

# 제주산 자생식물들의 DPPH, Elastase 및 Superoxide 저해 활성검색

이정아\* · 정덕상\*\*

이번 연구에서는 제주 자생식물 중 6종의 식물에 대해 항산화 활성과 미백활성을 확인해 보고자 하였다. 제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 각 추출물의  $RC_{50}$  값은 석위가 17.32  $\mu\text{g/mL}$ 으로 대조군에 비해 매우 뛰어난 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유는 70.98  $\mu\text{g/mL}$ , 쥐똥나무가 84.38  $\mu\text{g/mL}$  순으로 조사되었으며, 비교 대조군인 BHA나 Vitamin C와 비교하였을 때 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. Superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정 결과 각 시료 methanol 추출물의  $IC_{50}$  값은 석위 48.12  $\mu\text{g/mL}$ , 쥐똥나무 117.59  $\mu\text{g/mL}$ , 꽃향유 151.97  $\mu\text{g/mL}$ 으로 대조군 SOD (superoxide dismutase)의  $IC_{50}$  값 14.43  $\mu\text{g/mL}$ 에 비해 좋은 활성은 아니나, 단일 물이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면, 석위 methanol 추출물의 경우 비교적 좋은 항산화 활성을 보임을 확인할 수 있었다. Elastase 활성 저해 측정 실험에서는 비교 대조군인 빈랑자의  $IC_{50}$  값이 10.54  $\mu\text{g/mL}$ 를 나타내는 반면에 석위의  $IC_{50}$  값이 18.09  $\mu\text{g/mL}$ 로 비교 대조군에 비해서 활성을 떨어지나 대조군과 비슷한 정도의 활성을 보임을 확인하였다. 위와 같은 결과를 종합해본 결과 DPPH free radical 소거활성 측정, superoxide radical 소거 효과, elastase 활성 저해 측정 실험 모두에서 가장 뛰어난 효능을 보인 식물종은 석위임을 알 수 있었다.

\* 주제어: 석위, 피부노화, 항산화 활성, 주름개선

## I. 서론

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에, 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 활성산소종(ROS)이 생성되며 이어서 항산화 방어계는 붕괴되고, 결과적으로 피부에 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 야기 시키며, 노화를 가속화시킨다. 이러한 활성산소종은 반응성이 매우 큰  $^1\text{O}_2$  및  $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하

\* 제주대학교 화학과(email: frogyellow@jejunu.ac.kr)

\*\* 제주대학교 화학과(email: duksangj@jejunu.ac.kr)

© 접수일(2011년 9월 30일), 수정일(2011년 10월 24일), 게재확정일(2011년 10월 27일)

여  $O_2 \cdot^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO\cdot$ ,  $ROOH$  및  $HOCl$  등을 포함한다(S. N. Park, 2003: 35; S. N. Park, 2003: 14).

항산화제(antioxidant)란 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화 억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소로 free radical의 독성을 억제할 뿐만 아니라 유지의 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 요인을 말한다. 항산화제에는 합성 항산화제와 천연 항산화제가 있다. 합성 항산화제는 천연항산화제에 비해 효과가 월등하나 그 안정성의 문제로 허용량을 제한하고 있다. 페놀화합물인 합성 항산화제는 여러 나라에서 널리 사용되고 있는데, 현재 우리나라에서 사용되고 있는 것은 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate) 그리고 TBHQ(tertiarybutyl hydroxyquinone) 등이다. BHA는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취 시 심각한 여러 질병을 유발시킬 수 있다고 한다(Branen, A. L., 1975: 52; Choe, S. Y. and Yang, K. H., 1982: 14). 또한 합성 항산화제는 고온에서 불안정 하여 생체 부작용이 없고 활성 산소를 제거 할 수 있는 항산화력이 강한 천연 항산화제를 찾으려는 연구가 더욱 활발하게 진행 될 것으로 여겨진다.

피부노화는 복잡한 생물학적 과정을 거쳐 일어나는 현상으로 지금까지 보고된 피부노화의 과정은 자외선에 의해 일어나는 광노화와 내인성 요인에 의한 노화로 구분되고 있다. 피부노화 과정을 지연시키고 방지하려는 목적으로 많은 항 노화 화장품이 개발되고 있으며 특히 주름형성 완화와 개선을 위한 연구가 진행되고 있다. 지금까지 국내에서 주름 개선물질로 고시된 물질은 레티놀(retinol)과 아데노신(adenosine) 등이 있으며 식품의약품안전청에서 고시한 이들 원료는 주름개선 화장품의 원료로 사용되고, 주름개선 효과를 보이고 있는 것으로 알려져 있다(E.S. Chan et al., 2006: 54). 최근 연구에서 주름형성에 있어서 콜라겐 이외의 탄력섬유인 엘라스틴(elastin)과 엘라스틴 분해에 관여하는 효소인 엘라스타제(elastase)에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있는 것으로 보고되고 있다(F. Antonicelli et al., 2007: 79; J. C. Isenburg, D. T. Simionescu, and N. R., 2004: 25; S. Seite et al., 2006: 20). 특히, 만성적인 UV 조사에 의해 사람의 피부 표피의 각질형성세포(keratinocytes)에서도 엘라스틴의 전구체인 tropoelastin mRNA 발현이 증가한다는 보고가 있었으며(J. Y. Seo et al., 2001: 116), 선택적인 엘라스타제 활성의 억제를 통한 주름형성에서 엘라스타제의 역할이 보고되기도 하였다(N. Tsuji, S et al., 2001: 74).

본 연구는 이러한 흐름에 발맞추어 제주도에서 자생하고 있는 6종의 식물을 대상으로 유기용매 분획을 이용하여 각 추출물을 분리하고 각 분획별로 DPPH radical 소거 활성, superoxide( $O_2^{\cdot-}$ ) 소거능, elastase inhibition 활성을 측정하여 새로운 천연물 생리 활성 물질의 개발 가능성을 알아보고자 한다.

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 재료

#### 가. 시료준비

본 연구에서 사용한 쥐똥나무는 2004년 1월에 제주대학교 근처에서 채집하여 잎을 실험에 사용하

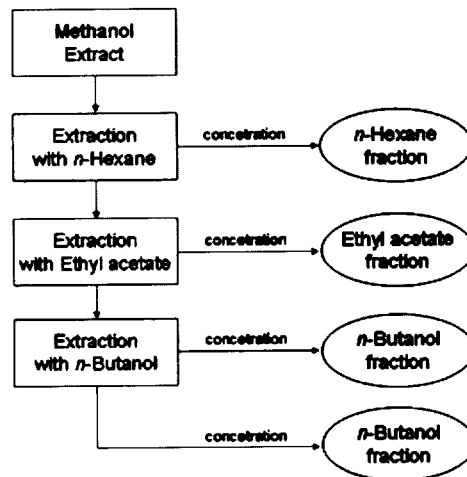
였으며, 2002년 6월 제주도 조천읍 선흘리에서 채집한 석위는 전초를 실험에 사용하였다. 눈괴불주머니는 2002년 10월 제주도 조천읍 선흘리에서 채집하여 전초를 이용하여 실험에 임하였고, 큰천남성은 제주도 성판악 일대에서 2002년 6월 채집하여 전초를 사용하였다. 2005년 5월 제주대학교 근처에서 광대수염, 꽃향유를 채집하여 전초를 사용하여 실험에 임하였다.

**나. Methanol 추출물**

채취한 식물 6종을 음지에서 통풍건조 하였다. 건조된 시료를 잘게 파쇄하여 미세 분말로 만든 후, 추출용매인 80% methanol에 두 달 동안 침지하여 추출하였다. 추출액을 필터로 여과하여 고형물을 분리하고 methanol 추출액을 감압농축기를 이용하여 농축하여 분말상태로 냉장 보관하여 각 실험에 사용하였다.

**다. Methanol 추출물 용매분획 과정**

Crude methanol extracts 6종에 대해 DPPH free radical 소거 활성 측정, superoxide(O<sup>-2</sup>) 소거능 측정, elastase inhibition 활성 측정을 우선 실시하여 실험결과를 살핀 후, 용매분획을 실시하여 추출 분리하였다. 획득한 각각의 methanol 추출물 일정량을 1L의 1차 증류수에 현탁 시킨 후, 분획깔때기를 이용하여 극성이 다른 용매 n-hexane, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 이용하여 용매분획을 실시하였다. 분획깔때기에 1L의 1차 증류수에 현탁 시킨 시료를 넣은 후 동량의 n-hexane을 넣고 잘 혼합한 후 최소 6시간을 방치하여 수층과 추출용매의 두층으로 나뉘도록 하였다. 추출 용매를 분리하고 남은 여액을 같은 방법으로 ethyl acetate와 butanol을 차례대로 넣고 각층별 용매를 얻어 감압농축을 통해 시료를 얻었다[그림 1].



[그림 1] Fractionation scheme of methanol extract of each sample

## 2. 시약 및 기기

### 가. 추출 및 분리과정

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. 침출된 용매 및 용매 분획물 등을 감압농축 시키기 위하여 evaporator(EYELA, JAPAN)를 사용하였고, 동결건조기(일신, Korea)를 사용하였다.

### 나. 활성측정

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였으며, 대조군으로는 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid를 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. Elastase 주름억제활성 실험 시 기질로 사용된 N-succinyl-(ala-ala-ala)-p-nitroanilide)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였고, 효소로 사용된 elastase porcine pancreatic은 Sigma-Aldrich에서 구입한 것을 사용하였다. Superoxide 억제활성 실험 시 대조군으로 Superoxide Dismutase Bovine Liver는 CALBIOCHEM사에서 구입하여 사용하였다. 활성 측정 시 사용한 기기로는 Perkin Elmer 1420 Multilabel counter VICTOR 3V를 사용하였다.

### 다. 실험방법

#### (1) DPPH radical 소거 활성 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다. 즉, methanol에 녹인 여러 농도의 시료 각각을 96well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하고 0.4 mM DPPH용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 대조군으로는 Vitamin C, butylated hydroxy anisole(BHA)를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 아래의 식으로 산출하였고, DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(RC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

A<sub>sample</sub> = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

A<sub>control</sub> = 시료 대신 methanol을 첨가한 반응액의 흡광도

#### (2) Superoxide(O<sup>-2</sup>) 소거능 측정 방법

superoxide는 phenazine methosulfate(PMS)- $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide(환원형 NADH)계에서 NADH 산화에 의하여 생성되며, 이 때 nitroblue tetrazolium(NBT)가 얼마나 환원되느냐에 따라 정량

된다. 실험은 96well Plate에 sample과 30 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)을 넣은 후 100  $\mu$ m의 PMS를 가한 후 560 nm 측정하였다(A1). 측정 후 5 mM NADH 와 0.5 mM NBT를 순차적으로 가하여 다시 560 nm 측정하였다(A2).

positive control : Asorbic acid

negative control : D.W (A0)

$$\text{Superoxide 소거능(\%)} = (A0 - A2 - A1) / (A0 - A1) \times 100$$

### (3) Elastase Inhibition 활성 측정

후보 생리활성물질 추출물을 농도별로 포함한 200 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 50  $\mu$ L에 10  $\mu$ L/ml elastase 100  $\mu$ L와 5 mM N-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide 50  $\mu$ L를 넣고 잘 섞은 후, 실온에서 20분 간 반응시키고 생성된 p-nitroaniline의 양을 410 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 추출물과 같은 농도인 빈랑자를 사용하여 위와 동일한 실험을 수행하여 후보물질의 elastase의 활성 억제 정도를 비교하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

A : 시료, 기질, 효소가 반응한 실험군

B : 시료, 기질, 효소대신 buffer가 반응한 실험군 (시료의 흡광도)

C : 용매, 기질, 효소가 반응한 실험군

## III. 실험결과 및 고찰

### 1. DPPH free radical 소거 활성 측정

#### 가. 시료 추출물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

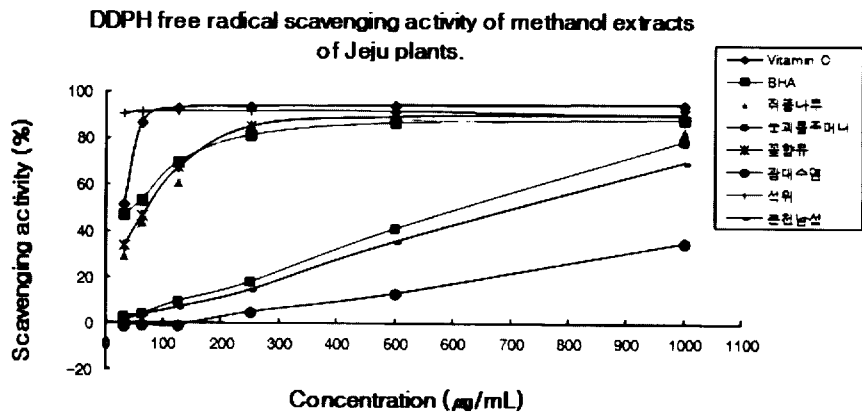
항산화 물질의 가장 큰 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식물중의 항산화 효과나 인체 내 노화를 억제하는 척도로 이용된다(장현주, 2007). DPPH는 비교적 안정된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm~520 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 특유의 보라색이 없어지면서 특정 파장대에서 흡수가 없어지게 된다(김철홍 외, 2004: 21; 김경범, 2006). DPPH free radical 소거활성 측정법은 1958년 처음 소개되었는데(Bolois MS., 1958: 181), 색상

의 변화정도를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 아주 간편한 방법(최점삼 외, 2003: 7)이다. 제주도 자생식물 Methanol 추출물들과 대조군인 BHA(Butylated hydroxy anisole), Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과는 <표 1>과 [그림 2]와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 각 추출물의 RC<sub>50</sub> 값은 석위에서 17.32 µg/mL로 대조군 BHA 43.37 µg/mL와 Vitamin C 29.59 µg/mL 보다 훨씬 높은 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유 (70.98 µg/mL) > 쥐똥나무 (84.38 µg/mL) > 눈피불주머니 (615.93 µg/mL) > 큰천남성 (708.68 µg/mL) > 광대수염 (>1000 µg/mL) 순으로 조사되었다. 이러한 결과는 대조군에 비교하였을 때 아주 좋은 소거 활성을 나타내지는 않았지만, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 충분히 소거 화설이 있다고 할 수 있어, 대조군보다 뛰어난 소거 활성을 나타냈던 석위와 함께 시료 추출물에 대해 유기 용매 분획을 실시하였다.

<표 1> DPPH free radical scavenging activities of Methanol extracts of Jeju plants

sample	학명	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
쥐똥나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	84.38
석위	<i>Pyrosia lingua</i> (Thunb.) Farwell	17.32
눈피불주머니	<i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow	625.92
큰천남성	<i>Arisaema ringens</i> Schott	708.68
광대수염	<i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc)	>1000
꽃향유	<i>Elscholtzia splendens</i> Nakai	70.98
BHA		43.37
Vitamin C		29.59

1) RC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.



[그림 2] DPPH free radical scavenging activity of Methanol extracts of Jeju plants

#### 나. 시료 분획물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

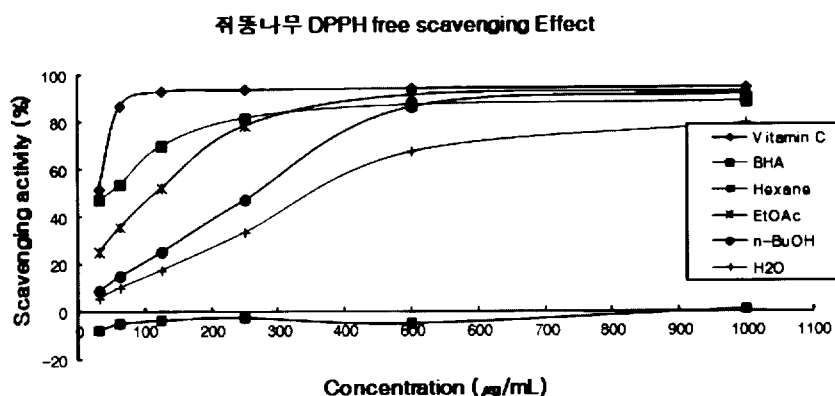
제주도 자생식물 6종 MeOH 추출물의 DPPH free radical 소거 활성을 측정하고 이 시료들을 유기

용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과를 <표 2>와 [그림 3, 4, 5, 6, 7, 8]에 나타내었다. 쥐똥나무의 분획물은 EtOAc 층에서 RC<sub>50</sub>이 115.55 µg/mL, BuOH층 267.50 µg/mL, H<sub>2</sub>O 층에서 370.37 µg/mL의 RC<sub>50</sub> 값을 나타내어 대조군인 BHA (43.37 µg/mL) 과 Vitamin C (29.59 µg/mL)에 비해 소거 활성 정도가 많이 떨어지는 것으로 여겨진다. 눈피불주머니의 분획물은 EtOAc 층에서 RC<sub>50</sub>이 258.84 µg/mL, BuOH층의 RC<sub>50</sub>이 322.14 µg/mL, H<sub>2</sub>O층의 RC<sub>50</sub>은 946.50 µg/mL로 대조군과 비교하였을 때 free radical 소거 활성이 좋지 않음을 알 수 있었다. 꽃향유 분획물 Hexane층에서 603.44 µg/mL로 RC<sub>50</sub> 값을 보였고, EtOAc층 RC<sub>50</sub>값은 18.03 µg/mL로 대조군인 BHA (43.37 µg/mL)과 Vitamin C (29.59 µg/mL)에 비해 뛰어난 활성을 보임을 확인 할 수 있

<표 2> DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants

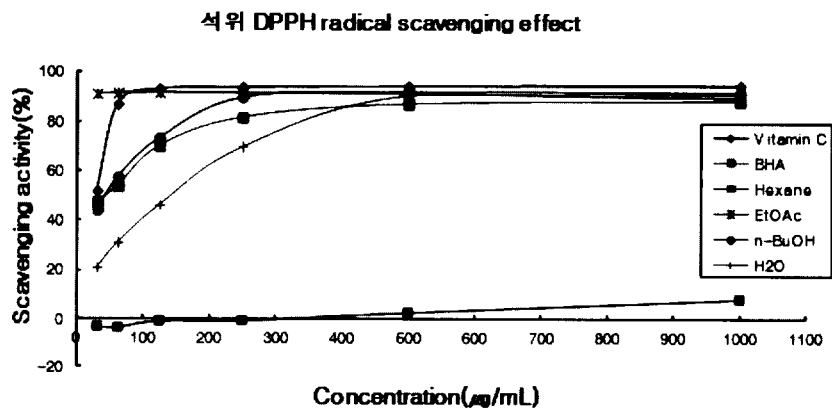
Fractions	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	Fractions	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
쥐똥나무-Hexane	>1000	광대수염-Hexane	>1000
쥐똥나무-EtOAc	115.54	광대수염-EtOAc	331.32
쥐똥나무-BuOH	267.49	광대수염-BuOH	422.43
쥐똥나무-H <sub>2</sub> O	370.36	광대수염-H <sub>2</sub> O	>1000
눈피불주머니-Hexane	>1000	석위-Hexane	>1000
눈피불주머니-EtOAc	258.84	석위-EtOAc	17.17
눈피불주머니-BuOH	322.14	석위-BuOH	45.51
눈피불주머니-H <sub>2</sub> O	946.50	석위-H <sub>2</sub> O	143.14
꽃향유-Hexane	603.44	큰천남성-Hexane	>1000
꽃향유-EtOAc	18.03	큰천남성-EtOAc	42.82
꽃향유-BuOH	98.24	큰천남성-BuOH	522.62
꽃향유-H <sub>2</sub> O	>1000	큰천남성-H <sub>2</sub> O	>1000
BHA	43.37	Vitamin C	29.59

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

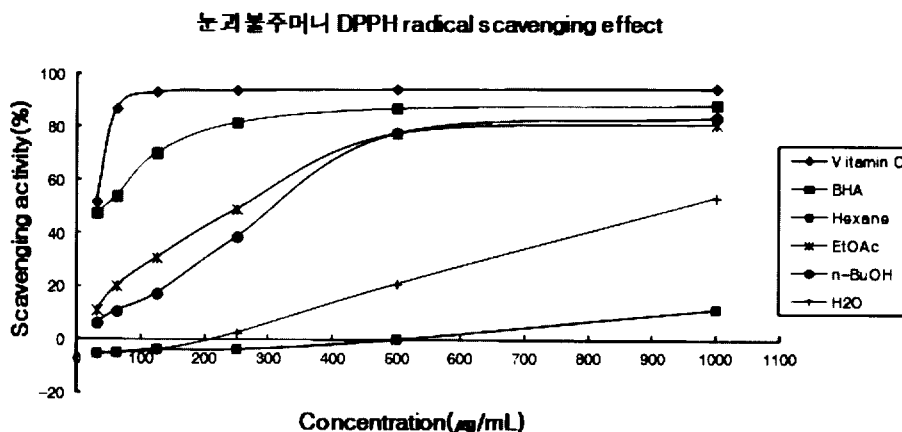


[그림 3] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc

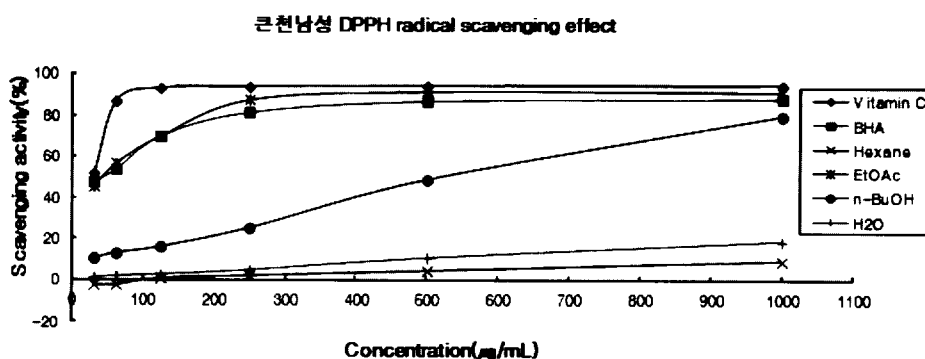
었다. BuOH 층이 RC<sub>50</sub>은 98.24 µg/mL을 보였다. 광대수염의 분획물은 EtOAc층 331.32 µg/mL, BuOH 층 422.43 µg/mL의 RC<sub>50</sub> 값을 확인 할 수 있었으며, 석위의 분획물에서는 EtOAc 층에서 17.17 µg/mL,



[그림 4] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Pyrosia lingua Farwell*



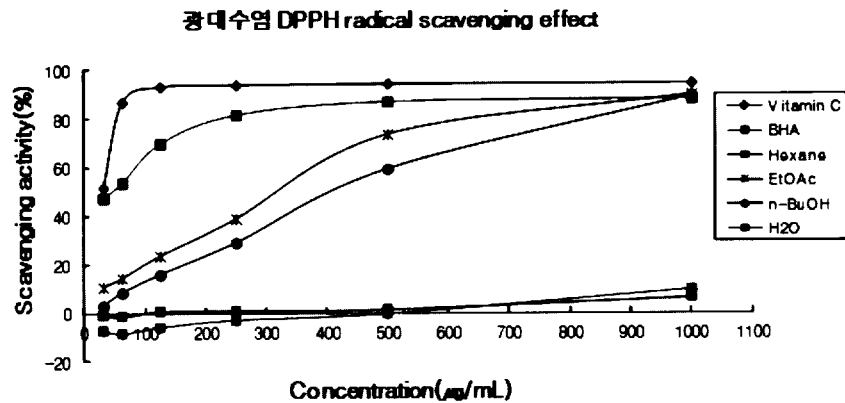
[그림 5] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Corydalis ochotensis Turczaninow*



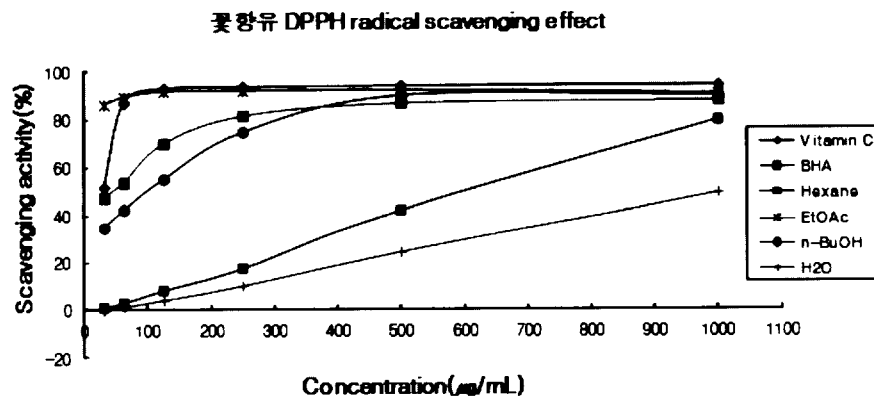
[그림 6] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Arisaema ringens*



BuOH층 45.51  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$ 을 보여, 대조군인 BHA (43.37  $\mu\text{g/mL}$ )과 Vitamin C (29.59  $\mu\text{g/mL}$ )에 비해 소거 활성 정도 매우 뛰어남을 알 수 있었다. H<sub>2</sub>O층에는 143.14  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 확인하였다. 마지막으로 큰천남성의 분획물에서는 EtOAc층에서 42.82  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$ 을 확인하여 대조군 BHA와 유사한 활성을 보임을 확인하였고, BuOH층에서 522.62  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 확인하였다.



[그림 7] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Lamium album L. nar. barbatum*



[그림 8] DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Elscholtzia splendens Nakai*

## 2. Superoxide 소거 활성 측정

### 가. 시료 추출물의 Superoxide 소거 활성 측정

생체 내에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과 호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성 산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 superoxide dismutase(SOD)이다(장현주, 2007). 생명체내 존재하는 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 superoxide를 과산화수소로 전환

시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 과산화수소는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 자신은 분해하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다(손미예, 2004: 14).

제주도 자생식물 6종의 superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정결과를 <표 3>과 [그림 9]에 나타내었다.

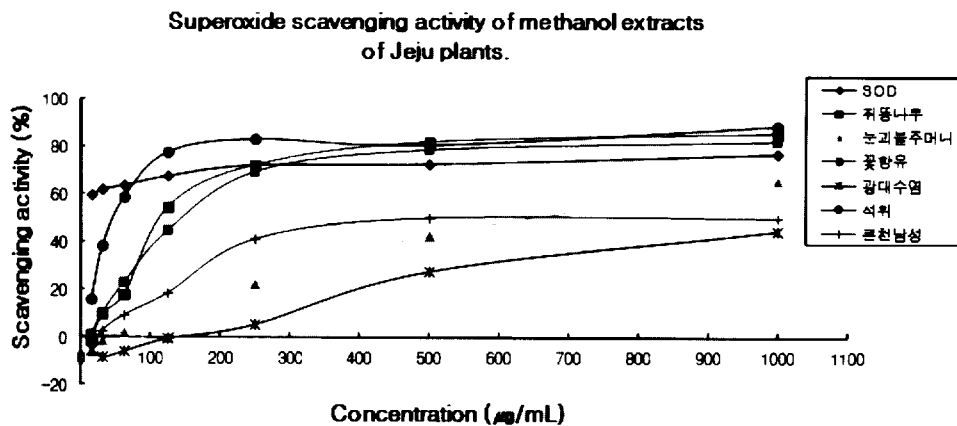
결과에서 보는 바와 같이 각 시료 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 추출물에서 48.13 µg/mL로 가장 우수한 superoxide radical 소거 효과를 보였으나, 대조군인 superoxide dismutase(SOD)의 IC<sub>50</sub> 값 13.43 µg/mL 보다는 좋지 않은 활성을 보임을 알 수 있었다. 쥐똥나무의 methanol 추출물과 꽃향유의 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub>은 각각 117.59 µg/mL와 151.97 µg/mL로 superoxide radical 소거 활성을 보였으며 마지막으로, 눈피불주머니의 methanol 추출물은 659.97 µg/mL 순으로 조사되어 대체적으로 이들 성분들은 활성이 존재하는 것으로 나타났다.

<표 3> Superoxide scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants

sample	학명	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
쥐똥나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	117.59
석위	<i>Pyrrhosia lingua</i> Farwell	48.12
눈피불주머니	<i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow	659.97
큰천남성	<i>Arisaema ringens</i> Schott	>1000
광대수염	<i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc)	>1000
꽃향유	<i>Elscholtzia splendens</i> Nakai	151.97
SOD <sup>2)</sup>		13.43

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) SOD (superoxide dismutase)



[그림 9] Superoxide scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants

나. 시료 분획물의 Superoxide 소거 활성 측정

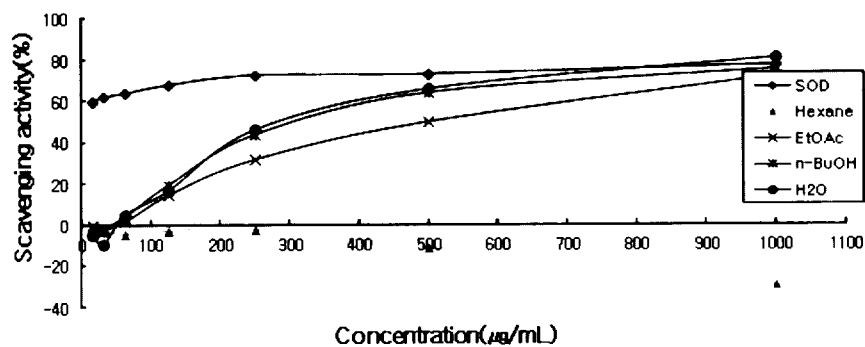
제주도 자생식물 6종 Methanol 추출물의 항산화 활성을 측정하고, 결과를 확인한 후 시료 추출물에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 superoxide 소거 활성을 측정한 결과를 <표 4>와 [그림 10, 11, 12, 13, 14, 15]로 나타내었다. 각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 쥐똥나무의 분획물 EtOAc층에서 500.82 µg/mL BuOH층과 H<sub>2</sub>O층에서 각각 IC<sub>50</sub>이 327.32 µg/mL와 298.47 µg/mL의 superoxide 소거 활성을 보임을 알 수 있었다. 눈피불주

<표 4> Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants

Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
쥐똥나무-Hexane	>1000	광대수염-Hexane	>1000
쥐똥나무-EtOAc	500.82	광대수염-EtOAc	>1000
쥐똥나무-BuOH	327.32	광대수염-BuOH	826.71
쥐똥나무-H <sub>2</sub> O	298.47	광대수염-H <sub>2</sub> O	>1000
눈피불주머니-Hexane	>1000	석위-Hexane	>1000
눈피불주머니-EtOAc	>1000	석위-EtOAc	28.12
눈피불주머니-BuOH	716.41	석위-BuOH	112.12
눈피불주머니-H <sub>2</sub> O	>1000	석위-H <sub>2</sub> O	134.56
꽃향유-Hexane	>1000	큰천남성-Hexane	>1000
꽃향유-EtOAc	64.62	큰천남성-EtOAc	222.44
꽃향유-BuOH	176.83	큰천남성-BuOH	471.06
꽃향유-H <sub>2</sub> O	228.54	큰천남성-H <sub>2</sub> O	985.76
SOD			13.43

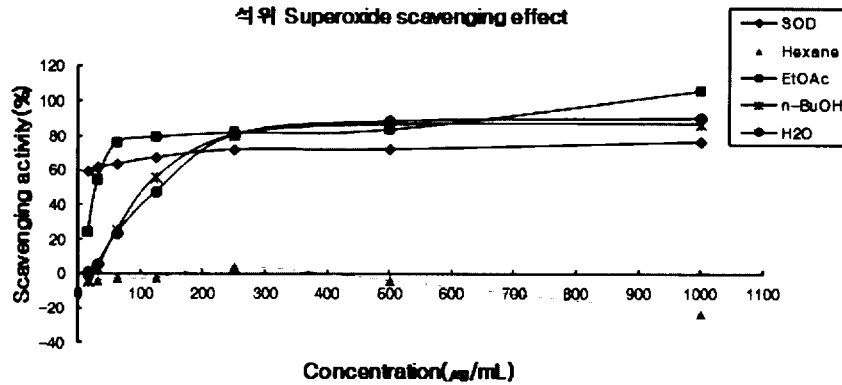
- 1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.
- 2) SOD (superoxide dismutase)

쥐똥나무 Superoxide scavenging effect

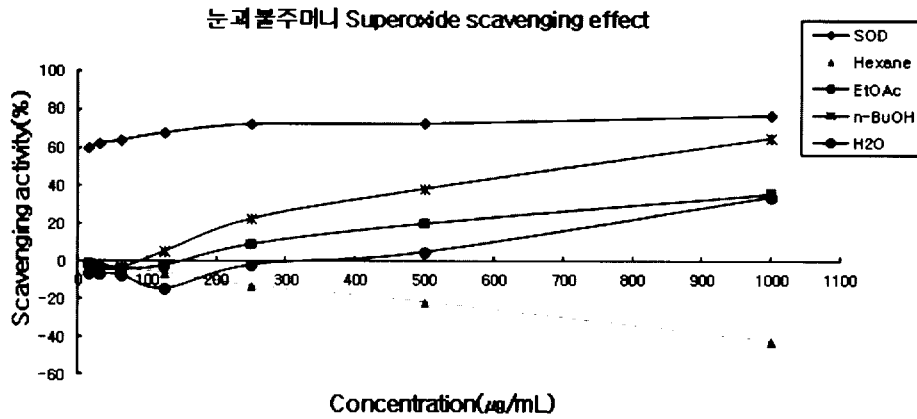


[그림 10] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc

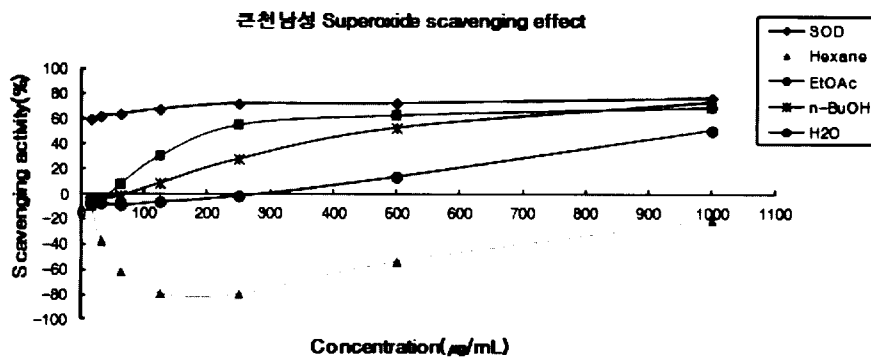
머니의 분획물 BuOH층에서 716.41  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$  값을 확인 할 수 있었다. 꽃향유 분획물 EtOAc층에서 64.62  $\mu\text{g/mL}$ , BuOH층, H<sub>2</sub>O층에서 각각 176.83  $\mu\text{g/mL}$ , 228.54  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$  값을 확인 할 수 있었다. 광대수염 분획물 BuOH층에서 826.71  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$  값을 확인하였다. 석위의 분획물에서는 EtOAc



[그림 11] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Pyrosia lingua* Farwell

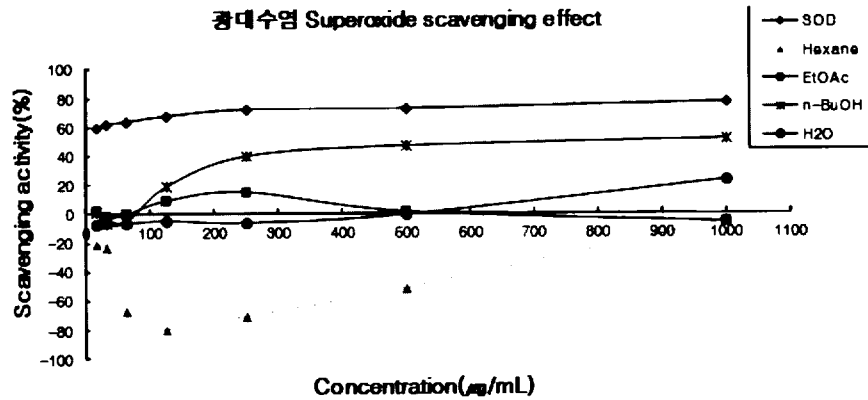


[그림 12] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Corydalis ochotensis* Turczaninow

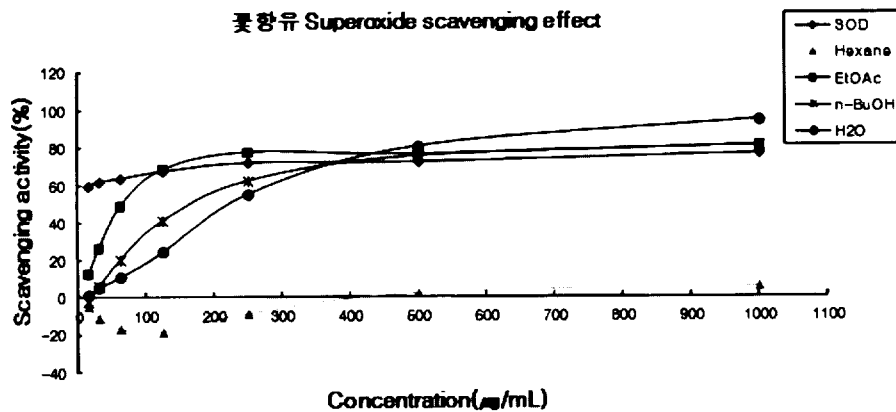


[그림 13] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Arisaema ringens*

총 28.12  $\mu\text{g/mL}$ , BuOH층 112.12  $\mu\text{g/mL}$ , H<sub>2</sub>O층 134.56  $\mu\text{g/mL}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였고, 마지막으로 큰천남성의 분획물에서 EtOAc층에서 222.44  $\mu\text{g/mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 BuOH층에서 471.06  $\mu\text{g/mL}$ , H<sub>2</sub>O층에서 985.76  $\mu\text{g/mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 확인하여 대조군인 SOD(13.43  $\mu\text{g/mL}$ )에 비해 좋은 활성은 확인을 할 수 없었으나, 어느 정도의 활성을 가짐은 알 수 있었다.



[그림 14] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Lamium album* L. nar. barbatum



[그림 15] Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Elscholtzia splendens* Nakai

### 3. Elastase 활성저해 측정

#### 가. 시료 추출물의 Elastase 활성저해 측정

모든 생명체는 태어나면서부터 성숙과 노화 그리고 죽음의 과정을 겪게 된다. 피부도 나이가 들면 표면에 많은 잔주름이 형성되고 부위에 따라 굵은 주름을 형성하며 피부의 표면이 거칠어지고 신축성이 감소된다. 이는 나이가 들면서 유두상 진피의 혈관 분포가 감소하여 모세 혈관 벽의 기저막이 두꺼워져, 진피에 분포하는 섬유조직의 구조적 변성 및 허부 지방조직의 감소가 동반되어 지

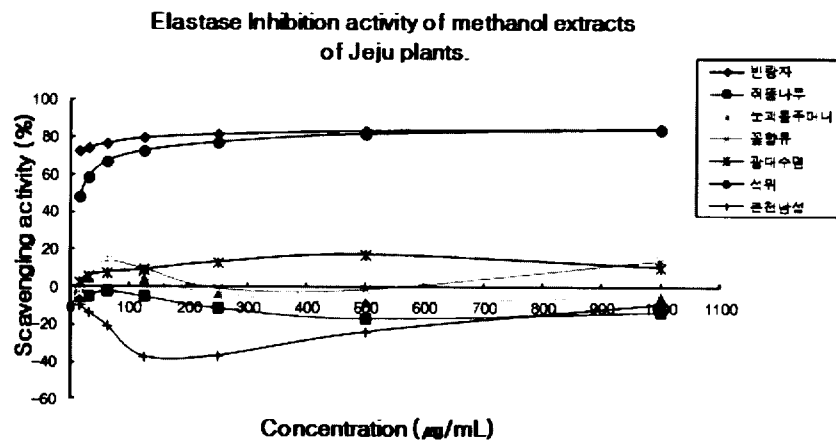
기 때문이다. 최근 피부 탄력을 유지하기 위해 elastin을 분해시키는 elastase 효소에 억제력이 있는 화합물 연구가 활발하다(단온화, 2005). Elastase는 동물결합조직의 불용성 탄성섬유 단백질인 elastin을 분해 시켜 피부의 세포 기저층의 그물망 구조를 끊어주어, 주름을 생성하는 주된 원인으로 알려져 있다(곽윤진 외, 2006: 13).

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 대조군으로 사용된 빈랑자에 의해 elastase 활성 저해를 측정하여 비교한 결과는 <표 5>, [그림 16]과 같다. 6종의 methanol 추출물중 유일하게 석위에서만 elastase 활성 저해정도를 볼 수 있었다. 석위 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub>은 18.09 µg/mL로 대조군으로 사용한 빈랑자 (10.54 µg/mL)에 비교하여 아주 좋은 활성 저해를 보이지는 않으나, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 충분히 활성 저해가 있음을 확인 할 수 있었다.

<표 5> Elastase inhibition activities of methanol extract of Jeju Plants

sample	학 명	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
취퐁나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	>1000
석위	<i>Pyrosia lingua</i> Farwell	18.09
눈피불주머니	<i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow	>1000
큰천남성	<i>Arisaema ringens</i> Schott	>1000
광대수염	<i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc)	>1000
꽃향유	<i>Elscholtzia splendens</i> Nakai	>1000
빈랑자		10.54

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.



[그림 16] Elastase inhibition activity of methanol extracts of Jeju plants

#### 나. 시료 분획물의 Elastase 활성저해 측정

제주도 자생식물 6종 MeOH 추출물의 elastase 활성 저해를 측정하고 각 시료별 유기 용매 분획을

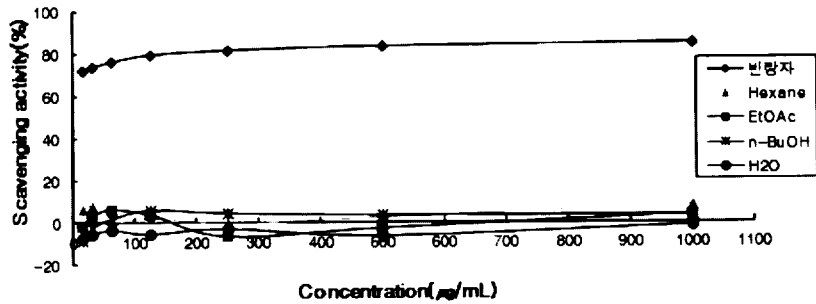
실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 elastase 활성 저해를 측정된 결과를 <표 6>과 [그림 17, 18, 19, 20, 21, 22]로 나타내었다. 석위의 분획물에서만 활성을 확인 할 수 있었는데 EtOAc층에서 IC<sub>50</sub>이 26.91 µg/mL을 보이며 대조군 빈랑자 (10.54 µg/mL)에 비해 좋은 활성은 아니지만 비슷한 활성을 보임을 알 수 있었고, BuOH층과 H<sub>2</sub>O층에서 각각 116.80 µg/mL와 196.19 µg/mL의 IC<sub>50</sub>을 보여 주어 대조군에 미치지 못하는 활성을 가짐을 알 수 있었다.

<표 6> Elastase inhibition activities of solvent extract of Jeju Plants

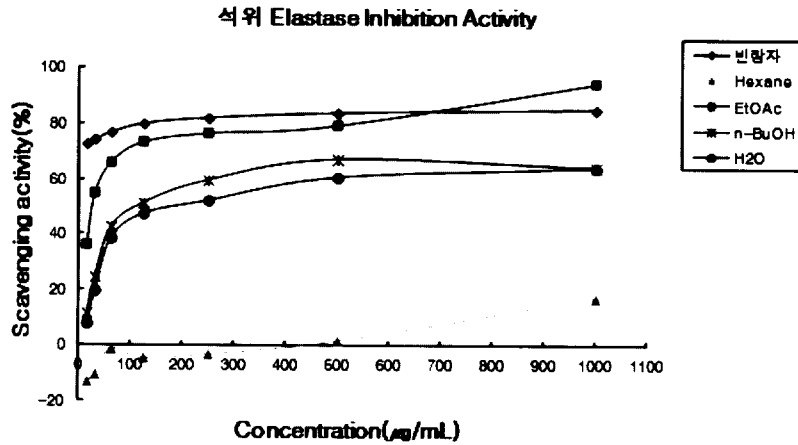
Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
취퐁나무-Hexane	>1000	광대수염-Hexane	>1000
취퐁나무-EtOAc	>1000	광대수염-EtOAc	>1000
취퐁나무-BuOH	>1000	광대수염-BuOH	>1000
취퐁나무-H <sub>2</sub> O	>1000	광대수염-H <sub>2</sub> O	>1000
눈피불주머니-Hexane	>1000	석위-Hexane	>1000
눈피불주머니-EtOAc	>1000	석위-EtOAc	26.91
눈피불주머니-BuOH	>1000	석위-BuOH	116.80
눈피불주머니-H <sub>2</sub> O	>1000	석위-H <sub>2</sub> O	196.19
꽃향유-Hexane	>1000	큰천남성-Hexane	>1000
꽃향유-EtOAc	>1000	큰천남성-EtOAc	>1000
꽃향유-BuOH	>1000	큰천남성-BuOH	>1000
꽃향유-H <sub>2</sub> O	>1000	큰천남성-H <sub>2</sub> O	>1000
빈랑자			10.54

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

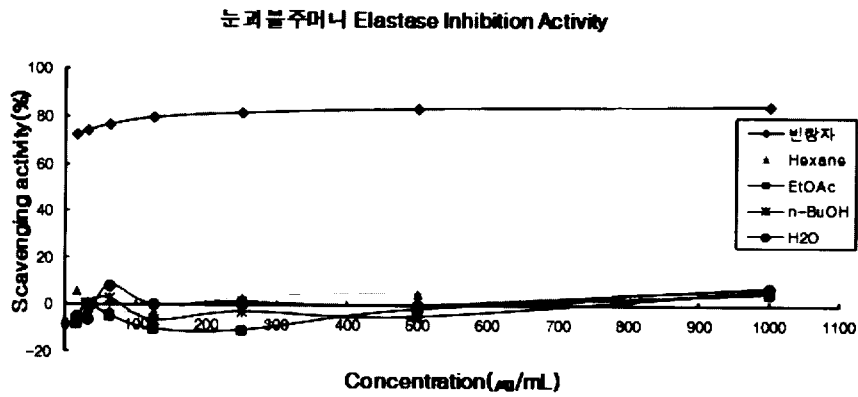
취퐁나무 Elastase Inhibition Activity



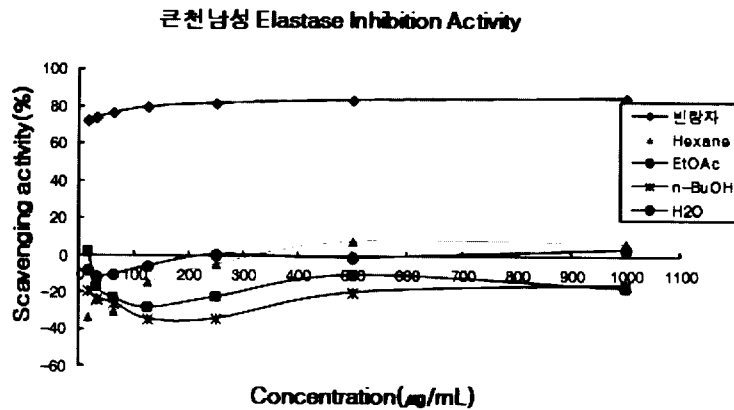
[그림 17] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc



[그림 18] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Pyrosia lingua Farwell*

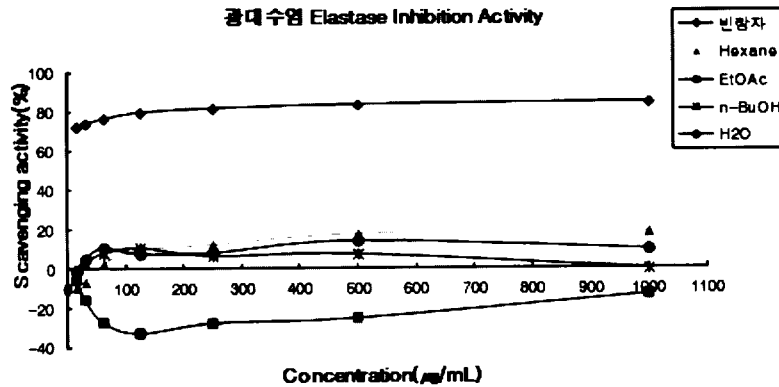


[그림 19] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Corydalis ochotensis Turczaninow*

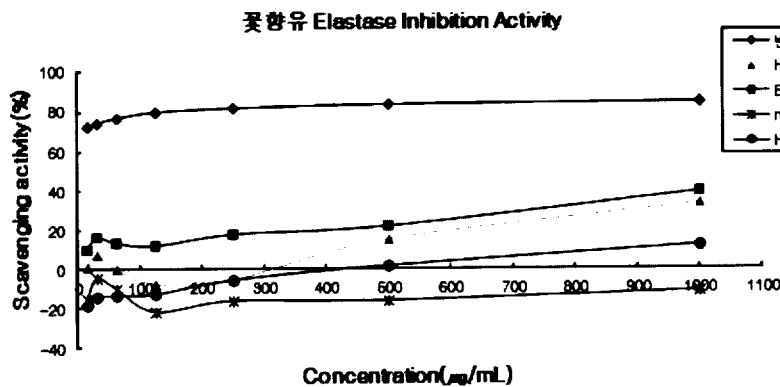


[그림 20] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Arisaema ringens*





[그림 21] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Lamium album L. nar. barbatum*



[그림 22] Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Elscholtzia splendens Nakai*

#### IV. 결론

본 연구는 제주도에서 자생하는 식물 6종 [귀퉁나무(잎), 석위(전초), 꽃향유(전초), 눈피불주머니(전초), 큰천남성(전초), 광대수염(전초)]을 대상으로 DPPH free radical 소거 활성, superoxide 소거 활성 및 elastase 활성 저해를 측정하였다. 이들 식물에 대하여 유기용매 분획을 실시하여 추출 분리한 뒤 각각의 분획물을 얻었으며, 각 분획별로 위와 동일한 항산화 활성을 조사하여 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질의 개발 가능성을 검토하고자 실험을 진행하였다. 다양한 방법으로 이들 식물들의 항산화 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 각 추출물의 RC<sub>50</sub> 값은 석위가 17.32 µg/mL으로 대조군에 비해 매우 뛰어난 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유는 70.98 µg/mL, 귀퉁나무가 84.38 µg/mL 순으로 조사되었으며, 비교 대조군인 BHA나 Vitamin C와 비교하였을 때 단일 물질이 아닌

methanol 추출물임을 감안한다면 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 시료 분획물에서 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정된 결과 IC<sub>50</sub>은 석위의 분획물중 EtOAc층이 17.17 µg/mL, 꽃향유 분획물중 EtOAc층은 18.03 µg/mL로 비교 대조군인 BHA나 Vitamin C보다 더 좋은 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 석위의 BuOH층이 45.51 µg/mL, H<sub>2</sub>O층 143.14 µg/mL 대조 비교군에는 미치지 못하나 유기 용매 분획을 실시한 시료 중에선 비교적 좋은 활성을 나타내고 있었다.

Superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정 결과 각 시료 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 석위 48.12 µg/mL, 쥐똥나무 117.59 µg/mL, 꽃향유 151.97 µg/mL으로 대조군 SOD(superoxide dismutase)의 IC<sub>50</sub> 값 14.43 µg/mL에 비해 좋은 활성은 아니나, 단일 물이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면, 석위 methanol 추출물의 경우 비교적 좋은 항산화 활성을 보임을 확인 할 수 있었다.

각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 EtOAc층에서 28.12 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보임으로 비교 대조군과 비슷한 소거 활성 효과를 보임을 알 수 있었다. 다음으로 꽃향유 EtOAc층에서 64.62 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보였고, 석위의 BuOH층에서는 112.12 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보였다. 석위 H<sub>2</sub>O층에서 134.56 µg/mL, 꽃향유 BuOH층에서 176.83 µg/mL, 꽃향유 H<sub>2</sub>O층에서 228.54 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 확인 할 수 있었다. 쥐똥나무 분획층에서도 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였는데, H<sub>2</sub>O층, BuOH층, EtOAc층에서 각각 298.47 µg/mL, 327.32 µg/mL, 500.82 µg/mL의 IC<sub>50</sub>값을 확인하였는데, 이는 다른 분획 시료물과는 다르게 H<sub>2</sub>O, BuOH, EtOAc층의 순으로 소거 활성을 보여, 다른 EtOAc층들의 좋은 소거활성과는 다른 경향을 보임을 확인하였다.

Elastase 활성 저해 측정 실험에서는 비교 대조군인 빈랑자의 IC<sub>50</sub> 값이 10.54 µg/mL를 나타내는 반면에 제주도에서 자생하고 있는 본 실험에 사용한 식물종의 경우 elastase 활성 저해 정도가 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 이용된 methanol 추출물 중에서 석위의 IC<sub>50</sub>이 18.09 µg/mL로 비교 대조군에 비해서 활성을 떨어지나 대조군과 비슷한 정도의 활성을 보임을 확인하였고, EtOAc층에서 26.91 µg/mL, BuOH층이 116.80 µg/mL이며, 마지막으로 H<sub>2</sub>O 분획층에서 196.19 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보이며, 그 외의 시료에서는 IC<sub>50</sub>을 >1000 µg/mL로 확인 할 수 있었다.

위와 같은 결과를 종합해본 결과 DPPH free radical 소거활성 측정, superoxide radical 소거 효과, elastase 활성 저해 측정 실험 모두에서 가장 뛰어난 효능을 보인 식물종은 석위임을 알 수 있었다.

현재 국내외적으로 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 제주지역에 자생하는 천연물의 항산화 효과에 대한 연구는 그 효용 가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 실험 연구의 결과를 토대로 항산화 효과가 우수한 석위에 대한 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항염증이나, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- 곽윤진·이대형·김나미·이종수(2006). 각종 약용 식물로부터 피부노화 억제관련 Elastase 저해물질의 탐색 및 추출 조건. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(6), 213-216.
- 김경범(2006). **Identification and Characterization of Luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomume*.** 석사학위논문. 제주대학교 일반대학원.
- 김철홍·윤현민·장경전·송춘호·안창범(2004). 활성당의 NO 억제, DPPH 소거 및 Microarray상 유전자 발현에 미치는 영향. *대한침구학회지* 21(5).
- 단은화(2005). **Elastase 효소 억제작용이 있는 플라보노이드화합물의 구조와 활성 연구.** 석사학위논문. 중앙대학교 의약식품대학원.
- 손미예·김성희·남상해·박석규·성낙주(2004). 국내산 녹차 및 후발효차 추출물의 항산화 효과. *Journal of Life Science.* 14(6), 920-924.
- 장현주(2007). **Screening for Antioxidant Activity of Jeju Native Plant.** 석사학위논문. 제주대학교 교육대학원.
- 최점섭·오정임·황인택·김성은·전재철·이병화·김진석·김태준·조광연(2003). 96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정과 응용. *한국농약과학회지* 7(2).
- Bolois MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181, 1199-1200.
- Branen, A. L.(1975). Toxicological and biochemistry of Butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59-63.
- Chan E.S., Fernandez P., Merchant A.A., Montesinos M.C., Trzaska S., Desai A., Tung C.F., Khoa D.N., Pillinger M.H., Reiss A.B., Tomic-Canic M., Chen J.F., Schwarzschild M.A., and Cronstein B.N. (2006). Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 54, 2632.
- Choe, S. Y. and Yang, K. H. (1982). Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene(BHT) and Butylated hydroxyanisole(BHA). *Korea J. Food Sci. Technol.* 14(3), 283-288.
- F. Antonicelli, G. Bellon, L. Debelle, and W. Hornebeck. (2007). Elastin-elastases and inflamm-aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 79, 99.
- Isenburg J. C., Simionescu D. T., and N. R. (2004). Vyavahare, Elastin stabilization in cardiovascular implants : improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. *Biomaterials.* 25, 3293.
- Park S. N. (2003). Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35(3), 510.
- Park S. N. (2003). Antioxidative properties of baicalein component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I). *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 14(5), 657.
- Seite S., Zucchi H., Septier D., Igondfo-Tchen S., Senni K., and Godeau G. (2006). Elastin changes during chronological and photo-ageing : the important role of lysozyme. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 20, 980.
- Seo J. Y., Lee S. H., Youn C. S., Choi H. R., Rhie G. E., Cho K. H., Kim K. H., Park K. C., Eun H. C.,

and Chung J. H. (2001). Ultraviolet radiation increases tropoelastin mRNA expression in the epidermis of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 116, 915.

Tsuji N., Moriwaki S., Suzuki Y., Takema Y., and Imokawa G.. (2001). The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation : implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* 74, 283.

<Abstract>

## Screening of the Antioxidant and Anti-elastase Activities for the Extracts of Jeju Endemic Plants

Lee, Jung-A

(Jeju National University)

Jung, Duk Sang

(Jeju National University)

In the previous study, we reported the antioxidative and cellular protective effects for some Jeju native plant extracts. In this study, we investigated the free radical-scavenging and elastase-inhibition effects for the extracts of another six plants collected in Jeju island. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities ( $RC_{50}$ ) for the extracts of the investigated plants in Jeju island were in the order : *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell (17.32  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Elscholtzia splendens* Nakai (70.98  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc. (84.38  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Corydalis ochotensis* Turczaninow (615.93  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Arisaema ringens* Schott (708.68  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Lamium album* L. nar. *barbatum* (>1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Superoxide anion radical scavenging activities ( $IC_{50}$ ) for the plants were in the order : *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell (48.12  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc. (117.59  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Elscholtzia splendens* Nakai (151.97  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Corydalis ochotensis* Turczaninow (659.97  $\mu\text{g/mL}$ ).

$IC_{50}$  on the elastase inhibition for *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell was 18.09  $\mu\text{g/mL}$ . These results indicate that fractions of the plants investigated here could be used as ingredients for whitening and anti-wrinkle products.

<Key words> *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell, Skin aging, antioxidant activity, anti-wrinkle activity

