



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

야관문 추출물의
주름, 미백 활성 평가

Evaluation of Wrinkle and Whitening Activity of Extract from
Lespedeza cuneata G. Don.

濟州大學校 大學院

農學科

愼 鏞 夏

2017年 12月

야관문 추출물의
주름, 미백 활성 평가

指導教授 宋 昌 吉

愼 鏞 廈

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

2017年 12月

愼鏞廈의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

濟州大學校 大學院

2017年 12月

목 차

LIST OF TABLE	iii
LIST OF FIGURE	iv
ABSTRACT	v
I. 서언	1
II. 연구사	3
III. 재료 및 방법	6
1. 시료 및 추출물의 제조	6
2. 추출물 및 분획물의 항산화 측정	7
1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정	7
2) DPPH free radical 소거활성	8
3) ABTS free radical 소거활성	9
4) ORAC assay	9
3. 추출 및 분획물의 미백 활성	11
1) Tyrosinase 저해 활성	11
2) B16F10 세포에서의 멜라닌 정량	11
4. Western blot analysis	12
5. 통계처리	13
IV. 결과	14
1. 야관문 추출물의 항산화 활성	14
1) 야관문 추출물 및 분획물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량	14
2) 야관문 추출물 및 분획물의 DPPH free radical 소거 활성	16
3) 야관문 추출물 및 분획물의 ABTS free radical 소거 활성	18
4) Oxygen Radical Absorbance Capacity by Fluorescein assay	20
2. 야관문 추출물의 미백 활성	21

1) 야관문 추출물 및 분획물의 Tyrosinase 저해 활성	21
2) B16F10 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제 활성	24
3. HDF 세포에서의 MMP-1, MMP-3 생성 저해 활성	26
4. 항산화, 미백, 항주름 활성간 상관계수분석	29
V. 고찰	31
VI. 적요	34
인용문헌	35

LIST OF TABLES

Table 1. Total phenolic compound and flavonoid contents of fractions from extracted and 30% ethanol extract from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	15
Table 2. The result of DPPH radical scavenging in <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	16
Table 3. The result of ABTS radical scavenging in <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	18
Table 4. Tyrosinase inhibitory activities of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don..	22
Table 5. Correlation coefficient between active components and their biological activities of <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don extract and fraction.	30

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Fractionation of 30% ethanol extract from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don	7
Fig. 2. Antioxidant activity of tested sample expressed as the net area under curve (AUC).	10
Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	17
Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	19
Fig. 5. Antioxidant capacity activities of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	20
Fig. 6. Inhibition of tyrosinase activity of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don.	23
Fig. 7. Melanin contents of Organic solvent extract and Fractions from <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don in B16F10 cell.	25
Fig. 8. Inhibitory effect of <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don extract and fractions on TNF- α production in MMP1 and MMP3 cells.	27
Fig. 9. Effects of <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don extract and fractions on protein levels of MMP-1 and MMP-3.	28

ABSTRACT

This study was investigated to suggest the baseline data about application plan and raw material development of *Lespedeza cuneata* G. Don by producing the research of possibility in cosmeceutical raw material originated from a natural substance.

The result of 30% ethanol extract and fraction was that the total content of phenol was $117.77 \pm 2.86(\text{mg}\cdot\text{GAE}/\text{g})$ which was the highest activity in ethyl acetate fractions. Also the total content of flavonoid was $35.89 \pm 0.55(\text{mg}\cdot\text{QE}/\text{g})$ was the highest activity in ethyl acetate fractions same as phenol. In antioxidation activity, RC50 which was necessary concentration for expressing the 50% inhibition activity. Furthermore, ethyl acetate fractions that value is $26.82 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{ml}$ was the highest in ABTS.

When the antioxidation activation of the several concentrations was compared in ORAC assay, ethyl acetate was the highest in concentration at (12.5) but methyl-chloroform was higher than ethyl acetate in high concentration.

In tyrosinase inhibition activity, arbutin that was positive control in whole concentrations was indicated the highest inhibition rate. However ethyl acetate as high as arbutin in $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Also arbutin which was positive control inhibited the melanin synthesis greatly in concentration at $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. However, ethyl acetate fraction was shown the highest activity among ethanol extract and fraction in *Lespedeza cuneata*. G. Don

When product inhibition ability of MMP1 and MMP3 that formation was promoted by TNF- α was observed using western blot, MMP1 was expressed similar as normal cell that was not treated with TNF- α in ethyl acetate. In case of MMP3, the formation of that was exhibited than normal cell which

was not treated with TNF- α .

The phenol and flavonoid which included the *Lespedeza cuneata* G. Don effected to antioxidation ability. In based on this, it was known that *Lespedeza cuneata* G. Don had the effects in whitening and anti-wrinkling activity.

Therefore, It was expected that the possibility in utilization of *Lespedeza cuneata* G. Don would be used for Cosmeceutical raw material originated from a natural substance based on whitening and anti-wrinkling.

I. 서 언

한국에 자생하는 콩과 다년생 식물인 비수리(*Lespedeza cuneata* G. Don)는 초본식물로 야관문으로 불린다. 분류학적 분류는 콩목 콩과 싸리속이며 생태학적 특징으로는 잎은 어긋나며 잎 표면에는 털이 없으나 뒷면에는 잔털이 있는 것이 특징이며 잎의 길이는 1~2cm이다. 꽃은 8~9월에 피며 흰색이며 잎보다 짧으며 잎겨드랑이에 달린다. 열매는 암갈색을 띠고 있으며 10월에 달리며 황록색 바탕에 적색 반점이 있는 1개의 씨가 들어있다. 야관문은 산기슭 아래서 자라며 한국, 일본, 타이완, 인도, 중국, 오스트레일리아 등지에 분포한다. 야관문은 일상생활에서 베어 말린 후 빗자루로 사용하기도 하며 집에서 기르는 가축의 먹이로도 사용하였다. 한방에서 남성의 음위증, 조루의 치료로 이용되어있으며 진하게 달여 마시면 만성 기관지염에 효과가 있고, 비수리 전초로 술을 담가 먹으면 신장 기능이 허약해서 생기는 노인들의 양기 부족에 탁월한 효과가 있다고 알려져 있다(전, 2006).

현대인들의 삶의 질이 과거보다 높아짐에 따라 의식주와 같은 기본적인 욕구 외에도 미에 대한 욕구가 점차 증가하고 있다.

미에 대한 욕구 내에서도 자연적인 노화를 이겨내어 젊음을 유지하는 욕구가 점차 증가하고 있다. 현대인들의 미에 대한 관심이 지속적으로 높아짐에 따라 이를 만족시키기 위하여 화장품 시장의 지속적인 개발이 진행 중이며 “anti-aging”, “youth”라는 단어가 화장품 시장에 등장하고 있다. 현대인들의 삶의 질이 향상과는 달리 현대인들의 받는 스트레스는 과거와 다르게 증가하고 있다. 이러한 스트레스는 피부의 산소라디칼을 발생시키게 되고 이는 피부 노화의 큰 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Martinez, 1994).

최근 들어 이러한 피부의 산소라디칼로 인한 피부노화를 최소화하기 위하여 식물 유래의 항산화 활성에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 식물의 2차대사 산물에는 항산화 활성을 가지고 있는 물질이 존재하며 대부분의 물질들은 페놀성 화합물이며 이러한 페놀성 히드록시기 물질은 활성산소를 소거하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 식물은 생존에 어려운 환경 이로부터 극복하기 위해 방어

물질로써 2차대사산물을 생산하며 phenolic compound는 이러한 대표적인 2차대사 산물중 하나이다. phenolic compound는 항산화, 항암, 항염증, 항당뇨 등 다양한 생리 활성을 나타낸다고 보고되어있다(Rahman *et al.*, 2006).

바이오산업에서 화장품 산업은 각광받고 있으며 규모도 점차 커져 의약품산업 다음으로 규모가 큰 사업으로서 지속개발이 가능하며 고부가가치 사업으로 점차 성장하고 있다. 화장품 사업은 원재료에 대한 이미지를 강조하여 나아가 기능성을 부각시키는 특징을 가지고 있다. 기존의 화장품이 피부에 대하여 단순한 보호와 관리로 여겨졌다면 현재는 유해한 환경으로부터 보호뿐만 아니라 외부로부터 손상된 피부의 재생, 개선, 보호와 같이 기능적인 특성이 강조 되고 있다.

과거 arbutin 및 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA) 등과 같은 합성화학물질이 피부 미백 및 산화방지제 기능성 원료로써 사용되어왔으나 최근래에 합성화학물질에 대한 소비자의 인식의 변화로 이러한 화학물질의 사용이 감소하고 천연물 유래의 기능성 원료의 수요가 점차 증가하고 있다.

본 연구는 야관문의 분획추출물로부터 페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH assay, ABTS assay, ORAC assay를 통한 항산화 연구를 진행하고 이를 바탕으로 B16F10, HDF 세포에서 미백, 주름 관련 *In-vitro* 평가를 진행 하였으며 궁극적으로 미백 및 주름개선효과를 확인함으로써 야관문의 새로운 가치를 발견하고 나아가 화장품 및 제약 기능성 소재로서 야관문의 이용 가능성을 제시하고자 실험을 실시하였다.

II. 연구사

과다한 자외선 노출을 포함한 환경적인 요인과 불규칙적인 생활로 인한 스트레스 등으로 인하여 활성산소가 과다하게 생성될 때 세포에서는 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical(-OH), superoxide anion radical 등의 활성산소를 생성하게 되며 이는 세포에 유해한 작용을 한다. 이는 세포내에서 단백질 분해효소의 활성화, 진피에 존재하는 collagen과 elastin의 분해, 멜라닌 생성 촉진, 등을 야기하며 이러한 결과로 기미, 주근깨, 피부착색, 주름 등과 같이 피부에 악영향을 초래한다(Stich, 1991).

활성산소에 의한 과산화로부터 보호하기 위하여 산화방지제로서 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA)와 같은 합성 항산화제를 이용하고 있으나 최근에 이러한 합성항산화제의 독성과 부작용(Hudson, 1990)이 밝혀짐에 따라 이를 대체할 수 있는 천연으로부터 얻을 수 있는 항산화 물질의 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

과다한 멜라닌 생성은 피부의 색소침착, 기미, 주근깨 등을 일으켜 피부 미용에 악 영향을 끼치는 요소 중 하나이다. 멜라닌 생성은 표피 내 멜라닌 형성세포(melanocyte)에 존재하는 티로신(tyrosin)으로부터 가역적 산화반응을 통하여 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA), DOPA quinone, DOPA chrome을 거쳐 멜라닌으로 형성되는데 자외선 등 외적요인(김 *et al.*, 1994; Virador *et al.*, 2002), 스트레스 그리고 호르몬 등의 내적 요인에 의해 조절된다. Melanocyte stimulating hormone(α -MSH)은 멜라닌 생성에 큰 역할을 지니는 호르몬으로서 cyclic adenosine monophosphate(cAMP) 경로를 자극시켜 피부 내 멜라닌 생성을 촉진 시키는 요인이다(Bertolotto *et al.*, 1998; Cheli *et al.*, 2009).

표피세포에 자외선 등 환경적 요인에 의해 자극을 받게 되면 분비하는 인자로는 endothelin(Yada *et al.*, 1991; Tada *et al.*, 1998), α -MSH(Choi *et al.*, 2008), nitric oxide(Christine *et al.*, 1997) 등이 분비된다고 알려져 있다. α -MSH는 cAMP경로를 자극하여 표피세포에서 멜라닌 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있

다(Choi *et al.*, 2008).

피부의 탄력은 피부 진피 내에 존재하는 결합섬유(collagen)와 탄성섬유(elastin)에 의하여 유지된다. 피부 진피 내에 collagen을 분해하는 MMP-1(metalloprotease-1), elastin을 분해하는 MMP-3(metalloprotease-3)의 생성은 활성산소와 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고되어있다(Rhie *et al.*, 2001; Imokawa, 2001). 활성산소에 의하여 MMPs의 축진이 유도되고 표피세포 내에서의 발현량이 더욱 증가되어지며 MMPs에 의하여 피부 내 collagen 및 elastin의 분해는 피부의 주름발생의 원인이 된다. 따라서 활성산소를 소거하는 것은 MMPs 발생을 저해함으로써 주름방지를 위한 중요한 방법이 된다(Hudson, 1990).

Collagenase는 진피 내 존재하는 콜라겐에 작용하는 MMP-1으로서 이 효소의 활성이 증가하게 되면 콜라겐이 과도하게 분해되어 주름이 형성된다. MMP-1의 활성을 억제하면 피부노화를 지연시킬 수 있는 효과를 나타낸다고 보고되어 있다(Seiji, 2000).

Elastase는 또 다른 진피 내 elastin에 특이적으로 작용하는 분해효소로서 MMP-3로 알려져 있다. MMP-3의 지나친 활성은 elastin을 과도하게 분해시켜 피부섬유의 결합을 저해함으로써 피부노화의 원인이 된다. Elastin에 특이적으로 작용하는 효소인 MMP-3의 과도한 활성을 억제시킨다면 피부노화 방지가 가능할 것으로 볼 수 있다(Imokawa, 2001).

Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)는 종양괴사인자로서 cytokinin의 일종으로 알려져 있다. TNF- α 는 종양에 대하여 괴사를 유도하는 인자로 발견되었으며 특정 세포에 대하여 세포자살을 유도한다(Victor *et al.*, 2002). TNF- α 는 주로 면역을 담당하는 대식세포에서 주로 분비되며 면역 세포의 조절 역할을 한다. TNF- α 의 비정상적인 조절은 암, 염증성질환 등의 질병에서 나타나며 최근에 TNF- α 는 사람 피부에 있어 MMPs의 활성을 촉진시킨다고 보고되어있다(Han *et al.*, 2001).

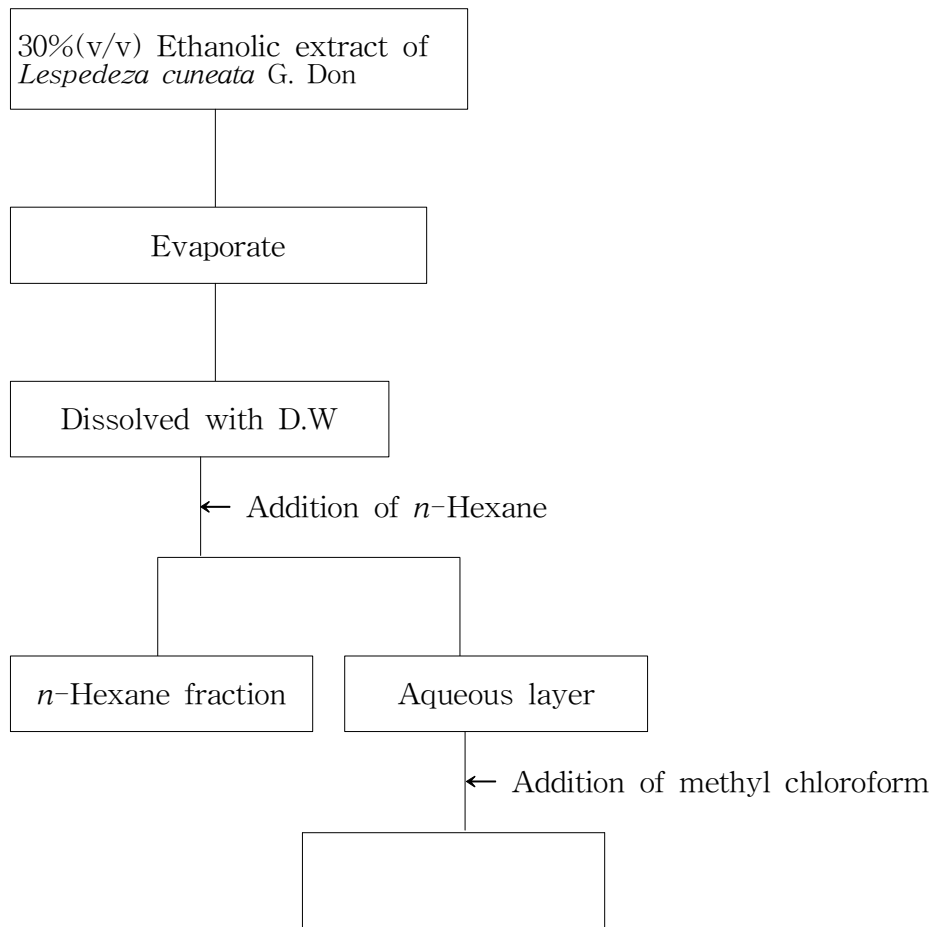
야관문의 flavonoid와 phenolic phytochemicals의 종류인 quercetin과 kaempferol은 대표적인 항산화 물질로 알려져 있다(Numata, 1980). 한방에서는 남성의 음위증, 정력 강장, 발기부전의 치료용으로 이용되었다고 보고되어 있다. 그

외에도 야관문의 메탄올 추출물은 tyrosinase에 대하여 저해활성이 보고되어지고 있으며(차 *et al.*, 2010), 야관문의 ethyl acetate 분획물의 경우 피부 상재균에 대한 항균작용으로부터 항산화, 항노화 및 항균성 효과가 보고되어있다(이 *et al.*, 2011). 또한 야관문의 에탄올 추출물의 경우 elastase 저해활성 및 동물실험에서 외과적 창상에 대하여 피부재생의 효과가 보고되어있다(김 *et al.*, 2014).

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 시료 및 추출물의 제조

본 실험에 사용한 야관문은 개화기 이전 제주 오라동 일대에서 채집한 것으로 뿌리를 제거한 전초를 사용하였다. 채집한 후 건조된 야관문 500g을 믹서로 분쇄한 뒤 상온아래 30%(v/v) 에탄올에 시료와 추출 용매를 1:15의 비율로 24시간 교반추출 하였다. 이후 얻어진 추출물을 *n*-hexane, methyl chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, aqueous 순으로 3회 반복 분획을 실시 한 후 감압농축기로 농축을 하여 건조분을 획득하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).



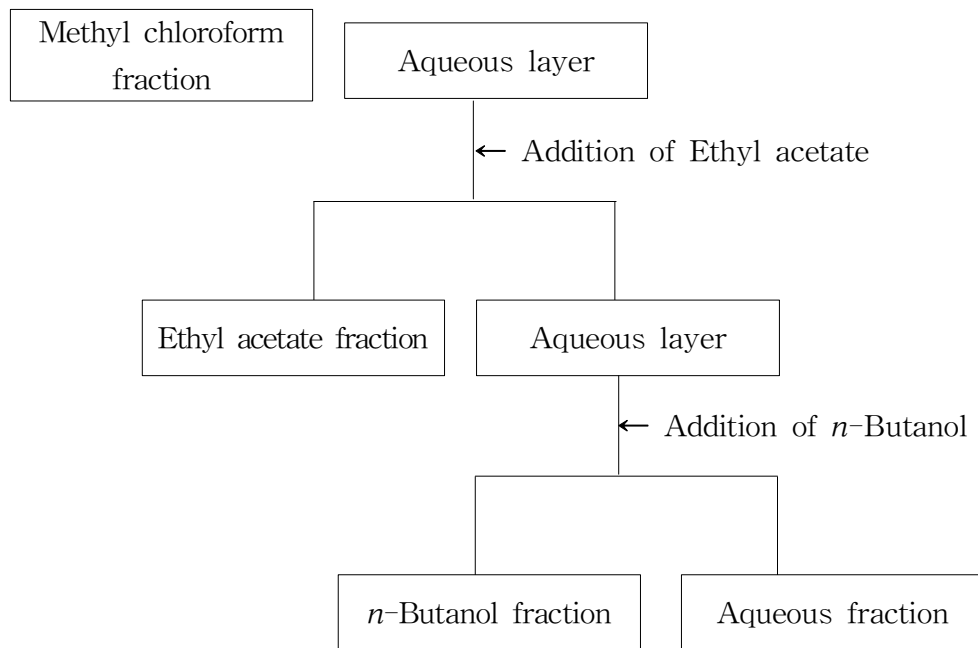


Fig. 1. Fractionation of 30% ethanol extract from *Lespedeza cuneata* G. Don.

2. 추출물 및 분획물의 항산화 측정

1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 실험방법을 사용하여 측정하였다(Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016). 30% 에탄올 추출물 및 분획물 각각 100 μ l에 증류수 500 μ l를 혼합한 후 Folin-Ciocalteu 시약 50 μ l를 넣고 vortexing 과정을 거친 후 5분간 반응시켰다. 그 다음 20% sodium carbonate 300 μ l를 넣어 상온아래 20분간 반응시켰으며 Y자형 큐벳을 사용하여 분광광도계 (Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer, Varian)를 사용하여 725nm에서 흡광도를 측정 하였다. 본 실험은 동일 조건아래 총 3회 실시하였으며 측정된 에탄올 추출물 및 분획물로부터 페놀량의 산출은 gallic acid로 통하여 작성된 표준검량 곡선을 이용하여 GAE(gallic acid equivalent, mg·GAE/g)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Kim등의 방법을 이용하여 측정하였다(Kim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2010b). 에탄올 추출물 및 분획물 200 μl 에 10% aluminum nitrate 100 μl 와 1 M potassium acetate 100 μl 를 혼합하였다. 그 후 4.6 ml 80% 에탄올 첨가하여 40분간 실온에서 방치하였으며 이후 분광광도계로 417 nm아래 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 동일 조건아래 총 3회 실시하였으며 측정된 에탄올 추출물 및 분획물로부터 플라보노이드량의 산출은 표준물질인 quercetin을 통하여 작성된 표준검량곡선을 이용하여 QE (quercetin equivalent, mg·GAE/g)로 나타내었다.

2) DPPH free radical 소거활성

DPPH는 보라색을 지닌 상대적으로 안정된 자유전자로서 시료에 존재하는 산화물질이 가진 전자 공여능에 의하여 서로 반응하게 되면 안정된 분자가 된다 (Brand *et al.*, 1995). 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거능은 최 (Choi *et al.*, 2003) 등의 방법을 변형하여 실시하였다. 에탄올 추출물 및 분획물에 메탄올을 혼합하여 20 μl 로 만든 후 0.15 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 180 μl 를 96-well plate에 로딩하여 상온 아래 암실에서 30분동안 방치하였다. 그 이후 multi-micro plate reader (spectramax i3, molecular device, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거능은 아래의 계산식으로 계산하였으며 모든 실험은 동일 농도아래 3회 실시하였다. DPPH radical을 50% 소거하는데 필요한 시료의 양은 RC_{50} 으로 표기하였다.

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

A; absorbance of the sample, B; absorbance of the blank, C; absorbance of the control

3) ABTS free radical 소거활성

ABTS는 안정화 상태로 존재하나 과산화기와 반응하여 ABTS radical을 생성하게 된다. 각각의 에탄올 추출물 및 분획물에 들어있는 항산화 물질이 생성된 ABTS radical을 소거시키는 능력을 통하여 활성을 측정하였다. ABTS free radical 소거활성의 측정방법은 Ko(Ko *et al.*, 2016)등의 방법을 이용하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(Sigma Co., 이하 ABTS)에 2.6 mM potassium persulfate를 반응시켜 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 이후 양이온이 형성된 ABTS용액에 메탄올을 가하여 734 nm 아래 흡광도 값이 1.0이 되도록 희석시켰다. 희석된 ABTS 용액 180 μ l와 에탄올 추출물 및 분획물 20 μ l을 혼합하여 암실에서 30분간 방치한 후 multi-microplate reader로 734 nm아래 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 동일 농도아래 3회 실시하였으며 ABTS radical을 50% 소거하는데 필요한 시료의량은 RC₅₀으로 표기하였다.

4) ORAC assay

항산화력 측정기법 중에서 radical 소거기능 측정법에는 TEAC, ABTS, TRAP, DPPH 등이 있으나 최근 해외에서 항산화 기능을 갖는 식품 원료로 인증을 받기 위해 Dept of Agriculture, U.S에서 표준화한 실험기법으로 ORAC를 선택하고 있는 추세이다. 실험에 사용한 Fluorescein solution과 AAPH를 혼합하면 radical이 생성되며 반응이 시작되며 시간이 지나면서 형광물질 값이 감소하는 FL-decay 반응을 나타낸다. 시료에 항산화 물질이 존재할 경우 AAPH로 인해 생성된 radical을 저해함으로써 FL-decay반응이 Inhibition되며 이때 시료에 의해 감소되는 FL 값을 시간별로 측정하여 이를 통해 AUC(Area under curve)를 산출한 후 시료별로 가진 항산화 능력을 측정하는 원리다(Fig. 2).

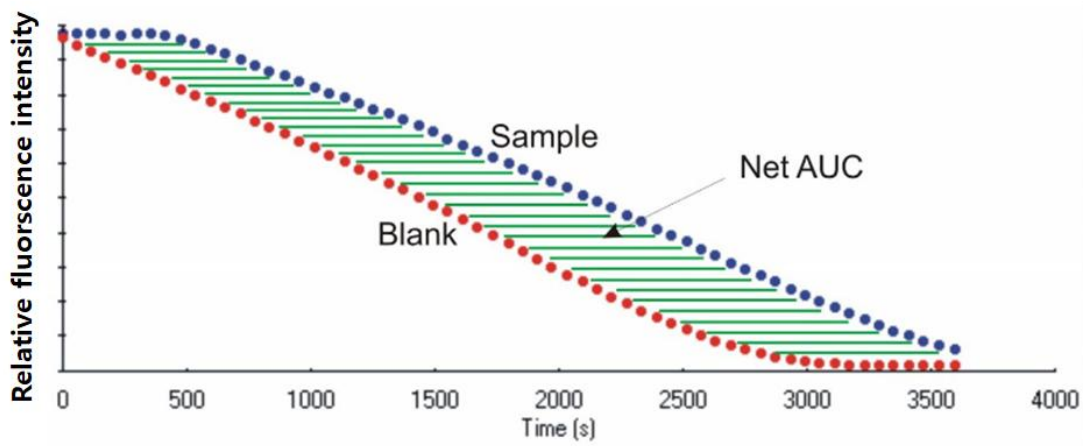


Fig. 2. Antioxidant activity of tested sample expressed as the net area under curve (AUC).

30% 에탄올 추출물 및 각각의 유기용매에 의해 분리된 야관문 분획추출물의 항산화 활성은 추출물 및 분획물이 가지고 있는 항산화 효과에 의해 억제되는 FL-dacay 반응의 감소율을 측정함으로써 진행하였다. 산소라디칼 생성을 위해 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였다. 시료는 100, 50 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도와 β -phycoerythrin(SIGMA St Louis. MO. USA) 0.25 mM 10 μl 를 함유한 0.75 M phosphate- buffer(SIGMA St. Louis. MO. USA)를 총 150 μl 를 제조하였으며 50 μl AAPH를 혼합한 후 시간이 지남에 따라 변화되는 fluorescent 감소율을 Fluorometer (PerkinElmer Victor3)를 통하여 excitation 535 nm, emission 590 nm, 36.5 $^{\circ}\text{C}$ 아래 측정값을 2분 간격으로 25회 측정하였다. 항산화 활성 비교 표준액으로 water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy- 2,5,7,8 - tetramethylchroman-2- carboxylic acid, Aldrich Chem, Inc. Milw. WI 이하 Trolox)를 Phosphate buffer를 가하여 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석하여 사용하였다. 모든 실험은 동일 조건에 3회 반복 시행하였으며 기기에 의한 관측된 값은 검체인 Trolox 1g 가지고 있는 ORAC value의 값을 1로 기준하여 각 시료의 ORAC value를 환산하였다.

Antioxidation of capacity(ORAC value) = (AUCsample - AUCblank) / (AUCtrolox - AUCblacnk) x 100]

*AUC (Area under the curve) = 1+f1/f0 + f2/f0 + f3/f0 +... +f25/f0

3. 추출물 및 분획물의 미백 활성

1) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 Bernard의 방법을 변형하여 실시하였다(Bernard *et al.*, 2002). 에탄올 추출물 및 이로부터 분리된 분획물 10 μ l(final conc. 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ g/ml)와 Mushroom tyrosinase(Aldrich, Co., St, Louis, MO 63103 USA 314-771-5765)를 50 mM phosphate buffer(PH 6.5) 희석시킨 후 20 μ l (500U/ml)을 제조하였다. tyrosine을 함유한 Mixture(1 mM L-tyrosine : 50 mM phosphate buffer : 증류수 = 10 : 10 : 9)를 제조 한 후 170 μ l를 가한 후 37 $^{\circ}$ C 아래 30분간 Incubation 하였다. 이 후 multi microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 동일 조건아래 총 3회 실험을 실시하였다.

2) B16F10세포에서의 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Hosoi 등(Hosoi *et al.*, 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 사용된 B16F10 세포는 C56/BL6유래의 melanoma cell line으로 일본 등에서 미백물질 스크리닝에 일반적으로 사용하는 세포이다. 사용된 B16F10 세포는 5% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL Grand BRL grand Island, NY, USA) 및 1% penicillin을 첨가한 delbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL(DMEM)배지를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 세포가 배양되면 Phosphate buffer saline(PBS)로 세척하고 0.05% Trypsin-EDTA(TE) 용액을 일정량 첨가하여 cell culture dish에 부착된 세포를 분리한 후 다시 DMEM을 가하여 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 suction 통하여 제거한 후 아래에 모인 세포에 다시 DMEM을 첨가하여 충분히 현탁시킨 후 세포수를 측정하였다. 그 이후 6-well plate에 2x10⁵ cells/well의

농도로 분주 한 뒤 α -MSH (1 mM) 및 각 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리 한 후 72시간 incubation 하였다. 이 후 1 ml의 PBS로 세척한 후 1 N 의 NaOH 용액으로 60°C에서 1시간 용해하여 multi microplate reader를 통해 405 nm아래 흡광도를 측정 한 후 아래의 식을 통해 멜라닌 총량을 계산하였다.

$$\text{Melanin contents (\% of control)} = (A-B)/C * 100$$

A; absorbance of the sample, B; absorbance of the blank, C; absorbance of the control

4. Western blot analysis

Western blot analysis는 protein이 DNA로부터 Transcription되어 RNA를 통해 다시 Translation을 거쳐 protein이 발현되는 중점원리(The Central Dogma)를 바탕으로 특정 protein의 유무 또는 양을 알기 위해 수행하는 분석방법이다. 항원-항체 반응의 원리를 이용하여 MMPs를 검출하기 위한 실험은 조 등(조 *et al.*, 2016)의 방법을 변형하여 진행하였다. HDF(Human dermal fibroblast) 세포를 배양 한 후 1×10^5 cells/well 개 씩 6-well plates에 분주하고 TNF- α (10 ng/ml)의 농도로 처리하여 MMPs의 발현을 유도 시킨 후 에탄올 추출물 및 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리하여 48시간 배양하였다. 이후 PBS로 세포를 세척한 뒤 상층액을 제거한 후 Protein Extraction solution (iNtRON, Gyeonggi, Korea)을 첨가하여 세포를 녹여 얻어진 단백질을 1.5 ml tube에 옮긴 후 99°C에서 10분 가열 후 원심분리하여 -70°C에 보관하였다. 단백질 정량은 Bicinchoninic acid assay(BCA) protein assay kit를 이용하였으며 각각의 시료를 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 전사하였다. 전사된 membrane을 5% skim milk/TBST(Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20)에서 1시간동안 blocking 하였다. 이후 1차 antibody를 전사된 membrane에 첨가하여 반응시킨 후 TBS/T로 5분간 총 5회 세척하였다. 이를 검출하기 위해 부착한 2차 antibody는 1시간 상온에서 처리 후 TBS/T로 위와 동일한 방법으로 세척하였다. 세척된 membrane은 EZ-Western limi pico

reagents를 처리한 후 chemidoc image analyze (Bio-Rad, Ca, USA)를 통해 밴드를 확인하였다. 통계를 위한 수치데이터 환산은 image Processing and Analysis in JAVA (NIH, USA)를 사용하여 membrane에 옮겨진 단백질의 면적을 구하였다.

5. 통계처리

본 연구를 통한 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, 각 실험군의 통계처리는 SASS 9.1 통계프로그램을 이용하였으며 mean \pm S.D, Duncan's multiple range test를 통하여 농도별 시료의 측정치 값을 나누어 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정하였다. 각 실험에 대하여 서로간의 연관성을 분석하기 위해 Peason's Correlation Coefficient를 이용하였으며 각 측정값에 해당하는 유의성은 NS(Not significant), *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$)로 표기하였다.

IV. 결 과

1. 야관문 추출물의 항산화 활성

1) 야관문 추출물 및 분획물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

본 연구에서 야관문의 30% 에탄올 추출물 및 분획물에 존재하는 페놀과 플라보노이드와 뒤에서 진행되는 항산화, 미백, 주름에 관한 생리활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 진행하였다. 페놀의 경우 에틸아세테이트 분획물(117.7 ± 2.8 mg·GAE/g)에서 가장 높게 관찰되었으며 헥산 분획물(79.7 ± 0.7 mg·GAE/g), 부탄올 분획물 (45.4 ± 0.8 mg·GAE/g), 메틸클로로폼 분획물(39.0 ± 1.1 mg·GAE/g), 30% 에탄올 추출물(36.2 ± 0.2 mg·GAE/g), 물 분획물(13.3 ± 0.5 mg·GAE/g) 순서로 함량을 나타내었다. 플라보노이드의 경우 가장 높은 함량은 페놀함량이 높았던 에틸아세테이트 분획물 (35.8 ± 0.5 mg·QE/g)과 동일하였으며 부탄올 분획물(14.7 ± 0.2 mg·QE/g), 메틸클로로폼 분획물(7.9 ± 0.4 mg·QE/g), 헥산 분획물(6.3 ± 1.2 mg·QE/g), 30% 에탄올 추출물(5.1 ± 0.5 mg·QE/g) 순으로 함량을 나타내었으나 물 분획물에서는 플라보노이드가 관찰되지 않았다(Table 1).

Table 1. Total phenolic compound and flavonoid contents of fractions from extracted and 30% ethanol extract from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Sample	Total phenol (mg·GAE/g) ¹⁾	Total flavonoids (mg·QE/g) ²⁾
30% Ethanol (Extract)	36.2 ± 0.2 e	5.13 ± 0.5 e
<i>n</i> -Hexane	79.7 ± 0.7 b	6.36 ± 1.2 d
Methyl chloroform	39.0 ± 1.1 d	7.93 ± 0.4 c
Ethyl acetate	117.7 ± 2.8 a	35.89 ± 0.5 a
<i>n</i> -Butanol	45.4 ± 0.8 c	14.71 ± 0.2 b
Aqueous	13.3 ± 0.5 f	N.D ³⁾

Each value represents Mean ± SD (n=3).

¹⁾ mg· GAE/g; mg· gallic acid equivalent per sample 1 g.

²⁾ mg· QE/g; mg· quercetin acid equivalent per sample 1 g.

³⁾ Absorbance was not detected in the reaction solution.

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

2) 야관문 추출물 및 분획물의 DPPH free radical 소거 활성

본 실험을 통하여 야관문 30% 에탄올 추출물과 그로부터 분리된 분획물의 항산화 활성을 합성항산화제인 BHT(dibutyl hydroxy toluene)와 비교하였으며 DPPH에 대한 radical을 50% 소거하는데 필요한 농도를 산출하여 RC₅₀으로 나타내었다(Table. 2). RC₅₀의 경우 에틸아세테이트 분획물이(91.6 ± 1.9 μg/ml)으로 가장 높은 활성을 나타냈고 헥산 분획물이(124.1 ± 2.1 μg/ml) 그 다음으로 나타내었으며 이어서 부탄올 분획물(157.3 ± 4.1 μg/ml), 80% 에탄올 추출물(178.9 ± 5.4 μg/ml), 메틸클로로폼 분획물(190.4 ± 3.7 μg/ml), BHT(241.3 ± 8.4 μg/ml), 물 분획물(833.2 ± 63.1 μg/ml) 순으로 활성을 나타냈다.

Table 2. The result of DPPH radical scavenging in *Lespedeza cuneata* G. Don.

Extract	RC ₅₀ (μg/ml) ¹⁾
80% Ethanol	178.9 ± 5.4 c
<i>n</i> -Hexane fraction	124.1 ± 2.1 de
Methyl chloroform fraction	190.4 ± 3.7 c
Ethylacetate fraction	91.6 ± 1.9 e
<i>n</i> -Butanol fraction	157.3 ± 4.1 cd
Aqueous fraction	833.2 ± 63.1 a
BHT ²⁾	241.3 ± 8.4 b

1) RC₅₀ ; Amount required for a 50% reduction of DPPH free radicals after 30 min.

2) BHT ; dibutylated hydroxytoluene.

Each value represents Mean ± SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

야관문의 에탄올 추출물 및 분획물을 각각 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 반응 시킨 후 농도별로 각 추출물 및 분획물을 양성대조군인 BHT와 비교하여 DPPH 소거능을 측정된 결과 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 에틸아세테이트와 헥산 분획물이 BHT보다 더 높은 활성을 나타내었으며 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올, 에탄올추출물 순서대로 BHT보다 더 높은 활성을 나타내었다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 물을 제외한 모든 에탄올 추출물 및 분획물에서 BHT와 비교하여 높은 활성을 나타냈으며 에틸아세테이트 분획물에서 페놀과, 플라보노이드 성분이 가장 높았던 것처럼 DPPH 소거능 또한 다른 분획물과 비교하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3).

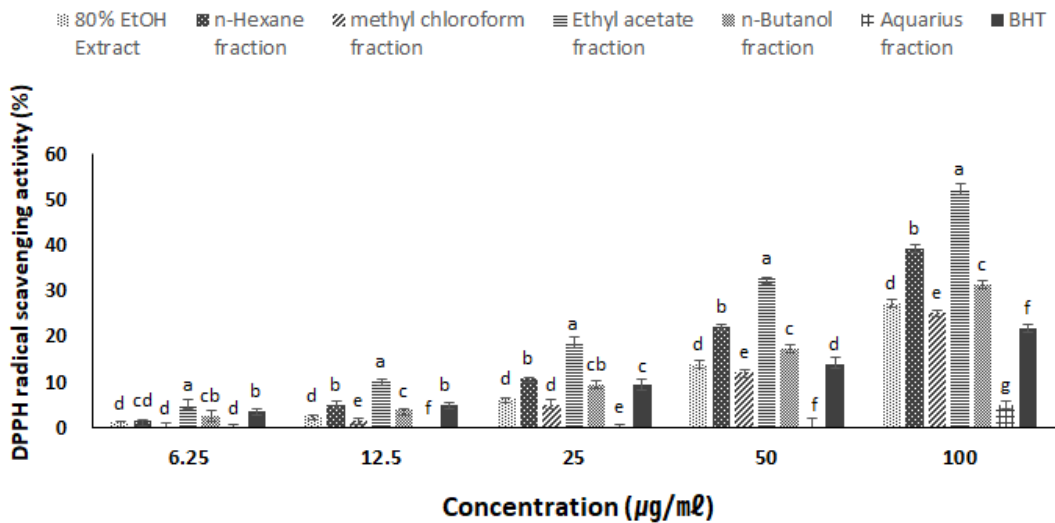


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

3) 야관문 추출물 및 분획물의 ABTS free radical 소거 활성

각각의 시료와 ABTS radical 소거 활성을 비교하기 위해 양성대조군으로써 BHT를 사용하였으며 50% ABTS radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 RC₅₀으로 나타내었다. 실험에 이용한 시료 중 가장 좋은 활성을 가진 것은 이전에 진행하였던 DPPH와 동일한 경향으로 에틸아세테이트 분획물(26.8 ± 0.6 µg/ml)에서 50% ABTS radical을 소거하는데 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 3).

Table 3. The result of ABTS radical scavenging in *Lespedeza cuneata* G. Don.

Extract	RC ₅₀ (µg/ml) ¹⁾
80% Ethanol	59.6 ± 0.8 b
<i>n</i> -Hexane fraction	51.1 ± 0.2 c
Methyl chloroform fraction	58.7 ± 1.2 b
Ethylacetate fraction	26.8 ± 0.6 d
<i>n</i> -Butanol fraction	60.2 ± 0.8 b
Aqueous fraction	161.3 ± 8.1 a
BHT ²⁾	<6.25 e

1) RC₅₀ ; Amount required for a 50% reduction of ABTS free radicals after 30 min.

2) BHT ; dibutylated hydroxytoluene.

Each value represents Mean ± SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

야관문의 에탄올 추출물 및 분획물을 각각 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 반응 시킨 후 농도별로 양성대조군인 BHT와 비교하여 ABTS 소거능을 측정된 결과 대조군으로 사용한 BHT가 가장 높은 활성을 보였다. 에탄올 추출물 및 분획물의 경우 모든 농도에서 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 활성을 나타냈으며 DPPH radical 저해 활성과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 4).

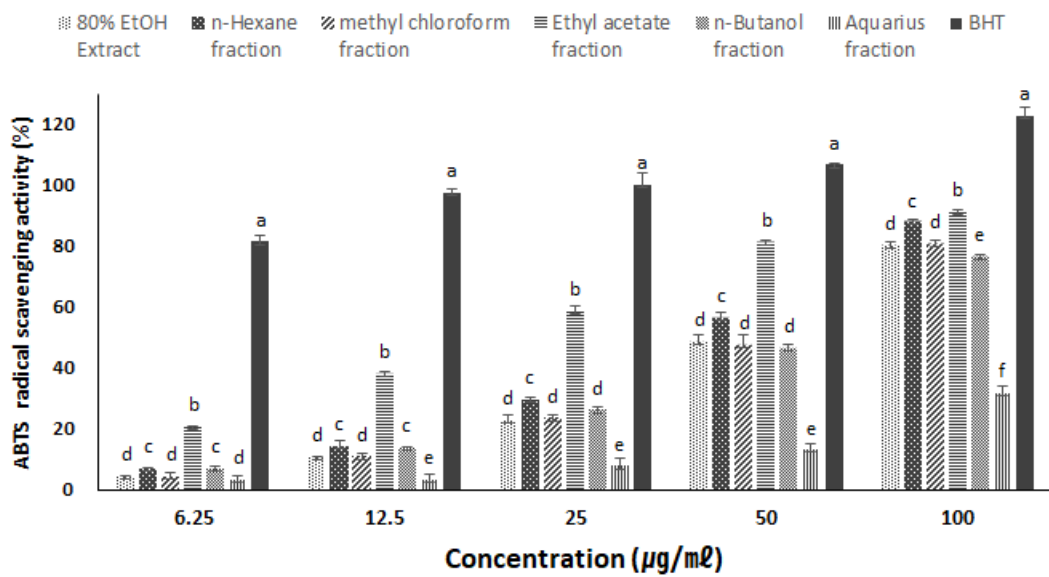


Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of Organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

4) Oxygen Radical Absorbance by Fluorescein assay

AAPH에 의해서 생성된 radical에 에탄올 추출물과 분획물이 가진 radical 저해능력에 따른 fluorescent 감소율을 ORAC assay를 이용하여 측정하였다. 측정된 관측값을 positive control로 사용한 Trolox가 가진 항산화력을 동일 농도아래 기준으로 환산하였을 때 시료가 가진 활성을 ORAC value로써 나타내었다. 그 결과 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아래 에틸아세테이트 분획물($108 \pm 4\%$)에서 가장 높은 활성을 나타냈으나 농도가 증가함에 따라 더 이상 활성이 높아지지 않았다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 부탄올 분획물($114 \pm 3\%$)이 가장 높은 활성을 나타내었으며 물 분획물 ($75 \pm 2\%$)을 제외한 나머지 시료의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도아래 Trolox보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 5).

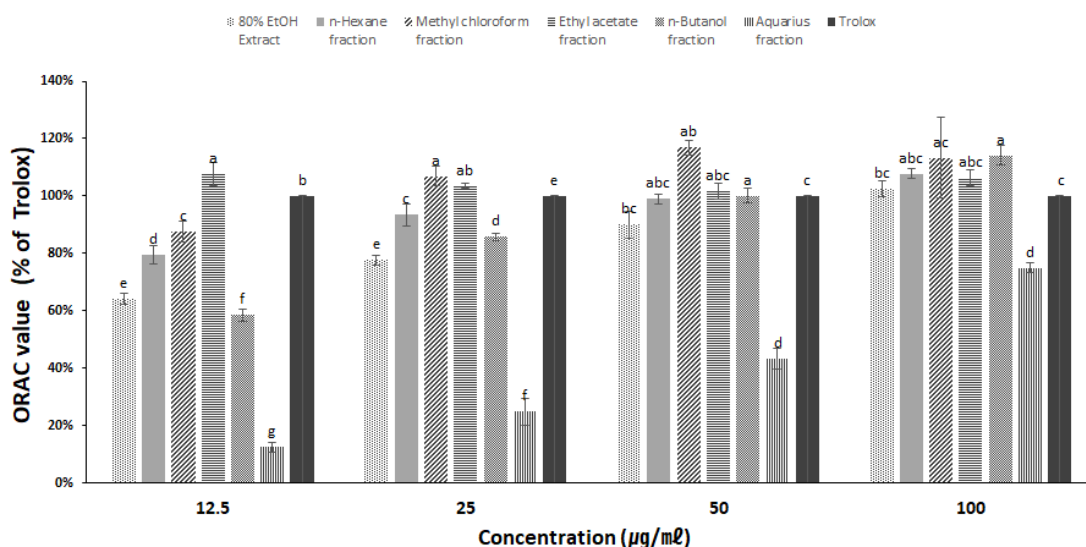


Fig. 5. Antioxidant capacity activities of Organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

2. 야관문 추출물의 미백 활성

1) 야관문 추출물 및 분획물의 Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase의 활성을 50% 저해하는 시료의 농도를 IC_{50} 으로 나타내었으며 양성대조군으로 사용한 arbutin($28.4 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$)이 가장 높은 활성을 보여주었다. 에틸아세테이트 분획물($115.1 \pm 3.0 \mu\text{g/ml}$)은 시료중 가장 높은 활성을 나타냈으며 헥산 분획물($455.8 \pm 35.5 \mu\text{g/ml}$), 메틸클로로폼 분획물($480.0 \pm 89.9 \mu\text{g/ml}$), 부탄올 분획물($509.9 \pm 75.7 \mu\text{g/ml}$), 에탄올 추출물($765.7 \pm 66.2 \mu\text{g/ml}$), 물 분획물($1500 > \mu\text{g/ml}$) 순으로 IC_{50} 활성을 나타냈다(Table 4).

농도별 Tyrosinase의 저해하는 활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 Arbutin이 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 높은 활성을 보였으나 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 에틸아세테이트 분획물이 arbutin보다 높은 활성을 나타내었다. 그 외 다른 분획물의 경우 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈으나 에틸아세테이트 분획물 및 arbutin과 비교하였을 때 보다 높은 활성을 나타내지 않았으며 물 분획물의 경우 25 $\mu\text{g/ml}$ 이하 농도에서 tyrosinase 저해 활성이 관찰 되지 않았다(Fig. 6).

Table 4. Tyrosinase inhibitory activities of Organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Extract	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹⁾
80% Ethanol	765.7 \pm 66.2 b
<i>n</i> -Hexane fraction	455.8 \pm 35.5 c
Chloroform fraction	480.0 \pm 89.9 c
Ethylacetate fraction	115.1 \pm 3.0 d
<i>n</i> -Butanol fraction	509.9 \pm 75.7 c
Aquarius fraction	> 1500 a
Arbutin	28.4 \pm 0.1 d

1) IC₅₀ ; concentration required to reduce 50% of tyrosinase.

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

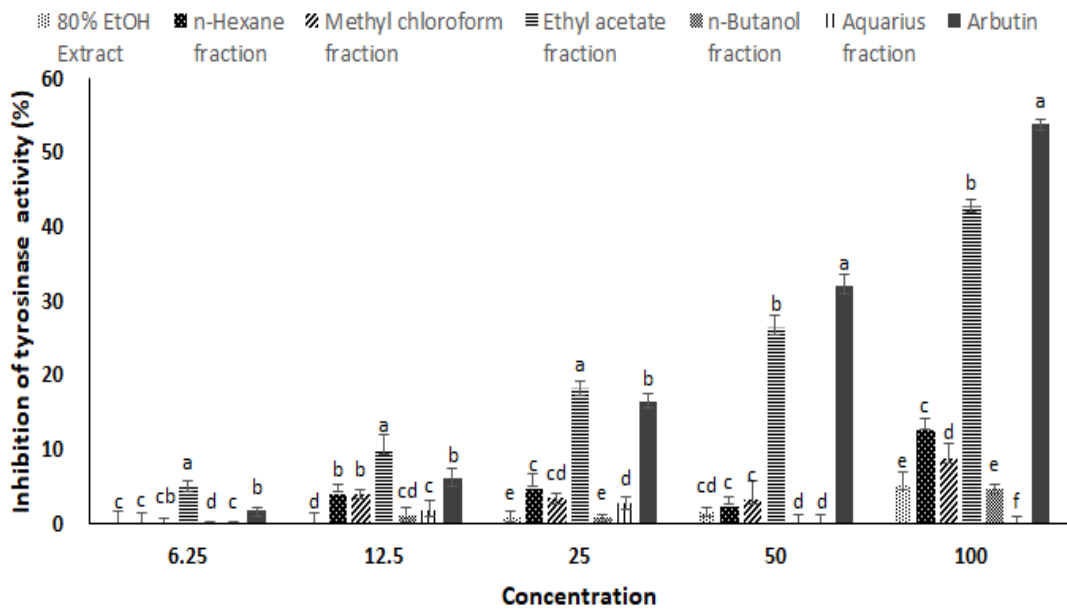


Fig. 6. Inhibition of tyrosinase activity of Organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don.

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

2) B16F10 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제 활성

α -MSH를 처리하여 melanin 생성이 유도된 B16F10 세포에서 각 시료에 의하여 억제된 멜라닌 합성량을 비교하였을 때 양성대조군으로 사용한 arbutin($64.63 \pm 63\%$)이 가장 높은 활성을 나타냈으며 이어서 에틸아세테이트 분획물($70.97 \pm 4.40\%$)은 시료중 가장 활성이 높았으며 이는 tyrosinase 저해활성과 같은 경향을 나타냈다. 이어서 물 분획물($84.2 \pm 1.6\%$), 메틸클로로폼 분획물($85.7 \pm 1.5\%$), 부탄올 분획물($86.5 \pm 4.7\%$), 에탄올 추출물($93.2 \pm 2.9\%$), hexan 분획물($106.7 \pm 0.4\%$)순서로 활성을 나타내었다(Fig. 7).

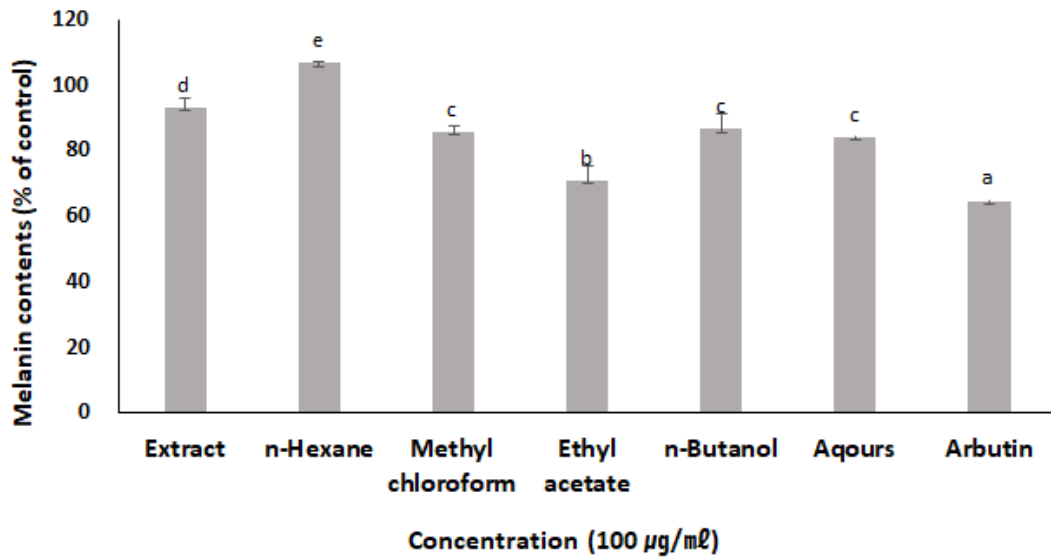


Fig. 7. Melanin contents of Organic solvent extract and Fractions from *Lespedeza cuneata* G. Don in B16F10 cell.

Cells (2×10^5 cells/well) were stimulated by α -MSH for 72 hour in the presence of *Lespedeza cuneata* G. Don (100 µg/ml).

Each value represents Mean \pm SD (n=3).

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

3. HDF 세포에서의 MMP-1, MMP-3 생성 저해 활성

MMP는 collagenase (MMP1, MMP8, MMP13), gelatinase (MMP2, MMP9), elastase(MMP3, MMP10)와 같이 크게 3종류로 구분되며, collagenase는 collagen의 삼차 구조를 붕괴시켜 collagen을 분해한다. elastase는 세포 외 기질인 콜라겐의 결합을 유지하는 탄성섬유를 파괴하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 주름 억제 효과는 진피 내의 collagen을 분해하는 MMP-1 및 elastin을 분해하는 MMP-3의 생합성을 TNF- α 를 통하여 유도시켰을 때 야관문 추출물 및 분획물이 가지는 억제효과를 비교하였다. 에틸아세테이트 분획물의 경우 TNF- α 를 처리하였음에도 불구하고 MMP-1의 억제는 TNF- α 를 처리하지 않은 대조군(-)과 비교하였을 때 비슷한 수준으로 MMP-1 억제 활성을 나타내었다(Fig. 8). 에틸아세테이트 분획물은 또한 MMP-3 억제 활성에 대하여 TNF- α 를 처리하지 않은 대조군(-)과 비교하였을 때 더욱 적은 MMP-3 저해 활성을 나타내었다(Fig. 9).

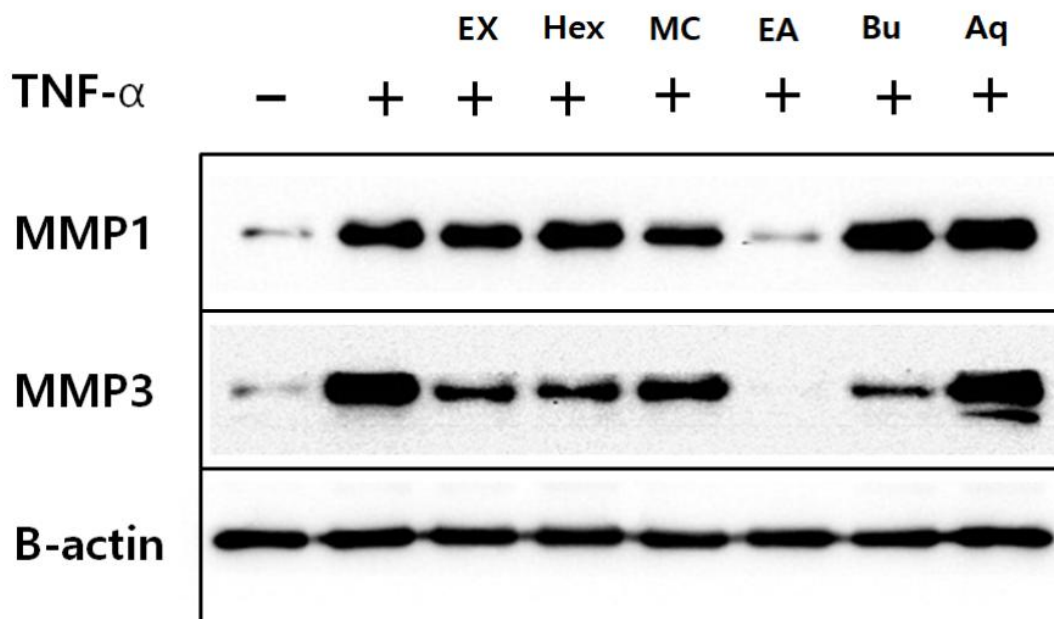


Fig. 8. Inhibitory effect of *Lespedeza cuneata* G. Don extract and fractions on TNF- α production in MMP1 and MMP3 cells.

Cells(1×10^5 cells/well) were stimulated by TNF- α (10 ng/ml) for 48 hour in the presence of *Lespedeza cuneata* G. Don(100 μ g/ml). The levels of MMP1 and MMP3 were determined using immunoblotting method.

Ex: ethanol fraction, Hex: *n*-hexane fraction, MC: methyl chloroform fraction, EA: ethyl acetate fraction, Bu: *n*-butanol fraction, Aq: aqueous fraction.

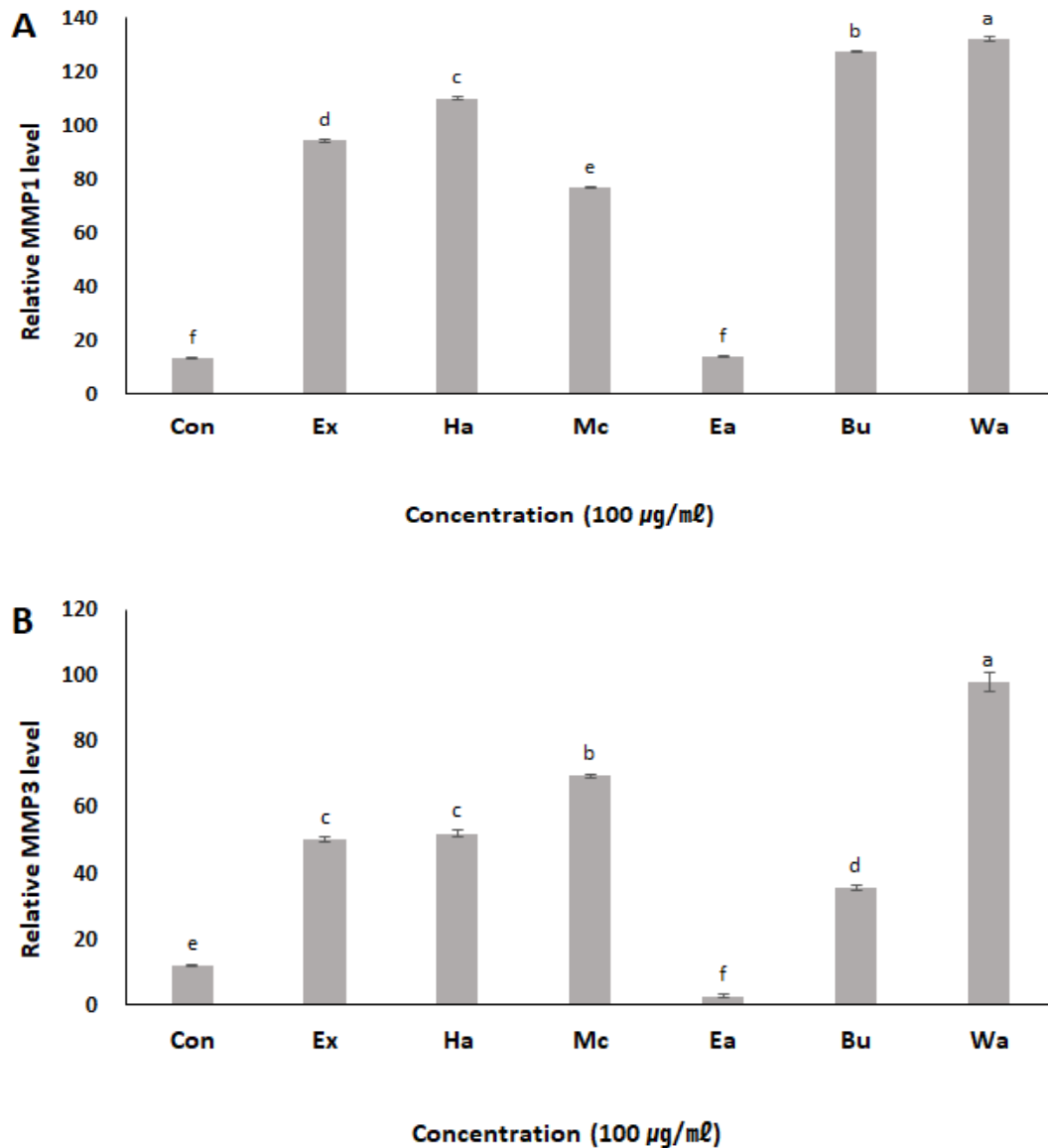


Fig. 9. Effects of *Lespedeza cuneata* G. Don extract and fractions on protein levels of MMP-1(A) and MMP-3(B).

Human dermal fibroblast cells (1×10^5 cells/well) were stimulated with 10 ng/ml of TNF- α for 48 hours in the presence of *Lespedeza cuneata* G. Don(100 µg/ml). Protein levels were determined with Western blot and densitometric analysis.

Ex: ethanol fraction, Hex: *n*-hexane fraction, Mc: methyl chloroform fraction, Ea: ethyl acetate fraction, Bu: *n*-butanol fraction, Aq: aqueous fraction.

each value represents Mean \pm SD (n=3)

The different letters show the significant difference by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

4. 항산화, 미백, 항주름 활성 간 상관계수분석

야관문의 에탄올 추출물과 분획물이 가지고 있는 항산화, 미백, 주름 활성과의 관련을 알아보기 위하여 상관관계가 있는지 확인하였다(Table 5). 페놀은 플라보노이드($r=0.8479$, $p<0.001$)와 높은 정의 상관관계를 나타냈으며 페놀(TPC)에 따른 항산화 활성사이의 관계를 나타내는 DRC_{50} ($r=-0.6461$, $p<0.01$), ARC_{50} ($r=-0.7427$, $p<0.01$)는 다소 높은 부의 상관관계를 나타내었다. 플라보노이드(TFC)와 미백활성사이의 관계는 TIC_{50} ($r=-0.7399$, $p<0.01$), MCO ($r= -0.6429$, $p<0.01$)로 다소 높은 부의 상관관계를 나타내었다. 항산화활성(ORAC)과 주름 활성사이의 관계를 나타내는 MMP_1 ($r=-0.8087$, $p<0.001$), MMP_3 ($r=0.7660$, $p<0.01$)로 높은 부의 상관관계를 나타내었다.

Table 5. Correlation coefficient between active components and their biological activities of *Lespedeza cuneata* G. Don extract and fraction.

	TPC	TFC	DRC ₅₀	ARC ₅₀	ORAC	TIC ₅₀	MCO	MMP ₁	MMP ₃
TPC ¹⁾	1	0.8479***	-0.6461**	-0.7427**	0.8100***	-0.8123***	-0.2162 ^{NS}	-0.7687**	-0.8505***
TFC ²⁾		1	-0.5289*	-0.6435**	0.7045**	-0.7399**	-0.6429**	-0.8269***	-0.8946***
DRC ₅₀ ³⁾			1	0.9841***	-0.8733***	0.7267***	-0.1157 ^{NS}	0.5003*	0.7775***
ARC ₅₀ ⁴⁾				1	-0.9299***	0.9603***	0.0047 ^{NS}	0.6359**	0.8411***
ORAC					1	-0.9461***	-0.1525 ^{NS}	-0.8087***	-0.7660**
TIC ₅₀ ⁵⁾						1	0.1197 ^{NS}	0.6810**	0.8515***
MCO ⁶⁾							1	0.5758*	0.3369 ^{NS}
MMP ₁								1	0.6948**
MMP ₃									1

^{NS}Not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ¹⁾TPC; Total phenolic content expressed as gallic acid equivalent (GAE) mg/g of extract and fractions. ²⁾TFC; Total flavonoid content expressed as quercetin equivalent (QE) mg/g of extract and fractions. ³⁾DRC₅₀; Concentration required to reduce 50% of DPPH at 30 minutes once reaction starts ($\mu\text{g}/\text{ml}$). ⁴⁾ARC₅₀; Concentration required to reduce 50% of ABTS at 30 minutes once reaction starts ($\mu\text{g}/\text{ml}$). ⁵⁾TIC₅₀; Concentration required to reduce 50% of tyrosinase ($\mu\text{g}/\text{ml}$). ⁶⁾MCO; Melanin contents

V. 고 찰

오늘날 향장시장은 기능성 화장품이 시장을 주도하고 있는 아래 더 안전한 기능성 원료 개발에 대한 연구가 진행되고 있으며 그에 대한 해답으로 천연물 유래 기능성 원료 개발이 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 야관문의 항산화, 미백 및 주름개선에 대한 *in-vitro* 평가를 진행하였으며 천연물 유래 기능성 원료로써 이용 가능성을 제시하였다.

30% 에탄올 추출물과 분획물별 페놀 및 플라보노이드 함량은 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 함량($117.7 \pm 2.8 \text{ mg} \cdot \text{GAE/g}$, $35.8 \pm 0.5 \text{ mg} \cdot \text{QE/g}$)을 나타냈다. 이는 야관문에서 분리된 화합물에 대한 연구(Min, 2016)에서 3종의 sitosterol 화합물과 2종의 flavonoid 및 6종의 flavonol을 포함한 16종의 화합물을 분리하였을 때 페놀, 플라보노이드 계통의 물질이 야관문에 다수 존재한다는 결과를 토대로 에틸아세테이트 분획물에 존재한다고 사료된다. 또한 야관문의 에틸아세테이트 분획물에 존재하는 페놀과 플라보노이드 함량은 유기용매로 추출 및 분획을 실시한 연구(Kim *et al.*, 2010a) 결과와 동일하게 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높았다고 보고된 결과와 일치하였다.

DPPH와 ABTS 소거 활성은 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 이때 DPPH의 RC_{50} 은 $91.6 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ 로 활성을 나타냈으며 ABTS의 RC_{50} 값은 $26.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ 로 활성을 나타냈다. 이는 선행연구(Min, 2016 ; Kim, 2004)에 따라 야관문에는 대표적인 생리활성물질인 Quercetin, Vitexin, Isovitexin, Orientin, Isoorientin을 포함한 9종의 플라보노이드계 화합물이 존재하며 이러한 물질에 따라 항산화 활성을 나타냈다고 사료되며 본 실험 또한 Total flavonoid content와 DPPH($r=-0.5280$, $p<0.05$)와 ABTS($r=-0.6435$, $p<0.01$) 상관관계는 다소 높은 부의 상관관계를 보여주었으며 페놀 및 플라보노이드계 화합물에 의하여 항산화 효능을 나타내었다고 사료되어 진다.

ORAC radical에 반응하여 FL-decay 반응을 저해하는 시료는 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 야관문 잎 페놀 추출물의 항산화능 및

미백효과(Cho *et al.*, 2011) 연구에서 야관문 에틸아세테이트 분획물에 존재하는 페놀 추출물이 지닌 전자공능이 416.6 mgVCE, 366.8 mgVCE로 높은 활성을 나타낸 것과 일치하였다. 이는 상관계수 분석을 통하여 페놀화합물($r= 0.8100$, $p<0.001$)과 플라보노이드계($r=0.7045$, $p<0.01$)로써 화합물이 가진 높은 전자공여능을 바탕으로 FL-decay를 저해하는 항산화 활성을 나타나게 되었다고 사료된다.

Tyrosinase 저해 활성의 경우 양성대조군 arbutin의 IC_{50} (28.43 ± 0.15 d $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 가장 높은 활성을 나타내었으며 그 다음 에틸아세테이트 분획물(115.10 ± 3.08 d $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 나타났다. DPPH의 활성과 tyrosinase의 활성의 상관관계는 높은 정의 상관관계를 나타내었으며 DPPH radical 저해 활성은 알콜성 유기용매에 추출되는 hydroxy-가 중요하게 연관 되어있다는 연구(Nishida *et al.*, 2006)가 보고 되어있으며 에틸아세테이트 분획물에 존재하는 hydroxy-에 의한 항산화 활성을 바탕으로 tyrosinase 저해 활성에 영향을 준다고 사료된다.

α -MSH로 멜라닌 생성이 유도된 B16F10세포에서 멜라닌 생합성량은 양성대조군인 arbutin(64.63 ± 63)이 가장 높은 활성을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물(70.97 ± 4.40)은 tyrosinase저해 활성과 같은 경향으로 시료 중 가장 높은 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었다. B16F10세포에서의 멜라닌 생성량과 플라보노이드 함량은 다소 높은 부의 상관관계를 나타냈으며 플라보노이드 화합물을 0.1~5 μM 처리하였을 경우 멜라닌 함량이 현저히 억제되었다는 연구결과(Kim, 2014)를 토대로 야관문 에틸아세테이트에 존재하는 다량의 플라보노이드에 의하여 멜라닌 생성이 억제되었다고 사료되어진다.

TNF- α 에 의하여 MMPs 발현이 촉진된 HDF 세포에서 야관문 에탄올 추출물 및 분획물이 가진 MMPs 생성 저해능력을 관찰한 결과 에틸아세테이트 분획물에서 TNF- α 를 처리하지 않은 세포와 유사한 수치로 MMP-1 단백질 저해 활성을 나타냈으며 MMP-3은 TNF- α 를 처리하지 않은 세포보다 단백질 발현량이 현저히 감소하였다. MMP-1은 에틸아세테이트, 메틸클로로폼, 에탄올 추출물 순서로 활성을 나타내었다. MMP-3은 에틸아세테이트, 부탄올, 에탄올추출물, 헥산, 메틸클로로폼 분획물 순서로 생성 억제 활성을 나타내었다. MMP1 및 MMP3은 페놀 사이 및 플라보노이드와 높은 부의 상관관계를 나타내었으며 야관문에 존

재하는 페놀과 플라보노이드에 의해 MMP1 및 MMP3의 억제활성을 나타내었다고 사료된다. MMP3은 항산화 활성 실험으로 진행하였던 DPPH와 ABTS 사이 높은 상관관계를 나타내었고 이는 항산화와 주름의 관계를 진행한 연구(Rhie *et al.*, 2001; Imokawa *et al.*, 2001)와 같이 항산화 활성과 항 주름은 정의 상관관계에 있다고 알려진 것과 같은 결과를 나타내었다.

본 실험의 결과를 토대로 야관문 30% 에탄올 추출물과 그로부터 분리된 분획물이 가진 생리활성들을 종합하였을 때 에틸아세테이트 분획물에서 페놀 및 플라보이드 함량이 가장 높았으며 이를 바탕으로 항산화 능력, 미백 및 항주름 활성 또한 가장 높은 활성을 나타냈다. 상관계수를 바탕으로 에틸아세테이트에서 분리된 phenolic compound 및 flavonoid 계통의 화합물에 의하여 항산화, 미백, 항주름 활성에 영향을 주는 것으로 해석되며 현재 밝혀진 야관문으로 분리된 물질은 선행연구(Min, 2016)에 따라 β -actin, ioroxanthin, β -sisterol-6'-linolenoyl-3-0- β -D-glucopyranoside, quercetin, kaempferol, isorhamnetin, -pinitol, bezyl-D-glucopyranoside, isovitexin, hirsutrin, nicotiflorin, vitexin, astragaln, β -sitosterol, β -D-glucoside, tifolin + astagaln, 7R,8S dihydrodehydrodiconiferyl alcohol, Homovanillyl alcohol이 있으며 8종의 플라보노이드를 포함한 페놀계 성분이 다수를 차지하는 것으로 보고되어있다. 야관문이 가지고 있는 대표적인 항산화로 알려진 물질에는 kaempferol, quercetin이 있으며 그 외에도 β -sisterol의 경우 콜레스테롤의 흡수를 저해하는 생리효능(Vahur *et al.*, 2009)이 보고되어있다. MMP1, MMP3 활성을 현저하게 감소시키는 야관문으로부터 추출 및 분리된 에틸아세테이트 분획물의 결과를 바탕으로 야관문의 페놀 및 플라보노이드의 최적추출 조건, 원료표준화 및 안전성 평가, 등에 관한 연구가 추가적으로 진행되면 피부연고로써의 제약 및 주름개선 기능성 천연물 원료로 이용 가능성을 확인하였다.

VI. 적 요

본 연구는 야관문이 천연물 유래 항장원료로서의 가능성에 대한 연구를 진행하여 야관문의 활용방안과 원료개발에 대한 기초자료로 제공하기 위하여 진행하였다.

야관문을 30% 에탄올 추출 및 분획하여 실험을 진행한 결과 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 에틸아세테이트 분획물에서 117.77 ± 2.86 (mg·GAE/g) 및 35.89 ± 0.55 (mg·QE/g)로 가장 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성을 평가를 위해 진행한 DPPH assay 및 ABTS assay 실험의 결과 값은 50% 저해활성을 나타낼 때 필요한 농도인 RC_{50} 값으로 표기하였으며, DPPH의 RC_{50} 값은 91.63 ± 1.96 $\mu\text{g/ml}$, ABTS의 RC_{50} 값은 26.82 ± 0.61 $\mu\text{g/ml}$ 로써 에틸아세테이트 분획물에서 활성이 가장 높게 나타났다. ORAC assay를 통하여 농도별 항산화 활성을 비교하였을 때 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에선 에틸아세테이트 분획물이 활성이 가장 높았으나 고농도로 갈수록 메틸클로로폼 분획물이 더 높은 활성을 나타냈다.

Tyrosinase 저해 활성은 모든 농도에서 양성대조군인 arbutin이 가장 높은 저해활성을 나타냈으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 에틸아세테이트 분획물이 arbutin과 유사한 저해 활성을 나타내었다. 멜라닌 합성량은 양성대조군인 arbutin이 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 높은 멜라닌 합성을 저해하였으나 야관문 에탄올 추출물 및 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 저해활성을 보여주었다.

TNF- α 를 통해 생성이 촉진된 주름유발인자 MMP1, MMP3을 westernblot을 통하여 각 시료가 가진 생성억제 활성을 관찰하였을 때 MMP1은 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. MMP3의 경우 TNF- α 를 처리하지 않은 세포보다 에틸아세테이트 분획물이 더 높은 저해활성을 나타내었다.

통계결과를 바탕으로 야관문의 페놀과 플라보노이드계통의 성분들에 의하여 항산화 활성을 나타내었으며 이를 바탕으로 미백 및 항주름 활성과도 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 항주름 활성을 바탕으로 야관문이 천연물 유래 기능성 항장 원료로 이용 가능성을 제시하였다.

인 용 문 헌

- Bernard, P., N. Burine., E. Arnoult, T. Scior and Q. T. Do. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology* 82(2-3):155 - 158.
- Bertolotto, C., P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Bille, D. E. Fisher, J. P. Ortonne and R. Ballotti. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *Journal of Cell Biology* 142(3):827 - 835.
- Brand-Williams W., ME. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1):25 - 30.
- Cheli, Y., F. Luciani, M. Khaled, L. Beuret, K. Bille, P. Gounon, J. P. Ortonne, C. Bertolotto and R. Ballotti. 2009. Alpha-MSH and Cyclic AMP elevating agents control melanosome pH through a protein kinase A-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 284:18699 - 18706.
- Cho, E. J, H. M. Ju, C. H. Jeong., S. H. Eom, H. J. Heo and D. O. Kim. 2011. Effect of phenolic extract of Dry Leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on Antioxidant Capacity and Tyrosinase Inhibition. *Korea Journal of Horticultural Science & Technology* 29(4):358-365.
- Choi, M. Y., H. S. Song, H. S. Hur and S. S. Sim. 2008. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in α -MSH-stimulated B16 melanoma cells *Archives of Pharmacal Research*. 31(9):1166 - 1171.
- Christine, R-G. E. Aberdam, M. Clément, J. P. Ortonne and R. Ballotti. 1997. Nitric Oxide Produced by Ultraviolet-irradiated Keratinocytes Stimulates Melanogenesis. *Journal of clinical investigation* 99(4):635 - 642.
- Han, Y. P., T. L. Tuan, H. Wu. M.hughes, W. L. Garner. 2001. TNF-alpha s

- stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through Nf-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *Journal of Cell Science* 114:131 - 139.
- Hosoi, J. E. Abe, S. Tatsuo and K. Toshio. 1985. Regulation of Melanin Synthesis of B16 Mouse Melanoma Cells by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid. *Cancer Research* 45(4):1474-1478.
- Hudson, B. J. F., D. E. Pratt. 1990. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. *Food antioxidants* pp171 - 191.
- Imokawa, G. 2001. The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation; implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochemistry and Photobiology* 74(2):283-287.
- Kim, D. H. 2004. Isolation and Structural Elucidation of the Bioactive Compounds from *Lespedeza cuneata* G. Don and *Bipolaris sorokiniana*. Department of Agricultural chemistry, Graduate School Chungnam National University.
- Kim, J. S. and K. C. Kim. 2016. Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Hunt Leaf Extract and Fractions. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 24(3):222 - 227.
- Kim, J. S. and M. J. Kim. 2010a. In vitro antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. *Journal of Medicinal plants* 4(8):674 - 679.
- Kim, J. S., W. J. Chun, T. Y. Kim, J. Sun, C. Y. Yu and M. J. Kim. 2010b. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and α -glucosidase inhibitory effect. *Food Chemistry* 120(2):539 - 543.
- Kim, J. S., Y. S. Kwon, W. J. Chum, T. Y. Kim, J. Sun, C. Y. Yu and M. J. Kim. 2011. Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(1):138-144.
- Kim, Y. J and H. Uyama. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular Life Sciences* 36(15):1707 - 1723.

- Ko, H. M., T. K. Eom, S. K. Song, G. Y. Jo and J. S. Kim. 2016. Tyrosinase and α -Glucosidase Inhibition Activities and Antioxidant Effects of Extracts from different Parts of *Hypochoeris radicata*. Korea Journal of Medicinal Crop Science 25(3):139 - 145.
- Martinez-Cayuela, M. 1994. Oxygen free radicals and human disease. BIOCHIMIE 77(3):147 - 161.
- Min, J. Y. 2016. Studies on constituents from *Lespedeza cuneata* and their vasodilatory activities. Department of Biotechnology Graduate School. Yeungnam University.
- N. Y. Kim. 2014. Effect of Antioxidation and Inhibition of Melanogenesis from scutellaria Baicalensis Extract. Asian Journal of Beauty Cosmetol. 12(1):41-47
- Nishida, J. and J. Kawabata. 2006. Bioscience Biotechnology. Biochemistry 70 (1):193-202.
- Numata, A. K. Hokimoto and H. Yamaguchi. 1980. C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 28:964 - 965.
- Rahman, I. Biswas SK and Kirkham. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochemical Pharmacology 72(11):1439-1452.
- Rhie, G. E., M. H. Shin, Y. S. Jin, W. C. Won, C. H. Kwang, K. H. Kim, K. C. Park, C. E. Hee and H. C. Jin. 2001. Aging and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. Journal of Investigative dermatology 188(4):741-742.
- Seiji, Kondo. 2000. The roles of cytokines in photoaging. Journal of Dermatological Science 23(1):S30-S36.
- Stich, H. F. 1991. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. Mutation Research/Genetic Toxicology. 259(3-4):307-324.
- Tada, A., I. Suzuki, S. Im, M. B. Davis and Babcock, G. 1998. Endothelin-1 i

- s paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth differentiation* 9:575-584.
- Vahur, O., Xu. Chen., R. Mohammad and W. Geoffrey Chan. 2009. Sublimation Thermodynamic Parameters for cholesterol, Ergosterol, β -sisterol and Stigmaterol. *Journal of Chemical & Engineering Data* 54(3):730-734.
- Victor, F. C., A. B. Gottlieb. 2002. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *Journal of Drugs in Dermatology* : JDD 1(3):264-275
- Yada, Y., K. Higuchi and G. Imokawa. 1991. Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *Journal of Biological Chemistry* 266:18352-18357.
- Virador, V. M., J. Muller, X. Wu, *et al.* 2002. Influence of α -melanocyte-stimulating hormone and of ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB Journal* 16(1):105-107.
- 김대익, 김혜정. 2014. 흰쥐의 외과적 창상에 대한 야관문 에탄올 추출물의 피부 재생 효과. *한국식품영양과학회지* 43(4):516-521.
- 김진환, 박재경, 허충립, 이무형. 1994. UVB 반복조사가 배양 인체 멜라닌세포의 형태학적 변화와 증식 및 멜라닌화에 미치는 영향. *대한피부과학회지* 32(6):1035-1045.
- 민진영. 2016. 야관문에서 분리된 화합물들과 이들의 혈관확장 활성 연구. 학위논문.
- 이혜진, 임규남, 박민아, 박수남. 2011. 비수리 추출물의 항균 및 항산화 활성. *한국미생물생명공학회* 39(1):63 - 69.
- 전동명. 2006. 전동명의 우리약초이야기. *부산일보*. 2006-2-21:24
- 조영미, 송혜성, 장선아, 박대원, 신유수, 정용준, 강세찬. 2016. 백수오, 우영, 마 추출물 혼합비율에 따른 혈관 부착인자 VCAM-1의 발현억제 효과. *한국자원식물학회* 29(5):525-531.
- 차재영, 양현주, 정재준, 서원석, 박준석, 옥민, 조영수. 2010. 한방 생약재 발효액

의 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성. 생명과학회지. 20(6):940-947
최정섭, 오정임, 황인택, 김성은, 전재철, 이병희, 김진석, 김태준, 조광연. 2003. A
pplication and High Thoughtput Screening of DPPH Free Radical Scaveng
ing Activity by Using 96-well Plate. 농약학회지 7(2):92-99.

感 謝 文

스스로가 가장 차분한 시간 새벽입니다. 이미 12월을 이야기하듯 창문에는 새벽 서리가 얼어있으며 벌써 제주대학교에서 8년째 겪는 아름다운 시간입니다. 지난 농학인의 향기와 함께 보내던 시간을 차분히 되돌아보기 좋은 시간입니다.

아버지, 어머니, 가족으로 뜻을 함께하고 장남의 의지를 지지해주셨으며 항상 버팀목이 되었기에 가장 큰 감사의 말씀을 드립니다. 군대를 전역하고 주경야독하던 어려웠던 시절이 있었습니다. 그 시절부터 저를 상담을 해주시며 지금까지 지속적인 관심과 끝까지 저를 믿어주시며 많은 도움을 주신 지도교수 송창길 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 논문이 더욱 완벽할 수 있도록 많은 조언을 해주신 김동순 교수님, 지금의 제가 천연물 생리활성에 관심을 갖게 된 가장 큰 영향을 주신 김주성 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 아낌없는 조언과 더욱 도약할 수 있는 발판을 마련 해주신 전용철 교수님, 사회인으로써 성장하기 위한 강의를 해주신 현해남 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 올해 파견을 통하여 저에게 더 공부 할 수 있는 기회를 주시고 이 논문이 나오기까지 큰 영향을 주신 경희대학교 한방재료공학과 강세찬 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 본 논문을 쓰면서 함께 시간을 보내며 의지 할 수 있었던 노수방 원생에게 감사의 말씀을 드립니다. 자원식물학실험실에서의 오랜 시간 동안 함께해온 가족이자 선배님이신 송진영, 김태근, 하영삼, 현도경, 현명선, 차진우, 최고봉, 오동은, 이희선, 권난희 선배님 그리고 후배님께 항상 늘 고맙고 감사합니다. 또한 실험실을 졸업하고서도 항상 관심을 가져주신 강영식, 김현철, 강정환, 이영돈 선배님께 감사의 말씀을 드립니다. 이번 석사 논문을 같이 준비하였던 이성문, 이승학, 고명수, 노수방, 고효순 원생님께 성공적인 마무리를 할 수 있었던 점 모두에게 박수를 드립니다. 그 외 학교에서 지켜봐주셨던 고평열 박사님, 김용근 선생님, 장용석 선생님, 이종훈 선생님께 감사의 말씀을 드리며 학교에서 항상 버팀목이 되던 건이형, 친구인 김경철, 이강해, 고은주 후배님께도 항상 고맙고 마지막으로 동생 신용호에게 앞으로 형이 기대한다고 꼭 이야기 하고 싶습니다.