

돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino) 추출물의 산화적 스트레스에 대한 항산화 및 세포보호효과

김경미 · 김아랑 · 김아영 · 하지훈 · 현송화 · 정윤주 · 박영민 · 정효진 · 홍인기 · 박수남*
서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터

Antioxidative and Cellular Protective Effects of Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) Extracts against Oxidative Stress

Kyoung Mi Kim, A-Rang Kim, A-Young Kim, Ji Hun Ha, Song Hua Xuan, Yoon Ju Jeong,
Young Min Park, Hyo Jin Jeong, In Gi Hong and Soo Nam Park*

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

Abstract – In this study, we investigated the total phenolic and flavonoid contents, component analysis, antioxidative activity and cellular protective effects against oxidative stress on human skin cells in 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from *Gynostemma pentaphyllum* (*G. pentaphyllum*) Makino. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities (FSC₅₀) of the 50% ethanol extracts, ethyl acetate fraction and aglycone fraction were 246.8, 147.2, 128.9 µg/mL, respectively. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of the 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system using the luminol-dependent chemiluminescence assay were 37.15, 10.74, 7.19 µg/mL, respectively. We investigated the cellular protective activity and the results showed that treatment of aglycone fraction (0.05-0.39 µg/mL) protect human skin cells in a concentration-dependent manner when the skin cell damages were induced by treating them with H₂O₂. These results suggest that extract/fractions of *G. pentaphyllum* Makino may be applicable as natural antioxidants in cosmetics.

Keywords – *Gynostemma pentaphyllum* Makino, Antioxidant, Cellular protective effect, Components analysis, Cosmetics

피부 노화는 피부내 생리적 요인들의 기능 감소에 의해 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외부 환경에 의한 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 특히, 피부가 노화하는 데 가장 큰 영향을 미치는 외인성 요인으로 자외선을 꼽을 수 있다.^{1,2)} 피부가 자외선에 노출되면 피부에서는 자외선의 작용으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 이들 ROS는 피부에 광산화적 손상을 증가시키는 노화의 원인 물질로 알려져 있다.^{3,4)} ROS의 종류에는 superoxide anion radical(O₂⁻), hydroxyl radical(·OH)과 같은 산소중심의 라디칼과 singlet oxygen(¹O₂), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 비라디칼종, 그리고 이들 ROS와 생체분자와의 반응으로 생성된 2차 라디칼 활성종들(ROO·, RO· 및 ·ROOH)이 포함된다. 이들 ROS는 우선적으로 피부

항산화제를 파괴함으로써 피부 항산화 방어망을 붕괴시키고 이어서 지질 과산화반응을 개시하고, 단백질 산화 및 DNA 산화 등 생체 분자들의 산화적 손상을 일으킨다. 뿐만 아니라 자외선으로 유도된 ROS는 결합조직 단백질 분자들을 가수분해시키는 matrix metalloproteinases(MMPs)를 발현시키고 이와 함께 피부 내 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로써 주름생성을 유도하는 피부 광노화를 가속화시킨다.⁵⁻¹¹⁾ 하지만 피부에는 ROS의 산화적 손상으로부터 피부를 보호하기 위한 항산화 방어망이 구축되어 있다. 항산화 방어망은 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 vitamin E, vitamin C, glutathione 등과 같은 비효소적 항산화제들로 구성되어 있다. 하지만 피부가 자외선에 지속적으로 노출되거나 염증을 수반하는 피부질환 상태에서 발생하는 산화적 스트레스는 피부 항산화 방어망의

*교신저자(E-mail): snpark@seoultech.ac.kr
(Tel): +82-2-970-6451

붕괴를 가져오고 결국 ROS와 같은 산화제와 피부 항산화제 사이의 불균형을 초래하여 피부노화가 촉진되게 된다.¹⁰⁻¹³ 따라서 내외적인 산화적 스트레스로부터 피부를 보호하고 항산화성을 유지하기 위해서는 지속적으로 항산화제의 보충이 필요하다. 이를 위해 비타민 E 및 C 또는 그 유도체들을 항산화제로서 화장품에 널리 이용하고 있다. 하지만 이들 항산화제들은 제품내에서의 불안정성이나 유도체의 경우 활성 저하 등의 문제로 화장품에의 사용에 제한성이 종종 나타나고 있다. 따라서 최근에는 이러한 문제점을 개선하고자 비교적 안정하고 피부에 도포했을 때 피부 흡수 및 효능이 증대될 수 있는 안전한 천연 항산화제를 발굴하여 화장품에 응용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다.^{14,15} 화장품에 사용되는 천연 항산화제는 주로 식물 추출물로 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물들이 주성분들이다. 천연의 플라보노이드는 대부분 배당체 형태로 존재하지만 당이 없는 아글리콘 성분들은 피부 흡수 및 항산화능이 배당체보다 일반적으로 더 크다. 이러한 연구들은 저자들의 선행 연구에서도 여러 번 보고한 바가 있다.¹⁶⁻¹⁸

박과(Cucurbitaceae)에 속하는 돌외(*G. pentaphyllum* Makino)는 다년생 덩굴성 초본류로써, 예로부터 칠엽담(七葉膽) 또는 덩굴차 및 덩굴감차라고도 불린다. 우리나라 남부와 일본, 중국 등 아시아 지역에서 분포되어 있다.¹⁹ 구황본초통해(救荒本草通解)에 의하면 사람이 섭취하여도 해가 없으며, 중국의 중약대사전(中藥大辭典)에서는 전초 또는 지상부위를 차나 술로 만들거나 약용으로 쓴다는 기록이 있다.²⁰ 돌외 추출물은 항산화, 항균, 항당뇨 및 항위궤양 등의 활성이 보고되었다.²¹⁻²⁴ 돌외의 주성분으로는 사포닌 계열의 gypenoside가 있으며, 그 외에 플라보노이드, 카로티노이드 및 알칼로이드 등이 보고되고 있다.²⁵⁻²⁷

하지만 돌외 추출물이나 특정 분획에 대한 피부 노화에 중요한 작용을 나타내는 다양한 ROS를 대상으로한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서의 총항산화능이나 사람 피부세포에서의 자외선 또는 과산화수소로 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 돌외 추출물, 추출물의 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획을 제조하고 이들의 항산화능 및 세포보호효과 그리고 활성분획의 성분 분석을 통해 화장품의 기능성 항산화 소재로서 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - 실험에 사용한 UV-visible spectrophotometer는 Varian(Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold(Germany)사의 6-channel LB9505 LT 제품을 사용하였다. 성분 분리를 위한 thin layer chromatography(TLC, aluminum sheet silica gel 60 F254)는 Merck(USA)에서 구입하였고,

HPLC는 Shimadzu(Japan) 제품을 사용하였다. LC/ESI-MS/MS(Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명과학 공동기기에 분석 의뢰하였다. MTT 실험에서 사용되는 ELISA reader는 Tecan(Austria)사의 제품을, pH 미터는 Mettler-Toledo(Switzerland)를 사용하였다.

Folin-ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical, luminol, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), FeCl₃·6H₂O, H₂O₂, (+)- α -tocopherol(1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였다. 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판특급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 돌외는 국내 재생으로 (주)지에프에서 제공받았으며 교신 저자인 서울과학기술대학교 박수남 교수가 검증한 후 실험에 사용하였다.

돌외 추출물 및 분획물 제조 - 건조된 돌외 전초 150 g을 50% 에탄올 3 L 침적시키고 24 hr 동안 교반하여 추출 후 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하였다. 50% 에탄올 추출물 35 mL를 40°C에서 감압 농축하여 파우더를 얻었다. 남은 50% 추출물은 감압증류 한 후 n-헥산을 처리하여 클로로필 등의 비극성 성분을 제거하였다. 항산화능이 큰 플라보노이드 및 그 배당체들은 에틸아세테이트 용매로 추출하고 감압 농축하여 파우더를 얻어 실험에 사용하였다. 에틸아세테이트 분획 중 일부를 H₂SO₄ 및 아세트 용액을 이용하여 산 가수분해 반응을 통해 당을 제거시키고 5% KOH-MeOH로 중화 적정 후 증류수로 산, 염기 및 당 등을 제거 한 후 에틸아세테이트로 추출하고 감압·농축하여 아글리콘 파우더를 제조하여 사용하였다(Fig. 1).

총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량 측정 - 돌외 추출물 중의 총 페놀성 화합물 함량 측정은 Alves 등의 방법

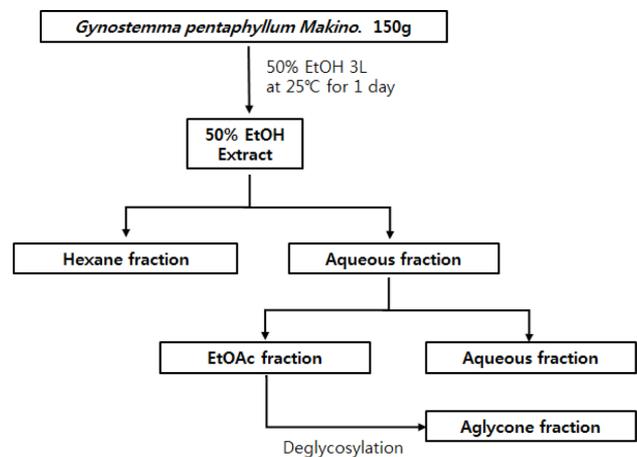


Fig. 1. Scheme for preparation of extract/fractions from *G. pentaphyllum* Makino.

을 이용하였다.²⁸⁾ 200 µg/mL 농도의 추출물 80 µL에 Folin-Ciocalteu 시약(50% v/v)을 20 µL를 가한 다음, 25°C에서 5 min 반응시킨다. 여기에 포화 Na₂CO₃용액(2% w/v) 200 µL를 가하여 혼합하고 25°C에서 30 min 반응시킨 후 ELISA reader(Tecan, Austria)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 농도별(0-50 µg/mL) 표준곡선을 작성한 후 총 페놀성 화합물 함량을 구하였다.

돌의 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등의 방법을 이용하였다.²⁹⁾ 2 mg/mL 농도의 추출물 30 µL에 증류수 120 µL를 가한 다음, NaNO₂(25% w/v) 9 µL를 넣고 25°C에서 5 min 반응시켰다. 이 용액에 AlCl₃(10% w/v) 9 µL를 넣고, 1 min 후 NaOH(1 M) 60 µL와 증류수 72 µL를 가한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 이용하여 농도별(0-100 µg/mL) 표준곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성 - 자유 라디칼은 피부노화의 주된 원인으로 알려져 있다. 따라서 돌의 추출물에 대한 자유라디칼 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 25°C에서 10 min 동안 방치 후 자유 라디칼의 양을 분광광도계로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 돌의 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 저해율은 식 (1)에 따라 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 blank, 추출물 또는 분획물을 넣지 않은 것을 대조군(control)으로 하여 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \left\{ \left[1 - \frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100 \quad (1)$$

A_{Experiment}는 실험군의 흡광도(absorbance), A_{Blank}는 blank의 흡광도, A_{Control}는 control의 흡광도를 의미한다. 농도에 따라 각각 세 번씩 측정하였으며, 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging concentration, FSC₅₀, µg/mL)를 구하여 비교하였다.

루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 활성 산소 소거 활성(총 항산화능) - 루미놀은 각종 ROS(O₂⁻, ·OH 그리고 H₂O₂)에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420-450 nm)하는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 luminol과 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 각종 ROS간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 총 항산화능을 측정할 수 있다. 실험방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 돌의 추출물과 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM 루미놀 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 화학발광기의

cell holder에 튜브를 꽂는다. 5 min 동안 항온시킨 후 Fenton 반응을 일으키기 위해 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)는 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 첨가하지 않았다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 활성산소 소거활성은 다음 식에 의해 계산되었고 활성산소 소거활성의 크기는 식 (2)에 따라 화학 발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

$$\text{Oxygen radical scavenging (\%)} = \left\{ \left[1 - \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Experiment}})}{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank}})} \right] \right\} \times 100 \quad (2)$$

돌의 추출물 및 분획물의 HaCaT 세포 독성 평가 - 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물이 세포생존율에 미치는 영향을 MTT 방법으로 확인하여 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 실험방법은 HaCaT 각질형성세포를 96-well plate에 접종한 후 37°C 세포배양기에서 70-80% 정도까지 배양하였다. 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물을 농도 별로 세포에 24 hr 처리한 후, 2 µg/mL 농도의 MTT 용액을 첨가하여 30 min 동안 반응시켜 formazan 결정을 생성시켰다. MTT 용액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해하여 570 nm 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 비 처리군(untreated group)에 의한 흡광도를 음성 대조군(100%)으로 하여 식 (3)에 따라 처리군(treated group)에 대한 상대적인 세포생존율을 구하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{treated group}}}{A_{\text{untreated group}}} \times 100 \quad (3)$$

과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 세포보호효과 - HaCaT 세포를 1×10⁴ cells/well로 96-well plate에 분주하고 24 hr 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 배양하였다. 24 hr incubation 후, 배지를 모두 제거하고 PBS 100 µL로 1회 세척하였다. PBS를 모두 제거 후, 과산화수소 6 mM 농도(in PBS)로 30 min 처리하였다. 과산화수소를 모두 제거 후, PBS 100 µL로 2회 세척하였다. 세척 후, 1% PBS를 함유한 DMEM 배지에 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물을 농도별로 희석하여 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 24 hr 배양하였다. 24 hr incubation 후, MTT assay로 세포생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물들의 세포 보호효과를 확인하였다.

돌의 추출물의 성분분석 - 돌의 추출물의 플라보노이드 성분을 동정하기 위하여 TLC, HPLC, LC/ESI-MS/MS을 이

용하여 분석하였다.

TLC 및 HPLC를 이용한 돌의 추출물의 성분 분석 - TLC 전개용매는 ethyl acetate:chloroform:formic acid:distilled water = 10:5:0.5:0.4(v/v) 및 ethyl acetate:chloroform:formic acid:distilled water = 8:1:0.5:0.4(v/v)를 사용하였다. TLC에서 성분 동정을 위해 표준물질의 R_f 값, 자외선 그리고 2-aminoethyl diphenylbromate-polyethylene glycol(NP-PEG) 발색법을 이용하였고 이미 보고된 분광학적 자료를 참고하였다.

돌의 추출물의 성분 분석을 위해 TLC로부터 각각의 띠를 긁어 100% 에탄올로 추출한 후 여과·농축하여 파우더를 얻었다. HPLC 분석은 2% acetic acid 및 0.5% acetic acid의 50% acetonitrile 용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때, HPLC 분리조건은 Table I에 나타내었다.

HPLC 및 LC/ESI-MS/MS를 이용한 돌의 추출물의 성분 분석 - LC 분석은 autosampler와 PDA-UV detector가 장착된 Thermo-Finnigan Surveyor instrument(Thermo Scientific, USA)를 사용하였다. 컬럼은 U-VDSpher Pur C18-E(2.0×50 mm, 1.8 μm)을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid (in D.W)(solvent A):0.1% formic acid(in acetonitrile)(solvent B)로 하였으며, 유속은 200 μL/min이며, injection volume은 5 μL로 하였다. MS/MS 분석은 Thermo-Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface를 사용하였다. Negative ion model로 capillary voltage는 -3500 V, nebulizer gas(N₂) 10(arbitrary units), collision gas (N₂) 그리고 ion source temperature는 400°C에서 행하였다.

통계처리 - 본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean±SD로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 5.0(San Diego, CA)프로그램을 이용하였으며, one-way ANOVA 검정을 적용하여 p<0.05 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

Table I. HPLC conditions for separation of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *G. pentaphyllum* Makino

Column	Shim-pack VP-ODS C18 (L:250 nm, LD:4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL
Mobile phase	A: 2% acetic acid in D.W B: 0.5% acetic acid in 50% acetonitrile solution
Gradient elution	0-10.0 min, 0% (v/v) of B; 10.0-30.0 min, 0-20% (v/v) of B; 30.0-100.0 min, 20-80% (v/v) of B; 100.0-110.0 min, 80% (v/v) of B; and 110.0-115.0 min, 80-0% (v/v) of B

결과 및 고찰

돌의 추출물과 분획물의 수율, 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량 측정 - 침적하여 얻은 돌의 50% 에탄올 추출물을 여과하고 감압증발기를 이용하여 여과된 추출물을 건조시켜 50% 에탄올 추출물을 얻었다. 수율은 돌의 원물 건조 중량당 18.1%이었다. 50% 에탄올 추출물로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획물의 수율은 1.3%였으며, 에틸아세테이트 분획물로부터 얻어진 아글리콘 분획물의 수율은 0.7%였다(Table II).

페놀 및 플라보노이드는 주로 항산화능을 나타내는 물질로서 천연물의 항산화력을 결정하는데 중요한 화합물로 알려져 있다. 돌의 1 g 50% 에탄올 추출물 파우더, 에틸아세테이트 분획물 파우더 또는 아글리콘 분획물 파우더 각각에 포함되어 있는 총 페놀성 및 플라보노이드 함량을 Table II에 나타내었다. 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 gallic acid의 양으로 환산하여 표시한 결과, 추출물 또는 분획물 중 아글리콘 분획물(517.2 mg/g)이 에틸아세테이트 분획물(409.8 mg/g), 50% 에탄올 추출물(197.8 mg/g)보다 높게 나타났다. 총 플라보노이드 화합물의 함량은 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었으며 추출물 또는 분획물 중 아글리콘 분획물(103.4 mg/g)이 에틸아세테이트 분획물(99.6 mg/g), 50% 에탄올 추출물(47.8 mg/g)보다 높게 나타났다.

DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성 - 피부가 자외선에 노출되어 생성되는 ROS에는 ·OH, O₂⁻과 같은 홀 전자를 갖는 자유라디칼이 포함되어 있다. 이러한 홀 전자를 가지고 있는 라디칼은 에너지가 높고 반응성이 크기 때문에 세포막에서 지질 과산화반응의 자동산화반응을 개시시킬 수 있다. 자동산화 반응이 개시되면, 생체 내 구성물질이 산화과정을 거치며 피부노화가 일어나게 된다. 이때, (+)-α-tocopherol, 플라보노이드 등의 항산화제는 ROS 및 유도된 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응인 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 시료의 항산화능은 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통하여 측정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존

Table II. Yields and bioactive compounds contents of *G. pentaphyllum* Makino extract/fractions

	Yields (wt%)	Total phenolic (gallic acid, mg/g)	Total flavonoid (quercetin, mg/g)
50% EtOH extract	18.1	197.8	47.8
EtOAc fraction	1.3	409.8	99.6
Aglycon fraction	0.7	517.2	103.4

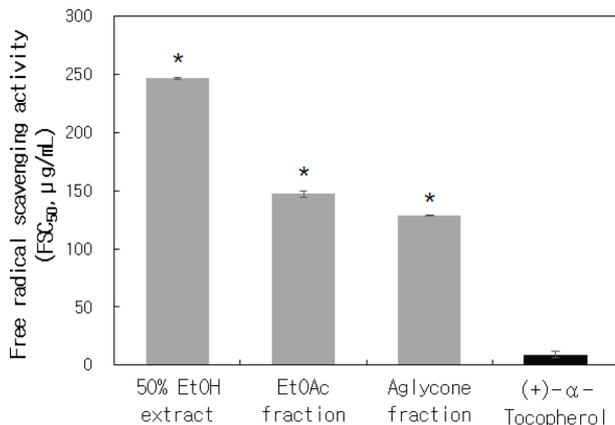


Fig. 2. Free radical scavenging activities of extract/fractions from *G pentaphyllum* Makino and reference. Data are indicated as mean±SD. **p*<0.05 compared with (+)-α-tocopherol.

재하는 DPPH를 이용하여 들의 추출물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 들의 50% 추출물과 분획물 및 대조군으로 기존에 강력한 지용성 항산화제로 알려진 (+)-α-tocopherol의 자유라디칼 소거활성 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

들의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 각각 246.82, 147.18 및 128.89 μg/mL로 나타났다. 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성이 50% 에탄올 추출물의 활성보다 크게 나타났으며, 특히 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성이 가장 높게 나타났다. 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 라디칼 소거활성이 크게 나타난 것은 함유된 플라보노이드의 함량이 크기 때문인 것으로 추정된다. 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (FSC₅₀, 8.98 μg/mL)보다는 낮은 활성을 보였지만, 아글리콘 분획은 50% 에탄올 추출물보다 약 2배 높은 활성으로 가장 높은 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 나타내었다.

루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거활성(총 항산화능) - Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서는 Fenton 반응을 통해 생성된 ·OH, H₂O₂와 같은 ROS가 생성되고, 생성된 ROS는 루미놀을 산화시킨다. 루미놀은 ROS 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420-450 nm에서 발광하는 것으로 알려져 있다. 이 계에서는 다양한 종류의 활성산소가 생성되기 때문에 이들 활성산소종들에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 들의 50% 추출물과 분획물 및 대조군으로 수용성 항산화제로 L-ascorbic acid의 총 항산화능(OSC₅₀) 측정 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

들의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 활성산소 소거활성은 각각 37.15, 10.74 및 7.19 μg/mL로 나타났다. 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 총 항산화능이 50% 에탄올 추출물의 활성보다 크게 나타났으며, 특히 아글리콘 분

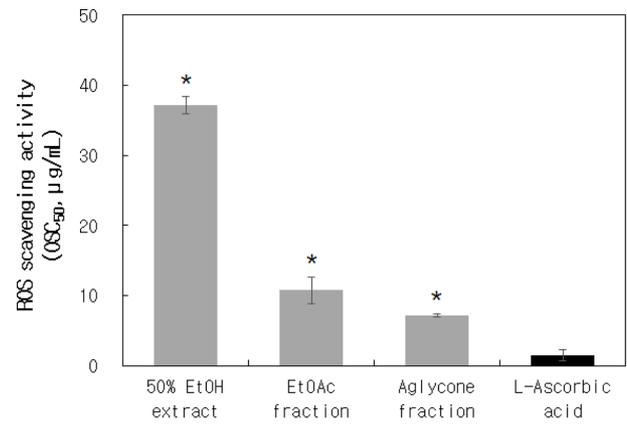


Fig. 3. ROS scavenging activities of extract/fractions from *G pentaphyllum* Makino and reference. Data are indicated as mean±SD. **p*<0.05 compared with L-ascorbic acid.

획의 총 항산화능이 가장 높게 나타났다. 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 총 항산화능이 크게 나타난 것은 함유된 플라보노이드의 함량이 크기 때문인 것으로 추정된다. 비교물질로 사용된 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid(OSC₅₀, 2.46 μg/mL)보다 낮은 활성을 보였지만, 아글리콘 분획은 50% 에탄올 추출물 보다 약 5배 높은 활성으로 가장 높은 총 항산화 활성을 나타내었다.

들의 추출물 및 분획물의 HaCaT 세포 독성 평가 - MTT 방법으로 들의 추출물 및 분획물이 사람갈질형성세포에 대한 세포독성을 확인함으로써 실험에 사용될 시료의 농도범위를 결정하였다. 0.4-400 μg/mL의 들의 50% 에탄올 추출물과 분획물의 세포 생존율을 Fig. 4에 나타내었다. 들의 50% 에탄올 추출물은 25 μg/mL, 에틸아세테이트 분획물은

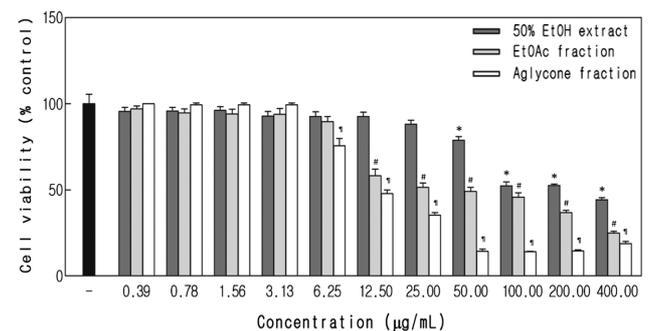


Fig. 4. Effects of 50% ethanol extract/fractions from *G pentaphyllum* Makino on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by the MTT assay. Data are presented as mean±SD. **p*<0.05 compared with untreated control in 50% ethanol extract dose-treated groups, #*p*<0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated groups, †*p*<0.05 compared with untreated control in aglycone fraction dose-treated groups.

6.25 µg/mL, 아글리콘 분획은 3.13 µg/mL의 농도까지는 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 본 실험에서는 이를 바탕으로 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 최고 농도를 3.13 µg/mL으로 설정하였다.

과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 세포보호효과 - 과산화수소는 세포 내에서 O₂⁻이 SOD로 촉매되어 생성되거나, 자외선 조사에 의해서 과잉 생산되면 산화적 손상을 일으킨다. 활성산소인 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속이온과 반응하여 다른 ROS를 생성시켜 세포손상을 야기시킨다.³⁰⁾ 50% 에탄올 추출물 및 분획물의 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 세포보호 효과를 Fig. 5에 나타내었다.

실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군에 비하여 약 50%의 생존율을 나타내었다. 50% 에탄올

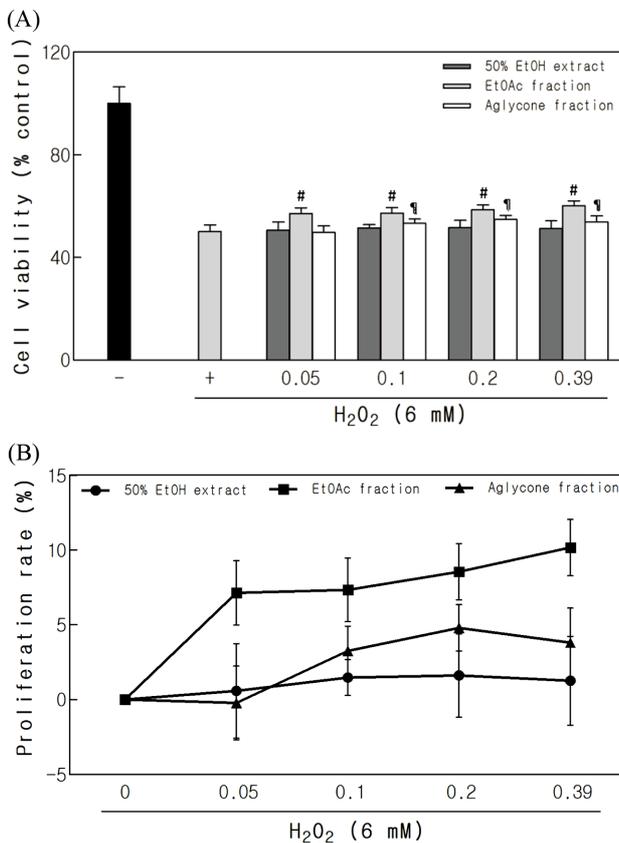


Fig. 5. (A) Cell protective effects of 50% ethanol extract/fractions from *G. pentaphyllum* Makino on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. **p*<0.05 compared with untreated control in 50% ethanol extract dose-treated groups, #*p*<0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated groups, ¶*p*<0.05 compared with untreated control in aglycone fraction dose-treated groups. (B) Rate of increase in proliferation of cell protective effects. -●-: 50% EtOH extract, -■-: EtOAc fraction, -▲-: aglycone fraction. Data are presented as mean±SD.

추출물 처리 군의 세포생존율은 모든 농도에서 미미한 수준으로 증가하지 않았다. 그러나 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 H₂O₂로 유도된 세포 손상에서 보호효과를 나타내었다. 그 중에서, 아글리콘 분획은 0.05-0.39 µg/mL 농도에서 각각 53.5, 54.8 및 53.8으로 최대 55% 증가하였다. 즉, 아글리콘 분획물이 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 보호효과를 나타냈다.

50% 에탄올 추출물의 성분분석 - 50% 에탄올 추출물 및 아글리콘 분획의 성분을 확인하기 위해, TLC 크로마토그램에서 극성도가 다른 다음의 2개의 용매조건을 이용하였다(A 조건; ethyl acetate:chloroform:formic acid:DW = 8:1:0.5:0.4 (v/v), B조건; ethyl acetate:chloroform:formic acid:DW = 10:5:0.5:0.4(v/v)). TLC 크로마토그램에서 50% 에탄올추출물은 Fig. 6에 아글리콘분획은 Fig. 7에 각각 나타내었다. A 조건에서 아랫부분에 있는 3개의 띠들(GPME1, GPME2, GPME3)을 분리했으며(Fig. 6A, 7A), B조건에서 윗부분의 4개의 띠들(GPME4, GPME5, GPME6, GPME7)을 분리했다(Fig. 6B, 7B). 성분 분석을 위해, 50% 에탄올추출물의 TLC로 분리된 GPME1-7띠들을 추출하여, LC/ESI-MS를 이용하였다(Table III).

50% 에탄올추출물의 성분분석을 위해, 50% 에탄올추출물의 TLC로 분리된 GPME1은 kaempferol 3-*O*-β-rutinoside, GPME2는 quercetin 3-β-*O*-glucoside, GPME3는 astragalol, GPME4는 caffeic acid, GPME5는 quercetin, GPME6는 ferulic acid, GPME7은 kaempferol로 확인되었으며, 표준물질을 이용하여 TLC, HPLC 및 UV-Visible 흡수 스펙트럼 결과와 참고문헌을 통해 최종적으로 확인하였다(Fig. 6-8, Table III). TLC 크로마토그램에서 분리한 성분들(GPME1-7)과 HPLC의 피크들을 비교한 결과는 GPME1은

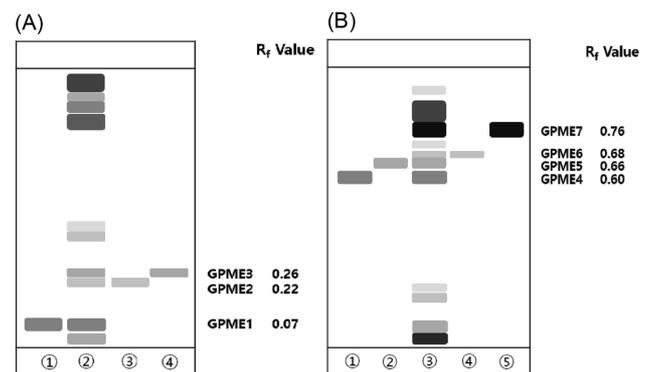


Fig. 6. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *G. pentaphyllum* Makino and references. (A) Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 8 : 1 : 0.5 : 0.4 (v/v), ① kaempferol 3-*O*-β-rutinoside, ② ethyl acetate fraction, ③ quercetin 3-β-*O*-glucoside, ④ astragalol. (B) Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 10 : 5 : 0.5 : 0.4 (v/v), ① caffeic acid, ② quercetin, ③ ethyl acetate fraction, ④ ferulic acid, ⑤ kaempferol.

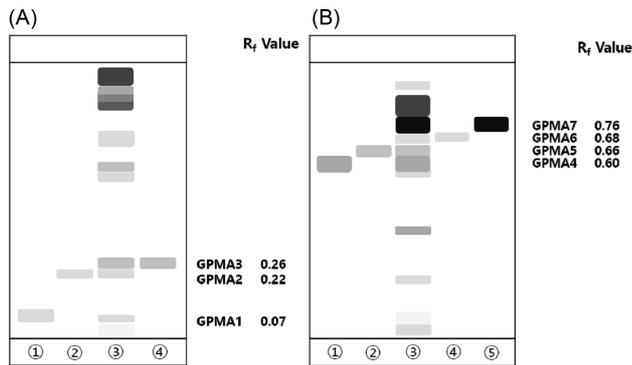


Fig. 7. TLC chromatogram of aglycone fraction from *G pentaphyllum* Makino and references. (A) Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 8 : 1 : 0.5 : 0.4 (v/v), ① kaempferol 3-*O*- β -rutinoside, ② quercetin 3- β -*O*-glucoside, ③ aglycone fraction, ④ astragalin. (B) Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 10 : 5 : 0.5 : 0.4 (v/v), ① caffeic acid, ② quercetin, ③ aglycone fraction, ④ ferulic acid, ⑤ kaempferol.

peak 3(kaempferol 3-*O*- β -rutinoside), GPME2은 peak 5 (quercetin 3- β -*O*-glucoside), GPME은 peak 4(astragalin), GPME4은 peak 1(caffeic acid), GPME5은 peak 6(quercetin) GPME6은 peak 2(ferulic acid), GPME7은 peak 7(kaempferol)로 나타났다. HPLC에서 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획(Fig. 8B)의 성분 변화를 확인하였으며, 플라보노이드의 배당체인 peak 3-5번이 두드러지게 감소하거나 사라졌고, peak 6(quercetin) 및 peak 7(kaempferol)의 함량이 증가함을 보였다.

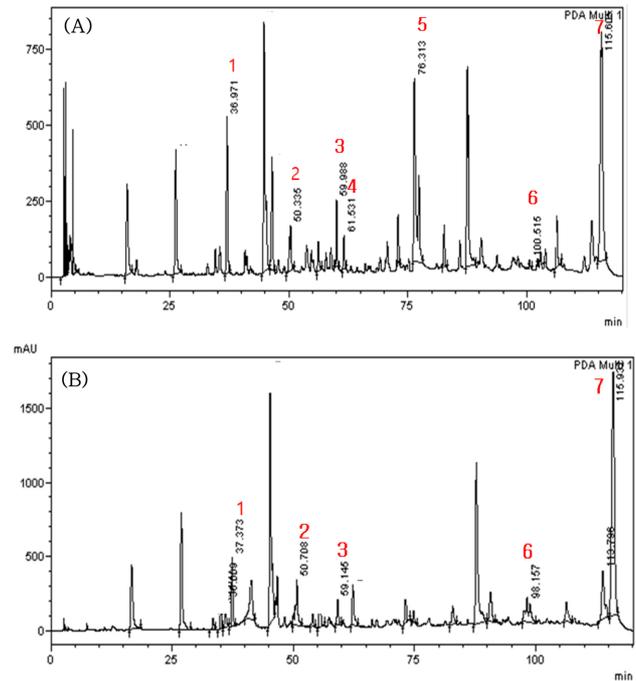


Fig. 8. The HPLC chromatograms of ethyl acetate fraction (A) and aglycone fraction (B) from *G pentaphyllum* Makino at 360 nm absorbance. 1: GPME4, 2: GPME6, 3: GPME1, 4: GPME3, 5: GPME2, 6: GPME5, 7: GPME7.

결론적으로 둘의 에틸아세테이트 분획보다 아글리콘 분획에서 당이 제거된 아글리콘 구조의 플라보노이드가 증가함을 확인할 수 있으며, 이러한 성분 변화가 그들의 활성에 차이를 나타냈을 것으로 사료된다.

Table III. LC/ESI-MS characteristics of ethyl acetate fraction from *G pentaphyllum* Makino in ion mode

TLC band	HPLC pack No.	Identified compound	Retention time (min)	Molar mass (g/mol)	λ_{max} (nm)	MS ions		Reference
						Negative ions (m/z) [M-H] ⁻	Positive ions (m/z) [M+H] ⁺	
GPME1	3	Kaempferol 3- <i>O</i> - β -rutinoside C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	59.988	594.5	264.8, 347.1	-	595.3	31)
GPME2	5	Quercetin 3- β - <i>O</i> -glucoside C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	76.313	464.4	255.7, 355.1	-	465.6	32)
GPME3	4	Astragalin C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	61.531	448.4	265.4, 343.9	447.2	449.1	33)
GPME4	1	Caffeic acid C ₉ H ₈ O ₄	36.971	180.2	292.4, 331.0	-	181.1	34)
GPME5	6	Quercetin C ₁₅ H ₁₀ O ₇	100.515	302.2	254.4, 370.4	301.3	303.3	35)
GPME6	2	Ferulic acid C ₁₀ H ₁₀ O ₄	50.335	194.2	279.1, 325.0	-	195.1	35)
GPME7	7	Kaempferol C ₁₅ H ₁₀ O ₆	115.605	286.2	264.4, 365.1	-	287.0	36)

결 론

본 연구에서는 돌의 50% 에탄올 추출물과 분획물들의 총 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량, 항산화 및 세포보호효과를 평가하고 추출물의 성분분석을 진행하였다.

돌의 추출물과 분획물들의 총 페놀성 화합물 함량 분석결과, 아글리콘 분획물(517.2 mg/g) > 에틸아세테이트 분획물(409.8 mg/g) > 50% 에탄올 추출물(197.8 mg/g) 순서로 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 아글리콘 분획물(103.4 mg/g) > 에틸아세테이트 분획물(99.6 mg/g) > 50% 에탄올 추출물(47.8 mg/g) 이었다. 돌의 추출물의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과, (+)- α -tocopherol(8.98 μ g/mL) > 아글리콘 분획(128.9 μ g/mL) > 에틸아세테이트 분획(147.2 μ g/mL) > 50% 에탄올 추출물(246.8 μ g/mL) 순서로 나타났다. 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol 보다는 낮은 활성을 보였지만, 아글리콘 분획은 50% 에탄올 추출물보다 약 2배 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다. 돌의 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 L-ascorbic acid(1.50 μ g/mL) > 아글리콘 분획(7.19 μ g/mL) > 에틸아세테이트 분획(10.74 μ g/mL) > 50% 에탄올 추출물(37.15 μ g/mL) 순서로 나타났다. 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid 보다 낮은 활성을 보였지만, 아글리콘 분획은 50% 에탄올 추출물 보다 약 5배 높은 총 항산화능을 나타내었다.

사람피부세포인 HaCaT을 이용한 세포보호효과 실험에서 과산화수소 처리 후 돌의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 처리한 경우 50% 에탄올 추출물을 처리한 것 보다 과산화수소로 감소되었던 세포 생존율이 더욱 증가하였으며, 아글리콘 분획은 최대 55% 증가함을 확인 하였다.

TLC 및 HPLC 크로마토그램 분석을 통해 활성분획인 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에서 quercetin 3- β -O-glucoside, kaempferol 3-O- β -rutinoside, astragalín, caffeic acid, quercetin, ferulic acid, kaempferol 성분들이 있음을 확인하였다. 돌의 에틸아세테이트 분획으로부터 아글리콘 분획물을 제조했을 때, 플라보노이드 배당체들(quercetin 3- β -O-glucoside, kaempferol 3-O- β -rutinoside, astragalín)은 감소하고, 아글리콘인 quercetin 및 kaempferol은 증가하였다.

본 연구에서는 항산화 활성 평가를 통해 돌의 분획물의 항산화 활성을 확인하였다. 특히 아글리콘 분획물은 50% 에탄올 추출물에 비해 가장 큰 항산화능을 갖는 것으로 평가되었다. 이상의 결과들을 볼 때, 돌의 아글리콘 분획물이 플라보노이드 및 페놀성 화합물에 기인하여 항산화 활성 및 세포보호효과를 나타냄을 확인하였다. 결론적으로, 돌의 분획물은 활성산소(H₂O₂)로 유도된 사람피부세포 손상에서 세포보호효과를 나타냈으며, 이는 항산화 화장품 원료로써 활용 가능성이 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다(과제 고유번호:HN15C0104).

인용문헌

- Lee, D. S., Lim, M. S., Kwan, S. S., Kim, S. Y. and Park, S. N. (2012) Antioxidative activity and componential analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 93-99.
- Yaar, M. and Gilchrist, B. A. (2007) Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* **157**: 874-887.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. I. and Lomri, A. (2007) Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* **74**: 324-329.
- Park, S. N. (1989) Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen mediated biochemical reactions. Seoul National Univ., Seoul, Korea.
- Berman, S. B. and Hastings, T. G. (1997) Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **69**: 1185-1195.
- Davies, M. J. (1998) Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability. *Am. Heart J.* **23**: 2382-2383.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A. and Stohs, S. J. (1995) *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* **104**: 129-140.
- Park, S. N. (1997) Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **23**: 75.
- Park, S. N. (2003) Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I). *A. J. Korean Ind. Eng. Chem.* **14**: 657-665.
- Park, S. N. (2003) Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 510-518.
- Yamakoshi, J., Otsuka, F., Sano, A., Tokutake, S., Saito, M., Kikuchi, M. and Kubota, Y. (2003) Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig. Cell Res.* **16**: 629-638.
- Magdalena, L. C. and Tak, Y. A. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**: 749-762.
- Sohala, R. S. and Orsb, W. C. (2012) The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **52**: 539-555.
- Kim, J. E., Kim, A. R., Kim, M. J. and Park, S. N. (2011) Antibacterial, antioxidative and antiaging effects of *Allium*

- cepa* peel extracts. *Appl. Chem. Eng.* **22**: 178-184.
15. Won, D. H., Gu, H. A., Kim, H. J., Han, S. B., Park, J. and Park, S. N. (2013) Antibacterial and antioxidative activities of *Epimedium koreanum* Nakai extracts. *J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 284-291.
 16. Ha, J. H., Jeong, Y. J., Seong, J. S., Kim, K. M., Kim, A. Y., Fu, M. M., Suh, J. Y., Lee, N. H., Park, J. and Park, S. N. (2015) Antioxidant and antibacterial activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher (Jecheon, Korea) extracts obtained by various extract condition. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **41**: 361-373.
 17. Xuan, S. H., Kim, G. Y., Yu, J. Y., Kim, J. W., Yang, Y. R., Jeon, Y. H., Jeong, Y. J., Kim, A. R., Park, S. N. (2017) Antioxidant and cellular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells. *Appl. Chem. Eng.* **27**: 620-626.
 18. Xuan, S. H., Kim, A. R., Jeong, Y. J., Lee, N. H. (2016) Antioxidant and cellular protective effects of *Moringa oleifera* leaves extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **42**: 217-226.
 19. Razmovski-Naumovski, V., Huang, T. H. W., Tran, V. H., Li, G. Q., Duke, C. C. and Roufogalis, B. D. (2005) Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem. Rev.* **4**: 197-219.
 20. Hyun, S. H., Lee, J. S., Lee, K. B. and Lee, J. S. (2007) Antioxidative activity of *Gynostemma pentaphyllum* Makino extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**: 447-451.
 21. Wang, Z. J. and Luo, D. H. (2007) Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Carbohydr. Polymers* **68**: 54-58.
 22. Srichana, D., Taengtip, R. and Kondo, S. (2011) Antimicrobial activity of *Gynostemma pentaphyllum* extracts against fungi producing aflatoxin and fumonisin and bacteria causing diarrheal disease. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **42**: 704-710.
 23. Huyen, V. T. T., Phan, D. V., Thang, P., Ky, P. T., Hoa, N. K. and Ostenson, C. G. (2012) Antidiabetic effects of add-on *Gynostemma pentaphyllum* extract therapy with sulfonylureas in type 2 diabetic patients. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2012**: 1-7.
 24. Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., and Amornlerdpison, D. (2004) The anti-gastric ulcer effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Phytomedicine* **11**: 431-435.
 25. Liu, X., Ye, W., Mo, Z., Yu, B., Zhao, S., Wu, H., Che, C., Jiang, R., Mak, T. C. W. and Wendy Hsiao, W. L. (2004) Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Nat. Prod.* **67**: 1147-1151.
 26. Fang, Z. P. and Zeng, X. Y. (1989) Isolation and identification of flavonoids and organic acid from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **14**: 676-678.
 27. Yang, X., Zhao, Y., Yang, Y. and Ruan, Y. (2008) Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 6905-6909.
 28. Alves, R. C., Costa, A. S. G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Nunez, M. J. and Oliveira, B. (2010) Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 12221-12229.
 29. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**: 555-559.
 30. Kammeyer, A. and Luiten, R. M. (2015) Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**: 16-29.
 31. Iwashina, T. and Matsumoto, S. (2013) Flavonoid glycosides from the fern, *Schizaea* (Schizaeaceae) in south pacific region, and their distribution pattern. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.* **39**: 195-201.
 32. Sakakimara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 571-581.
 33. Kim, D. S., Kang, Y. M., Jin, W. Y., Sung, Y. Y., Choi, G. and Kim, H. K. (2014) Antioxidant activities and polyphenol content of *Morus alba* leaf extracts collected from varying regions. *Biomed Rep.* **2**: 675-680.
 34. Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P. and Duan, C. (2007) Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules* **12**: 679-693.
 35. Hossain, M., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B. and Barry-Ryan, C. (2010) Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 10576-10581.
 36. Iwashina, T. and Kokubugata, G. (2012) Flavone and flavonol glycosides from the leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu islands. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.* **38**: 63-67.
- (2017. 5. 17 접수; 2017. 6. 12 심사; 2017. 6. 15 게재확정)