Appl. Chem. Eng., Vol. 29, No. 6, December 2018, 772-781
https://doi.org/10.14478/ace.2018.1091

Article

범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 항산화, 항균 및 세포 보호 효과

송바름 · 이상래 · 이윤주 · 신혁수 · 박수남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소
(2018년 9월 4일 접수, 2018년 10월 1일 심사, 2018년 10월 15일 채택)

Antioxidant, Antimicrobial and Cytoprotective Effects of the Extract and Its Fraction Obtained from Rhizomes of *Belamcanda chinensis* (L.) DC

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

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
(Received September 4, 2018; Revised October 1, 2018; Accepted October 15, 2018)

초 록

본 연구에서는 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 제조하고 이들의 항산화 및 항균 활성, 세포 보호 효능을 평가하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유라디칼 소거 활성(FSC_{50}) 측정 결과, 50% 에탄올 추출물은 621.5 μg/mL, 에틸아세테이트 분획물은 253.0 μg/mL이었다. Luminol 발광법을 이용한 총 항산화능(OSC_{50})은 추출물과 분획물에서 각각 13.6 및 3.0 μg/mL이었다. 항균 활성 측정에서 *Staphylococcus aureus* 및 *Candida albicans*에 대한 에틸아세테이트 분획물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 각각 156 및 1,250 μg/mL으로 나타났으며, 화장품에 사용하는 기존 방부제인 methyl paraben보다 유사하거나 더 높은 활성을 보여주었다. $^1O_2$로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과(τ_{50})에서 50% 에탄올 추출물은 4~64 μg/mL 농도 범위에서 농도 의존적으로 세포 보호 활성을 나타냈다. 16 μg/mL 농도에서 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 (+)-α-tocopherol의 τ_{50}은 각각 36.4, 45.0 및 45.8 min이었으며, 에틸아세테이트 분획물은 $^1O_2$로 유도된 세포 손상에서 (+)-α-tocopherol과 유사한 세포 보호 활성을 나타냈다. UVB로 유도된 HaCaT 세포 손상에서 에틸아세테이트 분획물은 8 μg/mL에서 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 최대 45.9%까지 감소시켰다. 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포 손상에서도 에틸아세테이트 분획물은 0.5~8.0 μg/mL에서 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다. 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석 결과, irisflorentin, irigenin, tectorigenin, resveratrol, iridin 및 tectoridin 등의 플라보노이드 및 폴리페놀 성분이 확인되었다. 결론적으로 범부채 뿌리 추출물 및 분획물은 화장품의 천연 항산화 및 항균 소재로서 적용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract

In this study, we investigated antioxidant, antimicrobial and cytoprotective effects of 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction from rhizomes of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities (FSC_{50}) of the 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction were 621.5 and 253.0 μg/mL, respectively. Total antioxidant capacities (OSC_{50}) of the extract and fraction were 13.6 and 3.0 μg/mL, respectively. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the ethyl acetate fraction for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were 156, 1,250 μg/mL, respectively, indicating similar or higher levels of those of using methyl paraben. Cytoprotective effects of the 50% ethanol extract against $^1O_2$-induced cellular damage (τ_{50}) showed in a dose dependent manner at 4 to 64 μg/mL. τ_{50} of the 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and (+)-α-tocopherol at 16 μg/mL were 36.4, 45.0 and 45.8 min respectively, and the ethyl acetate fraction showed cytoprotective effects similar to (+)-α-tocopherol. In ultraviolet B radiation-induced HaCaT cell damage, the ethyl acetate fraction decreased intracellular reactive oxygen species (ROS) up to 45.9% at 8 μg/mL. Also in H_2O_2-induced HaCaT cell damage, the ethyl acetate fraction significantly increased the cell viability at 0.5~8.0 μg/mL. As a result of chemical analyses of the ethyl acetate fraction, the presence of flavonoids and polyphenol such as irisflorentin, irigenin, tectorigenin, resveratrol, iridin and tectoridin were identified. In conclusion, the extract/fraction from rhizomes of *B. chinensis* can be applied as a natural antioxidant and antimicrobial material to cosmetics.

Keywords: *Belamcanda chinensis (L.) DC, antioxidant, reactive oxygen species, antimicrobial effect, cytoprotective effect, flavonoid*

† Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2018 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

1. 서 론

사람의 평균 수명이 연장되고 고령화 비율이 높아짐에 따라 피부 노화에 대한 관심이 증가하고 있으며, 삶의 질을 향상시키기 위해 건강뿐만 아니라 아름다움을 동시에 추구하는 경향이 나타나고 있다. 이에 따라 항노화 소재 개발과 이를 이용한 항노화 화장품 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

노화는 내인성 요인과 외인성 요인에 의해 피부의 구조적, 생리적 기능이 손실되는 과정이다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 진행되며, 유전적으로 정해진 속도로 불가피하게 발생한다. 반면, 외인성 노화는 다양한 외적 요인 즉, 자외선 및 공해 등의 환경적 요인과 다이어트나 수면 패턴, 병적 혹은 정신적 건강 상태 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. 특히 반복적인 자외선 노출에 의한 광노화는 외인성 피부 노화의 90%를 차지한다. 자외선이 피부에 흡수되면 다양한 경로를 통해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 진피층에서는 matrix metalloproteinase (MMP)가 발현되어 collagenase, gelatinase 및 stromelysin-1 등이 생성된다. 그 결과 세포외 기질인 collagen 및 elastin 등이 분해되고 탄력 손실, 주름 발생을 통해 피부 노화가 촉진된다[1,2].

ROS란 산소원자를 포함한 화학적으로 반응성 있는 분자로 hydroxyl radical (·OH), alkoxyl radical (RO·), peroxyl radical (ROO·), superoxide anion radical ($O^{\cdot-}_2$), nitroxyl radical (NO·), 비라디칼성의 hydrogen peroxide (H_2O_2), organic hydroperoxides (ROOH) 및 hypochlorous acid (HOCl) 등을 포함한다[3,4]. ROS가 발생하면 세포에서는 DNA 손상, 세포주기 조절 장애, DNA 복구 및 복제 장애, 유전자 변이가 일어나게 된다. 또한 ROS에 의한 DNA 손상은 면역을 억제시켜 피부암을 유발할 수도 있다[5].

생체 내에는 이러한 ROS를 소거할 수 있는 항산화제들로 구성된 항산화 시스템이 있다. 항산화제에는 tocopherol, flavonoids, alkaloids, carotenoids, ascorbate, glutathione (GSH)와 같은 비효소적 항산화제와 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) 및 catalase (CAT)와 같은 효소적 항산화제가 알려져 있다. SOD는 ROS에 대한 첫 번째 방어선으로 superoxide를 H_2O_2로 전환시킨다. 그 다음 APX, GPX 및 CAT가 H_2O_2를 H_2O로 전환시켜 해독작용을 한다[6]. 그러나 지속적인 자외선 노출로 인한 라디칼의 과잉 생성은 이러한 방어 시스템을 붕괴시켜 피부 질환을 일으키게 된다[5]. 따라서 항산화 시스템이 정상적으로 작동되어 세포 및 조직을 보호하기 위해서는 항산화제의 보충이 중요하다. 이를 위해 다양한 항산화제가 개발되고 있으나 합성 원료에 대한 유해성이 사회적으로 이슈가 되면서 피부에 보다 안전한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 이에 따라 각종 생약이나 식용식물에서 천연 항산화제를 개발하여 화장품에 응용하려는 시도들이 계속되고 있다[7,8].

범부채는 붓꽃과에 속하는 다년생초본 식물로 뿌리는 엷은 갈색을 띠며, 20~120 cm까지 자란다. 중국 중서부 지역에 주로 분포하며, 예로부터 해열제, 해독제, 거담제, 소염제 및 진통제로 널리 사용되어 왔다. 주요 성분으로는 flavonoids, terpenoids, quinones, phenolic compounds, ketones 및 organic acids 등이 있는 것으로 알려져 있다[9,10]. 생리활성으로는 에스트로겐 활성[10,11], 항산화[12-14] 항균[15], 항염증[16-18] 및 항돌연변이[12,13,19] 효과와 항암 효과[14,20] 등이 보고되어 있다. 하지만 각종 ROS가 발생되는 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서의 총 항산화능이나 세포 보호 효과에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 제조하고 자유 라디칼 소거활성 및 총 항산화능, 항균 효과, 사람 적혈구 세포에서 singlet oxygen ($^1O_2$)에 대한 세포막 보호효과, HaCaT 세포에서 자외선으로 유도된 ROS 소거 활성 및 H_2O_2로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과를 평가하였다. 또한 주요 활성 성분에 대한 분석을 진행함으로써 범부채 뿌리 추출물의 화장품 원료로서의 개발 가능성을 제시하였다.

2. 실 험

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 범부채 뿌리는 중국산으로 삼홍건재약업사에서 구매하였다.

2.2. 기기 및 시약

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성 실험에 사용한 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, Luminol 화학발광실험에 사용한 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였다. Microplate reader는 Tecan (Austria)사의 제품을 사용하였고, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack GIS ODS-Ⅰ C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였다. LC/ESI-MS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명과학 공동기기원에 분석 의뢰하였다.

DPPH radical, luminol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H_2O_2, heparin, rose-bangal, 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-di-phenytetrazolium bromide (MTT), 표준물질로 사용한 항산화제 (+)-α-tocopherol (1,000 IU vitamin E/g)과 L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품을 사용하였다. 그 외 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였고, 에탄올(EtOH) 및 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin (P/S) 및 trypsin 등은 Capricorn Scientific (Germany) 제품을 사용하였다. 성분 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F_{254} (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다.

2.3. 추출 및 분획

건조된 범부채 뿌리 400 g을 50% 에탄올 4 L에 3 day 동안 상온에서 침적시켜 추출한 후 여과하였으며, 여과액을 감압 농축하여 50% 에탄올 추출물을 얻었다. 남은 50% 에탄올 추출물은 감압 증류하여 수층만 남긴 후, 같은 부피만큼의 에틸아세테이트로 5회 반복하여 분획하였다. Na_2SO_4를 이용하여 잔존하는 미량의 물을 제거한 뒤 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다(Figure 1). 수율은 건조된 범부채 뿌리(400 g)를 기준으로 계산하였으며, 50% 에탄올 추출물은 22.36%, 에틸아세테이트 분획물은 2.20%로 나타났다.

2.4. 항산화 활성 측정

2.4.1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성

범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 소거 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력을 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 0.3 mL를 에탄올 0.3 mL와 측

Table 1. List of Strains and Cultivation Condition Used for Antimicrobial Experiment

Strains			Media	Temperature (℃)	Time (h)
Gram (+) bacteria		*S. aureus* ATCC 6538	TSA[1)], TSB[2)]	37	24
Gram (-) bacteria		*E. coli* ATCC 23736	TSA[1)], TSB[2)]	37	24
		P. aeruginosa ATCC 29336	TSA[1)], TSB[2)]	37	48
Fungi	Yeast	*C. albicans* ATCC 10231	TSA[1)], TSB[2)]	30	48
	Mold	*A. niger* ATCC 16404	PDA[3)], PDB[4)]	30	72

[1)]TSA : Tryptic soy agar (Difco, USA), [2)]TSB : Tryptic soy broth (Difco, USA), [3)]PDA : Potato dextrose agar (Difco, USA), [4)]PDB : Potato dextrose broth (Difco, USA).

정할 시료 0.3 mL를 넣은 시험관에 넣고 섞어준 뒤 10 min 동안 상온에서 방치한 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 넣지 않은 용매를 첨가한 것이며, 실험군(experiment)은 시료를 첨가한 것이다. 시료에 존재하는 항산화물질로부터 전자를 받아 DPPH가 환원될 경우 517 nm에서의 흡광도는 감소하게 된다. 공시험(sample blank)은 시료를 첨가하고 DPPH는 첨가하지 않은 것으로, 시료 자체의 흡광도를 나타낸다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH 소거 활성이 50%가 되는데 필요한 시료의 농도(FSC_{50}, μg/mL)로 표기하였으며, 각각의 흡광도(A)로부터 다음 식 (1)에 의해 구하였다.

$$\text{Free Radical Scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{A_{experiment} - A_{sample\ blank}}{A_{control}}\right) \times 100 \quad (1)$$

2.4.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서의 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서는 Fenton 반응과 그 후의 연쇄반응에 의해 각종 ROS가 생성되며, 생성된 ROS와 luminol의 반응으로 나타나는 화학발광을 측정함으로써 시료의 총 항산화능을 평가할 수 있다.

증류수 1.78 mL와 측정할 시료 50 μL를 넣은 시험관에 2.5 mM EDTA 40 μL, 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10μL 및 35 mM 루미놀 80 μL를 넣고 섞어준 뒤 화학발광기의 cell holder에 시험관을 넣고 5 min 동안 항온 반응시켰다. 이후 150 mM H_2O_2 40 μL를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신 용매를 넣었고, 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$와 H_2O_2 대신 증류수를 첨가하였다. 활성산소 소거 활성은 화학발광의 세기(counts per minute, CPM)가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50}, μg/mL)로 표기하였으며, 다음 식 (2)에 의해 구하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left(\frac{CPM_{control} - CPM_{experiment}}{CPM_{control} - CPM_{blank}}\right) \times 100 \quad (2)$$

2.5. 항균 활성 측정

2.5.1. 사용 균주, 배지 및 배양 조건

본 실험에 사용한 균주는 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (황색포도상구균), 호기성 그람 음성 균주인 *Escherichia coli* ATCC 23736 (대장균), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29336 (녹농균), 효모균인 *Candida albicans* ATCC 10231, 곰팡이균인 *Aspergillus niger* ATCC 16404로 총 5가지 균주를 한국 미생물 보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 해당 균주를 배양하는 데 필요한 배지 및 배양 조건은 다음과 같다(Table 1).

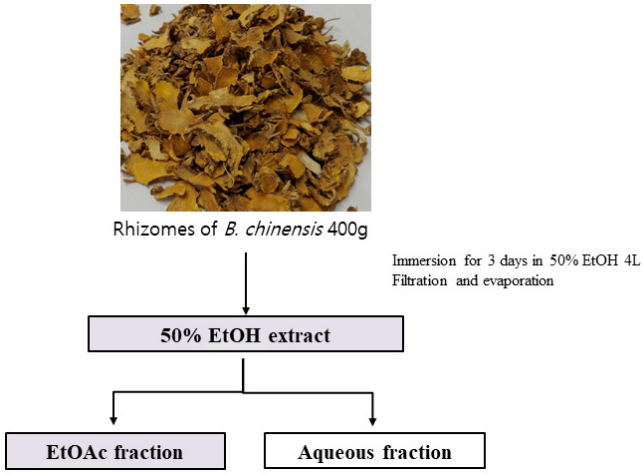

Figure 1. Preparation of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis*.

2.5.2. 디스크 확산법(Disc diffusion assay)

범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 항균활성을 측정하기 위해 disc diffusion assay를 수행하였다. 배양된 균주의 농도는 1~5 × 10^6 CFU/mL로 맞추어 본 실험에 사용하였으며, 각 균주는 멸균 면봉으로 100 μL씩 평판배지에 도말하였다. 측정할 시료를 paper disc (diameter 8 mm, Roshi Kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조 과정을 통해 용매를 휘발시켰다. 균주를 도말한 평판배지 위에 각 시료를 흡수시킨 paper disc를 밀착시킨 후 배양한 다음 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

2.5.3. 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 최소저해농도를 측정하기 위해 broth-dilution method를 사용하였다. 각 균주는 0.85% NaCl에 현탁시켜 10배 희석을 통해 균수를 세어 3~5 × 10^6 CFU/mL로 농도를 맞추었고, 시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 2배 희석법을 이용해 최종 농도가 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312, 156, 78 μg/mL가 되도록 하였다. 96-well plate의 한 well당 추출물 20 μL, 균주 20 μL, 배지 160 μL로 총 200 μL가 되도록 접종하였다. 30 ℃에서 24 h 배양한 후 육안으로 관찰하였을 때 균이 증식되지 않는 농도를 MIC 값으로 결정하였다. 대조군으로는 화장품 방부제인 메틸파라벤을 사용하였다.

Table 2. TLC Mobile Phase for Separation of EtOAc Fraction from Rhizomes of *B. chinensis* Extracts

Eluent system
Toluene : chloroform : methanol : formic acid = 1 : 7 : 1 : 1 (v/v)

Table 3. HPLC Condition for Separation of EtOAc Fraction from Rhizomes of *B. chinensis* Extracts

Condition of HPLC analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 μm)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254~400 nm			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	20 μL			
Mobile phase conditions for gradient elution	Program order	Time (min)	2% AA[1)] in water (%)	0.5% AA[1)] in 50% ACN[2)] (%)
	1	0	80	20
	2	10	80	20
	3	170	15	85
	4	180	80	20
	5	190	80	20

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

2.6. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

2.6.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었고, 채혈 직후 heparin이 첨가된 시험관에 넣어 4 ℃ 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 실험에 이용하였다. 혈액 2 mL를 취해 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 3회 세척하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, O.D.) 값이 0.6이었으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.6.2. 광용혈 억제 효과

파이렉스 시험관(No. 9820)에 적혈구 현탁액 3.5 mL와 측정할 시료를 농도별로 50 μL씩 첨가한 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시켰다. 이후 광증감제인 rose bengal (16 μM) 0.5 mL를 첨가하고 15 min 동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다. 광조사는 내부에 20 W 형광등이 설치된 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에서 15 min 동안 수행하였다. 광조사 후 암반응 시간에 따른 적혈구의 용혈 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로 측정하였다. 적혈구의 용혈이 진행될수록 해당 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도는 증가하게 된다. 실험은 20 ℃ 항온을 유지하며 진행하였고 광용혈 억제 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구가 50% 용혈되는데 걸리는 시간(τ_{50})을 구하여 비교하였다.

2.7. HaCaT 세포 보호 효과

2.7.1. 세포 배양

각질 형성 세포인 HaCaT 세포주는 CLS Cell Line Service GmbH (Eppelheim, Germany)에서 얻어 사용하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin (P/S)와 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37 ℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

2.7.2. 세포 독성 평가

HaCaT 세포 생존율에 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였고 이를 통해 실험에 사용할 시료의 농도 범위를 결정하였다. 먼저 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 70~80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. 이후 무혈청 배지에 각 시료를 희석하여 농도별로 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 이후 배양된 세포의 배지를 제거하고 0.5 mg/mL MTT 용액을 각 well당 100 μL씩 첨가하여 1 h 동안 formazan을 생성시켰다. 생성된 formazan을 DMSO로 녹이고 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7.3. 세포 내 ROS 소거 활성 평가

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCF-DA)를 사용하여 fluorescence를 측정함으로써 세포 내 ROS 소거 활성을 평가하였다. 먼저 HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 70~80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. 이후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 이용하여 1회 세척한 후 20 μM의 H_2DCF-DA를 처리하고 다시 30 min 동안 배양하였다. 세포를 2회 세척하고 DPBS 상태에서 CL-1000 ultraviolet crosslinker로 400 mJ/cm^2 UVB를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시킨 후 농도별로 희석한 시료를 처리하였다. 1 h 후 fluorescence microplate reader (excitation, 490 nm emission, 530 nm) 기기를 사용하여 형광의 세기를 측정하였다.

2.7.4. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과

HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 70~80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. 이후 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지에 농도별로 희석한 시료를 처리하여 2 h 동

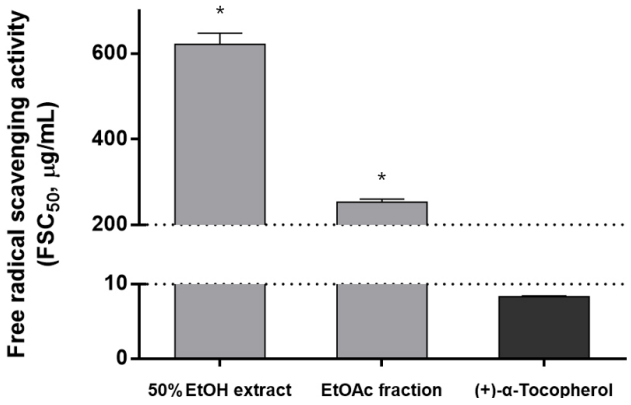

Figure 2. FSC50 of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* and (+)-α-tocopherol. Data are indicated as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with (+)-α-tocopherol.

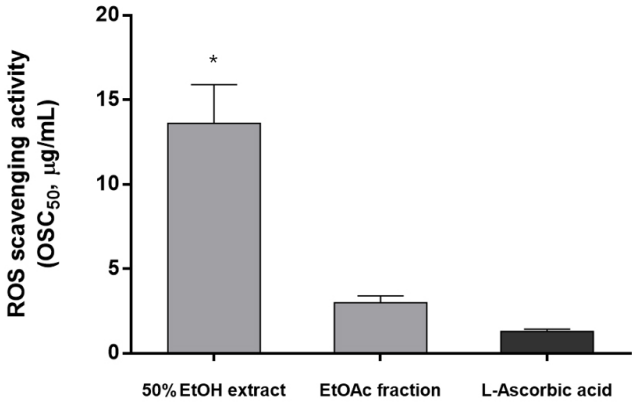

Figure 3. OSC_{50} of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* and L-Ascorbic acid in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are indicated as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with L-ascorbic acid.

안 배양하였다. DPBS로 1회 세척한 후, 2 mM의 과산화수소를 처리하고 다시 30 min 동안 배양하였다. 과산화수소를 모두 제거한 후, DPBS로 2회 세척하고 무혈청 배지 상태에서 24 h 배양하였다. 그 다음 MTT assay로 세포 생존율을 측정하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다.

2.8. 성분 분석

2.8.1. TLC 및 HPLC를 이용한 성분 분석

100% 에탄올에 녹인 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물을 syringe filter (Milipore 0.45 μm)를 이용하여 여과시키고 그 여과액으로 thin-layer chromatography (TLC) 및 high-performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 진행하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 2에 나타냈다. HPLC 분석은 2% acetic acid 용매(phase A)와 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 용매(phase B)를 이용하여 기울기 용리법으로 분석하였고 분리 조건은 Table 3에 나타냈다. 또한 TLC에 의해 분리된 각각의 띠를 긁어 100% 에탄올로 추출, 여과 및 감압 농축하여 파우더를 얻고 이를 다시 100% 에탄올에 녹여 HPLC 및 LC/ESI-MS 분석에 사용하였다.

2.8.2. LC/ESI-MS를 이용한 성분 분석

LC 기기는 autosampler와 PDA-UV detector가 장착된 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo Scientific, USA)(column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8 μm, 50 × 2.0 mm Cat.-No. N0520 E181UVC)를 사용하였으며, 질량분석(mass spectrometric analysis) 기기는 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface (Thermo Scientific, USA)를 사용하였다. Injection volume은 5 μL, flow rate는 200 μL/min이며, 전개용매 조건은 0.1% formic acid (in D.W) (A 용매) : 0.1% formic acid (in acetonitrile) (B 용매) = 75 : 25이었다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 측정하였고 자료 값은 mean ± S.D.로 표시하였다. 통계적 유의성 검정은 Graphpad Prism version 6.01 소프트웨어를 사용하였으며, one-way ANOVA 분석을 통해 p < 0.05 수준에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 활성

3.1.1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 짝을 짓지 않은 홀 전자를 갖고 있기 때문에 불안정하고 매우 큰 반응성을 갖는다. 이들은 생체 내에서 지질과산화 연쇄반응을 일으켜 세포 및 조직에 손상을 일으킨다. 라디칼은 다른 물질로부터 전자를 받아 환원됨으로써 연쇄적 산화반응이 종결될 수 있다[7]. 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol은 강력한 항산화제로 알려져 있으며, 라디칼에 전자주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 본 연구에서는 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 소거활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 측정하여 시료의 자유 라디칼 소거 활성(FSC_{50})을 측정하였다. 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 FSC_{50}은 각각 621.5 ± 25.5 μg/mL, 253.0 ± 7.0 μg/mL로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol의 FSC_{50}은 8.3 ± 0.1 μg/mL로 나타났다(Figure 2). 즉, 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 소거 활성은 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol 보다는 높지 않았지만 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 약 2.5배 높은 자유 라디칼 소거능을 나타냈다. 항산화 활성을 라디칼 소거 활성만으로 평가할 수 없기 때문에 폭넓은 측정을 위해 라디칼을 포함하여 다양한 활성산소 생성 시스템을 추가로 사용하였다.

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서의 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서는 Fe^{2+}와 H_2O_2에 의해 Fenton 반응이 일어나며, 이로 인해 여러 가지 ROS (·OH, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2)가 생성된다. 이 계에서 철 이온은 ROS를 생성시키는데 중요한 역할을 하는데, 생체 내에도 철(Fe)과 구리(Cu) 같은 전이금속 이온들이 존재하기 때문에 자외선을 받으면 H_2O_2와 Fenton 반응을 일으켜 ROS가 생성된다. 이러한 ROS는 루미놀을 산화시켜 들뜬 상태의 3-aminophthalic acid를 형성시키고 이것이 바닥상태로 떨어지면서 420-450 nm에서 발광하게 된다. 이 계에 항산화제를 첨가하여 ROS가 소거되면 화학발광이 감소하는데, 이를 이용하여 총 항산화능(ROS scavenging concentration, OSC_{50})을 평가하였다. 실험 결과, ROS가 50% 소거되는 농도인 OSC_{50}

Table 4. Antimicrobial Activity of 50% EtOH Extract and EtOAc Fraction from rhizomes of *B. chinensis* against Bacteria and Fungi

Strains		Size of clear zone (diameter, mm)		
		Methyl paraben	50% EtOH extract	EtOAc fraction
Gram (+) bacteria	*S. aureus*	17.5 ± 0.5	11.0 ± 0.0	14.5 ± 0.5
Gram (-) bacteria	*E. coli*	20.0 ± 0.0	-	-
	P. aeruginosa	12.0 ± 2.0	-	-
Fungi	*C. albicans*	25.5 ± 1.5	-	11.5 ± 0.5
	A. niger	23.0 ± 1.0	-	-

Zones of inhibition include diameter of disc (8 mm). Data are indicated as mean ± S.D., -: No inhibition.

Table 5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, μg/mL) of 50% EtOH Extract and EtOAc Fraction from Rhizomes of *B. chinensis* against Bacteria and Fungi

Strains		MIC (μg/mL)		
		Methyl paraben	50% EtOH extract	EtOAc fraction
Gram (+) bacteria	*S. aureus*	2,500	5,000	156
Gram (-) bacteria	*E. coli*	1,250	-	10,000
	P. aeruginosa	1,250	-	5,000
Fungi	*C. albicans*	1,250	10,000	1,250
	A. niger	625	-	-

-: No inhibition.

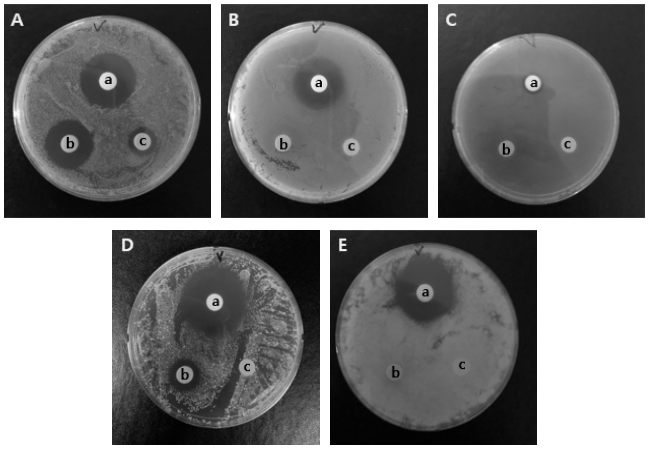

Figure 4. Antimicrobial activity of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* against bacteria and fungi. A: *S. aureus*, B: *E. coli*, C: *P. aeruginosa*, D: *C. albicans*, E: *A. niger*, a: methyl parben (control), b: EtOAc fraction, c: 50% EtOH extract.

은 50% 에탄올 추출물이 13.6 ± 2.3 μg/mL, 에틸아세테이트 분획물이 3.0 ± 0.4 μg/mL로 나타났다. 비교물질로는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며, OSC_{50}은 1.3 ± 0.1 μg/mL로 나타났다 (Figure 3). 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 총 항산화능은 50% 에탄올 추출물에 비해 약 4.5배 높게 나타났으며, 강력한 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid와 비교하여도 유사한 수준의 높은 항산화 효능을 나타냈다. 50% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획물에서 총 항산화능이 크게 나타난 것은 ROS 소거 활성뿐만 아니라 Fenton 반응을 유도하는 전이 금속을 킬레이팅하여 ROS 생성을 저해하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

3.2. 항균 활성

3.2.1. Disc Diffusion Assay

항균활성은 화장품의 방부력 평가에 대표적으로 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus* (황색포도상구균), 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli* (대장균), *P. aeruginosa* (녹농균), 효모균인 *C. albicans,* 곰팡이균인 *A. niger* 총 5종의 균주에 대하여 disc diffusion assay로 측정하였다. 실험 결과, 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물은 그람 양성균(*S. aureus*)에서만 저해환을 나타내었고 에틸아세테이트 분획물은 *S. aureus*와 *C. albicans*에서 저해환을 나타내었다. 특히 *S. aureus*에 대하여 대조군으로 사용된 methyl paraben과 유사한 수준의 저해환을 보여 그람 양성균에 대하여 높은 항균 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Figure 4, Table 4).

3.2.2. 최소저해농도(MIC) 측정

최소저해농도(MIC)는 broth-dilution method로 측정하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타냈다. 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물의 MIC 값은 *S. aureus, C. albicans*에 대하여 각각 5,000 μg/mL, 10,000 μg/mL로 나타났으며, *E. coli, P. aeruginosa, A. niger*에 대해서는 실험에 사용된 최고 농도인 10,000 μg/mL에서도 항균 활성이 나타나지 않았다. 에틸아세테이트 분획물은 *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, C. albicans*에 대하여 각각 156, 10,000, 5,000, 1,250 μg/mL에서 MIC 값을 나타냈으며, *A. niger*에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 종합하였을 때 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물은 그람 양성균인 *S. aureus*에 대하여 대조군으로 사용된 methyl paraben보다 더 뛰어난 항균 활성을 나타냈으며, 효모균인 *C. albicans*에 대해서도 methyl paraben과 유사한 수준의 항균활성을 보였다. 이는 disc diffusion assay 실험 결과와도 경향성이 일치한다. 또한 *E. coli*와 *P. aeruginosa* 균주에 대해서도 methyl paraben보다는 낮은 농도이지만 MIC

Table 6. Cellular Protective Effects of 50% EtOH Extract and EtOAc Fraction from Rhizomes of *B. chinensis* and (+)-α-Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

	τ_{50} (half time of hemolysis)*		
Concentration (μg/mL)	4	16	64
50% EtOH extract	35.3 ± 1.3	36.4 ± 2.7	47.6 ± 2.9
EtOAc fraction	40.4 ± 1.2	45.0 ± 1.1	25.3 ± 0.5
(+)-α-Tocopherol	40.2 ± 2.1	45.8 ± 1.8	68.3 ± 2.6

Data are indicated as mean ± S.D., *Control, τ_{50} = 33.7 ± 2.5 min.

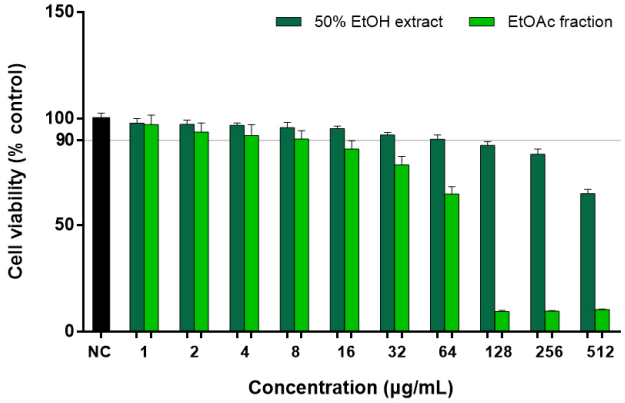

Figure 5. Effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as mean ± S.D.

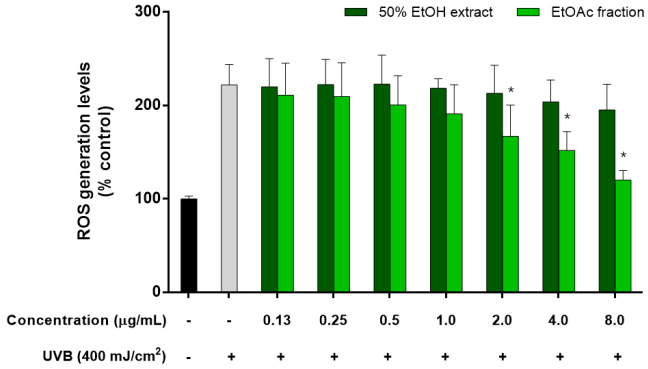

Figure 6. Effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* on UVB-induced oxidative stress in HaCaT cell. 50% EtOH extracts and EtOAc fraction scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The H_2DCF-DA probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with UVB treated control in EtOAc fraction groups by one-way ANOVA.

값을 나타냈기 때문에 다른 천연물과의 시너지 효과를 통해 방부력을 높이거나 합성 방부제의 함량을 낮춤으로써 화장품의 항균 소재로 응용 가능성이 있을 것이라 사료된다.

3.3. $^1O_2$로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과

피부 세포막은 지질 2중층 구조를 이루고 있으며, 2개의 인지질 꼬리 부분이 서로 cis 형태를 이루고 있다. 따라서 유동성이 크며, 자외선에 의해 쉽게 손상을 받는다. 피부가 자외선을 받으면 피부에 존재하는 porphyrin, riboflavin와 같은 광증감제에 의해 다양한 ROS가 생성된다. 광증감반응의 주생성물인 singlet oxygen ($^1O_2$)은 반응성이 매우 크며, $^1O_2$을 포함한 ROS는 피부 항산화 시스템을 붕괴시키고 세포막 구성 성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 반응을 개시한다. 이러한 자동산화반응에 의해 세포막이 손상되고 세포는 파괴된다. 본 연구에서는 광증감제로 알려진 rose-bengal 및 피부 세포막 지질 2중층 구조와 유사한 적혈구 세포를 이용하여 $^1O_2$으로 유도된 산화적 세포 손상 시스템을 구축하였고 활성산소로 인해 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50}, min)을 측정하여 세포 보호 효과를 평가하였다[7,21].

시료를 넣지 않은 대조군(control)의 경우, τ_{50}은 33.7 min으로 나타났다. 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물의 τ_{50}은 4, 16, 64 μg/mL 농도에서 각각 35.3, 36.4, 47.6 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 활성이 증가하는 경향을 보였다. 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 각각 40.4, 45.0, 25.3 min으로 16 μg/mL 농도에서 세포 보호 활성이 가장 높게 나타났으며, 최고 농도인 64 μg/mL에서는 시료의 독성에 의해 세포 보호 효과가 현저히 감소하였다. 또한 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물은 비교 물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol과 비교하였을 때 64 μg/mL를 제외한 농도에서 유사한 세포 보호 효과를 나타냈다(Table 6).

3.4. HaCaT 세포 보호 효과

3.4.1. 세포 독성 평가

MTT assay를 통해 범부채 뿌리 추출물의 HaCaT 세포에 대한 독성 평가를 진행하였고 이를 통해 실험에 사용할 샘플의 농도 범위를 결정하였다. HaCaT 세포에 1~512 μg/mL 농도의 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 24 h 처리한 후 세포생존율을 확인하였다. 실험 결과, 샘플을 처리하지 않은 음성대조군(negative control, NC)과 비교하였을 때 50% 에탄올 추출물은 64 μg/mL, 에틸아세테이트 분획물은 8 μg/mL의 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 보였다(Figure 5). 본 실험에서는 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 세포 보호 효과를 평가하기 위한 샘플의 최고 농도를 8 μg/mL로 설정하였다.

3.4.2. 세포 내 ROS 억제 효능

표피는 피부의 최외각 층으로 자외선 조사 시 ROS가 생성되어 세포의 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질이 손상되고 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포 외 기질을 분해하는 MMP의 발현이 촉진되어 피부 노화가 가속화된다[22]. 따라서 세포 내 ROS 억제를 통해 피부 노화를 억

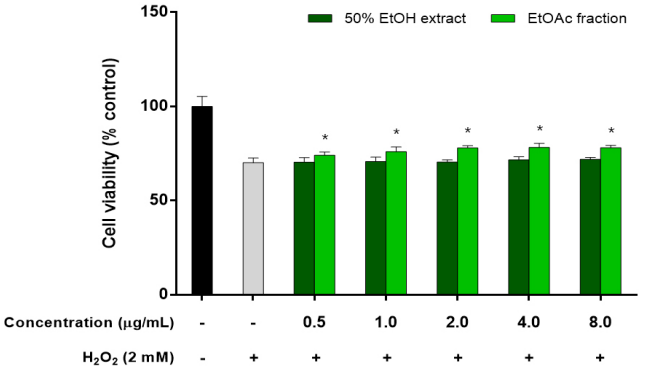

Figure 7. Cell protective effects of 50% ethanol extract and EtOAc fraction from rhizome of *B. chinensis* on H_2O_2-induced damaged HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of samples for 2 h before being exposed to oxidative stress. Data are presented as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with H_2O_2 treated control in EtOAc fraction groups by one-way ANOVA.

제할 수 있다. 본 연구에서는 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 세포 내 ROS 억제 활성을 각질형성세포인 HaCaT에 대해 H_2DCF-DA를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군(100%)에 비해 ROS가 222%로 증가하였고 범부채 뿌리 추출물 및 분획물을 0.13~8.0 μg/mL 농도로 1 h 동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 ROS 감소를 나타냈다. 50% 에탄올 추출물은 UVB 처리 군과 비교하였을 때 유의적 감소가 나타나지 않았으나 에틸아세테이트 분획물의 경우 2 μg/mL 이상에서 유의적 감소를 나타냈으며, 각각 24.7, 31.6 및 45.9%의 감소율을 나타냈다(Figure 6). 이상의 결과로 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 세포 내 ROS 억제 효능이 뛰어남을 확인하였다.

3.4.3. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과

과산화수소로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 분획물의 세포 보호 효과를 Figure 7에 나타냈다. 실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군(100%)에 비해 약 70%의 세포 생존율을 나타냈다. 0.5~8.0 μg/mL 농도로 50% 에탄올 추출물을 처리한 군은 세포 생존율을 유의적으로 증가시키지 못하였으나 같은 농도로 에틸아세테이트 분획물을 처리한 군은 모든 농도에서 세포 생존율의 유의적 증가를 나타냈으며, 최대 78.3%까지 증가시켰다(각각 74.1 ± 1.8, 76.0 ± 2.5, 78.0 ± 1.2, 78.3 ± 2.2, 78.1 ± 1.3%). 이상의 결과로 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물 보다 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대해 통계적으로 유의하게 보호 효과가 있음을 확인하였다.

3.5. 성분 분석

항산화, 항균 활성 및 세포 보호 효과 실험에서 효과가 좋았던 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 성분을 확인하기 위해 TLC, HPLC 및 LC/ESI-MS를 이용하였다. Figure 8은 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 순상 TLC로 크게 6개의 띠로 분리되었고 이를 긁어 추출, 농축한 각각의 성분들을 HPLC로 비교하였다. 그 결과, Figure 8의 TLC (normal phase)에서 BCE1은 Figure 9의 HPLC (reverse phase) peak 6, BCE2는 peak 5, BCE3은 peak 4, BCE4는 peak 3, BCE5는 peak 2, BCE6은 peak 1과 일치함을 확인하였다. 또한 추출한 띠를 이용하여 LC/ESI-MS를 측정하였고 UV 스펙트럼 및 HPLC 결과와 참고문헌을 통해 각 성분들을 최종적으로 확인하였다. Peak 1은 tectoridin, peak 2는 iridin, peak 3은 resveratrol, peak 4는 tectorigenin, peak 5는 irigenin, peak 6은 irisflorentin으로 추정되었다(Table 7).

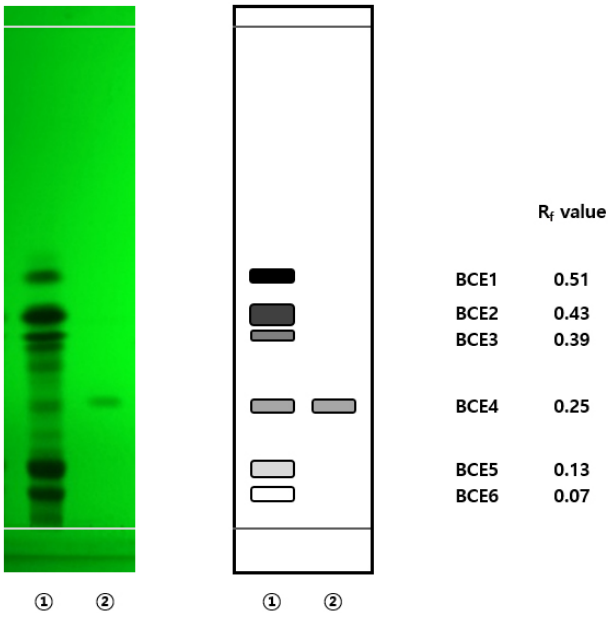

Figure 8. TLC chromatogram of EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* extract and reference. Eluent system; toluene : chloroform : methanol : formic acid = 1 : 7 : 1 : 1 (v/v), ① ethyl acetate fraction, ② resveratrol.

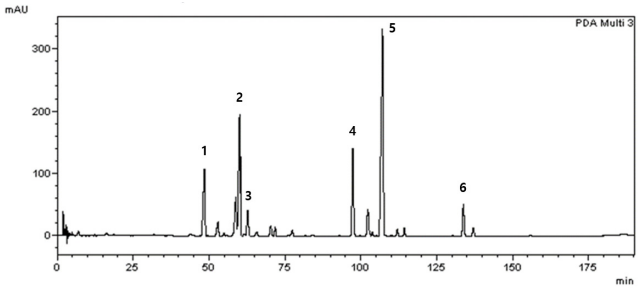

Figure 9. HPLC chromatogram of the EtOAc fraction from rhizomes of *B. chinensis* extract at λ = 254~400 nm. 1: tectoridin, 2: iridin, 3: resveratrol, 4: tectorigenin, 5: irigenin, 6: irisflorentin.

4. 결 론

본 연구에서는 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 제조하고 이들의 항산화 및 항균 활성, 세포 보호 효능을 평가하였다. DPPH를 이용한 자유라디칼 소거 활성(FSC_{50}) 측정 결과, 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물(253.0 μg/mL)이 50% 에탄올 추출물(621.5 μg/mL)보다 약 2.5배 높은 활성을 나타냈다. Luminol 발광법을 이용한 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC_{50}) 측정 결과, 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물(3.0 μg/mL)이 50% 에탄올 추출물(13.6 μg/mL)보다 약 4.5배 높은 활성을 나타냈으며, 강력한 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid (1.3 μg/mL)와 비교하여도 유사한

Table 7. TLC, HPLC, and LC-MS Data of EtOAc Fraction from Rhizomes of B. chinensis Extract

TLC band	HPLC peak No.	Identified compound	Molar mass (g/mol)	Measurement			Reference
				Ret. time (min)	λ_{max} (nm)	$[M+H]^+$ (m/z)	
BCE1	6	Irisflorentin	386.3	133.8	268.4, 321.5	387.1	[23]
BCE2	5	Irigenin	360.3	107.1	271.5	361.0	[23,24]
BCE3	4	Tectorigenin	300.2	97.4	267.8	301.3	[23,24]
BCE4	3	Resveratrol	228.2	62.8	308.0, 216.0	229.3	[23]
BCE5	2	Iridin	522.4	60.1	268.7	523.1	[23,24]
BCE6	1	tectoridin	462.4	48.5	263.6, 331.6	463.1	[23,24]

수준의 높은 항산화 효능을 나타냈다. Disc diffusion method를 이용한 항균 활성 측정 결과, 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물은 그람 양성균인 *S. aureus*에서 저해환을 나타냈다. 에틸아세테이트 분획물은 *S. aureus*와 효모균인 *C. albicans*에서 저해환을 나타냈으며, 특히 *S. aureus* (14.5 mm)에 대하여 대조군으로 사용된 methyl paraben (17.5 mm)과 유사한 수준의 저해환을 보여 50% 에탄올 추출물에 비해 높은 항균 활성을 나타냈다. MIC 측정 결과는 두 추출물 모두 *S. aureus, C. albicans*에 대하여 항균 활성을 나타냈으며, 에틸아세테이트 분획물은 그람 음성균인 *E. coli, P. aeruginosa*에 대해서도 항균 활성을 나타냈다. 특히 에틸아세테이트 분획물은 *S. aureus* (156 μg/mL)에 대하여 methyl paraben (2,500 μg/mL)보다 높은 항균 활성을 나타냈으며, *C. albicans* (1,250 μg/mL)에 대해서도 methyl paraben (1,250 μg/mL)과 유사한 수준의 활성을 나타냈다. $^1O_2$으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과(τ_{50}) 측정 결과, 범부채 뿌리 50% 에탄올 추출물은 4~64 μg/mL에서 농도 의존적으로 용혈을 억제하였다. 에틸아세테이트 분획물은 16 μg/mL까지 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타냈으나 고농도에서는 세포 보호 효과가 감소하였으며, 비교 물질인 (+)-α-tocopherol과 비교하였을 때 4, 16 μg/mL에서 유사한 수준의 세포 보호 효과를 나타냈다. 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가를 토대로 본 실험에서는 8 μg/mL을 최고 농도로 하여 세포 보호 효과를 진행하였다. UVB를 조사한 HaCaT 세포 내 ROS 억제 효능 평가에서 50% 에탄올 추출물은 유의적 감소가 나타나지 않았으나 에틸아세테이트 분획물은 2 μg/mL 이상의 농도에서 유의적 감소를 나타냈으며, 8 μg/mL (45.9%)에서 가장 높은 억제 효율을 보였다. 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 보호 효과를 확인한 실험에서도 에틸아세테이트 분획물이 모든 농도(0.5~8.0 μg/mL)에서 세포 보호 효과를 나타냈다. 이를 통해 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 항산화, 항균 및 세포 보호 효과가 뛰어남을 확인하였고 TLC와 HPLC, LC/ESI-MS를 이용한 범부채 뿌리 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석을 통해 irisflorentin, irigenin, tectorigenin, resveratrol, iridin, tectoridin이 존재함을 확인하였다. 이러한 플라보노이드 및 폴리페놀 성분들이 항산화 활성 및 세포 보호 효과에 크게 기여한 것으로 사료되며, 개별 성분들의 효능에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

본 연구에서는 범부채 뿌리 추출물 및 분획물의 다양한 ROS에 대한 항산화능과 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균에 대한 항균 활성을 확인하였고 세포 수준에서 자외선 및 ROS에 대한 보호 효과를 확인하였다. 이상의 결과를 통해 범부채 뿌리가 화장품의 천연 항산화 및 항균 소재로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

References

1. M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**(2), 87-95 (2008).
2. M. A. Farage and K. W. Miller, Structural characteristics of the aging skin: a review, *Cutan. Ocul. Toxicol.*, **26**(4), 343-357 (2007).
3. Th. Herrling, K. Jung, and J. Fuchs, Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin, *Spectrochim. Acta. A*, **63**(4), 840-845 (2006).
4. H. U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415-418 (2000).
5. K. J. Trouba, H. K. Hamadeh, R. P. Amin, and D. R. Germoled, Oxidative stress and its role in skin disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **4**(4), 665-673 (2002).
6. K. Apel and H. Hirt, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373-399 (2004).
7. S. H. Park, J. M. Kim, J. H. Kim, Y. S. Oh, D. H. Joo, E. Y. Lee, H. S. Shin, A. R. Kim, S. L. Lee, and S. N. Park, Antioxidative effects and component analysis of Graviola (*Annona muricata*) leaf extract/fractions. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(4), 309-320 (2017).
8. S. J. Oh and J. H. Mo, A comparative study on bioactivity of dried and fermented *Salicornia herbacea* extracts as cosmetics materials, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **9**(4), 1-8 (2011).
9. Y. Zhang, G. Yao, X. Huang, and X. Wang, Advances in research on the main chemical constituents and pharmacological effects of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Asian J. Tradit. Med.*, **12**(5), 201-209 (2017).
10. L. Zhang, K. Wei, J. Xu, D. Yang, C. Zhang, Z. Wang, and M. Li, *Belamcanda chinensis* (L.) DC-An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review, *J. Ethnopharmacol.*, **186**, 1-13 (2016).
11. R. H. Xin, J. F. Zheng, L. Cheng, W. J. Peng, and Y. J. Luo, *Belamcanda chinensis* (L.) DC: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **12**(6), 39-70 (2015).
12. D. Wozniak, B. Janda, I. Kapusta, W. Oleszek, and A. Matkowski, Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L.) DC., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **696**(2), 148-153 (2010).

13. D. Wozniak, J. Oszmianski, and A. Matkowski, Antimutagenic and antioxidant activity of the extract from *Belamcanda chinensis* (L.) DC., *Acta Pol. Pharm.*, **63**(3), 213-218 (2006).
14. M. Liu, S. Yang, L. Jin, D. Hu, W. Xue, and S. Yang, *In vitro* antitumor and antioxidant activities of *Belamcanda chinensis* (L.) DC., *J. Med. Plant Res.*, **6**(43), 5566-5569 (2012).
15. K. B. Oh, H. J. Kang, and H. Matsuoka, Detection of antifungal activity in *Belamcanda chinensis* by a single-cell bioassay method and isolation of its active compound, tectorigenin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(4), 939-942 (2001).
16. J. W. Lee, C. Lee, Q. Jin, M. S. Lee, Y. S. Kim, J. T. Hong, M. K. Lee, and B. Y. Hwang, Chemical constituents from *Belamcanda chinensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells, *Arch. Pharm. Res.*, **38**(6), 991-997 (2015).
17. K. S. Ahn, E. J. Noh, K. H. Cha, Y. S. Kim, S. S. Lim, K. H. Shin, and S. H. Jung, Inhibitory effects of irigenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E2 production in murine macrophage RAW 264.7 cells, *Life Sci.*, **78**(20), 2336-2342 (2006).
18. G. H. Wang, G. X. Zou, X. M. You, Y. Zhang, H. Jiang, F. Li, and G. X. Li, Tectorigenin and irigenin inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in murine macrophages. *Biomed. Res.*, **28**(12), 5412-5417 (2017).
19. M. Miyazawa, K. Sakano, S. I. Nakamura, H. Shimamura, and H. Kosaka, Antimutagenic activity of isoflavone from *Belamcanda chinensis, J. Oleo Sci.*, **50**(7), 545-554 (2001).
20. M. Liu, S. Yang, L. Jin, D. Hu, Z. Wu, and S. Yang, Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities, *Molecules*, **17**(5), 6156-6169 (2012).
21. A. R. Kim, M. C. Jung, H. I. Jeong, D. G. Song, Y. B. Seo, Y. H. Jeon, S. H. Park, H. S. Shin, S. L. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of *Lysimachia christinae* Hance extract and fractions, *Appl. Chem. Eng.*, **29**(2), 176-184 (2018).
22. Y. S. Lee, M. E. Yun, Y. J. Lee, Y. M. Park, S. L. Lee, and S. N. Park, Antioxidant activities and cytoprotective effects of *Lonicera japonica* Thunb. extract and fraction against oxidative stress, *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **46**(1), 18-28 (2018).
23. J. Li, Winnie Z. M. Li, W. Huang, Anna W. H. Cheung, Cathy W. C. Bi, R. Duan, Ava J. Y. Guo, Tina T. X. Dong, and Karl W. K. Tsim, Quality evaluation of rhizoma belamcandae (*Belamcanda chinensis* (L.) DC) by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1216**(11), 2071-2078 (2009).
24. G. Y. Xie, Y. Zhu, P. Shu, X. Y. Qin, G. Wu, Q. Wang, and M. J. Qin, Phenolic metabolite profiles and antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional Chinese medicine "She-gan" by on-line HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **98**, 40-51 (2014).