지모 뿌리 추출물과 분획물의 항균활성과 항산화 활성 및 세포보호 연구

이윤주, 송바름, 이상래, 신혁수, 박수남*

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소

Received: September 5, 2018 / Revised: October 5, 2018 / Accepted: October 9, 2018

Antimicrobial, Antioxidant and Cellular Protective Effects against Oxidative Stress of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge Extract and Fraction

Yun Ju Lee, Ba Reum Song, Sang Lae Lee, Hyuk Soo Shin, and Soo Nam Park*

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea

Extracts and fractions of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge were prepared and their physiological activities and components were analyzed. Antimicrobial activities of the ethyl acetate and aglycone fractions were 78 µg/ml and 31 µg/ml, respectively, for *Staphylococcus aureus* and 156 µg/ml and 125 µg/ml, respectively, for *Pseudomonas aeruginosa*. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging activities (FSC₅₀) of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction, and aglycone fraction of *A. asphodeloides* extracts were 146.2 µg/ml, 23.19 µg/ml, and 71.06 µg/ml, respectively. The total antioxidant capacity (OSC₅₀) in an Fe³⁺-EDTA/hydrogen peroxide (H₂O₂) system were 17.5 µg/ml, 1.5 µg/ml, and 1.4 µg/ml, respectively. The cytoprotective effect (τ₅₀) in ¹O₂-induced erythrocyte hemolysis was 181 min with 4 µg/ml of the aglycone fraction. The τ₅₀ of the aglycone fraction was approximately 4-times higher than that of (+)-α-tocopherol (τ₅₀, 41 min). Analysis of H₂O₂-induced damage of HaCaT cells revealed that the maximum cell viabilities for the 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction, and aglycone fraction were 86.23%, 86.59%, and 89.70%, respectively. The aglycone fraction increased cell viability up to 11.53% at 1 µg/ml compared to the positive control treated with H₂O₂. Analysis of ultraviolet B radiation-induced HaCaT cell damage revealed up to 41.77% decreased intracellular reactive oxygen species in the 2 µg/ml aglycone fraction compared with the positive control treated with ultraviolet B radiation. The findings suggest that the extracts and fractions of *A. asphodeloides* Bunge have potential applications in the field of cosmetics as natural preservatives and antioxidants.

Keywords: *Anemarrhena asphodeloides* Bunge, antimicrobial, reactive oxygen species, antioxidative activity, cellular protective effect

서 론

사람 신체의 최외각 보호 장벽인 피부는 자외선이나 미생물 등의 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 담당한다. 최근에는 공해 및 미세먼지 등 다양한 환경 변화가 피부에 미치는 해로운 영향으로부터 피부를 보호하기 위한 소재

개발 및 화장품에의 응용에 대한 관심도 증대되고 있다. 하지만 화장품은 대체로 30–95%의 많은 물이 함유되어 있기 때문에 쉽게 외부 미생물 오염에 노출될 수 있다. 미생물 오염은 제품의 안정성 및 주요 성분들의 변질을 초래할 뿐만 아니라 피부 손상도 일으킬 수 있다. 따라서 화장품에는 미생물 오염을 막기 위해 보존제인 파라벤류 및 페녹시에탄올 등이 사용되어 왔다. 하지만 이들 보존제는 최근 피부에 대한 안전성 이슈로 인하여 생체 및 피부에 보다 안전한 천연 항균활성을 갖는 방부제를 탐색하는 소재 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다[1–5].

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

피부는 내인적 요인과 외인적 요인으로 인해 노화가 진행된다. 내인적 요인으로는 생리적 요인의 기능 감소와 같은 자연 노화이며, 외인적 요인인 자외선(UVA 및 UVB)과 같은 광화학적 반응을 통한 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성에 의한 색소침착, 깊은 주름의 생성 등의 대표적인 광노화를 예로 들 수 있다. 활성산소의 종류는 비라디칼종인 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)과 hydrogen peroxide (H_2O_2) 라디칼종인 superoxide anion radical (O_2^-)과 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)이 있고, 활성산소와 생체 구성 성분과의 반응으로 생성되는 유기 라디칼인 peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$) 및 alkoxyl radical ($\text{RO}\cdot$) 등이 있다. 이러한 활성산소종은 DNA 산화, 단백질의 산화, 지질 과산화의 개시, 콜라겐 및 히알루론산 등의 사슬절단과 비정상적인 교차결합을 일으키는 등 피부에 손상을 주어 노화를 가속화 시킨다[6]. 이러한 활성산소의 유해한 작용으로부터 생체를 보호하는 항산화제로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) 및 catalase와 같은 효소적 항산화와 비타민 C, E와 같은 비효소적 항산화제가 있고 이들은 피부 항산화 방어망을 구축하여 피부를 보호한다. BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) 등은 식품 첨가물로 주로 사용되는 합성 항산화제들이다[7, 8]. 하지만 합성 항산화제는 과량 사용시 안전성이나 일반 소비자들의 거부감 때문에 보다 안전하다고 소구되는 천연 항산화제를 개발하여 제품에 응용하려는 연구들이 계속되고 있다[9].

지모는 백합과(Liliaceae)에 속하는 뿌리 줄기로 굵고 옆으로 뻗으며, 높이는 60–90 cm이다. 원산지는 중국이며 한국에서도 재배된다. 지모는 향염[10–12] 및 향균[13] 등의 효과가 있을 것으로 보고되고 있다. 그러나 화장품 소재로의 적용을 위한 다양한 종류의 항균활성 평가나 활성산소종 생성 시스템인 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능 평가나 광노화의 중요한 실험 모델 중 하나인 광증감 반응으로 생성되는 $^1\text{O}_2$ 등의 활성산소에 의해 지질과산화 연쇄반응으로 인한 세포 손상에 있어서 지모 추출물/분획물의 세포 보호 효과에 대한 연구에 대해서는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 지모 추출물(혹은 분획)을 제조하여 피부 상재균에 대한 항균활성, 다양한 활성산소종에 대한 소거능, 즉 총항산화능 및 세포보호활성을 측정하고 그 구성 성분을 확인함으로써 천연 화장품 소재로서의 가능성이 있는지를 확인 하고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

DPPH 실험에서 사용한 UV-visible spectrophotometer는 Varian사의 Cary 50 (Australia)를, 화학발광기는 Berthold

사의 6-channel LB9505 LT (Germany)를 사용하여 실험하였고, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약 luminol 및 heparin, free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, EDTA, 광증감제로 사용된 rose Bengal은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 에탄올(EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc), 메탄올 (MeOH) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였고, 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였다. 비교 물질로 사용한 mangiferin은 Corescience에서 구입하였고, L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 지모는 삼흥건재약업사에서 구입하였다. 세포배양에는 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Capricorn, Germany), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S) 및 trypsin 등은 Capricorn Scientific (Germany) 제품을 사용하였다.

지모 뿌리 추출/분획 및 수율

건조된 지모 300 g을 잘게 자른 뒤 50% 에탄올 6 L에 48 h 동안 상온에 두어 침적시킨 후 여과하였다. 여과를 통해 얻은 여액은 감압 농축시켜 파우더를 얻어 사용하였다. 에틸아세테이트 분획은 3회 분획하여 얻어 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 아글리콘 분획은 에틸아세테이트 분획을 산 가수분해 하여 당을 제거하여 얻었다. 아글리콘 분획은 에틸아세테이트 파우더 0.2 g을 증류수, 아세톤, H_2SO_4 를 각각 4.5 : 5 : 0.5(v/v) 비율로 20 ml에 녹여 총 파우더와 용액의 비가

Fig. 1. Preparation of extract/fraction from dried whole plant of *A. asphodeloides* Bunge.

1 : 100이 되도록 하였다. 이 용액을 4 h 동안 가열하여 적정 온도에서 환류 냉각시켰다. 그 후 에틸아세테이트를 사용하여 분액하고 얻은 에틸아세테이트 층을 감압 농축하여 아글리콘 분획을 얻었다. 수율은 건조된 지모(100 g)을 기준으로 계산되었다. 건조된 지모의 50% 에탄올 추출물은 44.1% 에틸아세테이트 분획은 1.39%였으며, 아글리콘 분획의 수율은 0.74%로 나타났다(Fig. 1).

지모 뿌리 추출물의 항균활성 측정

사용균주, 배양 및 배양 조건: 본 실험에는 피부상재균으로 호기성 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* (황색포도상구균) ATCC 6538, 호기성 그람 음성 균인 *Escherichia coli* (대장균) ATCC 23736, *Pseudomonas aeruginosa* (녹농균) ATCC 29336, 효모 균인 *Candida albicans* (칸디다균) ATCC 10231, 곰팡이균인 *Aspergillus niger* (검정곰팡이) ATCC 16404 총 5가지 균주를 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다. *S. aureus*와 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*의 배지는 tryptic soy broth (Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 24–48 h 배양기에서 배양하였으며, *A. niger*는 potato dextrose broth (Difco, USA)를 사용하여 30°C에서 48 h 배양하였다.

Agar diffusion test에 의한 항균활성 측정: 각 시료의 항균 활성을 agar diffusion test를 통해 측정하였다. Paper disc(diameter 8mm, Poshi kaisha. Ltd., Japan)에 각 추출물 및 분획물의 농도는 100,000 µg/ml로 맞추어 실험에 사용하였고, 각 paper에 시료 50 µl를 천천히 흡수시켜, 건조 과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 배양된 균주는 1×10^6 – 1×10^7 CFU/ml로 농도를 맞춰 실험에 사용하였다. 각 균주는 평판배지에 100 µl씩 접종하고 멸균 면봉을 사용하여 도말하였다. 균주를 접종시킨 평판배지 위에 각 시료를 흡수시킨 paper disc를 밀착시킨 후 배양시켜 disc 주변에 나타난 저해환(clear zone)을 통해 항균활성을 측정하였다[14].

최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 측정: 지모 추출물의 정확한 항균활성을 알아보기 위해 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 통해 확인하였다. 실험방법은 broth-dilution method를 사용하였다. 실험에 사용된 최고 농도는 10,000 µg/ml로, 두배 희석법을 이용하여 추출물의 항균 활성을 확인하였다. 각각의 균주는 1×10^6 – 1×10^7 CFU/ml로 농도를 맞춰 사용하였다. 각 시료를 96-well plate에 접종한 후 30–37°C대의 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균주가 콜로니로 자라거나 증식되지 않은 농도를 최소저해농

도로 결정하였고, 균이 완전히 자라지 않은 농도를 최소사멸 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)로 결정하였다. 50% DMSO를 음성대조군으로, 화장품 방부제로 주로 쓰이는 메틸 파라벤을 양성대조군으로 사용하였다[15].

지모 뿌리 추출물의 항산화 활성 측정

DPPH법을 이용한 free radical 소거활성: 자유 라디칼은 피부 노화의 주된 원인으로 간주되고 있다. DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼에 속하는 DPPH에 대한 시료의 환원력을 측정하는 실험법이다. 실험 방법은 시험관에 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 0.3 ml에 에탄올 0.3 ml를 첨가하고 여러 농도의 추출물 0.3 ml를 첨가하여 섞은 다음 시험관을 막고 볼텍싱하여 실온에서 10 min동안 암반응 후에 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)로 하고 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하였다. DPPH의 소거율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도를 자유 라디칼 소거활성(free radical scavenging activity, FSC₅₀)로 표기하였다.

Radical scavenging (%) =

$$\left(1 - \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거활성 평가(총 항산화능): Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 다양한 ROS(O₂⁻, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있으며, 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS와의 반응을 통한 화학 발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. 화학 발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 ml를 넣고 여러 농도의 지모 뿌리 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µl 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µl를 가한 후 35 mM luminol 80 µl를 넣고 흔들어 섞어주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µl를 넣고 화학 발광을 25 min동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료균과 조건이 동일하거나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학 발광으로 측정된 저해율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학 발광의 세기가 50%

감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)로서 표기하였다.

ROS scavenging (%) =

$$\left\{ \frac{(Cpm_{control} - Cpm_{experiment})}{(Cpm_{control} - Cpm_{blank})} \right\} \times 100$$

광용혈법을 이용한 세포보호효과 측정

적혈구 현탁액 제조: 적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 4℃의 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 사용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심 분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 이를 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였으며, 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다[16]. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 O.D. 값이 700 nm에서 0.6이었으며, 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/ml이었다.

지모 뿌리 추출물의 광용혈 억제 효과: 적혈구 현탁액 3.5 ml를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후 추출 조건 별 지모 뿌리 추출물을 10 µg/ml를 50 µl씩 첨가한 후 암소에서 30 min동안 pre-incubation시켰다. 그 후 광증감제로 사용된 15 µM rose-bengal 0.5 ml를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다. 15 min의 광조사가 끝난 후 암반응 시간에 따른 적혈구의 용혈 정도를 14.5 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하였다. 이 700 nm의 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례하였다. 모든 실험은 20℃ 항온을 유지하며 진행하였다. 데이터는 다음 식에 의해 적혈구의 50%가 용혈 되는데 걸리는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

지모 뿌리 추출물의 HaCaT 세포보호효과 측정

HaCaT 세포배양: 사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusening (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS (PAA, Austria), 1% P/S (PAA, Austria)을 이용하여, 37℃, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

세포 독성 평가: 본 실험에서는 MTT assay를 통해 본 실험에 사용될 시료의 농도를 결정하였다. 추출물이 HaCaT 세

포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 96-well plate에 분배하여 70–80%까지 배양하였다. 그 후, 농도별로 희석한 추출물을 무혈청배지에 24시간동안 처리하였다. 96-well plate의 무혈청배지를 모두 제거하고 각 well당 0.5 mg/ml MTT 용액을 첨가하여 2 h동안 37℃에 반응시켰다. 생성된 formazan을 DMSO로 녹이고 ELISA reader (Tecan, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과:

HaCaT 세포를 1×10^4 cells/well로 96-well plate에 분주하고 24 h동안 37℃, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 배양하였다. 24 h 배양 후, 배지를 제거하고 무혈청 배지에 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물을 농도 별로 희석하여 24 h동안 배양하였다. PBS로 1회 세척한 후, 과산화수소 2 mM 농도(PBS)로 30 min 처리하였다. 과산화수소를 모두 제거 후, PBS로 2회 세척하였다. 세척 후, 무혈청 배지로 바꿔 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 24 h incubation 후, MTT assay로 세포 생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물과 분획물의 세포보호 효과를 확인하였다.

세포 내 ROS 소거활성 평가: 세포 내 ROS 소거활성 평가를 위하여 2',7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 사용하여 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하여 24 h동안 배양한 후, PBS를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 20 µM H₂DCF-DA로 30 min동안 37℃에서 처리한 후, CL-1000 ultraviolet crosslinker를 이용하여 PBS 상태에서 400 mJ/cm² UVB를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시킨 후, 농도 별로 희석한 시료를 처리하여 1 h 후 fluorescence ELISA reader (excitation, 490 nm; emission, 530 nm) 기기를 통하여 형광의 세기를 측정하였다.

지모 뿌리 추출물의 성분분석

TLC 및 HPLC를 이용한 성분분석: 지모 뿌리의 에틸아세테이트 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 µm)를 이용하여 여과시키고 이 여액을 극성 TLC (normal phase)분석을 위한 시료로 사용하였다. TLC 분석 시 사용된 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. TLC로 분리된 여러 띠를 끊어 100% 에탄올로 추출한 후 여과·농축하여 파우더를 얻었다.

성분확인에는 표준물질과 같이 전개시킨 TLC 크로마토그램을 vanillin 발색시약과 자외선(UV-254 nm)을 통해 띠의 색상, R_f value를 비교하여 HPLC 크로마토그램에서 표준물질

Table 1. TLC mobile phase for separation of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge.

Eluent system	
EtOAc Fraction	Chloroform : Methanol : D.W : Formic acid
Aglycone fraction	= 70 : 30 : 4 : 2 (v/v)

의 peak retention time과 UV-Visible 흡수스펙트럼을 비교하여 분석하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 및 0.5% acetic acid의 50% acetonitrile 용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다.

LC/ESI-MS를 이용한 성분분석: 분석기기로 LC 기기는 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo scientific, USA) (column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8 μ m, 50 $\times$ 2.0 mm Cat.-No. N0520e181UVC), autosampler, PDA-UV detector를 사용하였으며, 질량분석 (Mass spectrometric analysis) 기기는 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESL interface를 사용하였다. Injection volume은 5 μ l, flow rate는 200 μ l/min이며 전개용매 조건으로는 0.1% formic acid (in D. W) (A 용매) : 0.1% formic acid (acetonitrile)(B 용매) = 75 : 25를 사용하였다[17].

통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 3회 반복 실시하였으며, 통계

Table 2. HPLC conditions for separation of ethyl acetate fraction from *A. asphodeloides* Bunge.

Condition of HPLC Analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 Column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 μ m)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254-365 nm			
Flow rate	1.0 ml/min			
Injection volume	20 μ l			
Mobile phase conditions for HPLC	Program Order	Time (min)	2% AA ¹⁾ in Water (%)	0.5% AA ¹⁾ in 50% ACN ²⁾ (%)
Gradient-elution	1	0	100	0
	2	10	100	0
	3	100	50	50
	4	140	30	70
	5	210	30	70
	6	225	100	0
	7	230	100	0

¹⁾AA: Acetic acid, ²⁾ACN: Acetonitrile.

분석은 GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였다. Student's *t*-test 및 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p > 0.01$ 또는 $p < 0.05$ 이상의 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

지모 뿌리 추출물의 항균활성

Agar Diffusion Test에 의한 항균활성: 지모 뿌리 추출물의 항균활성을 알아보기 위해 CTFA challenge test에서 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus*, 호기성 그람 양성 균주인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, 효모균인 *C. albicans*, 곰팡이균인 *A. niger*를 이용하여 agar diffusion test를 진행하였다. 실험 결과는 Fig. 2와 Table 3에 나타내었다. 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus*에서 모든 추출물 및 분획물이 저해환 (clear zone)을 나타내었는데 특히 에틸아세테이트 분획물에서 대조균으로 쓰인 메틸 파라벤보다 더 높은 항균활성을 나타내었고, 아글리콘 분획물에서도 높은 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 호기성 그람 음성 균주인 *P. aeruginosa*에서는 에틸아세테이트 분획에서 약간의 저해환이 확인되었다. 또한 효모균인 *C. albicans*에서도 에틸아세테이트 분획물과 아글리콘 분획물에서 저해환을 나타내어 항균 활성이 있음을 확인하였다. 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli*와 곰팡이균인 *A. niger*에서는 저해환이 확인되지 않았다. 지모 추출물/분획물에서는 결론적으로 그람 양성균 및 효모균에서 항균활성을 나타내었다.

최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소사멸농도(minimum bactericidal/fungi concentration, MBC/MFC) 측정: 지모 뿌리 추출물에 대한 더 정확한 항균 활성을 알아보기 위해 broth-dilution method를 통해 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC, MFC)를 확인하였다. 실험결과는 Table 4에 나타내었다. 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물은 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에서 각각 2,500 μ g/ml, 10,000 μ g/ml, 2,500 μ g/ml에서 MIC를 확인하였으며, *E. coli*와 *A. niger*에서는 측정 최고 농도인 10,000 μ g/ml에서도 MIC를 나타내지 않았다. 에틸아세테이트 분획물에서는 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에서 각각 78 μ g/ml, 5,000 μ g/ml, 156 μ g/ml, 78 μ g/ml에서 MIC를 나타내었고, *A. niger*에서는 항균활성을 나타내지 않았다. 아글리콘 분획물에서는 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에서 각각 31 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml에서 낮은 농도에서도 MIC를 나타내었다. *E. coli*와 *A. niger*에서는 항균활성을 나타내지 않았다. MIC 측정결과 에틸아세테이트 분획물과 아글리콘 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 높

Fig. 2. Antimicrobial activity of 50% EtOH/EtOAc fraction/aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge against bacteria and fungi. (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa*, (D) *C. albicans*, (E) *A. niger*. a: methyl paraben (control), b: EtOAc fraction, c: EtOH extract, d: aglycone fraction.

은 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 대조군으로 사용한 methyl paraben보다 더 높은 항균활성을 나타냄을 보였으며, 에틸아세테이트 분획물에서 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* 균주에서 메틸 파라벤보다 비슷하거나 낮은 농도에서 MIC를 나타내었다. Ahn 등(2000)은 paper disc를 이용하여 지모 뿌리 70% 에탄올 추출물에 대한 항균활성을 측정하였다. 이 연구에서 *Bacillus subtilis*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Streptococcus mutans*, *Trichophyton mentagrophytes* 및 *C. albicans*에 대한 항균활성을 측정한 결과, *S. sp.*, *T. mentagrophytes*, 및 *C. albicans* 3개 균에서 항균활성이 나타났으며, 지모 추출물은 특히 효모균인 *C. albicans*와 *S. sp.*에 대해 선택적인 항균활성을 나타낸다고

보고했다[18]. 저자들의 연구에서는 Ahn 등과는 달리, 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물 3종류를 사용하여 피부 상재균에 대한 항균활성을 agar diffusion assay와 MIC를 통해 조사하였다. 그 결과 추출물/분획물중에서 에틸아세테이트 분획물에서 *C. albicans* 뿐만 아니라 호기성 그람 양성, 음성 균에 대해서도 높은 항균 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 3개의 추출 및 분획물 중 에틸아세테이트 분획물에서 가장 큰 항균활성을 보였다. 이는 극성이 큰 성분들 보다도 극성이 작은 성분들이 항균 활성이 더 크게 기여한 것으로 판단된다. 따라서 지모 뿌리 추출물 또는 분획물을 다양한 항균활성 시너지 효과를 갖는 물질과 함께 사용하면 화장품 등에서 천연 방부제로서의 역

Table 3. Antimicrobial activity of 50% EtOH Extract/EtOAc Fraction/Aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge against Bacteria and Fungi. Zones of inhibition include diameter of disc (8 mm).

Strains		Size of clear zone(diameter, mm)			
		Methyl paraben	50% EtOH extract	EtOAc fraction	Aglycone fraction
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i>	17	11	18	16
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i>	20	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	14	-	9	-
Fungi	<i>C. albicans</i>	27	10	24	15
	<i>A. niger</i>	24	-	-	-

-: No inhibition.

Table 4. Antimicrobial activity of extract and fractions obtained from *A. asphodeloides* Bunge against bacteria and Fungi.

Strains		$\mu\text{g/ml}$							
		Methyl paraben		50% EtOH extract		EtOAc fraction		Aglycone fraction	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i>	2,500	2,500	2,500	5,000	78	156	31	31
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i>	1,250	1,250	-	-	5,000	5,000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1,250	1,250	10,000	10,000	156	156	125	250
Fungi	<i>C. albicans</i>	1,250	2,500	2,500	10,000	78	156	250	250
	<i>A. niger</i>	625	625	-	-	-	-	-	-

-: No inhibition.

할도 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

지모 뿌리 추출물의 항산화 활성

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성: 사람 피부가 자외선에 노출되었을 때 ROS, 즉 활성산소가 생성되게 되는데 활성산소에는 O_2^- , $\cdot\text{OH}$ 와 같은 홀 전자를 가지는 자유 라디칼이 포함되어 있다. 이들은 매우 반응성이 크기 때문에 생체막에서 자동산화과정 및 지질과산화를 경유한 연쇄반응으로 생체 구성성분들을 산화적 손상을 일으킨다. 이때 라디칼에 전자를 제공하여 라디칼을 소거하여 지질과산화 연쇄반응을 종결시킬 수 있다. 항산화제나 생체 내에 존재하는 항산화제인 (+)- α -tocopherol은 지질과산화 연쇄반응에서 생성된 지질 라디칼에 수소 주개로 작용함으로써 연쇄반응을 종결시켜 세포막을 보호한다[16]. 이러한 환원력을 이용하여 시료의 자유 라디칼 소거활성(free radical scavenging concentration, FSC_{50})을 측정하고자 하였다. 본 실험에서는 지모 뿌리 추출물 및 분획물의 라디칼 소거활성을 측정하였고 대조군으로는 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 사용하여 라디칼 소거활성을 비교하였다. 자유 라디칼이 50%

Fig. 3. Free radical scavenging activities of 50% EtOH extract/EtOAc fraction/aglycone fraction of *A. asphodeloides* Bunge and (+)- α -tocopherol. Data are presented as mean $\pm$ SD. ** $p > 0.01$ compared with (+)- α -tocopherol. # $p > 0.01$ compared with 50% EtOH extract.

소거되는 농도인 FSC_{50} 은 50% 에탄올 추출물이 146.2 $\mu\text{g/ml}$, 에틸아세테이트 분획물이 23.19 $\mu\text{g/ml}$, 아글리콘 분획물이 71.06 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이들은 대조군으로 사용된 (+)- α -tocopherol (7.9 $\mu\text{g/ml}$)보다는 낮은 활성을 보였으나 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획물보다 통계적으로 유의하게 더 높은 자유 라디칼 소거활성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 3).

Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성 평가(총 항산화능): Fenton 반응을 통해 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 에서는 다양한 종류의 활성산소가 생성된다. 루미놀은 활성산소와 반응하여 들뜬 상태의 루미놀이 되고, 이어서 루미놀이 바닥상태로 되면서 발광을 한다. 이 계에 항산화제를 첨가하면 감소된 활성산소에 의해 화학발광은 감소하는데 이를 이용하여 총 항산화능(ROS scavenging concentration, OSC_{50})을 평가하였다. 활성산소가 50% 감소하는 농도인 OSC_{50} 은 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물이

Fig. 4. ROS scavenging activities of 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge and L-ascorbic acid in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as mean $\pm$ SD. a-c, Different letters on the top of the bars denote significant differences ($p > 0.01$).

Table 5. Cellular protective effects of 50% EtOH Extract/ EtOAc fraction and aglycone fraction of *A. asphodeloides* Bunge, and (+)- α -tocopherol on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	τ_{50} (Half time of hemolysis)				
	Control	1	2	4	8
50% EtOH extract	40.3 (± 2.6)	37.9 (± 2.7)	40.6 (± 1.4)	31.3 (± 3.9)	34.5 (0.9)
EtOAc fraction	36.6 (± 2.5)	48.2 (± 3.8)	53.3 (± 6.4)	64.4 (± 5.2)	20 (± 1.0)
Aglycone fraction	35.7 (± 2.9)	78.8 (± 8.5)	95.4 (± 6.5)	181 (± 0.7)	215.9 (± 3.1)
(+)- α -Tocopherol	36.5 (± 2.8)	39.6 (± 1.1)	40.5 (± 4.9)	41 (± 1.6)	49.7 (± 8.0)

17.5 $\mu\text{g/ml}$, 에틸아세테이트 분획물이 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 아글리콘 분획이 1.4 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 에틸아세테이트 분획물과 아글리콘 분획물은 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid (1.3 $\mu\text{g/ml}$)과 비슷한 활성을 나타내었으며 높은 총 항산화능을 나타냄을 확인하였다. 또한 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 약 11배 더 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 Fig. 3과 비교하여 지모 뿌리 추출물 및 분획물이 자유 라디칼 소거활성 및 활성산소 소거활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 결론적으로 지모 에틸아세테이트 분획물과 아글리콘 분획물은 L-ascorbic acid와 거의 유사한 매우 큰 총항산화능을 나타내었다.

$^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 파괴에 대한 세포보호 효과: $^1\text{O}_2$ 는 매우 강한 반응성을 가진 활성산소로써 피부 항산화제를 소진시켜 항산화 방어망을 무너뜨리면 세포막에서는 라디칼 반응이 개시되어 지질과산화반응이 일어나서 세포손상을 촉진시킨다. 따라서 광증감제인 rose-bengal을 사용하여 $^1\text{O}_2$ 를 발생시키고, 생성된 $^1\text{O}_2$ 는 세포를 손상, 파괴시킨다. 이러한

광산화적 스트레스 하에서 지모 뿌리 추출물의 세포보호효과를 평가하고자 하였다. 특히, 적혈구는 철을 함유하고 있어 암반응 상태에서도 Fenton 반응에 의한 다양한 ROS를 생성하고 세포막 및 구성 성분을 파괴시키기 때문에 천연물의 항산화 활성을 평가하는데 적합하다고 판단하였다. 지모 뿌리 추출물의 비교 물질로는 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 사용하였다. 본 실험에서는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50} , min)을 측정하여 세포 보호 효과를 평가하였으며 세포 보호 효과가 클수록 값이 크게 나타났다.

실험결과는 Table 5과 Fig. 5에 나타내었다. 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물의 τ_{50} 은 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 37.9, 40.6, 31.3 및 34.5 min으로 나타났고, 에틸아세테이트 분획에서는 각각 48.2, 53.3, 64.4 및 20 min으로 나타났다. 아글리콘 분획에서는 78.8, 95.4, 181 및 215.9 min으로 나타났으며 비교 물질로 사용된 (+)- α -tocopherol은 같은 농도에서 각각 39.6, 40.5, 41 및 49.7 min으로 나타났다. 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획에서 모두 농도의존적인 세포보호효과를 보였으며, 특히 아글리콘 분획의 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 비교 물질로 사용된 (+)- α -tocopherol보다 약 4배 높은 세포보호 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획의 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포보호효과가 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 고농도에서 독성이 있는 것으로 보인다. 지모 추출물의 아글리콘 분획물은 광노화에 있어서 주도적인 역할을 하는 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 손상과 파괴에 있어서 비교 물질인 토코페롤보다도 매우 큰 세포보호활성을 나타내었다. 따라서 아글리콘 분획물은 화장품에서 광노화 억제 기능성 소재로서 응용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

지모 뿌리 추출물의 세포보호 효과

HaCaT 세포 독성 평가: HaCaT 세포에 대한 지모 뿌리 추출물의 농도에 따른 세포생존율을 확인하고자 MTT assay를 통해 확인하였고 세포가 80% 이상 생존한 농도를 실험에 사용하기로 결정하였다. HaCaT 세포에 0.5–256 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물을 처리 후 24 h 뒤 세포 생존율을 확인

Fig. 5. Cellular protective effect of 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction of *A. asphodeloides* Bunge, and (+)- α -tocopherol at 1 $\mu\text{g/ml}$ and 4 $\mu\text{g/ml}$ on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Data are presented as mean $\pm$ SD. a-c, Different letters on the top of the bars denote significant differences ($p > 0.05$).

Fig. 6. Effect of *A. asphodeloides* Bunge 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction treatment on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as the mean $\pm$ SD.

하였다. 실험 결과, 50% 에탄올 추출물은 16 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획물은 2 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획물은 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 HaCaT 세포가 80% 이상 생존율을 나타내었다. 따라서 세포 보호 효과를 확인하기 위한 시료의 최고 농도를 2 $\mu\text{g/mL}$ 으로 설정하여 사용하였다(Fig. 6).

과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과: 과산화수소는 세포 내 SOD로 촉매되는 반응에서 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 로부터 생성되며, 생성된 과산화수소는 생체 내 미량으로 존재하는 금속 이온과 반응하여 $\cdot\text{OH}$ 를 생성시켜 산화적 손상을 야기한다. 본 실험에서는 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 세포 보호 효과를 확인하였다. 실험결과는 Fig. 7에 나타내었다. 양성대조군으로 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군(음성대조군, 100%) 대비 약 78.17%의 생존율을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획을 처리한 군은 각각 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 생존을 유의적으로 증가시켰으며, 아글리콘 분획을 처리한 군은 0.06 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다. 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물의 최대 생존율은 각각 86.23, 86.59 및 89.70%를 나타냈으며, 이 때 과산화수소를 처리한 양성대조군에 비하여 세포 생존율을 각각 8.07, 8.42 및 11.53% 증가시켰다. 본 실험결과를 통해 지모 뿌리 아글리콘 분획물이 50% 에탄올, 에틸아세테이트 분획물보다 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효능이 있음을 확인하였다. 결론적으로 지모 뿌리 아글리콘 분획물은 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포

Fig. 7. Treatment of 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge HaCaT cells against H_2O_2 -mediated decreased cell viability. HaCaT cells were treated with different concentration of *A. asphodeloides* Bunge 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as the mean $\pm$ SD. a-c, Different letters on the top of the bars denote significant differences ($p > 0.05$).

손상뿐만 아니라 과산화수소로 유도된 세포 손상에 있어서도 세포보호효과가 큼을 확인하였다. 이는 각종 활성산소 생성 시스템에서 측정된 총항산화능과 더불어 세포 수준에서 수행한 다양한 활성산소종으로부터도 세포를 보호하는 효능이 있음을 시사하였다.

세포 내 ROS 소거활성: 사람 피부에 자외선을 처리하게 되면 피부 내에 ROS가 생성된다. 이들 ROS는 세포의 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시키고 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포 외 기질을 분해하는 MMPs의 발현을 촉진 시킴으로서 피부노화를 가속화시킨다[19, 20]. 따라서 세포내 ROS를 소거할 수 있는 항산화제를 사용하면 피부노화를 억제할 수 있다. 본 실험에서는 지모 뿌리 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물에 대하여 UVB로 조사된 HaCaT 세포에서 세포내 ROS 소거 활성을 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 를 이용하여 측정하였다. 실험결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 음성대조군에 비해 ROS가 4배 이상 증가하였다. 50% 에탄올 추출물에서는 ROS 소거 활성을 나타나지 않았다. 에틸아세테이트 분획물의 경우 2 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획물의 경우 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이상에서 유의한 세포내 ROS 감소를 나타내었다(Fig. 8). 결론적으로, 자외선으로 유도된 세포 손상에서 아글리콘 분획물은 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 UVB를 처리한 양성 대조군 대비 41.77%까지 세포내 ROS를 감소시켰다. 이 연구에서도 아글리콘 분획물은

Fig. 8. Effect of *A. asphodeloides* Bunge 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction on UVB-induced oxidative stress in HaCaT. *A. asphodeloides* Bunge 50% EtOH extract, EtOAc fraction and aglycone fraction scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as the mean $\pm$ SD. ^a $p < 0.05$ compared with UVB treated control in EtOAc fraction dose-treated groups by one way ANOVA, ^b $p > 0.01$ compared with UVB treated control in aglycone fraction dose-treated groups by one-way ANOVA.

매우 낮은 농도에서도 세포내 ROS를 소거함을 확인하였고, 이는 앞에서 언급한 ¹O₂으로 유도된 세포 손상뿐만 아니라 과산화수소로 유도된 세포 손상에 있어서도 세포보호 효과가 매우 큰 이유를 설명하는 것이다.

지모 뿌리 추출물의 성분분석

TLC 및 LC/ESI-MS 성분분석: TLC 크로마토그램을 통해 지모 뿌리 에틸아세테이트 분획의 성분을 확인하였다. 용매 조건은 chloroform : methanol : D.W : formic acid = 70 : 30 : 4 : 2 (v/v)으로 분리한 후 에틸아세테이트 분획물의 TLC 피

Fig. 9. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *A. asphodeloides* Bunge and references (UV 254 nm, vanillin reagents). Eluent system : chloroform : methanol : D.W : formic acid = 70 : 30 : 4 : 2(v/v), ① ethyl acetate fraction, ② aglycone fraction, ③ mangiferin.

분석을 통해 크게 7가지 피로 분리된 것을 확인하였다. 이로 나타난 피를 곁어서 추출 및 여과하고 용매를 감압·건조시켜 파우더를 얻은 뒤, 에탄올에 녹여 분석 시료로 사용하였다. 이중 4개의 피를 자외선과 vanillin 발색으로 확인하였다 (Fig. 9). R_f 0.26인 AAB 4는 단일 물질과의 비교를 통해 Mangiferin을 확인하였다. 나머지 TLC 분석 피 3개는 LC/ESI-MS를 이용해 분석한 결과 TLC R_f 0.74인 AAB 1은 [M-H]⁻이 m/z 251.3에서 나타났고, 성분은 Nyasol 임을 확인하였다. R_f 0.63인 AAB 2는 [M-H]⁻이 m/z 739.8으로 나타나 Timosaponin A-III로, R_f 0.57인 AAB 3은 [M-H]⁻이 m/z 421.4로 Isomangiferin으로 확인하였다(Table 6).

지모 뿌리 에틸아세테이트의 HPLC 성분분석: 지모 뿌리 에틸아세테이트 분획의 TLC 및 HPLC 크로마토그램은 Fig. 10

Table 6. LC/ESI-MS characteristics of ethyl acetate fraction from *A. asphodeloides* Bunge in ion mode.

TLC band	HPLC peak No.	Identified compound	Retention time (min)	Molar mass (g/mol)	$\lambda_{\max}$ (nm)	MS ions
						Negative ions (m/z) [M-H] ⁻
AAB1	2	Nyasol C17H16O2	165.685	252.3	259.09	251.3
AAB2	-	Timosaponin A-III C39H64O13	-	740.92	-	739.8
AAB3	-	Isomangiferin C19H18O11	-	422.3	274	421.4
AAB4	1	Mangiferin C19H18O11	55.122	422.3	257.44 317.30 365.75	-

Fig. 10. The HPLC chromatogram of EtOAc fraction and aglycone fraction of *A. asphodeloides* Bunge. 1: AAB4, 2: AAB1. (A) EtOAc fraction, (B) aglycone fraction.

에 나타내었다. HPLC 크로마토그램의 peak를 동정하기 위해 TLC 크로마토그램에서 분리하여 구한 시료를 HPLC 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석결과 크게 에틸아세테이트 분획물에서는 2개의 peak로 나타났고, 아글리콘 분획물에서는 1개의 피크가 크게 나타났다. AAB 4 (R_f 0.26)은 Fig. 10의 HPLC peak 1 (mangiferin), AAB 1 (R_f 0.74)은 peak 2 (nyasol)과 일치함을 확인하였다.

성분 분석을 통해 확인된 mangiferin과 niasol은 지모 뿌리 추출물의 주성분으로서 항산화효능은 여러 연구를 통해 알려져 있다. 페놀성 화합물인 mangiferin은 망고에서 주로 발견되며, 항산화 효능뿐만 아니라 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)에 대한 저해활성[21] 및 항당뇨[22] 및 항균 효과를 가지고 있다고 보고되었다. Niasol은 폴리페놀 화합물로 지모 뿌리에서 주로 발견된다. Niasol은 다양한 생물학적 활성을 띠는 것으로 알려져 있는데, 항암 작용 및 항진균 작용에 효능이 있다고 알려져 있다[12]. 따라서 본 TLC 및 HPLC 성분 분석을 통해 지모 뿌리 추출물의 주성분인 mangiferin과 niasol이 지모 추출물의 높은 항균 활성 및 항산화 활성을 더불어 세포 보호 효과에 기여한다고 사료된다 [23, 8].

요 약

1. Agar diffusion test를 통해 지모 뿌리 추출물의 항균활성 확인 결과 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus*에서 추출물 및 모든 분획물에서 저해환을 나타내었고, 에틸아세테이트

트 분획물이 대조군으로 사용된 메틸파라벤보다 더 높은 항균활성을 나타내었다.

2. 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC/MFC)를 통해 더 정확한 지모 뿌리 추출물의 항균활성을 확인하고자 하였다. 그 결과 곰팡이균인 *A. niger*를 제외한 모든 균주에서 MIC 농도를 확인하였고, 특히 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus*와 호기성 그람 음성 균주인 *P. aeruginosa* 그리고 진균인 *C. albicans*에서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획물이 낮은 농도에서 각 균주를 저해하는 것을 확인하였다.

3. DPPH법을 통해 지모 뿌리 추출물의 자유 라디칼 소거활성(FSC₅₀)을 확인한 결과 가장 높은 활성을 나타낸 것은 에틸아세테이트 분획물(23.19 µg/ml)이고 아글리콘 분획물(71.06 µg/ml), 50% 에탄올 추출물(146.2 µg/ml) 순서로 나타났다.

4. 지모 뿌리 추출물의 총 항산화능(OSC₅₀)을 확인하기 위해 luminol 발광법을 통해 확인하였다. 실험 결과 에틸아세테이트 분획물(1.5 µg/ml)과 아글리콘 분획물(1.4 µg/ml)이 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid (1.3 µg/ml)과 비슷한 활성을 나타내며 높은 총 항산화능을 나타내었다. 또한 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 약 11배 더 높은 활성을 띠는 것을 확인하였다.

5. ¹O₂으로 유도된 세포 파괴에 대한 세포보호 효과(τ_{50})를 확인한 결과 지모 뿌리 추출물과 분획물 모두 농도의존적으로 세포보호효과를 나타내었다. 50% 에탄올 추출물은 8 µg/ml의 농도(34.5 min)에서, 에틸아세테이트 분획물은 4 µg/ml의 농도(64.4 min)에서, 아글리콘 분획물은 8 µg/ml의 농도(215.9 min)에서 가장 높은 보호효과를 나타냄을 확인하였다.

6. 지모 뿌리 추출물의 HaCaT 세포독성평가를 진행한 결과, 본 실험에서는 0.02–2 µg/ml로 농도를 설정하여 세포보호실험을 진행하였다.

7. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물의 최대 생존율은 각각 86.23, 86.59 및 89.70%를 나타냈으며 과산화수소를 처리한 양성 대조군에 비하여 세포 생존율을 각각 8.07, 8.42 및 11.53% 증가시켰다.

8. HaCaT세포에 UVB를 조사하여 세포 내 ROS 소거활성평가를 진행한 결과, 자외선으로 유도된 세포 손상에서 아글리콘 분획물은 2 µg/ml 농도에서 UVB를 처리한 양성 대조군 대비 41.77%까지 세포내 ROS를 감소시켰다.

9. 실험을 통해 높은 생리활성을 나타낸 지모 뿌리 에틸아세테이트 분획물을 TLC 및 LS/ESI-MS를 통해 성분분석을 진행하였다. 그 결과 mangiferin, isomangiferin, timosaponin-A-III, niasol을 확인하였다.

본 연구의 결과를 통해 지모 뿌리 추출물의 항균 및 항산화 작용과 더불어 세포보호효과를 통해 천연 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Hiom SJ. 2004. *Preservation of medicines and cosmetics*, pp. 484-513. Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization.
- Choi EY. 2015. Effect of phenoxyethanol and alkane diol mixture on the antimicrobial activity and antiseptic ability in cosmetics. *Korean J. Aesthet. Cosmetol.* **13**: 213-220.
- Andersen FA. 2008. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int. J. Toxicol.* **27**: 1-82.
- Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**: 12-19.
- Lundov MD, Opstrup MS, Johansen JD. 2013. Methylisothiazolone contact allergy—a growing epidemic. *Contact. Dermatitis.* **69**: 271-275.
- Passi S, Picardo M, De Luca C, Breathnach AS, Nazzaro-Porro M. 1991. Scavenging activity of azelaic acid on hydroxyl radicals *in vitro*. *Free Radic. Res.* **11**: 329-338.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radic. Biol. Med.* **2**: 419-444.
- Kwon J, Kondaji G, Song S, Kim C, Lee K, Kim WK, et al. 2013. Synthesis of naturally occurring norlignan ($\pm$)-nyasol. *Bull. Korean Chem. Soc.* **34**: 1247-1249.
- Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, et al. 2002. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* HBK leaves and their major flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* **79**: 183-191.
- Chae S, Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Kim KC, Youn UJ, et al. 2011. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 2321-2325.
- Kang M, Jung I, Hur J, Kim SH, Lee JH, Kang JY, et al. 2010. The analgesic and anti-inflammatory effect of WIN-34B, a new herbal formula for osteoarthritis composed of *Lonicera japonica* Thunb and *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* **131**: 485-496.
- Kim HS, Song JH, Youn UJ, Hyun JW, Jeong WS, Lee MY, et al. 2012. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*. *Eur. J. Pharmacol.* **689**: 38-44.
- Park YJ, Ku CS, Kim MJ, Lee MK, Kim KO, Ryu HW, et al. 2015. Cosmetic activities of nyasol from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**: 31-38.
- Park SN, Kim SY, Lim GN, Jo NR, Lee MH. 2012. In vitro skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts. *Ind. Eng. Chem. Res.* **18**: 680-683.
- Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Ha JH, Park SN. 2014. Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 386-392.
- Park SN. 1997. Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **23**: 75-132.
- Kim KM, Kim AR, Kim AY, Ha JH, Xuan SH, Jeong YJ, et al. 2017. Antioxidative and cellular protective effect of Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) extracts against oxidative stress. *Korean J. Pharmacogn.* **48**: 125-133.
- Ahn DJ, Kwak YS, Kim MJ, Lee JC, Shin CS, Jeong KT. 2000. Screening of herbal plant extracts showing antimicrobial activity against some food spoilage and pathogenic microorganisms. *Korean J. Med. Crop Sci.* **8**: 109-116.
- Afaq F, Mukhtar H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* **15**: 678-684.
- Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, et al. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* **35**: 307-316.
- Chae S, Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Kim KC, Youn UJ, et al. 2011. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 2321-2325.
- Wang F, Yan J, Niu Y, Li Y, Lin H, Liu X, et al. 2014. Mangiferin and its aglycone, norathyriol, improve glucose metabolism by activation of AMP-activated protein kinase. *Pharm. Biol.* **52**: 68-73.
- Kim CY, Ahn MJ, Kim J. 2006. Preparative isolation of mangiferin from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes by centrifugal partition chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29**: 869-875.