

풍선덩굴 잎 추출물의 항산화 효과 및 성분 분석

정 호 진 · 김 아 랑 · 이 건 수 · 박 소 현 · 신 혁 수 · 이 상 래 · 송 바 림 · 이 윤 주 · 안 현 진* · 이 재 덕* · 박 수 남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품융합기술연구소
*여명바이오텍

(2017년 6월 24일 접수, 2017년 6월 29일 수정, 2017년 6월 30일 채택)

Antioxidant Effect and Component Analysis of *Cardiospermum halicacabum* Leaf Extracts

Hyo Jin Jeong, A Rang Kim, Keon Soo Lee, So Hyun Park, Hyuk Soo Shin, Sang Rae Lee,
Ba Reum Song, Yun Ju Lee, Hyun Jin An*, Jae Duk Lee*, and Soo Nam Park†

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

*Yeomyung Biochem, Room 301, K hall, Startup Center, Chungcheong University, 38 Wolgot-gil, Gangnae-myeon,
Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungbuk-do 28171, Korea

(Received June 24, 2017; Revised June 29, 2017; Accepted June 30, 2017)

요약: 본 연구에서는 풍선덩굴 잎 추출물 및 그 분획물에 대하여 항산화 활성 평가와 성분 분석을 수행하였다. 본 실험에는 풍선덩굴 건조 잎의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 사용하였으며, 각각의 수율은 16.4, 0.9 및 0.3%로 나타났다. 자유라디칼 소거활성(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, FSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(92.5 µg/mL)이 가장 큰 것으로 나타났으며, 이때 대조군인 (+)-α-tocopherol의 FSC₅₀은 8.9 µg/mL이었다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계를 이용한 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 아글리콘 분획(4.2 µg/mL)에서 가장 크게 나타났으며, 대조군인 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)와 유사한 효과를 나타내었다. ¹O₂로 유도된 사람 세포 손상에 대한 보호효과 측정에서 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획은 모두 농도 의존적(5.0-25.0 µg/mL)으로 세포보호효과를 나타냈다. 추출물/분획물 중에서 아글리콘 분획(τ₅₀, 76.4 min)이 가장 큰 세포보호효과를 나타내었다. TLC, HPLC, LC/ESI-MS를 이용하여 풍선덩굴 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획물에 대하여 성분 분석을 실시하였다. 그 결과, apigenin-7-O-glucuronide, apigenin-7-glucoside 및 quercitrin hydrate 등의 플라보노이드가 함유되어 있음을 확인하였다. 이상의 결과들은 풍선덩굴 잎 추출물 또는 분획이 항산화 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidant effect and component analysis for extract and fractions of *Cardiospermum halicacabum* leaf were investigated. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from dried *C. halicacabum* leaf. The yields of extract and fractions were 16.4, 0.9 and 0.3% per dried powder, respectively. DPPH (1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity (FSC₅₀) of ethyl acetate fraction (92.5 µg/mL) was the greatest radical scavenging activity, but lower than (+)-α-tocopherol (8.9 µg/mL). In reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (total antioxidant capacity, OSC₅₀) on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system, aglycone fraction (4.2 µg/mL) was the highest total antioxidant capacity and similar to L-ascorbic acid (1.5 µg/mL). The cellular protective effects of *C. halicacabum* leaf extract and fractions on the ¹O₂-induced cellular damage of human erythrocytes were exhibited at all concentration-dependent (5.0-25.0 µg/mL). Especially, aglycone fraction (τ₅₀, 76.4 min) in 25.0 µg/mL showed the most protective effect among extracts. Components of the ethyl acetate fraction obtained from *C. halicacabum* extracts were analyzed by TLC, HPLC

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

chromatogram and LC/ESI-MS. Results showed that the ethyl acetate fraction contained some flavonoids, such as apigenin-7-O-glucuronide, apigenin-7-glucoside and quercitrin hydrate. These results suggest that the extracts and fractions of *C. halicacabum* leaf may be applied as antioxidant functional cosmetic raw materials.

Keywords: *Cardiospermum halicacabum*, antioxidant, reactive oxygen species, component analysis

1. 서 론

피부는 표피, 진피, 피하조직의 3개의 층으로 구성되어 있으며 신체의 전신을 둘러싸고 있다. 피부는 자외선이나 미생물과 같이 해로운 외부 환경에 직접 노출되기 때문에 이들로부터 생체를 보호하는 역할을 한다. 피부 노화는 일반적으로 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 나눌 수 있다[1]. 내인적 노화는 나이가 증가함에 따라 나타나는 자연적인 노화이며, 외인적 노화는 자외선[2], 흡연[3] 및 환경요소 등의 원인으로 나타나는 노화이다. 그중에서 피부노화의 가장 큰 원인은 자외선 노출에 의한 광노화(photoaging)이다[4]. 자외선은 파장에 따라 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 및 UVC (200-280 nm)로 크게 구분되며, 그중에서 UVA (자외선의 90%)와 UVB (자외선의 5%)가 지구 표면까지 도달하여 피부에 영향을 미친다[5]. 특히 UVB는 일광화상(sunburn)을 유발시키는 능력이 UVA보다 1,000배 이상 높은 것으로 알려져 있다[6]. 피부가 이러한 자외선에 지속적으로 노출되면 다양한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 이러한 활성산소의 종류로는 singlet oxygen (1O_2), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), alkoxy radical ($\cdot OR$) 및 hydroperoxy radical ($\cdot OOR$) 등이 있다. 생성된 ROS는 피부의 생체 구성 성분인 단백질의 산화, DNA 손상, 지질 과산화 반응을 개시시키며 또한 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 촉진시켜 콜라겐, 엘라스틴 섬유의 절단 및 비정상적인 교차결합을 일으켜 피부노화를 가속화시킨다. 이러한 ROS로부터 유도된 산화적 스트레스에 대항하기 위해 피부에는 항산화 방어망이 구축되어 있다. Superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 효소적 항산화제와 함께 flavonoids, vitamin E, vitamin C, glutathione 등과 같은 비효소적 항산화제들이 서로 상호보완하며 피부에 항산화 네트워크를 형성한다. 이들은 지질과산화 반응에 대하여 화학적 소거 및 물리적

소광을 통해 singlet oxygen을 감소시키며 $\cdot OH$ 을 소거함으로써 자동산화반응으로 이어지는 개시반응을 억제한다. 또한 일부의 플라보노이드와 같은 항산화제들은 Fenton 반응을 촉매하는 Fe^{2+} , Cu^+ 의 전이금속과 결합함으로써 라디칼을 생성시키는 반응을 억제시키기도 한다. 특히 과잉의 ROS는 체내에 존재할 때 효소적 항산화제를 손상시킬 수 있으며 비효소적 항산화제의 고갈도 쉽게 일으킬 수 있다. 따라서 외부에서 비효소적 항산화제의 적절한 보충은 자외선으로부터 피부 세포 보호 및 광노화 억제에 꼭 필요한 것으로 간주되고 있다. 또한 비효소적 항산화제는 주로 광합성을 하는 식물에 의해 합성되며 항산화 작용이 있는 천연 식물 추출물들은 식품 및 화장품 등 다양한 분야에서 항산화제로 종종 사용되고 있다[7-14].

풍선덩굴(*C. halicacabum*)은 무환자나무과에 속하는 다년생 식물로 열대, 아열대 아시아 및 아프리카에 널리 분포되어 있다. 풍선덩굴 추출물은 류머티즘, 요통, 신경 질환 및 고환염과 수종염의 완화제로서 인도에서는 전통의학 및 민간요법에서 사용되어 왔다. 풍선덩굴에는 caffeic acid, chlorogenic acid 등과 같은 페놀성 화합물과 quercetin 및 apigenin 등과 같은 플라보노이드와 그 배당체들이 존재한다. 그 추출물은 NO 및 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼 소거활성, 콜라겐분해효소 억제작용, 상처 치유효과, 항균활성 및 항염증 활성이 있다고 보고되었다[16-21]. 하지만 화장품에서 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획을 대상으로 한 항산화 소재로서의 응용 연구는 아직도 미흡한 실정이다. 특히 피부 노화에서 중요한 다양한 ROS가 생성되는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능에 관한 연구나 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 풍선덩굴 잎에 대하여 추출물 및 분획물을 제조하고, 피부노화의 큰 원인인 활성산소에 따른 세포손상에 대한 보호작용, 총 항산화능 및 free radical 소거능에 대한 항산화능을 비교 평가하였다. 또한 풍선덩굴 잎 추출물의 활성 성분을 조사하고 이를 기능성 화장품 소재로서 화장품에 응용 가능성이

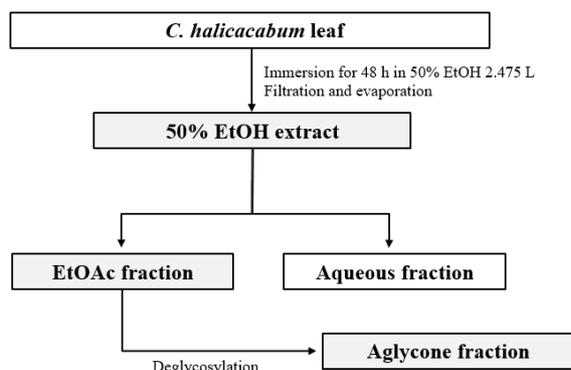


Figure 1. Fractionation scheme of *C. halicacabum* leaf 50% EtOH extract and its fractions.

있는지를 알아보하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용된 풍선덩굴은 여명바이오크(주) (충북 청주시)에서 제공받아 진행하였다.

2.2. 기기 및 시약

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험에 사용된 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, luminol 화학발광실험에서 사용되는 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT, 적혈구 광용혈 실험에는 Milton Roy Co. (USA)사의 Spectronic 20D 제품을 사용하였다. pH 측정기는 Mettler-Toledo (Switzerland)사 제품을, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack VP-ODS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였다. LC/ESI-MS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 NICEM (농생명과학공동기기원)에 분석 의뢰하였다.

DPPH radical, luminol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H₂O₂, rose bengal, (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), FeCl₃ · 6H₂O 및 L-ascorbic acid는 Sigma (USA)의 제품을 사용하였고, 완충용액 제조에 사용된 Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl, 에탄올(EtOH) 및 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 시약과 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 성분 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet gel 60

F254 (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다.

2.3. 추출 및 분획

건조된 풍선덩굴 잎 165 g을 50% 에탄올 2,475 mL에 48 h 동안 상온에서 침적시킨 후 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었으며, 일부를 에틸아세테이트로 3회 분획한 후 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획 파우더를 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 분획 파우더의 일부를 산 가수분해를 이용한 당 제거반응을 통하여 아글리콘 분획을 얻었다. 아글리콘 분획 제조는 다음과 같이 이루어졌다. 먼저 H₂SO₄와 아세톤을 혼합한 용액에 에틸아세테이트 분획 파우더 일정량을 첨가한 후 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류시켰다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정 후 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거하였다. 이 용액을 다시 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 아글리콘 분획 파우더를 제조하였고 이를 실험에 사용하였으며 제조 과정은 Figure 1에 나타내었다.

2.4. 풍선덩굴 잎 추출물의 항산화 효능 측정

2.4.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거능 측정은 시료 내의 항산화 물질과 자유 라디칼인 DPPH 시약이 반응하여 시료의 항산화 작용에 의한 자유 라디칼 소거능에 따라 보라색이 노란색으로 변하는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가한 후 측정할 시료 1 mL를 첨가하여 섞어준 뒤 10분간 상온 방치시켰다. 그 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료가 포함되지 않은 용매를 첨가한 것으로, 이때 DPPH 라디칼은 최대 흡광도를 나타낸다. 실험군(experiment)은 시료를 첨가한 것으로, 시료에 의해 DPPH가 환원될 경우 517 nm에서의 흡광도가 감소하게 된다. 시료 바탕실험군(sample blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료만을 첨가한 것으로, 시료자체의 흡광도를 나타낸다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(자유 라디칼 소거활성, FSC₅₀, μg/mL)로 표기하였으며, 각각의 흡광도(A)로부터 다음

식(1)에 의해 DPPH 라디칼 소거활성(%)을 구하였다.

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

2.4.2. 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획을 넣는다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L를 가한 후 35 mM 루미놀 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 반응 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O대신 증류수를 첨가하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기(counts per minute, CPM)가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μ g/mL)로 표기하였으며 다음 식(2)에 의해 ROS 소거활성(%)을 구하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left(\frac{\text{CPM}_{\text{control}} - \text{CPM}_{\text{experiment}}}{\text{CPM}_{\text{control}} - \text{CPM}_{\text{blank}}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

2.5. Photohemolysis법을 이용한 세포보호효과 측정

2.5.1. 적혈구 현탁액 제조

본 실험에서 사용된 적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었으며, 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 혈액을 넣고, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, 9.6 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.6 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O)로 3회 세척하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, OD) 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.5.2. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획물의 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣고, 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 파라필름으로 시험관의 입구를 봉한 뒤 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 5 cm 거리에 평행이 되도록 배열한 후 15 min 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 수행하였다. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간(τ_{50})을 구하여 비교 평가하였다.

2.6. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획물의 성분 분석

2.6.1. TLC 및 HPLC를 이용한 성분 분석

풍선덩굴 잎 추출물의 성분 분석을 위해 풍선덩굴 잎 추출물 에틸아세테이트 분획을 사용하였다. 에틸아세테이트 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과시키고 그 여액으로 TLC 및 HPLC 분석을 진행하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 상대적으로 극성인 물질을 분석하기 위하여 ethyl acetate : chloroform : formic acid : D.W = 8 : 1 : 1 : 1 조건을 사용하였다. 성분 확인은 기존에 알려진 분광학적 자료와 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 NP (natural products, 2-aminoethyl diphenylborinate) 발색법을 이용한 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 용매(phase A)와 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 용매(phase B)를 이용하여 기울기 용리법으로 분석하였고, HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 또한 TLC로 분리된 각각의 띠를 긁은 후 100% 에탄올 추출, 여과한 뒤 감압 농축하였다. 이때 얻어진 시료는 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 μ m)를 이용하여 여과하고 그 여액을 HPLC, LC/ESI-MS 분석에 이용하였다.

Table 1. HPLC Condition for Separation of EtOAc Fractions of *C. halicacabum* Extracts

Condition of HPLC analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 μ m)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254-400 nm			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	20 μ L			
	Program order	Time (min)	Phase A	Phase B
	1	0	80	20
	2	30	70	30
Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution	3	50	50	50
	4	70	50	50
	5	75	45	55
	6	80	45	55
	7	100	70	30

Table 2. Yields of *C. halicacabum* Leaf 50% EtOH Extract and Fractions

	50% EtOH extract	EtOAc fraction	Aglycone fraction
Yields (% , w/w)	16.4	0.9	0.3

2.6.2. LC/ESI-MS를 이용한 성분 분석

분석 기기로 LC기기는 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo, USA) (column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8 μ m, 50 × 2.0 mm Cat.-No. N0520E181UVC), autosampler, PDA-UV detector를 사용하였으며, 질량분석(Mass spectrometric analysis) 기기는 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface (Thermo)를 사용하였다. Injection volume은 5 μ L, flow rate는 200 μ L/min이며 전개용매 조건으로는 0.1% formic acid (in D.W) (A 용매) : 0.1% formic acid (in Acetonitrile) (B용매) = 75 : 25를 사용하였다.

2.7. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean ± S.D.로 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.

3. 결과 및 고찰

3.1. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획물의 수율

건조된 풍선덩굴 잎을 50% 에탄올로 침적 추출하여 여과 및 건조시켜 얻은 50% 에탄올 추출물의 수율은 풍선덩굴 잎 건조 중량의 16.4%였다. 50% 에탄올 추출물로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획의 수율은 추출에 이용한 풍선덩굴 잎의 건조 중량 대비 0.9%였으며, 에틸아세테이트 분획으로부터 산 가수분해를 통해 얻어진 아글리콘 분획의 수율은 0.3%였다(Table 2).

3.2. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획물의 항산화능 측정

3.2.1. DPPH 자유 라디칼 소거능 측정

작을 짓지 않은 홀 전자를 갖고 있는 자유 라디칼은 불안정하고 매우 큰 반응성을 갖는다. 자유 라디칼의 이러한 큰 반응성은 피부뿐만 아니라 생체 구성 성분들에도 손상을 준다. 본 연구에서는 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획의 자유 라디칼 소거활성을 평가하기 위해 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 시료의 전자 주

Table 3. Anti-oxidant Activities of 50% Ethanol Extract and Its Fractions from *C. halicacabum* and Reference

	Free radical scavenging activity (FSC ₅₀ , µg/mL)			ROS scavenging activity (OSC ₅₀ , µg/mL)		
	Mean	±	S.D.	Mean	±	S.D.
50% EtOH extracts	217.6	±	28.3	20.2	±	0.7
EtOAc fraction	92.5	±	16.9	4.6	±	0.1
Aglycone fraction	101.9	±	13.8	4.2	±	0.3
(+)- α -Tocopherol	8.9	±	0.2	-		
L-Ascorbic acid	-			1.5	±	0.9

Data are presented as mean \pm S.D.

-: Data not shown

개 능력을 통한 환원력을 측정하였다. 실험결과, 자유 라디칼이 50% 소거되는 농도인 FSC₅₀은 50% 에탄올 추출물이 217.6 µg/mL, 에틸아세테이트 분획이 92.5 µg/mL, 아글리콘 분획은 101.9 µg/mL를 나타내었으며 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 FSC₅₀은 8.9 µg/mL로 나타났다(Table 3). 에탄올 추출물의 경우 유사한 추출 조건을 가진 이전 연구 결과(EC₅₀ = 198.26 µg/mL)와 비슷한 결과를 보였지만[20] 모든 샘플 군에서 비교물질인 (+)- α -tocopherol보다는 낮은 활성을 보였다. 그중, 에틸아세테이트 분획이 추출물 및 분획 중에서 가장 높은 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 나타내었는데, 이는 수소 주개로서 뛰어난 자유 라디칼 소거능을 보이는 플라보노이드와 그 배당체들이 증가하였기 때문이라고 사료된다.

3.2.2. 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 Fe³⁺와 H₂O₂에 의해 Fenton 반응이 일어난다. 이러한 계에서는 Fenton 반응으로 ¹O₂을 제외한 대부분의 활성산소종(O₂^{•-}, •OH, H₂O₂)이 생성되고 존재한다. 이 계에서 철과 같은 전이금속은 반응성이 매우 큰 •OH를 생성시키는데 중요한 역할을 한다. ROS에 의해 산화된 루미놀은 들뜬 상태의 아미노프탈산으로 전환되며, 다시 바닥상태로 떨어지면서 420-450 nm에서 빛을 방출한다. 항산화제에 의해 ROS가 소거되면 루미놀이 아미노프탈산으로 전환되는 양이 감소하며 따라서 화학발광이 감소하게 된다. 본 실험에서는 풍선덩굴 잎 추출물과 분획 및 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid의 총 항산화능을 루미놀 발광법을 이용하여 측정하였고, 결과를 OSC₅₀으로 나타냈다(Table 3). 실험결과, ROS가 50% 소거되는

농도인 OSC₅₀은 50% 에탄올 추출물이 20.2 µg/mL, 에틸아세테이트 분획이 4.6 µg/mL를 나타내었으며 아글리콘 분획은 4.2 µg/mL를 나타내었다. 또한 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 유사한 총 항산화능을 나타내었으며 대조군인 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)와 비교하여 조금 낮은 활성을 보였다. 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획에서 총 항산화능이 크게 나타난 것은 활성산소 소거활성 뿐만 아니라 Fenton 반응을 유도하는 전이 금속에 대한 킬레이팅 능력이 우수한 활성 물질의 함량이 증가하였기 때문이라고 사료된다.

3.3. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호효과

피부에 자외선이 조사되었을 때 생성되는 ROS 중 singlet oxygen (¹O₂)은 반응성이 매우 큰 활성산소종이며 광증감 반응의 주 생성물이다. ¹O₂과 같은 활성산소종에 의해 세포막의 인지질이 산화되어 지질 과산화 반응이 개시된다. 지질 과산화 반응에 의해서 세포막은 손상되고 세포는 파괴된다. 따라서 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험을 통하여 활성산소에 의한 세포 손상을 방어하는 항산화제의 세포보호효과를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 rose bengal로 유도된 ¹O₂에 의한 세포 손상에 대한 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획의 세포보호효과를 평가하였다.

적혈구 파괴에 대한 세포보호효과를 풍선덩굴 잎 에탄올 추출물 및 분획에 대해 농도별로 비교하여 그래프로 나타내었다(Figure 2). 세포보호효과는 적혈구가 50% 용혈되는 데 걸리는 시간인 τ_{50} 으로 나타내었다. 시료들은 5.0, 10.0 및 25.0 µg/mL의 농도로 실험에 사용되었다. 결과로 50% 에탄올 추출물에서 τ_{50} 은 농도별로 각각 30.1, 28.8 및 31.8 min으로 세포보호효과를

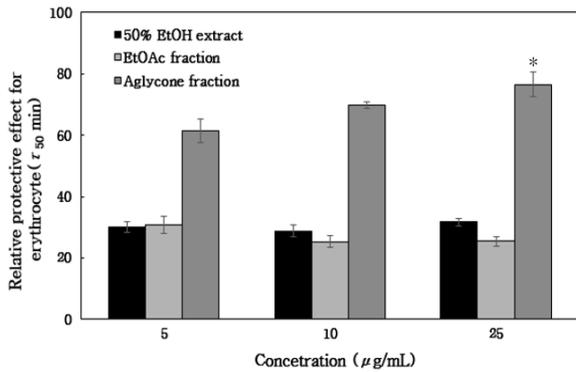


Figure 2. Cellular protective effects of 50% ethanol extract and fractions from *C. halicacabum* on rose bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 36.5 ± 1.8 min). Data are presented as mean ± S.D. **p* < 0.05 compared with concentration of 5 μg/mL in aglycone fraction dose-treated groups.

나타냈으며 에틸아세테이트 분획에서의 τ₅₀은 각각 30.8, 25.3 및 25.4 min으로 농도와 거의 무관하게 약간의 세포보호효과만을 나타내었다. 그러나 아글리콘 분획의 경우 τ₅₀이 각각 61.5, 69.8 및 76.4 min을 나타내어 농도 의존적으로 큰 세포보호효과를 나타내었다. 또한, 아글리콘 분획의 경우 비교적 높은 농도 (25 μg/mL)에서 제일 큰 세포보호효과를 나타내었다 (Figure 2).

가장 큰 세포보호효과를 나타내었던 25.0 μg/mL를 기준으로 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획과 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (40.2 min)의 τ₅₀을 비교하였다(Figure 3). 풍선덩굴 잎 추출물의 아글리콘 분획의 τ₅₀이 76.4 min으로 비교 물질인 (+)-α-tocopherol 보다 1.9배 높은 세포보호효과를 나타내었다. 이러한 결과는 아글리콘 분획의 항산화 활성 성분들이 세포와 친화적인 성질(지용성)을 가지고 있다고 사료되며 풍선덩굴 잎 추출물의 아글리콘 분획이 천연 항산화제로서 화장품에 응용 가능성이 있음을 시사한다.

3.4. 풍선덩굴 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.4.1. 풍선덩굴 잎 추출물의 TLC 성분분석

풍선덩굴 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획이 높은 항산화 활성을 보였다. 따라서 항산화 활성 및 세포보

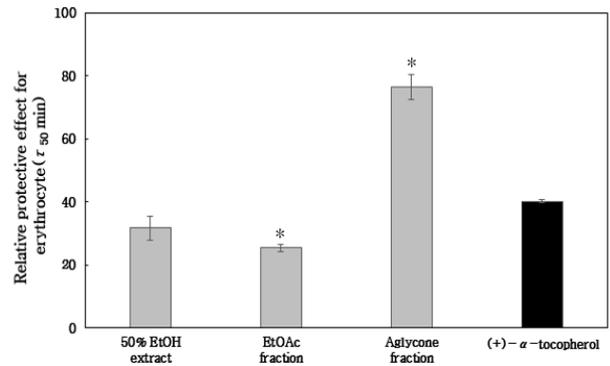


Figure 3. The cellular effects of extract/fractions obtained from *C. halicacabum* and reference at 25.0 μg/mL on the rose bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 36.5 ± 1.8 min). Data are presented as mean ± S.D. **p* < 0.05 compared with (+)-α-tocopherol.

호 효과를 나타내는 유효 성분에 대한 동정이 필요하다고 판단하였다. 풍선덩굴 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 4에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획은 4개의 띠로 분리되었으며, 에틸아세테이트 분획과 다양한 표준물질의 TLC 크로마토그램을 자외선과 NP (natural products, 2-aminoethylidiphenylborinate) 발색시약으로 확인하였다. 그중, 3개 띠 성분을 확인하였으며, 표준물질의 R_f 값과 비교하여 CHE-1은 R_f 값이 0.35로 apigenin-7-o-glucuronide, CHE-2는 R_f 값이 0.43으로 apigenin-7-glucoside, CHE-3은 R_f 값이 0.52로 quercitrin hydrate와 동일한 R_f 값을 가짐을 확인하였다.

3.4.2. 풍선덩굴 잎 추출물의 HPLC 성분분석

풍선덩굴 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램을 Figure 5에 나타내었다. 표준물질의 peak retention time과 UV-Visible 흡수스펙트럼을 비교하여 분석하였다. 에틸아세테이트 분획에서 peak 3은 apigenin-7-O-glucuronide, peak 2는 apigenin-7-glucoside, peak 1은 quercitrin hydrate와 동일한 위치에서 피크가 확인되었으며 이는 TLC 결과와도 일치하였다.

3.5. 풍선덩굴 잎 추출물의 LC/ESI-MS 분석

앞서 진행한 TLC 상에서의 표준물질과의 비교 및 HPLC 분석을 통해 세 가지 물질 모두 페놀성 플라보노이드 성질을 가지고 있는 것으로 예측할 수 있

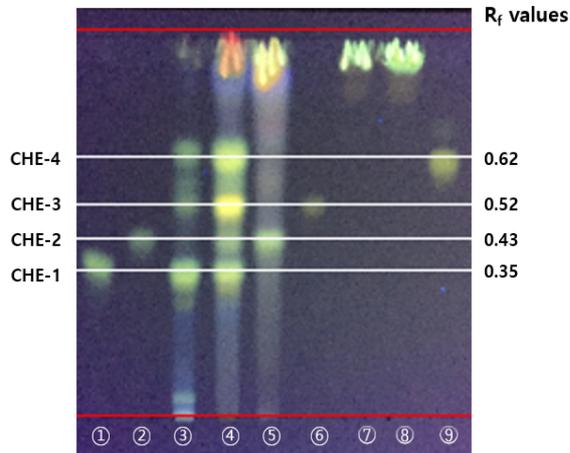


Figure 4. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *C. halicacabum* leaf extract and references. Eluent system : ethyl acetate : chloroform : formic acid : D.W = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), ① apigenin-7-O-glucuronide ② apigenin-7-glucoside ③ 50% ethanol extract ④ ethyl acetate fraction ⑤ aglycone fraction ⑥ quercitrin hydrate ⑦ quercitrin ⑧ quercetin dihydrate ⑨ avicularin

다. Apigenin-7-O-glucuronide로 예측되는 CHE-1, apigenin-7-glucoside로 예측되는 CHE-2, quercitrin hydrate로 예측되는 CHE-3 및 CHE-4의 구조분석을 위해 TLC 띠를 끊어서 추출하여 얻은 물질을 LC/ESI-MS 분석하였다.

3.5.1. CHE-1 (R_f 0.35)의 구조결정

머무름 시간 49.795 min; UV, 268.1, 333.0 nm; MS, 447.3 [M+H]⁺, 445.5 [M-H]⁻. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, apigenin-7-O-glucuronide로 예상되는 CHE-1의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS를 이용하였다. 그 결과, positive ion 모드에서 분자이온 [M+H]⁺이 m/z 447.3에서 나타났으며 negative ion 모드에서 분자이온 [M-H]⁻이 m/z 445.5에서 나타났다(Figure 6). MS 결과에 따라 풍선덩굴 잎 추출물의 CHE-1을 apigenin-7-O-glucuronide로 동정하였다[17-18].

3.5.2. CHE-2 (R_f 0.43)의 구조결정

머무름 시간 45.082 min; UV, 269.0, 330.9 nm; MS, 433.3 [M+H]⁺, 431.5 [M-H]⁻. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, apigenin-7-glucoside로 예상되는 CHE-2의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS를 이용하였다.

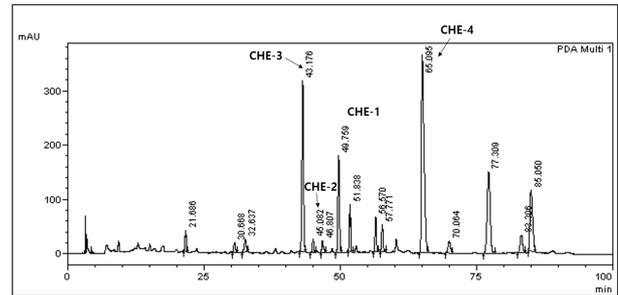


Figure 5. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *C. halicacabum* leaf extract (5,000 µg/mL) at λ = 254-400 nm. CHE-3 : apigenin-7-O-glucuronide, CHE-2 : apigenin-7-glucoside, CHE-1 : quercitrin hydrate

그 결과, positive ion 모드에서 [M+H]⁺이 m/z 433.3에서 나타났으며 negative ion 모드에서 [M-H]⁻이 m/z 431.5에서 나타났다(Figure 7). MS 결과에 따라 풍선덩굴 잎 추출물의 CHE-2를 apigenin-7-glucoside로 동정하였다[19].

3.5.3. CHE-3 (R_f 0.52)의 구조결정

머무름 시간 43.176 min; UV, 257.0, 347.0 nm; MS, 449.1 [M+H]⁺, 447.6 [M-H]⁻. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, quercitrin hydrate로 예상되는 CHE-3의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS를 이용하였다. 그 결과, positive ion 모드에서 [M+H]⁺이 m/z 449.1에서 나타났으며 negative ion 모드에서 [M-H]⁻이 m/z 447.6에서 나타났다(Figure 8). MS 결과에 따라 풍선덩굴 잎 추출물의 CHE-3를 quercitrin hydrate로 동정하였다[22].

3.5.4. CHE-4 (R_f 0.62)의 구조결정

머무름 시간 65.095 min; UV, 266.0, 338.0 nm; MS, 489.3 [M+H]⁺, 487.6 [M-H]⁻. 풍선덩굴 잎 추출물의 주요 성분인 CHE-4의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS 및 MS/MS를 이용하였다. MS 결과, positive ion 모드에서 [M+H]⁺이 m/z 489.3에서 나타났고 negative ion 모드에서 [M-H]⁻이 m/z 487.6에서 나타났다(Figure 9). MS/MS 결과는 Figure 10에 나타내었으며, [M+H]⁺이 m/z 271.1에서 나타나 apigenin의 분광학적 데이터와 일치함을 보였다[23]. 이를 통해 풍선덩굴 잎 추출물의 CHE-4는 apigenin 배당체로 추정되었다. 하지만 보다 정확한 구조 동정을 위해서는 추가 연구가 필요하다.

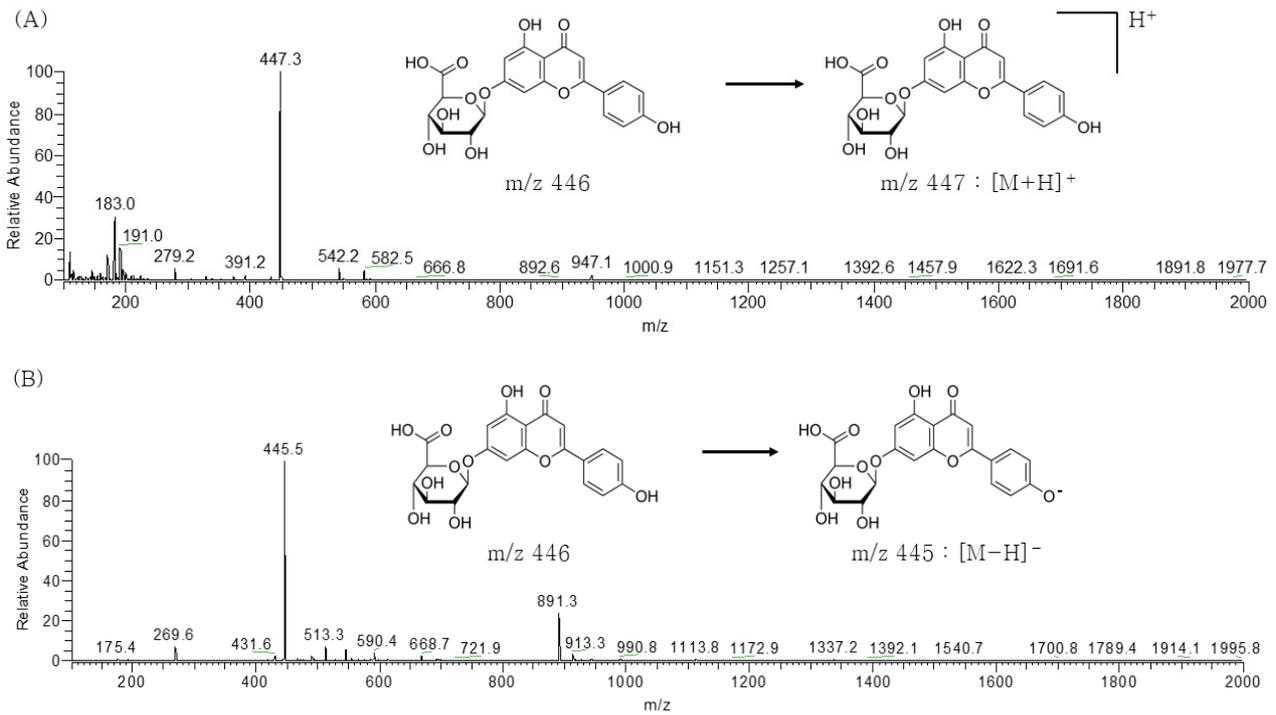


Figure 6. Mass spectra of CHE-1 (HPLC peak 3) in positive ion mode (A) and negative ion mode (B) (LC/ESI-MS).

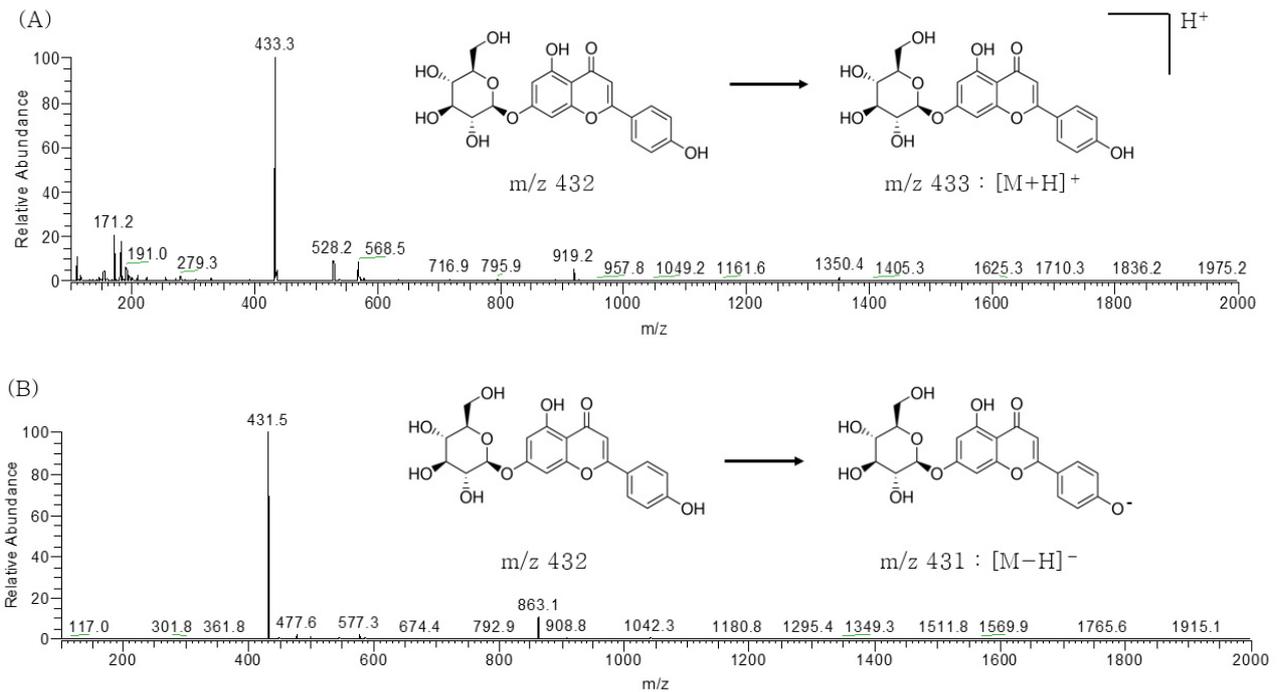


Figure 7. Mass spectra of CHE-2 (HPLC peak 2) in positive ion mode (A) and negative ion mode (B) (LC/ESI-MS).

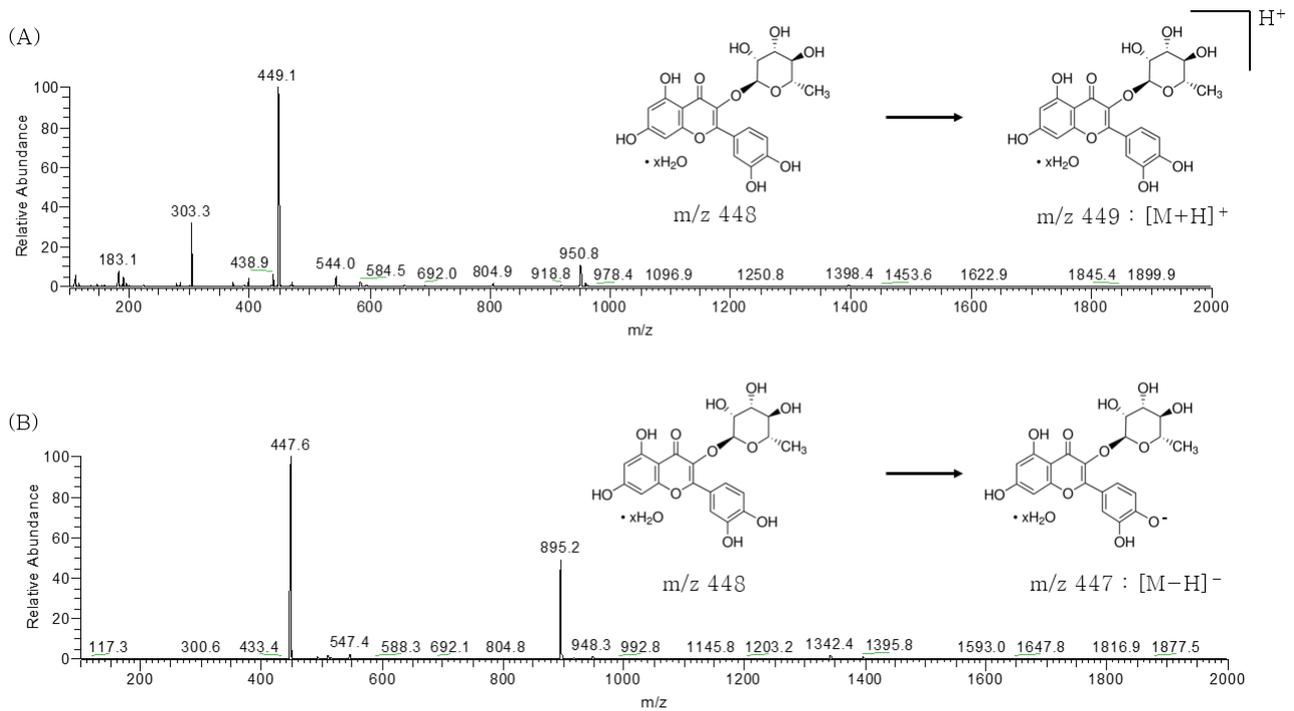


Figure 8. Mass spectra of CHE-3 (HPLC peak 1) in positive ion mode (A) and negative ion mode (B) (LC/ESI-MS).

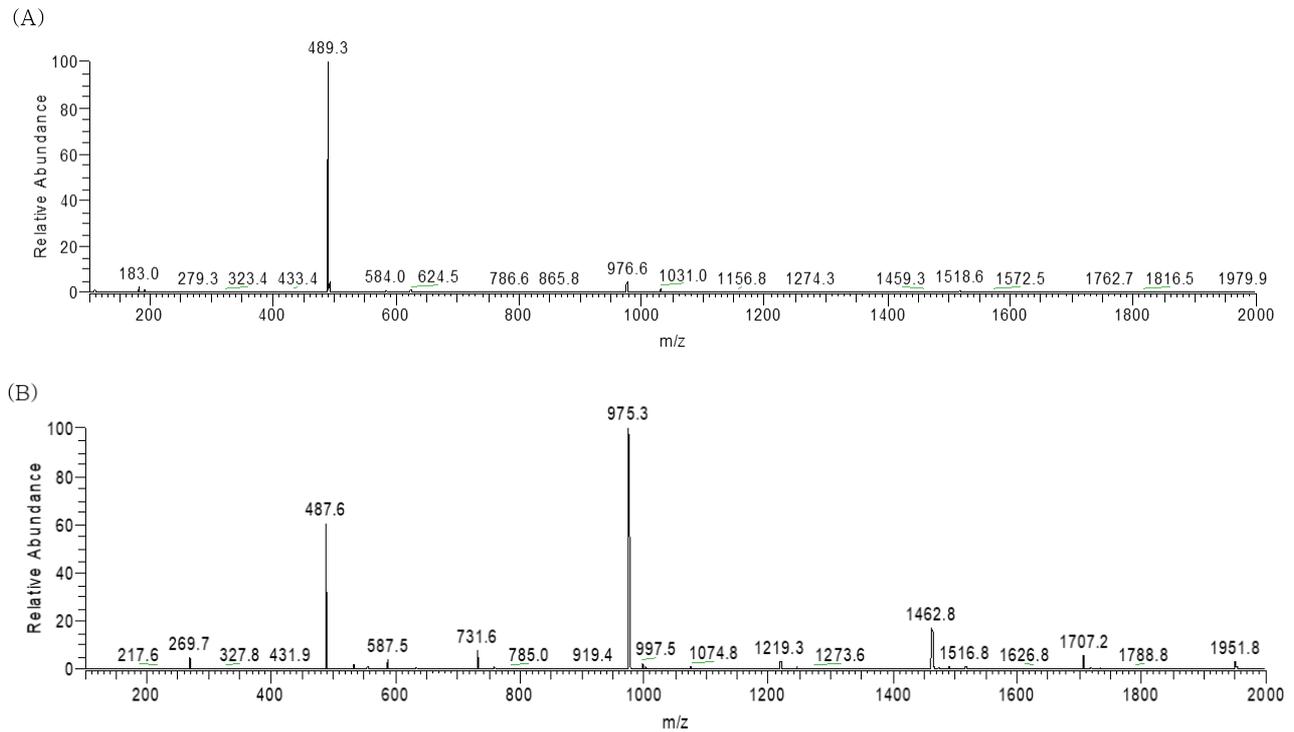


Figure 9. Mass spectra of CHE-4 (HPLC peak 4) in positive ion mode (A) and negative ion mode (B) (LC/ESI-MS).

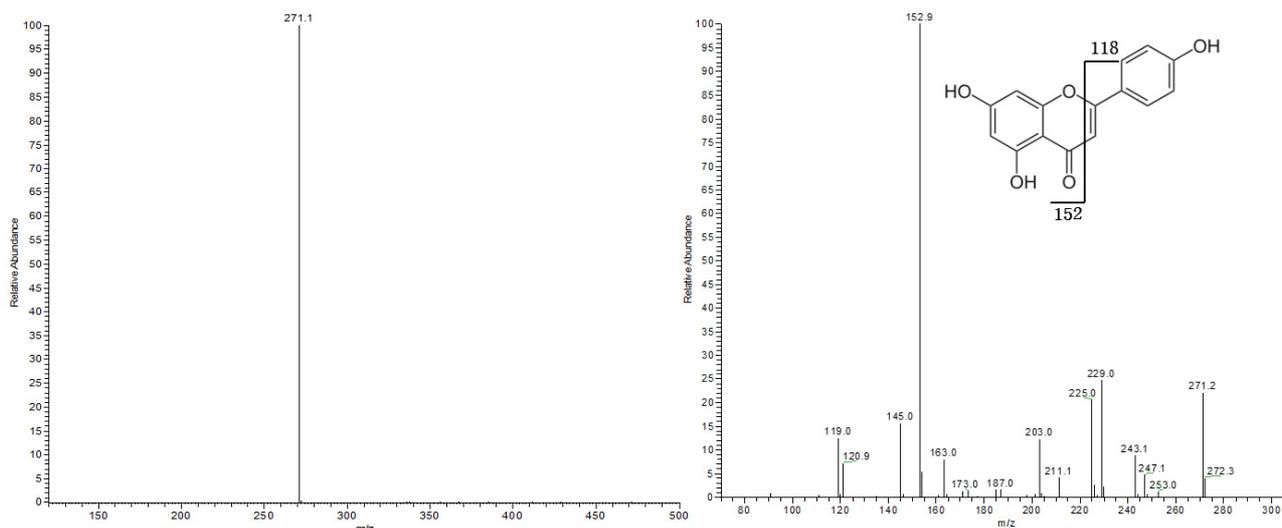


Figure 10. Mass spectra of CHE-4 (HPLC peak 4) in positive ion mode (LC/ESI-MS/MS).

4. 결 론

1) 풍선덩굴 잎 추출물의 자유라디칼 소거활성 (FSC₅₀) 측정 결과, (+)- α -tocopherol (8.9 $\mu\text{g/mL}$) > 에틸아세테이트 분획(92.5 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획(101.9 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물(217.6 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다. 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획은 비교 물질인 (+)- α -tocopherol 보다 낮은 자유라디칼 소거활성을 보였다.

2) 풍선덩굴 잎 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 L-ascorbic acid (1.5 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획(4.2 $\mu\text{g/mL}$) > 에틸아세테이트 분획(4.6 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물(20.2 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났으며 아글리콘 분획 및 에틸아세테이트 분획은 대조군인 L-ascorbic acid와 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 풍선덩굴 잎 추출물 및 분획의 항산화제로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

3) 풍선덩굴 잎 추출물의 ¹O₂로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과 실험에서 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 농도에 따른 차이 없이 대조군과 유사한 세포보호효과를 보인 반면, 아글리콘 분획만 농도 의존적인 세포보호효과를 나타내었다. 또한 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 기준으로 아글리콘 분획의 τ_{50} 은 76.4 min으로 풍선덩굴 잎 추출물의 아글리콘 분획이 비교 물질인 (+)- α -tocopherol (40.2 min)보다 높은 세포보호

활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

4) 자유 라디칼 소거 활성에 대한 효과는 에틸아세테이트 분획이 우수한 활성을 나타내었고 활성산소 소거활성에 대한 효과는 아글리콘 분획과 에틸아세테이트 분획이 유사한 효과를 나타내었으며 ¹O₂로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과는 아글리콘 분획이 우수한 효과를 나타내었다. 이를 통해 풍선덩굴 잎 추출물 중 에틸아세테이트를 이용하여 유효성분을 정제한 분획이 우수한 항산화 활성 및 세포보호효과를 나타내는 유효성분 추출에 적합한 조건으로 사료된다.

5) 풍선덩굴 잎 에틸아세테이트 분획의 성분 분리, 정제 및 구조분석을 통해 주 성분인 apigenin-7-O-glucuronide, apigenin-7-glucoside, quercitrin hydrate 및 apigenin 배당체를 동정하였고, 이러한 성분들로 인해 항산화 활성 및 세포보호효과를 나타내는 것을 확인하였다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 풍선덩굴 잎 추출물은 항산화 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2017 서울과학기술대학교 교내연구비에 의해 수행되었고 이에 감사드립니다.

Reference

1. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
2. M. Wlaschek, I. Tancheva-Poor, L. Naderi, W. J. Ma, A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol.*, **63**(1-3), 41 (2001).
3. D. Bernhard, C. Moser, A. Backovic, and G. Wick, Cigarette smoke - an aging accelerator, *Exp. Gerontol.*, **42**(3), 160 (2007).
4. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging - an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 610 (1989).
5. A. Perez-Sanchez, E. Barrajon-Catalan, M. Herranz-Lopez, J. Castillo, and V. Micol, Lemon balm extract (*Melissa officinalis* L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model, *J. Dermatol. Sci.*, **84**(2), 169 (2016).
6. A. Svobodova, J. Psotova, and D. Walterova, Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, *Biomed. papers.*, **147**(2) 137 (2003).
7. J. Pincemail and J. Defraigne, Potentiel therapeutique du coenzyme Q10, *J. Cardiol. annee.*, **20**(1), 57 (2008).
8. G. W. Burton, Antioxidant action of carotenoids, *Amer. Inst. Nutr.*, **119**(1), 109 (1989).
9. K. Haila, Ph. D. dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland (1999).
10. C. D. Putnam, A. S. Arvai, Y. Bourne, and J. A. Tainer, Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, *J. Mol. Biol.*, **296**, 295 (2000).
11. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**(7), 933 (1996).
12. R. Yamauchi, Vitamin E: mechanism of its antioxidant activity, *Food Sci. Technol. Int.*, **3**(4), 301 (1997).
13. A. T. Diplock, Antioxidants and free radical scavengers, *New Compr. Biochem.*, **28**, 113 (1994).
14. S. N. Park. Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**(1), 75 (1997).
15. R. Jeyadevi, T. Sivasudha, A. Rameshkumar, and L. Dinesh Kumar, Anti-arthritis activity of the Indian leafy vegetable *Cardiospermum halicacabum* in Wistar rats and UPLC-QTOF-MS/MS identification of the putative active phenolic components, *Inflamma. Res.*, **62**(1), 115 (2013).
16. C. Hui-Ling, Z. Li-Jie, L. Yu-Han, H. Ya-Wen, L. I-Jung, L. Chia-Ching, H. Syh-Yuan, and K. Yao-Haur, Antiinflammatory and antioxidant flavonoids and phenols from *Cardiospermum halicacabum*, *J. tradit. complement. med.*, **3**(1), 33 (2013).
17. R. Jeyadevi, T. Sivasudha, A. Ilavarasi, and N. Thajuddin, Chemical constituents and antimicrobial activity of indian green leafy vegetable *Cardiospermum halicacabum*, *Indian J. Microbiol.*, **53**(2), 208 (2013).
18. M. Viji and S. Murugesan, Phytochemical analysis and antibacterial activity of medicinal plant *Cardiospermum Halicacabum* Linn, *J. Phytol.*, **2**(1), 68 (2010).
19. A. Plazonić, F. Bucar, Ž. Maleš, A. Mornar, B. Nigović, and N. Kujundžić, Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules.*, **14**(7), 2466 (2009).
20. M. Huang, S. Huang, B. Wang, C. Wud, M. Sheud, W. Houe, S. Lin, and G. Huang, Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo, *J. Ethnopharmacology.*, **133**(2), 743 (2011).
21. F. L. Silva, P. R. H. Moreno, R. B. Filho, J. F. Tavares, and J. M. B. Filho, Chemical constituents of

- Cardiospermum corindum* L. and their distribution in Sapindaceae, *Biochem. Syst. Ecol.*, **57**, 137 (2014).
22. L. Puigventós, M. Navarro, É. Alechaga, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, and L. Puignou, Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**(2), 597 (2015).
23. R. Avallone, P. Zanoli, G. Puia, M. Kleinschnitz, P. Schreier, and M. Baraldi, Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*, *Biochem. Pharmacol.*, **59**(11), 1387 (2000).