

떡쭈 추출물의 항산화 효과 및 활성 성분 분석

김해수 · 임나리 · 박준호* · 김명옥* · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, *스킨큐어(주)
(2014년 1월 20일 접수, 2014년 2월 7일 수정, 2014년 2월 11일 채택)

Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Gnaphalium affine* D. DON. Extracts

Hae Soo Kim, Na Ri Im, Jun Ho Park*, Myeong-Ok Kim*, Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center,
Nanobiocosmetic Lab., Seoul National University of Science and
Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
*Skin Cure Co., Ltd, Jeju, Korea

(Received January 20, 2014; Revised February 7, 2014; Accepted February 11, 2014)

요약: 본 연구에서는 떡쭈 추출물의 항산화 활성 및 활성 성분을 확인하였다. 모든 실험은 떡쭈 추출물의 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 이용하여 진행하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)법을 이용한 free radical 소거활성(FSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(6.15 $\mu\text{g/mL}$)이 비교물질인 (+)- α -tocopherol (8.89 $\mu\text{g/mL}$)보다 높게 나타났다. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 떡쭈 추출물의 총 항산화능(OSC₅₀)은 70% 에탄올 추출물의 경우 1.60 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획의 경우 0.075 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획의 경우 2.28 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교물질인 L-ascorbic acid (6.88 $\mu\text{g/mL}$)보다 큰 활성을 나타내었다. 사람 적혈구의 ¹O₂로 유도된 세포손상에 대한 보호효과 실험에서 70% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획의 τ_{50} 은 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 52.0, 60.6 min으로 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (38.0 min)보다 더 큰 세포 보호 효과를 나타내었다. TLC와 HPLC를 이용한 아글리콘 분획의 성분분석 결과 luteolin, apigenin 등이 존재함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 떡쭈 추출물은 라디칼을 포함한 활성산소종을 소거하는 항산화제로서 응용될 수 있음을 시사한다.

Abstract: In this work, the antioxidative effects and active component analysis of *Gnaphalium affine* D. DON. (*G. affine*) extracts were investigated. All experiments were performed with 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction of the *G. affine* extract. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀) of ethyl acetate fraction (6.15 $\mu\text{g/mL}$) of the *G. affine* was higher than that of (+)- α -tocopherol (8.89 $\mu\text{g/mL}$), which is known as a reference control. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of the 70% ethanol extract (1.60 $\mu\text{g/mL}$), ethyl acetate fraction (0.075 $\mu\text{g/mL}$) and aglycone fraction (2.28 $\mu\text{g/mL}$) of extract of *G. affine* on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system using the luminol-dependent chemiluminescence assay were much higher than that of L-ascorbic acid (6.88 $\mu\text{g/mL}$). The cellular protective effects of 70% ethanol extract (τ_{50} = 52.0 min) and aglycone fraction of the extract (τ_{50} = 60.6 min) on the ¹O₂-induced cellular damage of human erythrocytes were exhibited the higher protective effect than (+)- α -tocopherol (τ_{50} = 38.0 min), known as a lipophilic antioxidant. TLC and HPLC were used to analyse active components in the aglycone fraction of the extract. Results showed that luteolin

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

and apigenin were main components. These results suggest that the *G. affine* extract can be applied to an effective anti-oxidant in scavenging ROS including radicals.

Keywords: *Gnaphalium affine* D. DON., antioxidative activity, flavonoid, photoaging

1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인(세균, 오염물질, 스트레스 등)과 태양 자외선에 노출됨으로써 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되어 광산화적 손상을 받게 된다. ROS는 큰 산화력을 갖는 산소종으로서 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide)와 같은 비라디칼종과 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical), $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)과 같은 산소중심의 라디칼들 그리고 생체 성분과 ROS와의 반응에서 유래된 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등이 포함된다[1-3]. ROS는 대사과정에서도 생성될 수 있지만 지속적인 자외선 노출이나 스트레스가 과잉의 ROS를 생성시킨다[4,5]. 이들 ROS는 피부 항산화제를 파괴하고, 지질 과산화반응을 개시하며, 단백질 및 DNA의 산화뿐만 아니라 피부 진피층에서 결합조직 성분인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로써 피부 노화를 가속화시킨다[6-9].

피부에는 활성산소종으로 유도된 산화적 스트레스에 대항하는 항산화 방어망이 구축되어 있다. Superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GSHPx)와 같은 효소적 항산화제와 비타민 C, 비타민 E와 같은 비효소적 항산화제들이 서로 상호보완하며 피부에 항산화 네트워크를 형성한다. 하지만 여러 가지 환경적 요인에 의해 ROS가 과도하게 생성되면 항산화 네트워크가 붕괴되고 손상을 일어나게 된다[10-12]. 이러한 활성산소종으로부터 발생하는 손상을 막기 위해 다양한 항산화제를 사용해왔고 이러한 물질로는 BHA (butylated hydroxy anisol)와 BHT (butylate hydroxy toluene) 등의 합성 항산화제와 천연물에서 유래된 천연 항산화제 등이 있다. 합성 항산화제들의 경우에는 과량 사용 시 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 개발이 활발하게 이루어지고 있다[13].

본 연구에서 사용한 떡쭉(*Gnaphalium affine* D. DON.)은 초롱꽃목 국화과의 쌍떡잎식물의 두해살이 풀로 한국, 일본, 중국 등 동아시아에 널리 분포하며 괴쭉, 솜쭉이라고도 한다. 한방에서는 뿌리를 제외한 식물체 전체를 서국초라는 약재로 쓰는데, 해수, 가래, 천식, 기관지염, 감기몸살에 효과가 있고, 근육통, 요통, 관절염, 위궤양, 피부가려움증에도 사용하며 혈압을 떨어뜨리는 작용도 한다[14]. 이전 연구에서는 떡쭉 추출물의 플라보노이드[16-21], 페놀 화합물[22], 폴리사카라이드[23], 에센셜 오일[24], 다이터펜류[25, 26]와 다른 화합물[27]을 분리하여 확인하였다[15]. 떡쭉 추출물과 분획물에 대한 ROS 소거활성이나 피부노화에 중요한 $^1\text{O}_2$ 와 같은 활성산소로 유도된 세포 손상에 있어서 보호효과 등의 연구는 진행되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 떡쭉 추출물을 이용하여 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 제조하였으며, 이들 분획의 항산화 활성 및 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 작용을 확인함으로써 떡쭉 추출물이 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다. 그리고 강력한 항산화제인 플라보노이드 성분 중 어느 성분이 떡쭉 추출물의 아글리콘 분획 속에 많이 존재하는지를 확인하기 위해 성분 분석을 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였고, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다. EDTA, luminol, heparin, 광증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는

Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H₂O₂는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충 용액 제조에 사용된 Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl, H₂SO₄ 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올 (MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 떡썩은 2012년 5월 제주도 제주대학교 102 제주대학교 바이오산업센터 근처에서 채집된 것을 70% 에탄올로 추출하여 사용하였다.

2.2 떡썩의 분획 및 추출

건조된 떡썩 100 g에 70% 에탄올 500 g을 넣고 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이러한 침적 및 여과 과정을 2회 반복하여 실험하였다. 이 여액을 감압농축기를 이용하여 농축시킨 후 동결 건조시켜 분말을 얻었고 이 분말을 70% 에탄올 추출물로 실험에 사용하였다. 다시 70% 에탄올 추출물 일부를 물과 n-헥산을 처리하여 비극성 성분을 제거하고 이어서 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 에틸아세테이트 분획물 일부를 산으로 가수분해하여 당을 제거시킨 후 감압 농축하여 아글리콘 분획물을 제조하였다. 아글리콘 분획물의 제조 방법은 에틸아세테이트 일정량에 H₂SO₄ 및 아세트 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정하고 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거한 후에 다시 에틸아세테이트로 추출하고 이를 감압·농축한 후 얻어진 아글리콘 분획물을 실험에 사용하였다.

2.3 떡썩 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1 DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

Free radical은 높은 반응성을 가진 홀 전자를 갖는 원자단으로서 이는 피부노화를 가속화시킨다. DPPH법은 시료의 free radical 소거능을 확인할 수 있는 시험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 시료의 환원력을 측정한다. 따라서 떡썩 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다.

실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. Free radical 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μg/mL)로서 표기하였다.

$$Inhibition (\%) = \left\{ 1 - \left[\frac{(A_{Experiment} - A_{Blank})}{A_{Control}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2 Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH, H₂O₂)를 생성시키며 철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (·OH) 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. 이 계를 이용하여 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 총항산화능을 측정할 수 있다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 떡썩 추출물과 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣은 다음 흔들어 섞어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣는다. 5 min 동안 37 °C 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μg/mL)로 표기하였다.

Table 1. TLC Mobile Phase for Separation of Aglycone Fraction from *G. affine*

Eluent system	
Aglycone fraction	Hexane : Ethyl acetate : Acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4 Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포 보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀 3명으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2 떡쭉 추출물의 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 떡쭉 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에

서 행하였다.

떡쭉 추출물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50} 이 30 min으로 오차 범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

2.5 TLC 및 HPLC를 이용한 떡쭉 추출물의 플라보노이드 분석

떡쭉 추출물 중 아글리콘 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC 및 비극성 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료와 플라보노이드 표준물질의 Rf 값과 자외선 및 발색법을 이용한 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 수용액과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고 HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다.

2.6 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

Table 2. HPLC Condition for Separation of Aglycone Fraction from *G. affine*

Condition of HPLC analysis	
Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 nm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Detection wavelength	370 nm
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 μ L
Mobile phase	2% AA ^{a)} in water : 0.5% AA ^{a)} in 50% ACN ^{b)} = 70 : 30 ~ 10 : 90 (gradient)

^{a)}AA : acetic acid, ^{b)}ACN : acetonitrile

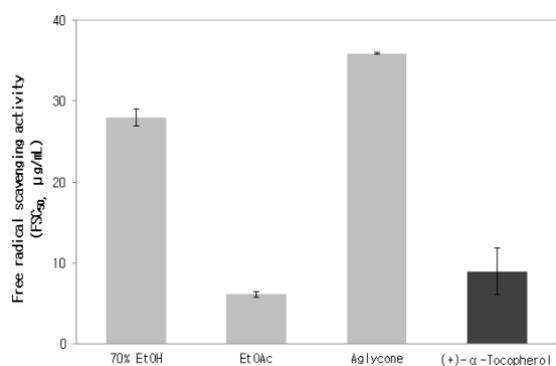


Figure 1. Free radical scavenging activities of *G. affine* extract/fractions and (+)- α -tocopherol.

3. 결과 및 고찰

3.1 떡쭈 추출물의 항산화 활성

3.1.1 DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

자외선 노출에 의해 생성되는 ROS에는 \cdot OH와 같은 홀 전자를 갖는 free radical이 포함되어 있다. 이러한 라디칼 중은 반응성이 매우 높아 세포막에서 지질 과산화반응의 자동산화반응을 개시시킬 수 있다. 이때 비타민 E 등의 항산화제는 ROS로 유도되는 세포막의 지질과산화 연쇄 반응에서 생성된 지질 라디칼에 전자를 제공함으로써 연쇄반응을 종결시킨다. 이와 같이 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통해서 시료의 항산화능을 측정할 수 있다.

따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여 떡쭈 추출물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 떡쭈 추출물에 대하여 지용성 항

산화제인 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성과 비교하였다(Figure 1). 떡쭈 70% 에탄올 추출물의 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 28.00 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획물은 6.15 μ g/mL, 아글리콘 분획의 경우에는 35.90 μ g/mL를 나타내었다. 떡쭈 추출물의 free radical 소거활성은 에틸아세테이트 분획에서 가장 크게 나타났음을 알 수 있다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성은 8.98 μ g/mL이다. 따라서 떡쭈 추출물의 에틸아세테이트 분획은 (+)- α -tocopherol보다도 더 큰 free radical 소거활성을 나타내었다.

3.1.2 Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

본 실험에 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 Fe³⁺ 및 H₂O₂로부터 Fenton 반응을 경유하여 다양한 종류의 ROS가 생성된다. Luminol은 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 화학발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 이 계에 항산화제가 첨가되면 ROS를 소거하고 화학발광은 감소한다. Figure 2는 떡쭈 추출물의 ROS 소거활성(총 항산화능)을 나타내었다. 떡쭈 70% 에탄올 추출물의 활성산소 소거활성은 1.60 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획은 0.075 μ g/mL, 아글리콘 분획은 각각 2.28 μ g/mL로 나타났다. 비교물질은 대표적 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총 항산화능은 6.88 μ g/mL로 나타났다. 떡쭈의 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 모두 비교물질인 L-ascorbic acid보다 더 큰 총 항산화능을 나타내었다.

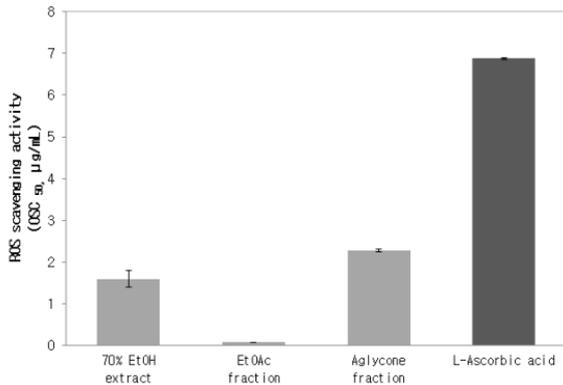


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of *G. affine* extract/fractions and L-ascorbic acid in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

3.2 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과
 피부에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 다양한 광증감제들이 존재하며 이들은 자외선에 노출될 때 광증감 반응을 통해 $^1\text{O}_2$ 과 여러 ROS를 생성시킨다. 특히 광증감반응의 주 생성물인 $^1\text{O}_2$ 는 반응성이 매우 큰 ROS로 피부 항산화제를 고갈시킴으로써 항산화 방어망을 붕괴시키고, 세포막에서 라디칼 반응을 개시시킴으로써 지질과산화반응을 일으켜서 세포 손상을 야기시킨다. 따라서 적혈구의 광용혈 실험법은 피부 광노화 모델로서 활성산소로부터 세포 보호 효과를 측정하는데 매우 효과적이다. 본 실험을 통해 광증감제로 사용되는 rose-bengal로 유도된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포 손상에 있어서 떡쭉 추출물의 세포 보호 효과를 측정하여 떡쭉 추출물의 항산화제로서의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

떡쭉의 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획물에 대하여 1, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})을 측정함으로써 세포 보호 효과를 비교하였다(Figures 3, 4). 이 값(τ_{50})은 시료의 세포 보호 활성이 클수록 높게 나타난다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우, 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간은 30 ± 1 min으로 재현성이 양호하게 나타났다. 떡쭉의 70% 에탄올 추출물은 1, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 τ_{50} 이 42.1, 52.0 및 40.8 min으로 농도의존적인 세포보호활성을 나타냈으며, 에틸아세테이트 분획은 37.6, 34.9 및 32.2 min으로 농도 의존적인 보호를 나타내지는 않

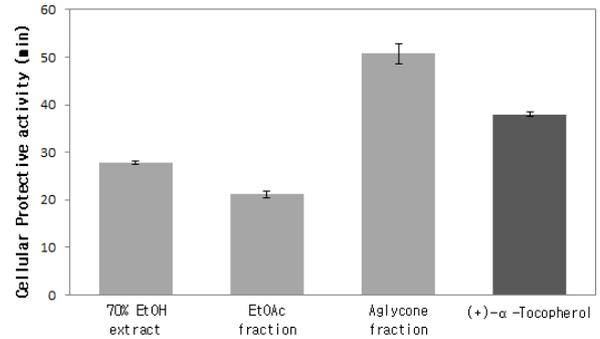


Figure 3. The cellular protective effects of *G. affine* extract/fractions and (+)- α -tocopherol at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30 ± 1 min).

았다(Figure 4). 아글리콘 분획의 경우 45.1, 60.6, 19.8 min으로, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 세포보호 활성을 나타내었으나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 세포보호 활성이 없고 오히려 세포 파괴를 촉진함을 알 수 있다. 아글리콘 분획 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 왜 이런 현상이 왜 일어나는지는 Figure 5에서 확인할 수 있었다. Figure 5는 아글리콘 분획의 TLC 크로마토그램이다. 이 TLC 크로마토그램의 ②번 항 아글리콘 분획의 TLC 패턴을 보면 상단에 빨간색의 띠 3개를 볼 수 있다. 이 띠들은 녹색 식물 잎 추출물에서 흔히 나타나는 클로로필 및 그 유도체들의 특징적인 띠들이다. 클로로필 및 그 유도체로 알려진 포르피린류는 광증감제로 알려져 있다. 아글리콘 분획이 고농도일 경우 이들의 광증감작용으로 아글리콘 분획의 세포보호 작용을 상쇄하고 오히려 세포막 파괴를 촉진시키는 작용이 있음을 알 수 있다. 아글리콘 분획에서 주성분인 플라보노이드와 그 극성 정도가 비슷한 클로로필 유도체가 함께 혼재함으로써 나타난 결과로 보인다. 클로로필 및 포르피린 유도체들은 그 농도가 낮아도 $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 활성산소를 생성시키는 광증감 작용을 일으킬 수 있다. 클로로필 및 그 유도체를 완전히 제거한 후 플라보노이드가 주류인 아글리콘 분획을 대상으로 실험을 하면 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 추가 연구를 통하여 이를 밝히고자 한다. 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol의 세포 보호 효과는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 38.0 min으로 나타났으며, 같은 농도에서 떡쭉 추출물의

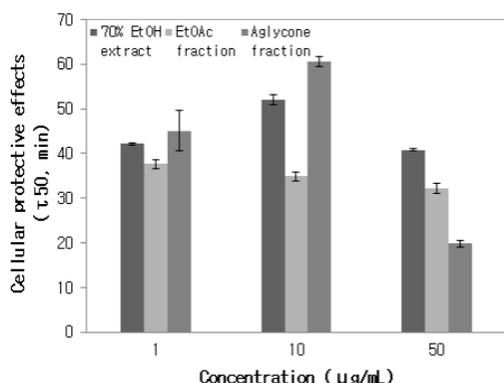


Figure 4. Cellular protective effects of *G. affine* extract/fractions against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30 ± 1 min).

아글리콘 분획과 70% 에탄올 추출물이 (+)-α-tocopherol보다 세포 보호 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있다(Figure 3).

3.3 떡썩 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.3.1 떡썩 추출물의 TLC 성분분석

떡썩 추출물의 아글리콘 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 5에 나타내었다. 아글리콘 분획은 2개의 띠로 분리되었으며, 아글리콘 분획과 다양한 표준물질의 TLC 크로마토그램을 자외선과 NP (2-amin-oethyl diphenylborinate) - PEG (polyethylene glycol) 발색시약으로 확인하였다. 그 결과, 2개의 띠가 확인되었으며, R_f값이 0.41인 GAA 1은 apigenin, R_f값이 0.24인 GAA 2는 luteolin으로 확인되었다. 앞에서 언급한 바와 같이, Figure 5의 TLC 크로마토그램의 ②번 항아글리콘 분획의 TLC 패턴을 보면 상단에 빨간색 띠 3개가 있다. 이 띠들은 녹색 식물 잎 추출물의 경우 종종 나타나는 클로로필 및 그 유도체들에서 연유한 특징적인 띠들이다. 이들 성분들은 식물에서 광합성의 안테나 역할 외에 부반응으로 광증감작용에 의해 ¹O₂ 등의 활성산소종을 생성시킴으로써 세포를 손상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 식물체에서는 이들 활성산소의 산화적 손상을 방어하기 위해 카로티노이드, 플라보노이드 및 안토시아닌과 같은 항산화제들의 작용으로 식물체를 보호하는 것으로 알려져 있다.

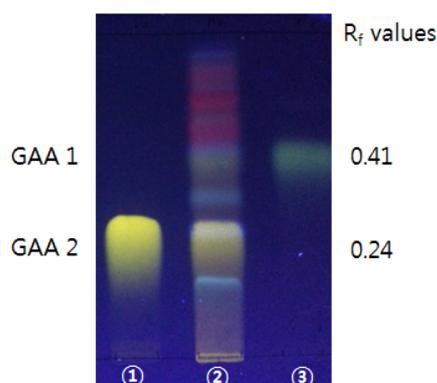


Figure 5. TLC chromatogram of aglycone fraction from *G. affine* and references. Eluent system : n-hexane : ethyl acetate : acetic acid (v/v). ①luteolin, ②aglycone fraction, ③apigenin

3.3.2 떡썩 추출물의 HPLC 성분분석

떡썩 추출물의 아글리콘 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. 표준물질을 사용하여 확인한 결과 peak 1은 luteolin이고 peak 2는 apigenin인 것으로 TLC와 동일한 결과로 나타났다.

4. 결 론

1) 떡썩 추출물의 free radical 소거활성(FSC50)을 측정 한 결과, 에틸아세테이트 분획 (6.15 μg/mL) > (+)-α-tocopherol (8.98 μg/mL) > 70% 에탄올 추출물 (28.00 μg/mL) > 아글리콘 분획 (35.90 μg/mL) 순서로 나타났다. 따라서 에틸아세테이트 분획이 (+)-α-tocopherol보다 높은 라디칼 소거활성을 갖는 것으로 확인되었다.

2) 떡썩 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC50)을 확인한 결과, 에틸아세테이트 분획 (0.075 μg/mL) > 70% 에탄올 추출물 (1.60 μg/mL) > 아글리콘 분획 (2.28 μg/mL) > L-ascorbic acid (6.88 μg/mL) 순서로 나타났다. 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 모두 비교물질인 L-ascorbic acid보다 높은 활성산소 소거활성을 갖는 것으로 확인되었다.

3) 떡썩 추출물의 ¹O₂로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과 실험에서 10 μg/mL일 때 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 τ₅₀은 각각 52.0, 34.98, 60.6 min으로 비교 물질인 (+)-α-tocopherol과 비교했을 때, 70% 에탄올 추출물과 아글

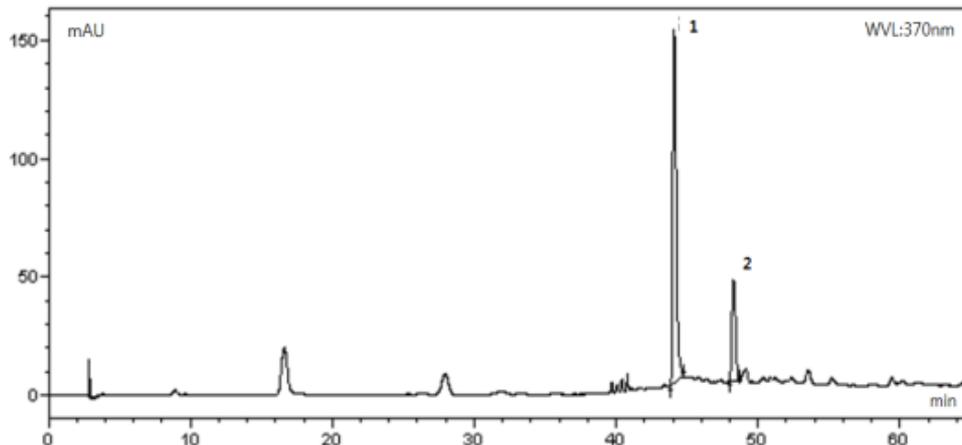


Figure 6. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *G. affine* at $\lambda = 370$ nm. ①luteolin, ②apigenin.

리콘 분획이 (+)- α -tocopherol (38.0 min)보다 높은 세포보호 활성을 나타내었다. 단, 아글리콘 분획 50 μ g/mL 고농도에서는 세포보호 활성이 나타나지 않은 것은 분획 중에 함유되어 있는 클로로필 및 그 유도체에 의한 광증감작용으로 아글리콘 분획의 보호작용을 상쇄시킨 것으로 간주된다.

4) TLC 크로마토그램에서 떡쭉 아글리콘 분획 중에 apigenin (GAA 1)과 luteolin (GAA 2)이 있음을 확인할 수 있었다.

5) HPLC 크로마토그램으로부터 떡쭉 아글리콘 분획 중 luteolin 및 apigenin의 조성비는 대략적으로 78 : 22로 존재함을 알 수 있었다.

이상의 결과들로부터 떡쭉 추출물의 에틸아세테이트 분획은 free radical 소거능과 총 항산화능이 매우 큼을 알 수 있었고, 아글리콘 분획의 경우 1O_2 로 유도된 세포막 파괴에 대한 세포보호능을 나타냈으며 이는 플라보노이드에 기인된 것으로 확인하였다.

다만, 떡쭉 추출물 또는 분획을 화장품에 적용할 경우는 추출물 중에 클로로필 또는 포르피린류가 함유되지 않도록 제조해야 항산화 활성 및 활성산소로부터 세포보호능을 향상시키는 기능성 소재로서 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 산업통상자원부의 재원으로 지원을 받아 수행된 제주권 광역경제권 선도산업 육성

사업(과제번호 :R0002229)의 연구 결과입니다.

Reference

1. E. H. Witt, P. Motchnik, and L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin, eds. J. Fuchs and L. Packer, *Oxidative Stress in Dermatology*, 29, New York, Dekker (1993).
2. I. Emerit, Free radicals and aging of the skin, eds. L. Emerit and B. Chance, *Free radicals and aging*, 328, Basel, Birkhauser (1992).
3. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657(2003).
4. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
5. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
6. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Dissertation, Seoul National University (1989).
7. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and

- A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases : Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
8. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Amer. Heart J.*, **23**, 2382 (1998).
 9. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
 10. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
 11. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti oophorectomized rat : oxidative stress and anti-oxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**, 1 (2002).
 12. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
 13. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai., Active oxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
 14. Z. Xi, W. Chen, Z. Wu, Y. Wang, P. Zeng, G. Zhao, X. Li, and L. Sun, Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don., *Food Chem.*, **130**, 165 (2012).
 15. J. Li, D. Huang, W. Chen, Z. Xi, C. Chen, G. Huang and L. Sun, Two New Phenolic Glycosides from *Gnaphalium affine* D. Don and Their Anti-Complementary Activity, *Molecules*, **18**, 7751 (2013).
 16. M. Aritomi, and T. Kawasaki, Dehydro-para-asebotin, a new chalconeglucoside in the flowers of *Gnaphalium affine* D. Don., *Chem. Pharm. Bull.*, **22** (1974).
 17. M. Aritomi, M. Shimojoe, and T. Mazaki Aritomi, Chemical Constituents in Flowers of *Gnaphalium affine* D. Don., *Yakugaku Zasshi*, **84**, 895 (1964).
 18. M. Morimoto, S. Kumeda, and K. Komai, Insect anti-feedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1888 (2000).
 19. P. Cuadra, J. B. Harborne, and P. G. Waterma, Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation, *Phytochemistry*, **45**, 1377 (1997).
 20. T. Iwashina, J. Kitajima, and T. Takemura, Flavonoids from the leaves of six Corylopsis species (Hamamelidaceae), *Bio. System. Eco.*, **44**, 361 (2012).
 21. R. D. Torrenegra, S. Escarria, B. Raffelsberger, and H. Achenbachb, 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone from the flowers of *Gnaphalium elegans*, *Phytochemistry*, **19**, 2795 (1980).
 22. A. N. Shikova, M. Kundracikovac, T. L. Palama, O. N. Pozharitskaya, V. M. Kosman, V. G. Makarov, B. Galambosi, H. J. Kim, Y. P. Jang, Y. H. Choi, and R. Verpoorte, Phenolic constituents of *Gnaphalium uliginosum* L., *Phytochemistry*, **3**, 45 (2010).
 23. Y. Aoshima, Y. Hasegawa, S. Hasegawa, A. Nagasaka, T. Kimura, S. Hashimoto, Y. Torii, and N. Tsukagoshi, Isolation of GnafC, a polysaccharide constituent of *Gnaphalium affine*, and synergistic effects of GnafC and ascorbate on the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Bios. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2068 (2003).
 24. W. C. Zeng, R. X. Zhu, L. R. Jia, H. Gao, and Y. Zheng, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*, *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 1322 (2011).
 25. T. L. Meragelman, G. L. Silva, E. Mongelli, and R. R. Gil, Ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Phytochemistry*, **62**, 569 (2003).
 26. A. Urza, R. Torres, C. Bueno, and L. Mend, Flavonoids and diterpenoids in the trichome resinous exudate from *Pseudognaphalium cheiranthifolium*, *P. heterotrichium* and *P. vira vira.*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**, 459 (1995).

27. Z. Xi, W. Chen, Z. Wu, Y. Wang, P. Zeng, G. Zhao, X. Li, and L. Sun, Chemical constituents of petroleum ether fractions of *Gnaphalium affine* D. Don., *Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.*, **32**, 311 (2011).