

비타민나무 열매로부터 분리한 Quercetin 3-glucoside-7-rhamnoside의 항산화 및 주름개선 효과

이희경

원광대학교 한의학전문대학원

Antioxidant and Anti-wrinkle Effects of Quercetin 3-Glucoside-7-Rhamnoside Isolated from *Hippophae rhamnoides* Fruits

Hee-Kyung Lee

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract Although many studies have been performed to search materials that regulate skin aging, little is known about the effect of quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside (Q3G7R) from *Hippophae rhamnoides* (*H. rhamnoides*) L. fruits. In this study, we identified Q3G7R from *H. rhamnoides* L. fruits, and then measured the antioxidant activity of Q3G7R by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) method and its cytotoxicity in human dermal fibroblasts using sulforhodamine B (SRB) assay. Also, we investigated effect of Q3G7R on procollagen synthesis and TNF- α induced Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in human dermal fibroblasts. As the results, Q3G7R didn't exhibit cytotoxicity at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showing cell viability over 100 % and antioxidant activity with 56.4% at concentration of 1 mg/mL . Procollagen synthesis in human dermal fibroblasts increased about 2 times higher than control by treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Q3G7R. TNF- α induced MMP-1 expression was reduced to 85.58 ng/mL by treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Q3G7R. Therefore, these results suggest that Q3G7R can be effective antioxidant and antiwrinkle ingredient for cosmetics applications.

Keywords: Q3G7R, *Hippophae rhamnoides*, Antioxidant, Procollagen, Anti-wrinkle

I. 서론

피부노화를 일으키는 원인은 다양하며 특히 자외선은 피부에 존재하는 자외선 흡수 물질에 의해 흡수되어 이로 인해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 경유한 이차적 반응들에 의해 피부노화를 유발한다고 알려져 있다(Afaq and Mukhtar, 2006; Bowden, 2004). 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 주요 성분으로 콜라겐의 생합성과 분해는 피부노화의 주요 과정으로 인체내에서 생성된 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시킨다고 보고되

어 졌다(Scharffetter-Kochanek, 1993; Vile and Tyrrell, 1995; Wlaschek *et al.*, 1995). 콜라겐의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포증식과 분화에 관여함이 알려져 있다(Jerome *et al.*, 1998). 진피 내 콜라겐의 감소는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있음이 잘 알려져 있다(El-Domyati *et al.*, 2002; Wlaschek *et al.*, 2001). 그러므로 피부노화와 주름의 개선에 있어 reactive oxygen species (ROS)와 같은 활성산소를 제거하는 항산화 물질이나 콜라게네이즈의 작용을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진 시키는 소재의 발굴이 중요하다고 할 수 있다.

많은 식물체들은 다양한 형태의 플라보노이드 화합물을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Jeong, 2005; Lee *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2006). 이러한 플라보노이드 화합물은 배당체의 형태로써 전체 flavonoid의 50-80%를 차지하며, 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하 작용, 면역증강 작용, 모세혈관 강화 작용 등이 보고된 바 있다(Cha *et al.*, 1999; Kawaguchi *et al.*,

Corresponding author: Hee-Kyung Lee, Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea
Tel: +82-63-850-5193, Fax: +82-63-850-5195
E-mail: icanhk@naver.com

Received July 26, 2012; Revised August 9, 2012;
Accepted August 13, 2012; Published August 30, 2012

1997).

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.)는 중국, 몽골 등이 원산지인 보리수과(Elaeagnaceae)에 속하는 낙엽성 관목으로 비타민 나무의 잎과 열매에는 비타민과 아미노산 등이 포함 되어 있으며, 면역강화, 항염작용 등의 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다(Kim *et al.*, 2011). 비타민나무 열매에는 폴리페놀류, 토코페롤, 카로티노이드, 플라보노이드 등이 함유되어 있는 것으로 알려졌다(Chauhan *et al.*, 2007; Padwad *et al.*, 2006). 전의 연구에 의하면 비타민나무의 잎과 열매의 알코올 추출물은 상처부위의 콜라겐 합성과 안정화를 증가시킴으로써 피부 상처 치료 효과가 있는 것으로 보고되어졌다(Kim *et al.*, 2010).

따라서 본 연구에서는 비타민 나무 열매로부터 플라보노이드인 quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside (Q3G7R)을 분리하였고 Q3G7R의 세포독성, 항산화력을 측정하였으며, 콜라겐 생합성과 Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해 활성을 통해 주름개선효과를 분석하였다.

II. 연구방법

1. 기기

UV spectrum 은 Hewlett Packard model 8453 spectrophotometer을 사용하였다. ¹H-NMR (300 MHz), ¹³C-NMR (75 MHz) spectra는 용매로써 dimethyl sulfoxide (DMSO)-d₆을 사용하면서 Varian Unity 300 spectrometer에 의해 얻어졌다. electron spray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)는 Finnigan™ navigator spectrometer에서 측정되었으며, semi-preparative HPLC는 Shimaduz Model LC-6AD pump, SPD-10A detector와 C-R8A recorder를 장착한 것을 사용하였다.

2. 비타민나무 열매 추출물 제조

실험에 사용된 비타민나무 열매 분말은 금산의 한약재상에서 2010년 3월에 구입하여 사용하였으며, 본 연구실에 보관하면서 사용하였다. 비타민나무 열매 분말 500 g에 100% 에탄올 2 L를 가해 실온에서 3일 동안 정치한 후 여과지(Whatmann No. 2)를 이용하여 여과하였다. 그 여액을 감압농축하여 농축액 52 g을 얻어 -20°C에 보관하였다.

3. Quercetin 3-glucoside-7-rhamnoside의 분리

-20°C에 보관 중이던 에탄올 추출 농축액 52 g을 역상 컬럼 크로마토그래피(YMC-Gel RP-18, 70-230 mesh, 20 g)를 장착한 액체 크로마토그래피(HPLC)에서 메탄올과 물의 농

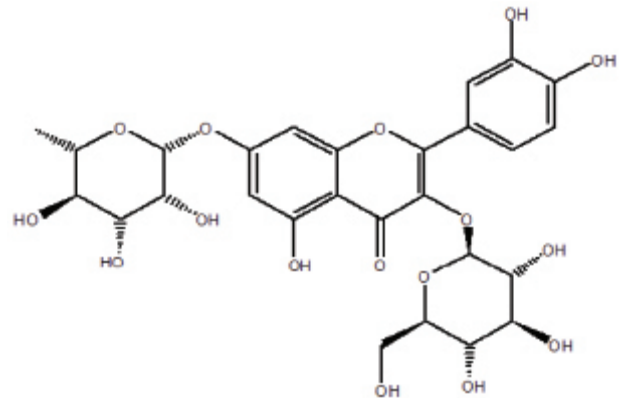


Figure 1. Structure of Q3G7R.

도구배(MeOH/H₂O; 50:50, 60:40, 70:30, 0:20, 90:10, 100:0; each 1 L)를 이용하여 30개의 분획을 얻었고, 이 중에서 메탄올과 물 50:50인 분획 농축분말 15 mg을 메탄올과 물 45:55의 비율의 용매를 사용하면서 프랩용 액체 크로마토그래피(semi-preparative HPLC; YMC J'sphere ODS H-80, 4 μm, φ 20 × 150 mm; UV 210 nm; flowrate 7 mL/min)에서 순수한 화합물 9 mg을 얻었다. 이것은 ESI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR spectral data를 통해 구조 동정하여 quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside (Q3G7R)을 얻었다 (Figure 1; Akhov *et al.*, 2003).

4. 세포 배양

세포는 Human dermal fibroblast를 Cambrex (UK)로부터 구입하여 사용하였다. 구입한 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 2-3 세대를 계대배양한 후 본 실험에 사용하였다.

5. 세포 독성 평가

Q3G7R의 세포독성을 측정하기 위하여 96 well plate에 cell을 well당 2 × 10⁴개 되게 100 μL씩 접종하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 0.1, 1, 10, 100 μg/mL 농도를 Q3G7R을 100 μL씩 첨가하고 24시간 배양한 후 생존세포를 이미 보고된 sulforhodamine B (SRB) 염색 방법으로 측정하였다(Lin *et al.*, 1999).

6. 항산화 효과

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 통한 항산화 활성은 Blois 방법에 따라 측정하였다(Blois, 1958). Q3G7R 0.2 mL

에 0.4 mM DPPH 3.8 mL을 가하고 10초간 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응하고 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군은 시료대신 에탄올을 동량 첨가하여 실험하였고, 양성대조군으로는 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)와 플라보노이드인 quercetin을 이용하여 동일한 방법으로 실시하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 다음과 같이 백분율로 표시하였다.

7. 콜라겐 생합성 정도

세포를 2×10^6 cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후, 각 well에 Q3G7R을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 세포 배양액내 콜라겐 생합성 정도는 procollagen type-1C peptide (PIP) EIA kit (Takara)을 사용하여 이미 보고된 방법에 의해 프로펩타이드의 양을 측정하였다(Parfitt *et al.*, 1987).

8. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해 활성

세포를 2×10^5 cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후, 각 well에 Q3G7R을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF- α 를 10 ng/mL의 농도로 첨가하였다. 이렇게 처리된 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였다. Gross 등 (1962)의 방법에 따라 Matrix Metalloproteinase-1 Biotrack activity Assay Kit (Amersham Bioscience)을 이용하여 plate reader (VERSAmix microplate reader; Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA)로 흡광도를 측정하고 표준곡선을 통해 계산식을 구하여 세포 배양액 내 MMP-1 활성을 수치화 하였다(Gross and Lapierre, 1962).

III. 연구결과 및 고찰

1. 항산화 효과

Q3G7R의 항산화 효과를 DPPH 방법에 의해 측정한 결과는 Figure 2와 같다. 대조군으로 상용 항산화제인 BHA와 플라보노이드로서 quercetin 정제물의 항산화력을 비교하였다. 항산화력은 BHA의 경우 85.9%, quercetin의 경우 86.7%로 나타났으며, Q3G7R의 경우 56.4%의 항산화력을 나타내었다. 많은 플라보노이드의 항산화력은 많은 연구에서 보고되었고, 특히 quercetin의 기본구조에 당이 붙어 있는 경우 항산화력은 quercetin 기본구조보다 더 약하다는 연구가 보고되어졌다(Amić *et al.*, 2007; Heim *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2011). 따라서 본 연구의 결과 Q3G7R은 quercetin의 기본구조에 3번에 glucose와 7번에 rhamnoside가 붙어 있는 형태로 quercetin

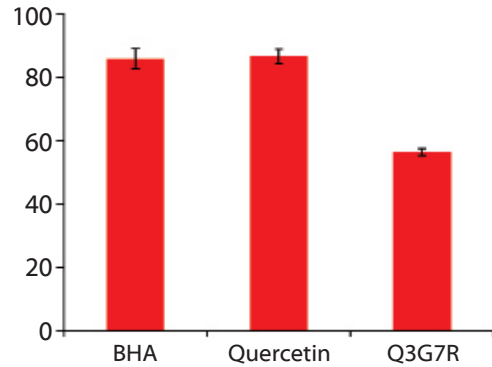


Figure 2. Antioxidant activity of Q3G7R. BHA and quercetin tested at a concentration of 1 mg/mL. The data are displayed with mean \pm standard deviation (n=3).

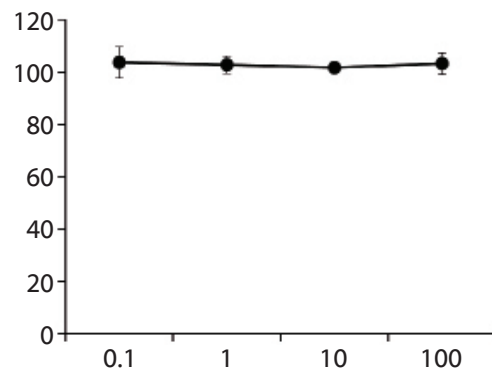


Figure 3. Cell viability of human dermal fibroblast treated with Q3G7R. Q3G7R treated with concentration of 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The data are displayed with mean \pm standard deviation (n=3).

에 비해 항산화력이 더 약하게 나타나는 것으로 보인다.

2. 세포독성

각각의 실험물질을 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 세포에 처리하여 배양했을 때 세포증식정도를 조사한 결과는 Figure 3과 같다. 각각 처리된 농도에서 세포의 생존율은 100% 이상을 나타내어 독성이 없음을 확인하였다. 전의 연구에서 quercetin 기본구조에 당이 붙은 형태의 flavonoids들은 그 독성이 없음을 보고하였다(Choi *et al.*, 2009a, 2009b, 2011). 본 연구에서 사용한 Q3G7R도 quercetin 기본구조에 당이 붙은 형태로 위의 연구결과가 비슷하게 나타났다.

3. 콜라겐 생합성

Human dermal fibroblast에 Q3G7R을 처리하여 배양한 후 콜라겐 생합성량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 콜라겐 생합성량은 대조군의 경우 78.69 ng/mL이었으며, Q3G7R의 경우 146.95 ng/mL으로 Q3G7R의 처리가 콜라겐 생합성을 많

Table 1. Procollagen synthesis of human dermal fibroblast treated with Q3G7R

Collagen (ng/mL)	
Control	78.69 ± 0.76
Q3G7R	146.95 ± 5.02

The data are displayed with mean ± standard deviation (n=3)

Table 2. MMP-1 activity in human dermal fibroblast incubated with Q3G7R

MMP-1 activity (ng/mL)	
Control-	81.39 ± 1.07
Control+	93.95 ± 1.59
Q3G7R	85.58 ± 0.68

The data are displayed with mean ± standard deviation (n=3).

이 증가시키는 것으로 나타났다. 전의 연구에서 사상자로부터 분리한 torilin의 경우 콜라겐 생합성이 대조군에 비해 약 2배 정도로 많이 증가함을 보고하였다(Koo *et al.*, 2007). 따라서 본 연구결과에서도 Q3G7R을 처리시 콜라겐 생합성량이 대조군에 비해 약 2배 이상 증가함을 나타내어 비슷한 연구결과를 보여준다.

4. MMP-1 활성

각각의 시험물질로 배양한 세포의 배양액을 수거하여 MMP-1 농도를 측정 한 결과는 Table 2와 같다. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)를 처리하지 않은 군과 처리한 군은 각각 81.39 ng/mL, 93.95 ng/mL의 MMP-1을 생산하여, TNF- α 에 의해 활성화된 MMP-1의 양이 증가하였음을 확인하였다. Q3G7R의 처리시 MMP-1의 양은 85.58 ng/mL로 TNF- α 의 처리에 의한 MMP-1의 양이 감소함을 나타내었다. 전의 연구에서 천연물로부터 분리한 화합물들이 MMP-1의 활성을 저해함을 보고하였다(Chen *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). 본 연구에서 비타민나무 열매로부터 분리한 Q3G7R 역시 MMP-1의 활성을 저해하는 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

IV. 결론

본 연구에서는 비타민나무 열매로부터 플라보노이드인 Q3G7R를 분리하여, 이 화합물의 항산화력, 세포독성, 콜라겐 생합성, MMP-1 활성을 관찰한 결과 Q3G7R은 세포독성을 나타내지 않으면서 항산화력을 나타내었고, 콜라겐 생합성을 증가시키며, MMP-1의 활성을 저해하여 세포독성 없이 항산화

력을 가지면서 주름개선 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

기존의 레티놀산, 비타민 C 등을 함유한 주름개선 기능성 화장품들이 많이 사용되고 있으나 새로운 기능성 주름개선제에 대한 소비자들의 욕구는 더 커지고 있다. 따라서 본 연구를 통해 Q3G7R은 항산화력을 가지면서 주름개선 효과가 있음을 알 수 있었으며, 향후 주름개선제 개발에 Q3G7R을 응용 가능하리라 생각된다.

참고문헌

- Adhami VM, Syed DM, Khan N and Afaq F. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation induced damages. *Photochem, Photobiol.*, 84: 489-500, 2008.
- Afaq F and Mukhtar H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.*, 15: 678-684, 2006.
- Akhov L and Barl B. Isolation of quercetin glycosides from leaves of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*). In: P. Hicklenton, J. Mass (ed.), Proc. XXVI IHC - Berry Corp Breeding, Acta Hort, ISHS, pp389-395, 2003.
- Amić D, Davidović-Amić D, Beslo D, Rastija V, Lucić B and Trinajstić N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.*, 14: 827-845, 2007.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200, 1958.
- Bon SK, Eui IH, Seung HS, Seong KL, Gyeong HH and Na MK. Effect of Torilis Fructus on Procollagen Biosynthesis and Activity of Matrix Metalloproteinase-I (MMP-1) in Human Dermal Fibroblast. *Kor. J. Pharmacogn.*, 38: 349-353, 2007.
- Bowden GT. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat. Rev. Cancer.*, 4: 23-35, 2004.
- Cha JY, Kim SY, Jeong SJ and Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Kor. J. Life Sci.*, 9: 389-394, 1999.
- Chauhan AS, Negi PS and Ramteke RS. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds.

- Fitoterapia*, 78: 590–592, 2007.
- Chen CL, Liou SF, Chen SJ and Shih MF. Protective effects of Chlorella-derived peptide on UVB-induced production of MMP-1 and degradation of procollagen genes in human skin fibroblasts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 60: 112–119, 2011.
- Choi HJ, Kim JH, Lee CH, Ahn YJ, Song JH, Baek SH and Kwon DH. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res.*, 81: 77–81, 2009a.
- Choi HJ, Song JH, Park KS and Kwon DH. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37: 329–333, 2009b.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H and Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.*, 11: 398–405, 2002.
- Gross B and Lapiere C. Collagenolytic activity in amphibian tissue a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 54: 1197–1204, 1962.
- He D, Sun J, Zhu X, Nian S and Liu J. Compound K increases type I procollagen level and decreases matrix metalloproteinase-1 activity and level in ultraviolet-A-irradiated fibroblasts. *J. Formos. Med. Assoc.*, 110: 153–160, 2011.
- Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572–584, 2002.
- Jeong IY. Antioxidant Activity and Radioprotection of Two Flavonoids from Propolis. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 34: 162–166, 2005.
- Jerome SP, Gabrielle L and Raul F. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.*, 90: 48–54, 1998.
- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K and Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 102–104, 1997.
- Kim JE, Chae KY and Park SN. Antioxidative and Inhibitory Activities on Tyrosinase of *Hippophae rhamnoides* Leaf Extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.*, 37: 265–273, 2011.
- Kim JS, Yu CY and Kim MJ. Phamalogical effect and component of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Plant Biotechnol.*, 37: 47–56, 2010.
- Lee MH, Huh D, Jo DJ, Lee GD and Yoon SR. Flavonoids Components and Functional Properties of Citrus Peel Hydrolysate. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 36: 1358–1364, 2007.
- Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM, Chung EY, Kim BS, Lee SH, Lee SJ and Kim JS. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, 674: 80–86, 2012.
- Lin ZX, Hoult JRS and Raman A. Sulforhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evolution of crude drugs used in the treatment of vitiligo. *J. Ethnopharmacol.*, 66: 141–150, 1999.
- Padwad Y, Ganju L and Jain M. Effect of leaf extract of seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 46–52, 2006.
- Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR and Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.*, 2: 427–436, 1987.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K and Sies H. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 331: 304–306, 1993.
- Song JH and Choi HJ. Silymarin efficacy against influenza A virus replication. *Phytomed.*, 18: 832–835, 2011.
- Vile GF and Tyrrell RM. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 721–730, 1995.
- Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.*, 104: 194–198, 1995.
- Wlaschek M., Tantcheva-Poor I., Naderi L, Ma

- W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J and Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 63: 41-51, 2001.
- Woo KL, Kim JI, Kim MC and Chang DK. Determination of Flavonoid and Limonoid Compounds in Citron (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka) Seeds by HPLC and HPLC/MS. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 35: 353-358, 2006.
- Zhong JQ, Li B, Jia Q, Li YM, Zhu WL and Chen KX. Advances in the structure-activity relationship study of natural flavonoids and its derivatives. *Yao Xue Xue Bao.*, 46: 622-630, 2011.

