중요하다. Tris HCl (pH 8.0) 0.13 M에 elastase 기질인 N-succinyl-(Ala)3p -nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 867 μ L에 측정 시료용액 67 μ L을 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 2 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액 (0.0025 unit/mL)을 67 μ L 첨가하여 25 $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신 시료 용액으로 사용된 용매를 67 μ L 첨가하였다. Blank는 N-succinyl-(Ala)3p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.13 M Tris HCl buffer 867 μ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

2.7. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

활성산소에는 하이드록실 라디칼(\cdot OH)과 수퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$)과 같은 라디칼 종이 포함된다. 라디칼은 홀수 전자를 가지고 있어 에너지가 높고 불안정한 상태로 다른 물질과의 높은 반응성으로 생체 내에서 연쇄적인 산화반응을 일으켜 세포 및 조직들에 손상을 일으킨다. 라디칼 연쇄반응에 의한 지질과산화는 피부노화를 가속화 시키는 주요 원인으로 밝혀진다. 라디칼은 전자를 받아 환원됨으로써 높은 반응성이 소멸될 수 있다. 따라서 라디칼을 환원시킬 수 있는 환원력은 연쇄반응에 의한 손상을 차단시켜 피부 세포를 보호할 수 있는 주요한 항산화 활성 중 하나이다. 이러한 항산화제의 환원력은 라디칼 소거 활성을 통해 확인할 수 있다. 마테 추출물 및 분획물의 라디칼 소거 활성을 DPPH 라디칼을 이용하여 측정하였다. Figure 1은 마테의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 아글리콘 분획물 그리고 수용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol의 라디칼 소거 활성을 측정한 결과이다. 라디칼 소거활성은 50%의 라디칼을 소거하는 시료의 농도(FSC₅₀, μ g/mL)로 나타내었다.

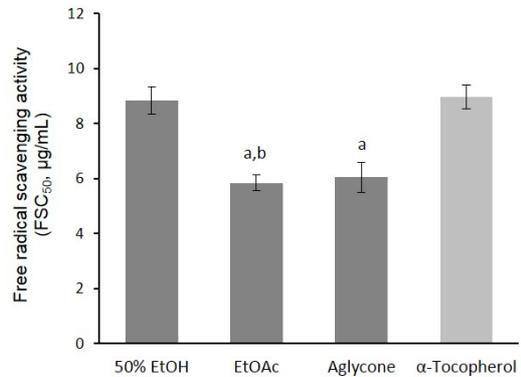


Figure 1. Free radical scavenging ability of mate extract/fractions. Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free radical. 50% EtOH: 50% ethanol extract, ETOAc: ethyl acetate fraction, Aglycone: aglycone fraction. a: statistical significance with α -tocopherol (control), b: statistical significance with 50% ethanol extract ($p < 0.05$).

50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거활성은 각각 8.83, 5.84 및 6.05 μ g/mL로 나타났다. 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거활성이 50% 에탄올 추출물의 활성보다 크게 나타났으며, 이는 비교 대조군으로 사용한 (+)- α -tocopherol (8.98 μ g/mL)보다도 유의적으로 큰 활성으로 측정되었다(Figure 1). 에틸아세테이트 분획 과 아글리콘 분획에서 라디칼 소거활성이 크게 나타난 것은 이들 분획에 함유된 플라보노이드의 함량이 크기 때문인 것으로 추정된다. 이는 저자들이 이전에 보고한 바 있는, 플라보노이드가 많이 함유된 루이보스 차 추출물의 에틸아세테이트 분획(8.47 μ g/mL)에서도 유사한 라디칼 소거활성을 보임을 확인한 바 있다[21].

3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

생체 내에는 철(Fe)과 구리(Cu)와 같은 전이금속 이온들이 존재하며, 이들은 주요한 생리작용에 관여하는 필수적인 요소이다. 자외선에 의해 생성된 활성산소 중 하나인 과산화수소(H₂O₂)는 생체내 이온 상태의 이들 전이금속의 촉매작용에 의한 Fenton 반응을 경유하여 하이드록실 라디칼(\cdot OH), 수퍼옥사이드 라디칼($O_2^{\cdot-}$)과 같은 여러 가지 ROS를 생성시킬 수 있다. 루미놀은 활성산소에 의해 산화되어 높은 에너지의 들뜬

상태로 되고 이어 바닥 상태로 떨어지게 되면서 발광 (420 ~ 450 nm)하는 특성을 가지는 물질로써, 본 연구에서는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계를 이용하여 활성산소를 발생시키고 이것에 의한 루미놀의 화학적 발광 정도를 통해 시료의 활성산소 소거 능력을 확인하고자 하였다. 이는 다양한 ROS가 관여하는 반응으로 그 결과를 총항산화능으로 명명하였다. 마테로부터 얻은 추출물들의 ROS 소거 활성은 50%의 활성산소를 소거하는 농도(OSC₅₀)로서 Figure 2에 나타내었다. 마테의 50% 에탄올 추출물은 총항산화능(OSC₅₀)이 1.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 에틸아세테이트 분획(1.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 아글리콘 분획물(1.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보다 약간 큰 활성을 나타내었다. 이는 라디칼 소거 활성과는 차이가 있다. 마테 추출물 또는 분획물들은 모두 강력한 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid보다 큰 항산화능을 보였지만, 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 특히 50% 에탄올 추출물은 에틸아세테이트 분획물과 유의적인 차이를 보이며 가장 큰 항산화능을 나타내었고, 따라서 50% 에탄올 추출물에 수용성 항산화제가 상대적으로 많이 함유되어 있을 것으로 사료된다.

3.3. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

광증감 반응은 활성산소가 발생하는 메커니즘 중 하나로 생체 내 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)들은 자외선 노출에 의해 광화학적 반응을 통해 다양한 활성산소들을 생성시키게 된다. $^1\text{O}_2$ 은 광증감 반응(photosensitization)의 주생성물로 알려지며 가장 반응성이 큰 활성산소로 세포막에 침투하여 인지질 및 세포 구성성분들의 자동산화반응을 개시하여 세포막 파괴 및 세포 손상을 야기하게 된다. 본 연구에서는 토끼 적혈구를 이용하여 $^1\text{O}_2$ 으로부터의 세포보호 효과를 확인하고자 하였다. 광증감제로써 rose-bengal을 사용하여 $^1\text{O}_2$ 을 발생시키고, 적혈구 세포의 용혈 정도를 통해 이를 판단하였다.

세포보호효과의 결과는 시료를 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 적혈구가 50% 용혈 되는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 나타내었으며(Table 1), 먼저 시료를 넣지 않은 대조군으로 약 29.9 min에서 50%의 적혈구가 파괴되는 것으로 측정되었다. 이러한 조건에서 아글리콘 분획물은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 196.2 min, 25

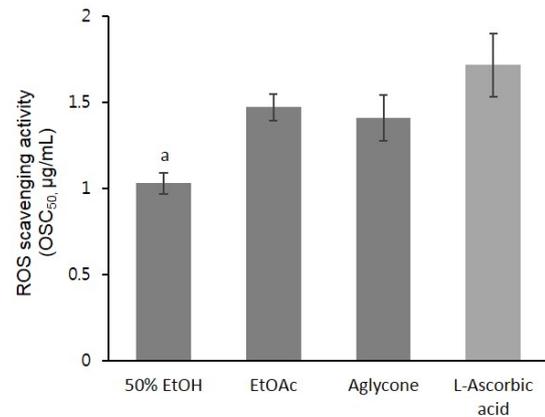


Figure 2. ROS scavenging ability of mate extract/fractions (total antioxidant capacity). Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of ROS. 50% ETOH: 50% ethanol extract, EtOAc: ethyl acetate fraction, Aglycone: aglycone fraction. a: statistical significance with ethyl acetate fraction ($p < 0.05$).

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 624.5 min으로 매우 높은 세포보호 효과를 나타내었다. 라디칼 소거 활성과 활성산소 소거 활성 결과에 비해 50% 에탄올 추출물(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 43.3 min)과 에틸아세테이트 분획물(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 57.0 min)과 큰 차이를 보였다. 모든 추출물은 낮은 농도(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 비교 물질인 (+)- α -tocopherol과 유의적 차이를 보이며 우수한 효과를 나타내었으며, 아글리콘 분획물은 (+)- α -tocopherol보다도 약 5배나 더 큰 세포 보호능을 나타내었다(Figure 3).

세포막은 지질을 주성분으로 하고 있음을 고려할 때, 배당체에서 당 성분들이 제거된 아글리콘 분획물은 세포막에의 침투가 훨씬 용이하여 세포막에서 일어나는 라디칼 연쇄반응을 차단함으로써 활성산소에 의한 손상으로부터 세포막을 효율적으로 보호할 수 있을 것으로 추정되며 이러한 결과는 아글리콘 분획이 (+)- α -tocopherol 보다도 5배 큰 월등한 세포보호효과로부터 알 수 있다. 한편 대부분의 식물 추출물에서 나타나는 고농도에서 세포 보호 활성이 약간 감소하는 경향은 마테 추출물에서도 나타났다. 마테 추출물은 세포 수준에서의 항산화능이 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol 보다도 우수하고 아글리콘은 매우 낮은 농도에서도 그 효과가 매우 커서 화장품에서 항노화 화장품의 항산화제로도 응용 가능성이 매우 큰 것으로 사료된다.

Table 1. Relative Cellular Protective Effects of Mate Extracts and (+)- α -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Rabbit Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)			
	5	10	25	50
50% EtOH	40.6 (\pm 0.3)	49.5 (\pm 1.7)	43.3 (\pm 0.5)	39.9 (\pm 0.6)
EtOAc	39.6 (\pm 1.3)	55.0 (\pm 1.0)	57.0 (\pm 0.5)	36.2 (\pm 1.6)
Aglycone	125.0 (\pm 8.4)	196.2 (\pm 19.6)	624.5 (\pm 13.3)	528.9 (\pm 1.6)
(+)- α -Tocopherol		39.3 (\pm 0.8)		104.5 (\pm 8.3)

¹⁾ Control, $\tau_{50} = 29.9 \pm 0.7$ min

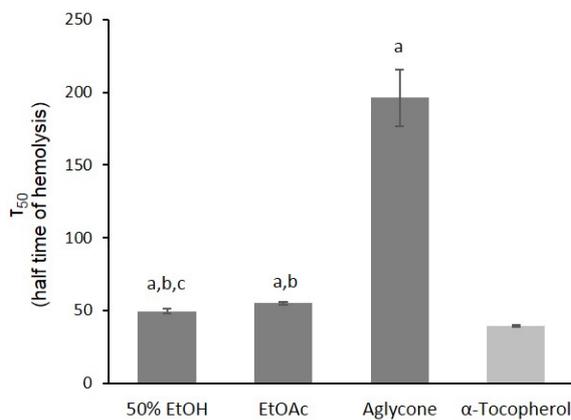


Figure 3. Relative cellular protective effects of mate extract/fractions at 10 $\mu\text{g/mL}$. 50% EtOH : 50% ethanol extract, EtOAc: ethyl acetate fraction, Aglycone: aglycone fraction. a: statistical significance with α -tocopherol (control), b: statistical significance with aglycone fraction. c: statistical significance with ethyl acetate fraction ($p < 0.05$).

3.4. Tyrosinase 저해 활성

피부 색소 침착은 자외선 및 활성산소로 유도된 멜라닌 생성에 의해 나타난다. Tyrosinase는 멜라닌 생성에서 가장 핵심적인 효소로 기질인 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, DOPA는 DOPAquinone으로 그리고 DHI (dihydroxyindole)을 산화시켜 궁극적으로 eumelanin을 생성하여 피부에 색소를 침착시킨다. Tyrosinase의 활성을 저해하는 것은 멜라닌 생성을 억제하는데 있어 매우 중요하다. 마테 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에

틸아세테이트 및 아글리콘 분획이 각각 305.8, 130.7 및 100.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Figure 4). 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 비교 물질로 기능성화장품 미백 소재인 arbutin (132.4 $\mu\text{g/mL}$)과 유사한 저해 활성을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 미백 기능성 화장품 소재로도 응용 가능성이 있음을 나타낸다.

3.5. Elastase 저해 활성

피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 주름 생성을 유발하는 효소들로 진피층의 세포외 매트릭스 조직에 존재하는 콜라겐이나 엘라스틴과 같은 섬유상 단백질을 분해하는 효소들이다. MMPs는 자외선이나 활성산소의 작용으로 생성된다. MMPs의 종류로는 elastase, collagenase 및 gelatinase 등이 있으며, 피부의 탄력에 영향을 주는 엘라스틴 및 콜라겐의 분해를 촉진하여 주름 생성을 일으킨다. 특히, elastase는 엘라스틴을 분해하는 효소로 피부의 탄력감소 및 주름 생성에 있어 매우 중요하며, 이들의 활성을 억제하는 것은 피부노화를 방지하는데 있어 매우 중요하다. 마테 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성(IC₅₀)은 50% 에탄올 추출물 및 아글리콘 분획이 각각 1100.7 및 122.3 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타냈다. 그리고 이들은 비교물질로 사용한 oleanolic acid (6.1 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 매우 낮은 elastase 저해 활성을 나타내었다(Figure 5). 에틸아세테이트 분획물의 경우는 실험 농도에서 석출되어 활성을 측정할 수 없었다.

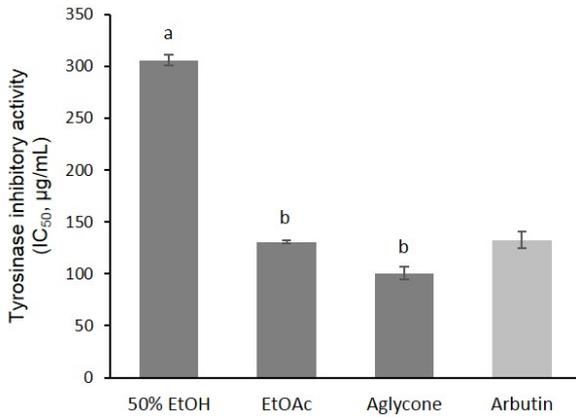


Figure 4. Inhibitory activities of extract/fractions obtained from *I. paraguariensis* and reference on tyrosinase. 50% EtOH: 50% ethanol extract, EtOAc: ethyl acetate fraction, Aglycone: aglycone fraction. a: statistical significance with arbutin (control), b: statistical significance with 50% ethanol extract ($p < 0.05$).

4. 결 론

본 연구에서는 주로 건강음료로 이용되는 마테로부터 화장품에의 활용 가능성 확인하기 위해 몇 가지 추출물을 제조하고 이에 대한 항산화 및 미백 활성을 측정하였다.

- 1) DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거활성 (FSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트, 아글리콘 분획물이 각각 8.83, 5.84 및 6.05 µg/mL로 측정되었다. 에틸아세테이트, 아글리콘 분획물은 비교 물질로 사용된 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol (8.98 µg/mL)보다 유의적으로 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다.
- 2) Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서의 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획물이 각각 1.03, 1.47 및 1.41 µg/mL로 측정되었다. 50% 에탄올 추출물은 에틸아세테이트 분획물 보다 큰 항산화능을 나타내었으며, 모두 강력한 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid와 유사한 항산화능을 갖는 것으로 평가되었다.
- 3) ¹O₂로 유도된 적혈구 세포 파괴에 대한 세포 보호 효과(적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시

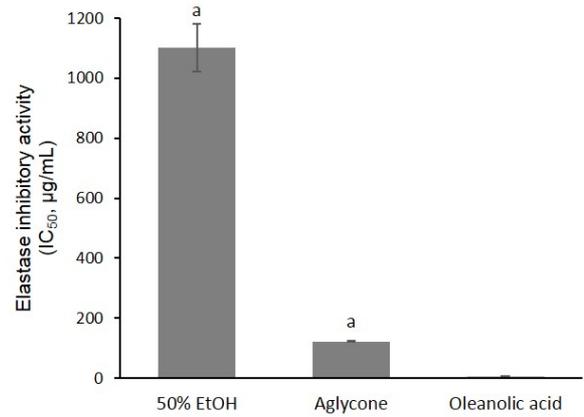


Figure 5. Inhibitory activities of extract/fractions obtained from *I. paraguariensis* and reference on elastase. 50% EtOH: 50% ethanol extract, Aglycone: aglycone fraction. a: statistical significance with oleanolic acid (control) ($p < 0.05$).

간, τ_{50})를 확인한 결과, 10 µg/mL에서 모든 추출물이 (+)- α -tocopherol (39.3 min)보다 유의적으로 큰 세포 보호 효과를 나타냈고, 특히 아글리콘 분획물은 (+)- α -tocopherol 보다도 약 5배 큰 세포 보호 효과(196.2 min)를 보였다.

- 4) 마테 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해활성 (IC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획이 각각 103.6, 130.7 및 100.5 µg/mL로 측정되었으며, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 미백 소재로 알려진 arbutin (132.4 µg/mL)과 유사한 활성을 나타내었다.
- 5) Elastase 저해 활성(IC₅₀)은 50% 에탄올 추출물 및 아글리콘 분획이 각각 1100.7 및 122.3 µg/mL로 측정되었으며, 모두 비교 물질인 oleanolic acid보다 낮은 활성을 나타내었다.

본 연구에서는 몇 가지 항산화 활성 평가를 통해 마테 추출물 또는 분획물이 활성산소종에 대한 우수한 항산화 활성을 확인하였다. 특히 아글리콘 분획물은 세포 수준에서의 항산화능 평가에서 매우 큰 세포 보호 효과를 갖는 것으로 평가되었다. 이상의 결과들을 볼 때, 마테는 항노화 화장품 원료로서 충분한 활용 가능성이 있을 것으로 사료되며, 추후 이러한 활성을 나타내는 마테의 주요 성분들에 대한 분석과 추가적인 주름 개선이나 미백 소재로서의 활성 평가가 요구될 것으로 판단된다.

Reference

1. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
2. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
3. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
4. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
5. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
6. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: antiaging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 85 (2010).
7. H. M. Chiang, H. C. Chen, H. H. Chiu, C. W. Chen, S. M. Wang, and K. C. Wen, *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013, 9 (2013).
8. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
9. M. Iwata, T. Corn, S. Iwata, M. A. Everett, B. B. Fuller, The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins, *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 9 (1990).
10. K. Kameyama, T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishi-yama, Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126 (1993).
11. S. A. Park, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Broussonetia kazinoki* SIEB extracts, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(2), 177 (2013).
12. 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).
13. N. R. Jo, H. A. Gu, S. A. Park, S. B. Han, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of isoquercitrin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(2), 103 (2012).
14. D. P. Arari, W. Bartchewsky, T. W. Dos Santos, K. Oliveira, A. Funck, J. Pedrazzoli, M. F. F. De Souza, M. J. Saad, D. H. M. Bastos, A. Gambero, P. O. Carvalho, M. L. Ribeiro, Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice, *Obesity*, **17**, 2127 (2009).
15. D. P. Arari, W. Bartchewsky, T. W. Dos Santos, K. Oliveira, C. Oliveira, E. Gotardo, J. Pedrazzoli, A. Gambero, L. F. C. Ferraz, P. O. Carvalho, M. L. Ribeiro, Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity, *Mol Cell Endocrinol*, **335**(2), 110 (2011).
16. G. Gosmann, A. G. Barlette, T. Dhamer, D. P. Arcari, J. C. Santos, E. R. de Camargo, S. Acedo, A. Gambero, S. C. B. Gnoatto, and M. L. Ribeiro, Phenolic compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes, *Plant Foods Hum Nutr*, **67**, 156 (2012).
17. E. G. Mejia, Y. S. Song, C. I. Heck, and M. Ramirez-Mares, Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation, *J. Funct. Foods*, **2**, 23 (2010).
18. D. D. Miranda, D. P. Arcari, J. Pedrazzoli, P. D. O.

- Carvalho, S. M. Cerutti, D. H. Bastos, and M. L. Ribeiro, Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice, *Mutagenesis*, **23**(4), 261 (2008).
19. R. L. Matsumoto, D. H. Bastos, S. Mendonca, V. S. Nunes, W. Bartchewsky Jr, M. L. Ribeiro, and P. de Oliveira Carvalho, Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women, *J. Agricult. Food Chem.*, **57**(5), 1775 (2009).
20. R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengibar, and A. Heras, Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydr. Polym.*, **84**(2), 803 (2011).
21. H. J. Yang, B. R. Won, Y. J. Lim, S. K. Yoon, D. H. Ji, J. Y. Choi, S. J. Han, C. W. Lee, and S. N. Park, Antioxidative activity, component analysis, and anti-elastase effect of *Aspalathus linearis* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(4), 251 (2007).