

하고초 추출물의 항산화 활성 및 성분 분석

서지영 · 성준섭 · 윤민음 · 이예슬 · 하지훈 · 박동순* · 박수남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, 코스메틱 융복합산업지원센터
*아람휴비스(주)

(2016년 9월 26일 접수; 2016년 11월 14일 수정; 2016년 12월 9일 채택)

Antioxidative Activity and Component Analysis of *Prunella vulgaris* L. Extract/Fractions

Ji Young Suh · Joon Seob Seong · Mid Eum Yun · Ye Seul Lee · Ji Hoon Ha
Dong Soon Park* · Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration
Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu,
Seoul 01811, Korea

*ARAM HUVIS Co., Ltd., Bundang Seoul National University Hospital Health Care Innovation
Park 172, Dolma-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13605, Korea

(Received September 26, 2016; Revised November 14, 2016; Accepted December 9, 2016)

요약 : 본 연구에서는 하고초(*Prunella vulgaris* L.)의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 대상으로 항산화 활성과 유효성분 분석 연구를 수행하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획에서 각각 15.25 $\mu\text{g/mL}$, 8.68 $\mu\text{g/mL}$ 및 8.25 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 하고초 추출물의 총항산화능(OSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획에서 각각 4.68 $\mu\text{g/mL}$, 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 및 1.02 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구 세포손상에 대한 보호효과는 1 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 아글리콘 분획의 τ_{50} 이 337.9 min으로 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 이는 대표적인 항산화 물질로 알려진 (+)- α -tocopherol (τ_{50} = 38.7 분)보다도 9배나 큰 세포 보호 효과를 나타냄을 알았다. 실험에 사용된 하고초 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에 대하여 TLC와 HPLC를 이용한 성분 분석을 수행하였다. 에틸아세테이트 분획에서는 caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin 3- β -D-glucoside, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, astragalinal (kaempferol-3-O-glucoside)을 확인하였다. 아글리콘 분획에서는 caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin 및 kaempferol이 존재함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터, 하고초 추출물 및 분획물은 $^1\text{O}_2$ 또는 ROS를 소거함으로써 세포막을 보호할 수 있는 천연 항산화제로서 화장품 분야에서 응용이 가능함을 시사하였다.

†Corresponding author
(E-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

주제어 : 하고초, 활성산소, 항산화 활성, 플라보노이드

Abstract : In this study, the antioxidative effects and active component analysis of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from *Prunella vulgaris* L. were investigated. The free radical scavenging activities (FSC₅₀) was investigated at 50% ethanol extract (15.25 $\mu\text{g/mL}$), ethyl acetate fraction (8.68 $\mu\text{g/mL}$), and aglycone fraction (8.25 $\mu\text{g/mL}$) respectively. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system using the luminol-dependent chemiluminescence assay was investigated at 50% ethanol extract (4.68 $\mu\text{g/mL}$), ethyl acetate fraction (1.00 $\mu\text{g/mL}$), and aglycone fraction (1.02 $\mu\text{g/mL}$) respectively. In the cellular protective effect against $^1\text{O}_2$ induced cellular damage of human erythrocytes, extract/fractions of *P. vulgaris* L. were increased in a concentration dependent manner (1~25 $\mu\text{g/mL}$). Especially, τ_{50} of aglycone fraction at concentrations of 25 $\mu\text{g/mL}$ showed the most protective effects at 337.9 min. It's showed nine times higher (+)- α -tocopherol ($\tau_{50} = 38.7$ min) as typical antioxidant in the $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes. TLC and HPLC were used to analyse active components in the ethyl acetate fraction and aglycone fraction of *P. vulgaris* L. In ethyl acetate fraction, caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin 3- β -D-glucoside, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, astragalol (kaempferol-3-O-glucoside) were identified. In aglycone fraction, caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin, kaempferol were identified. These results indicated that extract/fraction of *P. vulgaris* L. is may be used in cosmetics industry as natural antioxidants by quenching and/or scavenging $^1\text{O}_2$ and other ROS, and protecting cellular membranes.

Keywords : *Prunella vulgaris* L., reactive oxygen species, antioxidative activity, flavonoids,

1. 서론

피부는 신체의 최외각 장기로써 자외선, 공해, 흡연, 세균 등의 다양한 환경적 요인과 접촉하고 있기 때문에 직접적으로 산화적 스트레스 요인의 공격에 노출되어 있다. 산화적 스트레스의 주된 원인은 자외선(UVA 및 UVB)에 대한 노출이며, 그로 인해 발생된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부의 항산화 방어계를 공격하여 붕괴시킴으로써 피부는 산화적 스트레스에 노출된다. 활성산소종(ROS)의 종류로는 라디칼종인 superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 과 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)이 있고, 비라디칼종인 singlet oxygen($^1\text{O}_2$)과 hydrogen peroxide(H_2O_2), 그리고 활성산소종(ROS)과 생체 구성 성분과의 반응으로 생성되는 유기 자유 라디칼인 peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), alkoxy radical($\text{RO}\cdot$)등이 있다 [1-3]. 이들은 광증감반응 및 여러 효소 반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐 조직 및 세포에서 생성될 수 있으며, 그 중 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 과 $\cdot\text{OH}$ 은 그 반

응성이 가장 크고, 피부의 세포 손상 및 조직 손상을 야기하는데 핵심적인 역할을 한다[4-5]. 피부의 항산화 방어계의 구성 요소로는 효소적 항산화제인 superoxide dimutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHPx)와 비효소적 항산화제인 비타민 C, 비타민 E, 플라보노이드 등이 있고, 이들은 서로 상호보완 작용을 통하여 피부에서 항산화 네트워크를 형성한다. 하지만 ROS가 과잉으로 생성되면 항산화 네트워크가 붕괴되면서 피부 손상이 나타나게 된다[6-9]. 피부 손상은 지질 과산화 반응의 개시, 단백질 및 DNA의 산화, 그리고 엘라스틴, 콜라겐 및 히알루론산 등 결합조직 성분의 사슬 절단 및 비정상적 교차결합을 통해 주름 생성 등을 수반하는 피부 노화 과정으로 이어진다[10-13]. 따라서 생성된 ROS를 제거하거나 ROS가 생성되는 것을 억제하기 위해서는 손상된 피부 항산화 방어망을 보완할 수 있는, 이에 적절한 항산화제를 개발하고 화장품 제형 등을 통하여 항산화제를 보충할 필요가 있다.

하고초(*Prunella vulgaris* L.)는 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 한방에서는 지상부를 건조시킨 것을 말한다. 하고초는 이노, 소염, 해열 및 혈압강하 작용 등의 약리작용이 알려져 있다[14-15]. 일반적으로 한국, 중국 등의 동아시아와 유럽에서 자생하며, 'self-heal'로 알려져 있다[16]. 하고초의 대표적인 성분으로는 oleanolic acid, ursolic acid, caffeic acid 및 rutin 등이 알려져 있으며, 지상부에는 α -spinasterol, stigmast-7-en-3 β -ol 및 triterpenoids 성분들이 보고되고 있다[17-19]. 생리활성에 대한 연구로는 사람 면역 결핍 바이러스 (HIV type-1) 활성 억제[20], 하고초에서 분리된 polysaccharided의 herpes simplex virus type 1과 2에 대한 활성 억제[21], 항알리지 활성[22], 항염 활성[23] 및 일부 항산화 활성[24]이 보고되고 있다. 그러나 각종 ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$)가 생성되는 계에서 하고초 추출물의 분획별(50% 에탄올 추출, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획) ROS에 대한 총항산화능 평가나 피부노화에 중요한 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 하고초 추출물 및 분획물들에 대하여 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종에 대한 총 항산화능, 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호효과를 측정하고자 하였고, 그 활성 성분들을 분석함으로써 하고초 추출물의 항산화 또는 항노화 화장품 소재로서 응용 가능성이 있는지를 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

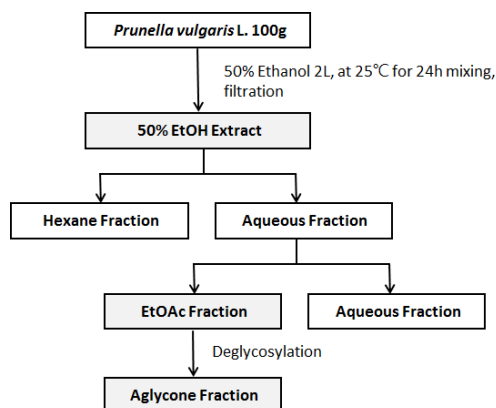
2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였다. pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였고, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack VP-ODS C18 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 제품을 사용하였다. Free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, luminol, heparin, 광증감제로 사용된

rose bengal은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, H_2SO_4 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 acid, caffeic acid, rosmarinic acid, astragaloside (kaempferol-3-O-glucoside), kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin 3- β -D-glucoside, rutin, kaempferol, quercetin은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 하고초는 2016년 3월 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 하고초의 추출/분획 및 수율

실험에 사용한 하고초는 Scheme 1과 같은 방법으로 추출 및 분획을 실시하였다. 건조된 하고초 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 2 L를 이용하여 24시간 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 분말을 얻었다. 그리고 50% 에탄올 추출물을 n-헥산을 이용하여 염록소 등의 비극성 성분을 제거한 뒤 에틸아세테이트를 이용하여 3회 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 아글리콘 분획은 에틸아세테이트 분획을 산 가수분해 하여 당을 제거하여 얻었다. 아글리콘 분획은 0.1 g의 에틸아세테이트 파우더를 D·W, 아세톤 및 H_2SO_4 를 4.5 : 5 : 0.5 (v/v) 비율로 혼합한 10 mL용액에 4시간 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트를 이용해 분획하고 이를 감압·농축하여 아글리콘 분획을 제조하였다. 수율은 건조된 하고초(100 g)를 기준으로 계산하였다. 건조된 하고초의 50% 에탄올 추출물은 23.3%, 에틸아세테이트 분획은 1.53%였으며, 에틸아세테이트 분획에서 당을 제거한 아글리콘 분획의 수율은 0.74%로 나타났다.



Scheme 1. Preparation of extract and fractions from dried *P. vulgaris* L.

2.3. 하고초 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자주게능을 통하여 시료의 환원력을 측정하는 실험법이다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 하고초 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 분 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 하였다. 자유 라디칼 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (free radical scavenging activity, FSC₅₀, μg/mL)로서 표기하였으며, 자유 라디칼(DPPH) 소거활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계는 다양한 ROS(O₂^{•-}, •OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있으며,

이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 하고초 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 분 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μL를 넣고 화학발광을 25 분 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)로서 표기하였다.

2.4. 광용혈법을 이용한 세포 보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 4 °C의 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 분 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 이를 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 적혈구 현탁액을 제조하여 사용하였으며, 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 하고초 추출물 및 분획의 세포 보호 효과 측정

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 시료를 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하고 암소에서 30 분 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증광제

rose-bengal ($12 \mu\text{M}$) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 분 동안 광조사를 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 $50 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 분 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 분 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온실에서 행하였다. 하고초 추출물 및 분획의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50} 이 30.3 분으로 오차범위 ± 1.3 분 이내로 재현성이 양호하게 나타났다.

2.5. TLC 및 HPLC를 이용한 하고초 추출물의 성분 분석

하고초 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore $0.45 \mu\text{m}$)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC (normal phase) 및 비극성 HPLC (C18) 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료와 표준물질의 Rf 값과 자외선 및 NP-PEG(natural products-polyethylene glycol, 2-aminoethyl diphenylborinate) 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.

Table 1. TLC Mobile Phase for Separation of EtOAc Fraction/Aglycone Fraction of *P. vulgaris* L.

Eluent system	
EtOAc Fraction	Ethyl acetate : chloroform : formic acid : D·W = 8 : 1 : 0.4 : 0.2 (v/v)
Aglycone Fraction	

Table 2. HPLC Condition for Separation of EtOAc Fraction/Aglycone Fraction of *P. vulgaris* L.

Condition of HPLC analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254 ~ 400 nm			
Flow rate	1.0 mL/분			
Injection volume	20 μL			
Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution	Program order	Time (분)	2% AA ¹⁾ in water (%)	0.5% AA ¹⁾ in 50% ACN ²⁾ (%)
	1	0	80	20
	2	35	40	60
	3	50	40	60
	4	55	80	20
5	60	80	20	

¹⁾ AA : Acetic acid, ²⁾ ACN : Acetonitrile

3. 결과 및 고찰

3.1. 하고초 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

자외선 노출에 의해 발생하는 활성산소들 중 $O_2^{\cdot-}$, 및 $\cdot OH$ 과 같은 홀전자를 갖는 자유 라디칼은 반응성이 커서 세포막과 결합하여 지질과 산화반응의 자동산화반응을 개시시킬 수 있다. 이때 생체 내에 존재하는 항산화제인 (+)- α -tocopherol 등은 지질과산화 연쇄 반응에서 생성된 지질 라디칼에 전자를 제공함으로써 연쇄반응을 종결시킨다. 이와 같이 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통해서 시료의 자유라디칼 소거활성(free radical scavenging concentration, FSC₅₀)을 측정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여 하고초 추출물 및 분획의 라디칼 소거활성을 측정하였고 지용성 항산화제로 잘 알려진 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성과 비교하였다. 자유 라디칼이 50% 소거되는 농도인 FSC₅₀은 하고초 50% 에탄올 추출물이 15.25 $\mu g/mL$, 에틸아세테이트 분획이 8.68 $\mu g/mL$, 아글리콘 분획은 8.25 $\mu g/mL$ 로 나타났다(Fig. 1.). 하고초 추출물의 자유라디칼 소거활성은 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 (+)- α -tocopherol (FSC₅₀, 8.98 $\mu g/mL$)과 유사한 자유라디칼 소거활성이 있음을 확인하였다.

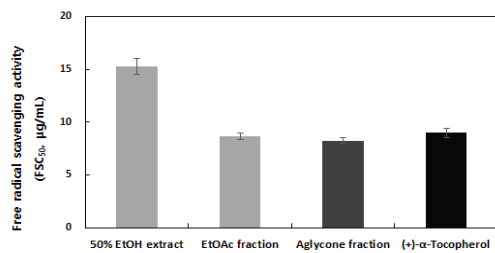


Fig. 1. Free radical scavenging activities of 50% EtOH extract/EtOAc fraction/aglycone fraction of *P. vulgaris* L. and (+)- α -tocopherol.

3.1.2. Luminol 발광법을 이용한

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

본 실험에 사용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는

Fenton 반응을 통해 다양한 종류의 활성산소가 생성된다. Luminol은 활성산소와 반응하여 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고, 이어서 아미노프탈산이 바닥상태로 되면서 발광(420~450 nm)을 한다[25]. 이 계에 항산화제를 첨가하면 감소된 활성산소에 의해 화학발광은 감소하는데 이를 이용하여 총 항산화능(ROS scavenging concentration, OSC₅₀)을 평가하였다. 활성산소가 50% 감소하는 농도인 OSC₅₀은 하고초 50% 에탄올 추출물이 4.68 $\mu g/mL$, 에틸아세테이트 분획이 1.00 $\mu g/mL$, 아글리콘 분획은 1.02 $\mu g/mL$ 로 나타났다(Fig. 2.). 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid (1.50 $\mu g/mL$)보다 약 1.5배 높은 활성을 나타냈다.

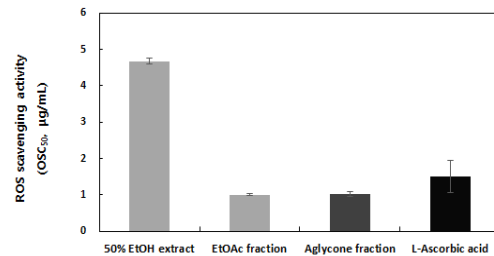


Fig. 2. ROS scavenging activities of 50% EtOH extract/EtOAc fraction/aglycone fraction of *P. vulgaris* L. and L-ascorbic acid in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

3.2. 1O_2 으로 유도된 세포 파괴에 대한 세포 보호 효과

피부에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 다양한 광증감제들이 존재하며 이들은 자외선에 노출될 때 광증감 반응을 통해 1O_2 과 여러 ROS를 생성시킨다. 특히 광증감 반응의 주 생성물인 1O_2 는 반응성이 매우 강한 활성산소로써 피부 항산화제를 고갈시켜 항산화 방어망을 붕괴시키면 세포막에서는 라디칼 반응이 개시되어 지질과산화반응이 일어나서 세포 손상을 촉진시킨다[26]. 본 연구에서는 세포막의 지질 이중층과 유사한 적혈구 세포를 이용한 항산화 평가 시스템을 이용하여 1O_2 로 유도된 세포손상에 대한 보호효과를 평가하고자 하였다. 하고초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 1, 5,

10 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하고 광증감제인 rose-bengal로 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 세포 파괴가 50%가 되는 시간(τ_{50} , 분)을 측정하여 세포 보호효과를 평가하였다(Fig. 3., Table 3.). 하고초의 50% 에탄올 추출물의 τ_{50} 은 1, 5, 10 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 29.9, 30.0, 34.3 및 39.8 분, 에틸아세테이트 분획은 각각 35.9, 43.3, 53.4 및 59.4 분, 아글리콘 분획은 각각 34.5, 83.7, 156.3 및 337.9 분으로 나타났으며 비교물질로 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol은 같은 농도에서 각각 31.1, 36.6, 37.5 및 38.7 분으로 나타났다. 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 모두 농도-의존적인 세포보호 효과를 보였으며, 특히 아글리콘 분획의 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 (+)- α -tocopherol보다 약 9배 높은 세포보호 효과를 나타냈다.

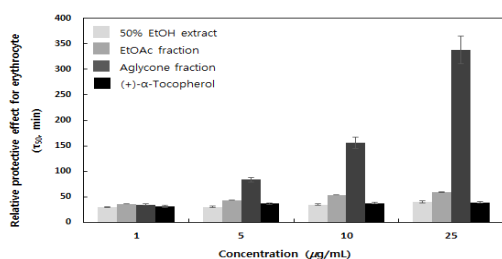


Fig. 3. Cellular protective effect of 50% EtOH extract/EtOAc fraction/aglycone fraction of *P. vulgaris* L. and (+)- α -tocopherol on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30.3 ± 1.3 분).

Table 3. Cellular Protective Effects of Extract / Fractions of *P. vulgaris* L. and (+)- α -Tocopherol on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes.

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	τ_{50} (Half time of hemolysis)			
	1	5	10	25
50% EtOH extracts	29.9 (± 1.1)	30.0 (± 1.2)	34.3 (± 1.3)	39.8 (± 2.2)
EtOAc fraction	35.9 (± 0.3)	43.3 (± 0.3)	53.4 (± 0.3)	59.4 (± 0.6)
Aglycone fraction	34.5 (± 1.4)	83.7 (± 4.5)	156.3 (± 11.1)	337.9 (± 26.9)
(+)- α -Tocopherol	31.1 (± 1.6)	36.6 (± 1.5)	37.5 (± 1.3)	38.7 (± 1.6)

* Control, $\tau_{50} = 30.3 \pm 1.3$ 분

3.3. 하고초 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

하고초 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에 대한 TLC 크로마토그램을 Fig. 4.에 나타내었고, HPLC 크로마토그램은 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 4.의 ⑤에서 분리 되어진 에틸아세테이트 분획의 여러 띠 중 6개의 띠(PVL3, PVL4, PVL6, PVL7, PVL8, PVL9)를 확인하였다. 6개의 띠를 참고문헌을 통해 이미 알려진 표준물질의 R_f value와 비교했을 때, PVL3($R_f=0.81$)은 caffeic acid, PVL4 ($R_f=0.72$)는 rosmarinic acid, PVL6 ($R_f=0.23$)은 astragalinal (kaempferol-3-O-glucoside), PVL7 ($R_f=0.14$)은 quercetin 3- β -D-glucoside, PVL8 ($R_f=0.05$)은 kaempferol-3-O-rutinoside, PVL9는 rutin ($R_f=0.02$)으로 확인하였다. 이들 성분은 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램에서도 확인되었다. HPLC 크로마토그램은 6개의 peak가 나왔으며, 각각의 peak를 표준물질의 retention time과 UV-Visible 흡수스펙트럼을 분석하였다 (Table 4). 각각의 peak를 분석하여본 결과, peak 1은 caffeic acid, peak 2는 rutin, peak 3은 quercetin 3- β -D-glucoside, 4는 kaempferol-3-O-rutinoside, peak 5는 astragalinal, peak 6은 rosmarinic acid로 나타났고 이는 앞서 TLC에서 확인한 PVL3, PVL9, PVL7, PVL8, PVL6, PVL4 띠의 성분과 각각 일치함을 확인하였다.

Fig. 4.의 ⑥은 아글리콘 분획의 TLC 크로마토그램이며, 분리된 띠 중 5개의 띠(PVL1, PVL2, PVL3, PVL4, PVL7)를 확인하였다. 5개의 띠를 표준물질과 비교한 결과, PVL1 ($R_f=0.91$)은 kaempferol, PVL2 ($R_f=0.85$)는 quercetin, PVL3

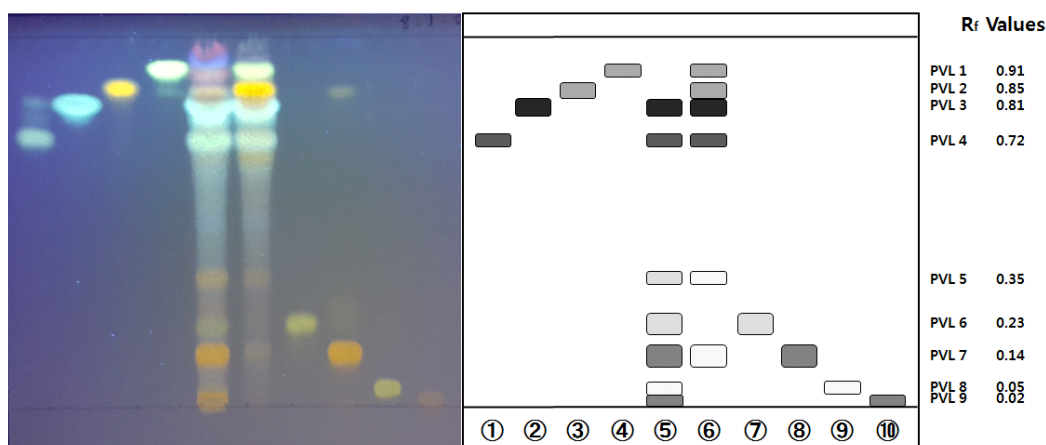


Fig. 4. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *P. vulgaris* L.(PVL) and references (NP-PEG reagents; UV-365 nm). Eluent system ; Ethyl acetate : chloroform : formic acid : D-W = 8 : 1 : 0.4 : 0.2 (v/v), ① rosmarinic acid, ② caffeic acid, ③ quercetin, ④ kaempferol, ⑤ ethyl acetate fraction, ⑥ aglycone fraction, ⑦ astragalin(kaempferol-3-O-glucoside), ⑧ quercetin 3-β-D-glucoside, ⑨ kaempferol-3-O-rutinoside, ⑩ rutin.

(R_f=0.81)은 caffeic acid, PVL4 (R_f=0.72)는 rosmarinic acid, PVL7 (R_f=0.14)은 quercetin 3-β-D-glucoside로 추정되었다. 이러한 성분은 아글리콘 분획의 HPLC 크로마토그램에서도 확인되었다. 크로마토그램은 4개의 peak가 나왔으며, 마찬가지로 표준물질을 이용하여 비교하여 분석하였다(Table 5.). HPLC peak의 조성비를 확인해 본 결과, peak 1는 caffeic acid, peak 2는 rosmarinic acid, peak 3은 quercetin, peak 4은 kaempferol로 나타났고 이는 각각 앞서 TLC에서 확인한 PVL3, PVL4, PVL2, PVL1의 띠의 성분과 각각 일치함을 확인하였다.

에틸아세테이트 분획에서 kaempferol 배당체인 astragalin (kaempferol-3-O-glucoside)과 kaempferol-3-O-rutinoside), quercetin 배당체인 quercetin 3-β-D-glucoside와 rutin은 확인되었으나 아글리콘 분획에서는 거의 없거나 확인할 수 없었다. 반면에 아글리콘 분획에서는 kaempferol과 quercetin이 확인되었다. 이는 kaempferol 배당체와 quercetin 배당체가 산 가수분해에 의해 kaempferol과 quercetin으로 전환된 것으로 사료된다. kaempferol과 quercetin은 각각의 배당체보다 세포막에 대한 접근과 세포막 내로의 침투가 더 용이함에 따라 세포보호 효과

가 월등히 높다고 알려져 있다[27]. 따라서 ¹O₂로 유도된 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과 (τ₅₀)에서 아글리콘 분획이 에틸아세테이트 분획보다 월등히 높게 나타난 이유는 아글리콘 분획에 의해 배당체로부터 당이 제거된 kaempferol과 quercetin의 증가가 주로 기인했을 것으로 사료된다.

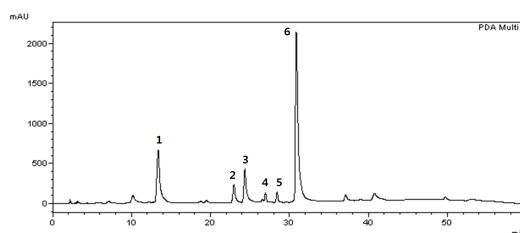


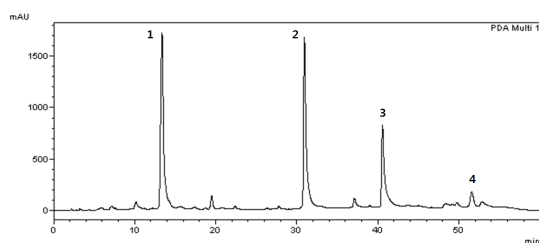
Fig. 5. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *P. vulgaris* L. at λ = 254 ~ 400 nm, 1 : caffeic acid, 2 : rutin, 3 : quercetin 3-β-D-glucoside, 4 : kaempferol-3-O-rutinoside, 5 : astragalin (kaempferol-3-O-glucoside), 6 : rosmarinic acid.

Table 4. HPLC Analysis Data and UV-visible Absorption Spectrum (λ_{\max}) of Ethyl Acetate Fraction from *P. vulgaris* L.

Peak No.	Compound	λ_{\max} , EtOH (nm)	Ret. time (분)
1	Caffeic acid	241, 323	13.371
2	Rutin	255, 348	22.959
3	Quercetin 3- β -D-glucoside	255, 354	24.341
4	Kaempferol-3-O-rutinoside	265, 348	26.947
5	Astragalín (kaempferol-3-O-glucoside)	265, 347	28.425
6	Rosmarinic acid	236, 328	30.846

Table 5. HPLC Analysis Data and UV-visible Absorption Spectrum (λ_{\max}) of Aglycone Fraction from *P. vulgaris* L.

Peak No.	Compound	λ_{\max} , EtOH (nm)	Ret. time (분)
1	Caffeic acid	241, 323	13.368
2	Rosmarinic acid	236, 328	30.928
3	Quercetin	254, 369	40.561
4	Kaempferol	265, 365	51.576

Fig. 6. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *P. vulgaris* L. at $\lambda = 254 \sim 400$ nm, 1 : caffeic acid, 2 : rosmarinic acid, 3 : quercetin, 4 : kaempferol.

4. 결론

- 1) 하고초 추출물의 수득율의 경우 50% 에탄올 추출물은 23.3%, 에틸아세테이트 분액은 1.53%, 아글리콘 분액의 경우 0.74%이었다.
- 2) 하고초 추출물의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과, 아글리콘 분획(8.25 μ g/mL) > 에틸아세테이트 분획(8.68 μ

g/mL) > (+)- α -tocopherol (8.98 μ g/mL) > 50% 에탄올 추출물(15.25 μ g/mL) 순서로 나타났다.

- 3) 하고초 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(1.00 μ g/mL) > 아글리콘 분획(1.02 μ g/mL) > L-ascorbic acid (1.50 μ g/mL) > 50% 에탄올 추출물(4.68 μ g/mL) 순서로 나타났다.
- 4) $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 세포의 파괴에 대한 세포보호효과(τ_{50})는 하고초 추출물 1 ~ 25 μ g/mL에서 농도-의존적으로 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 플라보노이드가 존재하는 아글리콘 분획은 25 μ g/mL 농도에서 τ_{50} 이 337.9 분으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다.
- 5) TLC와 HPLC 크로마토그램을 이용한 성분 분석을 통해 하고초 추출물의 에틸아세테이트 분획에서는 caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin 3- β -D-glucoside, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, astragalín (kaempferol-3-O-glucoside)를 확인하였고

아글리콘 분획에서는 caffeic acid, rosmarinic acid, quercetin, kaempferol을 확인하였다.

- 6) $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과(τ_{50})가 아글리콘 분획에서 에틸 아세테이트 분획보다 월등히 높게 나타난 것은 kaempferol과 quercetin의 증가가 주로 기인했을 것으로 사료된다.

이상의 결과들은 하고초 추출물의 항산화 작용, 특히 에틸아세테이트 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 아글리콘 분획의 높은 세포 보호 효과로부터 기능성 화장품 항산화 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 산업통상자원부 산업융합원천기술개발사업으로 지원된 연구결과입니다. (10043869, 개인별 피부·모발 특성에 맞는 맞춤형 의약외품·화장품 서비스플랫폼 기술개발).

References

1. E. H. Kim, J. E. Kim, K. E. Kim, E. Y. Na, S. K. Lee, H. M. Jeong, H. J. Lee, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Inula britannica* flower extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(3), 209 (2009).
2. H. J. Yang, E. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Psidium guajava* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(3), 233 (2008).
3. H. U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415 (2000).
4. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
5. J. S. Seong, K. M. Kim, J. Y. Suh, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidative activities of whole plant extracts of *Solanum nigrum* L., *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **32**(4), 781 (2015).
6. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
7. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti of oophorectomized rat : oxidative stress and antioxidative enzyme activities, *Kor. J. Gerontol.*, **12**(1) (2002).
8. 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).
9. H. S. Kim, N. R. Im, J. H. Park, M. O. Kim, and S. N. Park, Antioxidative effect and active component analysis of *Gnaphalium affine* D. DON. extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(1), 11 (2014).
10. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Dissertation, Seoul National University (1989).
11. 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).
12. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Amer. Heart J.*, **23**, 2382 (1998).
13. 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).
14. S. J. Lee, N. J. Sung, H. G. Jeong, J. H. Shin, Y. C. Chung, and J. K. Seo,

- Antioxidant activities of methanol extracts from *Prunella vulgaris*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(12), 1535 (2008).
15. J. S. Kim, S. S. Kang, K. S. Lee, S. Y. Chang, and D. H. Won, Quantitative determination of ursolic acid from *Prunellae herba*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**(4), 416 (2000).
 16. H. Y. Cheung and Q. F. Zhang, Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers, *J. Chromatogr. A*, **1213**(2), 231 (2008).
 17. J. K. Seo, M. J. Kang, J. H. Shin, S. J. Lee, H. G. Jeong, N. J. Sung, and Y. C. Chung, Antibacterial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of Hagocho (*Prunella vulgaris*), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(10), 1425 (2010).
 18. W. K. Yang, Y. Y. Sung, and H. K. Kim, Antithrombotic and antiplatelet activity of extract from *Prunella vulgaris*, *J. Life Sci.*, **21**(10), 1422 (2011).
 19. H. Kojima H. Ogura, Triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, **25**(3), 729 (1986).
 20. T. L. Lam, M. L. Lam, T. K. Au, D. T. M. Ip, T. B. Ng, W. P. Fong, and D. C. C. Wan, A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs, *Life Sci.*, **67**(23), 2889 (2000).
 21. H. X. Xu, S. H. Lee, S. F. Lee, R. L. White, and J. Blay, Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*, *Antiviral Res.*, **44**(1), 43 (1999).
 22. S. Y. Ryu, M. H. Oak, S. K. Yoon, D. I. Cho, G. S. Yoo, T. S. Kim, and K. M. Kim, Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*, *Planta Med.*, **66**(04), 358 (2000).
 23. Y. B. Jung, K. J. Roh, J. A. Jung, K. Jung, H. Yoo, Y. B. Cho, and C. K. Han, Effect of SKI 306X, a new herbal anti-arthritic agent, in patients with osteoarthritis of the knee: a double-blind placebo controlled study, *Am. J. Chin. Med.*, **29**(3-4), 485 (2001).
 24. F. Liu and T. B. Ng, Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs, *Life Sci.*, **66**(8), 725 (2000).
 25. Y. M. Jeong, H. J. Kim, S. H. Lee, D. Y. Jang, Y. C. Choi, N. Y. Min, B. J. Gong, and S. N. Park, Antioxidative effects and component analysis of extracts of *Rumex acetosa* L., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(4), 391 (2014).
 26. B. J. Gong, S. S. Han, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidant activities of *Ipomoea batatas* L. Lam. (purple sweet potato) extracts cultured in Korea, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(4), 423 (2014).
 27. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative properties of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* Extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).