

제주 당근 꽃의 항산화 및 항염증 활성

김수경, 변후돈, 김상철, 양경월, 김정희, 한종헌*

Antioxidative and Anti-inflammatory Activities of Carrot flower

Su-Gyeong Kim, Hoo-Dhon Byun, Sang Cheol Kim, Kyong-wol Yang, Jeong Hee Kim, and Jong-Heon Han*

Received: 7 April 2014 / Revised: 17 February 2015 / Accepted: 20 April 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The antioxidant and anti-inflammatory activities of extract and its fraction of *Daucus carota var. sativa* flower were studied in vitro. Extract and ethyl acetate fraction, butanol fraction of carrot flower showed radical scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). We also investigated the effect of extract and ethyl acetate fraction, butanol fraction of carrot flower on NO production in a lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells. Extract and its fraction of carrot flower significantly inhibited NO production and this inhibitory action was not due to the cytotoxicity. This study suggests that extract and ethyl acetate fraction, butanol fraction of *Daucus carota var. sativa* flower could contribute to the chemoprevention and therapy of oxidative stress and inflammation.

Keywords: *Daucus carota var. sativa* flower, Antioxidant, Anti-inflammatory, Nitric oxide

1. INTRODUCTION

천연물로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 천연 항산화제로는 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있다. 식물 유래의 2차 대사산

물들은 자유유리기 (free radical)와 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지한다는 것이 밝혀졌다 (1-2). 인체 내에서 생성되는 radical로 실험하는 것이 어렵기 때문에 다른 radical을 대상으로 in-vitro 실험하여 인체내에서의 radical 소거능을 색의 변화를 통해 간접적으로 확인하는 방법으로 DPPH와 ABTS assay가 널리 연구되어지고 있다. 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며 (3), 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다 (4). 염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다 (5). 염증을 일으키는 요인 중에서 세균에 의한 것이 가장 많으며 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene과 같은 혈관생성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발된다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등과 같은 질환의 요인이 되기도 한다 (6). Nitric oxide (NO)는 NO synthases (NOSs)에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는 유리기로, 체내 방어 및 신호전달, 혈관 확장 등의 2차 신호전달자로서 다양한 생리기능을 가진다 (7-10).

당근 (*Daucus carota var. sativa* DC)은 우리나라 각처에서 널리 재배되고 있는 산형과에 속하는 이년생 초본식물이다. 당근에는 당질과 카로틴이 풍부하고 당질로는 설탕과 맥아당·과당 등의 환원당을 함유하고 있어서 감미가 강하다. 색 가운데 β -카로틴이 약 60%를 차지하고 있어, 100g당 비트민

(재)제주테크노파크 바이오융합센터
Bio Convergence Center, Jeju Technopark, Jeju 690-121, Korea
Tel: +82-64-720-2346, Fax: +82-64-720-2331
e-mail: hjh11119@jejutp.or.kr

(주)제주사랑농수산
Jeju Love Co., Ltd., 66, Haegwon-ro 13 gil, Gujwa-eup, Jeju 695-975, Korea

A가 1만 I.U. 이상 함유되어 있다. 비타민C도 많이 들어 있으나, 산화효소가 많아서 갈거나 썰면 쉽게 산화되고 당근에서 붉은 색소성분인 카로틴을 추출하여 천연색소로 이용하기도 한다. 한방에서는 뿌리를 학슬풍이라는 약재로 쓰는데, 이질·백일해·해수·복부팽만에 효과가 있고 구충제로도 사용한다. 당근꽃의 항산화 및 항염증에 대한 연구 보고는 없는 실정으로 본 연구는 당근꽃이 기능성 생물 소재로서의 활용 가능성이 있는지를 평가하기 위하여 연구하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 시료 추출 및 분석

2.1.1. 시료의 선택

본 실험에 사용한 당근꽃 등 4종은 제주도 내 재배되고 있는 특산품 중 생산량이 많은 품목으로 (주)제주사랑농수산에서 제공 받아 사용하였다. 선택된 시료는 수돗물로 여러 번 세척한 후 정선하여 자연 탈수한 다음 37°C에서 12시간 건조한 후 제공될 때까지 냉동 보관하였다.

2.1.2. 열수 추출

당근꽃 등 4종 건조물 시료를 분쇄기로 갈아서 증류수 20배로 침전하여 온도 70°C에서 3시간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 동일하게 취하여 40°C에서 회전농축기를 이용하여 농축하고 동결건조시켰다. 동결건조를 마친 추출물은 실험 때까지 -20°C 이하의 냉동에서 보관 사용하였다. 건조물 시료 정보는 아래와 같다.

2.1.3. 용매 분획

당근꽃 추출물 10 g을 증류수 0.5 L에 현탁시킨 후에, 각각 헥산 (n-Hexane, 0.5 L×3), 에틸아세테이트 (ethyl acetate, 0.5 L×3), 부탄올 (n-Butanol, 0.5 L×3), 물 (H₂O)의 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매 분획하여 4개의 분획물을 얻었고, 각각의 분획물을 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 헥산과 에틸아세테이트 분획물은 100% 에탄올에 녹였고, 부탄올과 물 분획물은 phosphate buffered saline (PBS)와 100% 에탄올 비율 1:1로 녹여서 실험하였다.

2.2. 항산화 효과 측정

2.2.1. DPPH assay

전자공여능 (electron donating ability) 측정은 Blois 방법

의한 DPPH 자유유리기 소거법에 따라 측정하였다. 즉, 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료를 96well plate에 100μl씩 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA)를 사용하였다. DPPH 자유유리기 소거활성은 아래의 시으로부터 산출하였고 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료별로 3회 반복 실험 후 평균값을 구하였다.

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100 (\%)$$

Asample = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

Acontrol = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

2.2.2. ABTS assay

7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 물에 각각 녹여 ABTS 라디칼을 형성시키기 위해서 각각의 용액을 1:1 비율로 섞어주고 빛에 의한 라디칼 소모를 최소화하기 위하여 어두운 곳에서 12시간 동안 보관하였다. ABTS 용액을 UV 흡광도가 1.00이 되도록 조정하였다. 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료 20 μL과 ABTS 용액 180 μL를 첨가하여 10분 후에 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 Gallic acid를 사용하였다. ABTS의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀으로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100 (\%)$$

Asample = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

Acontrol = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

2.3. 항염증 효과 측정

2.3.1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 1% Penicillin-streptomycin과 10% Fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, USA) 10mL 배지에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양 하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, E. coli serotype 0111: B4)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

2.3.2. 세포독성 평가

RAW264.7 세포 (1.5×10⁵ cells/mL)를 18시간 전 배양하고 시

Table 1. Information and the various extraction conditions of four flower

시료명	학명	채집시기	채집장소	추출조건
당근꽃	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i> DC.	가을	구좌읍 행원	열수
감자꽃	<i>Solanum tuberosum</i> L.	여름	한림읍 대정	열수
감귤꽃	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	여름	구좌읍 행원	열수
유채꽃	<i>Brassica napus</i> L.	봄	구좌읍 행원	열수

료와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, 3-(4,5dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 100 µg을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 200 µL를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 농도에 대한 흡광도 값을 구하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제 정도를 조사하였다.

2.3.3. Nitric oxide 생성 억제 평가

RAW264.7 cell (1.5×10⁶ cells/mL)을 18시간 전 배양 후, 시료와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO²-형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfani-lamide, 0.1% (w/v) naphyl-ethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)를 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

III. RESULT AND DISCUSSION

3.1. 4종에 대한 항산화 활성

당근꽃 등 4종의 추출물 (62.5, 125, 250, 500 µg/mL)에 대하여 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다 (Table 2). 항산화 활성이 우수하다고 알려진 ascorbic acid와 gallic acid를 대조군 물질 (1.25, 2.5, 5, 10 µg/mL)로 사용하였다. 그 결과 DPPH 자유유리기 소거 활성은 감자꽃에서 IC₅₀ 값이 59.56 µg/mL으로 가장 좋았으며, 당근꽃 94.13 µg/mL, 감귤꽃 154.77 µg/mL, 유채꽃 387.41 µg/mL을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 IC₅₀ 값은 당근꽃이 147.66 µg/mL, 감자꽃 149.27 µg/mL, 감귤꽃 176.54 µg/mL, 유채꽃 375.99 µg/mL의 활성을 보였다.

3.2. 4종에 대한 항염증 활성

RAW 264.7 cell에서 4종의 꽃 추출물 (62.5, 125, 250, 500 µg/mL)의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC₅₀ 값과 50%의 세포독성을 나타내는 농도인 TC₅₀ 값을 산출하였다 (Table 3). 추출물과 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하여 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO₂-형태로 측정하였다. 당근꽃 추출물은 399.37 µg/mL의 농도에서 50% NO 억제 활성을 나타냈으며 이때 세포독성은 나타나지 않았다. 감자꽃은 130.15 µg/mL의 농도에서 50%의 세포독성을 나타냈으며 감귤꽃과 유채꽃은 500 µg/mL의 농도에서는 NO억제 효과를 확인할 수 없었다. 이런 결과를 기초로 하여 당근꽃을 분획하여 항산화 효과 및 항염증 효과를 확인하였다.

3.3. 당근꽃 추출물 및 분획물에 대한 항산화 및 항염증 연구

3.3.1. 항산화 연구

당근꽃의 추출물 및 각각의 용매 분획물을 시료 (62.5, 125, 250, 500 µg/mL)로 사용하였고, 항산화 활성이 우수하다고 알려진 ascorbic acid와 gallic acid를 대조군 물질 (1.25, 2.5, 5, 10 µg/mL)로 사용하였다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 IC₅₀ 값은 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물에서 각각 109.8 µg/mL, 51.9 µg/mL, 39.7 µg/mL, 263.7 µg/mL을 나타내었다 (Table 4). 이 중 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물이 높은 활성을 보였다.

3.3.2. 항염증 활성 연구

RAW 264.7 cell에서 당근꽃 추출물 및 분획물의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC₅₀ 값과 50%의 세포독성을 나타내는

Table 2. Antioxidant activities of the flower extract

Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	
	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
당근꽃	94.13±2.47	147.66±1.43
감자꽃	59.56±0.73	149.27±2.50
감귤꽃	154.77±1.09	176.54±4.03
유채꽃	387.41±3.76	375.99±4.03
Ascorbic acid	5.48±0.36	-
Gallic acid	-	2.06±0.02

¹⁾IC₅₀ values were calculated from regression lines using different concentration in triplicate experiments.

Table 3. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the extract in RAW 264.7 cells

Sample	TC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	IC ₅₀ ²⁾ (µg/mL)
당근꽃	>500	399.37±13.06
감자꽃	130.15±4.73	52.14±1.85
감귤꽃	>500	>500
유채꽃	>500	>500

¹⁾TC₅₀ is the concentration producing 50% toxicity in RAW 264.7 cells.

²⁾IC₅₀ is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

Table 4. Antioxidant activities of *Daucus carota* var. *sativa* flower extract and its fractions

Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	
	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
당근꽃 추출물	94.13±2.47	147.66±1.43
Hexane fraction	>1000	>1000
EtOAc fraction	51.97±2.17	47.67±1.04
BuOH fraction	39.75±0.66	32.00±0.14
Water fraction	263.75±6.98	183.24±2.03
Ascorbic acid	5.48±0.36	-
Gallic acid	-	2.06±0.02

¹⁾IC₅₀ values were calculated from regression lines using different concentration in triplicate experiments.

Table 5. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the extract and its fractions of *Daucus carota var. sativa* flower in RAW 264.7 cells

	TC ₅₀ ¹⁾ (ug/mL)	IC ₅₀ ²⁾ (ug/mL)
당근꽃 추출물	>500	399.37±13.06
Hexane fraction	125.59±2.61	47.04±2.65
EtOAc fraction	>200	88.68±4.19
BuOH fraction	>200	98.62±4.05
Water fraction	>200	>200

¹⁾TC₅₀ is the concentration producing 50% toxicity in RAW 264.7 cells.

²⁾IC₅₀ is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

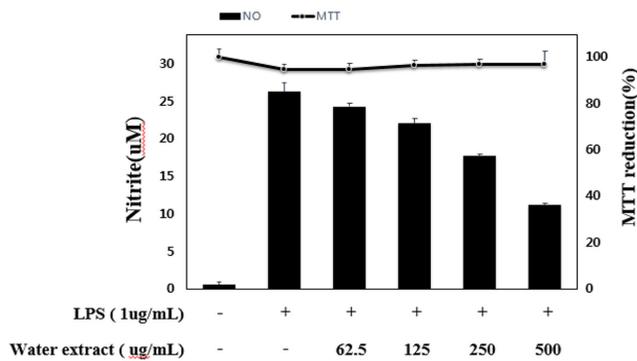


Fig. 1. Effects of extract of *Daucus carota var. sativa* flower on cytotoxicity and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

농도인 TC₅₀ 값을 산출하였다 (Table 5). 추출물과 LPS (1 ug/mL)를 동시처리하여 24시간 배양하여 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO²형태로 측정하였다.

RAW 264.7 세포에 당근꽃 추출물 (62.5, 125, 250, 500 ug/mL)과 LPS (1 ug/mL)를 동시처리하여 24시간 배양한 후 MTT 분석을 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과 당근꽃 추출물은 500 ug/mL 이하의 농도에서 90~100%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않았으며 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO²형태로 측정하였다. 당근꽃 추출물 500 ug/mL의 농도에서 LPS를 단독으로 처리한 군과 비교해 볼 때 57.5% NO생성을 억제하는 것으로 나타나 높은 NO 생성 억제 활성을 보였다 (Fig. 1).

RAW 264.7 세포에 당근꽃 분획물 (25, 50, 100, 200 ug/mL)과 LPS (1 ug/mL)를 동시처리하여 24시간 배양한 후 MTT 분석을 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과 당근꽃의 Hexan 분획물은 129.59 ug/mL의 농도에서 50%의 세포독성을 나타냈으며, EtOAc, BuOH 및 water 분획물은 200 ug/mL 이하의 95~105%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Figs. 2, 3). 생성된 NO의 양은 당근꽃 분획물 200 ug/mL의 농도에서 LPS를 단독으로 처리한 군과 비교해 볼

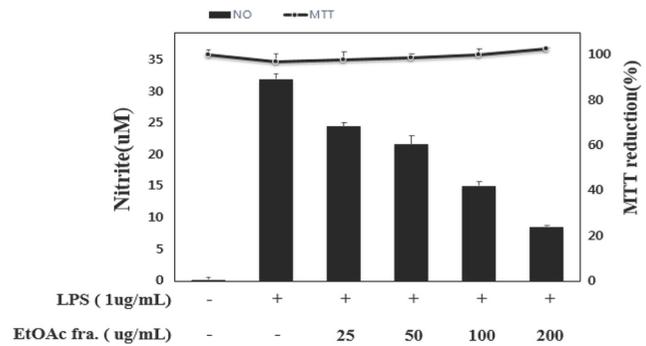


Fig. 2. Effects of EtOAc fraction of *Daucus carota var. sativa* flower on cytotoxicity and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

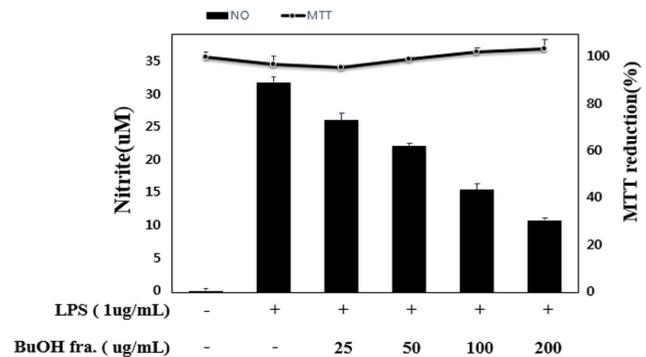


Fig. 3. Effects of BuOH fraction of *Daucus carota var. sativa* flower on cytotoxicity and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

때 EtOAc 층은 73.1%, BuOH 층은 65.5% 다른 분획물에 보다 높은 NO 생성 억제 활성을 보였다 (Figs. 2, 3). 그리고 NO 생성 억제율에 대한 IC₅₀값은 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물이 각각 88.68 ug/mL, 98.62 ug/mL로 나타났다. 이런 결과를 기초로 하여 NO활성에 관여하는 인자와의 상관관계를 계속 연구할 필요가 있으며 결론적으로 본 연구를 통하여 당근꽃 추출물이 활성산소 등 자유유리기에 의해 발생하는 여러 만성질환 발병을 지연시키고 나아가서는 예방하는 기능성 소재로서의 활용 가능성을 보여주고 있다. 또한, 항산화 및 항염증 효과와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 활용가치도 있다고 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 산업통상자원부 “제주광역경제권 선도산업 육성 사업”에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 (과제번호: R0001462), 지원에 감사합니다.

REFERENCES

1. Jeong, S. J., J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baeg (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 135-140.
2. Kang, I. H., J. H. Cha, J. H. Han, S. W. Lee, H. J. Kim, S. H. Kwon, I. H. Han, B. S. Hwang, and W. K. Whang (2005) Isolation of anti-oxidant from domestic *crataegus pinnatifida bunge* leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* 36: 121-128.
3. Huang, M. T., C. T. Ho, and C. Y. Lee (1992) *Phenolic compounds in food and their effects on health II: Antioxidants and cancer prevention*. pp. 54-71. American Chemical Society (ACS), Washington DC, USA.
4. Kim, E. C., S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row (2005) Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 16: 348-353.
5. Lee, J. Y. (2009) Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Malus micromalus* Makino in Jeju Island. *KSBB J.* 24: 327-333.
6. Willoughby, D. A. (1971) Human arthritis applied to animal models towards a better therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 34: 471-478.
7. Knowles, R. G. and S. Mocada (1992) Nitric oxides signal in blood vessels. *TIBS.* 17: 399-402.
8. Monacada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
9. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
10. Palmer, R. M., D. S. Ashton, and S. Monacada (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.