Journal of Naturopathy Vol. 10(2):108-113
한국자연치유학회지, 10권 2호, 108-113, 2021년 9월
https://doi.org/10.33562/JN.2021.10.2.5

[Originl Article]

속새(*Equisetum hyemale*) 추출물의 항산화 물질의 HPLC 분획과 LC-MS를 이용한 지표성분 분석

송진화 · 이거룡*

선문대학교 통합의학대학원 자연치유학과

HPLC Fractionation of Antioxidant Substances of *E. hyemale* Extract and Analysis of Indicator Components Using LC-MS

Jin Hwa Song · Geo Lyong Lee*

Dept. of Naturopathy, Graduate School of Integrative Medicine, Sun Moon University, Asan, 31460, Korea

(Received September 1, 2021 / Revised September 12, 2021 / Accepted September 13, 2021)

Abstract **Background**: Results on the action of antioxidants in extracts of *Equisetum hyemale* stems and roots have already been reported, but the antioxidant properties have not been analyzed. **Purpose**: This study was to determine the molecular structure of antioxidants in substances extracted from *E. hyemale* stems and roots. **Methods:** Component analysis was analyzed by HPLC and LC-MS after extraction with hot water and ethyl alcohol. **Results:** The HPLC chromatogram of stem and root extracts showed four significant peaks at a wavelength of 205 nm. Peak 1 at 280 nm is a typical simple phenolic type, and both peaks 2-4 near 280 nm and 370 nm are typical flavonoid glycosides. As for the antioxidant level of the extract by HPLC analysis, the sum of the peaks at 740 nm was the highest at 3,669 mAU in the 100% ethanol extract, 3,096 mAU in the 70% ethanol extract, and 2,868 mAU in the hot water extract. As a result of LC-MS analysis of the antioxidant extract, kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside with a molecular weight of 772 da at peak 3, and kaempferol-3-sophoroside-8-glucoside with a molecular weight of 788 and 772 at peak 4 was identified. **Conclusions**: The above results show that two types of antioxidants were identified in the antioxidant extract of *E. hyemale* exrtracts. Therefore, the potential as a raw material for functional cosmetics has increased.

Key words *Equisetum hyemale, A*ntioxidant, Cosmetics, Hot water extract, HPLC

초록 **배경**: 속새 줄기와 뿌리의 추출물에서 항산화 물질의 작용에 관한 결과를 이미 보고하였으나 항산화 성분은 분석되지 않았다. **목적:** 속새 줄기와 뿌리 부분의 성분을 추출한 물질들이 항산화 물질의 분자 구조를 확인하는 것이었다. 방법: 성분분석은 열수와 에틸알코올로 추출하여 HPLC와 LC-MS로 분석하였다. **결과**: 속새 줄기와 뿌리 추출물의 HPLC 크로마토그램은 파장 205 nm에서 4개의 중요한 peak가 나타났다. 280 nm에 있는 peak 1번은 전형적인 단순 페놀릭형이고, 모두 280 nm와 370 nm 근처에 있는 peak 2~4는 전형적인 플라보노이드 배당체의 형태임을 알 수 있었다. HPLC 분석에 의한 추출물의 항산화도는 740 nm에서 peak의 합은 100% 에탄올 추출물이 3,669 mAU로 제일 높았고, 70% 에탄올 추출물은 3,096 mAU, 열수추출물은 2,868 mAU로 제일 낮았다. 항산화성 추출 물질을 LC-MS 분석한 결과는 peak 3에서는 분자량이 772 da인 kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside, peak 4에서는 분자량이 788과 772인 물질 kaempferol-3- sophoroside- 8-glucoside가 확인되었다. **결론**: 속새의 항산화 추출물에 항산화 성분이 존재하는 것이 확인되어 속새가 기능성 화장품의 원료로서 가능성이 높아 졌다고 본다.

주제어 *Equisetum hyemale*, 속새, 항산화물질, 화장품, 열수추출, HPLC

서 론

여러 연구가가 식물에 함유한 천연 항산화 물질의 연구를 해왔다. Lee *et al*.,(2015)은 독활 식물의 에틸알코올 추출물에서 항산화 및 항염증 활성물질이 있는 것이 보고되었고, Lee *et al*.,(2016)은 흑메밀의 에틸알코올 추출물에서 항산화 및 항염증 활성물질을 확인하였다. Choi & Lee(2016)는 운지버섯 자실체의 열수 추출물의 polyphenol 및 flavonoid 함량이

Authors positions – J.H. Song(Doctorate), G.R. Lee(Prof.)
*Corresponding author E-mail:leeashram@naver.com
* 선문대학교 석사학위 논문을 발취하여 게제함 .

메탄올보다 높았다고 하였다. Choi & Lee (2017)는 구름송편버섯 자실체의 열수와 메탄올 추출물에서 아미노산의 성분이 존재하는 것을 보고하였다. Choi *et al*.,(2021)은 인도네시아 약초 중에서도 열수 추출물에 항산화 기능이 있음을 보고하였다. 최근에 Song & Lee(2021)는 속새풀의 열수와 에탄올 추출물에 항산화 물질이 높게 함유된 것을 보고도 하였다.

속새(*Equisetum hyemale*)는 속새과의 여러해살이풀로 깊은 산 응달진 습지에서 무리를 지어 자란다. 꽃과 열매 없이 포자낭으로 번식하는 식물이다(Seung & Lee, 2014). Song & Lee(2021)은 속새의 줄기과 뿌리 부위의 추출물에서 항산화성 물질이 존재하는 것을 보고하였으나, 물질의 규명은 하지 못하였다. 속새 추출물의 피부 항산화 및 피부주름 개선에 관여하는 물질의 발견은 다양한 분야로 활용성을 높이는 효과가 있을 것으로 판단하였다.

본 연구에서는 속새 풀의 줄기과 뿌리를 열수와 에틸알코올로 추출하여 항산화성 물질의 규명을 HPLC 및 LC-MS분석으로 규명한 것을 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 이용한 속새(*Equisetum hyemale*)는 오대산 700 m 산지에서 2015년 8~9월 사이에 채취한 재료를 줄기 부위와 뿌리 부위로 분리하여 세척한 다음에 실온에서 건조하여 사용하였다.

시약 및 기기

본 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.) 그리고 HPLC grade 시약은 Junsei Co.,(Chuo-ku, Tokyo, Japan)의 일급시약을 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 분석용 기기들은 KIST천연물연구소(강원도 강릉시 사임당로 679)에 설치되어 있는 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu Inc., Japan), HPLC(1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 및 LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry; Shimadzu Inc., Japan) 등을 활용 하였다.

열수 추출방법

줄기와 뿌리 부위를 각각 100 g을 1 L의 열수에서 추출하여 세척하여 건조한 다음에 환류 냉각관이 부착된 둥근 플라스크에 시교당 10배에 해당하는 증류수를 넣고 가열하며, 2시간 동안 추출한 뒤 이를 여과지로 여과하여 열수 추출액을 제조하였다. 열수 추출액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다(Song & Lee, 2021).

줄기 부위의 에탄올 추출 방법

줄기와 뿌리 부위를 100%-에탄올(100-EOH) 추출물과 70%-에탄올(70-EOH) 추출물은 준비하였다. 줄기 100 g을 물로 세척 후에 건조한 다음에 실온에서 각각 100%-에탄올과 70%-에탄올에 2시간 초음파처리 후에 침전을 시킨 다음에 상층의 추출액을 여과(0.45 nm)하여 100%-에탄올과 70%-에탄올 추출액을 제조하였다. 각 추출액을 회전진공 농축기(R-3000, Bushi, Switzerland)로 농축한 것을 동결건조기로 동결건조하여 각각 에탄올 추출물 시료로 사용하였다(Song & Lee, 2021).

추출물의 HPLC 분획방법

줄기와 뿌리 부위를 에탄올로 추출해서 농축 동결건조한 것을 다시 메탄올(70%)로 용해하여 여과지(0.45 μm PVDF syringe filter; Whatman, Maidstone, England)를 통과시키었다. 다음에 HPLC분석(Agilent, USA)은 제조회사인 Agilent Technologies의 방법을 사용하여 지표성분 및 항산화 성분을 분획하였다.

주요 HPLC 조성내용은 칼럼(Hydrosphere C18 column; 4.6 × 150 mm), 검출기는 UV(280 nm), 이동상은 HPLC grade용 아세토니트릴 (A)와 물 (B)을 0~10분, 10% A; 10~30분 10-100% A의 조건으로 linear gradient로 하였으며, 유량은 1.0 ml/min (아세토나이트릴, 물)과 0.5 ml/min (ABTS용액)으로 하였고, 시료 주입량은 10 μl로 하였다. 이때 식물 추출물의 지표성분 및 항산화 성분의 분석 파일은 크로마토그램에서 확인 정점(peak)은 280 nm로 하였고, 각 정점들에 대한 항산화 활성에서는 음성(negative) 정점은 734 nm에서 측정한 것으로 나타내었다.

HPLC용 시료 추출과 분석

추출 방법에 따른 줄기 부위 추출물을 비교하기 위하여 위에서 추출한 열수 추출물(HW), 70% 에탄올(70-EOH) 추출물과 100% 에탄올(100-EOH) 추출물을 각각 제조하였다. 제조한 각 줄기 부위 추출물의 추출 수율은 사용한 건조 시료의 무게와 추출 농축 후 얻은 추출물의 무게비를 퍼센트(%)로 환산하여 계산하였다. 각 추출물의 성분분석을 보기 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. 제조한 추출물을 메탄올로 용해하여 여과지(0.45 μm syringe filter, Whatman, Maidstone, England)를 통과시킨 다음 HPLC 장치를 사용하여 추출용매에 따른 추출물의 성분 크로마토그램을 비교 분석하였다(Table 1).

HPLC에 의한 ABTS의 항산화 성분분석

속새 추출물을 메탄올(70%)로 용해하여 여과지로 여과시킨 다음 온라인 항산화 HPLC 장치를 사용하여 지표성분 및 항산화 성분 분석하였다. 칼럼(Hydrosphere C18 column; 4.6 × 150 mm), 검출기(UV 280 nm)을 이용하였다. HPLC용 아세토니트릴(A)과 물(B)을 0~10분, 10% A; 10~30분 10~100% A의 조건으로 선상비율(linear gradient)로 하였으며, 유량은 1.0 ml/min (아세토나이트릴, 물)과 0.5 ml/min (ABTS 용액)으로 하였고, 시료주입량은 10 μl로 하였다. 이때 식물 추출물의 지표성분 및 항산화 성분의 분석은 확인 정점(peak)은 280 nm에

서 크로마토그램으로 나타내었고, 각 peak에 대한 항산화 활성은 네거티브 peak로서 734 nm에서 측정하여 나타내었다.

항산화 물질 지표성분의 구조분석

줄기 부위의 종류의 추출물에 있는 지표성분을 규명하고자, 세 추출물을 LC-MS를 활용하여 회사의 지침대로 분석하였다. 각 추출물을 70% methanol에 녹인 후 C18-HPLC 칼럼 (YMC-triart C18/ 250 × 4.6 mm)이 장착되어 있고, Agilent 6120 Quadrupole MS가 연결되어있는 LC-MS를 이용하여 분석하였다. 지표성분의 구조는 LC-MS의 positive와 negative spectrum을 기존 물질과 비교하여 동정하였다.

결과 및 고찰

속새 추출물의 수율

줄기 부위의 추출 방법에 따른 추출 수율을 비교한 결과는 Table 1에 제시하였다. 시료의 건조 중량에 대한 추출 수율은 열수 추출물(hot water extract)이 24.1%로 제일 높았고, 70% 에탄올 추출물 (70-EOH)이 17.4%, 100% 에탄올 추출물 (100-EOH)이 10.7%로 나타났다. 열수 추출물에 가장 높게 나타났다.

추출물의 HPLC 분석

HPLC 프로파일은 Fig. 1에 제시하였다. 줄기와 뿌리 부위의 지표성분과 항산화 성분의 HPLC 분석에서 280 nm에서는 청색을 나타내며, 적색은 온라인 항산화 장치를 통하여 얻는 734 nm에서 나온 ABTS 유리기의 양 즉 항산화도를 나타낸다.

Fig. 1의 HPLC 프로파일에서 주요 성분으로 나타나는 peak 1-4의 UV 스펙트럼을 살펴본 결과는 1번 peak는 항산화 활성을 가진 단순 페놀릭 화합물로 추정되며, 2-4번 peak는 항산화 활성을 가지는 플라보노이드 화합물로 추정된다.

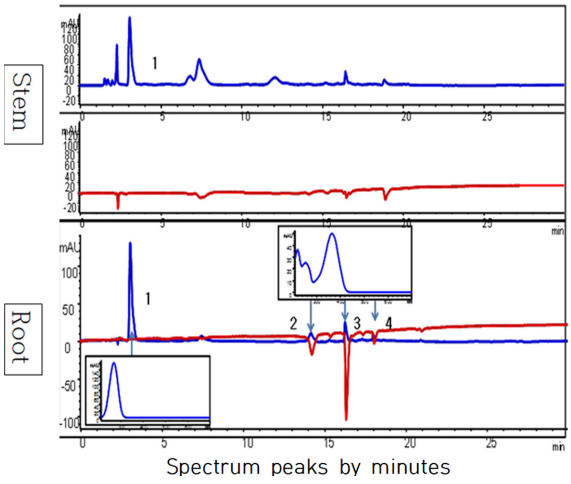

Fig. 1. HPLC chromatograms of ABTS radical with peaks 1-4 of the stem and root part extracts of *E. hyemale*. The blue line indicates 280 nm, and the red 734 nm.

이와 같은 내용은 각 peak의 UV 스펙트럼으로 알 수 있는데, 1번 peak는 280 nm 근처에서 최고 흡광도를 나타내는 전형적인 단순 페놀릭형이고, 2~4는 모두 280 nm에서의 흡광도 peak와 370 nm 근처에서의 흡광도 peak을 모두 가지는 전형적인 플라보노이드 배당체의 형태임을 알 수 있었다.

줄기 부위의 HPLC 분석 결과

줄기 부위의 추출은 열수 추출법과 에탄올 냉 침 추출한 추출물의 성분분석을 비교하기 위하여 각 추출물을 메탄올에 용해하여 HPLC로 분석하였다(Table 1, Fig. 2). 각 peak

Table 1. Summary of HPLC profiles of the stem extracts of *E. Hyemale* with the solvents

Peaks	Stem extracts with the solvents		
	Hot water	70-EOH	100-EOH
Peak No.1 (RT:2.24 min)	3015.6	2342	141.8
Peak No. 2 (RT: 2.59 min)		4143.7	1594.1
Peak No. 3 (RT: 3.20 min)	2154.6	1851.2	1107.4
Peak No. 4 (RT: 6.23 min)	421.9	449.7	97.4
Peak No. 5 (RT: 8.23 min)	10054.2	4649.5	620.7
Peak No. 6 (RT: 10.56 min)	842.6	458.3	45.9
Peak No. 7 (RT: 10.83 min)	1807.7	1331.7	170.7
Peak No. 8 (RT: 12.10 min)	621.3	693.3	123.9
Peak No. 9 (RT: 13.58 min)	172.9	499.6	47.3
Peak No. 10 (RT: 14.36 min)	273.4	324.8	23.8

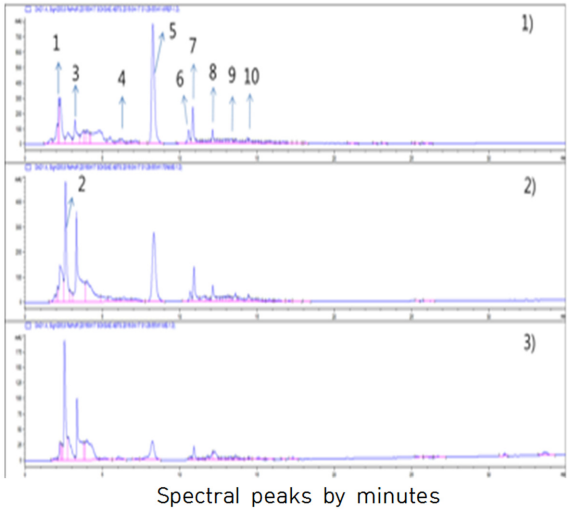

Fig. 2. HPLC profiles (UV 205 nm) of the stem part extract of of *E. Hyemale.* Numbers: 1): hot-water extract, 2): 70%-ethanol extract & 3):100%-ethanol extract.

의 조성은 HW, 70-EOH, 100-EOH 추출물이 유사하였으나, 205 nm파장에서는 각 peak의 크기가 100-EOH < 70-EOH < HW 순위로 증가하였다. 용매별로 정리한 것이 Table 1에 제시되었다. 추출물 순으로 HW추출물의 성분 peak가 큰 것을 알 수 있었다.

줄기 추출물의 HPLC peak별 항산화도 분석

HPLC에의한 분석 결과는 Table 2와 Fig. 3~4에 제시하였다. 세 추출 물의 항산화도는 ABTS 자유기 소거능을 나타내는 740 nm에서의 peak의 합을 보면, 100-EOH가 3,669 mAU로 제일 높았고, 70-EOH는 3,096 mAU이었고, HW는 2,868 mAU로 제일 낮았다.

205 nm에서의 peak크기는 HW추출물이 월등하게 컸으나, 항산화도는 오히려 제일 낮았다. 이것은 속새의 항산화도를 나타내는 성분이 205 nm에서 나타나는 물질들인 사포닌이나 터펜계통의 물질이 아니라 330 nm에서 나타나는 폴리페놀 계열임을 알 수 있다(Table 3).

각 항산화 효과를 나타내는 peak의 UV스펙트럼을 분석한 결과 모두 폴리페놀과 플라보노이드 형태임을 알 수 있었다. 이들의 구조를 확인하기 위하여 질량분석기로 분석을 수행하였다.

Table 2. The peak values of HPLC profile with ABTS of 70-EOH extract

Peak No.	Peak values(mAU) at 330 nm & 734 nm	
	Sample integ at 330 nm	ABTS integ at 734 nm
1	393.8	1279.7
2	9998.5	98.8
3	2254.8	534.3
4	496.2	1184
Total	13143.3	3096.8

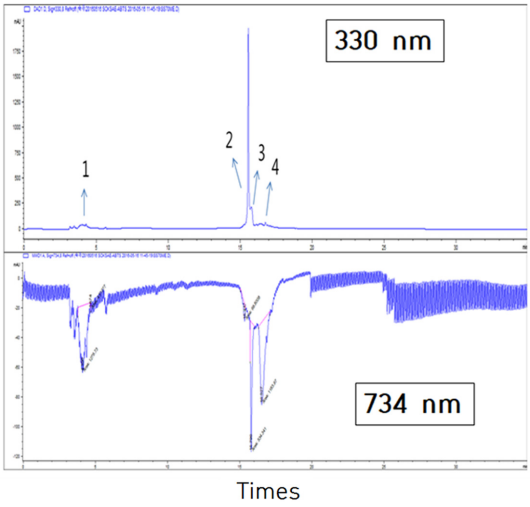

Fig. 3. HPLC chromatogram of ABTS radical scavenging activity of the crude extract of the stem part of *E. hyemale* using 70% ethanol at UV330 nm and 734 nm .

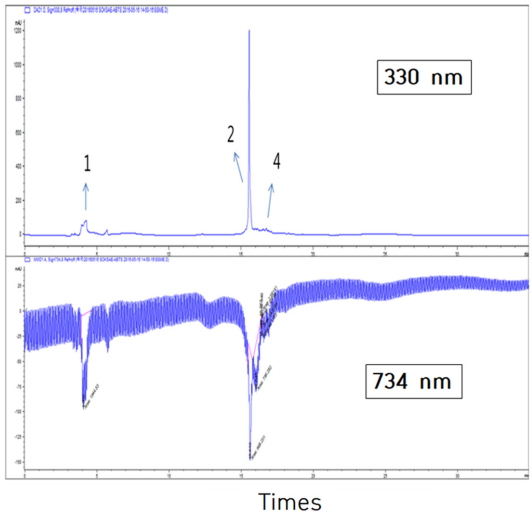

Fig. 4. HPLC profile of ABTS radical scavenging activity of the crude extract of the stem part of *E. hyemale* using 100% ethanol at UV330 nm and 734 nm.

Table 3. The peak values of HPLC profile with ABTS of 100-EOH extract

Peak No.	Peak values(mAU) at 330 nm & 734 nm	
	Sample integ at 330 nm	ABTS integ at 734 nm
1	1667.3	1944.5
2	7301.5	ND
3	204.4	968.2
4	363.8	756.3
Total	9537	3669

Table 4. The peaks of HPLC chromatograms with ABTS of the stem part hot water extract of *E. hyemale*

Peak No.	Peak values(mAU) at 330 nm & 734 nm	
	Sample integ at 330 nm	ABTS integ at 734 nm
1	1,105.7	1,317.1
2	7,586.6	108.2
3	1,146.4	399.0
4	767.4	1,043.9
Total	10,606.1	2,868.2

줄기 항산화 물질의 지표성분의 구조

줄기 부위의 3가지 추출물 중의 항산화 물질의 지표성분을 규명은 LC-MS를 활용하여 분석하였으며 그 결과는 Figs. 5, 6, 7에 제시하였다. Fig. 5에서 peak 3과 4에서 2개 지표성분의 구조를 확인할 수 있었다.

peak 3에서는 분자량이 772인 kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside이 확인되었고(Fig. 6), peak 4에서는 분자량이 788 및 772인 물질 kaempferol-3- sophoroside- 8-glucoside가 확인되었다(Fig. 7).

두 물질 모두 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 플라보노이드 계열의 화합물로 기존 쇠뜨기류에서 발견된 물질(Yang & Park, 2007)과 동일하였다.

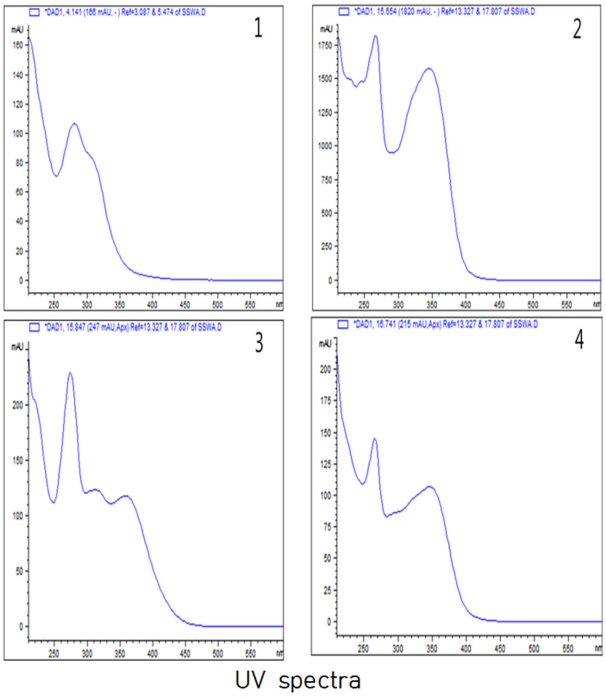

Fig. 5. UV spectra of the peak 1-4 of HPLC profiles of the crude extracts of the stem parts of *E. hyemale.*

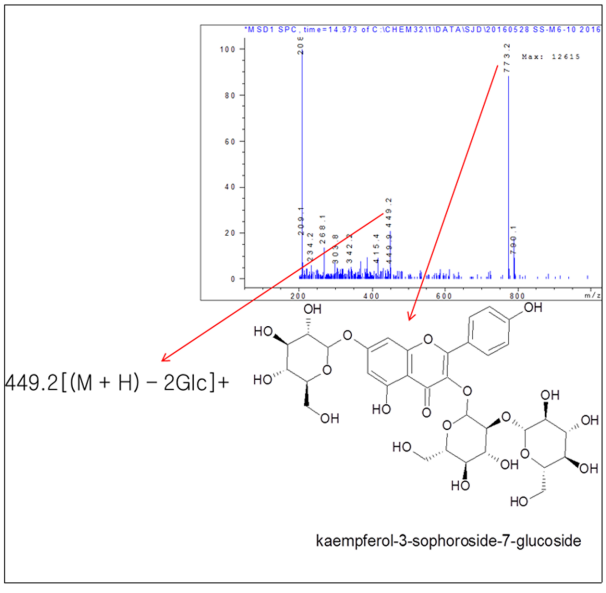

Fig. 6. MS spectrum with its chemical structure of peak 3 of the crude extract of the stem part of *E. hyemale.*

결 론

속새 줄기와 뿌리의 추출물에서 항산화 물질의 작용에 관한 결과를 이미 보고하였으며, 항산화 성분은 분석되지 않았다. 본 연구의 목적은 속새 줄기와 뿌리 부분의 성분을 추출한 물질들이 항산화 물질의 분자 구조를 확인하는 것이었다. 성분분석은 열수와 70% 에틸알코올과 100% 에틸알코올로 추출하여 HPLC와 LC-MS로 분석하였다.

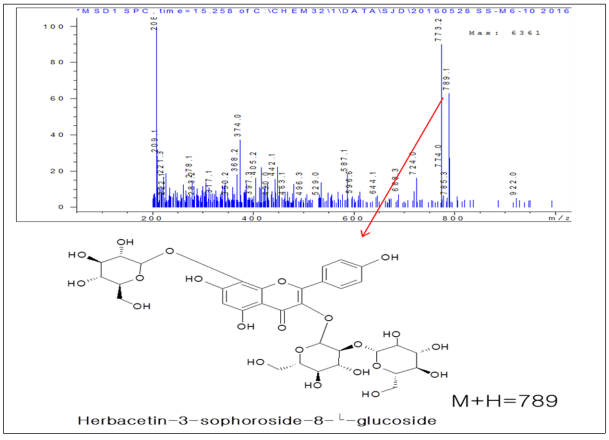

Fig. 7. MS spectrum with its chemical structure of peak 4 of the crude extract of the stem part of *E. hyemale.*

1. 속새 추출물의 줄기와 뿌리 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출파장 205 nm에서 4개의 중요한 peak가 나타났다. peak 1번은 280 nm 근처에서 최고 흡광도를 나타내는 전형적인 단순 페놀릭형이고, peak 2~4는 모두 280 nm에서의 흡광도 peak와 370 nm 근처에서의 흡광도 peak을 모두 가지는 전형적인 플라보노이드 배당체의 형태임을 알 수 있었다.

2. 메탄올에 용해한 추출물의 HPLC로 분석에서는 각 peak의 조성은 열수(HW), 70%에탄올와 100% 에탄올 추출물이 유사하였으나, 205 nm 파장에서는 각 peak의 크기가 100% 에탄올 < 70% 에타올 < HW 순위로 열수에서 높았다.

3. HPLC 분석 결과는 추출물의 항산화도는 ABTS 자유기 소거능을 나타내는 740 nm에서의 peak의 합을 보면, 100% 에탄올이 3,669 mAU로 제일 높았고, 70% 에탄올은 3,096 mAU, HW는 2,868 mAU로 제일 낮았다.

4. 추출물 내의 항산화 물질을 LC-MS 분석에서는 peak 3에서는 분자량이 772 da인 kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside, peak 4에서는 분자량이 788 및 772인 물질 kaempferol-3-sophoroside-8-glucoside인 것으로 확인되었다.

결론적으로 이상의 결과는 이미 보고한 속새의 항산화 추출물에 항산화 성분이 존재하는 것이 확인되어 속새가 기능성 화장품의 원료로서 가능성이 높아 졌다고 본다.

References

Choi, J.H., J.W. Hwang, S.G. Lee, S.H. Heo, and H. Kang. 2021. Antioxidant effect of hot water extract from 3 types Indonesia plants(*H. petal, M. oleifera, and N. fruticans*). J. Naturopathy 10(1): 42-47. doi:10.33562/JN.2021.10.1.6

Choi, B.Y. and H.H. Lee. 2016. Antioxidant and physiological activities of *Coriolus versicolor* fruit body crude extracts. J. Kor. Acad. Indust. Co. Soc. 17(8): 415-422.

Choi, B.Y. and H.H. Lee. 2017. Amino acids in hot and methanol extracts of *Cariolus versicolor* fruit body. J. Naturopathy 6(1&2): 16-22.

Korean Association for the Prevention of Geriatric Diseases. 2007. Encyclopedia of herbal medicine. Itembooks Pub., Seoul. p.457.

Lee, S.G., D.J. Jo, H.J. Chang, and H. Kang. 2015. Antioxidant and anti-inflammaory activities of ethanol extracts from *Aralia continentalis* Kitagawa. J. Naturopathy 4(1&2): 10-14.

Lee, S.G., S.Y. Park, I.C Hwang, and H. Kang. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract from *Fagopyum tataricum*. J. Naturopathy 5(1&2): 9-14.

Park, J.C. 2015. Herbal medicine great encyclopedia. Paju, Kyunggido.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26(9): 1231-1237.

Seung, H.G. and Y.H. Lee. 2014. New herbal medicine Donguibogam. Blue-Happy Pub., Goyang, Kyungkido.

Song, J.H. and G.R. Lee. 2021. Antioxidant and elastase inhibitory effects of *Equisetum hyemale* extracts. J. Naturopathy 10(2): 85-91.

Yang, H.J. and S.N. Park. 2007. Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum arvense* extracts. J. Soc. Cosmet. Scientists Kor. 33(3):139-144.