

통초추출물의 항산화 활성 및 항노화효과

노연주 · 김병관 · 김덕술[†]

국립창원대학교 화공시스템공학과, 동명대학교 의용공학과
(2011년 5월 12일 접수 ; 2011년 5월 20일 채택)

Antioxidative Activity and Antiaging Effects of *Tetrapanax papyrifera* extract

Eon-Joo Roh · Byung-Kwan Kim · Duck-Sool Kim[†]

Dept. of Chemical Engineering, Changwon National University
Dept. of Biomedical Engineering, TongMyong University
(Received May 12, 2011 ; Accepted May 20, 2011)

Abstract : In this study, we evaluated the anti-oxidative, whitening and anti-wrinkle effect of *Tetrapanax papyrifera* extract. *Tetrapanax papyrifera* was extracted by two different solvents which were n-Hexane, ethyl acetate. The anti-oxidant activity was measured by free radical scavenging activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical). And the inhibitory activities of tyrosinase for whitening effect and collagenase, elastase for anti-wrinkle were investigated. For anti-oxidant activity, ethyl acetate fraction of *Tetrapanax papyrifera* extract showed more significant activity than n-Hexane fraction of *Tetrapanax papyrifera* extract. For whitening activity, n-Hexane fraction of *Tetrapanax papyrifera* extract exhibited strong inhibition effects compared with reference. Therefore, *Tetrapanax papyrifera* extract may be useful as a new antioxidant and whitening agent.

Keywords : *Tetrapanax papyrifera*, anti-wrinkle, whitening, free radical

1. 서론

통초(*Tetrapanax papyrifera*)는 한약재로 주로 이용되며, 통초의 기원식물에 대하여 대한 약전의 한약규격집에 의하면 우리나라에서는 오가과(五加科) Araliaceae 통탈목(通脫木) *Tetrapanax papyrifera* (Hook.) K.Koch의 건

조한 경수(莖髓)를 이용하고 있는데, 북한에서는 넓은잎삼나무라고도 한다. 뿐만 아니라, 중국에서도 중화인민공화국약전에 의하면 이 식물을 통초의 기원식물로 이용하고 있다[1-4].

두릅나무과 통탈목의 줄기인 통초는 맛은 달고 담담한 맛이 나며, 냄새가 없고 약간 찬 성질로 동의보감에서는 방광을 다스리며, 등창을 삭이고, 종기를 치료할 뿐만 아니라 젖을 나오게 해준다는 효능을 보고하고 있다[5].

[†]주저자 (E-mail : dskim@tu.ac.kr)

통초의 유효 성분으로는 oleanane 유형의 triterpene, papyroside LA-LD, papyroside LE-LH, 플라보노이드와 벤젠 유도체, inosite, papyriogenin A-G, papyroside L-IIad 및 quercetin 등이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다[4,6-8].

위와 같이 통초를 한약재로 사용하고 있지만 피부의 항노화에 관련된 연구는 보고된 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 통초 추출물의 항산화 효과, 미백, 항주름 효능에 대하여 고찰하였다.

2. 실험

2.1 시약 및 기기

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), L-Ascorbic acid, Tyrosinase from mushroom, L-tyrosine, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, Retinyl acetate, Collagenase Assay Kit, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, Methanol, Ethyl acetate, n-Hexane, Ethanol, Rotary vacuum evaporator(RE121, BUCHI, 스위스), UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)

2.2 시료의 추출

그늘진 곳에서 건조한 통초를 잘게 썰어 methanol로 실온에서 일주일동안 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지를 사용하여 여과한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하였다. 얻어진 농축액에 증류수를 현탁시킨 후 n-Hexane을 가하여 잔여층으로부터 분리하였으며, 이 과정을 4회 반복하여 감압 농축하여 n-Hexane 분획물을 얻었다. 잔여층에 ethyl acetate를 가하여 분리하였으며 n-Hexane층과 동일하게 4회 반복하여 감압 농축하여 잔여층으로부터 ethyl acetate분획물을 획득하였다. 그리하여 통초추출물로부터 n-Hexane, ethyl acetate 분획으로 나눈 2가지의 분획물을 가지고 실험하였다. 실험은 각각 3회 실시하여 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

2.3 자유라디칼 소거효과 측정

자외선이 피부에 조사되면 과산화수소와 같은 활성산소가 증가하고 항산화 효소가 감소한다. 일차적으로 superoxide anion이 만들어지고

superoxide anion은 superoxide dismutase에 의해 hydrogen peroxide로 전환된다. 형성된 과산화수소는 철, 구리 등의 금속이 있을 때 반응성이 높은 hydroxyl radical로 전환된다. 만들어진 hydroxyl radical은 Raf, protein tyrosine phosphatase(PTPs), MEKKI 등을 통한 tyrosine kinase 신호전달과정을 활성화시킨다[9].

자외선으로부터 생성된 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 초래하여 피부는 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고 세포 성분들에 대한 손상을 야기시켜 결과적으로 주름을 생성시키는 원인으로 알려져 있다[10].

피부 조직에서 발생한 프리 라디칼을 효과적으로 제거해 준다면, 피부 노화를 예방하고 지연할 수 있다. Free radical 제거능을 측정하는 방법으로 DPPH radical 제거법이 폭넓게 사용되어지고 있다.

통초 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 대부분의 radical은 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[11,12].

시료를 에탄올에 0.01mg/mL, 0.1 mg/mL, 1mg/mL의 농도로 녹였다. 시험관에 시료 용액 100 µL를 넣고, 100 µL의 ethanol과 50 µL의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) /ethanol 용액을 첨가하여 25°C의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교 대조군으로 L-ascorbic acid을 0.01mg/mL, 0.1mg/mL, 1mg/mL의 농도로 녹여 시료와 같은 방법으로 측정하였다. 라디칼 소거능의 다음의 식에 따라 DPPH 탈색의 %로 계산하였다.

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

2.4 Tyrosinase 활성 저해능 측정

멜라닌 생성에 관여하는 주요효소에는 tyrosinase가 있다. 이 효소는 인체내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 단계인 티로시나제에서 DOPA 그리고 DOPA에서 DOPAquinone, DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다[13]. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화 반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보여 지고 있다.

티로시나제 활성을 저해해 미백효과를 확인할 수 있는 방법으로, ‘기능성 화장품 효력을 측정하기 위한 가이드라인’ (식약청)에 따라 측정하였다. 에탄올에 각각의 농도로 녹인 시료를 제조하여 이것을 시료액으로 하였다. 또한 비교 대조군으로 L-ascorbic acid을 0.01mg/mL, 0.1mg/mL, 1mg/mL의 농도로 녹여 시료와 같은 방법으로 측정하였다. 시험관에 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6.5) 220ul와 시료액 20ul, tyrosinase (2unit/μL) 20ul를 순서대로 취하였다. 이 반응 용액에 1.5 mM tyrosine 40ul 가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해율은 다음 식에 의거하여 계산하였다.

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

2.5 Collagenase 활성 저해능 측정

노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부진피조직의 교원질 중 주 단백질인 collagen의 현저한 감소에 의해서라고 할 수 있다[14,15]. Collagen은 진피의 90%이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 때문에 콜라겐의 감소는 피부노화와 매우 깊은 관계를 가지고 있다[16]. 콜라겐은 섬유모세포에서 합성 분비되며, 진피 세포와 기질의 대부분을 차지하고 있어 피부의 질적 변화는 콜라겐의 양과 밀접한 관련성이 있다. 생체내에서 콜라겐의 합성과 분해는 적절하게 조절되거나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 자외선 조사에 의해 콜

라겐의 분해 효소인 collagenase의 발현이 촉진된다.

Collagenase 활성 저해능의 실험은 Sigma사의 kit 시약을 구입하여 사용하였다. 먼저 1mg DG gelatin vial에 1.0ml의 DDW를 가해 DG gelatin stock solution(1mg/mL)을 만든다. 10 x reaction buffer 2ml에 DDW 18ml을 가해 reaction buffer를 희석 제조한다. 다음으로 collagenase 효소 시약을 제조한다. Working solution으로 최종 농도가 0.2unit/mL이 되도록 reaction buffer로 희석한다. 실험에 사용할 시료를 에탄올에 녹여 시료의 농도가 0.1, 1, 10mg/mL이 되도록 제조한다. 제조한 시료를 96 well plate에 20ul씩 triple로 준비한다. DQ gellatin 10ul를 시료에 가하고, 빛을 차단한 상태에서 실온에서 1-2시간 동안 방치한 후 형광강도 495nm/515nm에서 형광강도를 측정하였다 [17]. 비교 대조군으로 Retinyl acetate를 0.1mg/mL, 1mg/mL, 10mg/mL의 농도로 녹여 시료와 같은 방법으로 측정하였다.

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

2.6 Elastase 활성 저해효과 측정

Tris-Cl (0.267 M, pH 8.0)에 elastase 기질인 N-succinyl-(Ala)3-p -nitroanilide 8.8 mg/mL 이 용해된 완충액에 측정시료 용액 100 μL와 완충액 60 μL를 첨가하여 25 °C에서 10분 동안 preincubation한 뒤 여기에 elastase 용액을 20 μL 첨가하여 25 °C 수욕상에서 10분 동안 항온 배양한 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다.

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 자유라디칼 소거능 비교

자외선이 조사되면 사람의 피부에는 여러 중

류의 프리 라디칼의 생성이 증가된다. 이와 같은 프리 라디칼은 피부 노화의 원인이 된다.

비교 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 L-ascorbic acid를 이용하여 통초추출물의 n-Hexane 분획물과 ethyl acetate분획물과의 항산화 효과를 비교하였다. Table 1에서 보는바와 같이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었고 통초추출물의 ethyl acetate 분획이 활성이 우수했다. 비교 대조군으로 같이 측정된 L-ascorbic acid 0.1mg/mL의 값이 94.2% 소거능을 나타내었고, 통초추출물의 ethyl acetate분획 0.1mg/mL의 값이 73.2% 소거능을 보여 주었다. L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 통초추출물의 ethyl acetate분획은 매우 높은 라디칼 소거능을 보여 주는 것이라고 하겠다.

Table 1. Free radical scavenging activities of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Tetrapanax papyrifera* and reference.

sample	0.01	0.1	1
n-Hexane	8.4 ±0.09	9.6 ±0.11	18.2 ±1.87
EtOAc	18.6 ±0.80	73.2 ±4.63	85.5 ±5.23
L-Ascorbic acid	66.2 ±2.10	94.2 ±7.01	-

3.2 Tyrosinase 활성 저해능 비교

이 시험은 시험관내에서 타이로시나제 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 피부 미백의 활성을 보는데 매우 중요하다. 통초추출물의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력은 Table 2에서 보는바와 같이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었다.

n-Hexane분획은 1mg/mL 농도에서 74.2%의 소거능을 보여 비교대조군인 L-ascorbic acid가 동일 농도에서 36.6%의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력을 보이는 것보다 월등히 우수한 활성을 보였다.

Table 2. The effect of extracts(n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Tetrapanax papyrifera* and reference on tyrosinase.

sample	0.01	0.1	1mg/mL
n-Hexane	4.2±0.12	24.7±0.87	74.2±1.98
EtOAc	5.9±0.29	25.4±1.11	44.3±2.01
L-Ascorbic acid	1.8±0.02	11.9±2.10	36.6±3.01

3.3 Collagenase 활성 저해능 비교

피부의 주름개선 효과를 검정하는 collagenase의 저해능을 실험하였다. 통초추출물의 n-Hexane 분획과 ethyl acetate분획을 가지고 collagenase 저해능을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 농도 10mg/mL n-Hexane분획의 소거능은 15.8%, 비교대조군으로 같이 측정된 Retinyl acetate는 동일농도에서 42%의 저해능을 나타내었다. Retinyl acetate가 단일 성분임을 감안한다면 Retinyl acetate와 비교 시 통초추출물의 n-Hexane분획은 양호한 collagenase 활성 저해능을 인지할 수 있었다.

Table 3. Inhibitory activity of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Tetrapanax papyrifera* reference on collagenase.

sample	0.1	1	10mg/mL
n-Hexane	2.8 ±0.19	11.8 ±0.87	15.8 ±1.43
EtOAc	1.4 ±0.55	3.01 ±1.03	7.9 ±4.21
Retinyl acetate	12.4 ±1.01	29.6 ±1.77	42±2.98

3.4 Elastase 저해능 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포 외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부 노화억제

평가에 대단히 중요하다.

통초추출물로부터 n-Hexane, ethyl acetate 분획으로 나누어 2가지의 분획물을 가지고 elastase 저해능을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 10mg/ml의 농도에서 n-Hexane 분획은 22%의 elastase 저해능을, ethyl acetate분획은 17.2%의 저해능을 보여 n-Hexane 분획이 ethyl acetate분획보다 높은 elastase 소거능을 보였다.

Table 4. Elastase Inhibitory Activities of Compounds from *Tetrapanax papyriferum*

sample	0.1	1	10mg/mL
n-Hexane	10.4 ±0.21	10.9 ±1.87	22 ±2.03
EtOAc	15.2 ±0.85	16.7 ±1.93	17.2 ±4.61

4. 결론

본 연구에서는 통초추출물로부터 n-Hexane, ethyl acetate 분획으로 나누어 2가지의 분획물을 가지고 항산화효과, 미백, 항주름 효능에 대해 관찰하였다. 항산화 효능 측정에서 통초추출물의 ethyl acetate 분획이 n-Hexane분획 보다 높은 활성을 보였고 비교 대조군인 L-ascorbic acid에 비해 조금 낮은 소거능을 보여 주었다. 그렇지만 L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 통초추출물의 ethyl acetate분획은 매우 높은 항산화 효능을 나타내었다.

통초추출물의 tyrosinase 활성에 대한 저해능력은 n-Hexane분획과 ethyl acetate 분획이 비교 대조군인 L-ascorbic acid보다 높은 저해능을 나타내었고 n-Hexane분획은 L-ascorbic acid보다 월등히 높은 저해능을 보였다.

Collagenase 억제효능은 n-Hexane분획이 ethyl acetate 분획보다 높은 저해능을 나타내었고, Retinyl acetate보다는 저해능이 미약했다. 하지만 Retinyl acetate가 단일 성분임을 감안한다면 Retinyl acetate와 비교 시 통초추출물의 n-Hexane분획은 양호한 Collagenase 활성

저해능을 인지할 수 있었다.

Elastase 저해능은 n-Hexane 분획이 ethyl acetate분획보다 높은 elastase 소거능을 보였다.

이상의 결과로 볼 때, 통초추출물은 항산화 활성과 더불어 미백활성 갖는 기능성 원료로 응용 가능성이 큼을 시사한다.

참고문헌

1. 지형준·이상인 편저: 「대한약전의 한약(생약)규격집 주해서」 서울: 한국 메디칼인텍스, 1988, p.386.
2. 한국한의학회연구원. 1998. “상용한약재 기본항목 정리: 한약재 규격화에 필요한 포제에 관한 연구”. 한국한의학회연구원. p.352.
3. Hsu, H.Y.: Oriental materia medica, Oriental Healing Art Institute: Long Beach, CA., 1986, p.311.
4. Effects of *Tetrapanax papyriferum* Extracts on the KB Human Oral Squamous Carcinoma Cells Department of Alternative Medicine, Graduate School of Health Science Chosun University, Chung, Sun-hee 2010.
5. 신민교·송호준·고운채: “목통과 통초의 효능에 관한 본초학적 고찰”, 「대한본초학회지」, 제3권, 제1호, 71~87, 1988.
6. Ho, J.C., C.M. Chen and L.C. Row.: “Flavonoids and benzene derivatives from the flowers and fruit of *Tetrapanax papyriferus*,” *J. Nat. Prod.*, 68(12):1773~1775, 2005.
7. Ho, J.C., C.M. Chen and L.C. Row.: “Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*,” *Phytochemistry*, 68(5):631~635, 2007.
8. Kosima, K., I. Saracoglu, M. Mutsuga and Y. Ogihara: “Triterpene saponins from *Tetrapanax papyriferum* Koch,” *K. Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 44(11):15~18, 1996.
9. G. C. Park, New Trend of Photodermatosis, Update in Dermatology,

- 46, (2005).
10. G. S. Sim, J. H. Kim, 등 Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of Saussurea involucrata on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fibroblast, *J. Soc Cosmet. Scientists Korea*, **31(4)**, 330 (2005).
 11. M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
 12. H. S. Yoon, J. K. Kim, The Inhibitory Effects of *Acanthopeltis japonica* on Melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **33(2)**, 88 (2007).
 13. 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 alltrans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
 14. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Aging versus photo aging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 47 (1998).
 15. J. J. Li, Z. Dong, M. I. Dawson and N. H. Colburn, Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element, *Cancer Research*, **56**, 483 (1996).
 16. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell and Z. Dong, Blocking activator protein 1 activity but not activation retinoic acid response effect of retinoic acid, *Proc. Acad. Sci., USA*, **94**, 5826 (1997).
 17. Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robers, K and Watson, J. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. 2nd Edition, *Garland Publishin Inc.* 802-824.