

작약 레드참 꽃잎의 이온화원-푸리에 변환 질량분석과 기능성 연구

김준현*, 최용복, 이하정, 김용희, 김준환, 심정민, 손영선

수원대학교 생명공학과

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) MASS Spectrophotometric Analysis of Flower Petal from *Paeonia lactiflora* cv. 'Red Charm' and Evaluation of its Functional Activity

June Hyun Kim*, Yong Bock Choi, Ha Jung Lee, Yong Hee Kim, Jun Huan Kim,
Jung Min Sim and Young-Sun Sohn

Department of Biotechnology and Bioscience, The University of Suwon, Hwaseong 18323, Korea

Abstract - Little attention has been paid to the functional aspect of the flower petal of *Paeonia lactiflora*, compared to that of its root. To determine the components of flower petal of *Paeonia lactiflora*, we conducted the Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) MASS spectrophotometric analysis. We detected the 24 different types of ingredients from the 70% ethanol extracts of flower petal of *peonia lactiflora* cv. 'Red Charm'. The main compounds were quercetin glucopyranosides, methyl gallate, paoniflolol and kaemperol glucopyranosides. We further tested its functional activity. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of the extracts was 87.9-90.4% at 0.1mg/ml. This result showed that these flower extracts have approximately 5-fold stronger antioxidant potential than a previous report with root extracts (Bang et al. 1999). The result of tyrosinase inhibition assay of *Paeonia lactiflora* extract was almost similar to that of arbutin except significantly higher effect in the coral sunset extract at 0.1% concentration. Hyaluronidase inhibition assay showed 76.5% inhibition at 5% concentration of this flower extract, indicating that *Peaonia lactiflora* flower extracts have the major anti-inflammatory, anti-oxidant and brightening effects. Taken together, these results suggest these three *Paeonia lactiflora* species extracts might provide the basis to develop a new natural brightening agent.

Key words - Fourier transform-ion cyclotron resonance (FT-ICR) MASS, *Paeonia lactiflora* cv. 'Red Charm', Anti-oxidant activity, Tyrosinase inhibition assay, Hyaluronidase inhibition assay

서 언

작약은 작약과 paeoniaceae에 속하는 다년생 초본으로 꽃의 색깔에 따라 백작약과 적작약으로 분류된다. 주성분은 paeoniflorin이며, 주요기능은 혈관 확장 및 혈액순환을 원활히 하고 골격근 중 평활근의 탄력세포 결합력을 강화하여 근육경련을 완화하고 소화관 연동 운동을 향진하여 소화와 흡수를 증진하여 복통을 완화해 주는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Cheng et al., 1999). 작약은 아시아와 유럽에 33종, 북미에 1종 등 총 34

개종이 있으며(Goulandris, 1984), 뿌리를 한약재와 식용으로 주로 이용하는 중요한 작물이지만 꽃에 대한 활용의 예는 찾아 보기 어려웠다. 작약의 생리활성에 관한 연구는 항염증작용, 항알러지작용, 진통작용 등과 주성분인 paeoniflorin에 관한 활성도 등이 보고되었다(Jung et al., 2010). 작약의 methanol, ethyl acetate의 용매추출과 이러한 추출물에서 분리·정제한 2개의 화합물 benzoyloxypaeoniflorin과 paeoniflorin의 혈소판 응집 억제작용을 보고하였으며, 그 중 benzoyloxypaeoniflorin이 비교적 더 우수함이 보고되었다(son et al., 2002).

핵산 추출물은 실험 균주 *S. mutans*, *S. aureus* 2종에서 항균 활성이 있었으며, 클로로포름 추출물에서도 항균 활성을 나

*교신저자: jk8199@suwon.ac.kr

Tel. +82--31-220-2327

타내었으며, 에틸아세테이트 추출물은 *S. mutans*, *S. albicans*, *S. aureus* 3균주 모두에서 항균력이 있었고, 그 중 *S. albicans*, *S. aureus* 균주에서 강한 항균력을 보였다(Park *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2000). MMP는 교원섬유를 분해하는 효소로서 탄력섬유를 변성시켜 피부 주름을 유발 한다고 보고 되어있으며(Kim *et al.*, 2005), 작약 열수 추출물이 자외선에 의해 생성된 MMP의 발현을 억제시키는 효과가 있으며 피부에 도포했을 때 항 주름 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kwon *et al.*, 2009).

작약의 에탄올 추출물에서는 15개 이상의 글루코사이드 구성물이 포함되어있고, 작약 뿌리의 산화스트레스에 대한 항산화 효과와 세포보호 효과와 생리활성에 관한 연구에서 항염증 작용, 항알러지작용, 진통작용 등이 보고 되었다(Bang *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Park and Chun 2015). 이러한 작약은 전통적으로 한방 소재로 활용되어 왔으며, 적작약은 과민성대장증후군, 사지경련, 복통, 진통, 두통완화, 부인병, 항알러지 및 소염치료에 처방하고, 백작약은 부인병, 복통, 두통, 해열, 지혈, 진통, 객혈, 이뇨 등에 쓴다고 한다(Nishida *et al.*, 2003). 최근 미백 화장품 소재로서 천연물을 활용이 증가하고 있으며, 특히 심미적 기능적 요소를 활용한 꽃잎 추출물 등이 천연 화장품 소재로 활용되기 시작하고 있다. 그리하여 작약 꽃잎 추출물의 기능성을 활용하기 위한 천연 소재탐색 연구가 수행되어 미백 및 항산화 효과의 분석 결과가 보고되었다(Jung *et al.*, 2010). 그 외 꽃잎에서 pyrethrin, 안토시아닌 색소인 paeonin과 flavonoid인 kampferid, kampferol 등 10종이 동정되었다고 보고되었다(Jung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2001; Soka *et al.*, 1985). 그러나 이들 결과는 뿌리 또는 작약 꽃잎 추출물의 polyphenol 성분의 검출을 위한 HPLC 분석법으로 전체 꽃잎 추출물의 다양한 성분을 분석하는데 한계가 있었다. 또한 지금까지의 연구에서는 작약 꽃잎 추출물의 품종별 차이 및 그 효과에 대한 보고는 없었다.

따라서 본 연구에서는 FT-ICR MASS spectrophotometry 분석법과 천연물 구조 DB 분석 시스템을 활용하여 작약꽃잎 추출물의 주요 성분 분석 및 동정을 하고자 하였다. 아울러 본 연구에서는 상기 데이터 베이스에서 확인된 주요 성분의 기능 추정 일치하는지의 여부 및 품종별 생리활성의 차이를 알아보기 위하여 작약 ‘레드 참’, ‘캔사스’, ‘코랄선셋’ 세가지 품종에 대하여 물과 에탄올 추출물에 대한 항염증, 항산화, 브라이트닝, 그리고 세포독성 실험을 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 작약(*Paeonia Lactiflora* cv Kansas, *Paeonia Lactiflora* cv Coral sunset 그리고 *Paeonia Lactiflora* cv Red Charm)은 우리화훼종묘(주) 생산연구소에서 분양 받아, 수원대학교내에서 재배하여 실험재료로 사용하였다(Kim, 1998; 2001; Kim *et al.*, 2006). 작약 3가지 품종 5-6월에 핀 꽃 봉오리를 동결 건조하여 -20°C 냉동 보관하여 사용하였다. 냉동 보관된 꽃봉오리를 Mixer를 이용하여 분쇄한 후 각각 DW와 70% Ethanol 수용액에 침지한 후 현탁하여 상온에서 48시간 동안 추출하였고, 추출물을 여과하여 감압 진공 농축기(Eyela)에 농축후 동결 건조하여 분말을 제조하고 이를 시료로 최대 1% 사용하였다. DPPH, Mushroom Tyrosinase, 3-[4,5-dimethyl-hiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), Hyaluronic Acid, Hyaluronidase, Ethanol 등의 연구에 사용된 시약들은 Sigma Korea로부터 구매하였다.

Tyrosinase inhibition assay

Melanocyte에서의 melanin의 합성경로는 tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 hydroxylation 되어 dopaquinone, dopachrome의 과정을 거쳐 melanin으로 합성 되므로, Tyrosinase 활성 저해 효과 측정은 멜라닌 합성에 필요한 tyrosinase의 활성을 측정하여 브라이트닝효과를 측정하는 방법이다(Suh, 2001). 96 well plate에 대조군인 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, pH 6.5)과 각각의 추출물 시료(최대 1%) 170 μl , 1,000 U/ml tyrosinase 10 μl 를 넣고 37°C 에서 10 min 반응시켰다. 여기에 1.5 mM L-tyrosine 20 μl 를 넣은 다음 37°C 에서 10 min 반응 시킨 후, 바로 얼음 중에 5 min 방치한 후, 분광광도계를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 다음과 같이 계산하였다. Tyrosinase inhibition rate (%) = $(100 - (A - A') / (B - B')) \times 100$ A: 시료 반응 후의 흡광도 B: 공시료 반응 후의 흡광도 A': 시료와 완충액의 흡광도 B': 공시료와 완충액의 흡광도.

DPPH radical scavenging assay

DPPH radical 소거능 실험은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 의한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다(Sharma *et al.*, 2009). 식물 추출물의 최종 농도 1 mg/ml 농도와 0.1 mg/ml 농도가 되도록 희석하여 추출물 시료 0.2 ml

와 0.2mM DPPH용액 0.8 ml를 잘 혼합한 다음 실온에서 30분간 암조건하에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화력은 $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 10$ 의 계산식에 의해 전자공여능(%)을 구하였으며, 대조구는 시료 대신 메탄올을 첨가하였고, positive control로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

Hyaluronidase inhibition assay

Hyaluronidase (HAase) 활성 저해 측정은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucozoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하는 방법으로 수행하였다(Reissig *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2012). 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (8,000 U/ml) 0.05 ml와 작약 추출물 용액(시료 최대 1%) 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 12.5 mM CaCl₂ 0.1 ml를 가하고 혼합 후 다시 20분간 반응하였다. 기질로서 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic Acid (12 mg/ml)를 첨가하고 다시 40분간 반응하여 0.4 N potassium tetraborate 0.1 ml 및 0.4 N NaOH 용액을 0.1 ml 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각 후 반응물에 발색제로 DMAB 시약 3 ml를 가하여 37°C에서 20분간 반응한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출하였다. 저해율(%) = $(1 - \text{시료첨가구의 흡광도}) \times 100$ 무첨가구의 흡광도

MTT assay

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다(Carmichael *et al.*, 1987). F16 skin fibroblast cell (ATCC)을 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 배양하였으며, 6 well plate에 0.6~8×10⁵ cells/well이 되게 3 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 농도가 0.001%~1%가 되게 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 PBS를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:Ethanol(1:1) 3 ml를 가하여 실온에서 30분간 로터리 셰이커에서 반응시킨 뒤 각각 0.2 ml를 ELISA plate에 분주하고, ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존

율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

FT-ICR MASS spectrophotometry

FT-ICR MASS Spectrometry system은 한국기초과학연구원의 15 T FT-ICR 초고분해능 질량분석장치를 활용하여 분자 설계연구소의 천연물 구조 database 분석 시스템인 Flora genesis system을 활용하여 분석하였다. Flora genesis system은 DNP: Dictionary of Natural Products (<http://dnp.chemnetbase.com/tour/index.jsp>), 한국전통지식포털(<http://www.koreantk.com/ktkp2014>), Reaxys (<https://www.reaxys.com/reaxys/session.dodml>)를 근간으로 data base를 구축하였다.

통계 처리

본 연구의 실험은 독립적으로 3회 반복 수행하고 실험 결과는 평균 ±표준편차로 표기하였으며, 각 실험 농도군에 통계처리하는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05일때 통계적으로 유의한 결과로 판단하였다.

결 과

FT-ICR MASS spectrophotometry

작약 Red Charm 70% ethanol 추출물을 고해상도 FT-ICR MASS Spectrometry를 이용하여 분석을 하였고(Fig. 1), 각각의 peak를 천연물 구조 database 분석 시스템을 통해 구성 성분을 확인 추정하였다 (Table 1).

본 연구에서 보여준 작약꽃잎 추출물의 높은 항산화 능력과 브라이팅 효과는 FT-ICR MASS spectrophotometry 분석결과 quercetin 배당체와 kemperol 배당체의 기능으로 추정되며 그 외에 paeoniflolol 등의 성분이 항염증(anti-inflammatory effect) 효과를 나타내는 것으로 추정된다.

Tyrosinase inhibition assay

작약 꽃잎의 브라이팅 효과에 있어서 품종별 차이가 있는지를 확인하기 위하여, *Paeonia lactiflora* cv Kansas, *Paeonia lactiflora* cv Coral sunset, 그리고 *Paeonia lactiflora* cv Red charm 3가지 품종의 물과 에탄올 추출물에 대한 tyrosinase inhibition assay를 수행하였다.

이들 3가지 품종의 tyrosinase inhibition assay 결과는 대조군인 arbutin과 유사한 결과를 보였으나 Coral sunset 70%

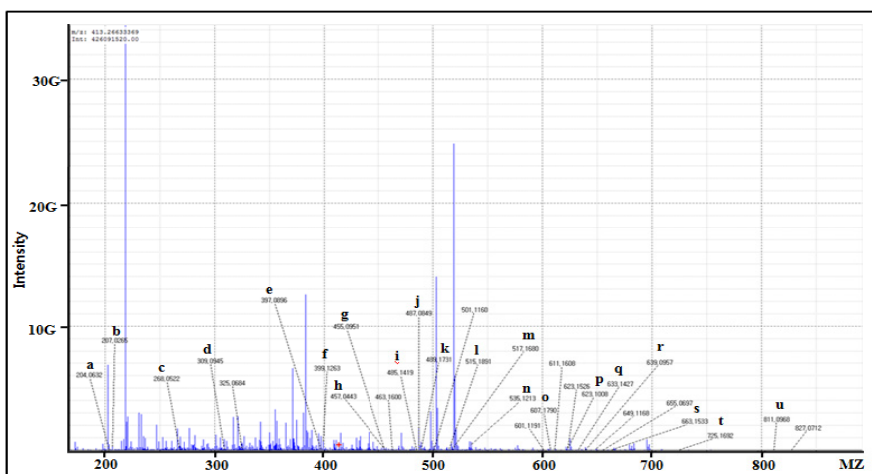


Fig. 1. FT-ICR Mass spectrophotometry of *Paeonia lactiflora* cv ‘red charm’ flower petal. This sample was extracted with 70% ethanol and analyzed by using methanol soluble fraction.

Table 1. Analysis of *Paeonia lactiflora* cv red charm flower petal

Compound Name	Molecular formula	Exact mass	Adduct	M/Z	Error (ppm)
a 3,4,5-trihydroxybenzoic acid/gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170.021525	CH ₂ O 33.033489	204.0631526	1.52
b Methyl gallate	C ₈ H ₈ O ₅	184.037175	Na 2.989218 K 38.963158	207.0264523223.0003784	0.26 0.20
c para-methoxyphenyl beta-glucoside/4-methoxyphenyl-beta-D-glucoside	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	286.105255	Na 2.989218 K 38.963158	309.0946119325.0684089	0.4 0.01
d Nonane	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358.126385	K 38.963158	397.0896282	0.21
e 8-debenzoylpaeniflorin	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376.13695	Na 22.989218 K 38.963158	399.1263143415.1001867	0.35 0.18
f 2-O-[alpha-L-arabinopyranosyl-(1a6)-beta-D-glucopyranosyl] benzaldehyde	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	416.131865	K 38.963158	455.0950603	0.08
g cephalanone A	C ₂₁ H ₁₉ ClO ₇	418.081933	K 38.963158	457.044315	1.69
h 2-methoxy-5-(E)-propenyl-phenol-beta-vicianoside	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	458.178815	K ₂ 77.926316 Na 22.989218	268.0521991(charge +2)	1.36 0.12
i Nonane	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	462.1526	H 1.007276 K 38.963158 Na 22.989218	485.1418831463.1599518501.1159591	0.16 0.4 0.43
j quercetin 3-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09548	H 1.007276 K 38.963158 Na 22.989218	487.0849151465.1028318503.0588281	0.16 0.37 0.58
k Paeoniflorol	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₀	466.1839	Na 22.989218 K 38.963158	489.1734093505.1473451	0.56
l Paeonidanin	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₀	492.19955	Na 22.989218	515.1891138	0.66
m Nonane	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	494.178815	Na 22.989218	517.168368	0.64
n Oxypaeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496.15808	Na 22.989218 K 38.963158	519.1471787535.1212993	0.23 0.11
o Benzoylpaeniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	584.18938	Na 22.989218 K 38.963158 Na 22.989218	607.1789714623.1526488	0.6 0.17 0.15
p kaempferol 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	600.111525	H 1.007276 K 38.963158 C ₂ H ₂ O ₂ 66.066978 Na 22.989218	623.1008453601.1190512639.0751086 334.0978038(charge +2)	0.41 0.66 2.16 0.14
q kaempferol-3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15339	H 1.007276 K 38.963158	633.1427014611.1607922649.1168021	0.2 0.39
r quercetin 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	616.10644	Na 22.989218 K 38.963158	639.0957411655.0696534	0.12 0.08
s 8-methoxykaempferol-3-O-beta-D-(2"-O-beta-D-glucopyranosyl)-glucopyranoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	640.163955	Na 22.989218 K 38.963158	663.1532873679.1273554	0.16 0.35
t paenoside A	C ₃₃ H ₃₄ O ₁₇	702.179605	Na 22.989218	725.1692	0.51
u 1(beta),2,3,6-tetra-O-galloylglucose	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	788.10723	Na 22.989218 K 38.963158	811.0967965827.0712073	0.42 0.98

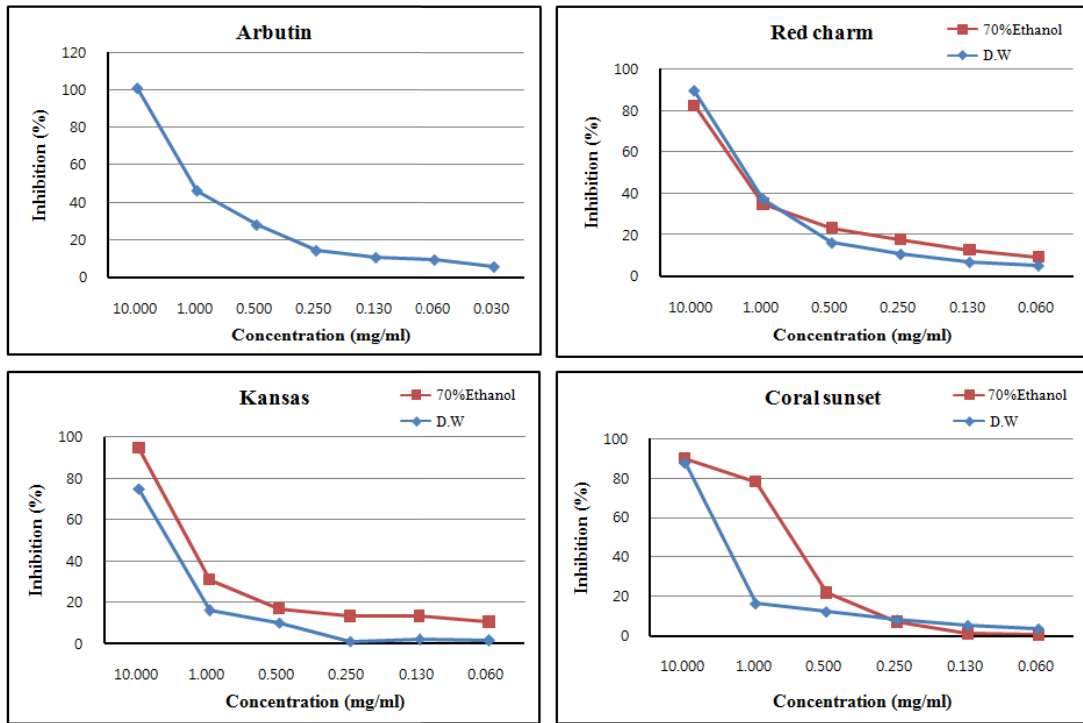


Fig. 2. Tyrosinase inhibition assay of three species of *Paeonia lactiflora* flower.

Comparison of tyrosinase inhibition activity

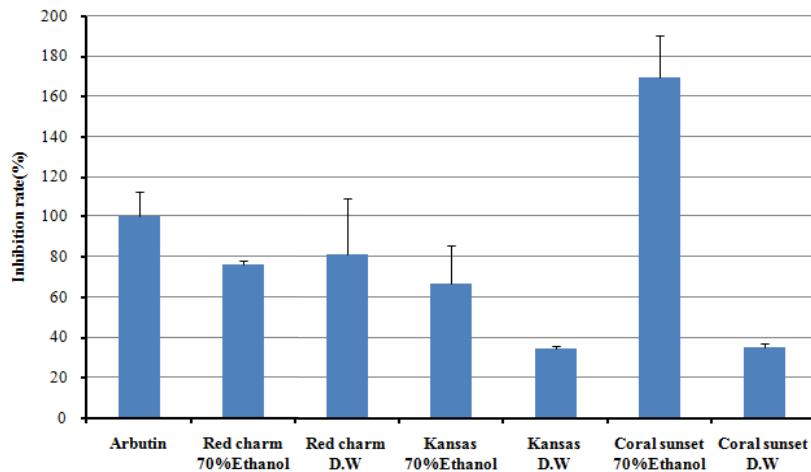


Fig. 3. Comparison of Tyrosinase inhibition rate of three species *Paeonia lactiflora* flower at 1 mg/ml concentration. Data are means \pm S.D. of three experiments performed triplicate. All data was identified statistically ($P < 0.05$) compare to Arbutin using student's t-test.

ethanol 추출물에서는 대조군인 arbutin 대비 특이적으로 높은 탁월한 브라이트닝효과를 나타내었다. 이들 결과를 효과적으로 비교하기 위하여 0.1% 농도에서 대조군인 arbutin 대비 이들 추출물의 상대적인 저해 수준을 비교하였다(Fig. 3).

결과를 비교해보면 Red Charm의 경우 물 추출물은 83%, 에

탄올 추출물은 75.9%저해 효과를 보였으며, Kansas의 경우 물 추출물은 상대적으로 낮은 35.1%, 에탄올 추출물은 66.8%로 다른 품종과 유사한 결과를 보였으며, Coral sunset의 경우 물 추출물은 35.1%, 에탄올 추출물은 177%로 arbutin 대비 우수한 tyrosinase inhibition 효과를 보였다. 따라서 Coral sunset의

에탄올 추출물은 arbutin 대용의 새로운 브라이트닝 소재로의 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

DPPH radical scavenging assay

작약 꽃잎의 항산화 효과에 있어서 품종별 차이가 있는지를 확인하기 위하여, *Paeonia Lactiflora* cv Kansas, *Paeonia lactiflora* cv Coral sunset 그리고 *Paeonia lactiflora* cv Red Charm 3가지 품종의 물과 에탄올 추출물에 대한 DPPH radical scavenging assay를 수행하였다(Table 2).

이들의 DPPH radical scavenging assay 결과는 3가지 품종에서 품종별 차이는 크지 않았으며 0.1 mg/ml 농도에서 Kansas는 88% 이상, Redcharm은 90% 이상 그리고 Coral sunset의

경우 90% 이상의 우수한 항산화 효능이 있는 것으로 나타났다 (Table 1). 이들 결과는 작약 뿌리의 항산화 기능에 대한 연구 결과(Bang *et al.*, 1999)와 비교해보면, 꽃잎 추출물 농도 0.1 mg/ml 농도에서도 88% 이상의 우수한 항산화 효과를 보이는 결과를 얻었으며 이는 뿌리 추출물 대비 우수한 항산화 효과를 보이는 결과이다.

Hyaluronidase inhibition assay

작약 *Paeonia lactiflora* cv Red Charm 추출물이 hyaluronic acid(HA)를 분해하는 hyaluronidase (HAase)를 저해할 수 있는지 확인하기 위하여 HAase 저해활성을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 각 5% 농도에서 Redcharm 70% ethanol과 물 추출물

Table 2. The DPPH radical scavenging activity of plant extracts

Scientific name	Korean name	Part used	Extract condition	Radical scavenging activity (%)	Radical scavenging activity (%)
				1 mg/ml	0.1 mg/ml
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Kansas'	Kansas	FL	70% Ethanol	94.11	90.14
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Kansas'	Kansas	FL	DW	93.26	88.72
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Red Charm'	Red Charm	FL	70% Ethanol	92.41	91.28
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Red Charm'	Red Charm	FL	DW	92.41	90.99
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Coral Sunset'	Coral Sunset	FL	70% Ethanol	94.40	90.71
<i>Paeonia lactiflora</i> cv. 'Coral Sunset'	Coral Sunset	FL		82.98	91.28
Ascorbic acid				94.34	94.24

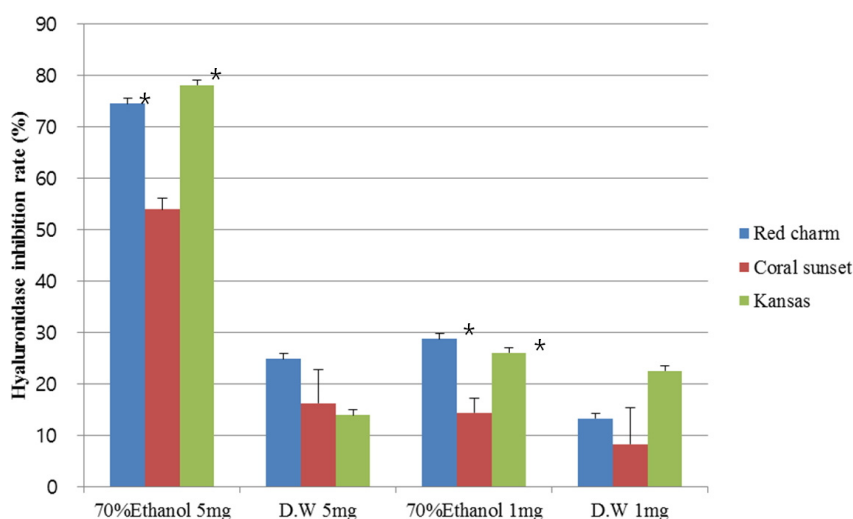


Fig. 4. Hyaluronidase inhibition assay of three species *Paeonia lactiflora* flower at 5 mg and 1 mg concentration. 70% Ethanol and DW its mean to extraction method. Data are means \pm S.D. of three experiments performed triplicate. Data was identified statistically (* $P < 0.05$) using student's t-test.

은 각각 74.5%와 28.7%, Coral sunset ethanol과 물추출물은 각각 53.9%와 14.4%, 그리고 Kansas ethanol과 물 추출물은 각각 78%와 26%의 저해 효과를 보였다. Hyaluronidase 저해는 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 더 많은 hyaluronidase 활성 억제를 보였으며, 에탄올 추출물에서 Red charm과 Kansas가 coral sunset에 비해 우수하였으며, Red charm과 Kansas의 차이는 크지 않지만 student t-test 유의성 검정에서 유의하게 차이는 있는 것으로 나타났다.

MTT assay

작약 추출물의 세포독성은 MTT에 의한 생존율 시험을 통해서 확인하였다(Fig. 4). *Paeonia lactiflora* cv Kansas, *Paeonia*

lactiflora cv Coral sunset and *Paeonia lactiflora* cv Red Charm 3가지 품종의 물과 에탄올 추출물을 ascorbic acid를 대조군으로 하여 세포의 생존율을 측정한 결과 0.01% 농도에서 85% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 0.01% 농도에서 3가지 품종의 작약 추출물들은 독성이 거의 없는 것으로 판단된다.

FT-ICR MASS spectrophotometry 분석 및 database를 이용한 기능 분석

작약 꽃잎 추출물의 FT-ICR MASS spectrophotometry 분석에서 밝혀진 주요 구성 성분들은 화학 구조 데이터베이스 구성 성분 추정 분석을 실시하였다(Table 3). 작약 꽃잎 추출물에는 미백, 항산화, 항염증 등의 효능을 가질 것으로 추정되는 다

Table 3. Prediction of the functions of chemicals derived from the structure database

	Compound Name/ID	Molecular formula	Exact mass	Predicted Activities
A	3,4,5-trihydroxybenzoic acid gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170.021525	
B	Methyl gallate	C ₈ H ₈ O ₅	184.037175	
C	2-methoxy-5-(E)-propenyl-phenol-beta-vicianoside	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	458.178815	Antihypercholesterolemic, Chemopreventive, Free radical scavenger, Wound healing agent
D	para-methoxyphenyl beta-glucoside 4-methoxyphenyl-beta-D-glucoside	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	286.105255	Antihypercholesterolemic, Free radical scavenger
E	Noname	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358.126385	
F	8-debenzoylpaeniflorin	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376.13695	Anti-inflammatory
G	2-O-[alpha-L-arabinopyranosyl-(1a6)-beta-D-glucopyranosyl] benzaldehyde	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	416.131865	Antihypercholesterolemic, Free radical scavenger, Wound healing agent
H	cephalalone A	C ₂₁ H ₁₉ ClO ₇	418.081933	
I	Noname	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	462.1526	
J	quercetin 3-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09548	Anti-inflammatory, Antihypercholesterolemic, Antioxidant, Chemopre-ventive, Free radical scavenger, Radioprotector, Skin whitener
K	Paeoniflorol	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₀	466.1839	Anti-inflammatory
L	Paeonidanin	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₀	492.19955	
M	Noname	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	494.178815	Anti-inflammatory
N	Oxypaeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496.15808	Anti-inflammatory
O	Benzoylpaeniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	584.18938	Anti-inflammatory
P	kaempferol 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	600.111525	Anti-inflammatory, Antihypercholesterolemic, Antioxidant, Chemopreventive, Free radical scavenger, Skin whitener
Q	kaempferol-3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15339	Anti-inflammatory, Antihypercholesterolemic Antioxidant, Chemopreventive, Free radical scavenger, Radioprotector, Skin whitener
R	quercetin 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	616.10644	Anti-inflammatory, Antihypercholesterolemic Antioxidant, Chemopreventive, Free radical scavenger, Skin whitener
S	8-methoxykaempferol-3-O-beta-D-(2"-O-beta-D-glucopyranosyl)-glucopyranoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	640.163955	Anti-inflammatory, Antihypercholesterolemic Antioxidant, Chemopreventive, Free radical scavenger
T	paenoside A	C ₃₃ H ₃₄ O ₁₇	702.179605	Antihypercholesterolemic, Free radical scavenger
U	1(beta),2,3,6-tetra-O-galloylglucose	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	788.10723	Anti-inflammatory, Free radical scavenger

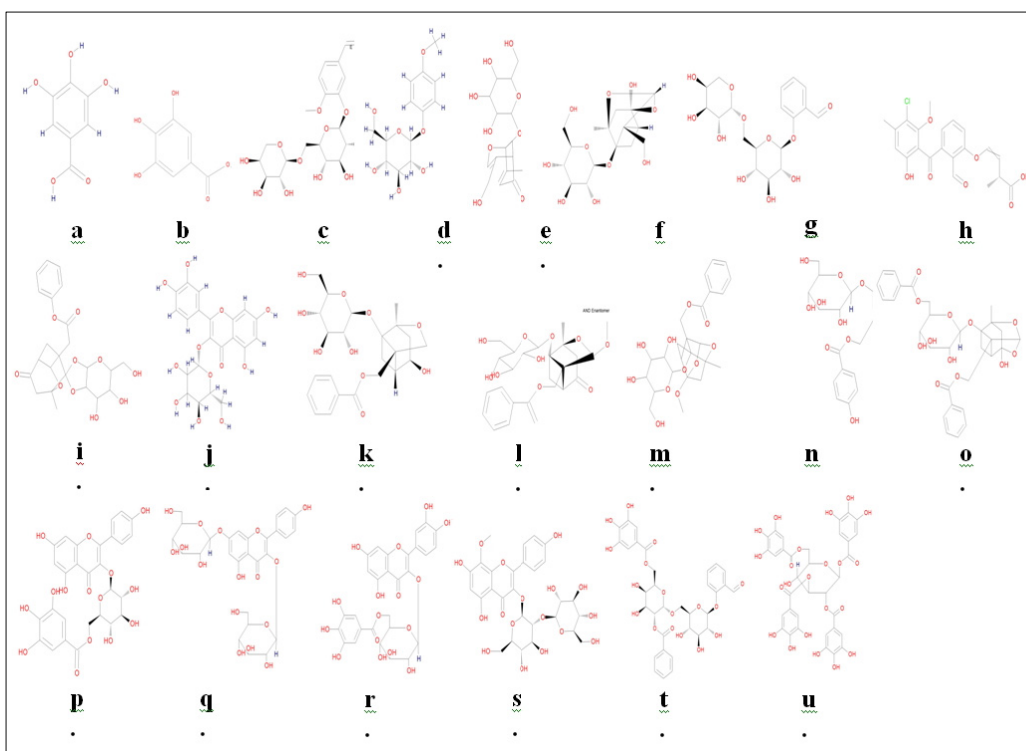


Fig. 5. Chemical structure of MASS spectrophotometry data from floral genesis system database.

양한 화합물들이 존재하는 것을 확인할 수 있었고, 또한 그 예상 기능이 추정된다.

고 찰

작약의 뿌리는 전통적으로 한약재로 사용되어 왔으며 뿌리 추출물에서 다양한 항산화 기능성에 대한 연구가 수행되었다 (Bang *et al.*, 1999). 또한 작약 꽃잎 추출물로부터 항산화 및 브라이트닝 효능이 있는 유효성분에 대한 분리 및 분석을 통해 polyphenol이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Jung *et al.*, 2010). 작약 꽃잎에 함유된 폴리페놀 성분의 주요 물질로는 naringin, sinapic acid methyl gallate, syringic acid 등을 HPLC 방법으로 확인하였으나 꽃잎의 pyrethrin, 안토시아닌 색소인 paeonin과 flavonoid인 kampferid, kampferol 등 10여 종의 화합물 등 전에 보고된 물질(Jung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2001; Soka *et al.*, 1985)은 HPLC로 확인할 수 없었다. 이는 HPLC 분석의 특성에 의한 것으로 천연물 추출물의 전체 성분 분석에는 한계가 있기 때문으로 보인다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 본 연구에서는 FT-ICR MASS spectrophotometry와 천연물 구조분석 database 시스템을 이용한 분석을 수행하

였고, 분석 추정을 통해 작약꽃잎에서 다량의 quercetin 배당체 및 kemperol 배당체, Gallate 배당체 그리고 peoniflorol 등을 존재 추정할 수 있었다. 이들 물질들은 항산화, 브라이트닝, 항염증 기능을 가지는 것으로 추정된다. 이 결과를 바탕으로 작약꽃잎 추출물이 항산화, 브라이트닝, 항염증 효능을 가지는지를 본 연구에서 실험을 통해 확인하고자 하였다. 작약 뿌리의 항산화 기능에 대한 연구 결과(Bang *et al.*, 1999) 0.5 mg/ml 농도에서 95% 항산화 효과를 보였으며, 꽃잎 추출물의 미백 효과에 대한 연구 결과(Jung *et al.*, 2010)에서와 같은 arbutin 대비 우수한 미백효과를 전에 보여 주었다. 그리고 특히 Coral sunset 70% ethanol 추출물의 미백효과가 다른 품종에 대비하여 특이적으로 높은 결과를 얻었는데 이것에 대한 평가가 식물의 추출 시기와 연관되어있는 것인지 품종 특이적인 현상인지 정확한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

고분자 다당인 히아루론산(hyaluronic acid, HA)은 진피 층의 섬유아 세포로부터 산출되어, 표피, 진피에 있어서 주요한 세포외 매트릭스로서 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide이다(Lee *et al.*, 2001). 또한 HA은 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해 산물 혹은 저분

Table 4. Classification of Functional Activities and MASS detected components

Activities	Classification	Chemical Name / ID	Molecular formula
Antioxidant	j	quercetin 3-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
	p	kaempferol 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
	q	kaempferol-3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
	r	quercetin 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆
	s	8-methoxykaempferol-3-O-beta-D-(2"-O-beta-D-glucopyranosyl)-glucopyranoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇
Skin whitener	j	quercetin 3-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
	r	quercetin 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆
	p	kaempferol 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
	q	kaempferol-3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Anti-inflammatory	e	8-debenzoylpaeniflorin	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀
	j	quercetin 3-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
	k	Paeoniflorol	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₀
	n	Oxypaeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂
	o	Benzoylpaeniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂
	r	quercetin 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆
	q	kaempferol-3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
		kaempferol-3-O-(2"-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
	p	kaempferol 3-O-beta-D-(6"-galloyl)glucopyranoside	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
	s	8-methoxykaempferol-3-O-beta-D-(2"-O-beta-D-glucopyranosyl)-glucopyranoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇
u	1(beta),2,3,6-tetra-O-galloylglucose	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	

자 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Ghosh *et al.*, 1994). 이는 결국 고분자 HA의 분해효소인 hyaluronidase (HAase)의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로써 항염증 효과를 기대할 수 있는데(Ghosh *et al.*, 1994), 'Red charm', Coral sunset, 그리고 'Kansas'의 에탄올 추출물에서 각각 74.5%, 53.9%, 78%의 hyaluronidase 저해 효과를 나타내었다. 그러나 물 추출물에서는 상대적으로 낮은 저해 활성을 보였는데 이는 다른 작약 추출물에서 유사한 결과를 보일 것으로 예상된다. 이 결과는 본 연구의 FT-ICR MASS spectrophotometry와 천연물 구조 분석 Data 시스템을 이용한 분석에서 다양한 종류의 염증관련 추정되는 화합물이 있을 것으로 추정되었고, 작약 꽃잎 추출물의 항산화, 브라이팅, 항염증 실험을 수행한 결과를 바탕으로 FT-ICR MASS spectrophotometry와 천연물 구조 분석 Data 시스템 Flora genesis system에서 검색하여 검출된 추정 유효 성분들을 비교검토 분류해 보면 Table 4와 같이 정리할 수 있다.

본 연구에서는 FT-ICR MASS spectrophotometry와 천연물 구조 분석 Data 시스템을 이용한 분석을 수행하였고, 작약

꽃잎 추출물속에는 항산화, 브라이팅 및 항염증 효능을 가진 것으로 추정되는 다량의 quercetin 배당체 및 kemperol 배당체 그리고 작약의 주요성분인 Paeoniflorin 유도체 등이 함유되어 있음을 추정할 수 있었다. 특히 quercetin은 항산화, 항염증, 항알러지 등의 다양한 기능성을 가진 것으로 최근 보고 되었으며(Mlcek *et al.*, 2016), Paeoniflorin의 기능성에 대한 보고(Jung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2001; Soka *et al.*, 1985) 등에 비추어 볼 때 본 연구에서 작약 꽃잎 추출물이 보여준 항산화, 브라이팅 및 항염증 효과의 주 요인은 Quercetin 유도체들과 작약의 주요 성분인 paeoniflorin 유도체들에 의한 기능으로 추정할 수 있다. 본 연구에서 나온 작약뿌리 분석 결과 및 작약 꽃잎에서 얻은 본 연구 결과들을 잘 활용해서 응용시키면 새로운 천연 식물 소재의 개발과 화장품 등 신소재의 발굴 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2015학년도 수원대학교 학술진흥연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Bang, M.H., S.Y. Lee, J.C. Song, S.Y. Lee, N.K. Park and N.I. Baek. 1999. Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42(2):170-175.
- Carmichael, J., W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna and J.B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47(4):936-42.
- Cheng, J.T., C.J. Wang and F.L. Hsu. 1999. Paeoniflorin reverses guanethidine-induced hypotension via activation of central adenosine A1 receptors in Wistar rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 26:815-816.
- Ghosh, P. 1994. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. Clin. Exp. Rheumatol. 12(1): 75-82.
- Goulandris, N. 1984. The ponies of Greece. House & Garden. 156(May):252-256.
- Hwang, J.S., H.J. Chun and Y.S. Han. 2000. Isolation and identification of antimicrobial compound from Jakyak (*Paeonia japonica* var. pilosa Nakai). Korean J. Soc. Food Sci. 16(5):445-46 (in Korean)
- Jeong, H.R., H.J. Kwon, K. Choi, J.M. Chung and H.S. Moon. 2014. Traditional knowledge on the regional folk plants in inland of Chungcheongnam-do province, Korea. Korean J. Plant Res. 27(4):309-325.
- Jung, Y.O., N.B. Park, S.J. Jung, J.S. Kwak and J.H. Han. 2010. Effect of whitening, anti-aging on extract of *Paeonia lactiflora* flower. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine 24(3):452-456.
- Kim, H.H., M.J. Lee, S.R. Lee, K.H. Kim, K.H. Cho, H.C. Eun and J.H. Chung. 2005. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. Mechanism of Ageing and Development 126(11):1170-1177.
- Kim, K.J., S.D. Park, J.H. Park and J.C. Kim. 2006. Effective cultivation method for early harvesting of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J. Plant Res. 19(1):83-87.
- Kim, S.J. and J.C. Kim. 2001. Effect of irrigation treatment on growth and yield of *Paeonia lactiflora* Pallas L. (Peony). Korean J. Plant Res. 14(1):48-52.
- Kim, S.J., J.H. Park, B.G. Kim, S.D. Park and B.S. Choi. 1998. Effects of vinyl mulching on growth and quality of peony (*Paeonia lactiflora* P.) RDA. J. Indus. Crop Sci. 40(1):23-28.
- Kwon, M.H., S.Y. Choi and Y.C. Kim. 2009. Inhibitory effects of *Peonia japonica* water extract on skin aging (II). Environ. Toxicol. 24(2):169-178.
- Lee, B.G., J.H. Kim, S.G. Ham and C.E. Lee. 2014. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. Korean J. Plant Res. 27:29-34.
- Lee, M.K. J.S. Park, H.J. Song and S.U. Chon. 2014. Effects of polyphenol and catechin levels on antioxidant activity of several edible flower extracts Korean. J. Plant Res. 27(2): 111-118.
- Lee, N.H., S.J. Lee, D.S. Jung, H.J. Bu, H.C. Yang and K.Z. Riu. 2001. Screening of the tyrosinase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. Kor J. Pharmacogn. 32(3):175-180.
- Lee, J.Y. and B.J. An. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from *Pruni persicae* Flos. Kor. J. Herbolog. 27(5):55-63.
- Mlcek, J., T. Jurikova, S. Skrovankova and J. Sochor. 2016. Quercetin and its anti-allergic immune response. Molecules 21(5):E623.
- Nishida, S., S. Kikuichi, S. Yoshioka, M. Tsubaki, Y. Fujii, H. Matsuda, M. Kubo and K. Irimajiri. 2003. Induction of apoptosis in HL-60 cells treated with medicinal herbs. Amer. J. Chin. Med. 31:551-562.
- Park, H.S., K.J. Min, C.G. Cha, J.W. Song and J.C. Son. 2007. Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of *Paeonia lactiflora*. Kor. J. Env. Hlth. 33(1):21-29.
- Park, M.S. and Y.M. Chun. 2015. The usage of regional folk plants in Jeollanam-do. Korean J. Plant Res. 28(1):79-92.
- Prieto, J.M., M.C. Recio, R.M. Giner, S. Máñez, E.M. Giner-Larza and J.L. Ríos. 2003. Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions. J. Pharm. Pharmacol. 55(9):1275-1282.
- Reissig, J.L., J.L. Strominger and L.F. Leloir. 1995. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 270(2):959-66.
- Sharma, O.P. and T.K. Bhat. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem. 113:1201-1205.
- Soka, T. 1985. Encyclopedia of Chinese Medicine. Tokyo, Japan. 3:2066-2070.
- Suh, S.Y. 2001. Screening of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. Korean J. Plant Res. 14(1):32-37.

(Received 8 July 2016 ; Revised 6 October 2016 ; Accepted 14 October 2016)