

돼지감자잎 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과

김연숙¹ · 이승재¹ · 황진우¹ · 김이화² · 박표잠¹ · 전병태^{3*}

¹건국대학교 생명공학과

²세명대학교 한의과대학 경락경혈학교실

³건국대학교 녹용연구센터

Antioxidant Activity and Protective Effects of Extracts from *Helianthus tuberosus* L. Leaves on *t*-BHP Induced Oxidative Stress in Chang Cells

Yon-Suk Kim¹, Seung-Jae Lee¹, Jin-Woo Hwang¹, Ee-Hwa Kim²,
Pyo-Jam Park¹, and Byung-Tae Jeon^{3*}

¹Dept. of Biotechnology, Konkuk University, Chungbuk 380-701, Korea

²Dept. of Acupoint and Meridian, College of Oriental Medicine, Semyung University, Chungbuk 390-711, Korea

³Nokyong Research Center, Konkuk University, Chungbuk 380-702, Korea

Abstract

Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves (HTL) on *t*-BHP-induced oxidative stress in human liver Chang cells were investigated. The total polyphenol and flavonoid content of the water and ethanolic extracts from HTL were 89.6 ± 1.96 , 94 ± 2.03 mg gallic acid equivalent/g extract, and 65.1 ± 2.84 , 54.6 ± 1.87 mg catechin equivalent/g extract, respectively. In addition, IC₅₀ values for 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl (DPPH), alkyl, and hydroxyl radical scavenging activity of the water extracts were 0.010 ± 0.003 mg/mL, 0.014 ± 0.002 mg/mL, and 0.989 ± 0.003 mg/mL, respectively. Antioxidant activities of the extracts were also determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity and reducing power. The HTL extracts showed a strongly inhibitory effect on lipid peroxidation by measuring ferric thiocyanate (FTC) and thiobarbituric acid (TBA) values. In an MTT assay on the Chang cells, the extracts showed a protective effect by increasing cell viability and decreasing ROS on *t*-BHP-induced oxidative stress in Chang cells. These results indicate that the HTL extracts possess an antioxidant activity.

Key words: antioxidant activity, *t*-BHP, *Helianthus tuberosus* L., oxidative stress

서 론

Nitric oxide, hydroxyl, superoxide 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)은 생체 내 대사과정의 부산물로 지속적으로 생성되며 불안정하고 반응성이 매우 강한데, 생체는 이러한 활성산소종의 작용을 최소화하기 위해, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase 등과 같은 항산화효소를 가지고 있다(1). 생체 내에서 활성산소가 과도하게 발생되거나 균형이 깨어질 때 세포나 조직이 손상을 받게 된다(2). 균형이 깨진 활성산소는 지질을 산화시키고 단백질의 변성을 일으켜 세포막을 파괴하고, DNA 손상을 입혀 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성 피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병 및 알츠하이머형 치매뿐 아니라 암 발병

의 원인이 되기도 한다(3). 따라서 활성산소는 생체 내의 불균형이 문제이며, 그 내적인 불균형의 조절을 위해 보조적인 항산화제의 복용이 증가되고 있는 추세이다. 이들 항산화 물질은 건강에 대한 욕구의 증대와 소득의 향상으로 인공 합성품의 사용을 꺼리는 추세이며 이에 따라 많은 연구자들은 안전성의 확보와 각종 질병의 예방 및 치료가 동시에 가능한 천연 항산화제 개발에 초점을 두고 연구가 이루어지고 있는 상황이다(4). Butylated hydroxyanisole(BHA)과 butylated hydroxytoluene(BHT)과 같은 합성 항산화제가 강력한 항산화제 기능을 지니고 있지만 여러 가지 부작용(5) 때문에 천연항산화제에 대한 관심이 높아지고 있으며, 특히 식물 부산물 유래의 천연항산화 물질에 관한 연구 또한 활발히 진행 중이다(6). 본 연구에 사용한 국화과 해바라기 속의 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L.)는 다년생 식물로

*Corresponding author. E-mail: jbt@kku.ac.kr
Phone: 82-43-840-3523, Fax: 82-43-851-4169

서 일명 돼지감자 혹은 땅만지로 불리며, 원산지는 북아메리카이나 우리나라의 기후조건에 맞아 전국 각지에 자생하고 있다(7,8). 돼지감자 괴경의 주성분은 fructose 중합체인 inulin이며, 이는 돼지감자 괴경 건조물량(dry weight)의 약 75%를 차지한다(9). 최근까지의 돼지감자의 연구현황은 prebiotic의 효능, 돼지감자로부터의 inulin 추출, 가수분해물질 생산, 에탄올 발효, 돼지감자 추출물의 항당뇨 효과 및 inulin 등에 관한 연구(10-13)가 대부분이며, 돼지감자잎 추출물을 이용한 연구는 아직 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 돼지감자잎 추출물의 항산화 활성 및 정상 간세포인 Chang cell을 이용한 돼지감자잎 추출물의 간세포 보호능을 살펴 돼지감자잎의 항산화 및 기능성 소재 개발을 위한 기초자료로 사용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 추출

본 실험에 사용한 돼지감자잎은 자양농장(충주, 한국)에서 기증받아 음지에서 건조하여 마쇄 후 사용하였다. Folin-Ciocalteu's reagent, ferrous chloride(FeCl_2), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), potassium persulfate, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ), linoleic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 특급 및 일급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시료 추출을 위한 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 물 추출은 돼지감자잎 건조 분말 시료 10 g을 3차 증류수 500 mL를 첨가하여 95°C에서 150분 동안 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 11, Whatman, Maidstone, England)로 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조하였다. 에탄올 추출은 돼지감자잎 건조 분말 시료 20 g에 에탄올 200 mL를 첨가하여 상온에서 120 rpm의 진탕기로 24시간씩 3회 추출한 후 농축하여 동결건조 하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(14)을 약간 변형하여 추출물 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na_2CO_3 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 30분 정치한 후 분광광도계(SECOMAM, Ales, France)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Jia 등(15)의 방법에 따라 추출물

0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin(Sigma Chemical Co.)을 표준물질로 하여 0~1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

Electron spin resonance(ESR)를 이용한 DPPH 라디칼 소거능 측정

라디칼 소거능 측정은 Lee 등(16)의 방법에 따라 메탄올에 용해시킨 60 μM DPPH 60 μL 와 농도별로 준비한 시료 60 μL 를 섞은 후 10초간 강하게 교반하여 2분간 실온에서 방치한 후 capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer(Jeol Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였으며, 그 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 5 mW, gain: 6.3×10^5 , temperature: 298 K였다.

ESR을 이용한 alkyl 라디칼 소거능 측정

10 μL 의 PBS, 10 μL 의 농도별 시료, 10 μL 의 40 mM AAPH, 10 μL 의 40 mM 4-POBN을 차례로 첨가하여 10초간 강하게 교반한 후 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시킨 다음, capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer로 alkyl 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 10 mW, gain: 6.3×10^5 , temperature: 298 K였다.

ESR을 이용한 hydroxyl 라디칼 소거능 측정

농도별 시료 0.2 mL에 0.3 M의 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 0.2 mL, 10 mM의 FeSO_4 0.2 mL 및 10 mM의 H_2O_2 0.2 mL를 차례로 첨가한 후 10초간 강하게 교반한 다음, 반응 혼합물을 capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer에서 hydroxyl 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 1 mW, gain: 6.3×10^5 , 온도: 298 K였다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Park과 Kim(17)의 방법에 따라 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정한 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ferric reducing antioxidant power(FRAP)을 이용한 총 항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(18)의 방법을 사용하였다. 즉, 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 고형분 함유량이 1~5 mg 되도록 희석한 시료액 0.15 mL과 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 표준물질로 하여 mM FeSO_4 eq./mg extract으로 표시하였다.

환원력 측정

돼지감자잎 추출물의 환원력 측정은 Seo 등(19)의 방법에 따라 측정하였으며, 시료 1.0 mL에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1.0 mL씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 여기에 15% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 1.0 mL 가하고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상층액 1.0 mL에 증류수 및 ferric chloride 각 1.0 mL를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ferric thiocyanate(FTC) 방법에 의한 지질과산화 억제 활성 측정

Ferric thiocyanate에 의한 지질과산화 측정은 Kikuzaki와 Nakatani(20)의 방법에 의해 측정하였다. 추출물 4.0 mL, 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 8.0 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에서 항온처리 하여 과산화를 유도시켰다. 이 혼합용액 0.1 mL, 75% ethanol 9.7 mL, 30%-ammonium thiocyanate 0.1 mL를 순서대로 첨가한 후 잘 섞어주었다. 여기에 20 mM ferrous chloride(3.5% HCl에 녹인 것)를 0.1 mL 가한 후 잘 섞이도록 한 후 정확히 3분 후에 분광광도계를 이용하여 500 nm에서 변화된 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로는 시료 대신 물과 에탄올을 사용하여 반응시켰고, 양성 대조군으로 vitamin C 및 α -tocopherol을 사용하였다.

Thiobarbituric acid(TBA) 방법에 의한 지질과산화 억제 활성 측정

추출물 4.0 mL에 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 8.0 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에 항온 처리하여 일정 간격으로 측정하였다. 먼저 각 시료용액 1.0 mL, 20% TCA 2.0 mL, 0.67% TBA 2.0 mL를 가하여 혼합한 후 열탕조에서 10분간 가열 처리하여 흐르는 물에 냉각시킨 후 5°C 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 상층액을 532 nm에서 측정하여 TBA값을 측정하였다.

세포 배양

정상 간세포(human liver cells, Chang)를 불활성화한

fetal bovine serum(FBS) 10%와 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

세포 독성 측정 및 t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터 간세포보호 효과 측정

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(21). Chang 세포를 24-well plates에 7×10^4 cells/mL 농도로 1.0 mL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200 μL 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 돼지감자잎 추출물의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, Chang 세포를 24-well plates에 7×10^4 cells/mL 농도로 1.0 mL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)가 되도록 세포에 한 시간 전 처리한 후 t-BHP(최종 농도 80 μM)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

세포내 활성 산소종 소거능

활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하여 세포내에서 발생하는 활성산소의 정도를 형광측정기로 측정하였다. 96 well black plate에 2×10^4 개의 Chang 세포를 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음, 시료를 1시간 전 처리하였다. t-BHP를 200 μM 을 30분 처리한 다음 DCF-DA를 최종농도 10 μM 가 되도록 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후 Fluorospectrometer (SpectraMax M2/M2e, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 (excitation, 485 nm; emission, 538 nm) 측정하였다(22).

통계분석

각 군 간의 유의성의 검증은 Window용 SPSS 통계프로그램(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student t-test 및 ANOVA 법으로 검증하여 p값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

식물에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 항산화, 항염, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내며, 따라서 페놀성 물질과

Table 1. Extraction yields, total polyphenol and total flavonoid contents of HTL extracts

Solvent	Extraction yields (% w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract)	Total flavonoid (mg CE/g extract)
Water	32.38	89.6±1.96 ¹⁾	65.1±2.84
Ethanol	26.58	94±2.03	54.6±1.87

GAE: gallic acid equivalents, CE: catechin equivalents.

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

항산화 활성 간의 상관관계에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔다. 따라서 돼지감자잎의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 조사하여 항산화 활성 탐색의 기본 자료로 사용하고자 하였다. 돼지감자잎의 에탄올 및 물 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 물 추출물은 32.38%, 에탄올 추출물은 26.58% 수율을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 에탄올 추출물이 94±2.03 mg GAE eq./g extract로 물 추출물 89.6±1.96 mg GAE eq./g extract보다 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 물 추출물이 65.1±2.84 mg CE eq./g extract로 에탄올 추출물 54.6±1.87 mg CE eq./g extract보다 높았다. 이는 미나리 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 37.5±0.94 mg GAE eq./g extract, 총 플라보노이드 함량이 26.50±0.50 mg CE eq./g extract로 돼지감자잎 추출물이 2배가량 높은 함량을 나타내었다(23).

ESR을 이용한 라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 산화를 일으키기 쉬운데 DPPH는 보라색의 비교적 안정한 자유 라디칼로서 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 돼지감자잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 농도에 비례하여 증가하였으며, 물추출물과 에탄올 추출물은 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 91.12%, 92.14%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. Table 2와 같이 50% 라디칼 소거능인 IC₅₀ 값은 물추출물과 에탄올 추출물 각각 0.010±0.003 mg/mL, 0.012±0.004 mg/mL로 이는 양성대조군인 비타민 C(0.003±0.001 mg/mL)보다는 약간 낮았지만 모두 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였다. Seo 등(24)은 하고초 추출물에 대한 라디칼 소거능은 폴리페놀 화합물과 플라보노이드 함량과 상관관계가 있을 것으로 추정하였는데, 돼지감자잎 추출물 또한 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량과 라디칼 소거능과 높은 상관관계가 있을 것으로 사료된다.

돼지감자잎 추출물의 alkyl 라디칼 소거능은 물추출물의 경우 IC₅₀ 값이 0.014±0.002 mg/mL, 에탄올 추출물의 경우에는 0.005±0.003 mg/mL로 에탄올 추출물의 알킬라디칼 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 에탄올 추출물의 알킬라디칼 소거능은 양성대조군인 비타민 C보다도 IC₅₀ 값이 훨씬 낮은 값을 나타내었으며, 이는 우수한 항산화 효과가 있다고 사료된다.

Hydroxyl 라디칼은 DMPO 트랩을 이용하여 Fe²⁺/H₂O₂계에서 발생된다. DMPO-OH의 전형적인 1:2:2:1 ESR 시그널이 관찰되었다. Table 2와 같이 돼지감자잎의 에탄올 추출물은 IC₅₀ 값이 0.630±0.002 mg/mL로 물추출물(0.989±0.003 mg/mL)보다 더 높은 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 보였으나, 대조군인 비타민 C(0.021±0.002 mg/mL)보다는 낮은 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 돼지감자잎 추출물은 높은 DPPH, alkyl 및 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 나타내었으며, 특히 alkyl 라디칼 소거 활성은 천연 항산화제로 사용하고 있는 비타민 C보다도 높은 활성을 나타내어 천연항산화제로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

Table 3은 돼지감자잎의 추출용매에 따른 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과이다. 실험군 모두 시료 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타났으며(data now shown), 특히 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 5.0 mg/mL의 시료의 농도에서 66.41%, 53.37%의 활성을 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 BHT와 비교하여 낮은 활성을 보였으나 Jeon 등(25)의 고추잎의 물 추출물의 ABTS 소거능이 0.227 mM Trolox eq./mg extract 것과 비교해 돼지감자잎 추출물이 고추잎 추출물보다 두 배 이상 높은 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

FRAP을 이용한 총 항산화력

FRAP법은 전자공여 능력을 통해 산화 활성을 검증하는 방법 중 하나로 즉 산화제로 작용하는 Fe³⁺와 항산화제와의 반응을 통해 생성된 Fe²⁺을 흡광도를 통해 정량할 수 있는 방법으로 본 연구에서는 항산화 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 그 결과 돼지감자잎의 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 효과를 보였을 뿐만 아니라 양성 대조군인 BHT와도 거의 비슷한 활성을 나타내었다(Table 3). 한편, Holasova 등(26)은 식물로부터 추출된 페놀류의 화합물은 페놀함량이 높을수록 항산화력이 증가한다고 보고하였는데, 이는 본 연

Table 2. DPPH, alkyl and hydroxyl radical scavenging activity of the HTL extracts measured by an ESR spectrophotometer

Extract	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Alkyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Hydroxyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)
Water	0.010±0.003 ¹⁾	0.014±0.002	0.989±0.003
Ethanol	0.012±0.004	0.005±0.003	0.630±0.002
Vitamin C	0.003±0.001	0.011±0.003	0.021±0.002

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

Table 3. ABTS radical scavenging and FRAP activity of HTL extracts

Sample	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)
Water	0.416±0.06 ¹⁾	0.908±0.09
Ethanol	0.192±0.05	0.712±0.10
BHT	1.461±0.02	1.284±0.16

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, FRAP: ferric reducing antioxidant power.

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

구에서 얻은 물추출이 에탄올 추출물보다 총 플라보노이드 함량이 높았기 때문에 항산화 활성이 우수한 것으로 판단된다.

환원력

환원력은 Fe⁺³ 이온을 Fe⁺²으로 환원시키는 능력을 측정하여 항산화 활성을 검정하는 방법이며, 환원력이 강할수록 진한 녹색에 가깝게 발색되어 항산화 활성이 큰 물질일수록 높은 흡광도 값을 나타내는 것으로 알려져 있다(27). 돼지감자잎 추출물의 환원력은 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 농도 1.0 mg/mL에서 물 추출물은 1.25, 에탄올 추출물은 0.95의 흡광도 값을 나타내어 positive control BHT 1.0 mg/mL와 거의 비슷한 활성을 나타내었다(Fig. 1). Kwak 등(27)은 자색고구마 추출물의 환원력을 측정한 결과, 농도 5.0 mg/mL에서 2.918의 높은 환원력을 나타내었지만, 1.25 mg/mL의 농도일 때는 돼지감자잎 추출물보다 훨씬 더 낮은 환원력을 보였다.

지질과산화 억제 활성

돼지감자잎 추출물을 첨가하여 FTC와 TBA 방법으로 지질과산화 억제활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 돼지감자잎 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 과산화지질이 생성되어 흡광도가 점차적으로 증가하였으며 6일째의 최고치를 지나 8일째는 감소하는 경향을 나타내었다. 돼지감자잎 추출물을 첨가한 처리구 중 에탄올 추출물은 FTC와 TBA 방법 모두에서 6일째 이후에 산화가 급격히 진행되는 경향을 나타내었으나, 물추출물은

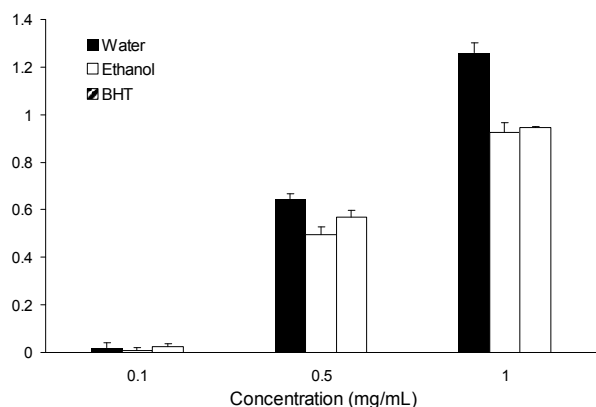


Fig. 1. Reducing power of water and ethanolic extracts from HTL at various concentrations.

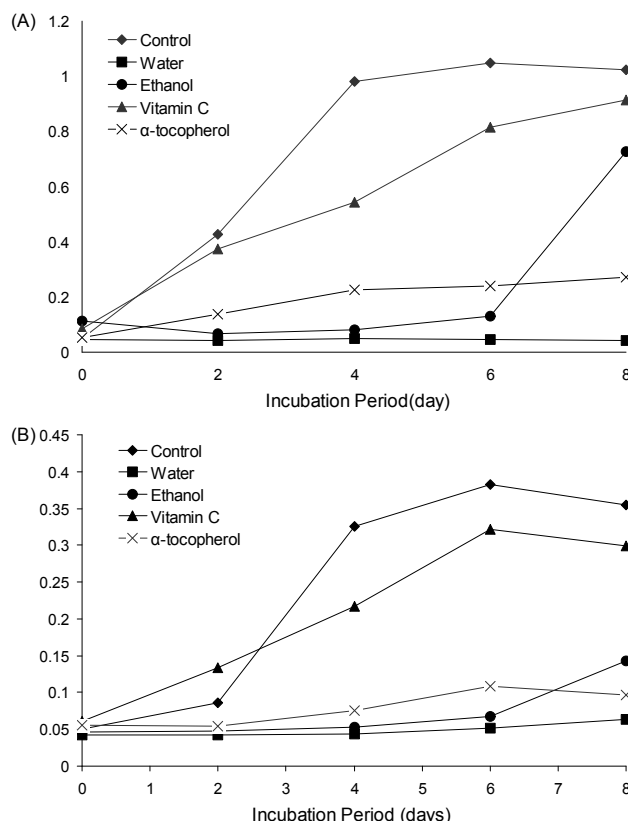


Fig. 2. Antioxidant activities of HTL extracts at 1.0 mg/mL in linoleic acid autooxidation system measured by the ferric thiocyanate method (A) and the thiobarbituric acid method (B).

8일째까지 산화가 일어나지 않았다. 양성대조군 중 비타민 C는 돼지감자잎 추출물에 비해 지질과산화 억제효능이 낮았으며, α-토코페롤은 대조구 및 에탄올 추출물보다 높은 지질과산화 억제활성을 나타내었으나 물 추출물보다는 낮은 활성을 보여주었다. 따라서 돼지감자잎 물 추출물의 경우 천연 항산화제인 비타민 C 뿐만 아니라 α-토코페롤보다 높은 지질과산화 억제 효능을 나타내어 천연 항산화제로 사용 가능할 것으로 판단된다.

세포 생존율

정상 간세포인 Chang 세포에 대한 돼지감자잎 추출물의 세포독성 및 간세포 보호능을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였으며, 돼지감자잎 추출물을 농도별로 처리한 결과 0.5 mg/mL 농도 이하에서는 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 그러므로 돼지감자잎 추출물의 간세포 보호 효과 측정을 할 때 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL의 농도를 선택하여 실험을 진행하였다. 돼지감자잎 추출물을 한 시간 전 처리한 후, 80 μM t-BHP 처리했을 때 생존율이 약 50%에서 물 추출물의 경우 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 생존율이 59.2, 62.0, 67.2%로 증가하는 경향을 나타내었으며, 에탄올 추출물 또한 같은 농도에서 53.4, 59.7, 64.4%로 생존율이 증가하였다(Fig. 4). 이들 결과로부터 돼지감자잎 추출물이 정

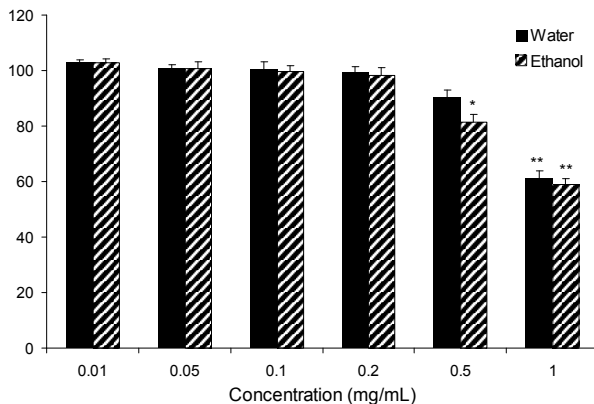


Fig. 3. Effect of HTL extracts on cytotoxicity in Chang cells. HTL extracts were treated with various concentrations in Chang cells for 24 hr. Values are expressed as the mean \pm SD of determinations made in triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

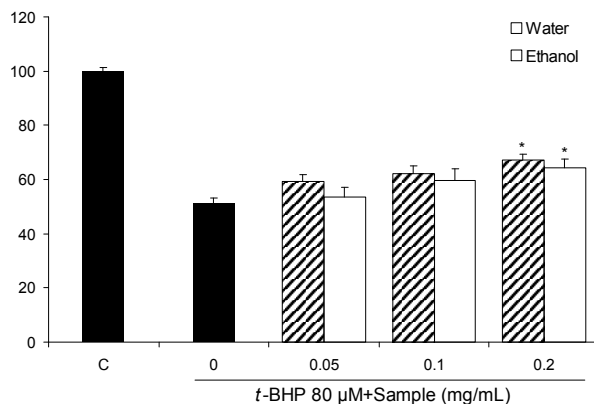


Fig. 4. Protective effect of HTL extracts on *t*-BHP induced oxidative damage in Chang cells. Hepatocytes were pre-treated with various concentrations of extracts from HTL leaves for 1 hr, and then were treated with *t*-BHP (80 μ M) for 24 hr. Values are mean \pm SD of determinations in each case. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

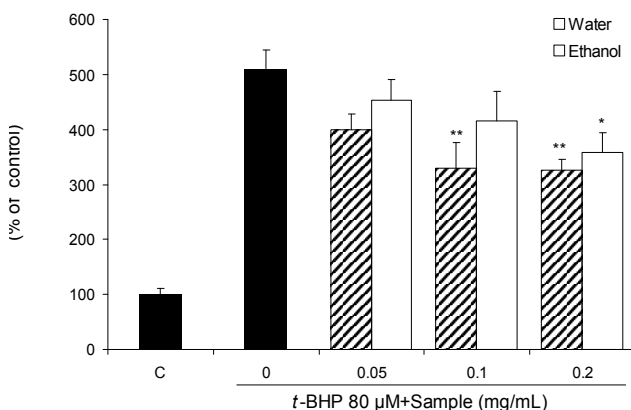


Fig. 5. Changes of intracellular ROS generated by *t*-BHP treatment in Chang cells. The extracts from HTL leaves were treated with various concentrations in Chang cells for 1 hr prior to 200 μ M *t*-BHP treatment for 30 min. Values are given as the mean \pm SD of determinations made in triplicate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ are significantly different as analyzed by paired *t*-test that compared the *t*-BHP group with sample group, respectively.

상 간세포인 Chang 세포의 *t*-BHP로 유도된 세포 손상을 보호함을 알 수 있었다.

세포내 활성산소종 소거능

Chang 세포에 200 μ M *t*-BHP 처리에 의해 생성된 활성산소종 수준이 대조군에서는 약 500%를 나타내었지만, 돼지감자잎 추출물을 처리한 경우 물추출물 및 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 그 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 돼지감자잎 물 추출물을 0.2 mg/mL 처리했을 때 활성산소종이 320%로 대조군에 비해 약 40% 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 *t*-BHP 처리로 인해 발생하는 산화스트레스 증가를 돼지감자잎 추출물이 감소시킴으로써 간세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 돼지감자잎(*Helianthus tuberosus* L.) 추출물의 항산화 활성을 탐색하고자 물과 에탄올로 각각 추출하였다. 돼지감자잎에 포함된 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 에탄올 추출물(94 \pm 2.03 mg GAE/g extract)이 물 추출물(89.6 \pm 1.96 mg/GAE/g extract)보다 더 많은 총 폴리페놀 함량을 포함하고 있었으며, 총 플라보노이드 함량은 물 추출물(65.1 \pm 2.84 mg CE/g extract)이 에탄올 추출물(54.6 \pm 1.87 mg CE/g extract)보다 더 높았다. ESR을 이용한 라디칼 소거능을 측정된 결과, hydroxyl 라디칼을 제외한 DPPH, alkyl 라디칼 소거능은 물 추출물 및 에탄올 추출물 모두 비타민 C와 비슷하거나 더 높은 활성을 나타내었다. ABTS를 이용한 라디칼 소거 활성, FRAP을 이용한 총항산화능 측정 및 환원력을 통한 항산화 활성을 측정된 결과에서도 돼지감자잎 추출물이 항산화효과를 가지고 있음이 확인되었다. 또한, FTC 및 TBA법을 이용한 지질과산화 억제 효능을 살펴본 결과, 특히 돼지감자잎 물 추출물이 에탄올 추출물보다 지질과산화 억제효과가 높았으며 이는 α -토코페롤보다 활성이 우수하였다. 한편, 세포독성을 살펴보기 위하여 정상 간세포(human liver, Chang cells)를 이용하여 MTT assay를 수행한 결과, 세포의 생존율은 0.5 mg/mL의 농도까지는 독성을 나타내지 않았고 간세포 보호효능 실험에서는 *t*-BHP로 유발시킨 산화적 스트레스에 대해 농도 의존적인 간세포 보호 효과가 있었으며, 이는 세포내 ROS의 감소로 인한 산화스트레스 억제를 통하여 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 건국대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

1. Gurpreet K, Sarwar A, Zoobi J, Kaleem J, Mohammad A. 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J Ethnopharmacol* 108: 340-348.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
3. Aruoma OI. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 62: 671-683.
4. Lee MA, Choi HJ, Kang JS, Choi YW, Joo WH. 2008. Antioxidant activities of the solvent extracts from *Tetragonia tetragonoides*. *Journal of Life Science* 18: 220-227.
5. Ito N, Fukushima S, Tsuda H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Res Toxicol* 15: 109-150.
6. Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. 2009. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. *J Appl Biol Chem* 52: 70-76.
7. Go GS, Jeon US. 2003. *Ferns, fern-allies and seed-bearing plants of Korea*. Iljinsa, Seoul, Korea. p 659.
8. Lee YN. 2006. *New flora of Korea II*. Kyohak, Seoul, Korea. p 278-279.
9. Kim CG, Kim SI, Shin HK. 1993. Effect of fructooligosaccharide-inulin of Jerusalem artichoke on the growth of intestinal microorganisms of pig. *Korean J Food Sci Technol* 25: 395-399.
10. Jhon DY, Kim MH. 1988. Studies on inulase form Jerusalem artichoke. *J Korean Soc Food Nutr* 17: 205-210.
11. Chae EM, Chol EH. 1991. Optimization for alcohol fermentation by *Kluyveromyces marxianus* using Jerusalem artichoke powder. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 19: 265-271.
12. Rosengard BR, Cochrane DE. 1983. Complement-mediated cytolysis: A quick, simple method for determining levels of immunoglobulin E bound to mast cells. *J Histochem* 31: 441-444.
13. Kim JL, Bae CR, Cha YS. 2010. *Helianthus tuberosus* extract has anti-diabetes effects in HIT-T15 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 31-35.
14. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
15. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
16. Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK, Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of β -chitooligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 14: 24-28.
17. Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
18. Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
19. Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 129-135.
20. Kikuzaki H, Nakatani N. 1993. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J Food Sci* 58: 1407-1410.
21. Je JY, Park PJ, Kim EK, Ahn CB. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in liquamen. *Food Chem* 113: 932-935.
22. Zeng KW, Wang XM, Ko HS, Yang HO. 2010. Neuroprotective effect of modified Wu-Zi-Yan-Zong granule, a traditional chinese herbal medicine, on CoCl_2 -induced PC12 cells. *J Ethnopharmacol* 130: 13-18.
23. Hwang CR, Hwang IG, Kim HY, Kang TS, Kim YB, Joo SS, Lee JS, Jeong HS. 2011. Antioxidant component and activity of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 316-320.
24. Seo JK, Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Jeong HG, Sung NJ, Chung YC. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of hagocho (*Prunella vulgaris*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1425-1432.
25. Jeon GU, Han JY, Choi YM, Lee SM, Kim HT, Lee JS. 2008. Antioxidant and antiproliferative activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1079-1083.
26. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. 2002. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int* 35: 207-211.
27. Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *Journal of Agriculture & Life Science* 44: 57-66.

(2011년 8월 29일 접수; 2011년 9월 15일 채택)