

곤달비추출물의 항산화와 멜라닌 생성 저해 효과

†노연주 · 김윤신 · 김병관

한양대학교 보건학과
(2009년 1월 5일 접수 ; 2009년 3월 19일 채택)

Effect of Antioxidation and Inhibition of Melanogenesis from *Ligularia stenocephala* extract

†Eon-Joo Roh · Yoon-Shin Kim · Beung-Gwan Kim

Department of Health Sciences, Graduate School, Hanyang University, Seoul, Korea
(Received January 5, 2009 ; Accepted March 19, 2009)

Abstract: In this study, we evaluated anti-oxidation and whitening effects of *Ligularia stenocephala* extract for use as the cosmeceuticals. *L. stenocephala* was extracted by three different solvents which was n-Hexane, ethyl acetate, H₂O. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity of extract of *L. stenocephala* was in the order: ethyl acetate fraction of leaf (IC₅₀ value of 10.512ug/mL) > ethyl acetate fraction of stem (IC₅₀ value of 31.877ug/mL) > H₂O fraction of leaf (IC₅₀ value of 129.194ug/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of extract of *L. stenocephala* was in the order: ethyl acetate fraction of leaf (IC₅₀ value of 0.230mg/mL) > ethyl acetate fraction of stem (IC₅₀ value of 0.528mg/mL) > H₂O fraction of leaf (IC₅₀ value of 0.799mg/mL). Tyrosinase inhibition activity of *L. stenocephala* extracts was reduced 29.477% on ethyl acetate fraction of leaf, 13.583% on ethyl acetate fraction of stems. Therefore, *L. stenocephala* extracts may be useful as a new antioxidant and whitening agent to inhibit melanogenesis.

Keywords : *Ligularia stenocephala*, anti-oxidation, free radical, cosmeceutical

1. 서론

곤달비(*Ligularia stenocephala*)는 쌍떡잎식물, 국화과의 다년생 초본식물로서 한국·일본· 타이완· 중국 등에 분포하며 깊은 산의 습지에서 잘 자란다. 동속식물로는 곱취(*L.fischeri*), 어린곤달비(*L.intermedia*) 등 우리나라에 8종이 알려져 있다. 높이는 60~100cm

정도로 자라며, 표면에는 털이 없으나 잎 뒷면의 맥을 따라 털이 나며 가장자리에 뽕족한 톱니가 있다. 곤달비의 어린잎은 식용 및 약용의 목적으로 이용하고 있는데 전초 혹은 뿌리를 보익, 진정 및 부인병 등에 약으로 사용하는 것으로 알려져 있다[1].

곤달비에서 분리 보고되어진 물질로는 1b,6a-dihydroxy-4(15)-eudesmene[2], phthalic acid di-Bu ester, N-phenyl-2-naphthylamine [3], neophytadiene, vanillin[4], triterpenoid유

†주저자 (e-mail : jenniyoona@naver.com)

도체[5], toxol and hydroxyplatyphyllide, and chlorogenic acid 유도체, friedelin, b-sitosterol[6], benzofuran 유도체[7-8]들이 다수 보고 되었지만, 곤달비의 피부 항산화작용과 미백 작용에 대한 연구 결과는 없었다. 따라서 본 연구에서는 곤달비 추출물의 항산화 효과와 멜라닌 생성 억제 효능을 평가하여 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

2. 실험

2.1 실험재료

본 실험에서 사용한 곤달비(*Ligularia Stenocephala*)는 경상북도 경주 산내면의 백천농원에서 구입하였다. 시료 추출을 위해 사용한 유기 용매는 Samchun(한국)에서 구입하였고, 실험을 위해 사용한 시약 DPPH, L-ascorbic acid, DL- α -tocopherol, Xanthine/Xanthine oxidase, Nitroblue tetrazolium, Na₂CO₃, Bovine serum albumin 등은 Sigma의 것을 사용하였고, 물질의 분리 농축에는 Rotary vacuum evaporator (RE121, BUCHI, 스위스), 흡광도 측정에는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)를 사용하였다.

2.2 시료의 추출

그늘진 곳에서 건조한 곤달비의 잎과 줄기부분을 분리하여 분쇄기를 이용하여 세절하고 99.8% methanol로 실온에서 일주일동안 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지를 사용하여 여과한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하였다. 얻어진 잎, 줄기의 농축액에 증류수를 현탁시킨 후 n-Hexane을 가하여 H₂O층으로부터 분리하였으며, 이 과정을 4회 반복하여 감압 농축하여 n-Hexane 분획물을 얻었다. H₂O층에 ethyl acetate를 가하여 분리하였으며 n-Hexane층과 동일하게 4회 반복하여 감압 농축하여 H₂O층으로부터 ethyl acetate분획물을 획득하였다. 그리하여 곤달비 잎의 n-Hexane, ethyl acetate, H₂O분획물 그리고 줄기의 n-Hexane, ethyl acetate, H₂O분획물로 총 6가지의 분획물을 가지고 실험하였다.

2.3 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 시험은 안정한 자유라

디칼 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma, USA)을 사용하는 방법으로[9] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL에 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 2 mL로 하여 혼합하고, 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid와 DL- α -tocopherol를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4 활성산소 소거효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거활성 평가는 Noro 등의 방법을[10] 활용하여 xanthine/xanthine oxidase(Sigma, USA) 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, USA)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (Sigma, USA), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15 % bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA) 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 10 min 동안 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25 °C에서 20 min 동안 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂(Sigma, USA)를 넣어 반응을 정지시키고 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 DL- α -tocopherol를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 소거율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.5 Tyrosinase 활성 저해능 측정

멜라닌 생성에 관여하는 주요효소에는 tyrosinase가 있다. 이 효소는 티로신으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, 티로신에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다[11]. 본 실험은 이 효소의 기능을 억제하여 tyrosine이 산화되어 멜라닌이라는 흑색

의 고분자를 형성하는 것을 억제하는 정도를 측정하는 방법[12]을 응용하였다. 시료 0.9mL, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 mL, 1.5 mM L-tyrosine 1.0 mL을 넣은 후, 37°C에서 10 min간 반응시킨 후, UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 자유라디칼 소거효과 측정결과

곤달비 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 대부분의 라디칼은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical로서 517nm에서 강한 흡수를 가지는 진한 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 전자 혹은 수소를 공여 받아 비라디칼인 1,1-diphenyl-picrylhydrazine이 되면 짙은 보라색이 노란색으로 변화하여 517nm에서 흡광도가 감소하는데, 이를 이용하여 쉽게 항산화효과를 측정할 수 있다[13,14].

양성대조군으로는 항산화 효과가 알려진 L-ascorbic acid와 DL- α -tocopherol를 이용하여 곤달비추출물의 항산화 효과를 비교하였다. Fig. 1.에서 보는바와 같이 잎의 ethyl acetate 분획, 줄기의 ethyl acetate분획, 잎의 H₂O분획은 활성이 우수했다. Fig. 2.에서는 활성이 좋은 곤달비 잎의 ethyl acetate 분획, 줄기의 ethyl acetate분획, 잎의 H₂O분획이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었다. Table 1.에서는 50%소거효율에 대한 농도IC₅₀값을 비교하여 나타내었다. 잎의 ethyl acetate분획 IC₅₀값이 10.512ug/mL, 줄기의 ethyl acetate분획 IC₅₀값이 31.877ug/mL, 잎의 H₂O분획 IC₅₀값이 129.194ug/mL이며, 양성대조군인 L-ascorbic acid의 IC₅₀값이 3.01ug/mL, DL- α -tocopherol의 IC₅₀값은 18.31ug/mL로 잎의 ethyl acetate분획은 양성대조군인 DL- α -tocopherol보다 높은 저

해활성을 나타내었다.

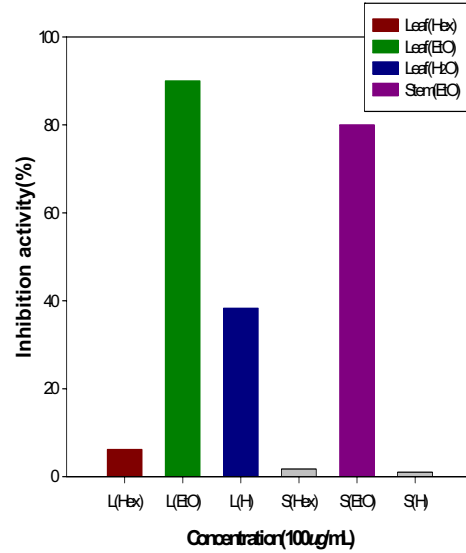


Fig. 1. Free radical scavenging activity of extracts from *L. stenocephala* leaf (n-Hexane, EtOAc, H₂O fraction) and stem(n-Hexane, EtOAc, H₂O fraction)

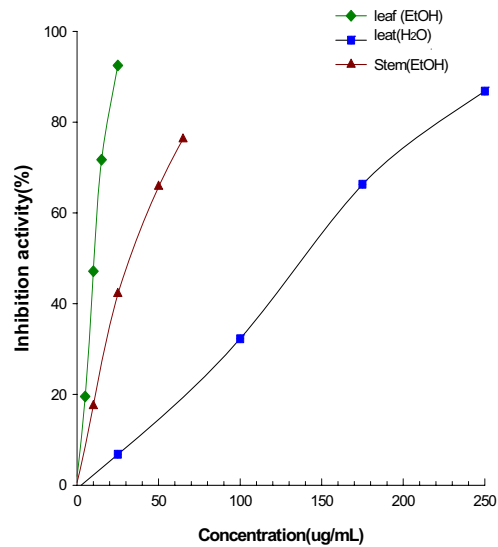


Fig. 2. Free radical scavenging activity of extracts from *L. stenocephala* leaf(EtOAc, H₂O fraction) and stem(EtOAc fraction)

Table 1. Free Radical Scavenging Activities of Extract from *L. stenocephala* and References

Compounds	Scavenging activity (IC ₅₀ ^a , ug/mL)
Leaf(EtOAc fra.)	10.512
Stem(EtOAc fra.)	31.877
Leaf(H ₂ O fra.)	129.194
L-ascorbic acid	3.01
DL- α -tocopherol	18.31

^aIC₅₀ : Concentration of the sample required for 50% the activity to be inhibited

3.2. 활성산소 소거효과 측정

Superoxide anion radical은 DMPO와 반응하여 DMPO-OOH· 이라는 새로운 radical을 만들어내고 이는 ERP 신호를 가지고 있다. 이를 이용하여 superoxide anion radical 소거에 따른 DMPO-OOH·의 EPR 신호 세기의 감소를 통해 [15] 곤달비 잎, 줄기 추출물의 superoxide anion radical 소거활성을 정량적으로 측정하였다. 양성대조군으로 DL- α -tocopherol를 이용하여 곤달비 추출물의 superoxide anion radical 소거효과를 비교하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 곤달비잎의 ethyl acetate분획, 줄기의 ethyl acetate분획, 잎의 H₂O분획은 활성이 우수하였다. Fig. 4에서는 활성이 좋은 잎의 ethyl acetate분획, 줄기의 ethyl acetate분획, 잎의 H₂O분획이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었다. Table 2.에서는 양성대조군인 DL- α -tocopherol의 IC₅₀값이 0.225mg/mL, 잎의 ethyl acetate분획 IC₅₀값은 0.230mg/mL, 줄기의 ethyl acetate분획 IC₅₀값이 0.528mg/mL, 잎의 H₂O분획 IC₅₀값은 0.799mg/mL로 잎의 ethyl acetate분획은 양성대조군인 DL- α -tocopherol과 비슷한 저해활성을 나타내었다.

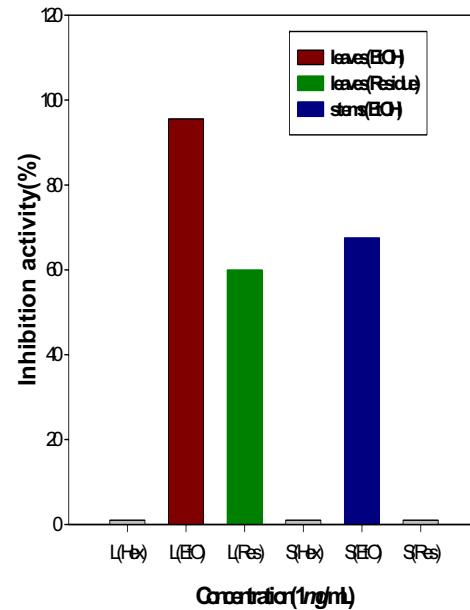


Fig. 3. Reactive oxygen scavenging activities of extracts from *L. stenocephala* leaf (n-Hexane, EtOAc, H₂O fraction) and stem(n-Hexane, EtOAc, H₂O fraction)

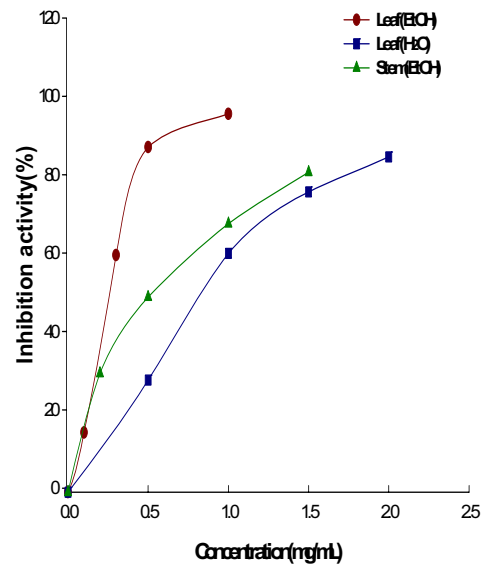


Fig. 4. Reactive oxygen scavenging activities of extracts from *L. stenocephala* leaf(EtOAc, H₂O fraction) and stem(EtOAc fraction)

Table. 2. Reactive Oxygen Scavenging Activities of Extracts from *L. Steocephala* Leaf(EtOAc, H₂O fraction), Stem (EtOAc fraction) and Reference

Compounds	Scavenging activity (IC ₅₀ ^a , mg/mL)
Leaf(EtOAc fra.)	0.230
Stem(EtOAc fra.)	0.528
Leaf(H ₂ O fra.)	0.799
DL- α -tocopherol	0.225

^aIC₅₀ : Concentration of the sample required for 50% the activity to be inhibited

3.4. Tyrosinase 활성 억제 효과

멜라닌 생성 과정은 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합 반응인데 이 과정에서 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소인 Tyrosinase가 생체 내에서 tyrosine이라는 물질의 산화과정을 촉진하는 중요한 역할을 한다. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화 반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보여 지고 있다.

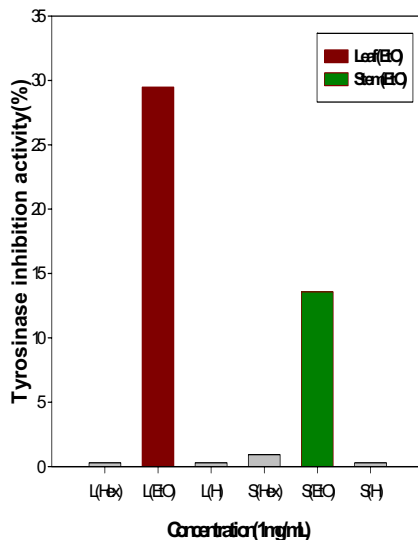


Fig. 5. Inhibitory activity of extracts from *L. stenocephala* leaf(n-Hexane, EtOAc H₂O fraction) and stem(n-Hexane, EtOAc, H₂O fraction) on tyrosinase

곤달비추출물의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력은 잎의 ethyl acetate분획이 29.477%로 가장 높았으며, 줄기의ethyl acetate 분획은 13.583%, 줄기의 n-Hexane분획은 0.935%순으로 나타났다(Fig. 5).

4. 결론

본 연구에서는 곤달비를 잎과 줄기로 나누고 3개의 추출용매를 사용해 n-Hexane, ethyl acetate, H₂O분획으로 나누어 6가지 시료를 가지고 항산화효과, 멜라닌 생성 억제 효능에 대한 평가를 통하여 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다.

자유라디칼소거 효과에서 잎의 ethyl acetate 분획은 양성대조군인 DL- α -tocopherol 보다 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다.

Superoxide radical 소거효과는 잎의 ethyl acetate분획이 양성대조군인 DL- α -tocopherol 과 비슷한 소거효과를 나타내었으며, 추출물의 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었다.

곤달비의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력은 줄기의 n-Hexane 분획 < 줄기의 ethyl acetate 분획 < 잎의 ethyl acetate분획 순으로 높게 나타났다.

따라서 본 연구에서 부위별과 용매별로 효능에 차이를 쉽게 확인할 수 있었으며, 곤달비 잎의 ethyl acetate분획은 높은 항산화 효과와 tyrosinase 저해활성으로 화장품소재에 응용할 경우 효과가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. J. W. Choi, W. B. Kim, J. H. Nam and H. J. Park, Anti-diabetic Effect of the Methanolic Extract of *Ligularia stenocephala* Leaves in the Streptozotocin-induced Rat, Korean J. Plant Res. Vol.20(4),362-366 (2007)
2. Study on chemical constituents of *Ligularia stenocephala*. Yan, Fulin; Yan, Yan; Wu, Hongwei; Yang, Lijuan; Zhan, Heqin; Yang, Jie. School of Pharmacy,

- Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, Peop. Rep. China. *Xinxiang Yixueyuan Xuebao* (2006).
3. Study on chemical constituents from *Ligularia stenocephala*. Lu, Guangzhou; Yan, Fulin; Li, Weilin. Pharmacy College, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, Peop. Rep. China. *Xinxiang Yixueyuan Xuebao* (2007).
 4. Constituents of the leaves and roots of *Ligularia stenocephala* MATSUM. et KOIDZ. Toyoda, Kazuki; Yaoita, Yasunori; Kikuchi, Masao. Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan. *Journal of Natural Medicines*, **60(4)**, 329-330 (2006).
 5. Chemical constituents of the genus *Ligularia* plants. II. Triterpenoids from the leaves and roots of *Ligularia stenocephala* Matsum. et Koidz. Toyoda, Kazuki; Yaoita, Yasunori; Kikuchi, Masao. Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan. *Journal of Tohoku Pharmaceutical University*, **52** 27-32 (2005).
 6. Chemical constituents from *Ligularia stenocephala*. Yang, Zhenhua; Liu, Zhenling; Yan, Yan; Hao, Yongbing. Department of Chemistry, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, Peop. Rep. China. *Xinxiang Yixueyuan Xuebao*, **22(5)**, 438-440 (2005).
 7. New phenol derivatives from *Ligularia stenocephala*. Yan, Fu-lin; Wang, Ai-xia; Jia, Zhong-jian. College of Chemistry and Chemical Engineering, National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, Peop. Rep. China. *Journal of Chemical Research*, **(11)**, 742-743 (2004).
 8. Three new polymeric isopropenyl benzofurans from *Ligularia stenocephala*. Yan, Fu-Lin; Wang, Ai-Xia; Jia, Zhong-Jian. College of Chemistry and Chemical Engineering, National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, Peop. Rep. China. *Pharmazie*, **60(2)**, 155-159 (2005).
 9. Y. Fugita, I. Urea, Y. Morimoto, M. Nakajima, C. Hatano, and T. Okuda, Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids, II. Inhibition mechanism of coffee tannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation, *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129 (1998).
 10. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
 11. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and K. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
 12. AOAC, Official method of analysis, 16th ed. Association of official analytical chemists, Washington D. C. (1985).
 12. M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
 14. H. S. Yoon, J. K. Kim, The Inhibitory Effects of *Acanthopeltis japonica* on Melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **33(2)**, 88, (2007).
 15. N. K. Kim, M. H. Kim, C. S. Yoon, S. W. Choi, Studies on the Anti-inflammatory Activity of *Paulownia coreana* Uyeki Leaf Extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32(4)**, 241-247 (2006).