

애기땅빈대의 열수 추출 및 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교

강란이¹ · 최학주² · 박지원¹ · 심부용¹ · 이해진² · 김동희¹ *

Comparison on the Antioxidative Activity of Ethanol and Hot Water Extracts of *Euphorbia supina* Rafinesque

Kang Ran-Yi¹ · Choi Hak-Joo² · Bak Ji-Won¹ · Sim Boo-Yong¹ · Lee Hae-Jin² · Kim Dong-Hee¹ *

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

Objectives : In this study, the antioxidant activities of the 80% ethanol and hot water extracts of *Euphorbia supina* Rafinesque were investigated.

Methods : We measured total phenol contents, flavonoid contents, 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging assay. The production of reactive oxygen species was measured in LPS-induced RAW 264.7 cells using flow cytometry system.

Results : The content of phenol in the hot water extract was 65.529 ± 0.462 mg/g and 126.932 ± 1.894 mg/g in the 80% ethanol extract, and that of flavonoid in the hot water extract was 16.063 ± 0.471 mg/g and 29.159 ± 1.963 mg/g in the ethanol extract. The 80% ethanol extract also showed higher DPPH and ABTS radical scavenging activities ($90.8 \pm 1.0\%$ and $92.5 \pm 0.7\%$) than the hot water extract ($81.5 \pm 0.5\%$ and $91.5 \pm 0.2\%$). The production of reactive oxygen species(ROS) was reduced dose-dependently by 80% ethanol and hot water extract at concentration of 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of RAW 264.7 cells.

Conclusion : According to these results, the 80% ethanol extract of *Euphorbia supina* Rafinesque has a good anti-oxidative effects than the hot water extract. Thus, the 80% ethanol extract of *Euphorbia supina* Rafinesque may serve as useful natural antioxidants.

Key words : Antioxidant activity, *Euphorbia supina* Rafinesque, flavonoid, phenol, radical scavenging, reactive oxygen species

I. 서 론

생체 내에서는 정상적인 생리상태에서 활성산

소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성 질소종(reactive nitrogen species; RNS)을 포함하는 유리기(free radical)가 생성되며 이러한 유리기와 이를 제거하는 항산화 방어계(antioxidant defense system)가 균형을 이루고 있다¹⁾. 그러나 세포 내 항산화 방어계와 ROS 및 RNS 간의 불균형이 초래될 때 '산화적 스트레스'가 생성되어 수많은 질환의 생리/병리학적 현상

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 대학로62, 대전대학교 한의과대학.

E-mail : dhkim@dju.kr Tel : 042-280-2623

투고일 : 2014년07월23일 수정일 : 2014년08월05일

게재일 : 2014년08월05일

에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이러한 산화적 스트레스는 생체 내 단백질, 지질, DNA, 당질, 고도불포화지방산과 같은 거대분자를 불활성화 시켜 파괴시키고, 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시키는 염증 반응에 관여한다²⁻³⁾. 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면, 염증관련 세포에서 ROS 및 RNS가 과다 생성되고, 그 결과 영구적인 유전자의 변형이 야기되어 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 피부질환, 급성 용혈성 빈혈, 기관지천식 등의 알려지질환을 비롯하여 노화로 인한 파킨슨질환, 노인성 치매, 암, 당뇨, 고혈압 및 동맥경화 같은 만성 염증성질환이 발생하게 된다⁴⁻⁵⁾.

이러한 이유로 최근에는 다양한 유용식물을 이용하여 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항알러지, 항비만, 항산화 및 항염 등에 효과가 있는 기능성 물질을 다량 함유하는 자원을 선발하여 천연물 유래 약용, 기능성 식품 및 의약품 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁶⁻⁷⁾. 그 결과, 항산화제에 의해 산화적 스트레스가 차단될 경우 염증반응이 효과적으로 억제된다는 여러 연구결과들이 보고되고 있으며, 이로 인해 활성산소를 방어하는 항산화물질은 질병 치료의 가능성 때문에 주목 받고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafinesque)는 밭이나 들에서 자라는 대극과(*Euphorbiaceae*)에 속하는 일년생 초본으로, 중약에서 진초를 반지금(斑地錦)이라 하여 止血, 利尿, 通乳汁, 健胃, 活血, 解毒의 효능으로 黃疸, 泄瀉, 赤痢, 血尿, 血崩, 外傷出血, 母乳不足, 癰腫瘡毒 등의 치료에 사용된다고 알려져 있다¹¹⁻¹²⁾.

애기땅빈대에 관한 국내 연구 현황에서 박¹³⁾ 등은 RAW 264.7 세포에서 NO, PGE₂, IL-6, IL-10, TNF- α 와 같은 염증매개물질에 대한 억제효능을 밝혀내었으며, 최¹⁴⁾ 등의 연구에서는 애기땅빈대가 인체의 암세포 증식을 억제 시킨다는 연구결과를 밝혀냈다. 이 밖에도 terpenoid 및 화학적 성분 분석¹⁵⁻¹⁶⁾, 항산화 활성 성분 분석¹⁷⁾ 등이 있으며, 애기땅빈대의 항산화에 대한

연구로는 송¹⁸⁾ 등이 아세트산에틸 추출물과 여러 혼합물의 합성물을 가지고 항산화 효능연구를 진행하였고, 나¹⁹⁾ 등이 메탄올 추출을 통한 애기땅빈대의 항산화 효과를 밝혀낸 바 있으나 열수추출과 에탄올 추출에 대한 연구는 진행 되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 우선적으로 현재 임상에서 활용되고 있는 열수 추출과 80% 에탄올 추출을 통해 애기땅빈대의 총 phenol 및 flavonoid 함량, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능, reactive oxygen species (ROS) 등의 항산화 활성을 비교함으로써 신규 소재 개발과 임상에 활용 가능한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafinesque)는 대전대학교 지역혁신센터 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC)에서 구입하여 정선 후 사용하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Picture of *Euphorbia supina* Rafinesque

2. 시약 및 기기

사용된 시약은 isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), ether (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Co., U.S.A.),

penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), 2,4-dinitrochlorobenzene (Sigma Co., U.S.A.), ethanol (Merck Co., Germany), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Co., U.S.A.), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma Co., U.S.A), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany), gallic acid (Sigma Co., U.S.A), sodium carbonate (Sigma Co., U.S.A) 등을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), flow cytometry system (BD biosciences, U.S.A.) 등을 사용하였다.

3. 시료 추출

애기땅빈대의 잎과 줄기 부분 30 g에 물과 80% 에탄올(C2H5OH) 500 ml을 각각 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 열수 추출물(Hot water extract of *Euphorbia supina* Rafinesque, 이하 ERD)은 분말 3.0 g을 얻었으며, 80% 에탄올 추출물(80% ethanol extract of *Euphorbia supina* Rafinesque, 이하 ERE)은 분말 3.1 g을 얻었다. 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

4. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 RAW 264.7 세

포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO2) 에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

5. 세포 독성 평가

RAW 264.7 세포에서 세포독성 평가를 위해 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 추출물을 각각 1, 10, 100, 200, 400, 1000 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정된 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

6. 총 phenol 함량 측정

총 페놀 함량은 Gutfinger의 방법²⁰⁾을 응용하여 측정하였다. 추출 시료용액 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na₂CO₃ 포화용액 1 mL와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (Gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

7. 총 flavonoid 함량 측정

시료의 flavonoid 함량은 Nieva Moreno 등의 방법²¹⁾을 응용하여 측정하였다. 각 샘플 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium niatate와 1M potassium

acetate 0.1 ml 그리고 80% 에탄올 4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

8. DPPH 라디칼 소거능 측정

추출물의 농도를 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl와 추출물을 각각 100 µl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였으며,

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

9. ABTS 라디칼 소거능 측정

추출물의 농도를 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS⁺)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS⁺ 용액 150 µl와 추출물을 각각 5 µl 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

10. Reactive Oxygen Species(ROS) 측정

RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10⁵ cells/well이

되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 추출물을 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도와 LPS 1 µg/ml의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 DCF-DA로 염색 한 후 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

11. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성

RAW 264.7 세포주 세포 생존율을 측정된 결과, 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 열수추출물은 1, 10, 100, 200, 400, 1000 (µg/ml) 농도에서 113.0±3.7%, 110.5±2.4%, 107.6±5.1%, 109.1±4.8%, 105.1±1.9%, 107.6±5.0%의 세포 생존율을 나타내었으며, 80% 에탄올 추출물은 1, 10, 100, 200, 400, 1000 (µg/ml) 농도에서 112.5±1.4%, 105.5±3.8%, 101.7±4.9%, 98.4±2.5%, 98.1±2.3%, 96.4±3.8%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 2).

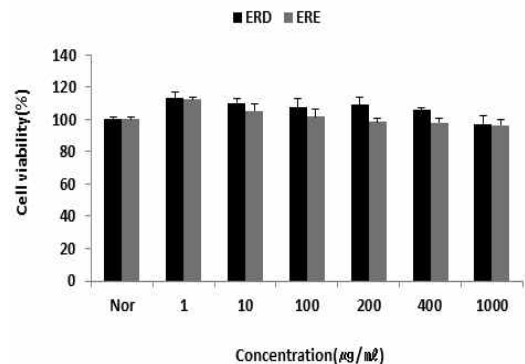


Fig. 2. Cell viability of *Euphorbia supina* Rafinesque's hot water and 80% ethanol extracts in RAW 264.7 cells. The results

were expressed as mean ± S.D.

2. 총 phenol 및 flavonoid 함량

추출 용매에 따른 애기땅빈대의 총 페놀 및 flavonoid 함량을 측정한 결과, 열수추출물은 65.529±0.462 mg/g, 80% 에탄올 추출물은 126.932±1.894 mg/g의 총 phenol 함량을 나타냈으며, 총 flavonoid 함량은 열수 추출물에서 16.063±0.471 mg/g, 80% 에탄올 추출물에서 29.159±1.963 mg/g으로 나타나 80% 에탄올 추출물에서 phenol과 flavonoid의 함량이 더 많은 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents hot water and 80% ethanol extracts of *Euphorbia supina* Rafinesque.

Sample	Total phenolics (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
ERD	65.529 ± 0.462	16.063 ± 0.471
ERE	126.932 ± 1.894	29.159 ± 1.963

ERD: Hot water extract of *Euphorbia supina* Rafinesque.

ERE: 80% ethanol extract of *Euphorbia supina* Rafinesque.

3. DPPH 라디칼 소거능

추출 용매에 따른 애기땅빈대의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 열수추출물은 1, 10, 100, 1000 (µg/ml) 농도에서 19.9±0.3%, 26.8±3.4%, 49.0±1.2%, 81.5±0.5% 로 나타났으며, 80% 에탄올 추출물은 1, 10, 100, 1000 µg/ml 농도에서 20.1±1.4%, 30.7±2.5%, 74.7±4.4%, 90.8±1.0% 로 나타나, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가함을 보였다. 특히, 100 µg/ml 농도에서 80% 에탄올 추출물이 열수추출물에 비해 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 3).

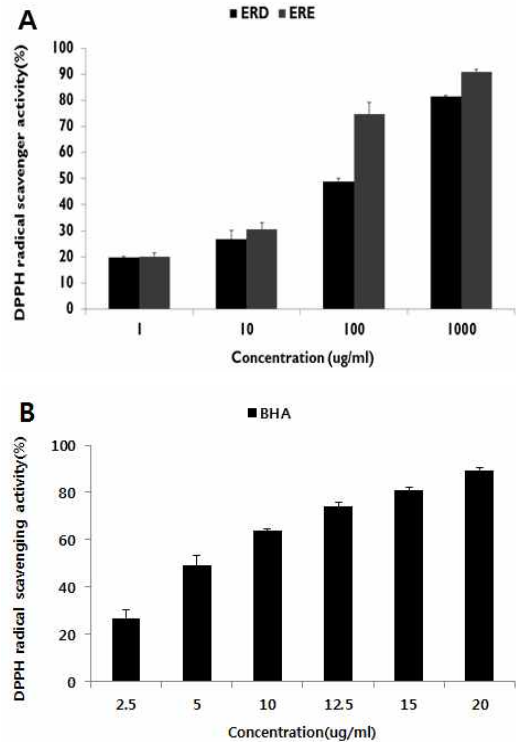


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of hot water and 80% ethanol extracts from *Euphorbia supina* Rafinesque.

A : Compare ERD and ERE

B : ABTS radical scavenging activity of butylated hydroxyanisole (BHA)

4. ABTS 라디칼 소거능

추출 용매에 따른 애기땅빈대의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 열수추출물은 1, 10, 100, 1000 (µg/ml) 농도에서 1.0±0.7%, 19.7±0.6%, 90.3±1.7%, 91.5±0.2% 로 나타났으며, 80% 에탄올 추출물은 1, 10, 100, 1000 (µg/ml) 농도에서 5.9±0.9%, 21.1±0.9%, 90.1±1.4%, 92.5±0.7% 로 나타나, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 증가함을 보였다. 두 추출물간의 결과는 큰 차이를 보이지 않았으며 두 추출물 모두 100 µg/ml 농도에서부터 매우 우수한 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 4).

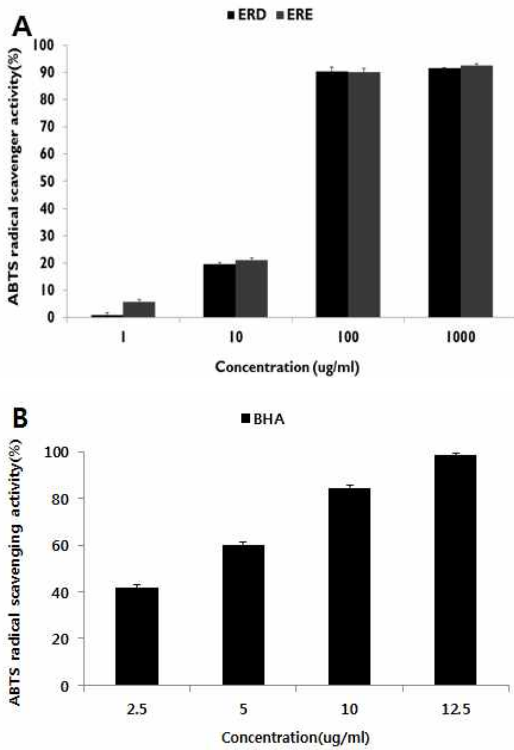


Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of hot water and 80% ethanol extracts from *Euphorbia supina* Rafinesque.

A : Compare ERD and ERE

B : ABTS radical scavenging activity of butylated hydroxyanisole (BHA)

5. ROS 생성량 측정

추출 용매에 따른 애기땅빈대의 ROS 생성량을 측정한 결과, 열수추출물은 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 정상군은 17.0±3.4%, 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 82.9±4.4%, 84.9±3.0%, 77.20±3.7%로 나타났으며, 80% 에탄올 추출물은 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 정상군은 19.3±7.1%, 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 82.9±5.2%, 76.5±3.8%, 70.6±3.3%로 나타나 두 추출물 모두 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (** : p < 0.01, *** : p < 0.001) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

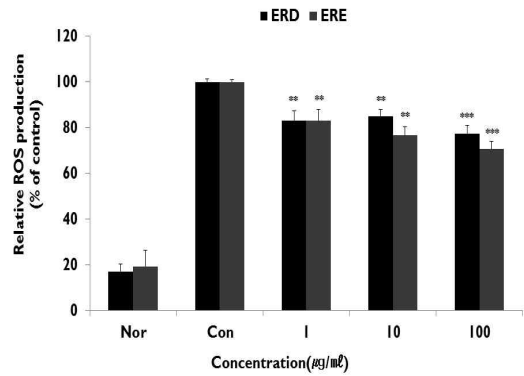


Fig. 5. Effect of *Euphorbia supina* Rafinesque's hot water and 80% ethanol extracts on ROS production in RAW 264.7 cells (Significance of results, *** : p < 0.001, ** : p < 0.01).

IV. 고찰

최근 급속한 산업화로 인한 환경오염과 합성물질의 증가로 활성산소종의 작용에 의해 체내에 균형이 깨지게 되어 과도한 산화적 스트레스에 의해 세포 상해 등을 유발하여 염증성 질환의 발생 빈도가 높아지고 있다²⁰. 또한, 최근 합성 의약품들의 부작용과 독성의 많은 사례가 보고됨에 따라 합성 의약품을 대체 할 수 있는 보다 안전한 의약품을 개발하기 위해 천연물 연구가 활발히 진행되고 있다²²⁻²³. 따라서 항산화활성이 있는 천연물 소재의 기능성 식품이나 이런 천연물 소재를 이용한 가공 식품을 섭취함으로써 활성산소에 의해 무너진 체내 생리활성의 균형을 개선 유지할 수 있는 연구가 필요하다.

애기땅빈대의 항산화 연구는 기존에 연구된 바 있으나, 본 연구에서는 현재 임상에서 주로 활용되고 있는 열수 추출과 80% 에탄올 추출을 통해 항산화 효능을 연구함으로써 신규 소재 개발과 임상에 활용 가능한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

본 연구에 앞서 실험에 대한 안전성을 확인하기 위해 세포독성을 평가한 결과, 애기땅빈대의 열수추출물 및 80% 에탄올 추출물 모두 1, 10,

100, 200, 400, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다.

페놀화합물은 식물에 널리 존재하는 2차 대사 화합물로 다수의 히드록실기(-OH)를 가지고 있어 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가진다. 또한 항암, 항고혈압, 항염증, 항당뇨, 항노화 및 항산화 효능이 있는 것으로 알려져 있고 주로 액포 및 세포막에서 유리형, 에스테르형 또는 결합형으로 존재하고 있다²⁴⁻²⁸. 본 연구에서 gallic acid를 표준물질로 하여 애기땅빈대의 총 phenol을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 높은 함량을 나타냈다.

식물에게만 존재하는 flavonoid는 폴리페놀 화합물의 한 종류로 C6-C3-C6의 기본 탄소 골격을 가지고 있으며 항바이러스, 항염증, 항암 효과 및 항산화효능이 높은 것으로 알려져 있다²⁹⁻³⁰. 본 연구에서 quercetin을 표준물질로 하여 애기땅빈대의 flavonoid 함량을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 높은 결과를 나타냈다. 이는 총 phenol 측정 결과가 반영된 것이라 할 수 있다.

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법은 여러 가지가 있으나, 항산화 측정시 가장 기본적으로 사용되는 실험인 DPPH는 안정적인 구조의 자유 라디칼로서 페놀성 화합물과 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하면 이로부터 전자나 hydro radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다³¹⁻³². 공여된 전자가 비가역적을 결합하면 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색이 노란색으로 변하므로 흡광도의 감소를 측정함으로써 라디칼 활성을 관찰할 수 있다. 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고, 또한 간편하고 비용이 저렴한 항산화 실험법으로 가장 널리 쓰이고 있다³³. 여러 연구에서 DPPH 라디칼 소거능은 총 폴리페놀 함량과 상호 관련성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다³⁴⁻³⁵. 본 연구에서 애기땅빈대의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물은 농도

의존적으로 높은 결과 값을 나타냈으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 우수한 효능이 나타났다. 이는 폴리페놀 함량과의 상관 관계로 인해 이와같은 연구 결과가 나타난 것이라 할 수 있다.

ABTS 항산화 측정법은 DPPH와 같은 라디칼 소거법에 의한 항산화능 측정법으로 화학반응을 통해 free radical이 유발된 용액에 시료를 넣어 항산화를 측정한다는 점에서 다르고, 단시간에 측정할 수 있으며, pH의 변화에 민감하게 작용하지 않는 장점이 있다³⁶. 본 연구에서 애기땅빈대의 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 농도 의존적으로 높은 결과 값을 나타내었으며 두 추출물 모두 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 우수한 효능이 나타났다.

세포내의 대사 과정의 결과로 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 심혈관계 질환, 암, 염증, 노화 등을 유발하는 것으로 알려져 있다³⁷. 생체 내에는 이러한 활성 산소종으로부터 신체를 보호하기 위한 다양한 항산화 체계를 갖추고 있지만, 과도한 활성산소종의 증가는 항산화계의 활성을 감소시킨다³². 본 연구에서 애기땅빈대의 ROS 생성량을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물은 모든 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 in vitro 상에서의 항산화 활성이 세포 내에서도 유효함을 확인할 수 있었다. 활성산소종은 암과 염증유발에 연관되어 있으며³⁷, 애기땅빈대가 염증 매개물 감소¹³와 암세포 증식 억제¹⁴효능을 나타냈다는 선행연구 결과를 통해 본 연구의 애기땅빈대가 활성산소를 조절하여 항염증 및 항암 효능에 영향을 주었을 것이라 판단되는 바이다.

결과적으로, 애기땅빈대는 항산화력이 뛰어난 천연물이며 임상에서 사용되어지는 80% 에탄올과 열수추출의 연구결과, 80% 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 총 phenol 및 flavonid 함량, DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능, ROS 생성량의 측정 결과가 유사하거나 우수한 효능을 나타내었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 가장 효

과적인 것으로 나타났다. 또한, 애기땅빈대 아세트산에틸(ethyl acetate) 추출물의 항산화 연구 결과와 비교하였을 때, 본 연구의 80% 에탄올 추출물에서 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 우수한 결과가 나타났으나, 메탄올 추출의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 DPPH radical 소거능 효과를 비교 하였을 때는 낮은 결과를 나타내었다. 향 후, 동일한 약재, 실험과정과 농도를 설정하여 다양한 용매에 따른 항산화 효과 비교를 통해 정확한 항산화 활성의 확인 및 생리 활성을 확인할 필요가 있어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 추출용매에 따른 애기땅빈대의 항산화 효과를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 독성 측정 결과, 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물은 1, 10, 100, 200, 400, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 95% 이상의 생존율을 나타내었다.

2. 총 페놀 및 플라보노이드 측정 결과, 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물 보다 더 높은 함량을 나타내었다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 높은 결과 값을 나타내었으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 80% 에탄올 추출물이 더 우수한 효능을 나타내었다.

4. ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 농도 의존적으로 우수한 효능을 나타내었다.

5. ROS 생성량을 측정한 결과, 두 추출물 모두 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었으나 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 더 우수한 효능을 나타내었다.

이상의 연구 결과를 통해 애기땅빈대가 뛰어난 항산화력을 지니고 있는 천연물임이며 80% 에탄올 추출이 더 효과적인 것이 실험적으로 규명되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 향 후 보다 유의성 있는 신규 소재로서의 가능성과 다양한 가공식품의 제조에 도움이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Freman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1982;47(5):412-426.
2. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J. Med. 1991;91(3): 31S-38S.
3. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, 2000;408(6809): 239-247.
4. Azard N, Rojanasakul Y, Valyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008;1(1):1-15.
5. Haliwel, B., Guteridga, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J, 1984;219(1):1-14.
6. 김현정, 안명수, 김금희, 강명화. 부위별 새송이버섯 추출물의 항산화 및 항균효과. 한국식품과학회지, 2006;38(6):799-804.
7. Ali KA, Abdelhak M, George B,

- Panagiotis K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chemistry*, 2005;89(1):27-36.
8. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*, 1999; 126(3):673-680.
 9. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 1999;20(10):1945-1952.
 10. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979 ;59(3):527-605.
 11. 중약대사전 편찬위원회. 중약대사전. 도서출판 정담, 서울, 1999;4:1500-1501.
 12. Lee TB. Coloured Flora of Korea(I), Hyang Moon Sa, Seoul, 2003;677.
 13. 박성철, 손대열. LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafin)의 염증매개물질 억제효과. *한국식품영양과학회지*, 2011;40(4):486-492.
 14. 최향미, 임선영. 애기땅빈대 추출물의 지방산 조성 및 인체 암세포 증식 억제 효과. *생명과학회지*, 2014;24(1):74-80.
 15. 정보섭, 김하균. 애기땅빈대의 Terpenoid 성분에 관한 연구. *생약학회지*, 1985; 16(3):155-159.
 16. 안인파, 권지웅, 권태오, 정완태, 이혜숙, 김윤철. 애기땅빈대의 화학적 성분. *생약학회지*, 2007;38(3):291-295.
 17. 홍현경, 광중환, 강세찬, 이종욱, 박종혁, 안중웅, 강혜숙, 정의수, 지옥표. 애기땅빈대의 항산화 활성 성분. *생약학회지*, 2008;39(3):260-264.
 18. Song, Y, Jeong, SW, Lee WS, Park S, Kim YH, Kim GS, Lee SJ, Jin JS, Kim CY, Lee JE, Ok SY, Bark KM, Shin SC. Determination of Polyphenol Components of Korean Prostrate Spurge (*Euphorbia supina*) by Using Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry: Overall Contribution to Antioxidant Activity. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014;418690.
 19. Na MK, An RB, Jin WY, Min BS, Yoo JK, Kim YH, Bae KH. Antioxidant effect of plant extracts on free radicals and lipid peroxidation. *Natural Product Sciences*, 2003;9(4):226-231.
 20. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981;58(11):966-968.
 21. Nieva M, María I, Antonio R, Marta A, Vattuone. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, 2000;71(1):109-114.
 22. Ames BN. Identification of environmental chemicals causing mutation and cancer. *The Biological Revolution*. Springer, US, 1979; 117-118.
 23. Naczki M, Shahidi F. Phenolic compounds in plant foods: chemistry and health benefits. *Nutraceuticals and Food*, 2003 ; 8(2) : 200-18.
 24. 이유진, 김은옥, 최상원. 오디씨로부터 항산화성 폴리페놀화합물의 분리 및 동정 *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2011;40(4):517-524.
 25. Lu Y, Foo LY. Antioxidant and radical

- scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food chemistry*, 2000;68(1):81-85.
26. 조영수, 김현정, 정정한, 차재영. 꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*)의 폴리페놀 화합물 함량과 항산화 활성. *한국식품영양학회지*, 1999;28(6):1310-1315.
 27. 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색. *한국식품과학회지*, 2012;44(3):337-342.
 28. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010;2(12):1231-1246.
 29. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2002;13(10):572-584.
 30. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids:antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004;36(7):838-849.
 31. 광충실, 이지연. In vitro 달맞이순과 다래순 에탄올 추출물의 in vitro 항산화효과 및 항염증효과. *한국식품영양과학회지*, 2014;43(2):207-215.
 32. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agric Food Chem*, 2010;49(1):3420-3424.
 33. Bekir J, Mars M, Souchard JP, Bouajila J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 2010;55(2):470-475.
 34. 신소림, 이철희. 추출방법 및 용매에 따른 청나래고사리의 항산화 활성. *한국생명과학회지*, 2011;21(1):56-61.
 35. 손호용, 류희영, 장유진, 장한수, 박유미, 김사열. 호이초(*Saxifraga stolonifera*) 지상부의 항균, 항혈전 및 항산화 활성 평가. *한국미생물·생명공학회지*, 2008;36(3):195-200.
 36. 정창호, 정희록, 최성길, 심기환, 허호진. 시판 메밀차 열수 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과. *한국식품저장유통학회지*, 2011;18(3):358-365.
 37. 정현실, 송영선, 노경희, 조혜연, 박지영, 최춘연, 권태완. 부추가 *Streptozotocin* 유발 당뇨병쥐의 지질과산화와 항산화방어 체계에 미치는 영향. *한국생명과학회지*, 2003;13(3):333-342.