

손바닥 선인장 엽상경의 품질 특성과 항산화 효과

황준호^{1,2} · 이미란¹ · 김재원³ · 부희정¹ · 강창희^{1,4} · 임상빈³

¹제주대학교 생명과학기술혁신센터, ²제주대학교 생물학과
³제주대학교 식품생명공학과, ⁴제주대학교 화학·코스메틱스학

Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Prickly Pear Cactus Cladodes

Joon-Ho Hwang^{1,2}, Mi-Ran Yi¹, Jae-Won Kim³, Hee-Jung Bu¹,
Chang-Hee Kang^{1,4}, and Sang-Bin Lim³

¹Biotechnology Regional Innovation Center, ²Department of Biology,
³Department of Food Bioengineering, and ⁴Faculty of Chemistry & Cosmetics, Jeju National University

ABSTRACT Prickly pear cactus cladodes were extracted with hot water and 70% ethanol, followed by fractionation with *n*-hexane (HF), ethyl acetate (EF), *n*-butanol (BF), and distilled water. Total phenolics and total flavonoid contents as well as antioxidative and anti-inflammatory activities were then measured. Total phenolic contents were 784, 452, and 220 mg gallic acid equivalents (GAE)/g, whereas total flavonoid contents were 214, 76, and 113 mg quercetin equivalents (QE)/g in EF, BF, and HF, respectively. DPPH and ABTS radical scavenging activities (IC₅₀) were 103 and 105 µg/mL in EF, 359 and 379 µg/mL in BF, and 469 and 605 µg/mL in HF, respectively. Oxygen radical absorbance capacity was highest at 391 µM TE in EF (in decreasing order of 117 µM TE in BF and 64 µM TE in HF), whereas superoxide anion radical scavenging activity (IC₅₀) was highest at 40 µg/mL in EF (in decreasing order of 69 µg/mL in BF and 98 µg/mL in 70% ethanol extract). Inhibitory activity (IC₅₀) of nitric oxide (NO) production induced by LPS-activated RAW264.7 cells was highest at 62 µg/mL in HF (in decreasing order of 104 µg/mL in EF and 465 µg/mL in BF). The selectivity index (ratio of inhibitory activity of NO production to cell cytotoxicity) was highest at 4.63 in EF (in decreasing order of 3.37 in HF and 2.14 in BF). In conclusion, EF showed potent antioxidant and anti-inflammatory effects with high phenolic and flavonoid contents.

Key words: prickly pear cactus cladodes, phenolic compounds, antioxidative activity, anti-inflammatory activity

서 론

제주도의 특산식물인 손바닥 선인장은 멕시코가 원산지인 열대성 다년생 초본으로 다량의 점질물과 함께 열매에는 betanin이라는 항암 활성을 갖는 붉은 천연색소를 함유하고 있다(1,2). 열매는 국내에서 각종 식품의 원료로 사용되고 있고 외국에서는 주로 열매와 엽상경 부분을 주스나 분말의 형태로 사용되고 있으며, 이뇨효과, 고혈압, 당뇨, 비만 예방 효과 등이 보고되고 있다(3).

선인장 엽상경에는 페놀계 화합물이 다량 함유되어 있는데 이는 식물에 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나로 다양한 구조를 가지고 있으며, phenolic hydroxyl기가 효소 등의 단백질 그리고 Fe²⁺, Cu²⁺ 등의 2가 금속이온과 거대 분자를 이루어 항산화 활성과 같은 생리활성을 나타낸다(4).

인체는 대사과정에서 만들어지는 활성 산소종인 과산화 수소, hydroxyl radical, superoxide anion radical, singlet oxygen이 catalase, superoxide dismutase와 같은 효소에 의해 제거되는 항산화 방어체계에 의해 균형을 유지하고 있다(5). 천연에는 비효소적 항산화제인 vitamin C, vitamin E, β-carotene, 페놀계 화합물 등이 존재하는데 이들은 활성 산소종을 직접 소거하거나 또는 활성 산소종에 의한 연쇄 반응을 차단하여 산화적 손상으로부터 인체를 보호한다(6).

염증반응은 조직에 상처나 감염이 일어날 경우 신체를 보호하기 위한 기전이며 free radical, cytokine 등의 자극성 물질에 대한 방어 반응으로 알려져 있다(7). 마우스 유래 대 식세포주인 RAW264.7은 lipopolysaccharide(LPS)로 자극을 받으면 염증성 cytokine(pro-inflammatory cytokine)을 방출하게 되고 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도하며, nitric oxide을 생성하여 염증반응을 매개하게 된다(8). 특히 nitric oxide(NO)는 그 자체로서도 염증과 세포 손상을 유발할 뿐만 아니라 활성 산소종인 superoxide와 결합 시 반응성이 더욱 강한 peroxynitrite의

형태로 전환되어 세포 파괴를 유발하게 되며(9), 세포에서의 NO 생성 저해는 항염 활성뿐만 아니라 체내 산화 스트레스에도 관련되어 있다.

선인장 열매에 대한 연구로는 Seo 등(10)이 메탄올, 에탄올, 열수 추출물의 항균 및 항산화 활성과 Lee 등(11)의 5종의 식중독균과 3종의 김치발효 미생물에 대한 항균 효과 및 생육 저해 효과가 있다. 선인장 엽상경에 대한 연구로는 항궤양 활성(3)이 보고되었고, 손바닥 선인장과 유사한 *Opuntia humifusa* 추출물의 항산화 활성 및 항암 활성(12), pectin 성분에 의한 콜레스테롤 저하 효과(13) 등이 있다. 선인장 성분에 대한 연구로는 Dok-Go 등(14)이 *Opuntia ficus indica* var. *saboten*에서 flavonoids, quercetin, (+)-di-hydroquercetin, quercetin 3-methyl ether 등을 분리하였고, Avila-Nava 등(15)은 kaempferol, isorhamnetin을 분리하였다. 또한 Butera 등(16)은 *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill에서 betanin, indicaxanthin을 분리하였고, Sreerkanth 등(2)은 열매에서 분리한 betacyanin의 항암 활성을 측정하였다.

지금까지 선인장에 대한 연구들은 대부분 *Opuntia* 속의 *ficus indica* var. *saboten* 열매와 *ficus indica* (L.) Mill과 *humifusa* 엽상경 추출물에 의한 항궤양, 항산화, 항균 효과에 대한 것으로 *Opuntia ficus indica* var. *saboten* 엽상경의 항산화 활성과 RAW264.7을 이용한 항염 활성에 대한 연구는 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *Opuntia ficus indica* var. *saboten* 엽상경의 기능성에 대한 연구의 일환으로 엽상경 열풍건조 분말의 일반성분과 유리당 함량을 측정하였고, 열수 추출 및 유기용매 추출물과 분획물의 항산화 활성과 항염 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

추출물과 분획물의 제조

본 실험에서 사용한 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) 엽상경은 2013년 1월에 제주시 애월읍에서 수확한 것으로 잎의 너비가 10 cm 이상인 것을 수확하여 도내 J사에서 열풍건조 한 것을 구입하여 냉동실에 보관하면서 시료로 사용하였다. 추출물은 엽상경 분말을 70% 에탄올과 열수에서 1시간 동안 추출한 것을 여과, 농축한 후 동결건조 하여 제조하였고, 분획물은 70% 에탄올 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, distilled water로 계통적으로 분획하여 동결건조 하였다. 기능성 분석을 위한 시료는 각각의 동결건조 분말을 에탄올 : phosphate-buffered saline(PBS pH 7.4)=1:1 용액에 가하여 100 mg/mL로 제조한 후 0.45 µm syringe filter(Millipore Co., Billerica, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

일반성분 분석

일반성분 함량은 식품공전(17)에 따라 측정하였다. 수분

은 105°C 상압건조법, 조회분은 건식회화법, 조지방은 에테르 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법으로 분석하였다. 식이섬유는 α-amylase, protease 및 amyloglucosidase를 이용한 효소분해법으로 측정하였다.

유리당 분석

유리당 함량은 Oh 등(18)의 방법으로 측정하였다. 즉 손바닥 선인장 엽상경 열풍건조 시료 1 g에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출(3회)하였다. 추출물은 분석조건에 알맞도록 희석한 다음 Sep-Pak C18 cartridges (Waters Associate Inc., Miliford, MA, USA)를 통과시킨 후 0.45 µm membrane filter(Woongki Science Co., Ltd., Seoul, Korea)로 여과한 것을 HPLC(Waters 2695, Waters Associate Inc.)로 분석하였다. 칼럼은 Prevail™ Carbo-hydrate ES(4.6×250 mm, 5 µm, Grace, Deerfield, IL, USA), 검출기는 ELSD였으며, 이동상으로는 acetonitrile과 증류수를 7:3으로 혼합하여 분당 0.8 mL의 속도로 이동시켰다. 유리당 함량은 농도별로 제조한 glucose, fructose, sucrose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 HPLC로 분석하여 얻은 표준곡선으로부터 정량하였다.

총 페놀 함량 측정

추출물과 분획물의 총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법(19)으로 측정하였다. 추출물(1 mg/mL) 100 µL와 증류수 900 µL를 혼합하였고 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 이 용액에 20% Na₂CO₃ 300 µL를 가하여 혼합한 다음 증류수를 가하여 2 mL로 조정하였다. 이 용액을 23°C에서 2시간 동안 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였고 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 검량선과 비교하여 mg gallic acid equivalents(GAE)/g으로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

추출물과 분획물의 총 플라보노이드의 함량은 Chang 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각각의 시료 용액을 1 mg/mL의 농도가 되게 증류수에 희석한 후 200 µL를 취하였고 여기에 에탄올 800 µL와 5% NaNO₂ 60 µL를 가하여 균질하게 혼합한 후 5분간 실온에서 반응시켰고 10% AlCl₃을 60 µL 가하여 실온에서 다시 5분간 반응시켰다. 그 후 1 M NaOH 용액을 400 µL 가하여 1분간 상온에서 반응시켰고 증류수 500 µL를 가하여 균질화시킨 후 200 µL를 96 well plate에 분주하여 Microplate Reader(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 시료의 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalents(QE)/g으로 나타내었다.

라디칼 소거 활성 측정

추출물과 분획물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois 방법(21)을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 추출물 100 μ L와 400 μ M의 DPPH (Sigma-Aldrich Co.) 용액 100 μ L를 혼합한 후 실온(암소)에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로는 항산화제인 L-ascorbic acid, butylated hydroxy anisole(BHA), trolox(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼 소거 활성은 Re 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험 용액의 제조는 증류수에 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.)와 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하였고 상온에서 16시간 배양하여 ABTS 양이온(ABTS⁺)을 생성시킨 후, 734 nm에서 흡광도의 값이 0.7 이하가 되도록 희석하여 제조하였다. 그 다음 ABTS 용액 100 μ L에 시료 용액 100 μ L를 가하여 6분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 시료를 각각 8가지 이상의 농도로 희석하여 농도별로 소거 활성을 구한 후 IC₅₀으로 나타내었다.

ORAC 측정

추출물과 분획물의 유해산소 흡수 능력(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)은 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율로 측정하였는데, 과산화 radical의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다(23). 본 실험에서 표준용액의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(0.075 M K₂HPO₄ : 0.075 M NaH₂PO₄=61.5:38.5(v/v))를 사용하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액으로는 trolox(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고, fluorescent 표준 용액은 Ou 등(24)의 방법에 따라 fluorescein sodium salt(Sigma-Aldrich Co.)를 75 mM phosphate buffer에 가하여 78 nM 농도로 제조하였다. 추출물과 분획물에 100 μ L에 fluorescent 표준 용액 50 μ L를 가하였고, 34 mM의 AAPH 50 μ L 가하여 반응시킨 후 FLUOstar OPTIMA(BMG Labtech, Inc., Offenburg, Germany)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 1시간 동안 3분마다 흡광도를 측정하였으며, ORAC은 trolox 표준곡선으로부터 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{AUC}(\text{area under the curve})=1+(f_1/f_0)+(f_2/f_0)+(f_3/f_0)+\dots+(f_{19}/f_0)+(f_{20}/f_0)$$

$$\text{Relative ORAC value}=[(\text{AUC}_{\text{sample}}-\text{AUC}_{\text{blank}})/(\text{AUC}_{\text{trolox}}-\text{AUC}_{\text{blank}})]\times(\text{molarity of trolox/g sample})$$

Superoxide anion 소거 활성

추출물과 분획물의 superoxide anion 소거 활성은 phe-

nazine methosulfate(PMS)/ dihydronicotinamide adenine dinucleotide(NADH) system을 이용하여 생성된 superoxide anion의 양을 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원법으로 517 nm에서 측정하였다(25). 즉 각 시료 50 μ L에 125 μ M NADH 100 μ L와 63 μ M NBT 50 μ L를 PBS(pH 7.4)에 용해하여 혼합하였고 8 μ M PMS 100 μ L 첨가하여 superoxide anion 생성을 유도하였다. Superoxide anion 소거 활성은 환원된 NBT의 흡광도를 시료를 가하지 않은 대조군과 비교하여 나타내었다.

세포독성과 NO 생성 저해능 측정

실험에 사용한 세포는 murine macrophage cell line RAW264.7로 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL penicillin-streptomycin(Gibco Inc., Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

NO 생성 저해능은 RAW264.7 세포를 1 \times 10⁵ cells/mL로 조절한 후 96 well plate에 접종하였고 여러 농도의 시료로 처리하여 1시간 동안 반응시킨 후 LPS(Sigma-Aldrich Co.) 100 ng/mL를 가하여 24시간 배양한 후 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphyl) ethylenediamine(Sigma-Aldrich Co.) in 2.5(v/v) phosphoric acid] 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)의 검량선과 비교하여 환산하였다.

세포독성 평가는 WST-1(EZ-CyTox enhanced cell viability assay kit; Daeil Lab Service, Seoul, Korea) 방법을 이용하여 세포 생존율을 3회 반복 측정하였으며, 각 시료의 농도에 대한 흡광도를 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 RAW264.7 세포에 대한 독성 정도를 나타내었다.

통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 각 군의 차이는 분산분석, 사후검정은 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 실시하였고, 모든 통계자료는 SPSS 12 program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

손바닥 선인장 엽상경의 일반성분 및 유리당 함량

제주산 손바닥 선인장 엽상경 열풍건조물의 일반성분과 유리당 함량 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 수분은 5.40%, 조단백질은 7.04%, 조지방은 1.30%, 회분은 16.6%, 탄수화물은 69.5%, 조섬유는 10.1%, 식이섬유는 53.4%,

Table 1. Chemical composition and free sugar content of prickly pear cactus cladodes

Chemical component	Content
Moisture (%)	5.40±0.03
Crude protein (%)	7.04±0.21
Carbohydrate (%)	69.5±0.1
Crude fiber (%)	10.1±0.2
Soluble dietary fiber (%)	53.4±0.2
Crude lipid (%)	1.30±0.14
Crude ash (%)	16.6±0.4
Sodium (mg/100 g)	689.9±33.8
Fructose (mg/g)	31.2±3.5
Glucose (mg/g)	35.9±4.0
Sucrose (mg/g)	43.6±7.1
Energy (kcal)	318.3±2.5

Na는 689.9 mg/100 g이었으며, 유리당 함량은 fructose가 31.2 mg/g, glucose가 35.9 mg/g, sucrose가 43.6 mg/g이었다. Feugang 등(26)은 *Opuntia ficus* sp.의 엽상경에서 조단백질은 4~10%, 조지방은 1~4%, 회분은 19~23%, 탄수화물은 64~71%, Na는 400 mg/100 g이었다고 보고하여 회분과 Na 등 일부 성분은 함량에서 차이를 보였으나 대부분의 성분 함량은 유사하였다. Shin 등(27)은 손바닥 선인장 열매에서 수분은 8.52%, 조단백질은 5.51%, 조지방은 9.89%, 회분은 9.29%, 탄수화물은 66.79%, 식이섬유는 36.51%, Na는 151.24 mg/100 g, fructose는 22.5 mg/g, glucose는 18.5 mg/g, sucrose는 149.9 mg/g이었다고 보고하였다. Shin 등(27)의 결과와 비교하여 엽상경과 열매의 성분 차이를 보면 수분, 조지방, sucrose 함량은 열매가 높았지만, 조단백질, 회분, 탄수화물, 식이섬유, Na, fructose, glucose 함량은 엽상경이 높은 것으로 나타났다.

총 페놀과 총 플라보노이드 함량

제주산 손바닥 선인장 엽상경의 추출물과 분획물의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 Table 2에 나타내었다. 총 페놀 함량은 열수 추출물이 93.0 mg GAE/g, 70% 에탄올 추출물이 172.0 mg GAE/g으로 에탄올 추출물이 약 1.8배 높았으며, 분획물에서는 헥산이 220.2 mg GAE/g, 에틸아

Table 2. Total phenolic and total flavonoid contents of the extracts and fractions from prickly pear cactus cladodes

Extracts and fractions	Total phenolics (mg GAE/g)	Total flavonoids (mg QE/g)
Hot water extract	93.0±4.4 ^{a2)}	ND
70% ethanol extract	172.0±0.8 ^c	14.4±1.4 ^a
Distilled water fraction ¹⁾	155.1±1.2 ^b	ND
<i>n</i> -Butanol fraction	452.4±5.5 ^e	76.6±5.8 ^b
Ethyl acetate fraction	784.7±5.5 ^f	214.9±8.4 ^d
<i>n</i> -Hexane fraction	220.2±1.9 ^d	113.4±0.5 ^c

¹⁾Fractions were made with 70% ethanol extract.

²⁾Values with different letters (a-e) in the column are significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

세테이트가 784.7 mg GAE/g, 부탄올이 452.4 mg GAE/g, 증류수가 155.1 mg GAE/g으로 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 열수 추출물에서는 검출되지 않은 반면 70% 에탄올 추출물에서는 14.4 mg QE/g이었고 70% 에탄올 추출물의 분획물에서는 헥산이 113.4 mg QE/g, 에틸아세테이트가 214.9 mg QE/g, 부탄올이 76.6 mg QE/g으로 에틸아세테이트 분획물이 가장 높았고, 증류수 분획물에서는 검출되지 않았다. Dok-Go 등(14)의 연구에 따르면 손바닥 선인장 열매의 에틸아세테이트 분획물에서 페놀성 화합물로 (+)-dihydroquercetin, quercetin, quercetin 3-methyl ether 등을 분리하였으며, 이들 물질은 쥐의 대뇌 피질 세포에서 H₂O₂와 xanthine/xanthine oxidase 산화적 자극에 의한 신경세포 보호 효과가 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 총 플라보노이드 함량이 높은 에틸아세테이트 분획물과 헥산 분획물이 기능성을 가질 것으로 추정되어 기능성 검정을 실시하였다.

손바닥 선인장 엽상경 추출물과 분획물의 라디칼 소거 활성

제주산 손바닥 선인장 엽상경 추출물과 분획물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)은 Table 3에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)은 각각 103.8 µg/mL와 105.6 µg/mL로 가장 높은 소거 활성을 보였으며, 그 다음으로 부탄올 분획물이 각각 359.1과 379.4 µg/mL로 높은 소거 활성을 나타내었다. 한편 70% 에탄올 추출물과 열수 추출물은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)이 각각 >1,000, 792.8 µg/mL 그리고 >1,000, 853.1 µg/mL로 DPPH 소거 활성보다 ABTS 소거 활성이 높았으며, 헥산 분획물은 각각 469.6과 605.4 µg/mL로 DPPH 소거 활성이 ABTS 라디칼 소거 활성보다 높았다. 헥산 분획물을 제외한 추출물 및 분획물 활성의 차이는 DPPH와 ABTS의 차이에 인한 것으로 DPPH와 ABTS는

Table 3. DPPH and ABTS radical scavenging activities of the extracts and fractions from prickly pear cactus cladodes

Extract and fractions	Radical scavenging activity (IC ₅₀ µg/mL)	
	DPPH	ABTS
Hot water extract	>1,000 ^{e2)}	853.1±47.5 ^f
70% ethanol extract	>1,000 ^e	792.8±7.9 ^e
Distilled water fraction ¹⁾	>1,000 ^e	>1,000 ^g
<i>n</i> -Butanol fraction	359.1±19.5 ^c	379.4±9.2 ^c
Ethyl acetate fraction	103.8±6.0 ^b	105.6±1.3 ^b
<i>n</i> -Hexane fraction	469.6±32.8 ^d	605.4±21.2 ^d
Ascorbic acid	5.8±0.1 ^a	7.2±0.5 ^a
BHA	9.0±0.2 ^a	18.8±1.9 ^a
Trolox	14.8±0.2 ^a	7.0±0.4 ^a

¹⁾Fractions were made with 70% ethanol extract.

²⁾Values with different letters (a-g) in the column are significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

같은 라디칼을 이루는 물질이지만 DPPH는 자유 라디칼, ABTS는 hydroxyl, peroxy, alkoxy 및 inorganic radical과 같은 라디칼들과 반응하여 안정한 양이온 라디칼을 형성하므로, DPPH는 주로 소수성 물질의 항산화능을 측정하는데 비해 ABTS는 친수성과 소수성 물질의 항산화력을 측정할 수 있는 차이 등에 기인하기 때문으로 추정되었다(28). hexan 분획물에서 DPPH 실험법이 높은 활성을 나타낸 것은 DPPH 실험법에서는 메탄올을, ABTS 실험법에서는 2.45 mM potassium persulfate를 용매로 하기 때문에 시료의 용해도 차이에 기인하는 것으로 추정되었다.

손바닥 선인장 엽상경 추출물과 분획물의 ORAC과 superoxide anion(SOA) 소거 활성

제주산 손바닥 선인장 엽상경 추출물과 분획물의 ORAC과 SOA 소거 활성을 분석한 결과는 Table 4와 같다. ORAC는 에틸아세테이트 분획물이 391.9 $\mu\text{M TE}$ 로 가장 높은 유해산소 흡수 능력을 나타내었다. 그 다음으로 부탄올 분획물이 117.2 $\mu\text{M TE}$, hexan 분획물이 64.4 $\mu\text{M TE}$, 70% 에탄올 추출물이 47.4 $\mu\text{M TE}$, 열수 추출물이 29.4 $\mu\text{M TE}$, 증류수 분획물이 12.9 $\mu\text{M TE}$ 순으로 페놀성 화합물의 함량이 높은 추출물 또는 분획물이 유해산소 흡수 능력도 높았다.

SOA 소거 활성(IC₅₀)은 에틸아세테이트 분획물이 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높았으며, 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid(12.6 $\mu\text{g/mL}$)보다는 낮았지만 trolox(67.7 $\mu\text{g/mL}$)보다는 높은 소거 활성을 나타내었다. 그 다음으로 부탄올 분획물이 69.9 $\mu\text{g/mL}$, 70% 에탄올 추출물이 98.8 $\mu\text{g/mL}$, 열수 추출물이 116.2 $\mu\text{g/mL}$, 증류수 분획물이 170.2 $\mu\text{g/mL}$, hexan 분획물이 405.4 $\mu\text{g/mL}$ 순으로 페놀성 화합물이 높은 추출물 또는 분획물이 SOA 소거 활성도 높았다. Cai 등(29)은 중국 자생 약용식물 112종의 추출물에서 총 페놀 함량과 항산화 활성이 양의 상관관계를 갖는다고 보고한 것과 유사한 결과로 총 페놀 함량이 높은 것이 항산화 활성도

Table 4. ORAC and superoxide anion radical scavenging activity of the extracts and fractions from prickly pear cactus cladodes

Extract and fractions	ORAC ($\mu\text{M TE}$) at 125 $\mu\text{g/mL}$	Superoxide anion (IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)
Hot water extract	29.4 \pm 1.4 ^{b2)}	116.2 \pm 29.3 ^d
70% ethanol extract	47.4 \pm 0.6 ^c	98.8 \pm 4.7 ^d
Distilled water fraction ¹⁾	12.9 \pm 0.6 ^a	170.2 \pm 27.8 ^e
<i>n</i> -Butanol fraction	117.2 \pm 1.6 ^c	69.9 \pm 2.7 ^c
Ethyl acetate fraction	391.9 \pm 23.6 ^f	40.0 \pm 3.2 ^b
<i>n</i> -Hexane fraction	64.4 \pm 0.6 ^d	405.4 \pm 39.3 ^f
Ascorbic acid		12.6 \pm 3.3 ^a
BHA		>100 ^d
Trolox		67.7 \pm 2.1 ^c

¹⁾Fractions were made with 70% ethanol extract.

²⁾Values with different letters (a-e) in the column are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

높게 나타났다.

인체는 대사 과정의 산물로 각종 활성 산소종을 생성하는데, 이 활성 산소종은 효소적 또는 비효소적 항산화 작용에 의하여 소거되거나 또는 활성 산소종의 연쇄 반응을 차단하여 산화적 손상으로부터 인체를 보호한다(5,6). 본 연구에서는 인체 대사과정 중 생성되는 free radicals과 같은 물질을 직접 소거하는 활성, 즉 전자전달에 의한 항산화 측정법으로 DPPH radical과 ABTS 양이온 radical 소거 활성을 측정하였고, 수소전자 전달에 의한 항산화 측정법으로 유해산소 흡수 능력을 측정하였다. 또한 PMS/NADH system에 의해 생성되는 superoxide anion을 소거하는 활성을 측정하였다. 그 결과에서 제주산 손바닥 선인장 엽상경의 추출물과 분획물에 적용한 에틸아세테이트 분획물이 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성, superoxide anion 소거 활성, ORAC에 있어서 가장 높은 활성을 보였다.

손바닥 선인장 엽상경 추출물과 분획물의 세포독성과 NO 생성 저해능

염증 매개인자인 NO의 생성 저해 활성과 세포독성 여부를 측정하기 위하여 대식세포주를 LPS로 자극 후 추출물과 분획물의 NO 생성 저해능을 분석하여 50% 저해하는 농도인 IC₅₀ 값으로 나타내었고, WST-1을 이용하여 세포독성을 분석하여 50% 세포독성을 나타내는 농도인 CC₅₀ 값으로 나타내었다. 또한 세포독성이 낮으면서 NO 생성 저해능이 높은 시료를 선택하기 위해 selectivity index(SI=CC₅₀/IC₅₀)를 산출하였다(Table 5).

열수와 70% 에탄올 추출물, 부탄올과 증류수 분획물에서는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포독성이 관찰되지 않았으나 hexan과 에틸아세테이트 분획물에서는 세포독성이 관찰되었으며, 각각 211.2와 484.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50% 세포독성을 나타내었다.

염증반응의 매개자인 NO 생성 저해능(IC₅₀)은 hexan 분획물이 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 미만, 에틸아세테이트 분획물이 104.6 $\mu\text{g/mL}$, 부탄올 분획물이 465.3 $\mu\text{g/mL}$, 물 분획물이 599.1 $\mu\text{g/mL}$ 순으로 높은 활성을 보였으며, 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물에서는 50% 이하의 활성을 보였다. 브로콜리의 잎과 비교하였을 경우 열수와 70% 에탄올 추출물 그리고 hexan 분획물에서는 차이를 나타내지 않았으나 에틸아세테이트 분획물은 브로콜리 잎이 약 1.7배, 물 분획물은 제주산 손바닥 선인장 엽상경이 약 1.7배 높은 활성을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량이 높은 에틸아세테이트 분획물보다 hexan 분획물의 NO 소거 활성이 보다 높게 나왔는데 이는 플라보노이드계 성분이 아닌 다른 성분에 의한 것으로 추정되었다. Lee 등(30)은 손바닥 선인장의 엽상경에서 4종의 sesquiterpene을 분리하였으며 이들의 DPPH radical 소거 활성이 미미하였음은 보고하였으나 RAW264.7 대식세포주에서의 NO 생성 저해능은 보고하지는 않았다. 일부의 sesquiterpene 중 chamazulene 같은 물질은 높은 항염 활성을

Table 5. Inhibition of nitric oxide production and cell toxicity in LPS (100 ng/mL)-induced RAW264.7 cells of the extracts and fractions from prickly pear cactus cladodes

Extract and fractions	Inhibition of nitric oxide production (IC ₅₀ µg/mL) ²⁾	Cell toxicity (CC ₅₀ µg/mL) ³⁾	Selectivity index (CC ₅₀ /IC ₅₀)
Prickly pear cactus cladodes			
Hot water extract	>1,000 ^{h4)}	>1,000 ^f	1
70% ethanol extract	>1,000 ^h	>1,000 ^f	1
Distilled water fraction ¹⁾	599.1±8.3 ^g	>1,000 ^f	1.66
<i>n</i> -Butanol fraction	465.3±8.7 ^c	>1,000 ^f	2.14
Ethyl acetate fraction	104.6±0.9 ^d	484.5±10.1 ^e	4.63
<i>n</i> -Hexane fraction	<62.5 ^c	211.2±2.0 ^c	3.37
Broccoli leaves			
Hot water extract	>1,000 ^h	>1,000 ^f	1
70% ethanol extract	>1,000 ^h	>1,000 ^f	1
Distilled water fraction ¹⁾	>1,000 ^h	>1,000 ^f	1
<i>n</i> -Butanol fraction	556.1±7.1 ^f	>1,000 ^f	1.79
Ethyl acetate fraction	<62.5 ^c	228.3±25.6 ^d	3.65
<i>n</i> -Hexane fraction	<62.5 ^c	239.7±2.6 ^d	3.83
Quercetin	3.2±0.1 ^a	>20 ^a	6.25
Pyrrrolidine dithiocarbamate	27.5±1.9 ^b	>100 ^b	3.63

¹⁾Fractions were made with 70% ethanol extract.

²⁾The concentration needed to reduce nitric oxide production by 50%.

³⁾The concentration needed to reduce cell viability by 50%.

⁴⁾Values with different letters (a-h) in the column are significantly different at *P*<0.05 according to Duncan's multiple range test.

가지고 있는 것으로 보고되었다(31). 따라서 제주산 손바닥 선인장 엽상경의 핵산 분획물에 포함되어 있는 일부 성분이 이와 같이 높은 NO 생성 저해능을 가질 가능성이 있을 것으로 추정되었다.

세포독성 대비 NO 생성 저해활성을 나타내는 selectivity index는 에틸아세테이트 분획물이 4.63으로 가장 높았고 다음으로는 핵산(3.37), 부탄올(2.14), 증류수(1.66) 순으로 양성 대조군으로 사용한 quercetin(6.25)보다는 낮은 활성을 나타내었는데, 이는 에틸아세테이트 분획물이 세포독성 대비 NO 생성 저해 활성이 높은 것으로 판단된다. 따라서 제주산 손바닥 선인장 엽상경의 추출물과 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획물이 항산화 활성과 항염 활성이 가장 높았는데, 이는 총 페놀과 총 플라보노이드 함량에 기인하는 것으로 추정되었다.

요 약

제주산 손바닥 선인장의 엽상경을 열수와 70% 에탄올로 추출한 후 분획하여 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성 및 항염증 활성을 측정하였다. 총 페놀 함량은 에틸아세테이트 분획물이 784 mg GAE/g으로 가장 높았고 그 다음으로 부탄올 분획물(452), 핵산 분획물(220) 순이었다. 총 플라보노이드 함량도 에틸아세테이트 분획물이 214 mg GE/g으로 가장 높았고 핵산 분획물(113), 부탄올 분획물(76) 순이었다. 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 핵산 분획물의 DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀)은 각각 103, 359, 469 µg/mL였고, ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)도 각각 105,

379, 605 µg/mL로 에틸아세테이트 분획물이 가장 높았다. 유해산소 억제 능력(ORAC)은 에틸아세테이트 분획물이 391 µM TE로 가장 높은 활성을 보였고 부탄올 분획물(117), 핵산 분획물(64) 순이었지만, superoxide anion 소거 활성(IC₅₀, µg/mL)은 에틸아세테이트 분획물(40), 부탄올 분획물(69), 70% 에탄올(98) 순이었다. RAW264.7 세포에 의한 NO 생성 저해능(IC₅₀, µg/mL)은 핵산 분획물(62), 에틸아세테이트 분획물(104), 부탄올 분획물(465) 순으로 높은 활성을 보였다. 세포독성 대비 NO 생성 저해 활성을 나타내는 SI 지수는 에틸아세테이트 분획물이 4.63으로 가장 높았고, 다음으로는 핵산 분획물(3.37), 부탄올 분획물(2.14), 증류수 추출물(1.66) 순으로, 양성 대조군으로 사용한 quercetin(6.25)보다는 낮았다. 결론적으로 제주산 손바닥 선인장 엽상경의 추출물과 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획물이 항산화 활성과 항염 활성이 가장 높았으며, 이는 총 페놀과 총 플라보노이드 함량에 기인하는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업 육성사업으로 수행된 연구 결과입니다.

REFERENCES

1. Park SS, Kim JJ, Yoon JA, Lee JH, Jung BO, Chung SJ. 2011. Preparation and quality characteristics of *Takju* (rice wine) with *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* and chito-oligosaccharide. *J Chitin Chitosan* 16: 164-169.

2. Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, Chandramohan Reddy T, Reddy GV, Reddanna P. 2007. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine* 14: 739-746.
3. Galati EM, Monforte MT, Tripodo MM, d'Aquino A, Mondello MR. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *J Ethnopharmacol* 76: 1-9.
4. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
5. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. 2005. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost* 3: 254-267.
6. Allen RG, Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.
7. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
8. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
9. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244-4250.
10. Seo KI, Yang KH, Shim KH. 1999. Antimicrobial and antioxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* extracts. *Korean J Food Preserv* 6: 345-349.
11. Lee YS, Shon HS, Rho JO. 2011. The antibacterial effects of *Backryeoncho* (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) extracts as applied to kimchi fermentation with lactic acid bacteria and food poisoning bacteria. *Korean J Hum Ecol* 20: 1-10.
12. Yoon MS, Yoo JS, Lee KK, Kim MK. 2012. A study on biological activities of *Opuntia humifusa* cladode extracts. *J Appl Biol Chem* 55: 117-121.
13. Fernandez ML, Trejo A, McNamara DJ. 1990. Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *J Nutr* 120: 1283-1290.
14. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res* 965: 130-136.
15. Avila-Nava A, Calderón-Oliver M, Medina-Campos ON, Zou T, Gu L, Torres N, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J. 2014. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Funct Foods* 10: 13-24.
16. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem* 50: 6895-6901.
17. KFDA. 2010. *Food Code*. Korea Food and Drug Association, Seoul, Korea.
18. Oh HJ, Jeon SB, Kang HY, Yang YJ, Kim SC, Lim SB. 2011. Chemical composition and antioxidative activity of kiwifruit in different cultivars and maturity. *Korean J Food & Nutr* 40: 343-349.
19. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis D, Barrow C. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol* 18: 445-450.
20. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182.
21. Blois S. 1955. A note on free radical formation in biologically occurring quinones. *Biochim Biophys Acta* 18: 165.
22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
23. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50: 4437-4444.
24. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
25. Liu F, Ooi VE, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 60: 763-771.
26. Feugang JM, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C. 2006. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci* 11: 2574-2589.
27. Shin EH, Park SJ, Choi SK. 2011. Component analysis and antioxidant activity of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J East Asian Soc Dietary Life* 21: 691-697.
28. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
29. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
30. Lee EH, Kim HJ, Song YS, Jin C, Lee KT, Cho J, Lee YS. 2003. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch Pharm Res* 26: 1018-1023.
31. Safayhi H, Sabieraj J, Sailer ER, Ammon HP. 1994. Chama-zulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. *Planta Med* 60: 410-413.