

Inhibitory activities of phenolic compounds isolated from *Chionanthus retusa* flower on biological enzymes

Eun-Ho Lee, Young-Je Cho*

School of Food Science and Biotechnology/Food and Bio-Industry Research Institute,
Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

이팝나무 꽃에서 분리한 페놀 화합물의 생리활성 효소 억제효과

이은호 · 조영제*

경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

Abstract

This study was designed to determine the biological activities of *Chionanthus retusus* flower extracts. Water and 90% ethanol extracts of *C. retusus* flower were prepared. The inhibitory activities of water and ethanol extracts with a phenolic content of 200 µg/mL against xanthine oxidase were 25.60% and 15.92%, respectively. Further, the water extract did not show any inhibitory activity against α-glucosidase whereas the ethanol extract showed 100.00% inhibition of α-glucosidase. The inhibitory activities of the extracts against tyrosinase were 17.27% (water extract) and 36.13% (ethanol extract), which suggest that the extracts may have a whitening effect. The water extract did not inhibit elastase activity but showed a collagenase-inhibitory activity of 20.21%. On the contrary, the ethanol extract showed 96.26% and 35.93% inhibition of collagenase and elastase, respectively. These findings suggest that the extracts may have an anti-wrinkle effect. Lastly, the extracts showed a hyaluronidase inhibitory activity of 36.96% (water extract) and 88.70% (ethanol extract), suggesting that they may have an anti-inflammatory effect. The results indicate that *C. retusus* flower extracts containing phenolic compounds can be used as functional resources because they have anti-gout, carbohydrate degradation-inhibitory, whitening, anti-wrinkle, and anti-inflammatory effects.

Key words : biological activities, *Chionanthus retusus* flower, isolation, phenolic compounds

서 론

빠르게 변화하고 복잡해진 사회로 인하여 과도한 업무, 정신적·육체적 스트레스, 운동부족 및 서구화되고 불규칙적인 영양섭취와 식생활 습관 등으로 당뇨(diabetes), 고혈압(hypertension), 비만(obesity), 동맥경화(atherosclerosis)와 같은 만성질환의 발생 빈도가 급격히 증가하고 있다(1). 또한 산업화로 인하여 대기오염, 중금속, 다이옥신 등 여러

가지 환경오염인자와 지구온난화로 인한 오존층의 파괴 및 자외선 조사 등의 직·간접적인 질병 유발인자들은 백내장(cataract)등의 안질환과 암(cancer), 피부질환(skin diseases)등 다양한 질병을 발생시키기도 한다(1,2). 이러한 질병을 유발시키는 요소는 스트레스나 자외선 등의 외부 자극에 의하여 과도하게 생산되거나 축적되며 다음과 같은 질병관련 생리활성 효소들이 작용하게 된다. 질병을 유발시키는 생리활성 효소로는 생체 내에서 uric acid를 생성하여 통풍과 산화적 손상을 일으키는 효소, 식이를 통하여 흡수된 탄수화물을 단당류로 분해하여 당뇨병에 영향을 줄 수 있는 효소, 멜라닌 형성과정의 불균형으로 인한 색소 침착을 일으키는 효소, 피부 진피층을 구성하는 collagen을 분해하여 피부 주름을 생성시키는 효소, 인체의 피부탄력을 유지해주는 elastin을 분해하여 피부 주름을 생성시키는

*Corresponding author. E-mail : yjcho@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7755, Fax : 82-53-950-7762
Received 18 December 2017; Revised 18 January 2018;
Accepted 20 February 2018.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

효소 및 염증 유발에 관련이 있는 효소 등이 있다(3-8). 질병과 관련하여 위와 같은 작용을 하는 생리활성 효소들은 식용자원에 함유되어 있는 여러 가지 기능성 성분들에 의해서 억제되기도 한다. 식용자원에는 각종 기능성 성분인 페놀류, steroid류 등의 물질이 함유되어 있으며, 천연물질들에서 유래되는 기능성 물질을 기술적으로 이용하여 특정의료목적의 식사요법용 식품, 질병예방용 식품, 당뇨병 환자용 식품, 만성염증 개선, 암 예방, 체중조절용 저칼로리 식품, 및 노화방지용 식품 등의 기능성 식품 또는 피부염증, 수렴효과, 미백, 주름개선 등의 미용식품 목적으로 다양하게 고안되어 개발되고 있다(9). 그러나 현재 대부분 식물의 꽃은 가공되지 않은 형태로 판매되어지고 있어 효율적인 이용차원에서 개선할 여지가 매우 크며, 고품질의 식품소재 및 건강식품을 제조하기 이전에 제품 생산에 적합한 기능 검증과 소재 활용을 위한 표준화, 과학화를 이루기 위한 활용기술의 연구가 미흡한 실정이다. 또한 산지에서 생산되는 원료농산물을 기존의 방법으로 유통, 판매시키는 데는 한계가 있고 농가의 소득증대 및 농산물의 활용 측면을 고려하기 위해서는 식물 꽃의 고급화와 고부가가치를 가지는 가공식품화가 매우 필요한 것으로 판단된다(10). 이에 대한 대표적인 연구로는 병꽃나무 꽃 추출물의 항염증 효과(11), 백련 꽃 추출물의 생리활성 효과(12), 도화 추출물의 미백 효과(13) 등이 있다.

이팝나무(*Chionanthus retusus* Lindl. et Paxton)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 낙엽교목으로, 산기슭에서 자생하는데 국내에는 제주도, 전라도, 경상도 등에서 자라고 일본, 대만, 중국 등에도 분포하고 있으며 니암나무, 뺨나무, 육도목으로도 불린다. 이팝나무 꽃은 백색이며 5-6월에 피고 화서는 새 가지에 달리며, 길이는 6-10 cm로 밑에 잎이 달리고, 소화경은 길이 7-10 mm로 화절이 있다. 꽃받침은 4개로 깊게 갈라지며 꽃잎은 4개이며, 길이 1.2-2 cm, 너비 3 mm로 밑 부분이 합쳐지고 통부가 꽃받침보다 길다(14). 이팝나무는 관상용, 공업용, 약용의 용도로 관상수 및 염료재, 가구재로 쓰며, 민간에서 어린잎을 나물로 무쳐져 식용되거나 차 대용으로 이용하기도 하며, 지사, 건위, 중풍치료 등의 약용의 용도로 사용 된다(15). 이팝나무와 관련된 선행 연구에는 잎에서 lignin 계열인 phillyrin, (+)-pinosinol-D-glucoside, secoiridoid인 ligustroside와 flavonoid인 luteolin 4'-glucoside, luteolin 7-glucoside, luteolin 7-rutinoside, apigenin 7-glucoside, apigenin 7-rutinoside, eriodictyol 7-glucoside 등의 물질이 분리, 동정되었으며(16,17), 이팝나무의 줄기 분획물로부터 aromadendrin, apigenin, chrysoeriol luteolin, kaempferol, 3,3',5',5,7-pentahydroxyflabanone, quercetin이 보고된 바 있다(18). Lignin 화합물 중 phillygnin, phillyrin, pinosinol을 함유하며, 그 외에 화합물로는 coumarin 화합물인 scopoletin, secoiridoid인 oleropein, phenolic compound가 함유된 것으로 알려져 있다(18).

본 연구에서는 한국에서 자생하는 이팝나무 꽃의 열수, ethanol 추출물에서 분리된 phenolic compounds를 이용하여 건강기능성 식품 및 미용식품에 적용하기 위한 기초자료를 얻고자 xanthine oxidase, α -glucosidase와 tyrosinase, collagenase 및 elastase, hyaluronidase 등의 기능성 관련 효소 저해 효과를 확인하여 기능성 신소재로의 개발 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 이팝나무 꽃은 실험을 위해 대구 지역에서 개화시기인 4월에 직접 채취하여 45°C dry oven(FO600M, Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 수분이 완전히 날아갈 때까지 열풍 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

이팝나무 꽃 추출물의 제조

추출물의 제조는 열수 추출물의 경우 이팝나무 꽃 건조 분말 1 g을 증류수 200 mL에 침지하여 추출물이 100 mL가 될 때까지 hot plate에서 가열한 후 실온에서 냉각하여 24시간 동안 교반 추출하였으며, ethanol 추출물의 경우에는 전보(19)에서와 같이 이팝나무 꽃 건조 분말 1 g에 90% ethanol 100 mL를 첨가하여 4°C의 shaking incubator에서 24시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료의 phenolic compounds 농도를 50, 100, 150, 200 μ g/mL phenolics 농도로 설정하여 4°C sample 보관 냉장고에서 저온 보관하며 시료로 사용하였다.

Xanthine oxidase(XOase) 저해 효과 측정

XOase 저해 효과 측정은 Stirpe와 Corte의 방법(20)에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 녹인 기질액 2 mM xanthine 3 mL에 효소액 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA, 0.05 U/0.1 mL) 0.1 mL와 시료 0.3 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 시약반응과 관계없는 증류수를 0.3 mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 종료시약 20% TCA 1 mL를 가한 후 반응액을 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였으며, 실험에 대한 positive control은 allopurinol을 사용하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 uric acid 함량/대조구의 uric acid 함량)×100으로 계산하였다.

α -Glucosidase 저해 효과 측정

α -Glucosidase 저해 효과 측정은 Tibbot와 Skadsen의 방법

(21)에 준하여 측정하였다. 50 mM sodium succinate buffer(pH 6.8)에 *p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside(PNPG) (Sigma-Aldrich Co.)를 용해시켜 1 mg/mL 농도로 기질을 만들고, 기질 2 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하여 반응구에는 시료 0.1 mL, 대조구에는 증류수 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응종료시약 5% Na₂CO₃를 첨가하였다. 이때 생성된 *p*-nitrophenol을 흡광도 470 nm에서 측정 한 후 표준곡선에 대입하여 양을 환산하였으며, 실험에 대한 positive control은 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 *p*-nitrophenol 함량/대조구의 *p*-nitrophenol 함량) \times 100으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해 효과 측정

Tyrosinase 저해 효과 측정은 Vincent와 Hearing의 방법(22)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 2.3 mL와 기질액 1.5 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Co., 250 U/mL) 0.1 mL와 시료 0.2 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응액은 흡광도 475 nm에서 측정하였으며, 실험에 대한 positive control은 kojic acid를 사용하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance) \times 100으로 계산하였다.

Collagenase 및 elastase 저해 효과 측정

Collagenase 저해 효과 측정은 Wunsch와 Heidrich의 방법(23)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL collagenase(Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하였다. 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 2 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해 효과 측정은 Kraunsoe 등의 방법(24)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL에 기질액 0.8 mM N-succinyl-(Ala)³-*p*-nitroanilide 용액 0.1 mL의 혼합액에 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase(PPE)(Sigma-Aldrich Co.) 효소 용액 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 *p*-nitroaniline 생성량을 흡광도 410 nm에서 측정하였으며, 실험에 대한 positive control은 EGCG를 사용하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance) \times 100으로 계산하였다.

Hyaluronidase(HAase) 저해 효과 측정

HAase 저해 효과 측정은 Dorfman와 Ott의 방법(25)에

준하여 측정하였다. 반응구는 시료 0.5 mL에 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.9)에 녹인 HAase(1,000 U/mL) 0.5 mL를 혼합하여 38°C에서 5분간 반응시키고 0.3 M phosphate buffer(pH 5.3)에 녹인 기질(4 mg/mL) 0.5 mL를 넣어 다시 38°C에서 45분간 반응시킨 후 0.04 M acetate buffer(pH 3.75)에 녹인 알부민용액 5 mL를 첨가한 후 5분간 방치하고 600 nm에서 투과율을 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수 0.5 mL를 넣어 반응시켰으며, 실험에 대한 positive control은 ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 사용하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 투과율/대조구의 투과율) \times 100으로 계산하였다.

통계처리

모든 실험은 6회 이상 반복 측정하여 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 표시하였고, 실험구간 차이검정은 IBM SPSS Statistics(23, IBM Corp, Armonk, NY, USA)를 이용하여 분산분석과 Duncan's multiple range test로 수행하였다 (p<0.05).

결과 및 고찰

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 XOase 저해 효과

진보(19)에서 이팝나무 꽃의 열수, ethanol 추출물에서 각각 20.8, 32.3 mg/g의 phenolic compounds의 높은 함량을 나타내었으며, 항산화 효과 측정을 통해 생리활성을 나타내는 물질이 phenolic compounds라는 것을 입증한바, 본 연구에서도 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 생리활성 효소 저해 효과를 살펴보았다. 생체 내 유리기 생성계의 하나인 XOase는 purine, aldehyde류, pyrimidine, pteridine 및 heterocyclic compound 등의 생체 내 대사에 관여하는 비특이적 효소이다. 생체 내에서는 주로 방향족성 유기 화합물인 purine 유도체와 그 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 불용성 질소화합물인 uric acid(urate)를 생성하는 반응의 촉매로 작용한다(3). 사람 혈액 내 uric acid의 정상 수치는 남자의 경우 80 mg/L이고, 여자의 경우 80 mg/L인데 uric acid 수치가 높아지고 원활한 배출이 되지 않을 때 통풍이 일어나게 되고, uric acid가 관절에 침착 결정체를 이루어 달라붙어 염증이 발생한다. 심한 경우 신장이나 심장 등에 합병증 또는 만성질환을 유발하기도 한다(26). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 uric acid를 생성하여 통풍을 일으키는 XOase 저해 효과를 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 50-200 μ g/mL의 phenolic 농도에서 열수 추출물에서는 14.94-25.60%로 저해 효과가 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, ethanol 추출물은

0.17-15.92%의 저해 효과를 나타내어 저농도의 phenolic 농도에서 고농도로 농도 의존적으로 유의하게 증가하여 phenolic 농도에 따라 저해 효과가 증가하는 것을 확인하였다. Positive control로 사용한 allopurinol은 50-200 µg/mL의 농도에서 67.10-80.96%로 나타내어 농도별로 유의한 저해 효과를 확인하였다. 높은 효과를 나타낸 allopurinol은 uric acid 수치를 낮춰주는데 사용되는 약물이지만, 가려움, 발진, 구토 및 신장에 문제를 일으킬 수 있다고 알려져 있어서 천연물 소재의 안전한 대체제가 필요한 실정이다. Kim 등 (27)은 현재 한약재로 쓰이고 있는 유근피 추출물의 200 µg/mL phenolics 농도에서 48.1%의 XOase 억제력을 나타내었다고 보고한 것과 같이 이팝나무 꽃 추출물에서도 XOase 저해 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

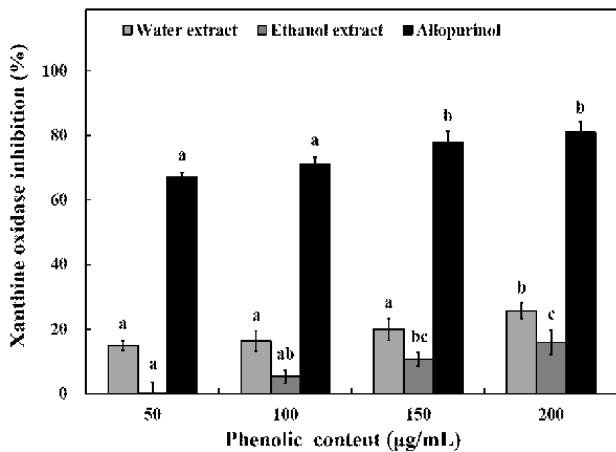


Fig. 1. Inhibition activity of water and ethanol extracts on xanthine oxidase from *C. retusus* flower.

Means with different letters (a-c) on the same extract bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 α-glucosidase 저해 효과

α-Glucosidase는 탄수화물의 소화과정에서 마지막 단계를 촉매하며, β-glucosidase와 반대로 (1→4)결합된 α-glucose 잔기를 가수 분해하여 단일 α-glucose 방출하는 탄수화물 가수분해효소이다. α-Glucosidase의 활성을 저해시키면 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시키게 되어 식후 혈당증가를 완화시킬 수 있어서 제 2형 당뇨병의 치료제로 적용이 가능하다(4). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 효모기원 α-glucosidase에 대한 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 2에서와 같이 열수 추출물에서는 저해 효과가 나타나지 않았으며, ethanol 추출물에서는 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 6.85-100.00%로 나타내어 phenolic 농도별로 저해 효과가 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 200 µg/mL의 고농도에서는 우수한 효능을 나타내었다. 이러한 결과는 각각 다른 추출 용매인 열수, ethanol에서 추출되는 phenolic

compounds가 다르기 때문에 α-glucosidase에 대한 저해 효과가 다르게 나타난 것으로 보이며, 이에 따른 후속연구로 phenolic compounds의 성분을 규명할 필요성이 있다고 판단되었다. Choi(28)는 목이버섯 추출물이 200 µg/mL의 농도에서 80%의 높은 α-glucosidase 저해 효과를 보고한 바 있다. 이팝나무 꽃 ethanol 추출물은 positive control로 사용한 EGCG와 비교하였을 때 고농도에서는 비슷한 효능을 나타내어 α-glucosidase 억제제로 사용가능성을 확인하였다.

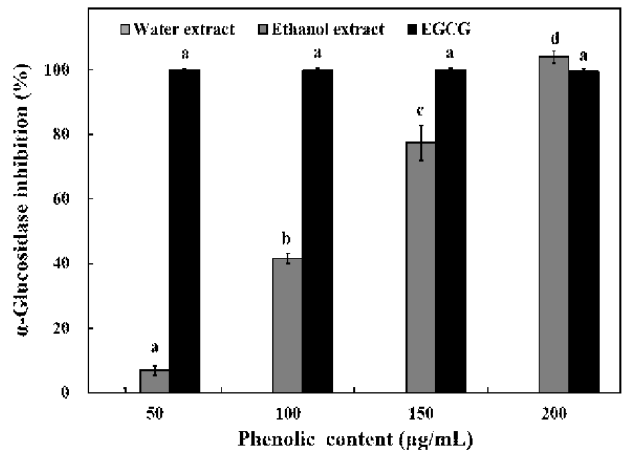


Fig. 2. Inhibition activity of water and ethanol extracts on α-glucosidase from *C. retusus* flower.

Means with different letters (a-d) on the same extract bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 tyrosinase 저해 효과

Melanin은 동물의 조직 및 피부에 존재하는 갈색 또는 흑색의 색소이며, 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질이다. 피부가 광노화 되는 것이나 일광 각 화증을 억제하는 등 긍정적인 기능과 더불어 피부 미용상 문제를 일으키는 과도한 색소 침착이나 멜라닌의 전구체의 독성으로 인한 세포사멸 등 부정적인 면도 가지고 있다. Tyrosinase는 monophenol의 수산화 과정이나 o-diphenol이 o-quinone로 전환되는 과정에 관여하여 melanin의 생성을 조절하는 효소이다(5). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 melanin 생성을 조절하는 tyrosinase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 열수 추출물 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 1.96-17.27%의 저해 효과를 나타내었고, ethanol 추출물 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 19.33-36.13%의 저해 효과를 나타내었다. 따라서 열수, ethanol 추출물 모두 50-200 µg/mL의 phenolic 농도로 농도가 증가함에 따라 의존적으로 유의하게 저해 효과가 증가하는 것을 확인하였다. Mo와 Oh(29)는 측백나무 에탄올 추출물을 5, 10, 20, 50 µg/mL의 농도로 설정하여 tyrosinase 저해 효과를 측정된

결과 8.75, 15.1, 29.1, 31.2%의 저해 효과를 나타내었다고 보고하였다. 이는 이팝나무 꽃 추출물과 유사한 효능을 나타내어 피부색소 침착 등을 방어할 수 있는 미백 기능성화장품의 소재로서 활용 가능하다고 판단되었다.

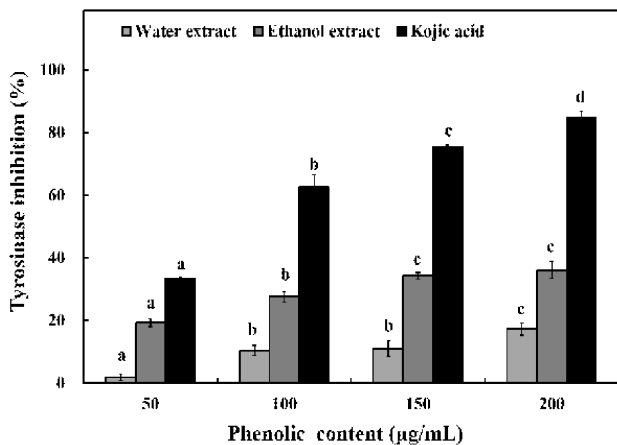


Fig. 3. Inhibition activity of water and ethanol extracts on tyrosinase from *C. retusus* flower.

Means with different letters (a-d) on the same extract bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 collagenase 저해 효과

세포외기질(extracellular matrix)의 70-80% 차지하는 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되어 대부분 진피층에 존재한다. 기질의 주요 단백질인 collagen은 피부에 기계적 견고성과 결합조직의 저항력, 조직력, 세포분할과 분화를 유도하는 기능이 있으나 자연노화에 따른 세포 활성 감소와 같은 내적 요인과 여러 유해환경에 의한 스트레스 증가, 자외선 조사에 의한 광노화와 같은 외적 요인에 의해 collagen이 분해된다(6). 피부 진피의 노화가 진행되면 collagen양이 현저하게 감소되며, collagen을 분해하는 collagenase의 발현이 더욱 증가되어 피부 탄력 저하를 야기시켜 피부의 주름과 피부 처짐의 원인이 된다(30). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 피부의 주름과 처짐을 유발하는 collagenase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 4A에서와 같이 열수 추출물 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 2.58-20.21%로 농도에 따라 유의하게 저해 효과가 증가하는 것으로 나타났고, ethanol 추출물 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 38.82-96.26%로 농도별로 매우 높은 collagenase 저해 효과를 나타내었으며, 유의성 또한 확인하였다. Ahn 등(31)은 추출용매에 따른 함초 추출물의 collagenase 저해 효과를 측정된 결과, 100 µg/mL 농도에서 29.7%의 저해 효과를 나타내었으며, Lee 등(32)의 배롱나무 가지 추출물의 경우 50 ppm에서 85%를 나타내었다고 보고하였다. 따라서 이팝나무 꽃 추출물의 collagenase 저해 효과가 우수하다고 판단되었다. 위의 결과

에 따라 이팝나무 꽃 추출물이 가지는 collagenase 저해력을 이용한 주름개선을 위한 기능성 미용식품 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

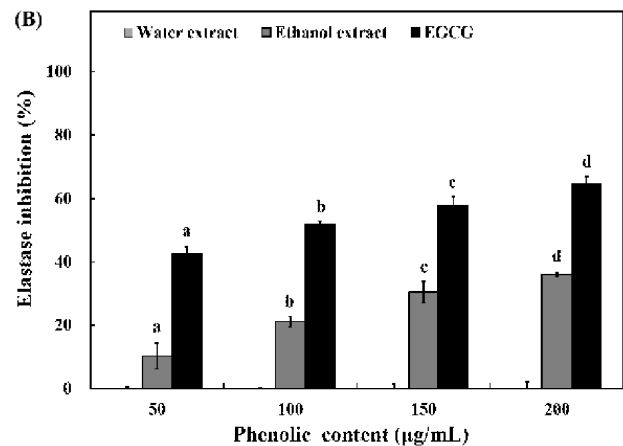
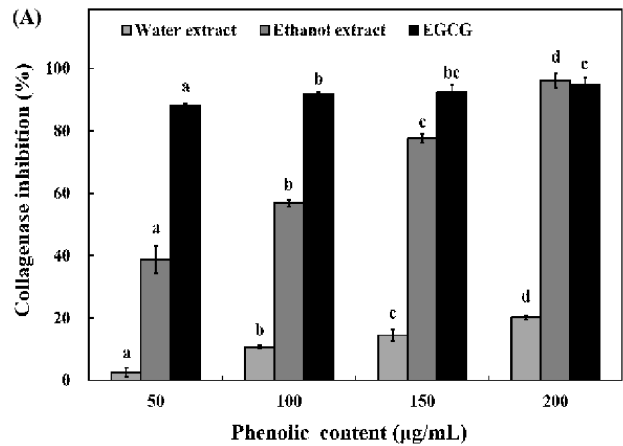


Fig. 4. Inhibition activity of water and ethanol extracts on collagenase (A), and elastase (B) from *C. retusus* flower.

Means with different letters (a-d) on the same extract bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 elastase 저해 효과

Elastase는 진피 내에서 피부탄력을 유지하기 위해 elastin, elastic fibre, collagen으로 결정 결합 조직을 이루고 있는 기질 단백질을 포함한 다양한 단백질을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 피부세포 기저층의 그물망 구조를 끊어 주름이 생성되도록 하는 주효소이며, 최근에는 피부 탄력섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(7). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 elastin을 분해해 주름 생성을 유발하는 elastase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 4B에서와 같이 열수 추출물에서는 저해 효과가 나타나지 않았으며, ethanol 추출물 50-200 µg/mL phenolics 농도에서 10.28-35.93%의 저해 효과를 나타내어 저농도의 phenolic 농도에서 고농도로 농도 의존적으로 유의하게 증

가하여 phenolic 농도에 따라 저해 효과가 증가하는 것을 확인하였다. Kim 등(33)은 유근피 ethanol 추출물을 200 µg/mL phenolics 농도로 처리했을 때 53.5%의 elastase 저해 효과를 나타내었다고 보고하였으며, 이팝나무 꽃 추출물에서도 elastase 저해 효과를 확인할 수 있었다.

이팝나무 꽃에서 추출한 phenolic compounds의 HAase 저해 효과

체내에서 염증반응이나 혈관 투과성에 관여하는 HAase는 선형의 glycosaminoglycan 중합체인 hyaluronic acid(HA)의 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine의 β-1,4 결합을 절단한다(34). HA는 extracellular matrix의 주요 구성분 중의 하나로서 주로 뇌, 근육, 연결조직, 땀샘, synovial fluid, 연골 등에서 흔히 존재하는 고분자의 물질이며, 염증 형성의 중요 요인인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하고 HA의 분해산물 혹은 저분자의 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시킨다. 그러므로 HAase의 활성 저해는 HA의 분해를 억제시켜 항염증 및 항알레르기 효과를 기대할 수 있다(8). 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds의 농도별 추출물을 이용하여 HA를 분해해 염증을 유발시키는 HAase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 열수 추출물 50-200 µg/mL phenolic 농도에서 21.88-36.69%의 저해 효과를 나타내었고, ethanol 추출물은 50-200 µg/mL phenolic 농도에서 9.82-88.70%의 저해 효과를 나타내었다. 이팝나무 꽃 추출물은 positive control로 사용한 PDTC의 9.88-78.17% 저해 효과보다 더 우수한 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과에 따라 이팝나무 꽃 추출물은 열수, ethanol 추출물 모두 농도에 따라 저해 효과가 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 각각의 추출물에 함유된 phenolic compounds의 종류와 농도의 차이에 따라 효소의 저해 효과

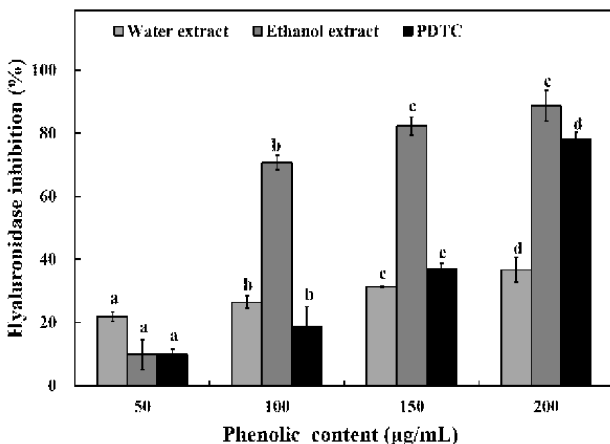


Fig. 5. Inhibition activity of water and ethanol extracts on hyaluronidase from *C. retusus* flower.

Means with different letters (a-d) on the same extract bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이팝나무 꽃 추출물은 항염증 및 항알레르기 제품에 작용할 수 있는 기능성 소재로 개발 가능할 것으로 판단되었다.

요 약

이팝나무 꽃으로부터 phenolic 화합물을 추출하기 위하여 열수와 90% 에탄올로 phenolic compounds를 추출하였다. Xanthine oxidase 저해 효과를 측정된 결과, 열수와 에탄올 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 25.60, 15.92%의 저해 효과를 나타내었다. α-Glucosidase 저해 효과를 측정된 결과 200 µg/mL phenolics 농도의 에탄올 추출물에서 100.00%의 매우 높은 저해 효과를 나타내었다. 미백 효과를 측정하는 tyrosinase 저해 효과를 측정된 결과, 열수와 에탄올 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 17.27, 36.13%의 저해 효과를 나타내었다. 주름개선 효과를 측정하는 collagenase, elastase 저해 효과를 측정된 결과 에탄올 추출물에서는 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 96.26, 35.93%의 저해 효과를 나타내었다. 항염증 효과를 측정하는 hyaluronidase 저해 효과를 측정된 결과, 열수와 에탄올 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 36.96, 88.70%의 저해 효과를 나타내었다. 따라서 이팝나무 꽃에서 분리된 phenolic compounds는 50-200 µg/mL phenolics 농도 범위에서 항통풍, 당분해 억제, 미백, 주름개선 및 항염증과 관련된 생리활성 효소를 농도 의존적으로 유의하게 저해하는 것을 확인하였고, 이를 이용한 건강기능성 식품 및 미용식품의 기능성 소재로 활용 가능하다고 판단되었다.

References

1. Harman DA (1956) Theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300
2. Cho YJ (2014) Biological activity of extracts from *Chrysanthemum indicum* Linne by ultrafine grinding. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 110-117
3. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP (1973) Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J*, 131, 187-190
4. Kim JH, Lee SY, Kwon OJ, Park JH, Lee JY (2013) Anti-aging and anti-diabetes effects of *Aconitum pseudo-laeve* var. *erectum* extracts. *J life science*, 23, 616-621
5. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by

- tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol*, 100, 126-131
6. Grant NH, Alburn HE (1959) Studies on the collagenase of *Clostridium histolyticum*. *Arch Biochem Biophys*, 82, 245-255
 7. Kligman D (2000) Cosmeceuticals. *Dermatol Clin*, 18, 609-615
 8. Jeong SJ, Ko YS, Ahn NH, Kim YC (1998) Hyaluronidase inhibitor from *Uncaria ramulus et uncus*. *Korean J Pharmacogn*, 29, 169-172
 9. Chae JW, Jo BS, Joo SH, Ahn DH, Chun SS, Cho YJ (2012) Biological and antimicrobial activity of *Vaccinium oldhami* fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 1-6
 10. Kim JW (2014) Physicochemical and physiological properties of *Aster scaber* Thunb., and utilization as food materials. Ph D Thesis, Daegu Catholic University, Korea, p 3
 11. Yoo YC, Lee GW, Cho YH (2016) Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 macrophages. *J Life Sci*, 26, 338-345
 12. Im MH, Park YS, Cho JY, Heo BG (2008) Assessment of the physiological activities of flower extracts from white lotus. *Korean J Community Living Sci*, 19, 3-10
 13. Son HU, Lee SH, Kim MA, Park HJ, Lee SH (2012) Comparison of melanogenesis-inhibiting activity by extracts of *Prunus persica* flower and calyx. *Korean J Food Preser*, 19, 946-950
 14. Lee TB (1999) Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa Publishing Co, Seoul, Korea, p 616
 15. Kim IK, Do BH, Kim YW, Um SH, Kim SW (1988) Studies on seed germination of fringe tree (*Chionanthus retusus*). *Korean J Hort Sci Technol*, 6, 212-213
 16. Chien CT, Kuo-Huang LL, Shen YC, Zhang R, Chen SY, Yang JC, Pharis RP (2004) Storage behavior of *Chionanthus retusus* seed and asynchronous development of the radicle and shoot apex during germination in relation to germination inhibitors, including abscisic acid and four phenolic glucosides. *Plant Cell Physiol*, 45, 1158-1167
 17. Harborne JB, Green PS (1980) A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the *Oleaceae*. *Bot J Linn Soc*, 81, 155-167
 18. Kang MW (2005) Phytochemical constituents and biological activity of *Chionanthus retusus* Lindl. et Paxton. MS Thesis, Sungkyunkwan University, Korea, p 33-45
 19. Kim MS, Lee EH, Cho YJ (2015) Anti-oxidative activities of extracts from *Chionanthus retusus* leaves, fruits and flower. *Curr Res Agric Life Sci*, 33, 49-56
 20. Stirpe F, Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 244, 3855-3863
 21. Tibbot BK, Skadsen RW (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol*, 30, 229-241
 22. Vincent J, Hearing JR (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. *Method Enzymol*, 142, 154-165
 23. Wunsch E, Heidrich HG (1963) Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol Chem*, 333, 149-151
 24. Kraunsoe JAE, Claridge TDW, Lowe G (1996) Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 35, 9090-9096
 25. Dorfman A, Ott ML (1948) A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem*, 172, 367-375
 26. Mo SM (1986) Diet therapy. Kyomunsa Publishing Co, Paju, Korea, p 311
 27. Kim KB, Jo BS, Park HJ, Park KT, An BJ, Ahn DH, Kim MU, Chae JW, Cho YJ (2012) Healthy functional food properties of phenolic compounds isolated from *Ulmus pumila*. *Korean J Food Preser*, 19, 909-918
 28. Choi HJ (2000) Inhibitory effect of *Gyrophora esculenta* on α -glucosidase. Ph D Thesis, Kyunghee University, Korea, p 48
 29. Mo JH, Oh SJ (2015) Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of extract of *Thuja orientalis*. *Korean J Aesthetic Cosmetol*, 13, 189-194
 30. Giacomoni PU, Rein G (2001) Factors of skin ageing share common mechanisms. *Biogerontology*, 2, 219-229
 31. Ahn BK, Kim R, Choi DB, Kim YS (2011) Effect of *Salicornia bigelovii* extract on the activities of whitening and anti-wrinkle. *Appl Chem Eng*, 22, 56-60
 32. Lee BG, Kim JH, Ham SG, Lee CE (2014) Study on Biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Korean J Plant Res*, 27, 29-34
 33. Kim KB, Jo BS, Lee JY, Park KT, An BJ, Lee SH, Cho YJ (2012) Beauty food activities of isolated phenolic compounds from *Ulmus pumila*. *J Appl Biol Chem*, 55, 207-215
 34. Sern R (2003) Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?. *Glycobiology*, 13, 105-115