

## 소염 및 항산화제 개발을 위한 상사화의 효능 연구

김보미<sup>1</sup>, 유명자<sup>1</sup>, 송미선<sup>1</sup>, 권태오<sup>2</sup>, 이영행<sup>1</sup>, 채규윤<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 자연과학대학 나노생명화학부, <sup>2</sup>원광대학교 생명자원과학 원예 애완 동·식물 학부

<sup>3</sup>기초 자연 과학 연구센터

### ABSTRACT

## Research for the antiinflammation and antioxidation effect on the *Lycoris squamigera Maxim*

Bo-Mi Kim<sup>1</sup>, Myung-Ja Yoo<sup>1</sup>, Mi-Seon Song<sup>1</sup>, Tae-Oh Kwon<sup>2</sup>, Young-Hang Lee<sup>1</sup>, Kyu-Yun Chai<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Nanobiochemistry, College of Natural Sciences

<sup>2</sup>Major of Pet Animal-Plant Science, <sup>3</sup>Institute of Basic Natural Science, Won-Kwang University

Objectives : The *Lycoris squamigera Maxim* has been used traditionally for treatment of various diseases. However, the studies on the effect of *Lycoris squamigera Maxim* have not been carried out. In the present study, extract of *Lycoris squamigera Maxim* were tested for their anti-inflammatory and anti-oxidation effect.

Methods : The anti-inflammatory effect of the various solvent extract was studied in lipopolysaccharide (lps)-treated mouse macrophage cells. RAW 264.7 cells were pre-incubated with *Lycoris squamigera Maxim* extracts for 4h and treated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lps for 18h, and then the anti-inflammatory effects of extracts were determined. The anti-oxidation effect of extracts measured by DPPH method, reductive potential test, total phenolics test.

- 
- 교신저자 : Kyu-Yun Chai
  - Dept. of Bionanochemistry, School of Natural Science, Won-Kwang University, Iksan 570-749, South Korea
  - Tel : +82-63-850-6230 E-mail : geuyoon@wonkwang.ac.kr
  - 접수 : 2011/ 11/ 18 수정 : 2011/ 12/ 02 채택 : 2011/ 12/ 21

Results : Extracted root's ethyl acetate layer showed a significant decrease in nitric oxide. And that layer (root's ethyl acetate extract) was showed decrease in TNF- $\alpha$  concentration dependently. Separated from Root's ethyl acetate extract was fraction 1 has 0.1~5  $\mu$ M range, fraction 2 has 0.1~10  $\mu$ M range did not showed cytotoxicity. Anti-oxidation result as DPPH test showed the best was root ethyl acetate extract. Redusing power was made a comparison between fractions and standard. They were showed similar value. Fraction's total phenol containing result was better then standard.

Conclussions : These results suggest that these extracts can be used as anti-inflammatory, anti-oxidation materials.

*Key word* : *Lycoris squamigera Maxim*, nitric oxide, TNF- $\alpha$ , nitric oxide synthase, anti-inflammatory effect, anti-oxidation effect

## 1. 서 론

생리활성물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가 가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며, 새로운 물질들이 연구 개발되고 있다<sup>1,2)</sup>.

상사화(*Lycoris squamigera Maxim*)는 외떡잎식물 백합목 수선화과의 여러 해살이 풀로 야생의 구근식물로서 중국의 남부지역이 기원지이다. 북반구의 아열대 및 온대 지역인 동아시아의 습윤한 수림 하에 약 20여 종이 한정 분포하며, 한국, 중국, 일본, 대만 등지에 분포 되어 있다. 상사화는 봄에 연한 녹색의 풀잎이 먼저 나오고, 풀잎이 다 없어진 8~9월경에 꽃대가 땅속에서 올라와서 그 끝에 네 송이 내지 여덟 송이의 꽃이 핀다. 한의학에서는 비늘줄기를 약재로 쓰는데, 氣味, 溫, 辛의 성질이 있으며, 인경 부위에 약 0.1~0.2 %의 알칼로이드 성분이 함유되어 있으며, 그 중에서도 Lycorin, Lycoramin, Lycoranelin 등의 성분이 함

유 되어 있다. 용법은 내복시 끓여서 달여 복용하거나, 외복시는 짓쪼아서 상처에 붙인다. 利水, 消腫, 鎮痛의 효능이 있어 거담제, 구토, 창종, 적리, 급만성기관지염, 폐결핵, 백일해, 각혈, 해열, 기관지 확장증 등의 기관지 계통과 폐, 심장병 등에 치료제로 사용되었다<sup>3)</sup>. 상사화의 생리활성과 치료학에 대한 실험연구로 항암 효과가 있다고 나와 있으나<sup>4)</sup>, 상사화의 획분층별 추출물을 이용한 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 상사화의 획분 층별 항균 효과와 항염증 효과의 연관관계 및 그 기전을 밝히는 것은 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 상사화를 메탄올 추출하고 그 추출물을 여러 가지 유기용매로 획분하여 각각의 항산화 활성을 in vitro 상에서 비교하고, 세포 생존율 및 항염증 효과를 확인하였다. 분획 중에서 우수한 생리 활성 효과를 가지는 ethyl acetate층을 HPLC를 이용하여 2개의 분획으로 다시 나누고, 2개의 획분된 층을 다시 항산화 효과, 세포 생

존율의 2차 생리 활성 효과를 측정하여 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에서 사용한 상사화는 원광대학교 생명자원과학대학 박윤점 교수님의 자문을 받아 구입하여 외부형태를 비교 조사하고 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 상사화는 원광대학교 자연과학대학 4층 천연물실험실에 보관되어있다.

### 2. 시약 및 기기

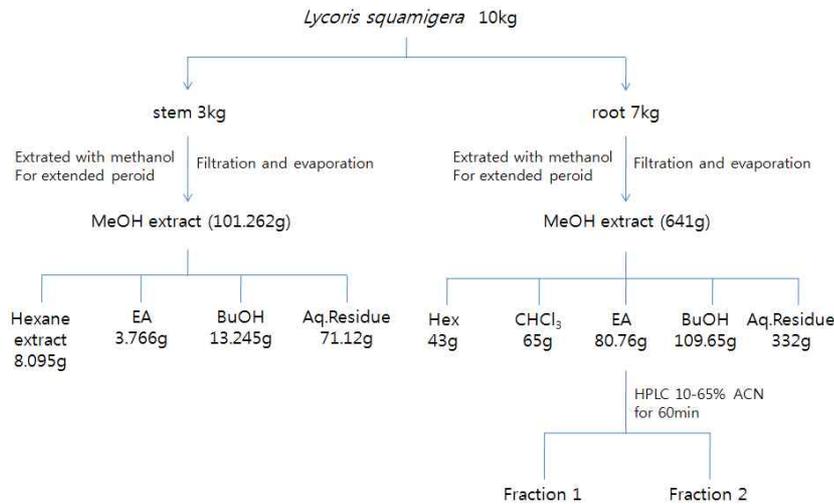
상사화 추출 및 open column 분리에서 사용된 용매는 GR 급을 사용하였으며, 물질의 분리에는 25 TLC plastic sheets(20×20 cm) silica gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK), 25 TLC plates 5×10 cm RP-18 F<sub>254S</sub> (MERCK), silica gel 60(0.015~0.140 mm, MERCK), silics gel 60(0.040~0.063mm; MERCK), octadecyl-functionalized silica gel(Aldrich), lipophilic sephadex LH-20(SIGMA) 등 충진제와 Phenomenex 사의 Luna 5u C<sub>18</sub>(2)(250×21.20 mm 5 micron) HPLC column 과 YMC 사의 Hydrosphere C<sub>18</sub>(250×20 mm I. D. S-5 μm, 12 nm) HPLC column, EYELA rotary vacuum evaporator, VISION WORKSTATION perseptive biosystems HPLC 등을 사용하였다.

생리활성 효과 측정을 위해 MTT(2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)와 DMSO(dimethyl sulfoxide), LPS(lipopolysacchride)는 SIGMA 사에서 구입하였으며, Antibiotic antimyotic solution 과 FBS(fetal bovine serum), RPMI 1640 은 Gibco/Invitrogen에서 구입하였다.

Anti-iNOS, anti-COX-2, anti-tumor necrosis factor-alpha(TNF-α) antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(California, U.S.A.)로부터 구입하였으며, nitrocellulose membrane(NC membrane)은 Amersham Pharmacia 사로부터 구입하여 사용하였다. 용매로는 *n*-hexane(Hex), methanol(MeOH), ethanol(EtOH), chloroform(CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate(EA), butanol(BuOH), dimethyl sulfoxide(DMSO), 정제하지 않고 사용하였고, 추출물들의 농축에는 원심분리기(Hanil Industrial Company, Hm 150IV)와 진공 회전식 농축기(Büchi, RE III Rotavapor)를 사용하였고, 흡광도 측정에는 UV-Visible Spectrophotometer(Molecular Devices Spectra Max 190)와 UV-Visible S-2100(Scinco Co. Ltd.)을 사용하였다.

### 3. 생리활성물질의 추출 및 분리

건조된 상사화 10 kg을 줄기 3kg 와 뿌리 7 kg로 구분하여 100% methanol 18 ℓ 에 넣고 일주일 동안 상온에서 추출하였다. 줄기 추출액은 필터한 후에 액상은 감압 농축하여 추출물 101.262 g을 얻었다. 농축한 100% methanol 추출물은 증류수에 완전히 녹인 후 극성에 따라 분획하였다. *n*-hexane(8.095 g)과 ethyl acetate(3.766 g), butanol(13.245 g) 그리고 H<sub>2</sub>O(71.123 g) 층 순으로 분획하였다. 뿌리 추출액은 필터한 후에 액상은 감압 농축하여 추출물 641.023 g을 얻었다. 농축한 100% methanol 추출물은 증류수에 완전히 녹인 후 극성에 따라 분획하였다. *n*-hexane(43.852 g)과 chloroform(65.364 g), ethyl acetate(80.760 g), butanol(109.15 g) 그리고 H<sub>2</sub>O(332.021 g) 층 순으로 분획하였다(schem 1).



Scheme 1. The pathway on the extraction and fraction of *Lycoris squamigera Maxim.*

#### 4. 세포배양

생쥐의 대식세포주(Murine macrophage Raw 264.7 cell line)를 10% FBS(Fetal Bovine Serum, 56 °C heat inactivated), 1 % L-glutamine, nonessential amino acids 및 1 % antibiotic / antimycotic solution(100 U/ml of penicillin, 25 µg/ml of amphotericin D, and 100 µg/ml of streptomycin), 2 % sodium bicarbonate 등이 포함된 RPMI 1640 배지에 넣고 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator 에서 24시간 배양하였다.

#### 5. 세포 생존율 측정

상사화 추출물들에 의한 RAW 264.7 세포주의 세포 생존율을 MTT(2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay 방법을 이용하여 분석 하였다<sup>11)</sup>. 세포주를 96-well plate 에 2.0 × 10<sup>5</sup> cell / ml 의 세포 현탁액 200 µl를 분주하고, 4시간 동안 안정화한다. 추출물을 DMSO 또는 3차 증류수로 적정용액을 만들어 0.1, 1, 10 µM 농도로 처리한 다음 2시간 후에 1 µg/ml LPS 를 처리한 후, 18시간 후에 5 µg/mL MTT 용액 50 µl를 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 배양액을

제거한 후, MTT 용액과 생존세포로부터 생성된 formazan 을 DMSO 150 µl 로 용해하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

#### 6. Nitric oxide(NO) 의 농도의 측정

RAW 264.7 cell line으로 생성된 nitric oxide의 양은 Feilish<sup>5)</sup> 등의 방법에 준하여 실험하였다. 96-well plate 에 RAW 264.7 세포주 2.0 × 10<sup>5</sup> cell/ml 의 현탁액을 200 µl 씩 분주하고, 4시간 동안 안정화하였다. 상사화 추출물의 적정용액을 농도 별로 제조한 후 0.1, 1, 10 µM 농도로 처리하고, 2시간 후에 1 µg/ml LPS 을 처리하였다. 18시간 후, 배양액 100 ml 를 취하고 같은 부피의 Griess Reagent(1 % sulfanilamide, 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5 % phosphoric acid solution)을 넣고 실온에서 10분간 방치한 다음 ELISA plate reader 를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 는 sodium nitrite 를 표준용액으로 하여 정량하였으며, 각 측정치는 5-8 µM 의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 을 함유하는 cell-free 배양액의 흡광도를 이용하여 보정하였다.

## 7. TNF- $\alpha$ 의 측정

RAW 264.7 세포주를 24 well plate 에  $5.0 \times 10^5$  cell/ml 의 현탁액을 분주하고, 10 % FBS가 포함된 media를 이용하여 18 시간 동안 안정화하였다. LPS( $1 \mu\text{g/ml}$ )과 다양한 농도의 시료를 셀에 더하고 20시간 동안 배양 한다. 셀 배양액은 20 시간 후에 수집하여 깨끗하게 원심분리하고  $-80^\circ\text{C}$ 까지 얼린다. 상업적으로 판매되는 Sandwich의 enzyme-linked immunosorbent assay ELISA를 이용한다. TNF- $\alpha$  측정은 96 well ELISA plate에서 수행되었고, coating buffer(1:250 dilution) 안의 capture antibody의  $100 (\mu\text{l/well})$ 을 coated 한다. 그리고  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight한다. plate를 washing하고 Assay diluent로  $200 (\mu\text{l/well})$ 로 blocked하고 1 시간 동안 실온에서 배양한다. washing 후에 시료 또는 TNF- $\alpha$  표준 물질을 더하고 2시간 동안 실온에서 배양한다. 2시간이 지나면 실온에서 배양된 각각의 well에 Working Detector(Detection Antibody +SAV-HRP reagent)를 준비하여  $100 \mu\text{l}$ 씩 처리하고 1시간 동안 실온에서 배양한다. 각 well은 다시 washing하고 1xTMB solution을 처리한다. 흡광도 변화는 microplate ELISA reader로  $450 \text{ nm}$ 에서 측정한다.

## 8. 생리활성 효과를 보이는 분획의 분리

생리 활성이 우수한 상사화 뿌리의 ethyl acetate 분획을 HPLC를 이용하여 2차 분획을 나누었다. HPLC 분리 조건은 Liner gradient로 하여 water과 acetonitrile을 이동상으로 사용하였으며, 컬럼은  $\text{C}_{18}$ 이 충전된 것을 사용하였다.

## 9. 환원력 측정

추출물의 환원력(reductive potential test)은 Oyaizu<sup>6)</sup> 방법에 의해서 측정 하였다.

다양한 농도( $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ )의 상사화 추출물  $0.5 \text{ mL}$ 에  $0.2 \text{ M}$  phosphate buffer(pH 6.6)

와  $1\%(\text{w/w})$  potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{N}_6)$ ]  $0.5 \text{ mL}$ 를 혼합하였다. 혼합물을  $50^\circ\text{C}$ 에서 20 분간 배양 시킨후  $10\%(\text{w/w})$  trichoroacetic acid  $0.5 \text{ mL}$ 를 가하여 혼합한다. 그런 후 원심분리기로  $3000 \text{ rpm}$ 에서 10분간 원심 분리 하였다. 상층액  $0.5\text{mL}$ 을 취하여  $1\%(\text{w/w})$   $\text{FeCl}_3$   $0.1 \text{ mL}$  가하고 spectrophotometer로  $700\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 반응혼합물의 높은 흡광도는 더 좋은 reductive potential을 나타낸다. 추출물의 reductive potential 효과를 보기 위해 일반적으로 항산화 물질로 알려진 BHA, BHT 그리고  $\alpha$ -tocopherol과 효과를 비교하였다.

## 10. 총 페놀 함량 측정

Total phenolics test 방법은 Folin-Ciocalteu 방법에 의해서 결정하였다.

상사화 추출물 각각의 fraction은 Spanos and Wrolstad<sup>7)</sup>의 방법을 바탕으로 하여 측정하였다. 다양한 농도( $0 \mu\text{g/mL} \sim 50 \mu\text{g/mL}$ )의 상사화 시료  $150\mu\text{l}$ 에  $750 \mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu 시약과  $600\mu\text{l}$   $7.5\%$  w/v sodium carbonate를 혼합한다. 혼합물을  $45^\circ\text{C}$ 에서 20분간 배양시키고, 흡광도를 UV-Visible Spectrophotometer(Molecular Devices Spectra Max 190.)로  $765\text{nm}$ 에서 측정하였다. 반응혼합물의 높은 흡광도는 더 좋은 total phenolics 효과를 나타낸다. 추출물의 total phenolics 효과를 보기 위해 일반적으로 항산화 물질로 알려진 BHA, BHT,  $\alpha$ -tocopherol 효과와 비교하였다.

## 11. 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과는  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$  값으로 표시하였으며, 각 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다. 일반적으로, p 값이  $0.005$  이하인 것만 통계적으로 유의성이 있는

것으로 검증하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 용매별 추출물의 DPPH 측정

*Lycoris squamigera Maxim*의 antioxidant scavenging activities를 표준 물질인 ascorbic acid를 비교하여 측정하였다. 항산화 측정은 희석별로 흡광도가 50 %로 감소하는  $IC_{50}$  값을 Table 1에 정리하였다. 가장 낮은  $IC_{50}$ 을 나타내는 숫자가 가장 좋은 antioxidant scavenging activity를 나타낸다. 뿌리 물 추출물(R-H<sub>2</sub>O)은 항산화 효과가 없는 것으로 나타났다. 그러나 뿌리의 ethyl acetate 층(R-EA)와 뿌리의 chloroform 층(R-CHCl<sub>3</sub>), 줄기의 ethyl acetate 층(S-EA)층은 4.82, 9.88, 5.25로 비교물질인 Ascorbic acid 5.61과 비교 하였을때, R-EA와 S-EA는 더 우수한 효과를 보였으며, R-CHCl<sub>3</sub>도 비교물질 보다는 적지만 항산화 효과가 높음을 확인 할 수 있었으며, 나머지 추출물들도 미미하게는 항산화 효과를 가짐을 확인 하였다 (Table 1).

Table 1.  $IC_{50}$  values of the solvent extracts obtained from *Lycoris squamigera Maxim* by free radical scavenging activities(DPPH)

Fraction	AC <sup>A</sup> IC <sub>50</sub> <sup>B</sup> (μg/ml)
R-Hex	22.46±14.37
R-EtOAc	4.82±3.36
R-CHCl <sub>3</sub>	9.88±3.83
R-BuOH	49.18±48.44
R-H <sub>2</sub> O	284.81±59.75
S-Hex	28.30±57.37
S-EtOAc	5.25±1.99
S-BuOH	12.10±6.16
S-H <sub>2</sub> O	47.60±23.06
Ascorbic acid	5.61±3.43

<sup>A</sup> Antioxidant capacity (DPPH free radical assay)

<sup>B</sup> The  $IC_{50}$  (μg/mL) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve.

#### 2. 각 용매별 추출물의 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포주의 성장에 상사화에서 추출한 물질들이 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 진행하였으며, 3차 증류수로 현탁 하여 만든 0.1, 1, 10 μM 의 표준용액을 처리하였으며, 자극원에 의한 세포의 성장을 알아보기 위해 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 하였다.

대조군을 기준으로 하여 백분율로 세포 성장을 나타난 결과, 화합물을 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 나타내었을 때, 자극원만 처리한 대조군의 세포생존율은 70%의 생존율을 나타내었고 상사화에서 추출물을 처리한 군에서 가장 좋은 세포 생존율을 나타내는 군은 뿌리의 ethyl acetate(R-EA)와 줄기의 ethyl acetate(S-EA)층으로 나타났고, 세포 생존율이 가장 낮은 군은 뿌리의 물 층(R-H<sub>2</sub>O)이었으며, 뿌리의 물 층에서 가장 높은 농도인 10 μM에서 72%의 생존율을 나타내었다. 그 결과 상사화에서 추출한 물질은 0.1~10 μM 의 농도에서는 세포생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 1).

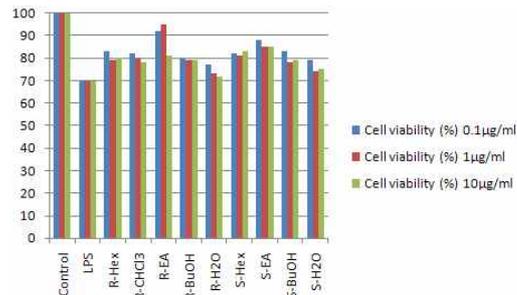


Fig. 1. Effect of *Lycoris squamigera Maxim* extract on the viability of RAW 264.7 cells.

The viability of the cells was measured by MTT. Results were expressed as % of control absorbance.

#### 3. Nitrite oxide 생성에 미치는 영향

상사화에서 추출한 생리활성 물질을 interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) 또는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포

주에 주입하여, 추출물에 의한 염증억제 효과를 측정하였다.

Sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 표준용액으로 하여 생성된  $\text{NO}_2^-$ 의 농도를 정량한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군은  $3.98 \mu\text{M}$  을 나타내었고, 자극원만 처리한 대조군은  $14.29 \mu\text{M}$  을 나타내었으며, 상사화 추출물을 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$  을 처리한 군에서  $\text{IC}_{50}$ (Thehalfmaximalinhibitoryconcentration)를 측정된 결과, 뿌리의 ethyl acetate층에서 가장 많이 NO의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

상사화 추출물이 LPS로 활성화되어 염증반응이 진행된 대식세포로부터 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 효과를 나타낸 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 상사화에서 추출한 생리활성 물질이 염증억제 효과를 가지고 있음을 증명하였다(Fig. 2).

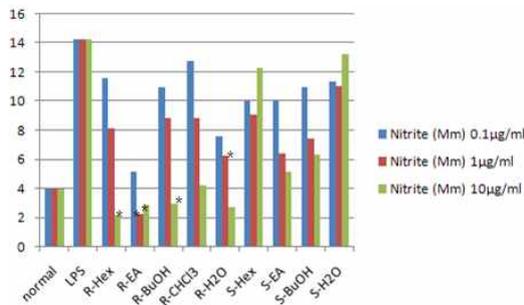


Fig. 2. RAW 264.7 cells were treated with various concentration of *Lycoris squamigera Maxim* extract in lipopolysaccharide(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and the cells were further incubated for 18 h.

Control(normal) cells were incubated with vehicle alone. The concentration of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $p < 0.001$  (\*)

#### 4. 각 용매별 추출물의 TNF- $\alpha$ 의 측정

TNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )는 모두 cytokine 이라고 하여, 세포가 다른 세포에게 신호를 주기

위해 방출하는 생리활성 단백질이다. TNF- $\alpha$ 는 '종양괴사인자'로, 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재 면역반응(innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자이다. 상사화에서 분리한 생리활성 추출물을 interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) 또는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포 주에 주입하여, 추출물에 의한 염증억제 효과를 측정하였다. 자극원만 처리한 대조군은 0  $\mu\text{M}$  을 나타내었으며, 상사화 추출물을 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$  을 처리한 뿌리 etyl acetate(R-EA)추출물 층에서는 TNF- $\alpha$ 의 저해율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 하였다(Fig. 3).

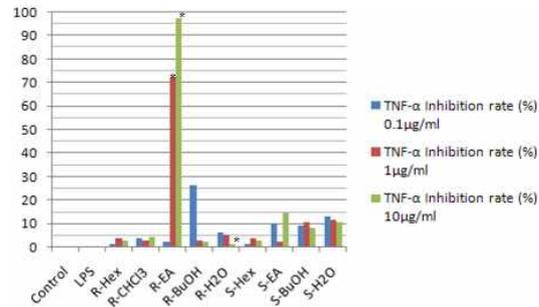


Fig. 3. Inhibition of LPS-activated cytokines by RAW 264.7 cells.

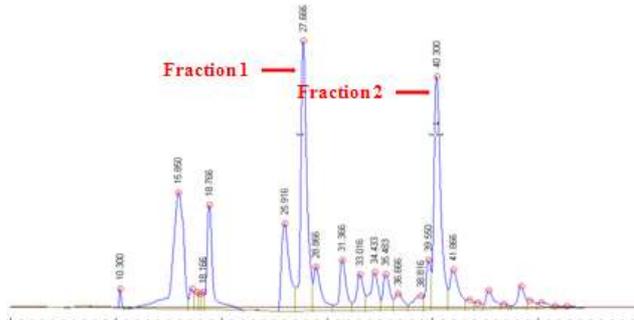
RAW 264.7 cells were cultured with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence or absence of RAW 264.7 cells for 12 h to determine the level of TNF- $\alpha$ . Data represent the mean $\pm$ SD. \*  $p < 0.001$

#### 5. 생리활성 효과를 보이는 분획의 분리

DPPH법에 의하여 항산화 효과와 Nitrite oxide 와 TNF- $\alpha$ 의 저해 능력이 우수한 뿌리의 ethyl acetate층(R-EA)를 HPLC를 이용하여 10 % acet nitrile~50 % acetnitrile를 농도 구배법으로 60 분 동안 분리한 결과 27.66 분에서 fraction 1과 40.300 분에서 fraction 2를 얻었다(Fig. 5).

AN 10~50%, time 60min, pressure: 60

농도: 20mg/mL, inject: 200 μL



HPLC conditions :

Linear gradient : 0 min: 10% acetonitrile in water  
; 60 min -50 % acetonitrile in water

Detection : 254, 280, 350, 370 nm, Flow rate : 3 mL/ min

Fig. 5. The HPLC chromatograms extracts of fraction ethyl acetate in hydrosphere C<sub>18</sub> HPLC column (250 × 20 mm ID, particle S-5 μm).

6. 환원력의 측정

*Lycoris squamigera Maxim* 뿌리의 ethyl acetate 의 분획물을 0 μg/mL~50 μg/mL의 농도로 처리한 후 금속이온 (Fe<sup>3+</sup> → Fe<sup>2+</sup>)을 환원 시키는 환원력을 측정할 결과는 다음과 같았다(Table 2). Fraction 1은 4.383으로 약간의 환원력을 나타내었다. Fraction 2는 21.29로 비교 표준 물질인 BHA, BHT와 α-tocopherol의 22.63, 15.79, 7.70과 비슷한 효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. A slope values of antioxidant scavenging activity on the fractions by the reductive potential test

sample	RAP <sup>B</sup> A/10 <sup>2</sup>
Fraction 1	4.383±0.0025
Fraction 2	21.29±0.0058
BHA	22.63±0.0015
BHT	15.79±0.0069
α-tocopherol	7.70±0.0024

<sup>B</sup>Reducing/antioxidant power (RAP assay)

7. 총 페놀 함량 측정

Phenolic compound는 단순한 phenol류, phenolic acid류, flavonoid류 등이 대부분인데, 대표적인 항산화물질로 항균과 항암 등에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>8)</sup>. 표준 시약으로 사용된 gallic acid 함량과 760 nm에서의 흡광도 간의 회귀 방정식은 Y=A+B로 Y는 760 nm에서 A는 sample, B는 gallic acid 함량이다. Fraction 1은 1.781.47±0.41을 나타냈고, Fraction 2는 3.290.04±0.29의 phenol 함량을 나타냈다. 비교 표준 물질인 BHA, BHT, α-tocopherol은 순차적으로 2.451.77±0.09, 1.292.30±0.16, 2.702.88±0.39와 같은 phenol 함량을 나타내었다(Table 3).

Table 3. The phenolics content volume of ethyl acetate fractions from *Lycoris squamigera Maxim*

sample	TP <sup>c</sup> (mg GAE/g)
Fraction 1	1.781.47±0.41
Fraction 2	3.290.04±0.29
BHA	2.451.77±0.09
BHT	1.292.30±0.16
α-tocopherol	2.702.88±0.39

<sup>c</sup>Total phenolic content (Folin-Cioaltea assay)

8. 생리활성 효과를 보이는 분획의 세포 생존율 측정

RAW 264.7 대식 세포에 뿌리의 ethyl acetate층에서 분리된 fraction 1, fraction 2을 0.1, 1, 5, 10 μM로 처리하고 세포 생존율을 확인하였다.

대조군을 기준으로 하여 백분율로 세포 성장을 나타낸 결과, 화합물을 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100 %로 나타내었을 때, 자극원만 처리한 대조군의 세포생존율은 70 %의 생존율을 나타내었고 상사화 ethyl acetate에서 분리한 fraction 1은 5 μM을 처리한 군에서는 72 %의 생존율을 나타내었고, 10 μM을 처리한 군에서 62 %의 생존율을 나타내었다. fraction 2에서는 10 μM에서 71%의 생존율을 보였다. 그 결과 상사화 ethyl acetate fraction 1에서는 0.1~5 μM의 농도와 fraction 2에서는 0.1~10 μM의 농도에서 세포 생존율에 영향이 없는 것을 확인 하였다(Fig. 4).

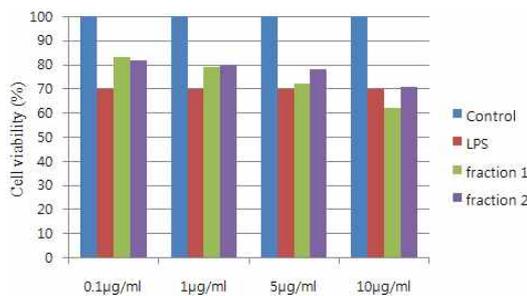


Fig. 4. Effect of root ethyl acetate fractions on

the viability of RAW 264.7 cells.

The viability of the cells was measured by MTT. Results were expressed as % of control absorbance.

IV. 결 론

상사화를 methanol로 추출한 후 각 추출물에 대하여 생리 활성 효과를 측정된 결과 DPPH를 통한 항산화 효과는 뿌리 ethyl acetate 추출물에서 가장 효과가 뛰어났으며, 상사화의 추출물이 면역반응에 미치는 영향에 대한 실험을 진행한 결과 뿌리의 ethyl acetate 층이 가장 우수한 Nitrite oxide 저해 효과를 가졌으며, TNF-α 저해 실험에서는 뿌리의 ethyl acetate층은 농도 의존적으로 TNF-α를 저해함을 관찰 하였다. 이러한 결과는 상사화의 추출물이 염증억제제로서 염증성 질환을 예방하거나 치료할 목적으로 이용할 수 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 원광대학교 교비연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nishibe, S.; Deyama, T. *Nat. Med.* 2002;56(6):227.
2. Boger, D. L. Natural products and nature's lessons. *217th ACS National Meeting.* 1999; Vol(March):21.
3. <http://ko.wikipedia.org>.
4. 조민경; 김영재; 신득용; 최태생, *한국 생약학회*, 2004;35:p62.
5. Feilish M and Stamler J. Methods in nitric oxide reserch. *John Wiley and Sone.* 1996;p492.

6. Oayizu, M.; Studies on Product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986;44:p307.
7. Spanos, G. A. & Wrolstad, R.E.; Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990;38:p1565.
8. Azuma, K., Nakayama, M., Koshika, M., Lpoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Ito, H. and Higashio, H. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J. Agric. Food. Chem.*, 1999;47:p3963.
9. K. Shimada, K. Fujikawa, Yahara and T. Nakamura, *J. Agric. and Food Chem.*, 1992; 40:p945.
10. Mosmann.T.; Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival. *J. Immun. Methods*. 1983;65:p55.
11. Blois, M. S. Antioxidation determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958; 181:p1191.
12. Peter, F. S., The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitrosocomounds. *J. Sci. Food Agric.*, 1975;26:p1761.
13. Mahinda Wettasinghe, Fereidoon shahdi. Antioxidant and free radical-scaenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seed. *Food Chemistry*, 1999;67:p399.
14. Pin-Der, Duh.; Antioxidant activity of Budrock (*Arctium Lappa* Linn). *J. American Oli Chemistry*, 1998;26:p1214.
15. Whang, H.J., W. S. Han, K.R. Yoon.; Quantitative analysis of tital phenolic content in apple. *Analytical Science & Technolgy*, 2001;14:p377.
16. Kim, H.J.,B.S.Jun, S. K. Kim, J.Y. Cha and Y.S. Cho.;Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower. *J .Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2000;29:p1127.
17. Keller, B. *pharmaceut. Composit. Therap.* 2002; p16.
18. Bertolini, A; Ottani, A; Sandrini, M. *Pharmacol. Res.* 2001;44(6):p437.
19. Tsai, p.; Weaver, J.; Cao, G. L.; Pou, S.; Roman, L. J.; Starkov, A. a.; Rosen, G. M. *Biochem. Pharmacol.* 2005;69(6):p971.
20. Stmler J. S.; Loscalzo D. J.; *Science* 1992; 258:p1898.
21. Meta, J. L.;Chen, Y.;Kone, B.C; Metha, P. ;Turner, P. J. LAB. *Clin.med.* 1995;125:p370.