

좁은잎천선과 및 조릿대 혼합 추출물의 항산화 성분과 항산화 활성

권희연¹ · 최선일¹ · 한웅호¹ · 문 효¹ · 장길웅¹ · 최예은¹ · 강준철² · 조주현² · 이옥환^{1,*}

¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공, ²하람 중앙연구소

Antioxidant components and antioxidant activities of mixtures with *Sasa quelpaertensis* Nakai and *Ficus erecta* var. *sieboldii*

Hee-Yeon Kwon¹, Sun-Il Choi¹, Xiongao Han¹, Xiao Men¹, Gill-Woong Jang¹,
Ye-Eun Choi¹, Jun-Chul Kang², Ju-Hyun Cho², and Ok-Hwan Lee^{1,*}

¹Department Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

²Haram Central Research Institute

Abstract The purpose of this study was to evaluate the antioxidant components and activities of HR02/04(8:2)-W, a mixture of *S. quelpaertensis* Nakai and *F. erecta* var. *sieboldii*. We investigated the *p*-coumaric acid, total flavonoid, and total phenol contents. To evaluate the antioxidant efficacy, we measured the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity, FRAP activity, reducing power, and ORAC value. We observed the protective effect of hydrogen peroxide against cell damage in human dermal fibroblasts. As a result of the experiment, the *p*-coumaric acid, total flavonoid, and total phenol contents were 75.62±1.56 mg/100 g, 21.57±0.84 mg rutin equivalent (RE)/g, and 21.25±1.31 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, respectively. In the experiments on antioxidant activity, HR02/04(8:2)-W was found to have significantly increased antioxidant activity. In the human dermal fibroblasts, the HR02/04(8:2)-W treated groups could effectively protect cells against oxidative damage. In this study, we confirmed that HR02/04(8:2)-W is a material with effective physiological antioxidant activity.

Keywords: *Sasa quelpaertensis* Nakai, *Ficus erecta* var. *sieboldii*, mixture, antioxidant activity, human dermal fibroblast

서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)는 체내 대사과정 속에서 생성되거나, 흡연, 음주, 환경오염물질 등 다양한 요인에 의하여 생성된다(Kim 등, 2017). 이렇게 생성된 활성산소는 생체 내 산화스트레스를 일으키고, DNA 손상, 암, 심장질환, 당뇨병 등 다양한 질병의 원인이 된다(Martinez-Cayuela, 1995). 인체는 이와 같은 활성산소를 조절하기 위하여 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등과 같은 다양한 항산화계 효소를 비롯한 방어 체계를 지니고 있다(Song 등, 1993). 현대 사회의 도시화 및 공업화로 인한 환경오염과 식생활 변화 등으로 인해 인체가 활성산소에 과도하게 노출됨에 따라 체내 항산화 방어시스템 균형이 깨져 대사질환 발병률이 증가하고 있다. 현재 항산화 효능을 가진 여러 약물들이 존재한다. 일반적으로 사용되고 있는 butylated hydroxy anisol 및 butylated hydroxy toluene 등의 합성 항산화제들은 높은 항산화 효능과 경제성 때문에 널리 쓰이고 있지만, 다량 섭취 시 위장점막, 폐, 신장, 혈관 등에 심

각한 독성 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다(Branen, 1975; Choe 등, 1982). 이에 따라, 부작용 위험이 적은 천연물을 원료로 하는 항산화제에 대한 개발이 요구되고 있는 실정이다(Shin, 1997).

좁은잎천선과(*Ficus erecta* var. *sieboldii*)는 무화과속에 속하는 식물로서 잣꼭지나무, 가는잎천선과 등의 이명을 가지며, 우리나라에서도 제주도과 남해안 지방 특히 제주도에 주로 자생하는 식물이다(Lee, 1980). 예로부터 원기회복, 뼈 건강, 상처회복, 혈액순환개선, 해독 등의 효능이 있다고 알려져 왔으며(Ahn, 1998), 최근 수행된 연구에서 Park 등(2016)은 좁은잎천선과의 카테킨 함량과 항산화 활성이 우수함을 확인하여 기능성소재로서의 가능성을 보고하였으며, Ham 등(2018)은 과민면역 대식세포 모델에서 항염증 효과에 대하여 보고하였다.

조릿대 속(*Sasa* sp.) 식물은 작은 대나무(dwarf bamboo)라고 불리는 다년생 식물로 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가에 다양한 종들이 널리 분포하고 있다(Okabe 등, 1975). 예로부터 잎은 향염, 해열, 이뇨 작용이 있어 민간약재로 이용되어 왔으며(Bae, 2000), 열매는 보리나 밀알 모양이며 전분을 함유하여 한 때 구황식물로 사용되었다. 세포실험 및 동물실험을 통한 항산화(Park과 Lim, 2009), 항균(Jang 등, 2010), 항염(Song 등, 2015) 및 항비만(Yang 등, 2010) 활성 등 다양한 건강증진 효과들이 보고되었다. 이 중에 제주 조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 제주도 한라산에 자생하는 특산식물로 그 잎은 차로 음용되어 왔으며, 최근 들어서는 제주조릿대 잎 추출물은 항비만(Kim, 2015), 항산화 및 항염(Lee 등, 2018), 항암(Kim과 Kim, 2014) 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있어 제주조릿대를 이용한 건강증진 식품 제조가 증가하고 있다.

*Corresponding author: Dr. Ok Hwan Lee, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454
Fax: +82-33-259-5565
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr
Received June 19, 2020; revised July 13, 2020;
accepted July 23, 2020

본 연구팀은 선행연구에서 좁은잎천선과 및 제주조릿대를 다양한 혼합비율(10:0, 2:8, 5:5, 8:2, 0:10)과 추출조건(열수추출, 70% 에탄올 추출)으로 개발된 10가지 추출물에 대하여 면역 증진 효능평가를 실시하여, 다른 소재들과 비교하여 가장 우수한 면역 활성을 보인 8:2 열수추출물(HR02/04(8:2)-W)을 선정하 바 있다 (Kwon 등, 2020). 이처럼 HR02/04(8:2)-W이 다른 비율의 혼합 추출물보다 면역 활성을 매우 효과적으로 증진시켰으므로, 본 연구에서는 건강기능식품 소재로서의 활용 가능성이 매우 높다 판단 되는 HR02/04(8:2)-W에 대한 추가적인 연구로 항산화 성분 분석 및 생리활성 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

추출물 제조 및 시약

본 연구에 사용된 좁은잎천선과잎과 제주조릿대잎은 (주)삼원네이처(Jeju, Korea)에서 구매하였다. 좁은잎천선과잎과 제주조릿대잎의 8:2 혼합비율에 20배수의 증류수를 넣고 환류 추출장치에서 95°C의 온도로 4시간 동안 환류 추출하였다. 총 2회 추출하여 1차 및 2차에서 얻어진 추출물을 filter paper (ADVANTEC, Tokyo, Japan)로 여과하고, 농축(N-1300, Eyla, Tokyo, Japan)한 후 동결건조(7751041, Labconco, Kansas, MO, USA)하여 열수추출 분말시료(HR02/04(8:2)-W)를 얻었다. 본 실험에 사용된 시약 중, *p*-coumaric acid, rutin, gallic acid, Folin-Ciocalteu reagent, L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, methanol, ethanol, acetonitrile 및 trifluoroacetic acid는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 피부섬유아세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S)는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

p-Coumaric acid 분석

HR02/04(8:2)-W에 함유된 *p*-coumaric acid의 분석은 식품공전법(2008)을 응용하여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)로 분석하였으며, 분석을 위한 시료 및 표준용액은 다음과 같이 제조하였다. 시료 250 mg을 정밀히 취하여 25 mL 부피 플라스크에 넣고 70% methanol 20 mL을 가하여 30분간 초음파를 가해 추출하고, 실온에서 방냉하여 25 mL로 정용하고 0.45 µm syringe filter (PTFE)로 여과 후 시험용액으로 사용하였다. 표준용액은 *p*-coumaric acid 25 mg을 칭량 후 25 mL 부피 플라스크에 넣고 70% methanol에 녹여 정용시켜 표준용액을 제조하였다. 다시 표준용액을 70% methanol로 희석하여 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm 농도로 표준용액을 제조하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters Alliance 2695 HPLC system과 Waters 2998 Photodiode Array Detector (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석조건은 Table 1과 같으며, 분석에 사용된 column은 Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 µm, Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

총 플라보노이드 및 총 페놀 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료 0.5 mL, 95% EtOH 1.5 mL, 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 증류수 2.8 mL을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여

Table 1. HPLC condition for analysis of *p*-coumaric acid

Instrument	Conditions		
Column	Agilent SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)		
Detector	UV 330 nm (Waters 2998 Photodiode Array Detector)		
	Time (min)	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)
Mobile phase (gradient)	0.0	90	10
	20.0	80	20
	22.0	20	80
	30.0	20	80
	32.0	90	10
	40.0	90	10
Flow rate	1.0 mL/min		
Column temp.	40°C		
Injection volume	10 µL		
Run time	40 min		

¹⁾0.5% trifluoroacetic acid in water

²⁾acetonitrile

415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 rutin을 이용하여 표준곡선($y=1.435x+0.012$, $R^2=0.999$)으로부터 총 플라보노이드 함량(mg rutin equivalent (RE)/g)을 계산하였다.

총 페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법(1996)을 참고하여 측정하였다. DW로 농도별로 희석한 시료 1 mL과 10% folin 시약을 먼저 1 mL 첨가 후 2% Na₂CO₃시약을 1 mL 첨가하여 혼합하였다. 혼합물을 암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 이용하여 검량곡선($y=16.957x-0.049$, $R^2=0.996$)을 작성하여 총 페놀 함량(mg gallic acid equivalent (GAE)/g)을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성 측정은 Kim 등(2002)의 방법을 참고하여 측정하였다. DW를 사용하여 농도별로 희석한 시료 0.2 mL와 ethanol에 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL을 혼합한 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 그 후 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH 라디칼 소거능을 아래 식에 의하여 나타내었다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성 측정은 Re 등(1999)의 방법을 참고하였다. 시료는 DW로 농도별로 희석하여 사용하였으며, 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate 용액을 암소에서 16시간 동안 반응시켜 라디칼을 발생시켰다. 그 후, 96-well plate에 시료 10 µL을 첨가하고 ABTS 용액 290 µL를 첨가하여 혼합한 후 암소에서 6분간 반응시켰다. 반응이 끝난 반응액은 734 nm에서 흡광도를 측정하고, 아래의 식에 따라 ABTS 라디칼 소거활성을 계산하였다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거활성(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

FRAP 활성 측정

FRAP 활성을 측정하기 위하여 Benzie 등(1996)의 방법을 참고하였다. Sodium acetate와 acetic acid를 혼합하여 pH 3.6의 sodium acetate buffer를 만들고, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)와 40 mM HCl을 혼합하여 10 mM TPTZ solution을 만들었다. 반응 용액을 만들기 위하여 sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 10:1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 반응용액 1.5 mL과 농도별로 희석한 시료 50 µL 및 DW 150 µL를 혼합하고, 37°C에서 4분간 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reducing power

Reducing power는 Oyaizu의 방법(1986)을 이용하여 측정하였다. 농도별 시료 0.5 mL에 1% potassium ferricyanide 2.5 mL 및 0.2 M sodium phosphate buffer 2.5 mL을 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합액에 trichloroacetic acid 2.5 mL을 첨가하고, 1790×g에서 10분간 원심분리기(Hanil Science Industrial Co., Seoul, Korea)를 사용하여 원심분리한 상층액 2.5 mL과 증류수 2.5 mL 및 0.1% Iron (III) chloride 0.5 mL을 넣어준 후 혼합하여 microplate reader를 사용하여 655 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

ORAC 지수 측정

ORAC 지수 측정은 Ou 등(2001)의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료는 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 희석하여 사용하였다. Black 96-well microplate에 40 nM fluorescein 150 µL 및 시료 25 µL을 첨가하고 측정 직전에 150 mM AAPH 25 µL을 첨가하여 fluorescent microplate reader (Spectra-max i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 37°C에서 90 분간 3분마다 fluorescence의 감소 정도를 측정하였다. 표준물질로는 trolox를 이용하였으며, 표준시약과 HR02/04(8:2)-W의 the area under the curve (AUC)를 측정하여 나타내었다.

피부 섬유아세포 배양

피부 섬유아세포(Human dermal fibroblast, HDF)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 피부 섬유아세포는 실험목적에 따라 6-well 및 96-well cell culture plate에 각각 1×10⁶ cells/well로 seeding한 후, 10% fetal bovine serum 및 1% penicillin streptomycin을 함유한 low glucose (89%)에서 24시간 배양하였다.

세포독성 평가 및 산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과 측정

피부 섬유아세포에 대한 HR02/04(8:2)-W의 세포독성 평가 및 세포 손상 보호효과를 측정하기 위하여 XTT assay kit를 사용하였다. 세포독성 평가를 위하여 96-well cell culture plate에 1×10⁶ cells/well의 농도로 24시간 동안 배양한 세포에 HR02/04(8:2)-W를 각각 50, 100, 200 및 300 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, XTT reagent 1 mL와 PMS reagent 20 µL을 혼합하여 각 well의 배지 양의 20%에 해당하는 양을 분주하여 CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 450 nm와 690 nm에서 각각 흡광도 값을 측정하고, 450 nm에서 측정된 흡광도 값에서 690 nm에서 측정된 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포독성을 계산하였다.

산화적 스트레스가 유도된 피부 섬유아세포에서 HR02/04(8:2)-

W의 세포 손상 보호 효과를 측정하기 위하여 96-well cell culture plate에 1×10⁶ cells/well의 농도로 24시간 동안 배양한 세포에 각 농도별 시료 및 ascorbic acid를 24시간 동안 처리한 후, 시료가 담긴 배지를 제거하고, 세포 손상을 유발하기 위해 1 mM hydrogen peroxide를 1.5시간 동안 세포에 처리하였다. 그 후, hydrogen peroxide가 첨가된 배지를 제거하고 각 well에 새로운 배지로 교체하여 세포독성 평가 실험과 같은 방법으로 XTT assay를 진행하여 세포 생존율을 계산하였다.

H₂-DCFDA assays를 이용한 산화적 스트레스 측정

산화적 스트레스에 대한 세포내 활성산소를 측정하기 위하여 H₂-DCFDA assay를 이용하였다. 피부섬유아세포를 6-well plate에 1×10⁶ cells/well의 농도로 seeding되어 24시간 동안 배양된 세포에 HR02/04(8:2)-W를 각각 100, 200 및 300 µg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 0.5 mM hydrogen peroxide를 0.5 시간 동안 처리하였다. 그 후, 멸균된 PBS (pH 7.4)를 이용하여 2회 세척하고, 세포 고정을 위하여 4% paraformaldehyde 용액 1 mL을 각 well에 첨가하여 15분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 이후 다시 PBS 용액으로 2회 세척하고, 빛이 들어가지 않도록 주의하며 10 µM H₂-DCFDA를 처리하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. Fluorescent microplate reader를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 525 nm에서 DCF에 의한 세포내 형광 값을 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 시료 당 3번 반복하여 평균±표준편차로 나타내었다. 실험결과의 통계적 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 p<0.05 유의 수준에서 검정하였다. 실험의 통계분석은 SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

HR02/04(8:2)-W의 항산화 성분

HR02/04(8:2)-W 내의 p-coumaric acid와 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량을 측정한 실험 결과는 Fig. 1과 Table 2와 같다. HPLC를 이용하여 p-coumaric acid를 분석한 결과, HR02/04(8:2)-W 내 p-coumaric acid의 함량은 75.62±1.56 mg/100 g으로 측정되었다. Lee 등(2016)은 제주조릿대 열수추출 및 에탄올추출물의 p-coumaric acid 함량을 각각 23.39 mg/g과 10.84 mg/g으로 보고하여 본 연구에서 측정된 수치와 차이를 보였다. 이는 HR02/04(8:2)-W이 좁은잎천선과와 조릿대의 8:2 혼합 추출물이기 때문인 것으로 사료된다.

총 페놀 함량 측정은 시료내의 다양한 페놀류 물질들이 Folin & Ciocalteu's 시약의 phosphomolybdic acid에 전자를 공여함에 따라 청자색 환원물을 생성하는 원리를 이용한 방법이다(Folin과 Denis, 1912). 총 플라보노이드 함량과 페놀 함량은 각각 21.57±0.84 mg RE/g, 21.25±1.31 mg GAE/g으로 측정되었다. Park 등(2013)의 연구에서 조릿대를 세 가지(n-hexane, ethanol 및 methanol) 용매를 이용하여 추출한 후 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 분석한 결과, 총 플라보노이드 함량은 217.28-354.18 mg quercetin equivalent (QUE)/g으로 나타나 본 연구의 값과는 상이한 차이를 보였으며, 페놀 함량은 12.81-15.98 mg GAE/g로 나타나 본 연구의 값보다는 적은 함량을 보였다. Lee 등(2017)은 조릿대 잎

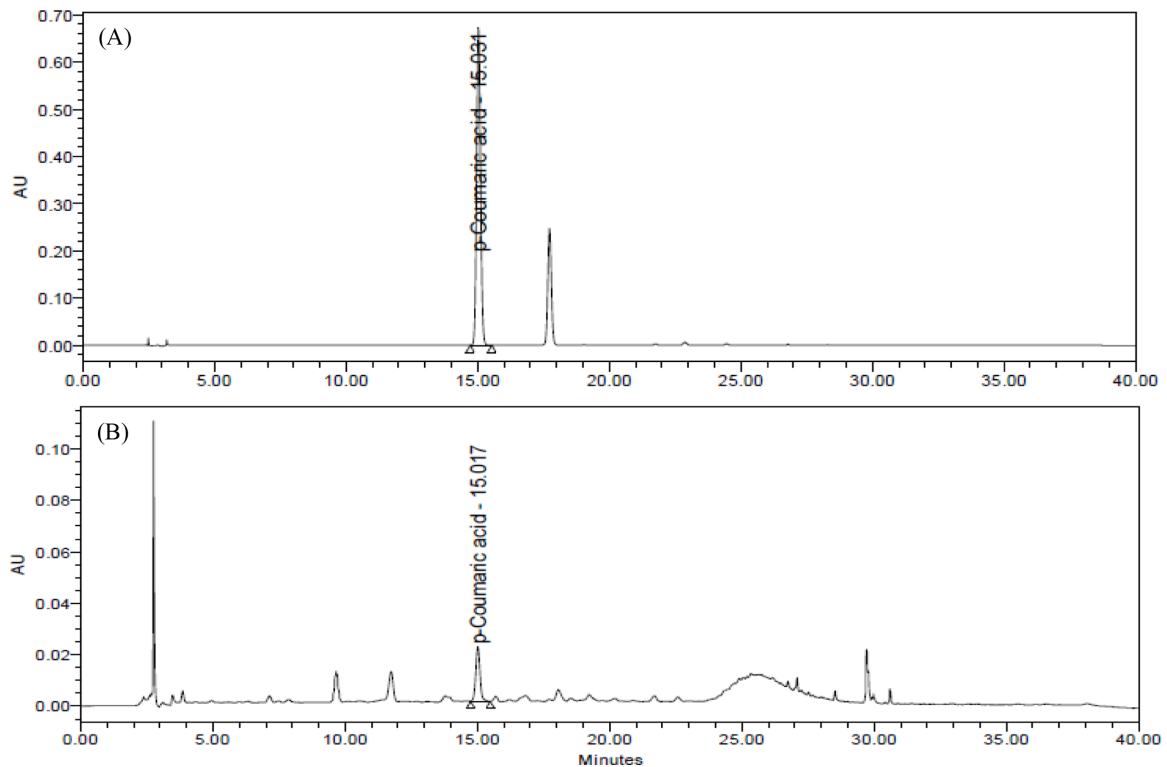


Fig. 1. HPLC chromatograms of *p*-coumaric acid (A) and HR02/04(8:2)-W (B).

Table 2. Contents of *p*-coumaric acid, total flavonoid and total phenol in HR02/04(8:2)-W

Sample	<i>p</i> -Coumaric acid contents (mg/100 g)		Total flavonoid content (mg RE ¹ /g)		Total phenol content (mg GAE ² /g)	
	Mean±SD	RSD ³ (%)	Mean±SD	RSD(%)	Mean±SD	RSD (%)
HR02/04(8:2)-W	75.62±1.56	2.06	21.57±0.84	3.91	21.25±1.31	0.89

¹RE: Rutin equivalent

²GAE: Gallic acid equivalent

³RSD: Relative standard deviation

을 95°C에서 10시간 동안 열수추출하여 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량은 17.8 mg QUE/g로 본 연구결과보다 낮은 함량을 보였으며, 총 페놀 함량은 26.6 mg GAE/g으로 나타나 본 연구결과보다 약 5.3 mg GAE/g 더 높게 측정되었다. 이러한 측정값의 차이는 단일 소재가 아닌 혼합물인 HR02/04(8:2)-W를 선행 연구와 다른 방법으로 추출하였기 때문에 나타난 것으로 판단된다.

플라보노이드는 페놀성 화합물의 일종으로 superoxide, hydroxy radical과 같은 세포손상의 원인이 되는 free radical을 제거하는 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Dewick, 2002). 페놀성 화합물은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 hydroxyl기를 가지고 있어 다양한 생리활성에 관여하고, 특히 항산화 활성은 페놀성 화합물의 종류나 함량에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Manach 등, 2005). 따라서 HR02/04(8:2)-W에 존재하는 페놀성 성분은 항산화 생리활성에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성

HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성, reducing power, ORAC assay를 이용하여 측정하였다.

DPPH는 항산화 능력을 측정하는데 있어 대표적으로 사용되는 반응물질로, 하이드록시 라디칼(-OH)을 갖는 페놀류 물질의 수소

공여를 통한 라디칼의 소거로 자색의 화합물이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다(Bondet 등, 1997). HR02/04(8:2)-W의 DPPH 라디칼의 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2a와 같다. DPPH 라디칼 소거활성은 1.25, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 29.47-66.31%의 소거능을 나타냈으며, 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였다.

ABTS 라디칼을 이용한 항산화 활성의 측정은 potassium persulfate와 반응하여 생성되는 ABTS free 라디칼이 샘플 내의 항산화 물질에 의하여 제거되어 라디칼의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다(van den Berg 등, 1999). ABTS 라디칼 소거활성을 측정된 결과 (Fig. 2b), 1.25, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 19.66-73.45%의 소거활성을 나타내어 ABTS 라디칼 소거활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. Lee 등(2017)의 연구에서 조릿대 잎을 95°C에서 10시간 동안 열수추출을 진행한 추출물에 대한 항산화효과를 조사한 결과, 1, 2.5, 5 mg/mL, 농도에서 14.1-69.8%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, ABTS 라디칼 소거능을 측정하였을 때, 1, 2.5, 5 mg/mL의 농도에서 26.7-84.5%의 소거활성을 나타내어 본 연구에서 사용된 HR02/04(8:2)-W과 유사한 항산화 활성을 나타내었다. 본 연구에서는 혼합소재를 사용함으로써 Lee 등(2017)의 연구와 같은 온도 조건에서 추출시간을 4시간으로 단축시켜 조릿대 10시간 추출물과 동등한 수준까지 라디칼 소거활성을 증가시킬 수 있었다. 이는 혼합추출물에 존재하

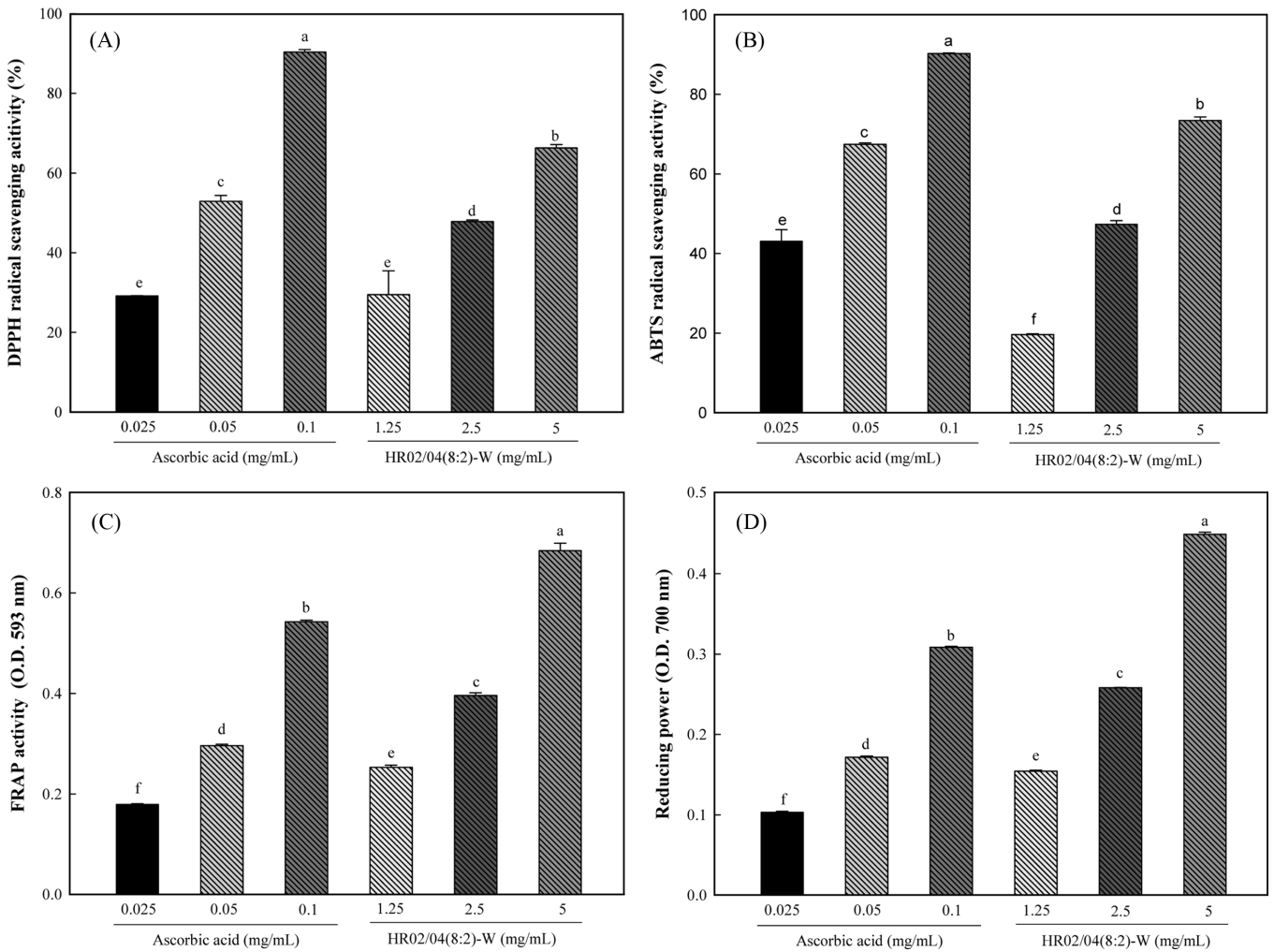


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), FRAP activity (C) and reducing power (D) of HR02/04(8:2)-W. Results are presented as the mean±standard deviation of 3 independent in triplicate. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

는 조릿대와 좁은잎천선과의 시너지 작용으로 인해 상대적으로 짧은 추출 시간에 항산화 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있었기 때문에 사료된다.

FRAP assay는 앞서 DPPH나 ABTS의 방법과는 다르게 산화 환원 반응을 이용하여 항산화 능력을 측정하는 방법으로, 낮은 pH에 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것이다(Kim 등, 2009). FRAP assay에서 나타나는 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 의미하며, 높은 항산화 활성을 가질수록 흡광도의 수치가 높게 나타난다. HR02/04(8:2)-W를 이용하여 FRAP assay에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 2c와 같다. HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성은 1.25, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 0.25-0.68의 흡광도 값을 나타내어 농도 의존적으로 환원력이 높아져 항산화 활성이 증가하였다.

Reducing power는 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환되는 환원력을 흡광도 값으로 측정하는 원리이다. HR02/04(8:2)-W를 이용하여 reducing power 시험법에 의한 항산화 활성을 측정한 결과(Fig. 2d), HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성은 1.25, 2.5, 5 mg/mL 농도에서 0.15-0.45의 흡광도 값을 나타내었으며, FRAP 실험에서

와 마찬가지로 농도 의존적으로 환원력을 증가시키며 효과적으로 항산화 활성이 증가하였다.

ORAC 분석은 peroxy 라디칼에 대한 항산화 물질의 저해능을 측정하는 방법으로 peroxy 라디칼과 형광 probe가 반응하여 형성되는 비형광 생성물의 양이 시간에 따라 얼마나 감소하는지를 평가하여 항산화 활성을 측정하는 원리이다(Kurihara 등, 2004). HR02/04(8:2)-W를 이용한 ORAC value 측정 실험의 결과는 Fig. 3와 같다. Fig. 3a는 시간에 따른 HR02/04(8:2)-W의 감소 그래프를 나타낸 것이며, Fig. 3b는 blank AUC에 대한 HR02/04(8:2)-W의 AUC를 나타낸 것이다. Trolox를 이용하여 표준곡선을 작성하여 HR02/04(8:2)-W의 ORAC value를 측정한 결과, 77.35 μ M trolox equivalent/mg으로 측정되어 control에 비하여 5배 이상 높은 항산화력을 나타내었다. Park 등(2016)은 좁은잎천선과잎을 70% 에탄올을 이용하여 추출하여 항산화 활성(DPPH, ABTS 라디칼 소거능)을 측정하고, 활성 성분(monolein, oleic acid, lutein, catechin 등)을 분리하여 좁은잎천선과의 항산화 효과가 우수하다고 평가한 바 있다. Ko 등(2008)은 조릿대의 화학성분 및 항산화 활성을 측정하여 조릿대 내에 citric acid, formic acid, fumaric acid 등 다양한 이화학적 성분이 존재한다고 보고하였다. 따라서 HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성은 좁은잎천선과에 함유된 활성 성

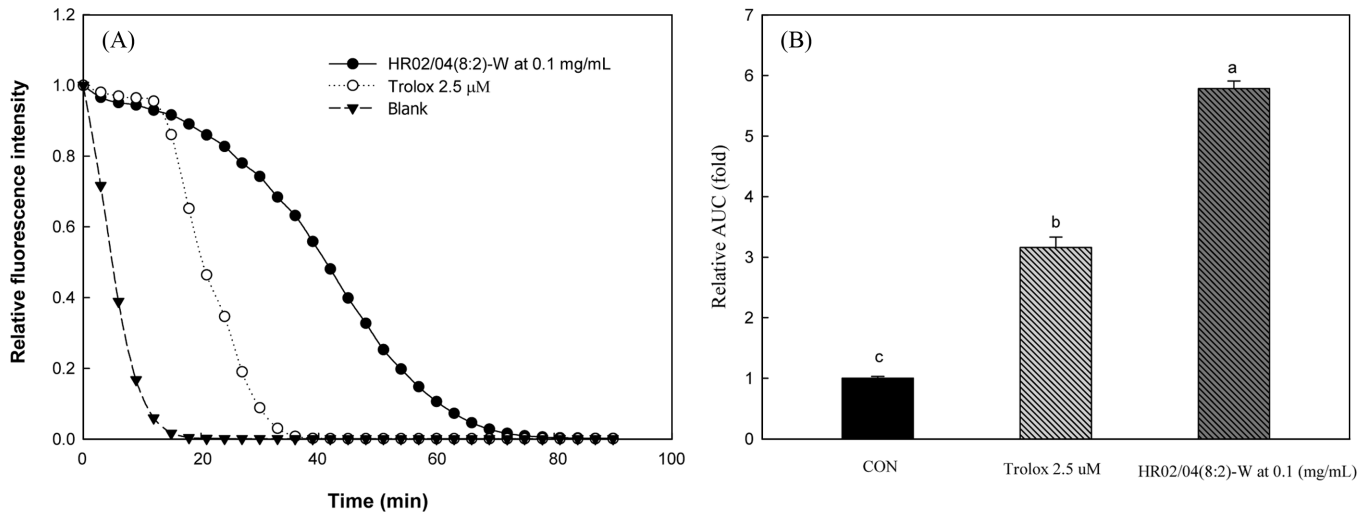


Fig. 3. Effect of HR02/04(8:2)-W on fluorescein decay induced by AAPH. (A) HR02/04(8:2)-W 0.1 mg/mL (●), Trolox 2.5 μM (○), Blank (▼). (B) Each bar indicates the mean±standard deviation of 3 independent in triplicate. The decay curve determined by fluorescein fluorescence intensity (excitation at 493 nm, emission at 515 nm). Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

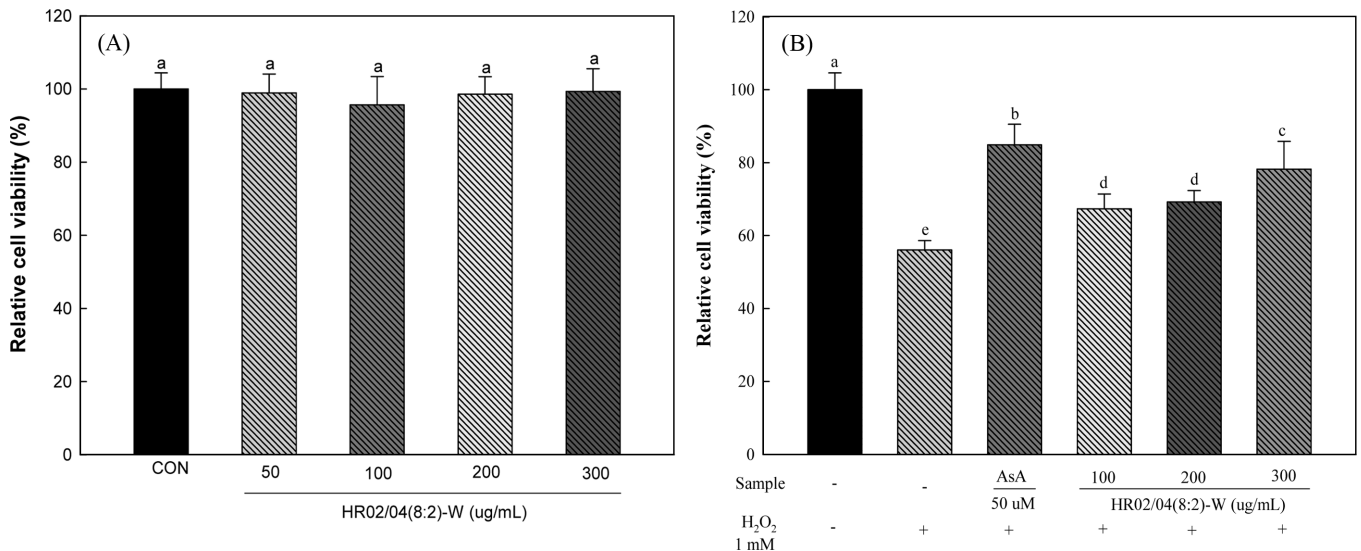


Fig. 4. Cell viability of human dermal fibroblasts (HDFs) treated with or without HR02/04(8:2)-W (A) and the protective effect of HR02/04(8:2)-W on H₂O₂-treated HDFs (B). Cell viability was determined using the XTT assay. The cells were exposed to HR02/04(8:2)-W for 24 h. Then, 1 mM H₂O₂ for 1.5 h. Each values are the mean±SD of the results from three different plates (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

분 및 조릿대 내의 다양한 성분의 복합 작용으로 인한 것으로 사료된다.

Hydrogen peroxide로 유도된 세포손상에 대한 HR02/04(8:2)-W의 세포 보호효과 및 항산화 활성

XTT assay는 살아있는 세포내의 mitochondrial dehydrogenase 효소에 의해 XTT 시약이 분열되며 생성되는 짙은 붉은색의 formazan을 흡광도로 측정하는 원리를 이용한 방법이다(Kim 등, 2011). 피부 섬유아세포에 대한 HR02/04(8:2)-W의 세포독성을 평가한 결과는 Fig. 4a와 같다. HR02/04(8:2)-W을 50, 100, 200, 300 μg/mL의 농도로 24시간 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포의 viability에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이후 이어지는 실험에 HR02/04(8:2)-W의 100-300 μg/mL 농도를 사용

하여 산화손상에 대한 세포 보호효과를 측정하였다.

Hydrogen peroxide로 유도한 세포손상에 대하여 HR02/04(8:2)-W이 피부 섬유아세포의 cell viability에 미치는 영향을 XTT assay를 이용하여 측정하였고, 그 결과는 Fig. 4b와 같다. 피부 섬유아세포에 1 mM hydrogen peroxide를 1.5 h동안 처리하여 세포 손상을 유도하였을 때, 음성 대조군에서 control군에 비해 56% 까지 세포 생존율이 감소하였다. 양성대조군인 50 μM의 ascorbic acid를 처리한 실험군은 84%까지 세포 생존율이 증가하여 유의적으로 산화적 손상이 억제되는 것으로 확인되었다. HR02/04(8:2)-W을 처리한 실험군에서 100 및 200 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 68% 정도로 세포 생존율이 증가하며 음성대조군에 비해 유의하게 산화적 손상이 억제되었으며, 300 μg/mL를 처리하였을 때 78% 까지 세포 생존율이 증가하여 hydrogen peroxide 처리에 의한 산

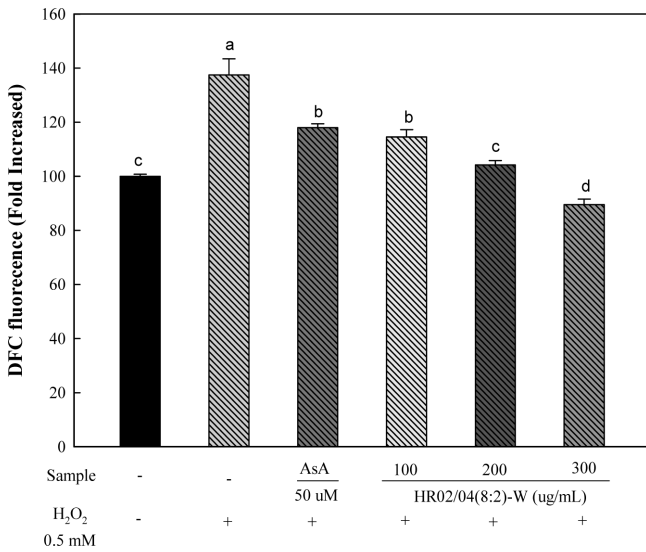


Fig. 5. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in HDFs treated with HR02/04(8:2)-W or H₂O₂. Intracellular ROS generation was measured using the H₂-DCFDA method. Cells were exposed to HR02/04(8:2)-W for 24 h, then 0.5 mM H₂O₂ for 0.5 h. All values are presented as mean±SD. Different letters above the bars indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

화적 손상을 효과적으로 억제시켰다. 이러한 세포손상 보호 효과는 본 연구에서 확인된 혼합소재의 우수한 항산화 활성에 의한 것으로 사료되며, Kim 등(2014)의 연구에서 항산화 활성 및 페놀성 물질이 피부섬유아세포에서 세포 손상 보호효과에 영향을 미친다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다.

Hydrogen peroxide로 산화적 스트레스가 유도된 피부 섬유아세포에서 HR02/04(8:2)-W의 항산화 활성을 평가하기 위해 H₂-DCFDA 염색 방법을 이용한 실험 결과는 Fig. 5와 같다. Hydrogen peroxide를 처리한 음성대조군에서는 control에 비해 세포내 ROS 생성량이 약 137% 증가하였으며, HR02/04(8:2)-W을 농도별로 처리하였을 때, 100, 200, 300 µg/mL에서 각각 114, 104, 89%로 농도의존적으로 세포내 ROS 생성량이 감소하였다. 이와 같은 결과는 HR02/04(8:2)-W 농도별 처리에 의하여 유의적으로 항산화 활성이 증가한 결과와 유사하며, 소재 내의 페놀류 성분에 의해 ROS에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 억제했을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 HR02/04(8:2)-W에 대한 항산화 성분 및 생리활성을 평가하기 위하여, *p*-coumaric acid 함량, 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량, DPPH, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성, reducing power, ORAC value를 측정하였다. 또한, 피부 섬유아세포에서 hydrogen peroxide에 의하여 산화적 스트레스가 유도된 세포 모델에서의 HR02/04(8:2)-W의 산화 손상 보호효과를 측정하기 위하여 XTT assay 및 H₂-DCFDA assay를 진행하였다. HPLC를 이용한 *p*-coumaric acid 함량 분석 결과, HR02/04(8:2)-W 내의 *p*-coumaric acid는 75.62±1.56 mg/100 g 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량 및 총 페놀 함량은 각각 21.57±0.84 mg RE/g, 21.25±1.31 mg GAE/g으로 측정되었다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 시험에서 HR02/04(8:2)-W의 농도 유의적

으로 소거활성이 증가하는 것을 확인하였으며, FRAP 활성 및 reducing power 측정에서도 우수한 항산화 활성을 보였다. ORAC assay 결과 control 보다 5배 이상 높은 수치를 보이며 효과적으로 라디칼 저해 활성을 보였다. 항산화 실험에서의 뛰어난 항산화 활성은 HR02/04(8:2)-W에 함유된 페놀류들에 의한 것으로 판단된다. 피부 섬유아세포를 이용한 실험에서, HR02/04(8:2)-W을 300 µg/mL의 농도까지 세포의 생존력에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, hydrogen peroxide 처리에 의하여 56%까지 감소되었던 세포 생존율을 최대 78%까지 증가시키며 효과적으로 세포를 보호했음을 확인하였다. H₂-DCFDA 염색을 통하여 세포내의 ROS의 양을 측정하였을 때, hydrogen peroxide 처리에 의하여 control군 대비 137%까지 증가하였던 ROS를 최대 89%까지 감소시켰으므로 세포 내 활성산소를 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, HR02/04(8:2)-W이 뛰어난 항산화 생리활성 기능을 가지고, 세포 내 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 소재임이 확인되었으며, 천연물 유래 기능성 식품원료로서의 활용 가능성이 매우 넓을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2019년 정부(중소벤처기업부)의 지원(S2698865)과 2018년 한국연구재단의 지원(NRF-2017R1D1A3B060284690) 및 정부(교육부)의 지원으로 한국연구재단의 지원(2018H1A2A1062634-미래기초과학핵심리더양성사업/글로벌박사양성사업)을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

References

Ahn DK. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. Kyohaksa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 855 (1998)

Bae KH. The Medicinal plants of Korea, KyoHak Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 565-567 (2000)

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76 (1996)

Bondet V, Brand-Williams W, Berset CLWT. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. Lebensm. Wiss. Technol. 30: 609-615 (1997)

Brannen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59 (1975)

Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14: 283-288 (1982)

Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. pp. 149-151 (2002)

Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdenic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-243 (1912)

Ham YM, Yoon WJ, Sohn EH, Park DW, Jeon H, Jung YH, Kang SC. The CH₂Cl₂ Extract Fraction from *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King Suppresses Lipopolysaccharide-mediated Inflammatory Responses in Raw264. 7 Cells. J. Food Nutr. Res. 6: 356-364 (2018)

Jang MR, Lee DH, Kim GH. Antibacterial Activity of Ethanol Extract and Fraction of *Sasa borealis*. Korean J. Food Cook. Sci. 26: 848-852 (2010)

Kim AY, Ha JH, Kim AR, Jeong HJ, Kim KM, Park SN. Cellular Protective Effect and Active Component Analysis of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Extracts and Fractions. Appl. Chem. 28:479-484 (2017)

Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*).

- Korean J. Food Preserv. 18:366-373 (2011)
- Kim DB, Oh JW, Lee JS, Kim YH, Park IJ, Cho JH, Lee OH. Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. Korean J. Food Sci. Technol. 46: 601-608 (2014)
- Kim JH, Jeong CH, Choi GN, Kwak JH, Choi SG, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an in vitro system. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 712-716 (2009)
- Kim JH, Kim MY. Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai in Human Cancer Cells. J. Life Sci. 24: 903-909 (2014)
- Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Moon KD. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 617-624 (2002)
- Kim SA. *Sasa quelpaertensis* Nakai extracts anti-obesity properties in Korean obese adults. PhD thesis, University of Ewha Womans, Seoul, Korea (2015)
- Ko MS. Chemical components in stalks and leaves of *sasa borealis* Makino and antioxidative and antimicrobial activities of extracts. Korean J. Food Preserv. 15: 125-132 (2008)
- Korea Food and Drug Administration. Food Standard Codex. Method 364-368. Korean Foods Industry Association, Cheongju, Korea (2008)
- Kurihara H, Fukami H, Asami S, Toyoda Y, Nakai M, Shibata H, Yao XS. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Biol. Pharm. Bull. 27: 1093-1098 (2004)
- Kwon HY, Choi SI, Han X, Men X, Jang GW, Choi YE, Kim SH, Kang JC, Cho JH, Lee OH. Enhancement of Immune Activities of Mixtures with *Sasa quelpaertensis* Nakai and *Ficus erecta* var. *sieboldii*. Foods. 9: 868 (2020)
- Lee TB. Illustrated Flora of Korea, Hyangmoonsa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 990 (1980)
- Lee JY, Ko HC, Jang MG, Kim SJ. Preparation and Characterization of Phytochemical-Rich Extract from *Sasa quelpaertensis* Leaf. J. Life Sci. 26: 1330-1335 (2016)
- Lee SH, Lee MS. The research on antioxidative effect of *Sasa quelpaertensis* extractum and assessment of cytotoxicity. J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc. 18: 687-693 (2017)
- Lee JY, Song HN, Ko HC, Jang MG, Kim SJ. Anti-oxidant and anti-inflammatory potentials of *Sasa quelpaertensis* leaf residue extracts. J. Life Sci. 28: 738-744 (2018)
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rmsy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am. J. Clin. Nutr. 81: 230S-242S (2005)
- Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77: 147-161 (1995)
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)
- Okabe S, Takeuchi K, Takagi K, Shibata M. Stimulatory effect of the water extract of bamboo grass (Folin solution) on gastric acid secretion in pylorus-ligated rats. Jpn. J. Pharmacol. 25: 608-609 (1975)
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agric. Food Chem. 49: 4619-4626 (2001)
- Oyaizu M. Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315 (1986)
- Park HS. Antioxidant and antimicrobial activities of *Sasa quelpaertensis* extracts. MD thesis, Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Korea (2015)
- Park SH, Kim JE, Yeum HS, Lee NH. Isolation and Evaluation of Anti-oxidative Constituents from the Extracts of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King Leaves. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea. 42: 321-328 (2016)
- Park YO, Lim HS. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa Borealis*) leaf extract according to Extraction Solvent. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1640-1648 (2009)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999)
- Shin DH. Research and direction of natural antioxidants. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 14-21 (1997)
- Song WY, Byeon SJ, Choi JH. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Sasa borealis* extracts. J. Agric. Life Sci. 49: 145-154 (2015)
- Song JS, Kim CH, Kwon SS, Kim YK, Kim KH, Han KD, Moon HS, Park SH. The change of antioxidant enzyme (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) in the endotoxin infused rat lung. Tuberc. Respir. Dis. 40: 104-111 (1993)
- van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast AALT. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66: 511-517 (1999)
- Yang JH, Hyeon SL, Young RH. *Sasa borealis* leaves extract improves insulin resistance by modulating inflammatory cytokine secretion in high fat diet-induced obese C57/BL6J mice. Nutr. Res. Pract. 4: 99-105 (2010)