

편백나무 잎 추출물의 항산화 활성과 성분분석에 관한 연구

이동숙 · 임명선 · 권순식 · 김선영 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품융합기술연구소
(2011년 10월 11일 접수, 2011년 11월 10일 심사, 2011년 11월 16일 채택)

Antioxidative Activity and Componential Analysis of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract

Dong Sook Lee, Myoung Sun Lim, Soon Sik Kwan, Sun Young Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea

(Received October 11, 2011; Revised November 10, 2011; Accepted November 16, 2011)

본 연구에서는 편백나무 잎 추출물의 항산화 효능 평가와 성분 분석을 통하여 편백나무 잎의 항노화 기능성 화장품 원료로서의 이용 가능성을 평가하였다. Luminol 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 편백나무 잎 추출물의 총항산화능은 에틸아세테이트 분획(0.22 $\mu\text{g/mL}$)과 아글리콘(aglycone) 분획(0.20 $\mu\text{g/mL}$)에서 모두 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$)보다 약 7배 더 큰 항산화 효능을 나타내었다. Rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 편백나무 잎 추출물의 세포 보호 효과를 측정하였을 때 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획 모두 농도 의존적(5~25 $\mu\text{g/mL}$)으로 세포보호효과를 나타내었다. 타이로신네이즈의 활성 저해 효과(IC_{50})는 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 각각 74.43, 53.80 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며 아글리콘 분획의 경우 강력한 미백제로 알려진 arbutin (226.88 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 약 4배 정도 더 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 편백나무 잎 추출물의 분획은 TLC 크로마토그램에서 3개의 띠를 나타내었고, HPLC 크로마토그램(360 nm)은 3개의 피크를 보여주었다. 분리된 3가지 성분은 taxifolin, quercetin, 그리고 Kaempferol로 확인되었다. 이상의 결과들은 편백나무 잎 추출물의 분획들은 1O_2 을 비롯한 활성산소종을 소거하고 활성산소종에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계에서, 특히 태양자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 시사한다. 편백나무 잎 추출물의 분획들은 항산화나 미백용 화장품에 응용가능성을 확인하였다.

In this study, the evaluation of antioxidative activity and componential analysis of *C. obtusa* leaf extracts was carried out. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC_{50}) of *C. obtusa* leaf extracts on ROS generated in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction (OSC_{50} ; 0.22 $\mu\text{g/mL}$) and aglycone fraction of *C. obtusa* leaf extracts (0.20 $\mu\text{g/mL}$) showed about 7 times more prominent ROS scavenging activity than L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$). The cellular protective effects of fractions obtained from *C. obtusa* leaf extracts on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethyl acetate fraction and aglycone fraction of *C. obtusa* leaf extracts showed the cellular protective effects in a concentration dependent manner (5~25 $\mu\text{g/mL}$). The inhibitory effect (IC_{50}) of ethyl acetate fraction and aglycone fraction on tyrosinase exhibited 74.43 and 53.80 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The aglycone fraction showed four times higher tyrosinase inhibitory effect than arbutin (226.88 $\mu\text{g/mL}$), known as a whitening agent. The aglycone fraction of *C. obtusa* leaf extracts showed three bands in TLC chromatogram and three peaks in HPLC chromatogram (360 nm). Three compounds were identified as taxifolin, quercetin and kaempferol. These results indicate that the fractions of *C. obtusa* leaf extracts can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging 1O_2 and other ROS, and protect cellular membranes against reactive oxygen species. The fractions of *C. obtusa* leaf extracts can be applicable to new functional cosmetics for antioxidan and whitening effects.

Keywords: *Chamaecyparis obtusa* leaf extracts, antioxidative activity, flavonoids, taxifolin, quercetin

1. 서 론

현대의학의 발달로 평균수명이 연장되고 삶의 질 향상과 건강하고 아름다운 삶에 대한 욕구가 증가함에 따라 피부 미용에 대한 관심이

확대되고 있다. 이에 따라 젊고 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 항노화 및 항산화 기능성 원료 및 화장품에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

피부 노화는 인체의 노화와 더불어 피부에 나타나는 변화이며 피부 내 생리적 요인들의 기능이 감소하여 발생하는 내인성노화(intrinsic aging)와 외부 환경의 산화적 스트레스에 의한 외인성노화(exogenous

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

2. 실험

aging)로 구분할 수 있다. 외인성 노화의 대표적인 예는 태양광선 노출에 의한 광노화이다. 태양광선에 노출된 피부에서는 자외선의 작용으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 피부는 항산화와 접촉하고 있으며 계속해서 태양 자외선에 노출되기 때문에 활성산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 실질적으로 증가하고 있다[1-4]. 활성산소종은 산소 중심의 라디칼인 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 를 비롯하여 비라디칼종인 O_2 , H_2O_2 , 그리고 생체 성분들과 활성산소종의 반응으로 발생할 수 있는 $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등을 포함한다. 이러한 활성산소종은 생체 내 존재하는 광증감제 분자에 의해 생성된다. 광증감반응은 Type I 또는 Type II 형태로 일어나며, Type I 반응의 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, Type II 반응은 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 그리고 1O_2 등을 생성시킨다[5-7]. 이러한 활성산소종에 의한 산화적 스트레스는 세포 성분들에 대한 손상을 야기시킨다. 지질 과산화, 단백질 산화, DNA 손상 등을 일으켜 노화 및 성인병 질환을 유발한다. 또한 탄력 섬유인 콜라겐, 엘라스틴 그리고 히아루론산과 같은 진피의 기질성분들을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 증가시키고 멜라닌 생성반응을 촉진시킨다[8,9]. 결국에는 피부의 탄력감소, 주름 생성, 기미 및 주근깨 생성 등이 특징으로 나타나는 피부노화가 가속화된다고[10,11]. 피부는 이러한 ROS의 산화적 손상을 예방하고 차단하기 위한 항산화 방어망을 구축하고 있다. 그 예로 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 등의 효소적 항산화제와 vitamin C, vitamin E, β -carotene, 플라보노이드 등의 비효소적 항산화제가 존재한다. 이들은 ROS를 직접 소거하거나 또는 ROS에 의한 연쇄 반응을 차단하여 세포 및 피부 구성 성분들을 산화적 손상으로부터 보호한다[12]. 따라서 산화적 스트레스로 인한 과잉의 ROS가 생성될 때 이를 효과적으로 감소시켜 피부 광노화를 예방하고 최소화하기 위한 항산화제의 개발이 중요한 연구과제가 되고 있다. 최근 피부에 보다 안전하고 강한 효과를 나타내는 천연 항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있으며 천연물로부터 기능성물질을 탐색하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 또한 수목의 목재, 잎 등의 추출성분 중 생리 활성이 뛰어난 성분들을 이용한 기능성 물질로서의 활용방안도 활발히 연구되고 있다[13-15].

본 연구에서 ROS에 의한 피부 산화적 손상의 대응책으로 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*) 추출물을 사용하였으며, 편백나무는 측백나무과(Cupressaceae)에 속하는 상록침엽수로 크기는 높이가 40 m, 지름은 2 m에 이른다. 가지는 옆으로 나란히 퍼지며 수피는 적갈색이고 세로로 길게 갈라진다. 비늘처럼 생긴 조그만 잎은 2장씩 서로 마주보며 4장씩 모여 달려있으며 위쪽과 아래쪽에 달리는 잎은 짧고 끝이 뾰족하지만 좌우에 달리는 잎은 약간 길며 아래쪽에는 Y자형의 흰색 무늬가 있다. 편백나무에서 추출한 정유 성분들이 스트레스 완화와 심리적 안정에 효과가 있다고 보고되어 있으며 심폐기능을 강화시키며 기관지 천식에 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 강력한 살균작용으로 아토피 등의 알레르기 피부질환에 효과가 있으며 유해물질 중화 작용 및 피부 진정작용 등이 알려져 있다[16-20].

그러나 광노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소종에 대한 산화적 손상에 대한 보호 작용과 그 생리활성 성분에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 편백나무 잎 추출물을 제조하여, 활성산소 소거활성 및 1O_2 에 대한 세포막 보호 효과 그리고 편백나무 잎의 주요 생리활성 물질을 동정하여, 항산화 및 항노화 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 검토하고자 한다.

2.1. 기기 및 시약

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

(+)- α -Tocopherol, L-ascorbic acid, arbutin, EDTA, luminol, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), 헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 효소로 사용된 타이로신네이즈(9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 편백나무 잎은 전남 장성군 편백나무 숲에서 채취한 것을 2011년 6월 구입하여 사용하였다.

2.2. 편백나무 잎의 분획 및 추출

건조된 편백나무 잎 100 g을 잘게 자른 후 70% 아세톤 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하고 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻어서 이를 실험에 사용하였다. 또한 70% 아세톤 추출물은 감압 농축한 후 물과 헥산을 이용하여 엽록소, 지질 등의 비극성 성분을 제거하였으며, 이후 에틸아세테이트로 3회 반복 처리한 분획을 감압 농축하여 파우더를 얻었다.

에틸아세테이트 파우더 일질량에 5% H_2SO_4 및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류 냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층을 분획하고 이를 감압 농축하여 얻은 당이 제거된 아글리콘 파우더(탈글리코실화된 분획)를 실험에 사용하였다.

2.3. 편백나무 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

홀 전자를 갖는 원자단을 free radical이라 하며 이는 짝을 짓지 않은 활성 전자를 가지고 있기 때문에 불안정하고, 매우 큰 반응성을 갖는다. Free radical의 이러한 큰 반응성은 피부뿐만 아니라, 신체 구성 성분들에 손상을 주며 결과적으로 노화를 가속화시킨다. DPPH 실험법은 이러한 free radical의 소거능을 확인하는 대표적인 실험으로, 비교적 간편하다는 장점이 있다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 소거 활성 저해율을 나타내었다. Free radical 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, $\mu g/mL$)로서 표기하였다.

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

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계의 Fenton 반응과 그 후의 연쇄반응에 의해 각종 활성산소종(O₂^{•-}, •OH 그리고 H₂O₂)가 생성되며, 철은 이 반응의 촉매제로서 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 여러 가지 활성산소종에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 총항산화능은 luminol이 활성산소종에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 편백나무 잎 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣고 혼합하였다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성능은 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μg/mL)로서 표기하였다.

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

2.4. 광용혈법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 연구는 시험모델로서 적합한 점이 많다. 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 이 실험법을 이용하여 알아볼 수 있다. 무엇보다 자외선에 의한 피부노화를 방어할 수 있는 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 사람 적혈구 세포를 이용한다는 점이 실질적이다. 따라서 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

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, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 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 optical density는 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 편백나무 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하고 압소에서 30 min 동안 미리 항온배양(pre-incubation) 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Aglycone Fractions from *C. obtusa* Leaf Extracts

Column	Luna 5 μ C ₁₈ (L: 250 mm, LD: 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2% Acetic acid : 0.5% acetic acid in H ₂ O in 50% acetonitrile solution (50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 × 20 × 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 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. 편백나무 잎 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

대조군은 τ₅₀이 30.6 min으로 오차범위 ± 0.3 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

2.5. 타이로신네이즈 저해활성 측정

멜라닌 생성과정에서 tyrosinase는 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 걸쳐 DOPA-quinone으로 산화되는 과정의 전체 반응 속도를 결정하는 핵심효소로 작용한다. 따라서 타이로신네이즈의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 유용하다. L-tyrosine (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 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타이로신네이즈 저해 활성은 0.1 mL 타이로신네이즈의 활성을 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC₅₀, μg/mL)로 표기하였다.

2.6. TLC 및 HPLC를 이용한 편백나무 잎 추출물의 플라보노이드 분석

편백나무 잎 추출물 분획 중에서 활성산소종 소거능과 ¹O₂에 대한 세포 보호 효과가 우수하게 나타난 아글리콘 분획(탈글리코실화된 분획)을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 μm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 아글리콘 분획의 전개용매는 헥산 : 에틸아세테이트 : 아세트산 = 21 : 14 : 5 (v/v)을 사용하여 분석하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 NP-PEG 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다.

HPLC 분석은 기율기 용리법으로 분리하였고, 아글리콘 분획의 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

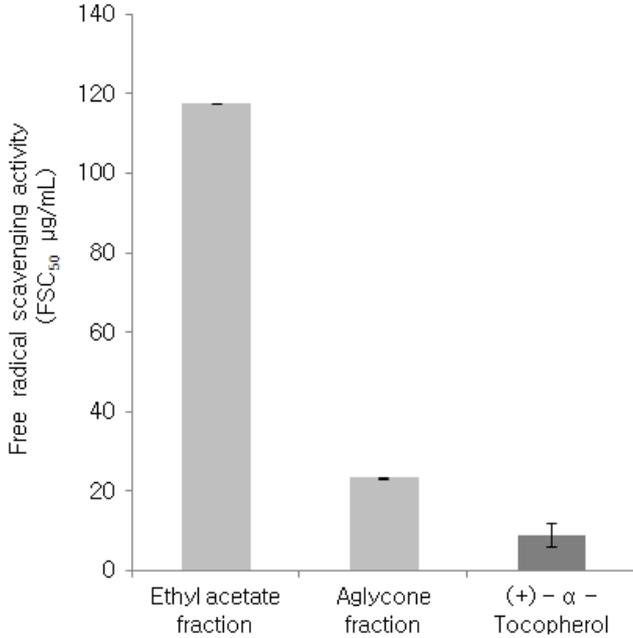


Figure 1. Free radical scavenging activities of *C. obtusa* leaf extract and reference.

2.7. 통계처리

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

3. 결 과

3.1. 편백나무 잎 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

(+) - α -Tocopherol, 플라보노이드 등의 항산화제는 활성산소종 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다. 편백나무 잎 추출물들의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과를 Figure 1에 나타내었다. 편백나무 잎 에틸아세테이트 분획의 경우 126.40 µg/mL, 아글리콘 분획은 23.50 µg/mL로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+) - α -tocopherol의 FSC₅₀는 8.98 µg/mL로 나타났다. 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 free radical 소거활성이 세포막의 강력한 지용성 항산화제로 알려진 (+) - α -tocopherol (FSC₅₀, 8.98 µg/mL)보다는 다소 떨어지지만, 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (FSC₅₀ 388.90 µg/mL)보다는 우수한 자유라디칼 소거활성을 나타냄을 알 수 있다[21].

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

Luminol은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420~450 nm에서 발광한다. 철 이온과 H₂O₂의 Fenton 반응에 의해 활성산소종이 생성되어 luminol과 반응한다. 편백나무 잎 에틸아세테이트 분획활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 0.2 µg/mL, 아글리콘 분획의 총항산화능은 0.2 µg/mL로 나타났다. 비교물질은 대표적인 수용성 항산화제인

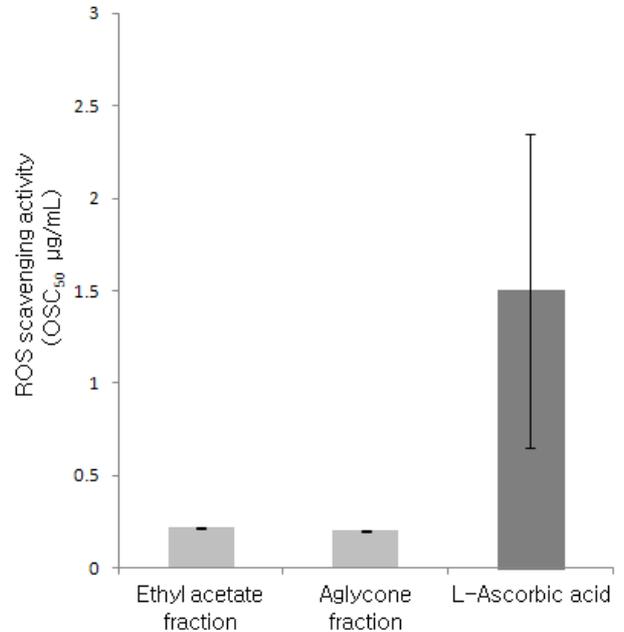


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of *C. obtusa* leaf extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

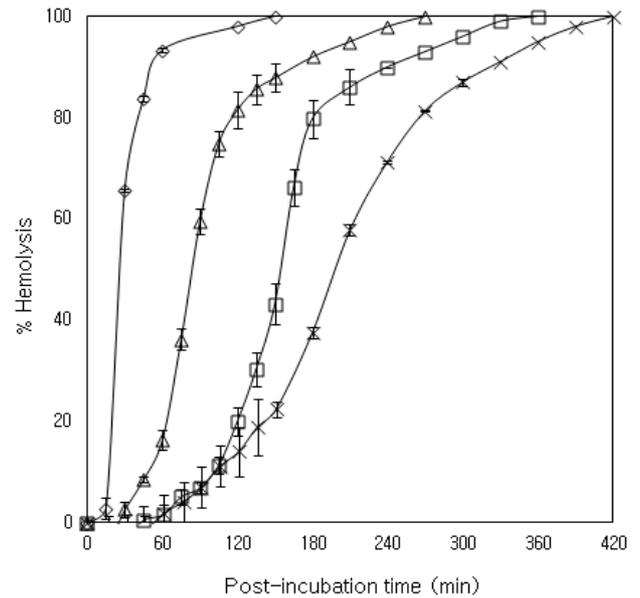


Figure 3. Cellular protective effects of aglycone fraction from *C. obtusa* leaf extracts against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30.6 ± 0.3). Irradiation time ; 15 min, pre-incubation time; 30 min, [rose-bengal] = 12 µM, concentrations of aglycone fraction from *C. obtusa* leaf extract; ◇-◇ : control, △-△ : 5 µg/mL, □-□ : 10 µg/mL, X-X : 25 µg/mL.

L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총항산화능은 1.50 µg/mL로 나타났다. 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획 모두 L-ascorbic acid보다 약 7배 정도의 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다(Figure 2).

Table 2. Effects of Extracts from *C. obtusa* Leaf and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)		
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	5	10	25
Ethyl acetate fraction of <i>C. obtusa</i> leaf extracts	53.9 ± 1.1	75.9 ± 1.0	147.7 ± 2.4
Aglycone fraction of <i>C. obtusa</i> leaf extracts	83.6 ± 1.5	152.9 ± 0.7	198.0 ± 1.5
(+)- α -Tocopherol	-	38.0 ± 1.8	-

¹⁾Control, $\tau_{50} = 30.6 \pm 0.3$ min

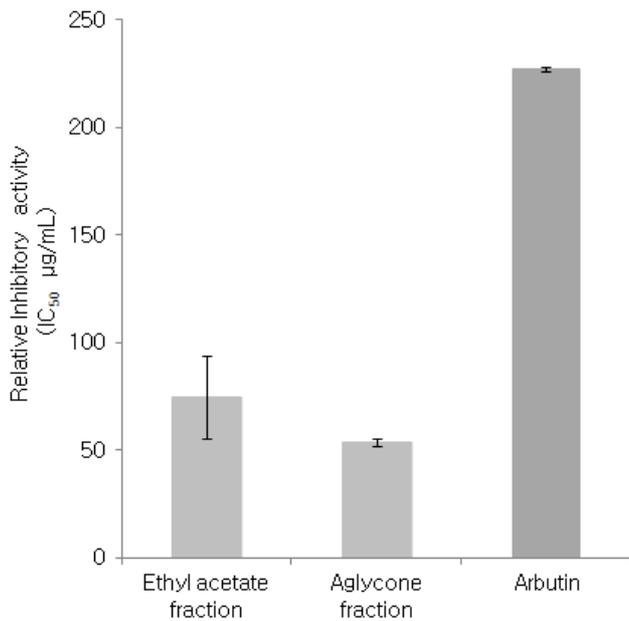


Figure 4. The effect of fractions from *C. obtusa* leaf extracts and reference on tyrosinase.

3.2. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

편백나무 잎 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 적혈구 광용혈법으로 측정하였고 아글리콘 분획의 농도에 따른 세포 보호 효과를 Figure 3에 나타내었다.

적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 편백나무 잎 추출물의 아글리콘 분획 경우는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})이 농도 범위 5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 53.9, 75.9, 147.7 min으로, 아글리콘 분획의 경우 같은 농도 범위에서 각각 83.6, 152.9, 198.0 min으로 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었다(Table 2). 편백나무 잎 추출물들의 세포보호 효과는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 에틸아세테이트 분획(75.9 min)에 비하여 아글리콘 분획(152.9 min)이 우수하게 나타났고, 비교물질로 사용한 지용성 항산화제 (+)- α -tocopherol의 세포 보호효과는 동일농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 38.0 min으로 나타났다. 특히 편백나무 잎의 아글리콘 분획은 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol와 비교하여 볼 때 동일 농도에서 약 5~6배 정도 우수한 세포보호 활성을 나타내었다.

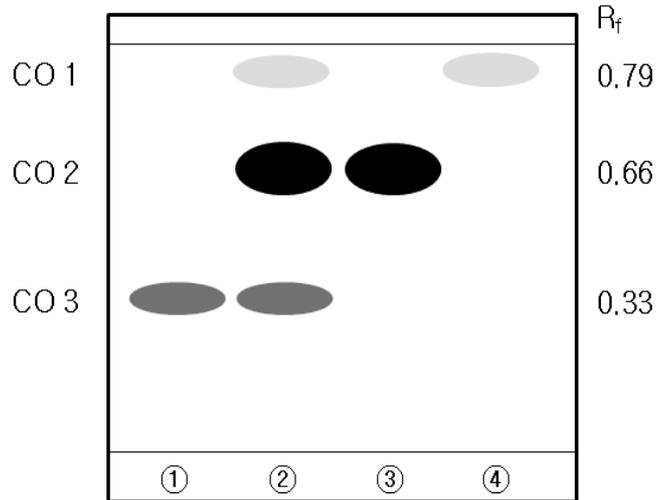


Figure 5. TLC chromatogram of aglycone fraction from *C. obtusa* leaf and references. Eluent system: 21 (n-hexane) : 14 (ethyl acetate) : 5 (acetic acid) (v/v). ①: taxifolin, ②: aglycone fraction of *C. obtusa* leaf extracts, ③: quercetin, ④: kaempferol.

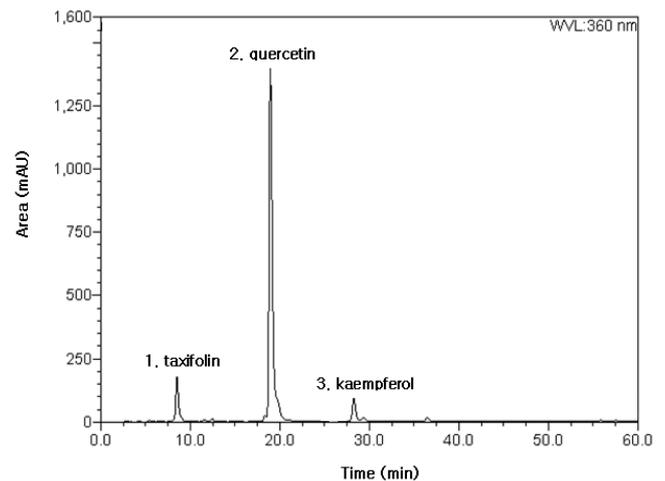


Figure 6. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *C. obtusa* leaf extracts at $\lambda = 360$ nm

3.3. 타이로신네이즈 저해 활성

타이로신네이즈는 tyrosine hydroxylase 기능과 dopa oxidase 기능, DHI oxidase 기능으로 멜라닌을 생성하는 효소로서 타이로신네이즈의 활성억제 작용을 통해 미백활성을 측정할 수 있다.

편백나무 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 경우에 타이로신네이즈 저해활성(IC₅₀)이 74.43 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획의 타이로신네이즈 저해활성은 53.80 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며, 비교물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해서도 큰 타이로신네이즈 저해활성을 보였다(Figure 4). 비교물질인 arbutin에 비해 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 타이로신네이즈 저해활성은 각각 3.05, 4.22배 더 크다는 것을 알 수 있다. 따라서 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료된다.

Table 3. Inhibitory Activity of Extracts from *C. obtusa* Leaf and Reference on Tyrosinase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
Ethyl acetate fraction of <i>C. obtusa</i> leaf extracts	74.43 ± 19.30
Aglycone fraction of <i>C. obtusa</i> leaf extracts	53.80 ± 1.60
Arbutin	226.88 ± 1.03

Table 4. HPLC Quantitative Analysis Data of Aglycone Fraction from *C. obtusa* Leaf Extracts

No.	Ret. time (min)	Peak name	Area (mAu)	Rel. ratio (%)
1	8.41	taxifolin	65.46	9.26
2	19.0	quercetin	593.77	83.97
3	28.33	kaempferol	47.88	6.77
Total			707.11	100.00

3.4. 편백나무 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

편백나무 잎 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 5에 나타내었다. Figure 5는 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획을 당제거한 아글리콘 분획의 TLC 크로마토그램이며, 3개의 띠로 분리되었다. 공통적으로 확인된 3개의 띠들은 자외선 및 NP-PEG 발색법으로 확인한 결과, R_f 값이 0.79인 CO1은 kaempferol로 나타났고, R_f 값이 0.66인 CO2는 quercetin, R_f 값이 0.33인 CO3은 taxifolin으로 나타났다.

편백나무 잎 추출물 중 아글리콘 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 6과 같다. 크로마토그램은 3개의 peak로 나타났다. 각각의 peak를 동정하기 위하여, Figure 6에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압 건조시킨 후 얻은 파우더를 에탄올로 녹인 후 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. HPLC 분석 결과 편백나무 잎 추출물 중 아글리콘 분획에 대한 Figure 5의 TLC 크로마토그램에서 R_f 값이 가장 큰 띠인 CO1 (R_f 0.79)은 Figure 7의 HPLC peak 3 (kaempferol)로, CO2 (R_f 0.66)는 peak 2 (quercetin), CO3 (R_f 0.33)는 peak 1 (taxifolin)과 일치함을 확인하였다. HPLC로 밝혀낸 각각의 성분에 대한 정량적인 데이터를 Table 4에 정리하여 나타내었다.

4. 고찰

피부에서 활성산소종의 생성은 광증감제 분자에 의한 자외선의 흡수로 시작된다. Type II 형태의 광증감반응의 주 생성물은 반응성이 매우 큰 ¹O₂를 비롯하여 O₂^{•-}, H₂O₂, •OH 등을 포함한다. 체내 항산화 효소인 SOD는 O₂^{•-}를 H₂O₂로 전환시킨다. O₂^{•-}과 H₂O₂는 반응성이 약하여 직접적으로 조직손상에 참여하는 경우가 드물지만 •OH과 같은 반응성이 매우 큰 라디칼 종의 생성에 참여한다. 다시 말해, O₂^{•-}는 Fe(III)와 같은 전이금속을 환원시킬 수 있고, 환원된 Fe(II)는 과산화수소를 환원시켜 •OH을 생성시킨다. 태양 자외선에 피부가 노출되면 노출부위에 철의 수준이 증가하고 또한 땀에도 라디칼 반응을 촉매할 수 있는 철 및 구리와 같은 전이금속이 풍부하다. 따라서 Fenton 반응에 의해 •OH이 생성될 수 있다. ¹O₂과 •OH은 광손상에 있어서 중요한 역할을 한다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화 반응 개시, 단백질 및 DNA의 산화, 진피의 결합 조직 성분인 콜라겐, 엘라스틴 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성,

멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속화시킨다.

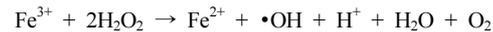
적혈구를 이용한 광용혈 실험은 활성산소종에 의한 광노화 또는 세포손상의 실험 모델로 매우 적합한 점이 많다. 이 연구에서는 광증감제로 rose-bengal을 사용하여 ¹O₂ 등의 활성산소종을 생성시켰다. ¹O₂은 적혈구 세포막의 지질 과산화반응을 일으키고 막단백질의 산화, 구조 단백질의 절단, 지질과산화물로부터 2차 라디칼의 생성, 그리고 헤모글로빈에서 방출된 철과 O₂^{•-}, H₂O₂의 Fenton 반응으로 •OH을 생성시킬 수 있다. 결국 ¹O₂으로 개시된 적혈구막의 지속적인 손상은 적혈구의 용혈로 이어진다.

¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈에 있어서 편백나무 잎 추출물 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 5~25 µg/mL의 농도 범위에서 농도 의존적으로 적혈구 세포의 파괴를 억제하였다. 이 두 가지 분획은 모두 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 큰 세포 보호활성을 나타내었다. 또한 편백나무 잎 추출물의 아글리콘 분획은 5, 10, 25 µg/mL의 농도에서 같은 농도의 에틸아세테이트 분획보다 훨씬 큰 세포보호 활성을 보여주었다. 이는 아마도 에틸아세테이트 분획의 성분들은 플라보노이드 배당체로서 세포막으로의 침투가 어렵고 반면에 아글리콘 분획은 당이 제거된 플라보노이드(quercetin, taxifolin, kaempferol)로 인하여 세포막으로의 침투가 용이하고 세포막 불포화지질의 자동산화반응을 효율적으로 억제함으로써 적혈구 세포막을 보호하는 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 편백나무 잎 추출물의 세포막 보호 작용은 ¹O₂의 소광, 그리고 이차적으로 암반응에서 생성된 O₂^{•-}, H₂O₂, •OH 등의 활성산소 소거작용, 철이온과의 킬레이팅에 의한 활성산소의 생성 억제, 항산화 성분의 세포막으로의 침투 및 지질 과산화반응 차단 등 다양한 요인들이 복합적으로 일어난 결과라고 사료된다.

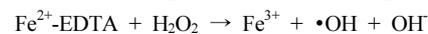
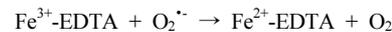
생명체에 대한 O₂^{•-}와 H₂O₂의 독성 작용은 철이온 의존성 •OH의 생성에 기인된다. 생체계에 있어서 •OH을 생성시키는 중 반응은 다음과 같은 Fenton 반응으로 알려져 있다.



그러나 Fe³⁺염과 과산화수소의 반응으로도 •OH이 생성될 수 있다고 보고되고 있다.



특히 Fe³⁺-EDTA를 과산화수소와 함께 반응시키면 •OH이 생성되는데 이때 SOD를 첨가할 경우 •OH 생성이 거의 완벽하게 억제되는 것으로부터 다음과 같은 일련의 반응과정들을 통하여 •OH이 생성되는 것으로 받아들여지고 있다.



따라서 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 존재할 수 있는 활성산소종은 O₂^{•-}, H₂O₂ 및 •OH이다. Luminol은 이들 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광하는 것으로 알려져 있다. 이 계에서 측정된 활성산소 소거활성은 다양한 활성산소의 소거작용과 철이온과의 킬레이팅 작용에 의한 활성산소 생성 억제 작용까지 포함되기 때문에 총항산화능으로 표현될 수 있다. 편백나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획 모두 강력한 수용성 항산화제인

ascorbic acid보다도 훨씬 큰 총항산화능을 보여주었다. 따라서 이들 추출물들은 모두 수용성 비타민 C를 대신하여 화장품에 응용가능성이 높음을 시사한다.

활성산소종은 광노화를 포함하는 피부병 질환을 일으킨다고 보고되고 있다. 이러한 측면에서 볼 때, 피부에 있어서 활성산소종의 생성을 감소시키는 일은 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다. 본 연구에서 편백나무 잎 추출물들은 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 광용혈에서의 현저한 세포 보호활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 활성산소종의 소거활성 및 철이온 킬레이팅 효과 등이 우수함을 보여주었다. 따라서 편백나무 잎 추출물은 피부 노화 방지를 위한 기능성 화장품 소재로서의 응용이 가능하다고 사료된다.

5. 결 론

1) 편백나무 잎 추출물의 free radical 소거 능력(FSC_{50})은 에틸아세테이트 분획의 경우 117.5 $\mu\text{g/mL}$, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone 분획의 경우 23.50 $\mu\text{g/mL}$ 으로 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (8.98 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 다소 떨어지지만, 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (FSC_{50} 388.9 $\mu\text{g/mL}$)보다는 우수한 자유라디칼 소거활성을 나타냈다.

2) 편백나무 잎 추출물의 활성산소 소거활성(OSC_{50})은 에틸아세테이트 분획 0.22 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 이는 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$)에 비하여 약 7배 더 우수한 활성산소 소거 능력을 나타냈다.

3) $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 편백나무 잎 추출물 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 농도 범위(5~25 $\mu\text{g/mL}$)에서 농도 의존적으로 $^1\text{O}_2$ 에 의해 유도된 용혈을 크게 억제하였다.

4) 편백나무 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 타이로신네이즈 저해활성(IC_{50})이 각각 74.43, 53.80 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났고 아글리콘 분획의 경우 arbutin (226.88 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 4배 정도 더 우수한 타이로신네이즈 저해 활성을 나타냈다.

5) 편백나무 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 아글리콘 분획의 TLC는 3개의 띠를 나타내었고, 이때 CO_1 , CO_2 및 CO_3 는 각각 kaempferol, quercetin, taxifolin으로 확인하였다.

6) 아글리콘 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 3개의 peak를 나타냈고, 그 용리 순서는 taxifolin, quercetin, kaempferol이었으며, 조성비는 taxifolin 9.26%, quercetin 83.97%, kaempferol 6.77%로 quercetin 함량이 가장 큰 것으로 나타났다.

이상의 결과들은 편백나무 잎 추출물의 항산화 활성과 더불어 편백나무 잎 추출물 성분에 대한 분석과 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 타이로신네이즈 저해활성 측정으로부터 편백나무 잎 추출물

의 항산화, 항노화 및 미백 화장품으로의 활용 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. D. Harman, *Mutat. Res.*, **275**, 257 (1992).
2. B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettner, *Photochem Photobiol.*, **59**, 1 (1994).
3. L. Packer, *Free Radical Damage and its Control*, ed. C. A. Rice-Evans, R. H. Burdon, 28, 239, Elsevier Science, Amsterdam (1994).
4. B. A. Jurkiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buetter, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
5. E. Cadenas, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
6. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 137 (1986).
7. J. C. Fantone and P. A. Ward, *Ann. J. Path.*, **107**, 395 (1982).
8. J. H. Jang, C. Lee, S. C. Kim, J. W. Chung, and C. I. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**, 79 (2010).
9. S. E. Lee, E. M. Ju, and J. H. Kim, *Environ. Toxicol.*, **15**, 147 (2000).
10. W. Ma, M. Wlaschek, P. Brenneisen, L. A. Schneider, C. Hommel, C. Hellweg, H. Sauer, M. Wartenberg, G. Herrmann, C. Meewes, P. Boukamp, and K. Scharffetter-Kochanek, *Experimental Cell Research*, **274**, 299 (2002).
11. S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **23**, 75 (1997).
12. R. G. Allen and M. Tresini, *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 463 (2000).
13. B. A. Jurkiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buetter, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
14. K. H. Jang and S. S. Roh, *The Journal of Daejeon Oriental Medicine*, **13**, 289 (2004).
15. I. K. Lee, B. S. Yun, J. P. Kim, S. H. Chung, G. S. Shim, and I. D. Yoo, *Kor. J. Pharmacogn*, **29**, 163 (1998).
16. M. J. Park, W. S. Choi, H. Y. Kang, K. S. Gwak, G. S. Lee, E. B. Jeung, and I. G. Choi, *J. Microbiology*, **48**, 496 (2010).
17. J. H. Lee, B. K. Lee, J. H. Kim, S. H. Lee, and S. K. Hong, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 391 (2009).
18. S. Koyama, Y. Yamaguchi, S. Tanaka, and J. Motoyoshiya, *Gen Pharmacol.*, **28**, 797 (1997).
19. J. K. Yang, M. S. Choi, W. T. Seo, D. Lee R. Sang, W. Han, and G. W. Cheong, *Fitoterapia*, **78**, 149 (2007).
20. H. S. Kim, S. K. Han, and J. Y. Mang, *Korean Journal of Odor Research and Engineering*, **8**, 111 (2009).
21. M. J. Kim and K. R. Im, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**, 143 (2009).