

한련초 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 항산화, 항노화 및 항균 효과

이상래·송바름·신혁수·이윤주·박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소
(2018년 8월 3일 접수, 2018년 8월 16일 수정, 2018년 9월 27일 채택)

Antioxidant, Antiaging and Antimicrobial Effects of Ethanolic Extract and Ethyl Acetate Fraction from *Eclipta prostrata*

Sang Lae Lee, Ba Reum Song, Hyuk Soo Shin, Yun Ju Lee, and Soo Nam Park[†]

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

(Received August 3, 2018; Revised August 16, 2018; Accepted September 27; 2018)

요약: 한련초는 열대 및 아열대 지방에 서식하는 국화과 한련초속에 속하는 한해살이풀로 간 손상에 대한 보호 효과, 살무사 독에 대한 해독효과, 항산화효과, 발모효과, 상처치유효과 등의 효능들이 확인된 바 있다. 더 나아가 본 연구에서는 한련초의 항산화 및 항노화효과를 확인하여 피부보호 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다. 이를 위해 한련초를 50% 에탄올로 추출한 추출물과 이를 다시 에틸아세테이트로 분획하여 얻은 분획물을 실험에 사용하였다. 항산화 지표인 FSC₅₀과 OSC₅₀을 측정된 결과, 에틸아세테이트 분획물의 OSC₅₀은 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid 보다 2.7배 이상 뛰어난 것으로 나타났다. 이와 더불어 시료의 세포 내 활성산소종 소거능과 H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과가 확인되었으며, 특히 ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구 광용혈에 대한 지연효과의 평가에서 64 µg/mL의 에틸아세테이트 분획물이 적혈구 광용혈의 소요시간을 6배 이상 지연시켜 한련초의 우수한 항산화능을 반영해주었다. 한련초의 항노화 효과를 검증하기 위해 Hs68에서 추출한 엘라스타제에 대한 저해활성을 평가한 결과, 16 µg/mL의 두 시료 모두 엘라스타제의 활성을 각각 6.8%와 14.0% 억제한 것을 확인하였다. 마지막으로 한련초가 식품 또는 화장품 등의 소재로 사용됨에 있어 화학적 방부제의 역할을 대체할 수 있을 가능성을 확인하기 위한 항균실험의 결과, 에틸아세테이트 분획물이 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus*에 대해 methyl paraben과 동등하거나 더 뛰어난 항균활성을 가진 것을 확인하였다. 이상의 실험결과들을 통해 한련초는 피부보호 소재 또는 천연방부제로서의 가능성을 가진 천연소재라 생각되며, 식품 또는 화장품 소재로서의 이용이 기대된다.

Abstract: An annual plant, *Eclipta prostrata* (Linn) is a member of the Asteraceae plant family and inhabited in tropical or subtropical regions of the world. Through many previous researches, *E. prostrata* has been extensively studied for its hepatoprotective effect, antivenom potential against viper venom, antioxidant, hair-growth, wound-healing efficacy and so on. In this study, for better understanding of the potential of *E. prostrata* as skin protectant, we conducted the experiments evaluating the antioxidant and antiaging efficacy. To this end, 50% ethanolic extract of *E. prostrata* and its ethyl acetate fraction were prepared and investigated. For the evaluation of antioxidant capacity of the samples, FSC₅₀ and OSC₅₀ were estimated. As a result, OSC₅₀ of ethyl acetate fraction was 2.7 times superior to OSC₅₀ of L-ascorbic acid, a well known antioxidant agent. Furthermore *E. prostrata* showed notable reactive oxygen species (ROS) scavenging

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

effect and protective effect against H_2O_2 in the cellular level as well. Especially, in the 1O_2 induced hemolysis test, 64 $\mu g/mL$ of ethyl acetate fraction showed greater than 6 times increased retardation effect compare to control which means *E. prostrata* has remarkable antioxidant capacity. To validate the antiaging effect of the samples, we conducted elastase inhibition assay using elastase solution extracted from human skin fibroblasts, Hs68. As a result, 16 $\mu g/mL$ of each sample showed 6.8% and 14.0% of elastase inhibition respectively. Finally, antimicrobial activity of *E. prostrata* was assessed to validate the possibility as alternative preservative. From the result, ethyl acetate fraction showed outstanding antimicrobial activity as of methyl paraben, a well known chemical preservative. In conclusion, these results suggest that *E. prostrata* can be used as natural skin protectant or preservative as natural ingredient in food or cosmetics industry.

Keywords: *Eclipta prostrata*, reactive oxygen species, antioxidant, antiaging, antimicrobial

1. 서 론

피부는 신체를 덮고 있는 인체의 가장 큰 장기로 유해물질, 자외선 및 미생물과 같은 외부의 해로운 환경으로부터 생체 내부를 보호하는 역할을 담당하고 있다.

피부 손상을 일으키는 가장 주요한 외부인자로는 자외선이 있다. 자외선은 파장에 따라 UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) 및 UVC (200-280 nm)로 나눌 수 있다. 이 중 UVC 영역은 피부에 가장 해로운 파장의 영역이지만 지구의 성층권에 있는 오존층에 의해 대부분 흡수되기 때문에 실제로 지표상에는 거의 도달하지 않는다. 반면에 UVB는 주로 피부 표피층까지 흡수되며, UVA는 피부 깊숙이 진피층까지 흡수된다[1]. 따라서 UVA 및 UVB 영역의 자외선은 피부 세포 및 조직의 손상과 광노화에 있어서 매우 주요한 자외선으로 여겨진다. 이들 자외선의 피부 흡수는 일광화상, 피부암 및 피부 조기노화의 주요한 원인으로 언급되고 있으며, 특히 외인성 피부노화의 대부분은 자외선에 의한 광노화인 것으로 알려져 있다[2].

피부가 자외선에 노출되면 피부에서는 자외선으로 유도된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. ROS의 종류로는 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$)과 hydroxyl radical ($\cdot OH$)과 같은 라디칼종, singlet oxygen (1O_2) 및 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 같은 비라디칼종, 그리고 이러한 ROS와 생체 내 분자들과의 반응으로 생성된 alkoxy radical ($RO\cdot$), peroxy radical ($ROO\cdot$) 등이 포함된다[3-5]. 이들 ROS는 반응성이 매우 크기 때문에 생체 성분인 지질, 단백질, DNA를 비롯한 생체 고분자를 산화 손상시켜서 그 기능을 약화하거나 파괴할 수 있다. 특히 피부에서 계속된 자외선에 노출로 ROS가 과잉으로 생성되면 피부 세포막

지질의 자동산화반응에 의한 과산화 지질의 생성, 피부 탄력을 유지하는 콜라겐이나 히아루론산의 산화적 절단이나 비정상적인 교차 결합, DNA 염기의 산화, 예를 들면 8-oxo-deoxyguanosine 및 피리미딘 이합체의 생성 등에 의한 돌연변이 및 피부암 발생 등으로 피부 광노화가 가속화될 수도 있다[6-8].

해로운 ROS의 산화적 스트레스로부터 생체 세포 및 조직을 보호하는 침병과 같은 역할을 하는 물질은 항산화제이다. 항산화제의 종류로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, 및 glutathione peroxidase (GSHPx)와 같은 효소적 항산화제와 비타민 C나 E, 글루타치온 및 유비퀴놀과 같은 비효소적 항산화제가 있다. 이들 효소적, 비효소적 항산화제들은 생체 내에서 항산화 방어 시스템을 구축하여 과잉의 ROS로부터 세포 및 조직을 보호하는 역할을 담당하고 있다[4,9]. 하지만 항산화 방어계를 압도하는 과잉의 ROS는 결국 피부의 항산화 방어계를 붕괴시키고 피부 및 조직 손상을 야기할 수 있다. 따라서 피부 항산화 방어망을 구축하여 과도한 활성산소종으로부터 피부를 보호하기 위해서는 적절한 새로운 항산화제의 개발 및 보충이 필요하다. 최근에 천연 생물자원에서부터 안전성이 확보된 천연 항산화제를 개발하여 화장품에 응용하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다[10,11].

한련초는 열대 및 아열대 지방에 서식하는 국화과 한련초 속에 속하는 한해살이풀로 우리나라에서는 주로 경기도 이남의 논둑이나 습지 등지에 주로 서식하는 것으로 알려져 있다. 전초를 말린 것을 한방명으로는 묵한련(墨旱蓮)이라 하여 청혈 또는 지혈 등에 쓰인다. 한련초의 학명으로는 주로 *E. clipta prostrata* 또는 *E. clipta alba*가 알려져 있다[12,13]. 한련초의 주요 성분으로는 protocatechuic acid, isochlorogenic acid, cou-

mestran 계열의 wedelolactone과 demethylwedelolactone, flavonoid 계열의 apigenin과 luteolin 등이 알려져 있다 [12]. 한련초의 약리 효능으로는, 인도 전통의학인 아유르베다에서 간경변이나 간염 등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있으며[14], 그 외 CCl₄로 유도된 간 손상에 대한 보호효과[15], 살무사 독에 대한 해독효과[16], CD rats 경구 투여에 의한 혈중 지질 및 활성산소종의 감소 효과[17], 한련초 에테르추출물의 항균활성[18], albino rats에서의 발모효과[19], 에탄올 추출물의 상처 치유효과[20] 등에 관한 연구 보고가 있다. 하지만 한련초 추출물 혹은 분획물에 대한 활성산소종으로 유도된 피부 세포 손상이나 광노화에 있어서 한련초 추출물/분획물의 세포보호효과나 총항산화능에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서 저자들은 한련초 50% 에탄올 추출물 및 활성 분획인 에틸아세테이트 분획을 이용하여 루미놀 발광법을 이용한 각종 활성산소종이 생성되는 시스템에서의 총항산화능인 활성산소 소거활성, ¹O₂으로 유도된 세포 손상에 대한 보호효과, 피부의 각질형성 세포주인 HaCaT 세포에서의 활성산소종 소거능을 평가하였고, 피부 섬유아세포인 Hs68로부터 추출한 엘라스타제 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 따라서 활성산소종으로 매개되는 피부 세포 손상 및 광노화 과정에서 한련초 추출물이 피부 보호효과 및 광노화 억제 효능이 있는지를 알아보고자 하였다. 또한 이와 함께 화장품에의 응용 범위를 확대하고자 한련초 추출물 및 분획물에 대한 항균활성을 측정하여 천연 방부제로서의 응용 가능성도 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), luminol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H₂O₂, rose bengal, heparin, α -tocopherol, FeCl₃ · 6H₂O, L-ascorbic acid를 비롯하여 비교물질로써 사용된 apigenin, luteolin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 세포실험에 사용된 phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin (P/S), fetal bovine serum (FBS)은 Capricorn (Ebsdorfergrund, Hesse, Germany)의 제품을, 3-(4,5-dimethyl-2-thia-

zoly)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT)와 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 에탄올, 에틸아세테이트, 헥세인 등의 용매는 분석용 등급 이상의 시판 제품을 사용하였으며, thin layer chromatography (TLC)는 Merck (Darmstadt, Germany)의 aluminum sheet gel 60 F₂₅₄를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거활성 측정에는 Varian (Mulgrave, VIC, Australia)의 UV/Vis 분광기인 Cary 50을, 화학발광도의 측정이 필요한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서의 활성산소종 소거활성의 평가에는 Berthold (Bad Wildbad, Germany)의 화학발광측정기 6-channel LB9505 LT를, 적혈구의 광용혈 억제활성의 평가에는 Milton Roy (Warminster, PA, USA)의 Spectronic 20D를, 흡광도의 측정이 필요한 모든 세포실험에서는 Tecan (Mannedorf, Swiss)의 infinite M200 PRO를 사용하였다. pH 측정기는 Mettler-Toledo (Greifensee, Switzerland)의 Seven Compact ph meter를 사용했으며, HPLC는 Shimadzu (Kyoto, Japan)의 Shim-pack VP-ODS (detector: UVD 170s Dionex, flow rate: 1.0 mL/min, injection volume: 20 μ L)를 사용했다. 주요성분들의 질량 분석은 NICEM (서울대학교 농생명과학공동기기원)에 의뢰하였으며, Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA)의 Thermo-Finnigan surveyor instrument가 사용되었다.

2.2. 한련초 추출 및 분액

한련초는 2018년도 4월경 경상북도 영천시에서 채집된 한련초의 지상부를 건조시킨 것을 삼흥건재약업사를 통해 구매하여 사용하였다. 잘게 자른 원물 400 g에 50% 에탄올 4 L를 가한 후 직사광선을 피해 72 h 동안 상온에서 추출한 뒤 이를 여과하였다. 이 여액을 40 °C 이하의 온도에서 감압농축한 후 동결건조하여 암록색의 파우더를 획득하였으며 이를 50% 에탄올 추출물(50% EtOH extract of *E. prostrata*, Ecl-EtOH)이라 하였다. 여액의 일부는 동일한 부피의 에틸아세테이트로 3회 반복 분액한 뒤 에틸아세테이트층을 모아 상기와 동일한 조건으로 감압농축 후 동결건조하여 파우더를 획득하였으며 이를 에틸아세테이트 분획물(EtOAc fraction of *E. prostrata*, Ecl-EtOAc)이라 하였다. Ecl-EtOH의 최종 수율은 건조된 원물의 질량 대비 약 14.4%였으며, Ecl-EtOAc의 최종 수율은 약 1.7%였다. 준비된 시료는 4 °C에 보관하며 사용하였다.

2.3. DPPH 라디칼 소거활성

메탄올에 용해시킨 DPPH 용액(0.2 mM)과 에탄올, 농도별 시료를 동일한 비율로 혼합한 후 상온에서 10 min 동안 반응을 일으킨다. 반응이 끝난 후 분광기를 이용해 517 nm에서 흡광도를 측정한다. 실험군(experiment)과 시료의 용매만을 첨가한 대조군(control), DPPH 용액의 용매만을 첨가한 바탕대조군(sample blank)의 흡광도를 함께 측정하여 다음 식 (1)을 통해 DPPH 라디칼 소거활성(%)을 구하였다. 식을 통해 구한 값은 DPPH 라디칼이 50%로 감소하는데 필요한 시료의 농도(concentration to scavenge half of free radicals, FSC₅₀)로 단순화하여 표현하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100 \quad (1)$$

2.4. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서의 활성산소종 소거활성

화학발광 측정용 튜브에 여러 농도의 시료와 증류수 1.78 mL, 40 μL의 2.5 mM EDTA, 10 μL의 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 및 35 mM luminol 80 μL를 넣고 잘 섞은 후 화학발광기 내부의 cell holder에 5 min 동안 항온시킨다. 그 후 40 μL의 150 mM H₂O₂를 첨가하여 다시 잘 섞은 후 25 min 동안 화학발광을 측정한다. 실험군과 시료의 용매만을 첨가한 대조군, H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O가 포함되지 않고 용매만을 첨가한 공시험(blank)의 발광도를 함께 측정하여 다음 식 (2)를 통해 활성산소종 소거활성(%)을 구하였다. 화학발광기의 각 채널들은 실험 전에 차이가 없도록 보정하였으며, 시료의 농도별 활성산소종 소거활성은 화학발광의 세기가 50%로 감소하는 데 필요한 시료의 농도(concentration to scavenge half of reactive oxygen species, OSC₅₀)로 단순화하여 표현하였다.

$$\text{ROS scavenging activity (\%)} = \left(\frac{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{experiment}}}{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{blank}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

cpm: counts of photon emission per minute

2.5. 세포배양

인간 유래 각질형성세포주 HaCaT은 CLS Cell Lines

Service GmbH (Germany)에서, 인간 유래 섬유아세포주 Hs68은 ATCC (USA)에서 분양받아 사용하였다. 통상적인 세포배양 시에는 10%의 FBS와 1%의 P/S를 함유한 DMEM을 배지로 사용하였으며, 48-72 h 마다 계대하였다. 시료의 처리를 위해 사용된 배지는 무혈청배지로서, 1%의 P/S가 함유된 DMEM을 사용하였다. 모든 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었으며 이를 위해 Sanyo (Japan)의 CO₂ incubator를 사용하였고, 자극 또는 시료의 처리시점은 재현성을 위해 분주 후 약 70-80% confluency에 도달하였을 때로 결정하였다.

2.6. 세포독성평가

HaCaT 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 적당한 confluency에 도달할 때(약 24 h 소요)까지 배양한다. 배양이 끝난 후 기존의 배지를 제거하고 농도별 시료를 처리하여 다시 24 h 동안 배양한다. 배양이 끝난 후 시료를 제거하고 MTT 용액(500 μg/mL)을 처리하여 다시 1 h 동안 배양기에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 MTT 용액을 제거하고 불용성인 formazan을 용해하기 위한 DMSO를 가해 잘 섞은 후 파장 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 다음의 식 (3)에 따라 실험군의 상대적인 세포생존율(%)을 구하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{A_{\text{experiment}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.7. 세포 내 활성산소종 소거활성

HaCaT 세포를 96-well black plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한다. 배양이 끝난 세포를 PBS로 1회 세척하고 H₂DCFDA 용액(20 μM)을 처리하여 다시 30 min 동안 배양한다. 배양이 끝난 후 PBS로 2회 세척하고 각 well에 100 μL의 PBS를 가한 상태에서 400 mJ/cm²의 강도로 UVB를 조사하여 세포 내 활성산소종의 생성을 유도하여 형광을 발현시킨다. UVB 조사가 끝난 즉시 농도별 시료를 처리하여 다시 1 h 동안 배양한 후 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, USA)를 이용하여 형광의 세기(excitation 485 nm, emission 530 nm)를 측정하였다. 한편 실험에 사용한 UVB의 강도는 다양한 강도의 UVB 조사에 대한 1 h 후의 세포생존율을 사전에 확인하여 독성이 없는 강도(400

mJ/cm²)로 결정하였다.

2.8. H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과

HaCaT 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한다. 배양이 끝난 후 기존의 배지를 농도별 시료로 교체하여 다시 2 h 동안 배양한다. 배양이 끝난 세포를 PBS로 1회 세척한 뒤 PBS에 희석한 H₂O₂ 용액(2 mM)을 처리하여 30 min 동안 배양한다. 배양이 끝난 후 PBS로 2회 세척하여 H₂O₂ 용액을 완전히 제거하고 무혈청배지를 가하여 다시 24 h 동안 배양한다. 배양이 끝난 세포는 MTT assay로 세포생존율을 측정하여 H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과를 확인하였다.

2.9. Hs68을 이용한 엘라스타제 저해활성

피부 섬유아세포주 Hs68을 이용하여 시료의 엘라스타제 저해활성을 확인하고자 하였다. 먼저 실험에 사용할 충분한 양의 세포를 얻기 위해 여러 번의 계대를 거쳐 필요한 양의 세포를 준비한다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 세포를 cellscraper로 모으고 원심분리(1,000 g, 3 min)하여 펠렛을 만든다. 여기에 0.1% triton X-100 · 0.2 M Tris buffer를 가하고 초음파 분쇄를 하여 단백질을 추출한다. 이 용액을 다시 원심분리(13,000 g, 10 min)하고 상층액만을 취하여 이를 엘라스타제 액으로 하였으며, 한편 BCA kit (Thermo, USA)를 이용해 단백질의 양을 정량하였다. 이후 96-well plate의 각 well에 Tris-HCl buffer (0.2 M)에 희석한 50 μg의 단백질을 포함하는 88 μL의 엘라스타제 액, 10 μL의 시료, 기질로써 사용된 2 μL의 N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide를 넣고 90 min 동안 배양하여 반응을 유도한다. 이후 파장 405 nm에 대한 각 well의 흡광도를 측정하였다. 실험군과 시료의 용매만을 첨가한 대조군, 엘라스타제 액의 용매만을 첨가한 두 공시험군(control blank, sample blank)의 흡광도를 함께 측정하여 다음 식 (4)을 통해 시료의 엘라스타제 활성 억제율(%)을 구하였다.

$$\text{Inhibition of elastase activity (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{control blank}}} \right) \right\} \times 100 \quad (4)$$

2.10. 적혈구 현탁액

적혈구는 건강한 성인 남성으로부터 얻었으며 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣고 원심분리(1,000 g, 5 min)하여 혈장을 분리하였으며, 분리된 적혈구만을 PBS로 3회 세척한 뒤 4 °C에 냉장보관하면서 12 h 이내에 사용하였다. 파장 700 nm에서 optical density (OD)값이 0.6이 되도록 PBS에 희석하여 적혈구 현탁액을 제조하였으며 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10⁷ cells/mL로 계산된다.

2.11. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구 광용혈에 대한 보호효과

준비된 3.5 mL의 적혈구 현탁액을 파이렉스 시험관 (No. 9820)에 주입하고, 농도별 시료를 각각 50 μL씩 첨가하여 암소에 두어 30 min 동안 pre-incubation시킨다. 이후 rose bengal 용액(16 μM)을 0.5 mL 가하고 입구를 봉하여 15 min 동안 빛을 조사하였다. 광용혈을 유도하는 데 필요한 광조사는 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 내부를 검게 칠한 상자 안에 20 W의 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 시험관의 거리가 5 cm가 되도록 고정 및 배열한 후 빛을 조사하였다. 조사가 끝난 후 post-incubation 시간에 따라 적혈구가 용혈되는 정도를 일정한 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도를 측정하여 시료가 적혈구의 광용혈에 미치는 효과를 확인하였다. 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈의 정도에 비례하며, 시료가 적혈구의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation의 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 50%의 적혈구가 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

2.12. 항균활성평가를 위한 사용균주, 배지 및 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 CTFA challenge test에서 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus* (황색포도상구균, ATCC 6538), 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli* (대장균, ATCC 23736), *P. aeruginosa* (녹농균, ATCC 29336), 효모인 *C. albicans* (ATCC 10231), 곰팡이균인 *A. niger* (ATCC 16404)로 총 다섯 종류의 균주이며 한국 미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였다. 해당 균주를 배양하는 데 필요한 배지 및 배양 조건은 판매자가 권장하는 조건을 따랐다.

2.13. Disc Diffusion Assay를 이용한 항균활성 측정

시료의 항균활성을 disc diffusion assay로 측정하였다. 배양된 균주가 현탁된 용액의 농도는 1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL로 맞추어 사용하였으며, 각 균주는 멸균면봉을 사용하여 평판배지에 100 μ L씩 도말하였다. 시료는 disc 당 5 mg이 되도록 천천히 흡수시킨 뒤, 용매는 휘발시켰다. 이 paper disc를 균주가 도말된 평판배지 위에 밀착시킨 후 배양시켜 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone)의 직경을 측정하였다.

2.14. MIC 측정

본 실험에서는 시료의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 구하기 위해 broth-dilution method를 사용하였다. 음성 대조군으로는 50% DMSO를, 양성 대조군으로는 화장품의 방부제로써 널리 사용되는 methyl paraben을 사용하였다. 농도별 시료는 2배 희석법을 이용하여 50% DMSO에 반복 희석하여 준비하였으며, 모든 균주는 1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL로 농도를 맞추어 사용하였다. 각 well에 20 μ L의 시료를 주입하고 180 μ L의 균주를 함유한 배지를 접종한 후 균주별 배양조건에 맞추어 배양하였다. 배양이 끝난 후 육안으로 관찰하였을 때 각각의 균들이 증식하지 않은 농도를 MIC로 결정하였다.

2.15. TLC 및 HPLC를 이용한 성분분석

Ecl-EtOAc를 에탄올에 용해시킨 후 여과하여 이를 성분분석을 위한 시료로써 사용하였다. TLC 분석에 사용한 전개용매의 조성은 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v) 또는 toluene : acetone : formic acid = 11 : 6 : 1 (v/v)을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 용매의 조성은 2% acetic acid 수용액(용매 A)과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 용액(용매 B)을 사용하여 시간에 따른 용매 A의 농도가 0 min (20%), 5 min (20%), 190 min (85%), 195 min (85%), 200 min (20%)가 되도록 농도구배를 설정하였다. TLC를 통한 성분확인에는 NP-PEG 발색법을 적용하여 이미 보고된 분광학적 자료와 표준물질과의 R_f 값의 비교를 통해 이루어졌으며, HPLC를 통한 성분확인에는 TLC에서 분리해낸 물질을 표준물질과의 머무름 시간 대조 및 UV spectrum의 비교를 통해 이루어졌다. TLC로부터 분리해낸 물질 중 HPLC-DAD 크로마토그램 상에서

도 피크의 확인이 완료된 물질들은 질량분석을 통해 추가적으로 검증하였다.

2.16. LC/ESI-MS를 이용한 성분 분석

본 분석의 시료는 전개가 완료된 TLC plate에 254 nm 파장의 자외선을 조사하였을 때 명확히 분리되는 밴드들로부터 획득하였다. 분리된 각각의 밴드를 긁어내어 에탄올에 용해시킨 뒤 원심분리(5,000 g, 20 min)하고 상층액만을 취하고 여과하여 이를 시료로 사용하였다. 분석기기로 사용된 액체 크로마토그래프는 Thermo scientific (USA)의 Thermo-Finnigan surveyor instrument (column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8 μ m, 50 \times 2.0 mm, Cat.-No. N0520E181UVC), autosampler, PDA-UV detector를 사용하였으며, 질량분석기는 Thermo scientific (USA)의 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface를 사용하였다. Injection volume은 5 μ L, flow rate는 200 μ L/min이며 전개용매 조건으로는 0.1% formic acid (in water, A용매) : 0.1% formic acid (in acetonitrile, B용매) = 75 : 25 (v/v)를 사용하였다.

2.17. 통계분석

통계적 검정이 적용된 모든 실험들은 3회 이상 반복하여 수행하였으며, 실험결과는 mean \pm standard deviation으로 나타내었다. 각 실험군 간의 통계적인 유의성의 검증은 Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA)을 통해 one-way ANOVA 검정을 적용하였으며, 사후검정으로써 Duncan's multiple range test를 적용하여 $p < 0.05$ 일 때 두 집단 간의 차이가 유의한 것으로 보았다.

3. 결 과

3.1. DPPH 라디칼 소거활성

활성산소종에는 $O_2^{\cdot -}$ 또는 $\cdot OH$ 와 같은 라디칼종이 포함된다. 라디칼은 한 개 또는 그 이상의 짝짓지 않은 비공유전자를 가진 반응성이 큰 화학종으로써, 그 풍부한 반응성으로 인해 라디칼 연쇄반응을 일으켜 세포의 손상 및 사멸을 유도할 수 있다[8]. 한편 활성산소의 라디칼종을 포함하는 많은 종류의 라디칼들은 큰 반응성으로 인해 반감기가 무척 짧아 직접적인 측정은 어렵다. 보라색의 DPPH 라디칼은 실험에 적용할 수

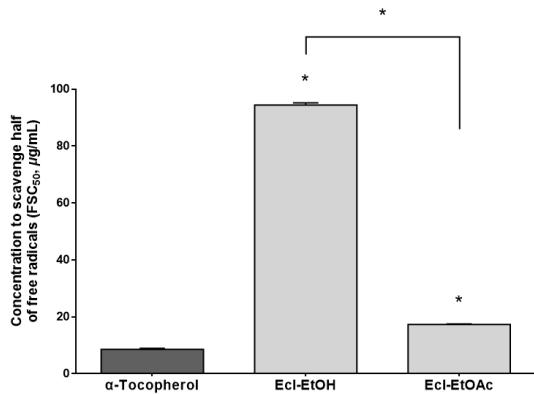


Figure 1. FSC₅₀ of Ecl-EtOH, Ecl-EtOAc and α-tocopherol. Results were expressed as mean ± standard deviation. **p* < 0.05 compared with α-tocopherol or each other.

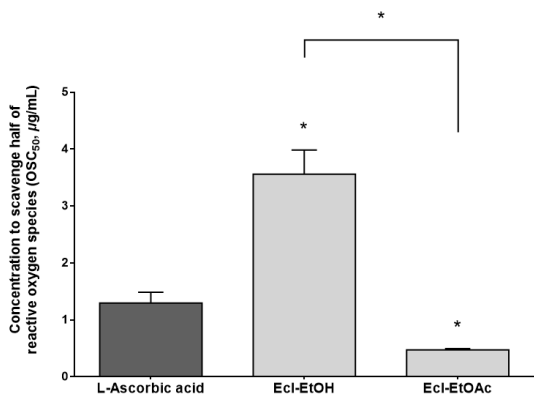


Figure 2. OSC₅₀ of Ecl-EtOH, Ecl-EtOAc and L-ascorbic acid. Results were expressed as mean ± standard deviation. **p* < 0.05 compared with L-ascorbic acid or each other.

있을 정도로 비교적 안정한 라디칼로써 시료 내의 항산화 물질과 반응하면 노란색의 환원된 형태로 변하면서 515 nm 파장대의 흡수를 잃게 된다[21]. 본 실험에서는 이러한 DPPH 라디칼의 성질을 이용하여 시료의 자유라디칼 소거활성을 측정하고 그 활성의 크기를 FSC₅₀로 표현하였다(Figure 1). 양성대조군으로는 항산화제로 잘 알려진 α-tocopherol을 사용하였다. 실험결과 각 시료의 FSC₅₀은 Ecl-EtOH가 94.45 µg/mL, Ecl-EtOAc가 17.28 µg/mL, α-tocopherol이 8.58 µg/mL로 각각 나타났다.

3.2. Luminol 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서의 활성산소종 소거활성

본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 철 이온이

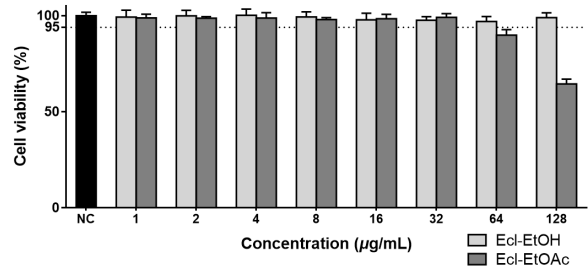


Figure 3. Effects of Ecl-EtOH and Ecl-EtOAc on cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of each sample and the cell viability was determined using MTT assay. Results were expressed as mean ± standard deviation.

촉매로 작용하는 Fenton 반응을 모사한 계로써 반응성이 특히 큰 ·OH를 비롯한 각종 활성산소종(O₂^{·-}, H₂O₂)이 생성된다. 생체 내에서도 철과 구리 이온 같은 전이금속 이온들의 촉매작용에 의해 활성산소종이 생성될 수 있으며 결과적으로 지질과산화, DNA 손상 등을 유발하여 세포 및 조직에 위해를 가할 수 있다[22]. Luminol은 활성산소종과 반응하여 462 nm 파장의 강한 청자색의 빛을 내는 화학적 발광물질로, 본 실험에서는 이러한 luminol의 성질과 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계를 이용하여 시료의 활성산소종 소거활성을 측정하였다(Figure 2). 한편 Fenton 반응을 모사한 계의 특성상 이 소거활성에는 금속이온에 대한 킬레이트 효과까지 포함할 수 있다. 실험결과 활성산소종이 50% 소거되는 농도를 의미하는 OSC₅₀는 Ecl-EtOH가 3.56 µg/mL, Ecl-EtOAc가 0.48 µg/mL, 양성대조군으로 사용한 L-ascorbic acid가 1.30 µg/mL로 나타났다. 이에 Ecl-EtOAc의 경우 잘 알려진 항산화제인 L-ascorbic acid 보다는 소거활성이 2.7배 이상 뛰어난 것으로 확인되었다.

3.3. 세포독성평가(HaCaT)

MTT assay를 이용하여 농도별 시료의 세포생존율을 확인하였다. MTT assay는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소효소의 작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT가 진청색의 비수용성 침전물인 formazan으로 변화되는 양을 흡광도를 통해 대조군과 비교하여 살아있는 세포의 수를 간접적으로 추정할 수 있는 실험이다. 본 실험에서는 HaCaT을 대상으로 하는 다음 실험들에 앞서 사용할 시료의 농도범위를 결정하는 한편, 시료가 세포의 증식 또는 독성에 미치는 영향을 알아보기 위

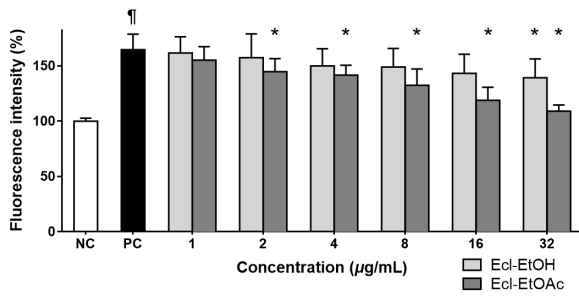


Figure 4. Effects of Ecl-EtOH and Ecl-EtOAc on UV-induced intracellular ROS production in HaCaT cells. Intracellular ROS production was upregulated by UVB irradiation and H₂DCFDA was used for visualizing ROS production level. Results were expressed as mean ± standard deviation. †*p* < 0.05 compared with NC, **p* < 0.05 compared with PC.

해 세포생존율을 측정하였다(Figure 3). 본 실험에서는 95% 이하의 생존율을 보이는 농도에 대하여 독성이 있는 것으로 판단하였다. 실험결과 Ecl-EtOH는 실험에 적용된 모든 농도범위인 1-128 μg/mL의 범위에서, Ecl-EtOAc의 경우에는 1-32 μg/mL의 범위에서 독성이 없는 것으로 판단하였다. 따라서 HaCaT을 대상으로 하는 다음 실험들에서 두 시료 모두 최고 농도를 32 μg/mL로 설정하였다.

3.4. 세포 내 활성산소종 소거활성

HaCaT에 자외선을 처리하게 되면 세포 내에서 활성산소종이 생성되게 된다. 피부 내에서 생성된 활성산소종은 세포의 구성성분인 단백질, DNA 및 세포막의 지질 등을 손상시킬뿐만 아니라 콜라겐, 엘라스틴 등의 세포외기질을 분해하는 MMPs의 발현을 촉진시켜 피부노화를 가속화시킬 수 있다. 그러므로 세포 내 활성산소종을 소거할 수 있는 항산화 물질은 피부노화를 억제하는데 도움이 될 수 있다[4,5]. 세포 내 활성산소종에 대한 시료의 소거활성을 평가하기 위해 H₂DCFDA를 이용한 형광세기 비교법을 사용했다. H₂DCFDA는 세포 내 에스테라아제에 의하여 두 개의 에스터기가 제거된 형태로 변화하며, 이때 활성산소종과 반응하게 되면 485 nm 파장의 빛을 흡수하여 530 nm 파장의 빛을 방출하는 형광을 갖는 물질이다. 본 실험에서는 이러한 성질을 이용해 자외선으로 활성산소종을 유발하고 형광의 세기를 비교하여 시료의 세포 내 활성산소종 소거활성을 측정하였다(Figure 4). 자외선 강도는 UVB 조사 후

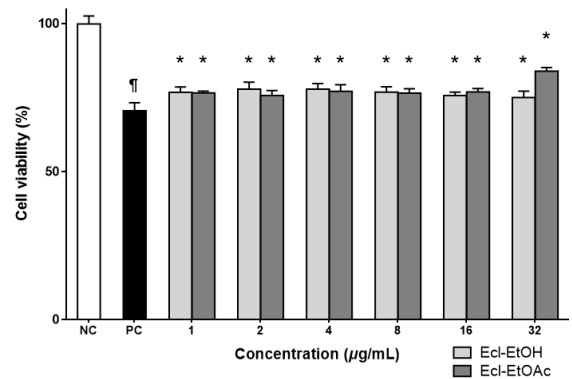


Figure 5. Effects of Ecl-EtOH and Ecl-EtOAc on H₂O₂-induced oxidative stress in HaCaT cells. The cell viability was determined using MTT assay. Results were expressed as mean ± standard deviation. †*p* < 0.05 compared with NC, **p* < 0.05 compared with PC.

1 h 뒤 세포독성이 없는 것으로 확인된 강도인 UVB 400 mJ/cm²로 설정하였다. 실험결과 UVB를 조사한 PC군은 UVB를 조사하지 않은 NC군에 비해 활성산소로 인해 발생하는 형광이 60% 이상 증가함을 확인하였으며, PC군에 시료를 처리하였을 경우에 두 시료 모두 농도의존적으로 형광의 세기를 감소시키는 것을 확인했다. Ecl-EtOH의 경우 최고농도인 32 μg/mL에서, Ecl-EtOAc의 경우 2 μg/mL 이상의 농도에서 유의한 감소를 보였다. 두 시료 모두 세포 수준에서도 활성산소종을 소거할 수 있는 것을 확인하였으며, 특히 Ecl-EtOAc의 소거활성이 더 뛰어났다.

3.5. H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과

본 실험에서는 세포에 H₂O₂용액이 가해져 세포의 사멸이 유도된 조건에서 시료의 세포보호효과를 확인하고자 하였다. 세포에 H₂O₂용액이 가해진 PC군은 산화스트레스로 인한 세포사멸이 유도된 군을 의미하며, PC군의 세포생존율은 NC군 대비 약 70%가 되도록 조건을 설정하였다. 두 시료 모두 농도의존적이지는 않았지만, 결과적으로 모든 농도에서 세포보호효과를 가진 것을 확인하였다(Figure 5). 특히 가장 뛰어난 보호효과를 가진 실험군은 Ecl-EtOAc를 32 μg/mL의 농도로 처리한 군으로써, 해당 군의 세포생존율은 약 84.4%로 PC군 대비 약 13.4% 높은 수준이었다. 이는 같은 농도의 Ecl-EtOH 보다도 뛰어났다.

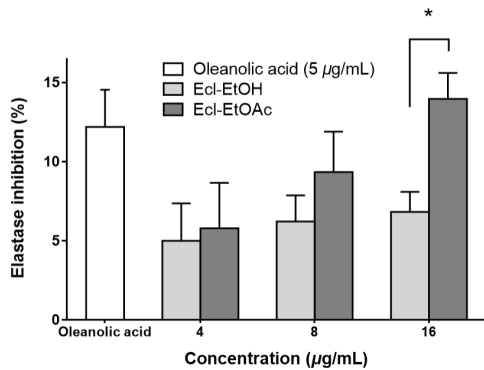


Figure 6. Inhibitory effects of Ecl-EtOH, Ecl-EtOAc and oleanolic acid on elastase extracted from human fibroblasts, Hs68. Results were expressed as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$.

3.6. Hs68를 이용한 엘라스타제 저해활성 평가

피부 섬유아세포로부터 유래한 엘라스타제는 호중구(neutrophil)로부터 유래한 엘라스타제와는 달리 금속 단백질분해효소(metalloproteinase)의 일종으로 성숙한 엘라스틴 섬유만을 분해할 수 있지만, 자외선의 반복적인 조사에 의한 주름의 형성을 매개하는 주요한 효소로 여겨진다[23]. 본 실험에서는 인간유래 피부 섬유아세포주 Hs68로부터 추출한 엘라스타제를 이용하여 시료의 엘라스타제 저해활성을 측정하였다(Figure 6). 양성대조군으로는 엘라스타제 저해활성이 이미 알려진 oleanolic acid를 사용했다. 실험결과 두 시료 모두 엘라스타제의 활성을 억제하는 것을 확인하였으며, 특히 Ecl-EtOAc를 실험 내 최고농도인 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 가장 높은 엘라스타제 저해활성을 확인하였다. 이는 엘라스타제의 활성을 약 14.0% 억제한 것으로 Ecl-EtOH 보다 유효하며 대조군과 유사한 수준인 것으로 판단된다.

3.7. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구 광용혈에 대한 보호효과

피부에 자외선 또는 가시광선 영역대의 빛을 조사하면 피부 내에 존재하는 포르피린(porphyrin)과 같은 구조를 가진 광증감제 등에 의하여 반응성이 큰 $^1\text{O}_2$ 과 같은 활성산소종이 생성될 수 있다[24]. 한편 세포막 인지질의 두 지방산 중 하나는 불포화 지방산으로 이중결합을 가져 꼬리의 형태가 구부러져 있는데, 이는 인지질 이중층으로 이루어진 세포막으로 하여금 유동성을 가지게 한다. 그러나 이러한 불포화 지방산은 활성

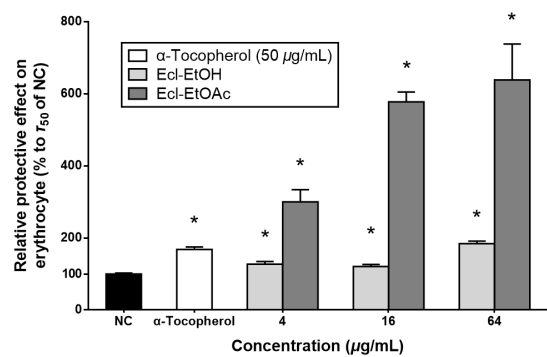


Figure 7. Protective effects of Ecl-EtOH, Ecl-EtOAc and α -tocopherol against rose bengal sensitized photohemolysis of erythrocyte. Results were converted into a percentage for proportional comparison and expressed as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared with NC.

산소종에 의한 지질과산화 연쇄반응의 대상이 될 수 있다[25]. 지질과산화 연쇄반응에 의해 세포막의 인지질이 산화되면 세포막이 손상되고 결국 세포가 파괴될 수 있다. 본 실험에서는 광증감제인 rose bengal을 이용한 $^1\text{O}_2$ 을 생성하는 계와 세포의 세포막과 동일한 구조를 가진 적혈구를 이용하여 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈에 대한 시료의 보호효과를 확인하고자 하였다. 양성대조군으로는 지질과산화 연쇄반응을 종결시킬 수 있는 α -tocopherol을 사용했다. 측정된 결과는 50%의 적혈구가 용혈되는 시간을 의미하는 τ_{50} 을 구하여 광용혈 지연효과를 확인하였다(Figure 7). 이 값은 시료의 보호효과가 클수록 크게 나타나며, 실험결과 두 시료 모두 시료를 처리하지 않은 NC군에 비하여 큰 τ_{50} 을 보여 적혈구의 용혈을 억제시키는 데 효과가 있음을 확인하였다. 두 시료 모두 4-16 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도 범위에서 NC군 대비 유의적으로 용혈을 억제시켰으며, 특히 Ecl-EtOAc를 실험 내 가장 높은 농도인 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 군의 τ_{50} 은 NC군 대비 약 6.3 배 이상 커 가장 뛰어난 보호효과를 보여주었다.

3.8. Disc Diffusion Assay를 이용한 항균활성 측정

각 시료에 대한 항균활성은 화장품의 방부력 평가를 위해 일반적으로 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus*, 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*, 효모 *C. albicans*, 곰팡이 *A. niger*로 총 5종의 균주에 대하여 disc diffusion assay로 실시하였으며 실험

Table 1. Antimicrobial Activity of Ecl-EtOH and Ecl-EtOAc from *E. prostrata* against Bacteria and Fungi

Strains		Diameter of clear zone (mm)		
		Methyl paraben	Ecl-EtOH	Ecl-EtOAc
Gram-positive bacteria	<i>S. aureus</i>	17	13	17
Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i>	20	-	10
	<i>P. aeruginosa</i>	13	11	11
Yeast	<i>C. albicans</i>	27	-	16
Mold	<i>A. niger</i>	24	-	-

Discs were equally treated with 50 μ L of each sample solution with a concentration of 10^5 μ g/mL.

Diameter of clear zone includes diameter of disc (8 mm).

- : No inhibition

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Ecl-EtOH and Ecl-EtOAc from *E. prostrata* against Bacteria and Fungi

Strains		MIC (μ g/mL)		
		Methyl paraben	Ecl-EtOH	Ecl-EtOAc
Gram-positive bacteria	<i>S. aureus</i>	2,500	2,500	78
Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i>	1,250	-	625
	<i>P. aeruginosa</i>	1,250	5,000	156
Yeast	<i>C. albicans</i>	1,250	-	625
Mold	<i>A. niger</i>	625	-	-

- : No inhibition

결과는 Table 1에 정리하였다. 양성대조군으로는 잘 알려진 화학적 방부제인 methyl paraben을 사용하였다. 실험결과 Ecl-EtOH는 *S. aureus*에서만 저해환을 나타내었으나 Ecl-EtOAc의 경우 *A. niger*를 제외한 모든 균주에서 저해환을 나타내었다. 이때 *S. aureus*에 대해서는 대조군으로 사용한 methyl paraben과 유사한 수준의 저해환을 보여 그람 양성균에 대해 특히 항균활성이 뛰어남을 확인하였다.

3.9. MIC 측정

각 균주에 대한 시료의 성장 억제효과를 확인하기 위해 broth-dilution method를 사용하여 각 시료의 MIC를 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. Ecl-EtOH의 MIC는 *S. aureus* 및 *P. aeruginosa*에 대하여 각각 2,500, 5,000 μ g/mL로 나타났으며, *E. coli*, *C. albicans* 및 *A. niger*에 대해서는 실험에서 사용된 최고 농도인 10,000 μ g/mL에서도 항균활성은 나타나지 않았다. 반면 Ecl-EtOAc의 경우엔 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*에

대하여 각각 78, 625, 156, 625 μ g/mL의 MIC를 나타냈으며, 이는 양성 대조군으로 사용된 methyl paraben 보다도 더 뛰어난 항균활성이었다. 하지만 *A. niger*에 대해서는 실험에서 사용된 최고 농도인 10,000 μ g/mL에서도 항균활성은 나타나지 않았다. 이 실험결과를 통해 Ecl-EtOH 및 Ecl-EtOAc가 피부를 보호하기 위한 소재 등으로 사용되었을 때 화학적 방부제를 일부 대신할 수 있을 가능성이 있음을 확인하였다.

3.10. 성분분석

본 연구에 사용된 한련초의 성분을 확인하기 위해 TLC, HPLC 및 질량분석을 통한 성분분석을 진행하였다. 한련초로부터 유래한 두 시료 중 본 연구에서 진행한 모든 실험에서 효과가 더 뛰어났던 Ecl-EtOAc를 성분분석을 위한 시료로 사용하였다. 전개가 완료된 TLC plate에 NP-PEG 발색법을 적용한 뒤 파장 365 nm에서 나타나는 TLC 전개 결과는 Figure 8에 나타내었으며, 이때 밴드의 효과적인 분리를 위해 두 종류의 용

Table 3. LC/ESI-MS and UV Spectrum Characteristics of Ecl-EtOAc from *E. prostrata*

Peak No.	TLC band	Compound name	λ_{\max} (nm)	t_R (min)	$[M-H]^+$ (m/z)	Ref.
p1	Ec3	Unknown	322, 295sh	16.09	316.01	-
p2	Ec5	Demethylwedelolactone	247, 350	55.09	301.03	[26]
p3	Ec2	Luteolin	255, 348	86.42	-	[27]
p4	Ec4	Wedelolactone	250, 350	91.25	315.05	[26]
p5	Ec1	Apigenin	266, 335	105.53	271.06	[27]

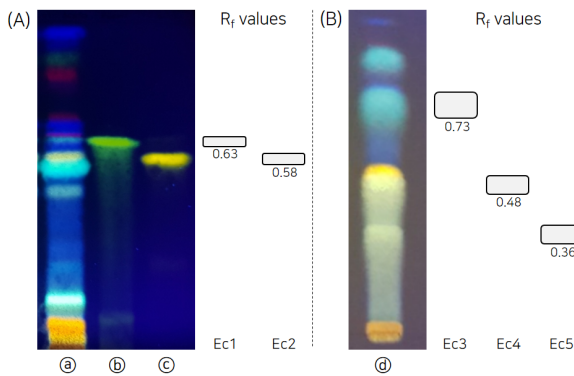


Figure 8. TLC chromatogram of Ecl-EtOAc and references (NP-PEG reagents; UV 365 nm). Composition of eluent system (A); toluene : acetone : formic acid = 11 : 6 : 1 (v/v), Composition of eluent system (B); hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v), (a) and (d) Ecl-EtOAc, (b) apigenin, (c) luteolin.

매조성을 적용하였다. HPLC-DAD 분석을 통해 얻은 크로마토그램은 Figure 9에 나타내었다. 결과적으로 최종확인된 주요성분들에 대한 정보는 Table 3에 정리하였다. TLC 밴드 Ec5와 Ec4에 해당하는 크로마토그램의 주요 피크인 p2와 p4는 파장 250 및 350 nm에서 큰 흡광을 갖는 전형적인 coumestan의 UV spectrum과 같으며, 질량분석과 참고문헌과의 대조를 통해 각각 demethylwedelolactone과 wedelolactone으로 최종적으로 확인하였다. TLC 밴드 Ec2에 해당하는 p3은 크로마토그램에서 작은 피크로써만 나타나며 TLC를 통한 표준물질과의 R_f 값의 비교, HPLC를 통한 t_R 값의 비교와 참고문헌의 대조를 통해서 최종적으로 luteolin으로 확인하였다. TLC 밴드 Ec1에 해당하는 p5는 표준물질과 TLC에서의 R_f 값과 HPLC에서의 t_R 값을 비교하고 UV 스펙트럼과 질량분석 결과를 참고문헌과 대조하여 최종적으로 apigenin으로 확인하였다. 마지막으로 TLC

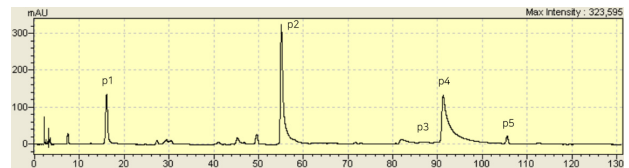


Figure 9. HPLC-DAD chromatogram of Ecl-EtOAc. The UV absorption was measured wavelength ranges between 254-400 nm. p1: unknown, p2: demethylwedelolactone, a tiny peak p3: luteolin, p4: wedelolactone, p5: apigenin.

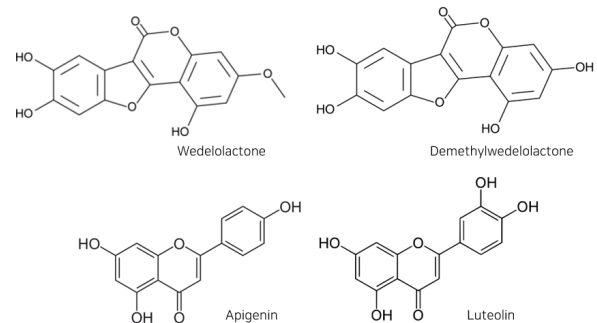


Figure 10. Structure of main components of *E. prostrata*.

밴드 Ec3에 해당하는 p1은 UV 스펙트럼과 질량분석 결과를 얻었지만 정확한 구조동정을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. Figure 10에 나타난 확인된 물질 중 demethylwedelolactone, wedelolactone 및 luteolin은 모두 분자 내 카테콜 구조를 가지고 있어 항산화 효과가 뛰어날 것으로 예상되며[28], 한련초 추출물의 뛰어난 항산화 효과에도 이들이 상당히 기여했을 것으로 예상된다. 하지만 각 물질들이 어느 정도로 전체적인 항산화효과에 기여했을지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 고 찰

피부 내에서 생성된 활성산소종은 세포의 구성성분인 단백질, DNA 및 세포막의 지질 등을 손상시킬 뿐만 아니라 콜라겐, 엘라스틴 등의 세포외기질을 분해하는 MMPs의 발현을 촉진시켜 피부노화를 가속화시킬 수 있다. 따라서 세포 내 활성산소종을 소거할 수 있는 항산화 물질은 피부노화를 억제하는 데에 도움이 된다. 본 연구에서는 한련초 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 대상으로 한련초의 피부보호 소재로의 가능성을 확인하기 위하여 활성산소종으로 매개되는 피부의 손상 및 광노화 과정에서의 피부 보호효과를 확인하고자 하였다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 활성산소종 소거활성 평가의 결과에서 Ecl-EtOAc의 경우 잘 알려진 항산화제인 L-ascorbic acid 보다 활성산소종 소거활성이 2.7배 이상 뛰어나 한련초의 우수한 항산화효과를 반영해주었다. 세포 내 활성산소종 소거활성 평가의 결과, 두 시료 모두 세포 수준에서도 활성산소종을 소거할 수 있음을 확인하였으며, 이때 Ecl-EtOAc의 소거활성이 더 뛰어났다. H_2O_2 로 유도된 세포손상에 대한 보호효과 평가의 결과, 두 시료 모두 농도의존적이지는 않았지만 모든 농도에서 세포보호 효과를 보여주었으며 가장 뛰어난 보호효과를 가진 실험군은 Ecl-EtOAc를 세포독성이 없는 최고농도인 32 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 군이었다. 1O_2 으로 유도된 사람 적혈구 광용혈에 대한 보호효과 평가의 결과, 두 시료 모두 NC군에 비하여 큰 τ_{50} 값을 나타내 적혈구의 용혈을 지연시키는 데 효과가 있음을 확인하였으며 본 실험 내 최고농도인 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 Ecl-EtOAc를 처리한 군에서 가장 뛰어난 보호효과를 확인하였다. 결론적으로 활성산소종 소거능은 에틸아세테이트 분획물인 Ecl-EtOAc이 50% 에탄올 추출물인 Ecl-EtOH보다도 큰 활성을 나타내었다. 이는 한련초 추출물중 항산화 활성 성분인 50% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획물에 더 많이 포함될 수 있음을 시사한다.

엘라스타제 저해활성 평가의 결과, 두 시료 모두 엘라스타제의 활성을 억제하는 것을 확인하였으며 특히 본 실험 내 최고농도인 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 Ecl-EtOAc를 처리한 군에서 가장 높은 엘라스타제 저해활성을 확인하였다. 피부 광노화 과정에서 엘라스타제는 콜라게네이즈와 함께 세포외기질인 콜라겐 및 엘라스틴 등의 탄력

을 유지시키는 단백질을 파괴시키는 대표적인 matrix metalloproteinases (MMPs)이다. 따라서 MMPs의 저해활성, 즉 엘라스타제의 저해활성은 광노화 억제에서 중요하다. 본 연구 결과에서 한련초 추출물 및 분획물은 모두 엘라스타제 저해활성을 나타냈으며 특히 에틸아세테이트 분획물에서 더 큰 저해활성을 보였다. 따라서 한련초 추출물 및 분획물의 엘라스타제 저해활성은 피부 광노화 억제를 위한 화장품 소재로서 적합한 것으로 판단된다.

저자들의 연구에 앞서 Venkatesan[18] 등(2008)은 한련초 에테르(petroleum ether) 추출물(사포닌 분획물)에 대한 항균활성을 측정하여 보고하였다. 에테르 추출물은 추출 용매의 특성상 매우 비극성 물질들이 주로 많이 포함된다. 이들과는 달리 저자들은 극성이 매우 큰 50% 에탄올 추출물 및 중간 정도의 극성을 갖는 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 항균활성을 측정하였다. Disc diffusion assay를 이용한 항균활성 측정의 결과, Ecl-EtOAc 처리군을 대상으로 한 실험에서 *A. niger*를 제외한 네 종류의 균주에서 저해환을 나타내었으며 특히 *S. aureus*에 대해서는 대조군으로 사용한 methyl paraben과 동일한 수준의 저해환을 보여 그람 양성균에 대해 항균활성이 특히 뛰어남을 확인하였다. MIC 측정의 결과, Ecl-EtOAc 처리군에서 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*에 대하여 각각 78, 625, 156, 625 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타냈으며 이는 양성 대조군으로 사용된 methyl paraben 보다 더 뛰어난 항균활성이었다. 하지만 *A. niger*에 대해서는 실험에서 사용된 최고 농도인 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 항균활성은 나타나지 않았다.

이상의 결과를 통해 한련초가 우수한 항산화, 항노화 및 항균 효과를 가지고 있음을 검증하였으며, 기능성 화장품 원료 및 건강기능식품의 원료 등으로 상당한 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

5. 결 론

본 연구에서는 한련초 추출물/분획물을 대상으로 항산화, 항노화 및 항균활성을 측정하여 활성산소 및 미생물로부터 피부를 보호하는 화장품소재로서의 응용 가능성을 검토하고자 하였다. 한련초 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 라디칼 소거활성

(FSC₅₀) 측정 결과, 각각 94.45, 17.28 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 비교물질인 α -tocopherol은 8.58 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 총 항산화능(OSC₅₀)은 각각 3.56, 0.48 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 에틸아세테이트 분획물의 OSC₅₀은 비교물질인 L-ascorbic acid (1.30 $\mu\text{g/mL}$) 보다 약 2.7배 큰 활성을 나타냈다. 세포 내 활성산소종 소거능은 두 시료 모두 농도 의존적인 소거활성을 나타냈다. H₂O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과의 측정 결과, 두 시료 모두 모든 농도에서 세포보호효과를 나타냈다. 32 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 에틸아세테이트 분획물은 가장 높은 보호효과(PC군 대비 약 13.4%)를 보였다. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구 광용혈에 대한 보호효과의 측정결과, 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 에틸아세테이트 분획물을 처리한 군은 음성 대조군 대비 약 6.3배 이상의 보호효과를 나타냈다. Hs68를 이용한 엘라스타제 저해활성은 에틸아세테이트 분획물이 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 큰 저해 활성을 나타냈다, 항균활성을 측정 결과, 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 MIC는 각각 *S. aureus* (2,500, 78 $\mu\text{g/mL}$), *E. coli* (-, 625 $\mu\text{g/mL}$), *P. aeruginosa* (5,000, 156 $\mu\text{g/mL}$), *C. albicans* (-, 625 $\mu\text{g/mL}$)이었으나 *A. niger*에 대한 저해활성은 보이지 않았다. *A. niger*를 제외한 실험균주 모두에서 MIC로 비교했을 때 에틸아세테이트 분획물은 methyl paraben 보다도 훨씬 큰 항균활성을 나타냈다. 이상의 결과를 통해 한련초추출물은 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 피부 보호 소재 또는 천연 방부제로서 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

Reference

1. W. A. G. Bruls, H. van Weelden, and J. C. van der Leun, Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose, *Photochem. photobiol.*, **39**(1), 63 (1984).
2. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
3. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, Cell Function and Disease, 209, Springer, Boston (1988).
4. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress-new approaches for their evaluation, *Biomed. Pharmacother.*, **53**(4), 181 (1999).
5. B. Poljšak and R. Dahmane, Free radicals and extrinsic skin aging, *Dermatol. Res. Pract.*, **2012**, 4 (2012).
6. F. R. de Gruijl, Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15**(5), 316 (2002).
7. H. U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415 (2000).
8. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.*, **138**(11), 1462 (2002).
9. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**(4), 324 (2007).
10. J. Y. Cho, J. H. Moon, and K. H. Park, Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**(6), 1403 (2000).
11. J. H. Wee and K. H. Park, Isolation of 4-hydroxycinnamic acid, 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid, and 3, 4-dihydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci. Biotechnol.*, **10**(5), 84 (2001).
12. A. Staudinger, Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines, 263, Springer, Boston, (2011).
13. M. I. Galinato, K. Moody, and C. M. Piggins, Upland rice weeds of South and Southeast Asia, 20, IRRI, Philippines (1999).
14. S. Dixit and M. Achar, Study of Bhringaraja (*Eclipta alba*) therapy in jaundice in children, *J. Sci. Res. Plant Med.*, **2**(4), 96 (1981).
15. H. Wagner, B. Geyer, Y. Kiso, H. Hikino, and G. S. Rao, Coumestans as the main active principles of the liver drugs *Eclipta alba* and *Wedelia calendulacea*1, *Planta Medica*, **52**(5), 370 (1986).

16. P. Pithayanukul, S. Laovachirasuwan, R. Bavovada, N. Pakmanee, and R. Suttisri, Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom, *J. Ethnopharmacol.*, **90**(2), 347 (2004).
17. D. I. Kim, S. H. Lee, J. H. Choi, H. S. Lillehoj, M. H. Yu, and G. S. Lee, The butanol fraction of *Eclipta prostrata* (Linn) effectively reduces serum lipid levels and improves antioxidant activities in CD rats, *Nutr. Res.*, **28**(8), 550 (2008).
18. V. G. Khanna and K. Kannabiran, Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(11), 2737 (2008).
19. R. K. Roy, M. Thakur, and V. K. Dixit, Hair growth promoting activity of *Eclipta alba* in male albino rats, *Arch. Dermatol. Res.*, **300**(7), 357 (2008).
20. S. Sharma and M. S. Sikawar, Wound healing activity of ethanolic extract of leaves of *Eclipta alba*, *Pharmacogn. Mag.*, **4**(13), 108 (2008).
21. V. Bondet, W. Brand-Williams, and C. Berset, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH · free radical method, *LWT-Food Sci. Technol.*, **30**, 609 (1997).
22. S. J. Stohs and D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.*, **18**(2), 321 (1995).
23. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: Implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol.*, **74**(2), 283 (2001).
24. S. Vincent, Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids, *Semin. Hematol.*, **26**(2), 105 (1989).
25. S. P. Stratton and D. C. Liebler, Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of β -carotene and α -tocopherol, *Biochemistry*, **36**(42), 12911 (1997).
26. K. P. Mansoorali, T. Prakash, D. Kotresha, K. Prabhu, and N. Rama Rao, Cerebroprotective effect of *Eclipta alba* against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats, *Phytomedicine*, **19**(12), 1108 (2012).
27. D. Manvar, M. Mishra, S. Kumar, and V. N. Pandey, Identification and evaluation of anti hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*, *J. Ethnopharmacol.*, **144**(3), 545 (2012).
28. P. G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**(7), 1035 (2000).