

금전초 추출물 및 분획물의 항산화 활성 및 세포 보호 효과

김아랑 · 정민철* · 정혜인* · 송동기* · 서영빈* · 전영희* · 박소현 · 신혁수 · 이상래 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 나노바이오화학제품연구실, 화장품종합기술연구소, *한성과학고등학교
(2017년 11월 18일 접수, 2017년 12월 2일 심사, 2017년 12월 22일 채택)

Antioxidative and Cellular Protective Effects of *Lysimachia christinae* Hance Extract and Fractions

A Rang Kim, Min Chul Jung*, Hye In Jeong*, Dong Gi Song*, Young Bin Seo*, Young Hee Jeon*,
So Hyun Park, Hyuk Soo Shin, Sang Lae Lee, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobioscience Lab., Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and
Technology, 232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*Hansung Science High School, Seoul 03732, Korea

(Received November 18, 2017; Revised December 2, 2017; Accepted December 22, 2017)

초 록

본 논문에서는 금전초로부터 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 제조하였고 이들의 항산화 활성, 세포 보호 효과 및 성분 분석에 대한 연구를 수행하였다. 항산화능 평가에서 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성(FSC₅₀)은 각각 146.8, 22.2 및 27.2 µg/mL이었고, 총 항산화능(OSC₅₀)은 29.3, 2.9 및 4.5 µg/mL이었다. 에틸아세테이트 분획의 자유라디칼 소거 활성 및 총 항산화능이 가장 크게 나타났다. 또한 ¹O₂로 유도된 적혈구 광용혈에 대한 세포 보호 효과(τ₅₀)는 금전초 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획 5 µg/mL에서 각각 26.9, 57.5 및 103.9 min을 나타냈다. 특히 아글리콘 분획물의 τ₅₀은 (+)-α-tocopherol (37.7 min)보다 훨씬 큰 세포 보호 효과를 나타내었다. UVB로 유도된 세포 손상에서 에틸아세테이트 분획물은 최대 90.1%까지 세포 생존율을 증가시켰다. 과산화수소로 유도된 세포 손상에서도 에틸아세테이트 분획물은 5-25 µg/mL에서 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 금전초 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석을 위해 TLC, HPLC, UV-vis spectrum, LC-MS로 분석한 결과, quercetin, kaempferol 및 그 배당체가 주성분들로 확인되었다. 결론적으로 금전초가 자외선에 노출된 피부를 보호하는 항산화제로서 작용할 수 있고, 기능성 화장품 원료로 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract

In the present study, we investigated the antioxidative properties, cellular protective effects and component analyses of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from *Lysimachia christinae* Hance (*L. christinae* Hance). In the evaluation of antioxidative properties, the free radical scavenging activities (FSC₅₀) of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction were 146.8, 22.2 and 27.2 µg/mL, respectively and total antioxidant capacities (OSC₅₀) were 29.3, 2.9 and 4.5 µg/mL, respectively. The ethyl acetate fraction showed the highest free radical scavenging activity and total antioxidant capacity. Also, the cellular protective effects (τ₅₀) of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction on ¹O₂ induced photohemolysis of human erythrocytes were 26.9, 57.5 and 103.9 min at 5 µg/mL, respectively. In particular, τ₅₀ of the aglycone fraction exhibited a higher cellular protective effect than that of (+)-α-tocopherol (37.7 min). The cell viability of the ethyl acetate fraction on the UVB-induced cell damage increased up to 90.1%. In addition, the ethyl acetate fraction (5-25 µg/mL) showed cellular protective effects on the H₂O₂-induced cell damages in a dose-dependent manner. TLC, HPLC, UV-vis spectroscopy and LC-MS were used to analyse components of the ethyl acetate fraction and the main components were quercetin, kaempferol and their glycosides. In conclusion, *L. christinae* Hance extract/fraction can function as antioxidants to protect the skin exposed to UV radiation and may also be used as a novel functional cosmetic material, for example, an antioxidant against skin photoaging.

Keywords: *Lysimachia christinae* Hance, reactive oxygen species, antioxidant, component analysis, cellular protective effect

[†] Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology,
Department of Fine Chemistry, Nanobioscience Lab., Cosmetic R&D Center,
232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

1. 서 론

피부는 자외선이나 공해와 같은 해로운 외부 환경으로부터 신체를 보호하는 중요한 역할을 담당하는 동시에 외부의 산화적 스트레스에 쉽게 노출될 수도 있다[1,2]. 피부에서 자외선은 광증감반응으로 sin-

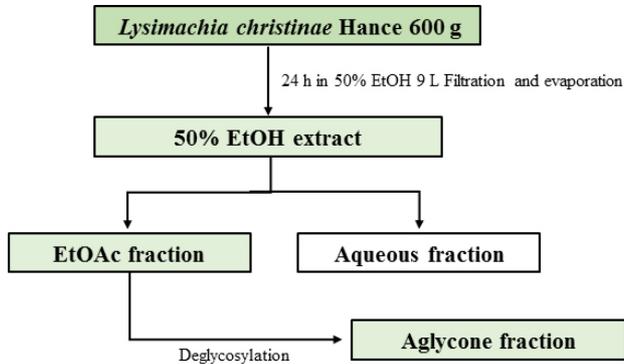


Figure 1. Fractionation scheme of *L. christinae* Hance 50% EtOH extract and fractions.

plet oxygen ($^1\text{O}_2$)을 비롯한 superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$)과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시킨다. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 는 superoxide dismutase (SOD)에 의해 과산화수소(H_2O_2)로 전환되며, H_2O_2 는 펜톤(Fenton) 반응을 거쳐 히드록실 라디칼($\cdot\text{OH}$)로 전환된다. 이러한 다양한 종류의 ROS가 자외선에 의한 생체 내 반응으로 생성될 수 있다[3-7]. ROS는 자외선 외에도 흡연, 공해 및 약물 대사 과정에서도 생성된다. 과잉으로 생성된 ROS는 단백질 산화, DNA 손상 및 지질 과산화 반응을 개시시키며 진피 층의 기질 성분인 콜라겐, 엘라스틴 섬유질을 분해시키는 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 촉진시킬 수 있다[8,9]. 결합 조직 분자와 기저막 단백질을 표적으로 하는 MMPs의 작용으로 피부 탄력감소나 주름 생성 등의 피부노화가 가속화된다. 이러한 산화적 스트레스로부터 피부를 보호하기 위하여 피부에는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소[10]와 비타민 C, E 및 글루타치온 등의 비효소적 항산화제[11]로 구성된 항산화 방어망이 구축되어 있다. 그러나 지속적인 자외선 노출에 의하여 생성된 과잉의 ROS는 이러한 항산화 방어망을 붕괴시킴으로써 피부노화를 더욱 가속화시킨다[9]. 따라서 피부에서 생성되는 과잉의 ROS의 생성을 억제하거나 생성된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있는 피부 항산화 방어망 구축과 이를 통한 산화적 손상으로부터 세포를 보호할 수 있는 항산화제 개발은 매우 중요하며 여전히 관심의 대상이 되고 있다[12,13]. 화장품에 사용되는 천연 항산화제는 주로 식물 추출물의 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물들이 주성분이다[14]. 이러한 플라보노이드는 대부분 배당체 형태로 존재하며 중간 극성을 갖는 용매인 에탄올이나 에틸아세테이트에 의해 추출이 잘 된다. 따라서 본 논문에서는 금전초 추출물로부터 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획물을 제조하고 이들의 항산화 활성을 평가하고 성분 분석을 수행하였다.

금전초는 긴병꽃풀이라 불리는 꿀풀과의 *Glechoma longituba* Kupr와 과로황이라 불리는 영초과의 *L. christinae* Hance 두 가지 종이 있다. 영초과 금전초의 생약명은 *Lysimachiae Herba*이며 중국 약전에는 “Jinqiancao”로 기록되어 있다. 전 세계적으로 온대 기후에서 분포하며 중국 남서부와 Yangzi강 유역에 주로 분포되어 있다[15]. 금전초는 일반적으로 담석증, 요로 결석 제거, 담낭염, 황달 등의 한방 치료제로 사용된다고 알려져 있다[16,17]. 현재까지 금전초로부터 분리한 6-tridecyl resorcylic acid, grevillol의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성 억제 작용이 보고되고 있으며[18], 메탄올 추출물과 분획물의 간독성 해독작용[19], 콜레스테롤 담석증 감소[17], 항염증제[20], 담즙 배출 촉진작용[21], 이뇨제(diuretics)[22], 산화방지제[23], 진통제(analgesic)[20] 등의 다

양한 생리활성에 관한 연구들이 있다. 또한 금전초의 주요 성분들은 myricetin, kaempferol 및 quercetin의 배당체들이 보고되어 있다 [15,22,24]. 하지만 화장품에서 금전초 추출물이나 특정 분획을 대상으로 다양한 ROS가 생성되는 $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서의 총 항산화능 측정에 관한 연구나 세포 보호 효과에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 금전초 추출물과 분획물을 이용하여 항산화 및 세포 보호 효과를 확인하고 성분 분석을 통해 활성 성분을 밝힘으로써 기능성 화장품의 항산화 소재로서의 가능성이 있는지를 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

DPPH 실험에서 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50를 사용하였으며, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를 사용하였다. 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품이며, pH 미터는 Mettler-Toledo Ltd. (Korea) 제품을 사용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), luminol, heparin, H_2O_2 , 증감제로 사용된 rose-bengal, 표준 물질로 사용한 항산화제 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E)과 L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였다. 완충 용액 제조에 사용된 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, H_2SO_4 그리고 에탄올(EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 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 (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명과학 공동기원에 분석 의뢰하였다. MTT 실험에서 사용되는 ELISA reader는 Tecan (Austria)사의 제품을 사용하였다. 본 연구에 사용한 금전초는 영초과에 속하며 2017년 5월경 경동시장에서 구입하였다.

2.2. 금전초의 추출 및 분획

건조된 금전초 600 g에 50% 에탄올 9 L를 이용하여 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 농축하여 50% 에탄올 추출물을 얻었으며, 일부를 에틸아세테이트로 3회 반복 처리한 분획을 감압 농축하여 건조된 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 에틸아세테이트 분획 중 일부를 산 가수분해 반응을 이용해 당을 제거시킨 후 아글리콘 분획물을 얻었다. 아글리콘 제조는 에틸아세테이트 분획 파우더 0.1 g에 H_2SO_4 와 아세톤을 혼합한 용액(10 mL)을 첨가한 후 4 h 동안 증탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한 후 산, 염기 및 당 등을 모두 제거하기 위해 증류수로 세척하였다. 이 용액을 다시 에틸아세테이트로 분획하고 이를 감압·농축하여 제조된 아글리콘 분획물을 실험에 사용하였다(Figure 1).

2.3. 금전초 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

금전초 추출물 및 분획물의 free radical 소거 활성을 평가하기 위해 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 시료의 환원력을 측정하였다. 먼저, 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 0.3 mL에 에탄올 0.3

mL를 첨가한 후 금전초 추출물 0.3 mL를 농도별로 첨가하여 섞는다. 실온에서 10 min 동안 방치한 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료가 포함되지 않은 용매를 첨가한 것으로, DPPH의 최대 흡광도를 나타낸다. 실험군(experiment)은 시료를 첨가한 것으로, 시료에 의해 DPPH 라디칼 소거활성이 나타날 경우 517 nm에서의 흡광도가 감소하게 된다. 시료 바탕 실험군(sample blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료만을 첨가한 것으로, 시료 자체의 흡광도를 나타낸다. 이들 각각의 흡광도(A)로부터 아래 식에 의거해서 DPPH 라디칼 소거율(%)을 나타내었다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는 데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

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

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거활성(총 항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 Fenton 반응을 주반응으로 다양한 종류의 ROS (O₂^{·-}, ·OH 및 H₂O₂)를 생성시킨다. 이들 ROS와 luminol이 반응하면 들뜬 상태의 luminol이 되고 이어 화학발광(chemiluminescence)이 나타난다. 이러한 화학발광은 시료의 항산화능이나 ROS 생성을 억제하는 킬레이트 능력에 의해 감소된다. 이를 총항산화능이라고 말한다.

실험 방법은 먼저, 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 금전초 추출물과 2.5 mM EDTA 40 µL, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 µL, 35 mM luminol 80 µL를 첨가하여 섞은 후 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고, 5 min 동안 37 °C에서 항온시켰다. 그 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였으며, 대조군(control)은 시료 용액 대신 증류수를 첨가한 것으로 하여, 다음 식에 의해 활성산소 소거율(%)을 구하였다. 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기(counts per minute, cpm)가 50% 감소하는 데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

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

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 분산액 제조

적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었고, 채혈 즉시 혈액을 heparin이 첨가된 시험관에 넣었다. 혈액 1.2 mL를 취해 튜브에 넣고 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3회 세척하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, O. D.) 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 금전초 추출물 및 분획의 광용혈 억제 효과

1.5 × 10⁷ cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣고, 금전초 추출물 및 분획을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (15 µM) 0.5 mL를 첨가하고 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 동안 수행하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하여 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 수행하였다. 금전초 추출물 및 분획이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간(τ₅₀)을 구하여 비교 평가하였다.

2.5. 금전초 추출물 및 분획물의 HaCaT 세포 독성 평가

금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물이 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT 방법으로 확인하여 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 실험 방법은 HaCaT 각질형성세포를 96-well plate에 접종한 후 37 °C 세포배양기에서 70-80% confluency 수준으로 배양하였다. 금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물을 농도별로 세포에 24 h 처리한 후, 0.5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 첨가하여 1 h 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 세포 생존율을 구하였다.

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

2.6. UVB로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 측정

세포 배양기에서 70-80% confluency 수준으로 배양된 HaCaT 세포를 PBS 상태에서 250 mJ/cm² UVB를 조사하여 세포 손상을 유도하였다. PBS로 2번 세척한 후, 농도별로 금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물을 처리한 다음 37 °C 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인하여 UVB로 유도된 세포손상에 대한 금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물들의 세포 보호 효과를 확인하였다.

2.7. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 측정

HaCaT 세포를 1 × 10⁴ cells/well로 96-well plate에 분주하고 24 h 동안 37 °C, 5% CO₂조건으로 incubator에서 배양하였다. 24 h incubation 후, 배지를 모두 제거하고 PBS 100 µL로 1회 세척하였다. PBS를 모두 제거 후, 과산화수소 1 mM 농도(in PBS)로 30 min 처리하였다. 과산화수소를 모두 제거 후, PBS 100 µL로 2회 세척하였다. 세척 후, 1% P/S (penicillin/streptomycin)를 함유한 DMEM 배지에 금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물을 농도별로 희석하여 처리한 후, 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 24 h 배양하였다. 24 h 항온배양 후, MTT assay로 세포 생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 금전초 50% 에탄올 추출물과 분획물들의 세포 보호 효과를 확인하였다.

Table 1. TLC Mobile Phase for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *L. christinae* Hance

| Eluent system | |
|------------------------|--|
| Ethyl acetate fraction | ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v) |
| Aglycone fraction | hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v) |

Table 2. HPLC Condition for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *L. christinae* Hance

| Condition of HPLC analysis | |
|----------------------------|---|
| Column | Shim-pack VP-ODS C18 column |
| Detector | UVD 170s DIONEX |
| Mobile phase | A : 2% acetic acid in water, B : 0.5% acetic acid in 50% acetonitrile |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Injection volume | 20 µL |
| Gradient elution | 0-10.0 min, 0% (v/v) of B; 10.0-140.0 min, 0-50% (v/v) of B; 140.0-180.0 min, 50-70% (v/v) of B; 180.0-190.0 min, 70% (v/v) of B; and 190.0-195.0 min, 70-0% (v/v) of B |

Table 3. Yields of *L. christinae* Hance Extract and Fractions

| | 50% EtOH extract | EtOAc fraction | Aglycone fraction |
|----------------|------------------|----------------|-------------------|
| Yields (% g/g) | 13.6 | 0.3 | 0.1 |

2.8. TLC 및 HPLC를 이용한 금전초 분획물의 플라보노이드 분석

금전초 추출물 중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 µm)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC 및 비극성 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타나 있었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료와 플라보노이드 표준 물질의 R_f 값과 자외선 및 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.

2.9. LC/ESI-MS를 이용한 금전초 분획물의 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)를 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 (arbitraryunits), collisiongas (N₂) 그리고 ion source temperature는 400 °C에서 행하였다.

2.10. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 3회 반복하였고 통계자료의 값은 mean ± SD로 표시하였다. 통계분석은 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. 금전초 추출물 및 분획물의 수율

건조된 금전초를 50% 에탄올로 추출하여 여과 및 건조시켜 얻은 50% 에탄올 추출물의 수율은 금전초 건조 중량의 13.6%이었다. 50% 에탄올 추출물로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획의 수율은 추출에 이용한 금전초의 건조 중량 대비 0.3%이었으며, 에틸아세테이트 분획으로부터 산 가수분해 반응을 통해 얻어진 아글리콘 분획의 수율은 금전초의 건조 중량 대비 0.1%로 얻어졌다(Table 3).

3.2. 금전초 추출물 및 분획의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

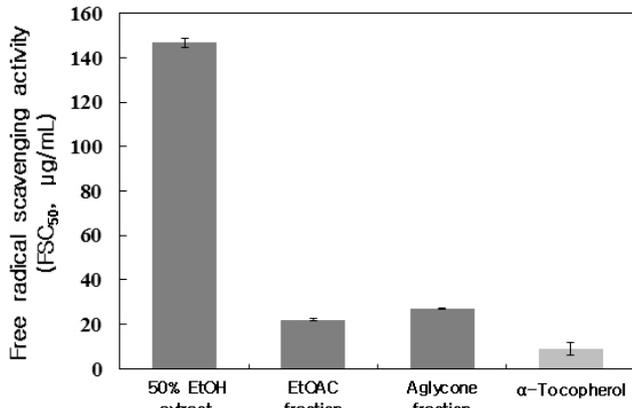
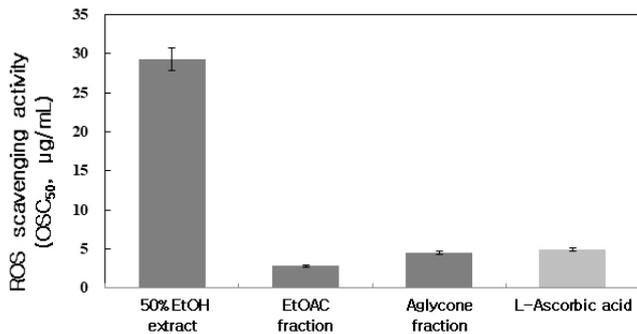
자외선 노출과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포막에서 지질 과산화반응을 개시하고 라디칼 연쇄반응을 통해 세포 및 조직을 손상시킴으로써 노화를 가속화시킨다. 대표적인 항산화제인 (+)-α-tocopherol은 생성된 지질라디칼에 전자를 제공하여 연쇄 반응을 종결시키고 세포막을 보호하게 된다. 따라서 시료의 전자 주개 능력을 측정하여 항산화능을 평가할 수 있다. 금전초 추출물 및 분획물, 대조군인 (+)-α-tocopherol의 자유 라디칼 소거 활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 2에 나타내었다. 실험 결과, 50% 에탄올 추출물의 FSC₅₀은 146.8 µg/mL, 아글리콘 분획 27.2 µg/mL, 에틸아세테이트 분획 22.2 µg/mL 순으로 자유 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 그중 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 자유 라디칼 소거 활성은 대표적인 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (FSC₅₀ = 9.0 µg/mL) 보다는 약간 작았지만 상당한 수준의 라디칼 소거 활성이 있음을 나타내었다.

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

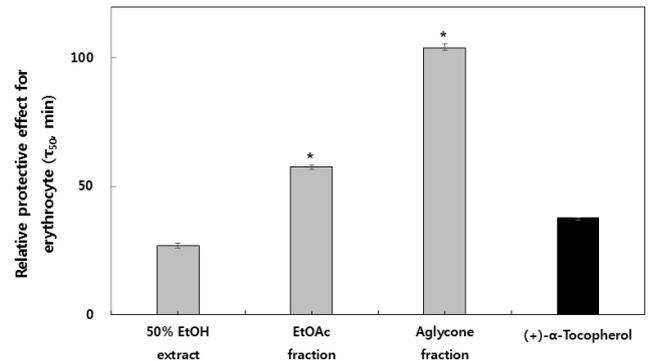
Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 H₂O₂와 Fe²⁺에 의해 ·OH을 포함한 다양한 ROS가 생성된다. 루미놀은 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬

Table 4. Cellular Protective Effects of Extract and Fractions from *L. christinae* Hance on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

| Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | τ_{50} (half time of hemolysis)* | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0.5 | 1 | 5 | 10 | 25 | 50 |
| 50% EtOH extract | - | - | 26.9 \pm 0.9 | 34.4 \pm 0.5 | 37.7 \pm 0.1 | 37.5 \pm 1.4 |
| EtOAc fraction | 50.2 \pm 1.3 | 53.5 \pm 0.8 | 57.5 \pm 0.8 | 43.3 \pm 2.6 | 39.4 \pm 1.7 | - |
| Aglycone fraction | 62.3 \pm 1.1 | 69.3 \pm 0.8 | 103.9 \pm 1.5 | 76.2 \pm 2.5 | - | - |

*Control, τ_{50} = 34.1 \pm 1.9 min**Figure 2. Free radical scavenging activities of extract and fractions from *L. christinae* Hance and reference. Data are presented as mean \pm SD.****Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of extract and fractions from *L. christinae* Hance and reference in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as mean \pm SD.**

상태의 아미노프탈산으로 전환되며, 다시 바닥상태로 떨어지면서 발광(420-450 nm)을 한다. 이때, 항산화제에 의해 ROS가 소거되면 루미놀이 아미노프탈산으로 전환되는 양이 감소하여 화학발광이 감소하게 된다. 따라서 루미놀 화학발광법을 이용하여 금전초 추출물 및 분획물의 활성산소 소거활성(총 항산화능)을 비교하였다(Figure 3). 총 항산화능은 OSC₅₀으로 나타내었고, 비교 물질로는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였다. 실험 결과, 금전초 50% 에탄올 추출물의 OSC₅₀은 29.3 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획 2.9 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획은 4.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 에틸아세테이트 분획의 총 항산화능은 추출물 및 분획물 중 가장 크게 나타났으며, 이는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (4.9 $\mu\text{g/mL}$) 보다도 더 큰 항산화능을 나타내었다.

**Figure 4. Cellular protective effects of extract and fractions from *L. christinae* Hance and (+)- α -tocopherol at 5 $\mu\text{g/mL}$ on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. * p < 0.05 compared with (+)- α -tocopherol in 50% ethanol extract and fractions dose-treated group.**

3.2.3. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과

피부에 자외선이 조사되면 피부에 존재하는 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)에 의해 다양한 ROS가 생성된다. 그중 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)은 반응성이 매우 큰 활성산소종으로 광증감반응의 주 생성물이다. $^1\text{O}_2$ 를 포함한 ROS는 피부 항산화 방어막을 붕괴시키고 세포막 구성 성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 반응을 개시한다. 이러한 자동산화반응에 의해 세포막이 손상되고 세포는 파괴된다. 따라서 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험을 통해 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포 손상을 방어하는 항산화제의 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 rose-bengal로 유도된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포 손상에 대하여 금전초 추출물의 세포 보호 효과를 측정하였다.

적혈구 파괴에 대한 금전초 추출물의 세포 보호 효과를 추출물 또는 분획의 농도별로 비교하여 표로 나타내었다(Table 4). 세포 보호 효과는 적혈구가 50% 용혈 되는 데 걸리는 시간인 τ_{50} 으로 나타내었다. 금전초 추출물 및 분획을 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 측정된 결과 금전초 50% 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 τ_{50} 이 26.9, 34.4, 37.7, 37.5 min으로 50 $\mu\text{g/mL}$ 을 제외하고는 농도의존적인 경향을 보였고, 에틸아세테이트 분획은 0.5, 1, 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 τ_{50} 이 50.2, 53.5, 57.5 min이었고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 시료의 독성에 의해 세포 보호 효과가 감소하는 경향을 보였다. 아글리콘 분획은 0.5, 1, 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 62.3, 69.3, 103.9 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 증가하는 경향을 보이다가 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 에틸아세테이트 분획과 마찬가지로 세포 보호 효과가 감소하는 경향을 보였다. 따라서 세포 독성이 나타나지 않고 최대 세포 보호 효과를 갖는 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 세포 보

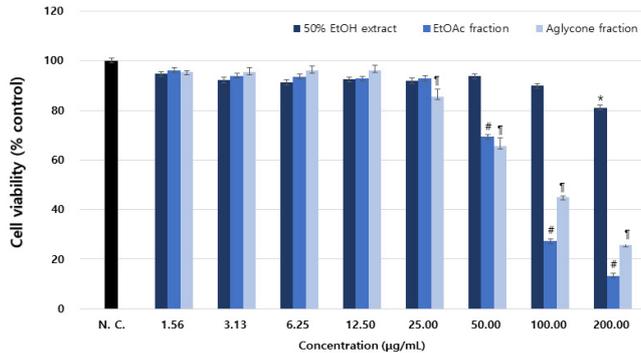


Figure 5. Effects of fractions from *L. christinae* Hance on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by the MTT assay. Data are presented as mean \pm SD. * p < 0.05 compared with untreated control in 50% ethanol extract dose-treated group. # p < 0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated group. $^{\dagger}p$ < 0.05 compared with untreated control in aglycone fraction dose-treated group (N. C. : negative control).

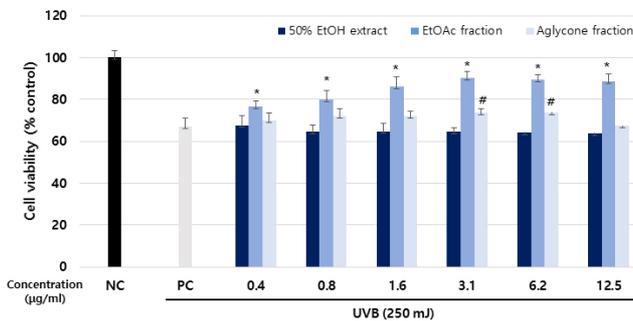


Figure 6. Cell protective effects of 50% ethanol extract/fractions from *L. christinae* Hance on UVB-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of 50% ethanol extract and its fractions from *L. christinae* Hance for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as mean \pm SD. * p < 0.05 compared with untreated control in 50% ethanol extract dose-treated group. # p < 0.05 compared with untreated control in ethyl acetate fraction dose-treated group (NC : negative control, PC : positive control).

호 효과를 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol과 비교한 결과, 50% 에탄올 추출물(26.9 min), (+)- α -tocopherol (37.7 min), 에틸아세테이트 분획(57.5 min), 아글리콘 분획(103.9 min) 순으로 세포 보호 효과가 증가하였으며 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 대조군인 (+)- α -tocopherol보다 큰 세포 보호 효과를 나타내었다(Figure 4). DPPH와 총 항산화능 결과에서는 에틸아세테이트 분획의 항산화 활성이 가장 컸고 적혈구를 대상으로 하는 광용혈 실험에서는 세포 독성이 없는 저농도일 때 아글리콘 분획에서 세포 보호 효과가 가장 크게 나타났다. 하지만 높은 농도의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서는 세포효과를 나타내지 않았고 오히려 세포막이 파괴되는 현상을 나타냈다.

3.3. 금전초 분획물의 세포 보호 효과

3.3.1. 금전초 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가

MTT 방법으로 금전초 추출물 및 분획물의 세포 독성을 확인하여

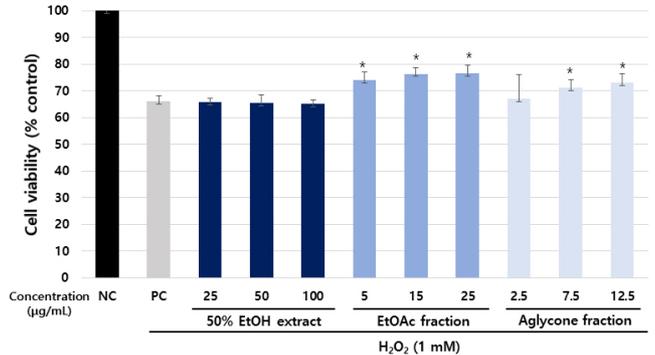


Figure 7. Cell protective effects of 50% ethanol extract/fractions from *L. christinae* Hance on H_2O_2 -induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h before being exposed to oxidative stress. * p < 0.05 compared with untreated control in 50% ethanol extract and fractions dose-treated groups.

실험에 사용될 농도 범위를 확인하였다. 금전초 추출물 및 분획물을 HaCaT 세포에 24 h 동안 처리하고 세포 생존율을 확인한 결과, 50% EtOH 추출물은 100 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획은 25.0 μ g/mL, 아글리콘 분획은 12.5 μ g/mL까지 세포 독성이 나타나지 않았다(Figure 5). 따라서 세포 보호 효과를 측정하기 위한 최고 농도를 12.5 μ g/mL로 설정하였다.

3.3.2. UVB로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

본 연구에서는 금전초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획을 이용하여 UVB로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과가 있는지를 확인하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군에 비하여 67.1%의 세포 생존율을 나타내었다. UVB를 조사한 후, 0.4-12.5 μ g/mL 농도의 50% 에탄올 추출물을 처리했을 때, 세포 생존율은 모든 농도에서 증가되지 않았다. 하지만 에틸아세테이트 분획을 HaCaT 세포에 24 h 처리하였을 때, 세포 생존율은 최대 90.1%까지 현저하게 증가하였다(각각 76.4, 80.0, 86.1, 90.1, 89.4, 88.5%). 0.4-12.5 μ g/mL 농도의 아글리콘 분획을 HaCaT 세포에 24 h 처리하였을 때, 세포 생존율은 최대 73.8%까지 증가하였다(각각 70.2, 71.9, 72.3, 73.6, 73.8, 67.4%). 즉 금전초 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 UVB 조사로 유도된 세포 손상에 대해 보호 효과를 나타냈다(Figure 6).

3.3.3. 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 세포 보호 효과

금전초 50% 에탄올 추출물 및 분획의 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 세포 보호 효과를 Figure 7에 나타내었다. 실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군에 비하여 약 65%의 세포 생존율을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물은 세포 보호 효과가 나타나지 않았으나, 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획을 처리했을 때 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 에틸아세테이트 분획 5-25 μ g/mL 농도에서 세포 생존율은 각각 74.0, 76.3 및 76.6%로 증가하였고, 아글리콘 분획은 2.5-12.5 μ g/mL 농도에서 각각 67.1, 71.1 및 73.0%로 증가하였다. 따라서 금전초 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과를 나타내었다.

Table 5. TLC, HPLC, and LC-MS Data of Ethyl Acetate Fraction from *L. christinae* Hance Extract

| TLC band | HPLC peak No. | Identified compound | Measurement | | | | MW (g/mol) | Ref. |
|----------|---------------|---|----------------------|-----------------------|--|--|------------|---------|
| | | | Retention time (min) | λ_{\max} (nm) | Positive ions (m/z) [M-H] ⁺ | Negative ions (m/z) [M-H] ⁻ | | |
| LCE-1 | 2 | kaempferol 3- <i>O</i> -neohesperidoside (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅) | 98.178 | 265, 345 | 595.2 | 593.8 | 594.52 | [25] |
| LCE-2 | 3 | kaempferol 3- <i>O</i> - β -rutinoside (nicotiflorin, C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅) | 106.323 | 265, 345 | 595.2 | 593.9 | 594.52 | [26] |
| LCE-3 | 4 | kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside (astragalin, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁) | 109.033 | 264, 344 | 449.2 | 447.7 | 448.37 | [27] |
| LCE-4 | 4 | quercetin 3-rhamnoside (quercitrin, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁) | 109.033 | 253, 344 | 449.0 | 447.5 | 448.38 | [25,27] |
| LCE-5 | 5 | kaempferol 3-rhamnoside (afzelin, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀) | 122.906 | 264, 341 | 433.1 | 431.6 | 432.38 | [28] |
| LCE-6 | 1 | <i>p</i> -coumaric acid (C ₉ H ₈ O ₃) | 66.437 | 310 | | 163.0 | 164.16 | [29,30] |
| LCE-7 | 6 | quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇) | 136.137 | 256, 372 | 303.2 | 301.2 | 302.24 | [30] |
| LCE-8 | 7 | kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆) | 158.075 | 266, 366 | 287.3 | 285.4 | 286.23 | [30] |

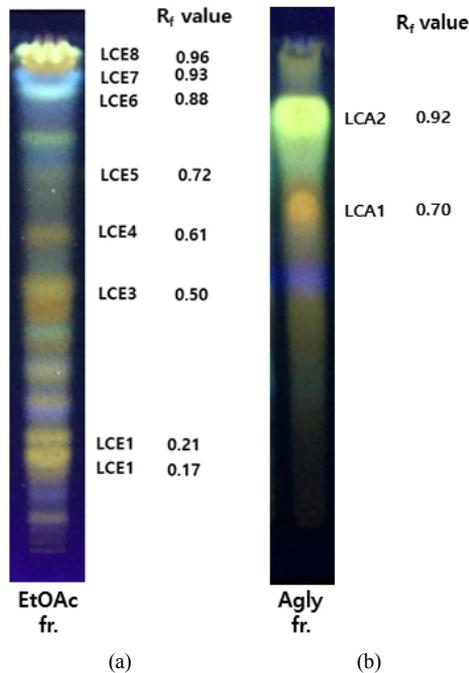


Figure 8. TLC chromatograms of ethyl acetate fraction (a) and aglycone fraction (b) from *L. christinae* Hance extract. (a) Eluent system : ethyl acetate : formic acid : chloroform : D. W. = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), (b) Eluent system : hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v).

3.4. 금전초 분획물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.4.1. 금전초 분획물의 TLC 성분분석

금전초 에틸아세테이트 분획의 성분을 확인하기 위해, TLC 크로마토그램에서 ethyl acetate : formic acid : chloroform : D. W. = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)의 용매조건을 이용하여 분리한 후, 자외선과 2-aminoethyl diphenylbrominate-polyethylene glycol (NP-PEG) 발색으로 확인하였다 (Figure 8a). 또한 에틸아세테이트 분획물의 TLC 분석 때 8개를 추출

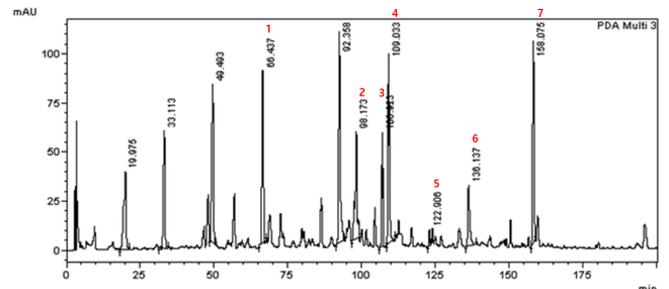


Figure 9. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction of *L. christinae* Hance (3,000 µg/mL) at $\lambda = 254-400$ nm, 1 : LCE-6, 2 : LCE-1, 3 : LCE-2, 4 : LCE-3, 5 : LCE-4, 6 : LCE-5, 7 : LCE-8.

하여 LC/ESI-MS로 분석하였다(Table 5). TLC, UV-vis spectrum, LC/ESI-MS를 이용해 분석한 결과 TLC R_f 0.17인 LCE-1은 [M-H]⁻이 m/z 593.8에서 나타났고, kaempferol 3-*O*-neohesperidoside임을 확인하였다. R_f 0.21인 LCE-2는 [M-H]⁻이 m/z 593.9으로 나타나 kaempferol 3-*O*- β -rutinoside (nicotiflorin)로, R_f 0.50인 LCE-3는 [M-H]⁻이 m/z 447.7, UV λ_{\max} 가 264, 348 nm로 나타나 astragalin으로, R_f 0.61인 LCE-4는 [M-H]⁻이 m/z 447.5, UV λ_{\max} 는 256, 348 nm로 quercitrin으로 확인되었다. R_f 0.72인 LCE-5는 [M-H]⁻이 m/z 431.6로 kaempferol 3-rhamnoside (afzelin), R_f 0.88인 LCE-6은 [M-H]⁻이 m/z 163.0인 coumaric acid로 확인되었으며, R_f 0.93인 LCE-7은 [M-H]⁻이 m/z 301.2인 quercetin, R_f 0.96인 LCE-8은 [M-H]⁻이 m/z 285.4인 kaempferol로 확인되었다(Table 5).

아글리콘 분획의 성분을 확인하기 위해서는 TLC 크로마토그램에서 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)의 용매조건을 이용하였고, TLC, HPLC를 이용해 분석한 결과 quercetin 및 kaempferol을 확인하였다(Figure 8B).

3.4.2. 금전초 분획물의 HPLC 성분분석

금전초 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 9와 같고 확인된 성분들은 주로 quercetin과 kaempferol에 당이 결합된

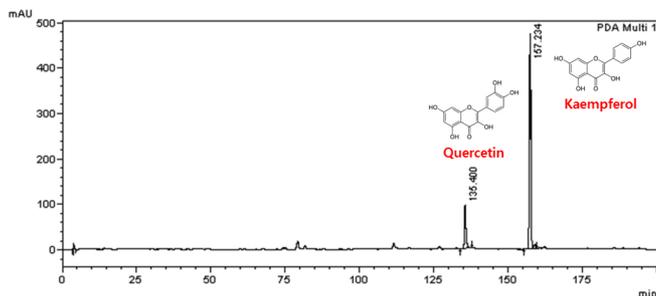


Figure 10. HPLC chromatogram of aglycone fraction of *L. christinae* Hance (3,000 $\mu\text{g/mL}$) at $\lambda = 254\text{-}400$ nm.

배당체나 acid 종류였다. 각 peak에 해당되는 성분은 Table 5에 나타나 있었다. 이처럼 금전초 에틸아세테이트 분획에 뛰어난 항산화 활성으로 알려져 있는 quercetin과 kaempferol 배당체 성분들이 존재하기 때문에 free radical 소거 활성, 총 항산화능 및 세포 보호 효과 실험에서 현저한 항산화 활성 및 세포 보호 효과가 나타난 것으로 사료된다. 당을 제거한 금전초 아글리콘 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 10에 나타내었다. 아글리콘 분획은 $\lambda = 254\text{-}400$ nm에서 2개의 피크를 나타내었고, 이는 에틸아세테이트 분획에 존재하던 quercetin과 kaempferol 배당체들의 당이 제거되어 생긴 quercetin과 kaempferol로 확인되었다.

4. 결 론

1. 금전초 추출물 및 분획의 자유 라디칼 소거능력(FSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물에서 146.8 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획에서 22.2 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획에서 27.2 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 금전초 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (9.0 $\mu\text{g/mL}$)보다는 조금 떨어지지만 상당한 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다.

2. 금전초 추출물 및 분획의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획이 각각 29.2 $\mu\text{g/mL}$, 2.9, 4.5 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다. 에틸아세테이트 분획의 총 항산화능은 추출물 및 분획물 중 가장 높게 나타났으며, 대조군인 L-ascorbic acid (4.9 $\mu\text{g/mL}$)와 비교하였을 때, 높은 항산화능을 나타내었다.

3. ¹O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈 실험에서 금전초 50% 에탄올 추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 까지, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획은 각각 5 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었으나, 그 이상의 농도에서는 세포 보호 효과가 감소하였다. 특히 아글리콘 분획은 5 $\mu\text{g/mL}$ 일 때, 비교 물질인 (+)- α -tocopherol에 비해 매우 큰 세포 보호 활성을 나타내었다.

4. UVB로 유도된 HaCaT세포의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인한 실험에서 금전초 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 UVB 조사로 유도된 세포 손상에 대해 보호 효과를 나타내었고, 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 세포 보호 효과를 확인한 실험에서도 마찬가지로 금전초 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획이 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대해 보호 효과를 나타내었다.

5. 금전초 에틸아세테이트 분획의 TLC, HPLC, UV-vis spectrum, LC/ESI-MS를 이용한 분석 결과 R_f 값이 0.17인 LCE-1은 kaempferol 3-O-neohesperidoside, 0.21인 LCE-2는 nicotiflorin, 0.50인 LCE-3는 astragaln, 0.61인 LCE-4는 quercitrin, 0.72인 LCE-5는 kaempferol 3-rhamnoside (afzelin), 0.88인 LCE-6은 coumaric acid, 그리고 0.93인

LCE-7은 quercetin, 0.96인 LCE-8은 kaempferol로 확인되었다. 이 결과로 금전초 추출물 및 분획물은 대부분 quercetin 및 kaempferol과 그 배당체 성분으로 이루어져 있는 것이 확인되었고, 이러한 플라보노이드 성분들이 현저한 항산화 활성 및 세포 보호 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

결론적으로 금전초 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 우수한 항산화 효능 및 세포 보호 효과가 있어 화장품의 항산화 소재로서 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

References

1. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16-29 (2015).
2. M. Wlaschek, I. Tantcheva-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. B.*, **63**, 41-51 (2001).
3. R. Aquino, S. Morelli, A. Tomaino, M. Pellegrino, A. Saija, L. Grumetto, C. Puglia, D. Ventura, and F. Bonina, Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids, *J. Ethnopharmacol.*, **79**, 183-191 (2002).
4. S. E. Fridovich and N. A. Porter, Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **256**, 260-265 (1981).
5. S. Passi, M. Picardo, C. D. Luca, A. S. Breathnach, and M. Nazzaro-Porro, Scavenging activity of azelaic acid on hydroxyl radicals in vitro, *Free Radic. Res. Commun.*, **11**, 329-338 (1991).
6. F. R. Gruijl, H. J. van Kranen, and L. H. Mullenders, UV-induced DNA damage, repair mutations and oncogenic pathways in skin cancer, *J. Photochem. Photobiol.*, **63**, 19-27 (2001).
7. J. E. Cleaver and E. Crowley, UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis, *Front. Biosci.*, **7**, 1024-1043 (2002).
8. M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **63**, 41-51 (2001).
9. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16-29 (2015).
10. M. Jose, Mates, C. Perez-gomez, and I. N. De Castro, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.*, **32**(8), 595-603 (1999).
11. A. Bendich, L. J. Machlin, and O. Scandurra, The antioxidant role of vitamin C, *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, **2**, 419-444 (1986).
12. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 680-683 (2012).
13. 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. Korean Oil Chem. Soc.*, **32**, 781-788 (2015).
14. Y. N. Kim, B. Jennifer, Keogh, and P. M. Clifton, Polyphenols and glycemic control, *Nutrients*, **8**(1), 17-43 (2016).
15. F. Gao, D. Zhao, and J. Deng, New flavonoids from *Lysimachia christinae* Hance, *Helv. Chim. Acta*, **96**, 985-989 (2013).
16. China Pharmacopoeia Committee, Pharmacopoeia of the People's

- Republic China, **1**, 204-205 China Medical Science Press, Beijing, China (2010).
17. J. Deng, M. Ren, X. Dai, D. Qu, M. Yang, T. Zhang, and B. Jiang, *Lysimachia christinae* Hance regresses preestablished cholesterol gallstone in mice, *J. Ethnopharmacol.*, **166**, 102-108 (2015).
 18. N. Shoji, A. Umeyama, and T. Takemoto, Na⁺-K⁺-ATPase inhibitors from *Lysimachia japonica.*, *J. Nat. Prod.*, **47**, 530-532 (1984).
 19. H. Y. Kim, S. S. Kim, C. K. Lee, and J. W. Choi, Biological activities of *Lysimachiae herba*-(1)-effects of the pretreatment of *Lysimachiae herba* on the enzyme activities in galactosamine-intoxicated rats, *Korean J. Pharmacogn.*, **27**(1), 58-64 (1996).
 20. J. W. Choi, J. C. Park, and C. K. Lee, Biologic activities of *Lysimachiae Herba* II-analgesic and antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction and a phenyl propanoid component, *Nat. Prod. Sci.*, **3**(2), 135-140 (1997).
 21. X. Yang, B. C. Wang, X. Zhang, W. Q. Liu, J. Z. Qian, W. Li, J. Deng, G. K. Singh, and H. Su, Evaluation of *Lysimachia christinae* Hance extracts as anticholecystitis and cholagogic agents in animals, *J. Ethnopharmacol.*, **137**, 57-63 (2011).
 22. L. J. Tian, N. Y. Yang, and W. Q. Chen, Triterpene saponins from *Lysimachia christinae*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **10**, 265-269 (2008).
 23. R. Y. Gan, L. Kuang, X. R. Xu, Y. Zhang, E. Q. Xia, F. L. Song, and H. B. Li, Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease, *Molecules*, **15**(9), 5988-5997 (2010).
 24. K. Yasukawa and M. Takido, Flavonoid glycosides from *Lysimachiae Herba* and *Lysimachia christinae* var. typical, *Planta Med.*, **59**, 578-578 (1993).
 25. T. Marica, Engström, M. Päljjarvi, and J. P. Salminen, Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin, kaempferol- and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 4068-4079 (2015).
 26. T. Iwashina and S. Matsumoto, Flavonoid glycosides from the Fern, *Schizaea* (Schizaeaceae) in south pacific region, and their distribution pattern, *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. B*, **39**(4), 195-201 (2013).
 27. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, and K. Kanazawa, Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 571-581 (2003).
 28. F. A. Bernal, L. E. Cuca-Suárez, L. F. Yamaguchi, and E. D. Coy-Barrera, LC-DAD-UV and LC-ESI-MS-based analyses, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of a polar fraction from *Iryanthera ulei* leaves, *Rec. Nat. Prod.*, **7**(2), 152-156 (2013).
 29. 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**, 2466-2490 (2009).
 30. J. Sun, F. Liang, Y. Bin, P. Li, and C. Duan, Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultra-violet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries, *Molecules*, **12**, 679-693 (2007).