

도화(桃花, Pruni persicae Flos) 분획물의 항산화 및 항염증 효과

이진영¹, 안봉전^{2*}

1 : 호서대학교 한방화장품학과

2 : 대구한의대학교 화장품약리학과

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fractions from Pruni persicae Flos

Jin-Young Lee¹, Bong-Jeun An^{2*}

1 : Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Korea,

2 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Korea.

ABSTRACT

Objectives : The solvent extracts of Pruni persicae Flos were investigated for the activities of anti-oxidant and anti-inflammatory effects to apply as a functional ingredient for cosmetic products.

Methods : In this study, the fractions of P. persicae Flos were extracted with 70.0% acetone and purified using Sephadex LH-20 column chromatography. As a result, eight fractions were isolated. We performed MTT assay, total polyphenol contents, DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition assay, astringent activity assay, hyaluronidase inhibition assay and the production of nitric oxide.

Results : For anti-oxidant effects, the electron donating ability of fraction (Fr.) 2-5, Fr.-8 isolated from P. persicae Flos was above 90.0% at 100 ppm respectively. The superoxide dismutase (SOD) - like activity of Fr.-5 isolated from P. persicae Flos was 92.1% at 1,000 ppm. The xanthine oxidase inhibitory effect of Fr.-6 isolated from P. persicae Flos was about 83.3% at 1,000 ppm. Hyaluronidase inhibition activity related to the anti-inflammation effect was 94.0% for Fr.-4 isolated from P. persicae Flos at 500 ppm. In the anti-inflammation effect, the Fr.-4 isolated from P. persicae Flos inhibited the generation of nitric oxide.

Conclusions : All these findings suggested that the fractions of P. persicae Flos has a great potential as a cosmeceutical ingredient with a anti-oxidant and anti-inflammatory effects.

Key words : Pruni persicae Flos, anti-oxidant, anti-inflammatory, nitric oxide, column chromatography

서론

인간의 몸속에서 세포가 산소를 이용하여 대사 작용을 하는 과정에서 활성 산소라는 부산물이 생긴다. 이러한 활성산소는 강력한 세포독성을 가지고 있기 때문에 세포막이나 단백질 혹은 DNA의 구조와 기능을 손상시키고 이러한 손상이 축적되면 암, 심장병, 백내장, 기억력 장애, 노화 등이 일어난다는 것이다.^{1,2)} 이러한 세포독성물질을 분해하여 노화를 방지하는 작용을 하는 물질을 항산화 물질이라고 한다³⁾. 이는 산소에서 생성되는 활성산소(Reactive Oxygen Species; ROS) 생성을 감소시키며 생성된 활성산소에 의한 손상부위를 복구하거나 새로운 물질로 교체할 수 있기 때문이다⁴⁾. 생체 내에서는 기본적으로

생성되는 활성산소와 free radical을 방어할 수 있는 항산화 효소로서는 superoxide dismutase (SOD)⁵⁾, catalase⁶⁾, peroxidase⁷⁾ 등이 있으며, 항산화를 나타내는 대표적 물질로서 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluen (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ)와 천연 항산화제로는 tocopherol⁸⁾, sesaminol, capsaicin, quercetin⁹⁾, gallic acid¹⁰⁾ 등이 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 인체 유해성에 의해 제품에 사용 시 배합 비율이 제한적이며 천연 항산화제의 경우 제품에 사용 시 다른 성분과의 혼화성이 낮아 사용성이 제한적이다. 따라서 인체 유해성이 낮고 혼화성이 뛰어나며, 활성산소 및 free radical을 방어가 우수하고, 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 소재를 검

*교신저자 : 안봉전, 경북 경산시 한의대로 1 대구한의대학교 화장품약리학과
· Tel : +82-53-819-1429 · Fax : +82-53-819-1429 · E-mail : anbj@dhu.ac.kr
· 접수 : 2012년 07월23일 · 수정 : 2012년 09월 07일 · 채택 : 2012년 09월 10일

색하고자 본 연구를 실시하였다.

도화(桃花, *Pruni persicae Flos*)는 복사꽃이라 하여, 복숭아나무를 복사나무라고도 부른다. 도화의 성분은 정확히 밝혀지지 않았으나, 복숭아에는 단백질, 지질, 당질, 회분, 칼슘, 인, 철분, 나트륨, 칼륨, 비타민 A, B1, B2, C, E 등이 있어, 미용에 신경 쓰는 여성들에게 좋다^{11,12}. 고려도경이라는 한방서적에서는 “성질이 고르고 맛이 쓰며 독이 없고, 석림(石淋)을 깨트리고, 대·소변을 이롭게 하며, 세 가지 벌레를 내리고 주(桂)와 악귀(惡鬼)를 죽이고 얼굴빛을 아름답게 한다” 하여 대장에 발생하는 병이나 얼굴에 나타나는 부스럼 등에 사용했다는 기록이 있다¹³. 또한 도화에는 flavonoids 유래의 kaempferol와 그 배당체, albamyricetin 등의 성분들이 함유되어 있다¹⁴. 이에 도화를 분획하여 분획물들의 활성을 검토하고, 어떤 분획물의 활성으로 인하여 항산화 및 항염증 효과가 있는지 확인하여, 화장품 및 식품의 천연소재로서 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시료 추출

실험에 사용한 도화(桃花, *Pruni persicae Flos*)는 4월 초순에 경북 경산에서 채집하여 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였다. 분획을 위한 용매는 선행연구에서 3가지 용매(물, 에탄올, 아세톤) 중 전반적으로 활성이 우수한 아세톤을 이용하여 추출하였다. 즉 도화 500 g에 70% 아세톤을 시료 중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상정액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하고, sephadex LH-20 column chromatography (Sigma, USA)를 이용하여 methanol과 H₂O의 비율을 0:100에서 100:0의 비율로 순차적으로 전개시켜, silica TLC plate를 이용하여 전개 및 anisaldehyde-H₂SO₄로 발색시켜 확인하여 8개의 분획물을 얻었다(Fig. 1).

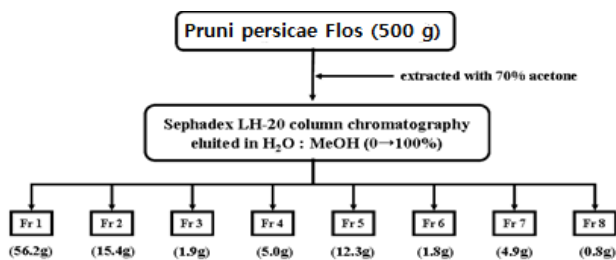


Fig. 1. Purification procedure for the 1st fractions isolated from *Pruni persicae Flos*.

2. 세포 배양 및 실험 시약

항산화능과 항염증 측정 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, hyaluronidase, hyaluronic acid, p-dimethylaminobenzaldehyde, sodium nitrite 및 griess reagent 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정에 사용된 세포주는 macrophage 세포인 Raw 264.7을 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배

양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 또한 세포 생존율 측정에 사용한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 정량은 AOAC¹⁵에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 3 ml에 folin-ciocalteu phenol reagent 시약 1 ml를 가하고, 1 N HCl 0.2 ml을 넣은 후, 포화용액 Na₂CO₃ 1 ml를 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고, 640 nm에서 흡광도를 측정 후, 표준물질인 tannic acid로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

4. 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법¹⁶을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

5. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법¹⁷에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 tris-HCl 완충용액(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

6. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법¹⁸에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 ml와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml에 xanthine (2 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 U/ml) 0.1 ml를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가군

와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 uric acid 생성량}}{\text{무첨가군의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

7. Astringent 활성 측정

Astringent 활성 측정은 Lee 등¹⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1 : 1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Astringent 활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

8. Hyaluronidase 저해활성 측정

Hyaluronidase (HAase) 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucozoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다²⁰⁾. 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (7,900 U/ml) 0.05 ml와 시료용액 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 12.5 mM CaCl₂ 0.1 ml를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HA (12 mg/ml)를 첨가하여 다시 40분간 배양하여 0.4 N potassiumtetraborate 0.1 ml 및 0.4 N NaOH 용액을 0.1 ml 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각 시킨 반응물에 발색제로 DMAB 시약 3 ml를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출 하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

9. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법²¹⁾에 따라 측정하였다. Macrophage (Raw 264.7)를 96 well plate에 0.6~8 × 10³ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : ethanol (1 : 1) 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

10. Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide (NO) 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide (NO)의 량을 nitrite와 nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent (Sigma, USA)를 사용하였으며, 6 well plate에 2 × 10⁶개의 cell을 confluence가 80%일 때, PBS로 2번 세척한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양 시킨 후에 lipopolysacchride (LPS) 10 μg/ml을 control군을 뺀 모든 well에 다 넣어서 자극시켰다. 2시간 후에 시료를 농도별로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

결 과

1. 도화 추출물의 분획 결과

도화(桃花, Pruni persicae Flos) 500 g를 sephadex LH-20 column chromatography (Sigma, USA)를 이용하여 1차 분획하고 TLC plate의 발색유무에 따라 8개의 분획물로 분류하였다. 그 결과 fraction (Fr.) 1은 56.2 g, Fr. 2는 15.4 g, Fr. 3은 1.9 g, Fr. 4는 5.0 g, Fr. 5는 12.3 g, Fr. 6은 1.8 g, Fr. 7은 4.9 g 및 Fr. 8은 0.8 g를 얻을 수 있었다. 이 8가지 1차 분획물을 이용하여 항산화 및 항염증 효과를 확인하였다.

2. 도화 분획물의 총 폴리페놀 함량 확인

도화 분획물을 표준물질인 tannic acid를 기준물질로 하여 표준곡선을 그린 후 도화로부터 분리된 분획물의 폴리페놀 함량을 측정한 결과 Table 1과 같이 나타내었다. 도화 Fr. - 1의 경우 27 mg/100 g의 폴리페놀 함량을 나타내었으며, Fr. - 8의 경우 도화 분획물 중 가장 많은 607 mg/100 g의 폴리페놀이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 나머지 분획물 2, 3, 4, 5, 6 및 7의 경우도 각각 234, 420, 575, 277, 180, 135 mg/100 g의 폴리페놀이 함유되어 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 도화 분획물에도 상당히 많은 폴리페놀이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. The contents of total polyphenol fractions isolated from Pruni persicae Flos

Fraction numbers	polyphenol contents (mg / 100 g)
1	27
2	234
3	420
4	575
5	277
6	180
7	135
8	607

3. 도화 분획물의 전자공여능 확인

도화 분획물의 전자공여능 측정 결과, Fig. 2와 같이 나타내었다. Fraction (Fr) - 1을 제외한 나머지 분획물 100 ppm에서 Fr. - 6, 7은 각각 75.6, 74.9%의 효과를 나타내었으며, Fr. - 2, 3, 4, 5 및 8은 90.0% 이상의 전자공여능을 나타내어 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다. 이 결과는 Lee와 An이 보고²²⁾한 항산화능 측정에서 도화 열수 및 에탄올 추출물 100 ppm에서 60%의 활성을 나타낸 결과와 비교하여 1차 분획으로도 높은 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

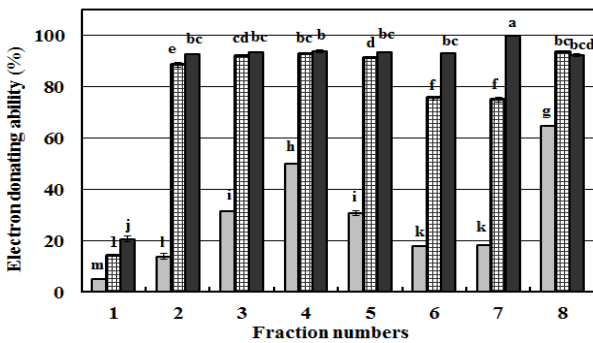


Fig. 2. Electron donating ability of fractions isolated from Pruni persicae Flos. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. 도화 분획물의 SOD 유사활성 확인

도화 분획물의 SOD 유사활성 측정 결과, Fr. - 5는 1,000 ppm에서 92.1%의 유사활성을 나타내었으며, Fr. - 2를 제외한 Fr. - 1, 3, 4, 6, 7 및 8은 각각 20.7, 40.6, 68.6, 38.5, 45.7, 29.4%의 SOD 유사활성을 나타내었다 (Fig. 3). 특히 Fr. - 5는 분획물 중 가장 활성이 우수하였으며, Lee와 An이 보고²²⁾한 도화 열수, 에탄올, 아세톤 추출물의 활성보다 3배 정도의 높은 효과를 나타내어, 피부 노화 방지를 위한 천연 소재로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

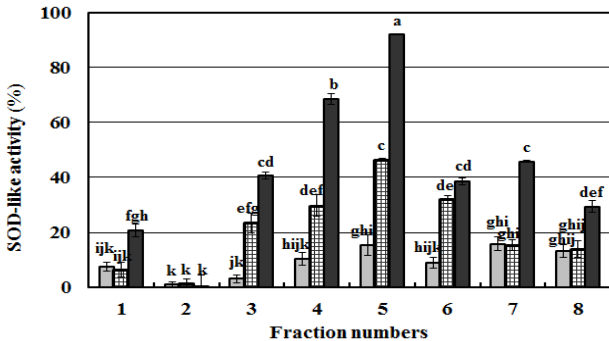


Fig. 3. SOD-like activity of fractions isolated from Pruni persicae Flos. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. 도화 분획물의 xanthine oxidase 저해활성 확인

도화 분획물의 xanthine oxidase 저해 활성을 측정된 결과, Fig. 4와 같이 나타내었다. 도화 Fr. - 2, 6이 1,000 ppm에서 각각 66.7, 83.3%의 저해활성을 나타내었으며, Fr. - 1을 제외한 Fr. - 3, 4, 5, 7 및 8이 각각 27.1, 34.7, 41.1, 26.1, 51.8%의 저해활성을 나타내어 전반적으로 유의한 결과를 나타내었다. Xanthine oxidase의 저해효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있는데, 도화 분획물 또한 항산화제로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

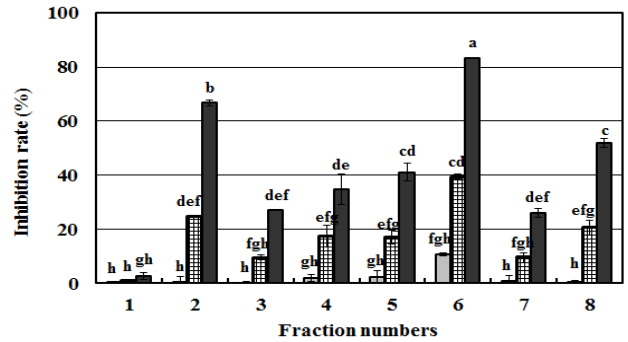


Fig. 4. Inhibition rate of fractions isolated from Pruni persicae Flos on xanthine oxidase. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. 도화 분획물의 astringent 활성 확인

도화 분획물의 수렴효과를 측정하기 위하여 astringent 활성을 측정된 결과 Fig. 5와 같이 나타내었다. 도화 Fr. - 4의 경우 5,000 ppm에서 57.4%의 활성을 나타내었으며, 그 외 Fr. - 2, 7의 경우 5,000 ppm에서 54.1, 49.3%의 astringent 활성을 나타내었다. Fr. - 1, 3, 5, 6 및 8의 경우 14.4, 34.7, 35.6, 31.2, 13.5%의 astringent 활성을 나타내었다. 이는 Lee와 An이 보고²²⁾한 도화 열수, 에탄올 및 아세톤 추출물의 astringent 활성이 30.0% 미만을 나타낸 결과와 비교하여 1차 분획물의 경우 효과가 상승했음을 확인할 수 있었으며, vitamin C의 경우 5,000 ppm에서 33.5%의 활성을 나타낸 결과와 비교하여 도화 Fr. - 2, 4, 7의 경우 더 높은 astringent 활성을 나타내었다.

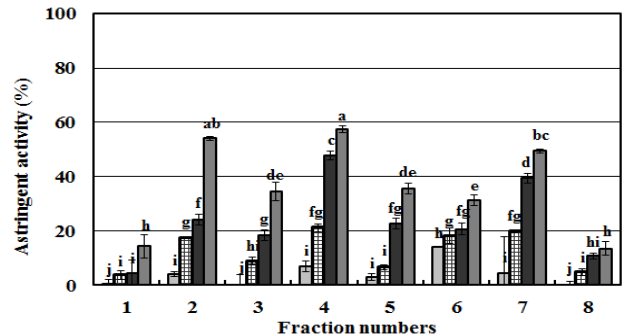


Fig. 5. Comparison of astringent activity of fractions isolated from Pruni persicae Flos. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

6. 도화 분획물의 hyaluronidase 저해활성 확인

도화 분획물이 hyaluronic acid (HA)를 분해하는 hyaluronidase (HAase)를 저해할 수 있는지 확인하기 위하여 HAase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. 도화 Fr. - 4의 경우 500 ppm에서 94.0% 이상의 저해효과를 나타내었으며, Fr. - 3도 1,000 ppm에서 95.0% 이상의 저해효과를 나타내어 HAase 저해효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 나머지 분획물 2, 5, 6, 7 및 8의 경우도 1,000 ppm에서 각각 52.0, 52.2, 48.3, 29.2, 69.3%의 저해효과를 나타내어 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다. 이는 Lee와 An이 보고²²⁾한 도화 열수, 에탄올 및 아세톤 추출물의 hyaluronidase 저해활성 측정에서 30% 중반의 활성과 비교하여 1차 분획만으로도 큰 상승효과를 기대할 수 있으며, Fr. - 4의 경우 hyaluronic acid (HA)의 분해효소인 hyaluronidase의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다⁴¹⁾.

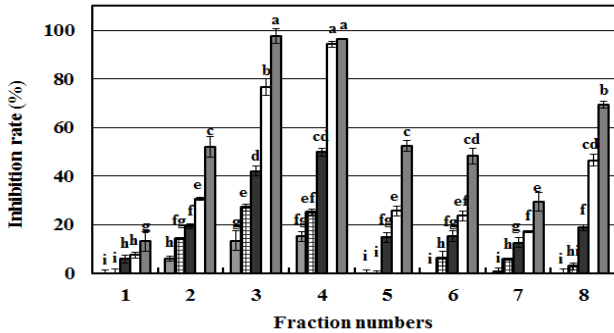


Fig. 6. Inhibition rate of fractions isolated from Pruni persicae Flos on hyaluronidase. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

7. 도화 분획물에 의한 macrophage (Raw 264.7) 세포의 생존율 확인

도화 분획물에 의한 macrophage 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 7과 같이 나타내었다. 즉 도화 분획물이 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 nitric oxide의 생성을 감소시킨 것인지, 추출물의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하는 것인지를 측정된 결과, 도화 Fr. - 1, 6 및 7의 경우 1,000 ppm에서 비교적 높은 70.0% 이상의 세포 생존율을 나타내어, 시료의 농도를 1,000 ppm 이하로 결정하였으며, 나머지 분획물 2, 3, 4, 5 및 8의 경우 약간의 독성은 있었지만, 그 수치가 미비해 분획물 500 ppm 이하에서 그 농도를 결정하여 nitric oxide 저해활성을 측정하였다.

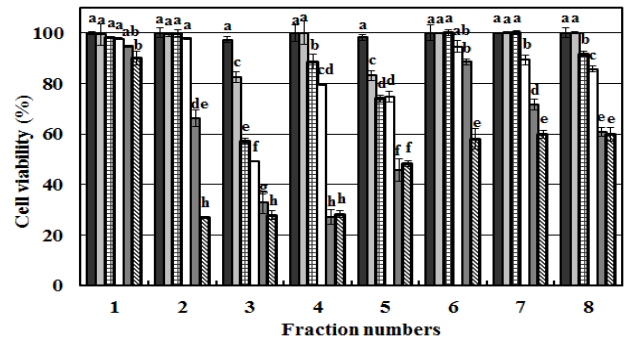


Fig. 7. Cell viability of fractions isolated from Pruni persicae Flos on Raw 264.7. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

8. 도화 분획물의 nitric oxide 저해활성 확인

도화 분획물의 Raw 264.7 세포의 nitric oxide (NO) 저해활성을 측정하기 위하여 세포 독성이 적은 1,000 ppm 이하의 농도에서 NO량을 측정하여 Fig. 8, 9에 나타내었다. LPS군에서는 6시간 후부터 control군에 비교하여 NO 생성량이 증가하였으며, 도화 Fr. - 1, 2를 처리한 군에서는 NO 생성량이 유의성 있게 억제되지 않았으나, Fr. - 3, 4, 5, 6, 7 및 8을 농도별로 처리한 군에서는 NO 생성량이 유의성 있게 억제되었다. 특히 Fr. - 4를 처리한 군에서 NO 저해활성이 우수하였다. 이는 *in vitro*에서 측정된 항염증 실험인 hyaluronidase 저해활성에서 도화 분획물 중 Fr. - 3, 4에서 항염증 효과가 높게 나타났는데, Fr-3의 경우 분획물 독성의 영향으로 활성이 높게 나타난 것으로 판단되며, Fr-4의 경우 항염증 활성이 우수함을 hyaluronidase 및 nitric oxide 저해활성에서 확인할 수 있었다.

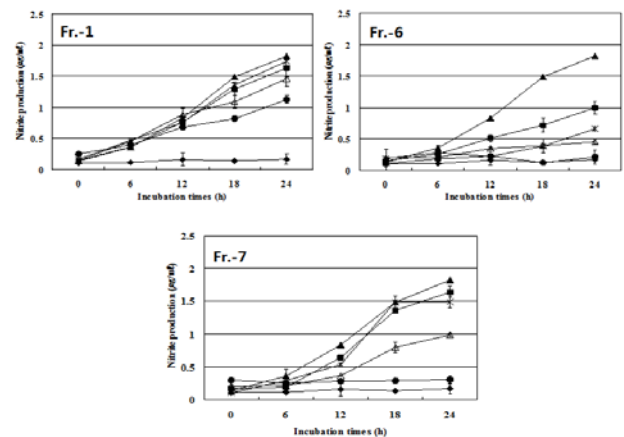


Fig. 8. Inhibition rate of fraction-1, 6, 7 isolated from Pruni persicae Flos on the production of nitric oxide in Raw 264.7 cells. Legend: ◆ : control, ▲ : lipopolysaccharide (LPS), ■ : LPS + Fr. - 1, 6, 7 at 50 ppm, ✖ : LPS + Fr. - 1, 6, 7 at 100 ppm, △ : LPS + Fr. - 1, 6, 7 at 500 ppm, ● : LPS + Fr. - 1, 6, 7 at 1,000 ppm

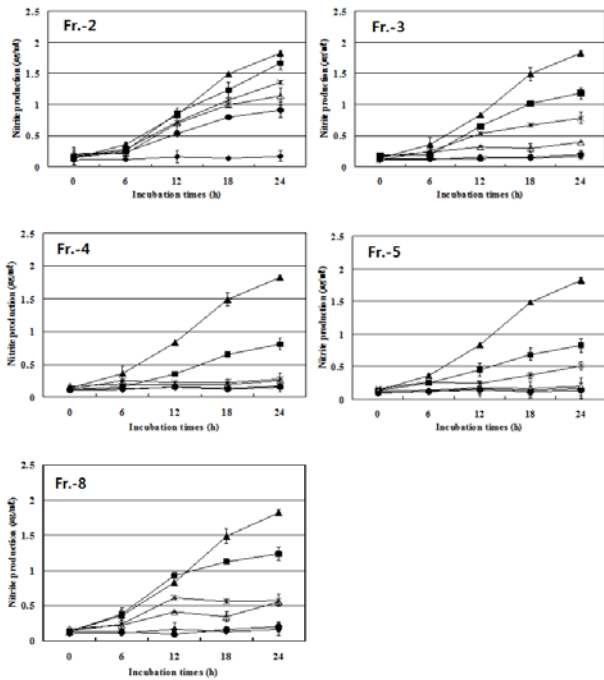


Fig. 9. Inhibition rate of fraction-2, 3, 4, 5, 8 isolated from *Pruni persicae* Flos on the production of nitric oxide in Raw 264.7 cells.

- ◆ : control
- ▲ : lipopolysaccharide (LPS)
- : LPS + Fr. -2, 3, 4, 5, 8 at 10 ppm
- ✱ : LPS + Fr. -2, 3, 4, 5, 8 at 50 ppm
- △ : LPS + Fr. -2, 3, 4, 5, 8 at 100 ppm
- : LPS + Fr. -2, 3, 4, 5, 8 at 500 ppm

고찰

최근 천연물을 중심으로 한 학문의 발전 및 식품이나 의약품개발에 있어서의 자연지향 추세에 따라 천연물 유래의 각종 생리활성 물질에 대한 학문적 및 산업적 응용의 관심이 증대되고 있다²³. 그 중에서도 천연 항산화 물질에 대한 관심이 증폭되고 있고, 이에 대한 연구가 널리 진행 중에 있는데, 식물체에 광범위하게 존재하는 폴리페놀은 대표적인 천연 항산화 물질의 하나이다. 이 폴리페놀은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, 일반적으로 8000여개 이상의 폴리페놀 구조가 알려져 있다^{24,25}. 일반적으로 페놀계 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA (Butylated hydroxy anisol)와 BHT (Butylated hydroxy toluene)는 그 효과와 경제성 그리고 안정성 때문에 많이 사용되어 왔지만 합성식품첨가물의 일반 기피현상뿐만 아니라 과량 섭취 시 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한독성작용을 일으키는 것으로 알려져 안전한 대체 항산화제의 연구가 필요하다²⁶. 따라서 인체에 무해하고 항산화력이 우수한 천연 항산화제에 관한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔으며, 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물 유래이다. 대부분의 식물들의 항산화능 화합물은 주로 polyphenol 물질들이 천연 항산화제로서의 기능이 잘 알려져 있다²⁷.

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서

특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다²⁸. 또한 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다^{29,30}. 이러한 노화의 척도로 알려진 DPPH 활성을 도화 분획물로 측정된 결과 100 ppm에서 90% 이상의 활성을 나타내는 분획물들이 많아 합성항산화제인 BHT 보다도 우수한 천연 항산화제가 될 것으로 판단된다.

항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)과 반응하여 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 생성하는 효소로, 산소를 소비하는 모든 생물 중에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다^{31,32}. 또한 산소분자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^- \cdot 2O_2 + 2e^- \rightarrow 2 \cdot O_2^-$)을 제거하는 첫 번째 방어 메커니즘에 관여하는 중요한 효소($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2^-$)이며, 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증 소재나 피부 노화방지를 위한 미용소재로 화장품 등의 첨가제로서 사용되어지고 있다^{33,34}. 이러한 피부 노화방지와 밀접한 관련이 있는 SOD 유사활성을 측정된 결과 도화 분획물 중 Fr.-5의 활성이 1,000 ppm에서 90% 이상의 활성을 나타내었으며, 그 외 3, 4, 7 분획물 또한 40% 이상의 활성을 나타내어 피부 노화 방지를 위한 천연소재로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

Xanthine oxidase는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는(free radical generation) 효소이다^{35,36}. 이러한 생체 내 유리기 생성계의 하나인 xanthine oxidase는 purine, pyrimidine, pteridine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체 내에서는 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 uric acid를 생성하는 반응의 촉매로 작용한다³⁶. 특히 식물계에 널리 존재하는 플라보노이드류 성분 중 분자 내 hydroxy기의 위치에 따라 그 저해효과가 다르며³⁷, gallate기를 함유한 플라보노이드는 경쟁적으로 저해한다고 보고되고 있다³⁸. 따라서 xanthine oxidase의 저해효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 도화 분획물 6의 경우 1,000 ppm에서 80%의 저해활성을 나타내었으며 2와 8 분획물 또한 50% 이상의 저해활성을 나타내어 유의한 결과를 나타내었다.

수렴작용의 원리는 피부 단백질의 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성하여 피부가 수축되는 현상을 말한다³⁹. 수렴이란 뜻에는 기본적으로 주름이 지고 혹은 움츠러드는 의미가 있으며, 수렴제는 피부와 점막 혈관 등을 수축시키는 작용이 있고, 세포간극 및 림프간극을 가로막아 점액의 분비를 억제시키는 효과가 있다¹⁹. 또한 수렴제는 단백질과 결합하는 성질을 가지기 때문에 일반적으로 헤모글로빈의 단백질

질이 추출물과 결합하는 정도에 따라서 수렴효과 정도를 판단할 수 있다. 이러한 수렴작용에는 외용 혹은 내용에 의해서 피부와 점막의 표면에 난용성의 피막을 형성하고 그 결과 국소를 보호하거나, 혹은 조직을 조밀하게 하여 세포막의 투과성을 감소시키는 효과가 있다고 할 수 있다. 이러한 수렴작용의 활성을 확인하여 스킨 및 미스트의 소재로 사용하기 위하여 도화 분획물을 측정된 결과 분획물 2, 4, 7번이 유의성 있는 결과를 나타내었으며, 특히 Fr.-4의 저해활성이 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

고분자 다당인 히아루론산(hyaluronic acid, HA)은 진피층의 섬유아세포로부터 산출되어, 표피, 진피에 있어서 주요한 세포외 매트릭스로서 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide⁴⁰⁾. 또한 HA는 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해 산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosism collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁴¹⁾. 이는 결국 고분자 HA의 분해효소인 hyaluronidase (HAase)의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서 항염증 효과를 기대할 수 있다⁴¹⁾. 도화 분획물 3, 4의 경우 90% 이상의 hyaluronidase 저해활성을 나타내어, 이러한 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX)-2에 의해 형성된다⁴²⁾. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관 확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다⁴³⁾. NO 자체는 반감기가 6~10초 정도로 매우 짧으며, 이러한 NO를 형성하는 nitric oxide synthase (NOS)는 물리 화학적 성상에 따라 type I, II 및 III 등 3종류의 동종 효소로 나누어진다. Type I(neuronal NOS, nNOS)과 type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS (constitutive NOS)로 분류하며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS (iNOS)로 나누어진다⁴³⁾. 이러한 NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 형성한다⁴⁴⁾. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며, 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다⁴⁵⁾. 일반적으로 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 병리학적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발 한다^{46,47)}. 도화 분획물의 경우 in-vitro 실험에서 확인한 분획물 중 분획물 4가 NO 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었으며, 농도 의존적으로 NO에 대한 면역 활성을 나타내어 항염증 효과가 우수할 것으로 판단된다.

이러한 1차 분획만으로도 도화 추출물 자체보다 활성이 2배 이상 증가함을 확인할 수 있었고 또한 항산화 및 항염증 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 차후 이들 분획물들을 좀 더 세분화하고 분리정제 및 성분 분석을 통하여 어떤 물질이 이러한 효과를 내는지 파악한다면 더 좋은 천연물질이 될 것으로 사료된다.

결론

최근 천연물을 중심으로 한 학문의 발전 및 식품이나 화장품 개발에 있어서의 자연지향 추세에 따라 천연물 유래의 각종 생리활성 물질에 대한 학문적 및 산업적 응용의 관심이 증대되고 있다. 그 중에서도 천연 항산화 물질에 대한 관심이 증폭되고 있고, 이에 대한 연구가 널리 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는 도화를 분리정제하여 물질을 세분화하고, 어떤 물질이 항산화 및 항염증 효과에 영향을 미치는지에 대해 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 총 폴리페놀 함량 분석에서 분획물 8이 607 mg/100 g의 폴리페놀이 함유되어 있어 도화 분획물 중 가장 많은 폴리페놀이 함유되어 있었다.
2. 전자공여능 측정에서 2, 3, 4, 5, 8 분획물 100 ppm에서 90% 이상의 높은 활성을 나타내었다.
3. SOD-유사활성능 측정에서 분획물 5가 1,000 ppm에서 92.1%의 활성을 나타내었으며, xanthine oxidase 저해활성 측정에서 분획물 2, 6이 1,000 ppm의 농도에서 각각 66.7, 83.3%의 활성을 나타내어 천연소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.
4. 수렴효과 측정을 위한 astringent 활성에서 도화 분획물 4가 5,000 ppm에서 57.4%의 활성을 나타내었다.
5. 항염증 효과를 확인하기 위한 hyaluronidase 저해활성 측정에서 도화 분획물 4가 500 ppm의 농도에서 94%의 활성을 나타내었으며, 분획물 3도 75% 이상의 활성을 나타내었다.
6. 도화 분획물의 섬유아세포에 대한 세포 생존율을 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포를 이용하여 MTT assay를 측정한 결과 도화 분획물 1, 6, 7은 1,000 ppm 이하에서 70% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, 분획물 2, 3, 4, 5, 8은 500 ppm에서 nitric oxide (NO) 저해활성을 측정하였다. 그 결과 도화 분획물 4의 NO 저해활성이 가장 우수하였다.

이상의 결과로 보아 도화 분획물의 항산화 및 항염증 효과가 유의성 있는 결과를 보여, 천연소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 도화추출물 보다 분획물의 경우 2배 이상의 활성을 보여 좀 더 세분화하여 단일물질을 분리한다면 더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kim CH, Park JH, Lim JK, Lee KJ, Chung GY, Jeong HJ. The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger. Korean J Medicinal Crop Sci. 2003 ; 11(1) : 31-9.
2. Guo DA. Quality control of herbal medicines and their related products. Korean J Crop Sci. 2006 ; 51 : 55-9.
3. Miyake T. Active oxygen and oxidative stress. Masui. 1988 ; 37(2) : 137.

4. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Arch Biol Med Exp (Santiago). 1988 ; 21(1) : 85-92.
5. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972 ; 247(10) : 3170-5.
6. Blaschko H. The mechanism of catalase inhibitions. Biochem J. 1935 ; 29(10) : 2303-12.
7. Ettore J. The estimation of peroxidase activity. Biochem J. 1949 ; 44(1) : 35-8.
8. Ridgway RR, Drummond JC, Wright MD. The biological activity of the oxidation products of alpha-tocopherol. Biochem J. 1940 ; 34(12) : 1569-73.
9. Quat-Hao Nguyen, Metche M, Urion E. Intermediary products in the autoxidation of quercetin. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 1965 ; 260(26) : 7047-9.
10. Afanas'ev GG, Pelevina II, Lipchina LP, Emanuel' NM. Increasing the effectiveness of ionizing radiation by inhibitors-antioxidants. Izv Akad Nauk SSSR Biol. 1968 ; 3 : 333-44.
11. Seo MH, Lee YM. The we tree to find easily(3). hyeonamsa Press. Seoul : Korea, 2000 : 146-7.
12. The Korean society of medical crop science. Synthesis of pharmaceutical botany. Hakchangsa Press, Seoul : Korea, 2001 : 190-1.
13. Park YH. The story about my country tree. eBeecom Press, Seoul : Korea, 2004 : 308-9.
14. Heo J. Donguibogam. Daejoongseokwan Press, Seoul : Korea, 1994 : 173, 301, 1386.
15. Association of Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed, Washington (DC) : Association of Analytical Chemists INC.: 1984.
16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 181 : 1199-200.
17. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 ; 47(3) : 469-74.
18. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J Biol Chem. 1969 ; 244(14) : 3855-63.
19. Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. Kor J Herbology. 2002 ; 17(2) : 51-60.
20. Reissig JL, Storminger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J Biol Chem. 1995 ; 271(2) : 959-66.
21. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987 ; 47(4) : 936-42.
22. Lee JY, An BJ. Anti-oxidant and anti-inflammation activities of *Prunus persica* Flos. J Appl Biol Chem. 2010 ; 53(3) : 162-9.
23. Park SW, Woo CJ, Chung SK, Chung KT. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. Korean J Food Sci Technol. 1994 ; 26(4) : 464-70.
24. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev. 1998 ; 56(11) : 317-33.
25. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. Korean J Food Sci Technol. 1995 ; 27(1) : 80-5.
26. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxy toluene. J Am Oil Chem Soc. 1975 ; 52(1) : 59-63.
27. Huang MT, Ho ST, Lee CY. Phenolic compounds in food and their effects on health (II): Antioxidants and Cancer Prevention. Washington DC : ACS Publications. 1992 ; 507 : 54-71.
28. Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH. Antioxidant and antitumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. Korean J Food Preserv. 2006 ; 13(1) : 83-7.
29. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. J Agric Food Chem. 2004 ; 52(16) : 5240-4.
30. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. Korean J Food Sci Technol. 1995 ; 27(1) : 80-5.
31. Pryor WA. Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions. Annu. Rev Physiol. 1986 ; 48 : 657-67.
32. Greenstock CL. Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. Med Hypotheses. 1993 ; 41(5) : 473-82.
33. McKersie BD, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative

- stress tolerance. *Plant Physiol.* 2000 ; 122(4) : 1427-37.
34. Grasbon T, Grasbon-Frodl EM, Juliusson B, Epstein C, Brundin P, Kampik A, Ehinger B. CuZn superoxide dismutase transgenic retinal transplants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999 ; 237(4) : 336-41.
35. Ziegler DW, Hutchinson HD, Kissling RE. Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infect Immun.* 1971 ; 3(2) : 237-42.
36. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J.* 1973 ; 131(2) : 187-90.
37. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod.* 1988 ; 51(2) : 345-8.
38. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Ikegami Y, Matsuda M, Yazaki K, Agata I, Nishibe S, Noro T, Yoshizaki M, Okuda T. Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Med.* 1991 ; 57(1) : 83-4.
39. Lodetti G, D'Abrosca F, Fontana P, Pavoni E, Gigola P. Set up of in vitro methods able to detect the safety of astringent liquids. *Minerva Stomatol.* 2004 ; 53(6) : 361-7.
40. Lee NH, Lee SJ, Jung DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ. Screening of the tyrosinase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor J Pharmacogn.* 2001 ; 32(3) : 175-80.
41. Ghosh P. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol.* 1994 ; 12(1) : 75-82.
42. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 ; 43(2) : 109-42.
43. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6(12) : 3051-64.
44. Lugnier C, Keravis T, Eckly-Michel A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharmacol.* 1999 ; 50(4) : 639-52.
45. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 ; 88(17) : 7773-7.
46. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1993 ; 178(2) : 749-54.
47. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* 1996 ; 316(Pt 1) : 209-15.