J. of Basic Sciences, Cheju Nat'l Univ.
17(1), 129~137, 2004

기초과학연구 제주대학교
17(1), 129~137, 2004

# 파리풀 (*Phryma leptostachya*) 추출액의 기능성화장품 성분 검색
## - 항산화 및 미백효과 검색 -

부 희 정 · 이 은 숙 · 김 경 범 · 김 영 대* · 이 선 주**

제주대학교 자연과학대학 화학과 · 아열대원예산업연구센터** · 방사선응용과학연구소** · 대기고등학교*

## 요 약

제주에서 자생하는 파리풀의 기능성향장품에 관계된 항산화 및 미백효과에 대한 생리활성을 검색하였다. 파리풀의 항산화 활성은 DPPH법과 NO assay를 통해 시행하였으며 비교적 비극성 쪽에서 좋은 활성을 나타내었다. 미백효과에 대한 실험은 tyrosinase inhibition assay, dopa oxidation assay, melanin contents를 이용하여 검색하였고, 우수한 활성은 보이지 않았다.

## I. 서 론

현대사회는 산업발달에 의한 환경유해물질과 같은 공해에 많이 노출되어 있고, 고령화에 따른 노인병 등 여러 가지 새로운 사회문제를 야기하고 있다. 이와 관련한 것으로서 생체 내에서 생성된 free radical이 지질과산화를 일으키고 이 지질과산화물은 다시 여러 가지 반응산물을 만들어 세포 및 각종 조직에 축적되거나 그 기능을 비정상적으로 만드는 유해한 장애를 일으켜 각종 성인병과 노화를 야기한다고 알려져 있다. 특히 이들 활성산소종은 피부노화와 색소침착의 원인으로 미용관련 산업에서도 큰 관심의 대상이 되고 있기도 하다. 생체내에서 생성된 활성산소종들은 피부 세포 및 조직 손상을 주도하는데 이들은 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화 상태 쪽으로 기울게 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 지질 과산화, 단백질 산화, 간질 성분을 파괴시키는 단백질분해효소의 활성화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기한다. 결국에는 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨 등으로 특징 지워지는 피부노화가 가속화 된다.[1,2,4,8]

따라서 피부노화 방지를 위해서는 과잉의 활성산소종 생성을 억제하고 또한 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이 필요하다. 이러한 피부노화 방지에 관하여 천연물로부터 원료를 찾으려는 연구는 세계적인 추세이며 천연에서부터 얻어지는 소재의 역할은 여러 가지로 수행될 수가 있다. 즉, 자외선 흡수제로서의 역할, 항산화제로서의 역할, 주름 개선제로서의 역할, 미백제로서의 역할, 항균 · 항염 작용 및 면역 조절제로서의 역할 등을 들 수 있다. 따라서 다양한 기후를 형성하여 특이한 식물 생태분포를 형성하는 제주도의 천연자원은 그 연구 가치가 크다고 할 수 있다.

본 연구실에서는 합성되어 사용되어지는 여러 종류의 기존 약품들이 수반하는 부작용을 없애면서, 효능이 있는 인체에 무해한 천연 생약적 성분을 검색하고, 특히 향장품 원료로서의 사용가능성을 평가하는 연구를 지속적으로 수행하고 있다.

제주도에 자생하는 식물 중에서 파리풀은 한국 · 일본 · 중국 · 히말라야산맥 · 동시베리아 등지에 분포하고 있는 식물로 줄기나 뿌리를 으깨어서 종이

에 발라 파리를 죽이기 때문에 파리풀이라 한다. 파리풀을 민간요법으로 사용한 예는 위궤양, 위암, 옴 등을 치료하는데 사용되었다는 보고가 있다. 이러한 기초 자료를 토대로 파리풀이 인체에 유용한 성분과 친피부적 성질을 조사하여 유효성분 탐색 및 기능성 화장품 등의 원료물질로서의 효과와 가능성을 검증하고자 하였다.

피부노화나 미백에 관련된 항산화 억제제의 개발에 필요한 기초 연구로서 사용되는 방법 중에 대표적인 것이 free radical 소거 효과에 대한 연구이다. 피부는 항상 산소와 접촉하고 있고, 자외선에 크게 노출되어 있어 활성산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재하고 있다. 라디칼 소거활성을 갖는 물질은 항산화활성을 나타내고, 궁극적으로 피부노화 방지효과를 기대할 수 있다. Flavonoid류의 포함하는 많은 페놀성 물질이 라디칼 소거활성을 나타내며, 화장품 첨가제로 자주 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 파리풀의 항산화 효능 검증을 위하여 DPPH를 이용하여 라디칼 저해활성을 보았고, 세포 수준에서 발생되는 활성산소종에 대한 실험 시료의 항산화 효과를 검증하기 위하여 RAW 264.7 세포에 인위적으로 NO를 과량 생성시켜 그 소거능력을 실험하였다.[4,12]

현재 동양인에게서 많은 관심과 연구의 대상인 피부미백 분야에서의 기술 개발은 melanocyte내에서의 멜라닌 생성을 억제하는 것과 melanocyte 자극물질을 조절하는 것 및 멜라닌 분비를 촉진시키는 것으로 크게 3가지 방향으로 이루어지고 있다.

피부의 미백에 도움을 주는 제품의 유효성 또는 기능을 입증하기 위해 화장품법에 고시된 *in vitro* 실험법에는 우선 타이로시네이즈(*In vitro* tyrosinase inhibition assay) 활성저해시험, DOPA 산화활성저해시험(*In vitro* DOPA oxidation inhibition assay)과 세포내의 멜라닌생성저해실험(Melanogenesis inhibition assay)이 있다. 본 연구에서도 이 세 가지 실험법을 이용하여 파리풀의 미백원료로서의 이용 가능성을 검색하였다.[3,4,9,10]

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 추출

본 연구에 사용되어진 파리풀은 2003년도 9월1일에서 10일경 제주도 남제주군 표선면에 위치한 백약봉 근경에서 채집하여 실온에서 자연 건조시킨 후 완전히 마른 시료를 파쇄하여 뿌리, 줄기, 잎 각각을 80% methanol (MeOH)로 3회 교반 추출하여 사용하였다. 농축한 MeOH 추출물을 물에 현탁시킨 후 비극성 용매부터 순차적으로 hexane, $CHCl_3$, ethylacetate(EtOAc), butanol(n-BuOH), $H_2O$을 사용하여 separate funnel에서 용매 분획하여 각각의 분획을 얻었다. 여기서 얻은 각각의 추출물 및 분획물을 항산화 작용 및 미백에 관련된 효소 및 세포실험에 사용하였다.

### 2. 세포 및 시약

Murine melanoma cell line인 B16BL6세포와 murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 제주대학교 의과대학 약리학실험실로부터 협조를 얻어 사용하였다. 세포 배양은 100units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% $CO_2$ 항온기에서 배양하였다. 시료의 라디칼 소거효과(scavenging effect)를 측정하기 위하여 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH)와 미백효과 검증을 위해 사용된 mushroom tyrosinase, L- DOPA, melanin은 sigma에서 구입하여 사용하였다. 사용된 용매들은 모두 Merck사 제품을 사용하였다.

### 3. 항산화 효과

3.1 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

시료의 항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois법을 활용하였다. DPPH(Sigma, USA) 약 2mg을 에탄올 15㎖에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 1200㎕에 DMSO

(dimethyl sulfoxide) 500㎕와 EtOH 3000㎕를 첨가시켜 vortex에서 잘 섞어준다. 준비된 DPPH 용액 450㎕에 여러 농도의 시료용액 50㎕ 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 방치 후 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517㎚의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 DPPH 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도($RC_{50}$)로 표시하였다. free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 측정하였다.

free radical scavenging activity(%)
= [A-(B-C)]/A x 100

A는 control의 흡광도이고, B는 DPPH와 시료 용액의 혼합액이며 C는 에탄올과 시료의 혼합액이다.

3.2 Nitric oxide(NO) assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 $1.5\times10^5$ cells/㎖로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료 농도 100 ㎍/㎖과 LPS 1 ㎍/㎖를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다.[5] 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 $NO_2^-$의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid] 100 ㎕를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. 540㎚는 ELISA reader를 이용하여 측정하였으며, sodium nitrite ($NaNO_2$)를 standard로 비교하였다.

## 4. 미백효과

4.1 Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성억제 효과 정도를 *in vitro*에서 확인함으로써 미백 성분의 함유 정도를 검색할 수 있다.[9,10]

Tyrosinase 억제효과는 dopachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다. 840㎕의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 50㎕의 MeOH용액 혹은 시료(1㎎/㎕)용액, 50㎕의 mushroom tyrosinase (75units/㎖, Sigma Chemical Co.)을 넣어 vortex에서 잘 섞은 후 10분간 37℃의 항온 수조에서 보관한다. 여기에 다시 60㎕의 L-tyrosine (0.6mM, Sigma Chemical Co.)을 첨가해 vortex에서 잘 섞어서 10분간 37℃ 항온 수조에서 배양한 후 475㎚에서 흡광도를 측정한다. 억제 정도는 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 첨가시켜 배양한 후의 흡광도의 차이로 살폈다. Tyrosinase 억제정도는 다음과 같이 측정하였다.

Tyrosinase inhibition (%)
= [(D-C)-(B-A)] / (D-C) ×100

A와 B는 각각 시료를 첨가한 용액의 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 넣어 배양한 후의 흡광도이고, C와 D는 각각 시료가 첨가되지 않은 용액의 효소를 넣기 전의 흡광도와 넣어서 반응 한 후의 흡광도이다.

4.2 Dopa oxidation inhibition assay

멜라닌 생성과정 중 dopa에서 dopaquinone으로 전환될 때 참여하는 dopa oxidase 활성억제정도를 cell lysate를 이용해 측정하는 방법으로 실험방법은 다음과 같다.

실험 물질 처리 마지막 날 0.25% tyrpsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고 Coulter counter로 세포수를 세어준다. 실험물질 처리군당 $2\times10^5$ 세포를 1.5㎖ tube에 각각 나눠담고 여기에 1mM L-Dopa(Sigma Chemical Co.)가 든 세포분쇄용액 100㎕을 넣고 1시간 동안 37℃에서 반응시킨다. 490㎚에서 흡광도를 측정한다. [9,13]

4.3 Melanogenesis inhibition assay

파리풀 추출물의 멜라닌 생성을 억제했는지를 cell 수준에서 알아보았다. 실험법은 Gordon PR 방법을 응용하였다.[6,9,13]

실험물질 처리 마지막 날 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고 Coulter counter로 세포수를 세어준다. 각 처리군 별로 $2\times10^5$ 세포수 당 100㎕의 1N NaOH 용액을 넣고 세포를 녹인다. (37℃, 12hr) 세포가 완전히 녹은 sample의 흡광도를 측정 전 합성멜라닌(Sigma Chemical Co.) 10㎎을 1N NaOH 10㎖에 녹여 stock solution (1㎎/㎖) 을 제조한 뒤 700 ㎍/㎖, 300 ㎍/㎖, 100㎍/㎖, 70 ㎍/㎖, 30 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 7 ㎍/㎖, 3 ㎍/㎖, 1

㎍/㎖, 0 ㎍/㎖ 농도로 희석하여 standard solution을 만든다. Sample과 standard solution을 96 well assay plate에 넣고 490㎚에서 흡광도를 측정한다.

## III. 실험결과 및 고찰

### 1. 항산화 활성 검색

#### 1.1 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

본 실험에 사용된 DPPH는 안정한 형태로 존재하는 라디칼 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 UV/Vis 분광광도계에서 517㎚의 흡수파장이 사라지게 된다. 생체 내 산화물질로 작용하는 활성 산소 등은 대표적 라디칼 물질로서, 라디칼 소거 활성물질은 항산화제로 인식되고 있다.

파리풀 뿌리, 줄기, 잎의 free radical 소거력을 측정하기 위하여 각각을 80% MeOH로 추출하여 농축 후 Hexane층, $CHCl_3$층, EtOAc층, BuOH층, 그리고 residue층으로 분획하여 MeOH층, Hexane층, $CHCl_3$층, EtOAc층, BuOH층, residue층 모두 6개의 층의 항산화효과를 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrihydrazyl) 용액을 이용하여 측정하였다. 우선 시료들을 100㎍/㎖의 농도에서 각각 세 차례의 실험을 하여 그 평균값으로 항산화 활성도를 계산하였다. 그 결과를 Table 1에 도표화 하였다. 또한 시료들의 50% 환원되는 농도를 구하기 위하여 5개의 농도로 시료를 준비하여 각 농도에 따른 항산화 정도를 측정하였고, 이는 $RC_{50}$으로 표현되며, Table 2에 정리하였다.

항산화효과는 DPPH 용액만 존재하는 대조군과 DPPH 용액과 시료가 들어있는 반응 시료액의 흡광도 차이로 표현되며 DPPH 용액의 라디칼이 제거되면 517㎚에서 흡광도가 감소한다. 그래서 그 차이가 클수록 항산화성이 높다고 할 수 있고, $RC_{50}$은 낮게 나올수록 적은 양으로도 50% 정도의 DPPH용액을 환원시킬 수 있는 강한 환원력을 갖고 있다고 할 수 있다.

100㎍/㎖농도에서 소거력을 측정한 결과 각 시료의 MeOH층에서는 파리풀 잎(82.86%)에서 대조군인 비타민 C (86.76%)와 비슷한 수치로 가장 효과가 좋게 나왔고, Hexane층과 $CHCl_3$층에서는 뿌리, 줄기, 잎 모두 좋은 활성을 보이지 않았다. EtOAc층에서는 줄기(92.39%)가 대조군인 비타민 C와 BHA(90.95%)보다 더 효과가 좋게 나왔다. BuOH층에서도 뿌리(95.63%)와 줄기(93.12%)가 두 대조군보다 효과가 좋게 나왔고, 잎(82.30%)에서도 비타민 C와 비슷한 수준의 소거력을 보여주었다.

Table 1. The free radical scavenging effects of methanol extracts and several subfractions of *Phryma leptostachya*. (sample concentration: 100㎍/㎖)

| Methanol extracts and solvent fractions | Inhibition (%) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 MeOH층 | 44.93 |
| 파리풀 줄기 MeOH층 | 24.18 |
| 파리풀 잎 MeOH층 | 82.86 |
| 파리풀 뿌리 Hexane층 | 30.62 |
| 파리풀 줄기 Hexane층 | 25.46 |
| 파리풀 잎 Hexane층 | 10.12 |
| 파리풀 뿌리 $CHCl_3$층 | 25.84 |
| 파리풀 줄기 $CHCl_3$층 | 70.48 |
| 파리풀 잎 $CHCl_3$층 | 74.46 |
| 파리풀 뿌리 EtOAc층 | 83.28 |
| 파리풀 줄기 EtOAc층 | 92.39 |
| 파리풀 잎 EtOAc층 | 14 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층 | 95.63 |
| 파리풀 줄기 BuOH층 | 93.12 |
| 파리풀 잎 BuOH층 | 82.30 |
| 파리풀 뿌리 residue층 | 7.43 |
| 파리풀 줄기 residue층 | 42.83 |
| 파리풀 잎 residue층 | 49.28 |
| Ascorbic acid | 86.76 |
| BHA | 90.95 |

본 실험에 사용된 시료들의 몇 개의 층에서는 대조군과 비교하여 우수한 항산화 효과를 보이고 있어서 DPPH용액의 라디칼을 50%환원시킬 때의 농도를 구한 결과 대조군과 비교해 본 실험 시료들은 농도의 변화에 민감한 반응을 보여 환원력이 급격히 저하됨을 알 수 있었다. 실험 시료 중 파리풀 잎의 EtOAc층(9.43㎍/㎖)은 대조군인 BHA(8.73㎍/㎖)와 비슷한 수준의 좋은 항산화 효과를 보여주었다. 파리풀 잎 EtOAc층의 농도별 DPPH용액의 라디칼 소거율은 Figure 1에 나타내었다. 줄기의 EtOAc층(17.37㎍/㎖)과 뿌리의 EtOAc층(22.14㎍/㎖)도 비교적 좋은 활성을 보여주었다.

**Table 2.** The free radical scavenging effects of methanol extracts and several subfractions of *Phryma leptostachya*

| Methanol extracts and solvent fractions | $RC_{50}$ (㎍/㎖) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 MeOH층 | >100 |
| 파리풀 줄기 MeOH층 | >100 |
| 파리풀 잎 MeOH층 | 45.97 |
| 파리풀 뿌리 Hexane층 | >100 |
| 파리풀 줄기 Hexane층 | >100 |
| 파리풀 잎 Hexane층 | >100 |
| 파리풀 뿌리 $CHCl_3$층 | >100 |
| 파리풀 줄기 $CHCl_3$층 | 69.81 |
| 파리풀 잎 $CHCl_3$층 | 87.29 |
| 파리풀 뿌리 EtOAc층 | 22.14 |
| 파리풀 줄기 EtOAc층 | 17.37 |
| 파리풀 잎 EtOAc층 | 9.43 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층 | 33.26 |
| 파리풀 줄기 BuOH층 | 22.14 |
| 파리풀 잎 BuOH층 | 39.62 |
| 파리풀 뿌리 residue층 | >100 |
| 파리풀 줄기 residue층 | >100 |
| 파리풀 잎 residue층 | >100 |
| Ascorbic acid | 3.2 |
| BHA | 8.73 |

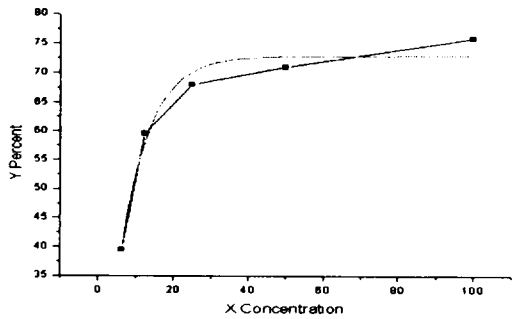


**Fig. 1.** The free radical svavenging effects of several ethylacetate extracts of the *Phryma eptostachya* leaves.

1.2 Nitric oxide(NO) assay

nitric oxide(NO)는 활성산소로서 자외선과 같은 자극이 주어졌을 때 발생량이 더욱 증가하며 인체 내에서 색소침착이나 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 지용성이 높아 쉽게 세포막을 통과할 수 있으므로 인접한 세포로 이동할 수 있으며, 세포내외에서 짧은 시간 내에 산

**Table 3.** Effect of *Phryma leptostachya* nitrite accumulation in RAW264.7 Mactophages. (sample concentration : 100㎍/㎖)

| methanol extract and solvent fractions | Inhibition (%) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 MeOH층(A) | 22.66 |
| 파리풀 줄기 MeOH층(B) | 9.44 |
| 파리풀 잎 MeOH층(C) | 28.33 |
| 파리풀 뿌리 Hexane층(D) | 62.32 |
| 파리풀 줄기 Hexane층(E) | 67.99 |
| 파리풀 잎 Hexane층(F) | 78.38 |
| 파리풀 뿌리 $CHCl_3$층(G) | 51.94 |
| 파리풀 줄기 $CHCl_3$층(H) | 76.49 |
| 파리풀 잎 $CHCl_3$층(I) | 70.82 |
| 파리풀 뿌리 EtOAc층(J) | 27.38 |
| 파리풀 줄기 EtOAc층(K) | 69.88 |
| 파리풀 잎 EtOAc층(L) | 69.88 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층(M) | 11.61 |
| 파리풀 줄기 BuOH층(N) | 6.11 |
| 파리풀 잎 BuOH층(O) | 6.11 |
| 파리풀 뿌리 residue층(P) | -7.33 |
| 파리풀 줄기 residue층(Q) | -27.51 |
| 파리풀 잎 residue층(R) | -4.89 |

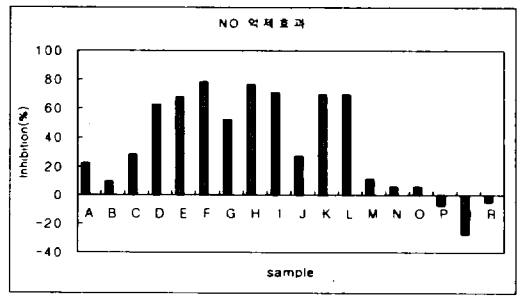


**Fig. 2.** Effect of *phryma leptostachya* nitrite accumulation in RAW264.7 Mactophages.

소와 반응하여 nitric 및 nitrate로 합성된다. 본 실험에서 파리풀 뿌리, 줄기, 잎의 메탄올 추출 및 그 분획층들의 NO의 생성억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS (1㎍/㎖)와 각 시료들을 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 $NO_2^-$의 형태로 측정하였다. 그 결과는 Table 3에 정리하였다. 파리풀 잎의 Hexane층(78.38%)이 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 가장 좋은 효과를 보였으며, 줄기 $CHCl_3$층(76.49%), 잎 $CHCl_3$층(70.82%), 줄기와

잎의 EtOAc층(69.88%)이 NO의 생성을 억제하여 비교적 좋은 효과를 보여주었다.

## 2. 미백효과

2.1 Tyrosinase inhibition assay

파리풀 시료의 미백효과 성분의 함유 여부를 관찰하기 위하여 MeOH층, hexane층, $CHCl_3$ 층, EtOAc 층, BuOH층, residue 층의 타이로시네이즈 활성 억제를 측정하였다. 타이로시네이즈 활성 억제 효과는 효소를 첨가한 대조군과 각 시료가 들어있는 반응 시료액의 흡광도 차이를 100분률을 이용하여 수치가 높을수록 타이로시네이즈 활성 억제 효과가 우수한 경우이다. 추출물들은 각각 세 차례의 정량적인 실험을 통하여 평균값을 구하였고, 그 결과는 Table 4에 나타내었다.

각 시료들을 세 차례에 걸쳐 타이로시네이즈 활성 억제 효과 실험을 하였다. 대부분의 시료가 특별히 효과를 나타내고 있지는 않으나 파리풀 줄기의 EtOAc층(26.12%)과 잎의 EtOAc층(20.24%)에서 대조군으로 쓰였던 알부틴(26.39%) 만큼의 효과를 보이고 있다. 그러나 실질적으로 *in vitro*에서 알부틴인 경우는 타이로시네이즈 활성 억제가 우수하지 않지만 *in vivo*에서는 우수한 효과를 보이기 때문에 이 실험에서 알부틴과 비슷한 수준의 억제를 보이는 시료인 경우에도 *in vivo*실험을 통한 검증이 필요하다.

2.2 Dopa oxidation inhibition assay

파리풀의 미백효과에 대한 검증을 위하여 세포 수준에서의 효소 억제 실험을 시행하였다. tyrosinase 효소 억제 실험에서 우선적으로 효과를 보이는 EtOAc층, BuOH층, residue층만을 세포실험에 사용하였다. 결과는 Table 5에 나타내었다. 대조군에는 시료를 녹인 용매만 처리하여 비교하였는데 효소 실험과는 다르게 파리풀 뿌리의 EtOAc층에서만 미약한 저해 효과를 나타내었다.

2.3 Melanogenesis inhibition assay

세포 수준에서의 실험 시료의 멜라닌 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16BL6 cell에 시료를 처리 3일 후 최종 생성된 멜라닌 양을 측정하였다.

**Table 4.** Screening of tyrosinase inhibition of the solvent fraction and methanol extracts of *Phryma leptostachya*. (sample concentration : 50㎍/㎖)

| methanol extract and olvent fractions | Inhibition (%) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 MeOH층 | - |
| 파리풀 줄기 MeOH층 | - |
| 파리풀 잎 MeOH층 | - |
| 파리풀 뿌리 Hexane층 | 7.70 |
| 파리풀 줄기 Hexane층 | - |
| 파리풀 잎 Hexane층 | - |
| 파리풀 뿌리 $CHCl_3$층 | - |
| 파리풀 줄기 $CHCl_3$층 | - |
| 파리풀 잎 $CHCl_3$층 | - |
| 파리풀 뿌리 EtOAc층 | - |
| 파리풀 줄기 EtOAc층 | 26.12 |
| 파리풀 잎 EtOAc층 | 20.24 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층 | 10.29 |
| 파리풀 줄기 BuOH층 | 8.92 |
| 파리풀 잎 BuOH층 | 4.18 |
| 파리풀 뿌리 residue층 | 14.60 |
| 파리풀 줄기 residue층 | 2.64 |
| 파리풀 잎 residue층 | 5.40 |
| arbutin | 26.39 |

**Table 5.** Inhibition of dopa oxidase activity of the methanol extracts and several subfractions of *phryma leptostachya*. on B16BL6 melanomea cells. (sample concentration : 100㎍/㎖)

| Fraction | Inhibition(%) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 EtOAc층 | 5.09 |
| 파리풀 줄기 EtOAc층 | 4.04 |
| 파리풀 잎 EtOAc층 | 1.24 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층 | -4.72 |
| 파리풀 줄기 BuOH층 | -3.11 |
| 파리풀 잎 BuOH층 | -13.41 |
| 파리풀 뿌리 residue층 | -12.42 |
| 파리풀 줄기 residue층 | -11.55 |
| 파리풀 잎 residue층 | -19.38 |

결과는 Table 6에 정리하였다. 세포에서의 실험 결과는 효소 수준의 실험과는 달리 전체적으로 좋은 활성을 보이진 않았고, 단지 파리풀 줄기의 residue 층에서 시료를 처리하지 않은 control에 비해 멜라닌 형성 억제 효과(12.09%)를 어느 정도 보였다.

**Table 6.** Effect of *phryma leptostachya* solvent fractions on melanin contents of B16BL6 melanoma cells. (sample concentration : 100㎍/㎖)

| Fraction | Inhibition(%) |
|---|---|
| 파리풀 뿌리 EtOAc층 | 3.90 |
| 파리풀 줄기 EtOAc층 | 7.69 |
| 파리풀 잎 EtOAc층 | 1.39 |
| 파리풀 뿌리 BuOH층 | -8.79 |
| 파리풀 줄기 BuOH층 | -18.68 |
| 파리풀 잎 BuOH층 | -22.34 |
| 파리풀 뿌리 residue층 | -6.59 |
| 파리풀 줄기 residue층 | 12.09 |
| 파리풀 잎 residue층 | -4.76 |

## Ⅳ. 결 론

활성산소는 각종 질병과 노화를 일으키는 주범으로 그의 생성을 억제하고 생성된 활성산소는 제거하기 위하여 인체에 무해한 항산화제에 대한 연구가 천연물을 이용하여 다양하게 시행되고 있다. 또한 활성산소에 대한 연구는 그에 의한 피부노화와 색소침착과 같은 영향으로 인해 향장품 원료개발을 위한 연구에서도 많이 이루어지고 있다. 따라서 본 실험에서도 질병과 노화, 특히 피부 색소침착에 대한 항산화제의 검색을 위하여 제주에서 자생하는 파리풀을 채집하여 뿌리, 줄기, 잎으로 분리하여 메탄올 추출물을 제조하였다. 이 추출물은 다시 hexane 및 $CHCl_3$, EtOAc, BuOH 가용분획, 그리고 잔사(residue)층으로 분획하여 활성검색의 시료로 사용하였다. 각각 추출된 시료는 DPPH와 NO assay를 통해 항산화 효과, tyrosinase 억제활성, dopa oxidation 억제활성, melanin contents를 통해 효소와 세포 수준에서 미백효과를 검증하였다.

시료들의 항산화 효과를 DPPH 용액과, RAW264.7 세포를 이용하여 측정하였다. DPPH용액을 이용한 실험에서는 농도별로 DPPH 라디칼 소거력을 측정한 결과 잎의 EtOAc층에서 대조군인 BHA($RC_{50}$ :8.73㎍/㎖)의 억제 정도와 비슷한 라디칼 소거효과를 보여주었다.

RAW264.7 세포를 이용한 NO 억제 효과를 측정한 결과 뿌리, 줄기, 잎의 Hexane, $CHCl_3$, EtOAc층에서 LPS 단독처리군에 비해 유효한 효과를 관찰할 수 있었다. DPPH와 NO assay를 두 실험을 통한 시료의 항산화 효과를 분획한 실험 시료를 이용해 비교한 결과 활성물질은 비교적 비극성 용매 분획층에서 관측할 수 있었다.

시료의 미백효과에 대한 활성검증은 Tyrosinase 억제효과와 cell을 이용한 Dopa oxidation inhibition assay, melanin contents 등을 측정하여 확인하였다. 효소 활성 억제 실험에서는 대조군으로 쓰인 알부틴과 비슷한 수준의 활성을 보이는 것도 있었지만 세포 수준에서 확인 결과 멜라닌 형성 저해에 특이한 효과는 보이지 않았다.

이상의 연구 결과를 보면, 파리풀의 뿌리, 줄기, 잎에 따라 그 활성 정도가 다르고 피부노화 및 질병유발에 주요 원인으로 작용하는 활성산소의 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 미백과 관련해서는 뚜렷한 효능을 보이지 않는 것으로 보아 파리풀의 항산화 효과는 미백관련과는 다른 경로로 질병이나 피부노화에 효능을 보일 것으로 여겨진다. 특히나 NO는 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에 사용된 시료의 NO에 대한 억제 효과가 우수한 것으로 보아 파리풀의 항염에 관한 연구 가치는 높다고 보여진다. 따라서 이러한 실험 자료를 토대로 본 연구실에서는 파리풀의 항노화 및 항염·항암에 관련된 더 많은 활성 검색과 분리·동정을 시행하고 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 제주대학교 아열대원예산업연구센터(RRC)의 2003년도 아열대식물유전자연구 연구비 일부와 과기부 과학재단지정 특수연구소재은행 아열대/열대식물유전자은행 연구비 일부지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Yen, G. C., Duh, P. D. 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free

radical and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food hemistry*. 42. 629-632

2. 박수남. 1997. 피부노화와 항산화제. *대한화장품학회지* 23: 75-132
3. 기능성화장품 기준 및 시험방법. 2001. 화장품신문4. 기능성화장품의 기술개발동향. 2001. 식약청
4. Heck. D.E..D.L. Laskin. C.R. Gardner. and J.D. Laskin. 1992. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J. Biol.* Chem. 267:21277-21280.
5. Imokawa. G.. G. Yada. and M. Miyagishi. 1992. Endothelins secreted from human deratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 267:24675-24680.
6. Okano. Y. 1997. Evaluation of plant extracts as active agents for skin whiening. *Fragrance Journal*. 25(9): 56-62.
7. Inoue. S. 1998. Prospect of dermatological science in cosmetics for regulation skin aging. *Fragrance Journal*. 1:45-50.
8. Baker. M.S. 1994. Free radicals and cinnetive tissue damage. In: Free radical damage and its control (C.A. Rice-Evance and R. H. Burdon. eds.) : Elsevier: Amsterdam.
9. Kazuhisa M.. Minoru F. 1996. Arbutin: Mechanism of its depigmenting aciton in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 276:765-769.
10. Kyoung Tae Kim. Jin Guk Kim. 2004. Anti-melanogenesis Effect of Phenolic Compound Isolated from Gastrodia elata. 30: 33-38.
11. A. Kitahara. U. Matsumoto. H. Ueda. and R. Ueoka. 1995. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ-irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.*. 40. 2208.
12. H. Masaki. S. Sakaki. T. Atsumi.. and H. Sakurai. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.*. 18. 162.
13. 한영숙. 2002. 항염증성 천연추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 아주대학교

# Screening of cosmeceutical ingredient from *Phryma leptostachya* extracts

## - Effect of Anti-oxidation and Whitening -

Hee-Jung Bu · Eun-Suk Lee · Gyung-Bum Kim · Young-Dae Kim* · Sunjoo Lee**

*Department of Chemistry, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea.*

*Subtropical horticulture research center**, Applied radiological science research institute***

*Daekey high school, Jeju, Korea**

**Abstract.** Solvent extracts of *Phryma leptostachya* in Jeju Island were investigated for biological properties related to cosmeceuticals such as radical scavenging and tyrosinase and dopa oxidation, melanin contents inhibition effects. Several nonpolor fractions of *Phryma leptostachya* exhibit considerable radical scavenging activities. But no significant effects of whitening with *Phryma leptostachya* extracts were shown.