J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 31, No. 2, June 2005, 189-196

익모초 추출물의 항산화 작용에 관한 연구

김 지 영† · 이 연 희** · 김 주 연* · 노 보 경

중앙대학교 약용식물학, *서경대학교 미용예술학과, **혜전대학 피부미용과
(2005년 5월 20일 접수, 2005년 6월 15일 채택)

Study of Antioxidation Action of *Lenonuri herba* Extract

Jee Young Kim†, Youn Hee Lee, Ju Youn Kim, and Bo Kyung Roh

The medical use Botany Classroom, Chungang University, 221, Heukseok 1-dong, Dongjak-gu, Seoul, Korea
*Department of Beauty art School, Seokyeong University
**Department of Skin and Beauty, Hyejeon College
(Received May 20, 2005; Accepted June 15, 2005)

요 약: 익모초(*Leonurus sibiricus L*)는 한국, 중국, 일본, 아시아 각지에 야생으로 자생하는 2년생 초본으로 꿀풀과(*Labiatae*) 식물로 높이 1.5~2 m 정도 자란다. 약효로는 부인병의 각종 자궁질환, 활혈, 조경, 이뇨, 소증 효과는 물론 혈변, 혈뇨, 치질, 대·소변 불통 등의 치료제로 사용한다. 그 외에 고혈압, 강심작용, 항암연구도 활발하다. 익모초의 $CHCl_3$ 엑스와 MeOH 엑스를 H_2O, 30% MeOH, 60% MeOH, 100% MeOH로 분획하였고, 이 5가지 분획물들에 대하여 activity guided fractionation 방법에 따라 DPPH free radical에 대한 scavenging activity와 LDL의 lipid peroxidation을 이용한 TBARS assay로 항산화 활성실험을 측정하였다. 그 결과 익모초의 MeOH 엑스는 30% MeOH, 60% MeOH 분획물이 항산화 활성이 증가하였으며, Vitamin C와 비교해 볼 때 강한 활성을 나타내었다. 또한 pyrogallol을 이용한 SOD 활성에서도 250 ppm에서는 Vitamin C 보다 우수한 유사 활성을 보였다. 이상과 같이 익모초로부터 비교적 강한 항산화 활성을 확인할 수 있어 천연항산화 기능성 화장품의 개발이 가능하리라 보여진다.

Abstract: Motherwort (*Leonurus sibiricus L*), a hemp nettle (*Labiatae*) plant, grows about 1.5~2 m high spontaneously to wildness in Korea, China, Japan, and other Asian place. Its medical applications includes women's uterine disease, urination, bloody stool, bloody urine, and hemorrhoids. It's also effective for high blood pressure, heart stimulation, and anti-cancer acitivity. We first prepared chlroform and methanol extracts of motherwort and then they were fractionated using water, 30% methanol, 60% methanol, and 100% methanol, respectively. Each fractionates is assayed for free radical scavenging activities against DPPH and anti-oxidant activity by TBARS assay measuring lipid peroxidation using LDL. The 30% and 60% methnal fractionates of methanol extracts showed strong anti-oxidant activity compared to vitamin C. They also had more potent SOD activity using pyrogallol at 250 ppm than that of vitamin C. These results suggest that anti-oxidant activities of motherwort may be applicable to development of natural anti-oxidant cosmetics. Possibility of nature antioxidation ability cosmetics is seen possibility low official.

Keywords: *DPPH, scavenging activity, LDL lipidperoxidation, TBARS assay*

1. 서 론

익모초의 기원은 *Leonurus japonicus* (= *L. heterophyllus*, 중국) 또는 *L. sibiricus*로 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하며 약물로는 신농본초경 상품에 충울(茺蔚)로 처음 기재되어 있다. 한국, 중국, 일본 등 각지에서 잘 자라며 우리나라에서는 특별히 재배는 하지 않고 야생하는 것을 채집 시판하고 있으며, 전국 각지에 자생하고 암눈비앗 또는 충위라고도 한다[1].

우리나라, 중국, 일본, 아시아 각지에 자생하는 것은 2년생 초본으로서 높이 1.5 ~ 2 m 정도이다. 잎은 3심열 또는 전열하며 열편은 우상으로 대생한다. 꽃은 2년생이 되는 해에 상부의 엽액에 심홍자색의 압술 모양의 꽃이 윤생으로 핀다. 과실은 5분과로 모가지고 숙존악에 속에 있다.

† 주 저자 (e-mail: moira1310@naver.com)

이 약초는 네모난 줄기와 여기에 달린 잎과 꽃으로 되어 있고 줄기는 길이 30 ~ 60 cm, 지름 1 ~ 5 mm이고 황록색 ~ 녹갈색을 띠며 흰 짧은 털이 밀생되어 있다. 줄기의 꺽은 면에는 흰색의 커다란 수가 있고 질은 가볍다. 잎은 3심열 ~ 전열로 줄기에 대생으로 붙어 있고 상면은 엷은 녹색을 띠며 하면은 흰색의 짧은 털이 밀생하고 회녹색이다. 꽃은 엽액에 윤생으로 밀생되고 꽃받침은 통상으로 끝이 5갈래로 갈라지며 엷은 녹색 ~ 녹갈색이다. 꽃잎은 순형으로 엷은 적자색 ~ 갈색이다. 이 약초는 특이한 냄새가 있고 맛은 쓰고 수렴성이 있다[2].

주성분으로는 전초에 alkaloid로서 leonurine, leonuridine, strachydrine, stachynose, flavonoid로서 rutin 그 외에 protocathecol, benzioc acid를 비롯해 비타민 A와 지방유 등의 성분이 함유된 것으로 밝혀졌으며[3,4], 약리학적 연구로는 leonurin을 토끼에 정맥주사하여 이뇨작용, 용혈작용을 일으키고, essential oil 추출물은 배뇨촉진 활성을 가지며 토끼의 자궁에서 자율운동 감소 및 이완을 일으키며, 또한 혈관수축을 유발하고 저혈 증세를 나타냄으로 최근 소련에서 고혈압증의 임상용으로 사용하여 좋은 성과를 얻었다는 보고와 함께[1,3] 항암작용도 상당하여 실험에서 흰 생쥐의 암을 78% 억제했다는 보고도 있다[1]. 그러나 기타 생체에서의 약효 및 그 기전에 대한 연구의 보고는 극히 미약한 실정이다.

익모초에 대한 국내연구로서는 1984년 신이 익모초의 약효성분에 관한 연구[3], 1986년 이 등이 익모초 녹즙이 흰쥐의 위액 분비에 미치는 영향[6], 1996년 안 등이 아플라톡신에 대한 익모초의 돌연변이 억제효과[5], 1999년 김 등이 익모초 추출액이 간장해에 미치는 영향[1], 2001년 홍등이 익모초로부터 Leonurine의 분리 및 함량분석에 관한 연구[6]를 실시 보고하였다.

약효로는 전초를 한방에서 산후의 출혈, 월경불순에 사용하며, 종자는 월경불순, 시력보호 목적으로 사용하며, 우리나라에서 가장 많이 사용하고 있는 민간약 중의 하나이다[7].

노화의 원인에 대해서는 지금까지 많은 가설들이 제창되고 있으며, 노화 학설로서는 분자장애설 중의 하나인 free radical 설로서, 산화적 대사과정 중에 생체 내에서는 항상 free radical이 생성되고 있으며, 이들 대부분은 생체 내 항산화 방어계에 의하여 소모된다는 설이다. 그러나 항산화 방어계에 문제가 생기면 free fadical에 의한 세포 구성성분의 변성 및 기능장해가 야기되며, 또 free radical 증가에 의해 교원섬유가 손상되면, 이는 주름발생의 원인이 된다. 따라서 free radical을 일명 유해산소(harmful oxygen)라고도 부른다.

인체에 손상을 미치는 free radical 활성산소에는 수퍼옥사이드(superoxide), 과산화수소(hydrogen peroxide), 히드록시라디칼(hydroxy radical), 싱글렛옥시젠(singlet oxygen)이 있다. 인체내에서 free radical이 생기는 경로를 보면, 우선 산소에서 수퍼옥사이드(superoxide)가 만들어지고 다음으로 수퍼옥사이드(superoxide)에서 과산화수소(hydrogen peroxide)가 생성되며, 이 과산화수소(hydrogen peroxide)로부터 히드록시라디칼(hydroxy radical)과 싱글렛옥시젠(singlet oxygen)이 만들어 진다[8].

Tolmasoff 등은 SOD의 활성이 대사율에 비하여 높은 포유동물일수록 수명이 길다는 사실을 밝힘으로서 free radical에 의한 산화적 스트레스와 노화와의 관련설을 강력히 제시한바 있다. 이와 같이 노화와 free radical은 밀접한 관계가 있으며, 노화의 free radical설은 노화로 인한 사망 가능성이 높아지는 원인을 설명하는데 있어서 매우 유력한 가설임이 입증되고 있다.

현대인이 앓고 있는 질환 중 free radical과 관련이 있다고 하며, 그 질환에는 주로 암, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색, 간염, 신장염, 교원병, 아토피성 피부염, 파킨스병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자외선과, 방사선에 의한 질병 등이 있다고 보고되어지고 있다[9-11]. 이와 같이 free radical에 의한 산화적 스트레스가 노화 특히 피부노화의 주요원인으로 작용하며, free radical은 질병이나 스트레스로 인하여 과잉 생성되기도 하지만 정상적인 대사과정에서도 생성된다. 또한 흡연, 공해, 세균감염 등도 free radical의 생성을 증가시키는 원인이 된다[10]. 따라서 피부 노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체뿐만 아니라 피부에서 free radical 생성을 억제시키는 동시에 피부에 유해한 과잉 free radical을 제거할 수 있는 효율적인 방어망을 구축하는 것이 무엇보다도 중요하다[10].

아름답고 젊어지고 싶어하는 욕구는 인간의 오래된 꿈 가운데 하나이다. 전 세계적으로 인류의 생활수준의 비약적인 향상으로 인해 환경오염과 생태계질서 파괴가 나타나는 동시에 과학의 발달로 인간의 수명연장에 따라 좀 더 풍요롭고 여유로운 삶을 추구하며, 웰빙, 친환경, 유기농의 단어들이 속속 나오면서, 이에 걸 맞는 피부의 외간을 갖추기를 보조해줄 수 있는 신개념의 기능성화장품의 연구가 활발히 이루어지고 있다.

최근에는 의학적 효능을 강화한 화장품들이 지속적으로 개발되면서 과학과 의학을 접목시킨 뛰어난 효능의 기능성 화장품들이 탄생하면서 꿈의 실현가능성을 더욱 높여주고 있다. 천연원료로 만들어진 화장품은 효능과 안정성 면에서 기존 제품보다 뛰어난 장점을 지니고 있기 때문에 피부주름개선, 미백 등 각종 기능성 화장품 개발에 활발히 이용되어지고 있으며 무엇보다 천연물분리 기술 등과 관련 응용기술의 발전으로 식물성 원료뿐만 아니라 해양심층수, 광물 등 각종 천연물 자원을 이용한 기

능성 화장품개발이 가능해지고 있다. 따라서 아로마테라피, 스파, 마사지 등 관련제품 서비스가 급부상하고 있는 것도 화장품 관련 산업에서 나타나는 자연주의 트렌드로 볼 수 있다.

이런 분위기에 맞추어, 본 연구는 민간약으로 주로 경구투여 하여 사용된 익모초를 피부노화와 보습 및 염증과 관련하여 그 추출액이 피부에 적용가능성이 있는지와 그와 관련하여 마사지, 반신욕, 족욕 등에서 어느 정도 노화를 막아주고 효과가 있는지, 익모초 추출액의 성분에 어떠한 효능 등이 더 있는지에 대하여, 익모초를 MeOH을 이용 추출한 후 수지를 이용 분획하고 각 분획에 대하여 항산화 작용 및 항염증 실험 등을 실시하였다.

2. 시약 및 실험방법

2.1. 재 료

본 실험에 사용한 익모초는 2004년 경상북도 영천 도동 근처에서 채취하여 중앙대학교 약품자원식물학실에서 정확이 식물학적 검정을 거친 후 사용하였다.

2.2. 기구 및 시약

Balance는 Sartorius AC211S (Sartorius Co., Germany)의 것을 사용하였고, Centrifuge는 Centrikon T-1180 (Centrikon Co., Italy)와 Union 55R (Hanil science industrial Co., Korea)를 Shaking water bath는 Daihan-sci LSB-045S (Daihan science Co., Korea)를 사용하였으며 Vortex mixer는 Thermolyne type 37600 mixer (Bioworld Co., U.S.A)의 제품을 사용하였고 UV/VIS spectrophotometer로서는 Human TU-1800PC (Insung Co., Korea), HP 8453 (Hewlett packard U.S.A)의 제품을 Plethysmometer는 model 7140 Ugo Basile (Italy)의 제품을 실험에 이용하였다.

TLC 확인시험으로서 Adsorbent는 Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Germany)를 구입하여 사용하였고, Solvent (v/v)는 $CHCl_3$: MeOH : H_2O (70 : 30 : 4)와 EtOAc : EtOH : H_2O (8 : 2 : 1)의 조성을 이용하였으며 Detection으로는 Ethanolic-$FeCl_3$ solution, 10%-H_2SO_4 in EtOH와 Vanillin-sulfuric acid solution 그리고 Dragendorf solution을 이용하였고 이를 UV-lamp (254 nm)에서 측정하였다.

Gels for Column Chromatography으로는 Diaion HP-20 (Nippon Rensui Co., Japan)을 이용하였다.

Chemical Reagent로서는 항산화 실험에 이용한 것으로서 L-Ascorbic acid (Sigma Chemical Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Ethylenediaminetetraacetic acid-2Na (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Human plasma LDL (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Potassium bromide (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Sodium azide (Sigma Chemical Co., U.S.A.), 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Thiobarbituric acid (Fluka Chemika, Germany), Trichloroacetic acid (Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 사용하였고, SOD 활성실험으로서 Pyrogallol (Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 이용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 추출 및 분획

건조된 익모초 2 kg을 절단한 뒤 MeOH로 수욕상에서 3회 열수 추출한 후 여과하고, 감압 농축하여 MeOH Ex.를 얻었다. 이 MeOH Ex를 증류수에 현탁시키고 $CHCl_3$를 가하여 진탕 반복추출하고 분액 깔대기에서 분획하여 수층과 $CHCl_3$ 층으로 분취한 후 농축하여 $CHCl_3$ Ex.를 얻었다. 수층을 Diaion HP-20를 통해 H_2O, 30%, 60%, 100% MeOH fraction으로 분획하였다(Nippon Rensui Co., Japan).

2.3.2. 분획물의 Thin Layer Chromatography 시험

익모초의 각 분획물의 가루 0.1 g을 달아 메탄올 1 mL를 넣고 녹여 이 액들을 검액으로 한다. 검액을 각각 20 μL씩을 박층크로마토그래프용 실리카 겔을 써서 만든 박층판에 점적하고 다음에 클로르포름 : 메탄올 : 물 = 70 : 30 : 4를 전개용매로 하여 전개하였다. 각각 약 10 cm 전개한 다음 박층판을 바람에 말렸다. 여기에 10% 황산시액을 고르게 뿌리고 105℃에서 잠시 가열하여 얻은 박층판(Figure 1)과 vanillin-sulfuric acid 시액을 고르게 뿌린 다음 120℃에서 잠시 가열하여 박층판(Figure 2)을 바람에 말렸다. 그리고 dragendorf 시액을 고르게 뿌린 다음 105℃에서 잠시 가열하여 얻은 박층판(Figure 3)으로 확인 시험하였고, 마지막으로 Ethanolic-$FeCl_3$ solution 시액을 뿌린 다음 박층판(Figure 4)을 바람에 말려 확인시험하였다. 다음 그림에서 좌측에서 순서대로 물 분획물, 30% MeOH, 60% MeOH, 100% MeOH, $CHCl_3$의 순서임을 나타낸다.

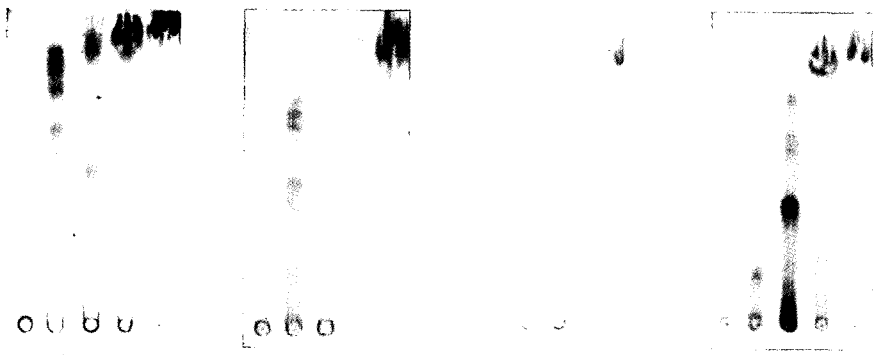


Figure 1 Figure 2 Figure 3 Figure 4

Figure 1. TLC of the Extract from *Lenonuri Herba* in 10% H_2SO_4.
Figure 2. TLC of the Extract from *Lenonuri Herba* in vanillin sulfuric acid solution.
Figure 3. TLC of the Extract from *Lenonuri Herba* in dragendorf solution.
Figure 4. TLC of the Extract from *Lenonuri Herba* in Ethanolic-$FeCl_3$ solution.

2.3.3. DPPH를 이용한 항산화능 측정

각 시료 조제
분획시료조제
Ascorbic acid soln. 조제(0.1 mg/mL)
0.1 mM DPPH조제(39.43 mg/1000 mL)
↓
시료 0.1 mL + 0.1 mM DPPH 1.9 mL
↓
Vortex mixer 진탕
↓
Incubation
↓
흡광도측정 (515 nm)

$$EDA\ \% = \frac{Control\ O.D. - Sample\ O.D}{Control\ O.D.} \times 100$$

Sample O.D. = 시료를 가한 시험액의 흡광도
Control O.D. = EtOH 0.1 mL + 0.1 mM DPPH 1.9 mL

Scheme 1. Measurement of free radical scavenging activity[12].

Table 2. IC_{50} Values of Fractions against the DPPH Radical

Sample	IC_{50} (μg/mL)
L-Ascorbic acid	7.508 ± 0.432
H_2O Fr.	462.326 ± 1.238
30% MeOH Fr.	103.771 ± 0.348*
60% MeOH Fr.	26.341 ± 0.552**
100% MeOH Fr.	72.582 ± 0.414*
$CHCl_3$ Fr.	182.676 ± 2.044

Each value represents the mean ± S.D. (n=2)
Significantly different from negative control : *p<0.05 **p<0.01

2.3.4. LDL 산화에 대한 억제 효과 측정

2.3.4.1. TBARS Assay를 이용한 지질과산화에 미치는 영향

Human plasma LDL(400 μg 단백질), 1 mM $CuSO_4$ 16 μL, 농도별로 조제한 각 시료(2000, 1000, 500, 250 ppm)

Table 1. The Free Radical Scavenging Activities of Fractions on DPPH

Sample \ EDA% / Conc ppm	EDA% 2000	EDA% 1000	EDA% 500	EDA% 250
H_2O Fraction	16.827 ± 1.077	10.631 ± 0.119*	7.563 ± 1.227	6.850 ± 1.278
30% MeOH Fraction	47.353 ± 0.518*	2.141 ± 1.058	20.259 ± 2.049*	14.165 ± 0.708
60% MeOH Fraction	89.892 ± 0.432**	4.680 ± 0.062**	53.054 ± 0.917*	35.762 ± 0.615*
100% MeOH Fraction	61.678 ± 1.011*	42.001 ± 2.021*	27.443 ± 0.735*	18.674 ± 0.463
$CHCl_3$ Fraction	28.839 ± 2.030	21.480 ± 0.647*	12.813 ± 1.125	9.555 ± 0.165
L- Ascorbic acid	94.503 ± 0.451**	95.973 ± 0.923*	69.895 ± 0.894**	49.389 ± 1.035*

Each value represents the mean ± S.D. (n=2)
Significantly different from negative control : *p < 0.05 **p < 0.01

Table 3. Effect of Extracts and Fractions from Lenonuri Herba on Cu^{2}+-induced Lipid Peroxidation

MDA / ppm / Sample	MDA (nmol/mg protein)			
	2000	1000	500	250
LDL		0.978±0.032*		
Ox-LDL		8.806±0.067		
H_20 Fr.	2.997 ± 1.030*	3.360 ± 0.436*	5.521 ± 1.058	7.129 ± 2.021*
30% MeOH Fr.	2.808 ± 0.915*	4.148 ± 1.012*	4.511 ± 2.724*	5.299 ± 1.722*
60% MeOH Fr.	2.003 ± 0.553	2.429 ± 0.657	3.139 ± 1.409**	5.741 ± 3.447
100% MeOH Fr.	2.634 ± 0.430*	3.785 ± 2.017*	5.820 ± 0.771	8.533 ± 0.750*
CHC_3 Fr.	4.274 ± 1.428*	6.357 ± 1.025*	7.476 ± 0.520*	9.811 ± 2.021*
L-Ascorbic acid	3.202 ± 2.109**	3.628 ± 0.711*	3.785 ± 0.894**	5.094 ± 3.018*

LDL : unoxidized LDL
Ox-LDL : Cu^{2+}-induced oxidized LDL
Each value represents the mean ± S.E. (n = 2)
Significantly different from negative control : *p < 0.05 **p < 0.01

Table 4. Effect of Extracts and Fractions from *Lenonuri herba* on Cu^{2+}-induced Lipid Peroxidation (IC_{50})

Sample	IC_{50} (μg/mL)
L-Ascorbic acid	6.415 ± 1.342
H_20 Fr.	29.991 ± 2.553
30% MeOH Fr.	14.308 ± 0.873
60% MeOH Fr.	12.470 ± 0.984**
100% MeOH Fr.	34.369 ± 2.069
$CHCl_3$ Fr.	53.324 ± 0.923*

$$Inhibition(\%) = \frac{[Ox-LDL]-[Sample\,LDL]}{[Ox-LDL]-[LDL]}$$

[Ox-LDL] : MDA of Cu^{2+}-induced oxidized LDL
[Sample LDL] : MDA of Sample added oxidized LDL
[LDL] : MDA of unoxidized LDL
IC_{50} : Required sample concentration (μg/mL) for 50% inhibition of Cu^{2+}-induced LDL lipid peroxidation

100 μL에 PBS (pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 mL가 되도록 한다. Vortex mixer로 혼화하여 37℃ 수욕상에서 4 h 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μL를 첨가하여 산화를 중지시킨다.

(Sartorius AC211S (Germany))
(Daihan-sci LSB-045S (Korea))
(Thermolyne type 37600 mixer, U.S.A))

산화된 LDL용액에 25% trichloroacetic acid 1 mL를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상징액에 1% thiobarbituric acid 1 mL를 첨가하여 95℃에서 발색시킨 후 냉각시킨다. 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정한다.

(Human TU-1800PC (Korea))
(Centrikon T-1180 (Italy))
(Hanil science industrial Co.Union 55R (Korea)

MDA 표준시료로는 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용한다.

MDA 농도(nM/ml) = (f/F) × 10
F : 표준시료의 흡광도(532 nm)
f : 검체의 흡광도(532 nm)

각 시료의 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu^{2+}에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC_{50})를 측정한다.

2.3.5. Superoxide Dismutase 활성측정

SOD 활성은 Marklund 등의 방법에 따라 각 분획을 (50 mM tris buffer + 10 mM EDTA, pH 8.5)의 3000, 2000, 1000, 500 및 250 ppm 5가지 농도로 조제한 용액 0.1 mL에 7.2 mM pyrogallol 0.1 mL와 50 mM tris buffer + 10 mM EDTA, pH 8.5 1.3 mL를 가하였다. votex로 2 sec간 진탕한 후 37℃에서 10 min간 I항온배양하였다. 이 후 spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정의 증가율을 2 min간 측정하여 안정할 때의 흡광도를 이용하였다. 양성 대조약물로서는 L-ascorbic acid를 3000, 2000, 1000, 500, 250 ppm (50 mM tris buffer + 10 mM EDTA, pH 8.5)의 5가지 농도로 조제하여 측정하였다. 그리고 항온배양 전 후의 흡광도 비교를 위해 항온배양하지 않은 한 군을 따로 위와 같은 과정을 거쳐 항온배양 과정을 제외하여 실험을 이행하였다.

각 시료의 항산화작용은 아래와 같은 SOD activity (%)를 이용하였다.

$$\text{SOD activity}(\%) = \left(1-\frac{C-D}{A-B}\right) \times 100$$

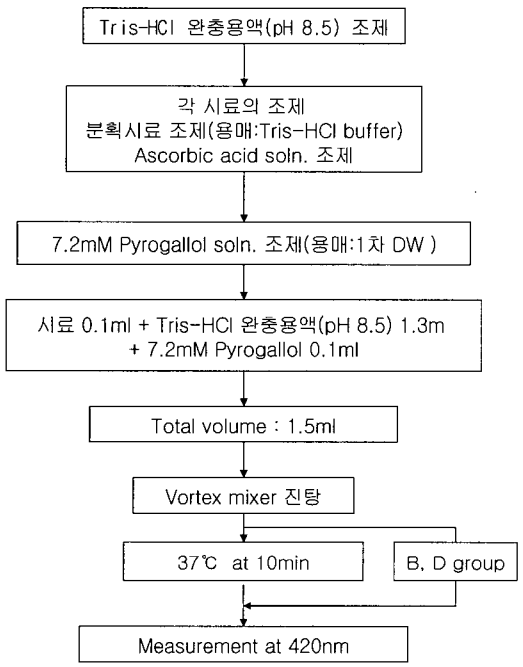
A : Absorbance at 420 nm without test sample after

Table 5. The SOD Activity of Fraction from *Lenonuri herba* on Pyrogallol

SOD (%) / Sample \ ppm	SOD activity (%)				
	3000	2000	1000	500	250
H_2O Fr.	7.325 ± 1.071	14.777 ± 2.046*	13.121 ± 1.151	12.739 ± 3.103	9.682 ± 1.045*
30% MeOH Fr.	6.051 ± 2.094	16.688 ± 3.562	13.758 ± 2.022*	11.847 ± 2.642*	10.701 ± 3.167
60% MeOH Fr.	25.860 ± 0.951	22.675 ± 0.934*	15.414 ± 0.848*	11.847 ± 0.931*	8.662 ± 2.098
100% MeOH Fr.	16.433 ± 0.853	13.503 ± 2.173	9.809 ± 1.433*	6.752 ± 0.748*	1.911 ± 1.673
$CHCl_3$ Fr.	13.248 ± 1.467	13.121 ± 1.031*	9.682 ± 2.606	6.369 ± 1.214*	1.146 ± 0.921**
L-Ascorbic acid	98.981 ± 0.544*	97.580 ± 0.843*	57.580 ± 1.433*	21.274 ± 1.005**	0.510 ± 1.749*

Each value represents the mean ± S.E. (n = 2)
Significantly different from negative control : *p < 0.05 **p < 0.01

incubation
B : Absorbance at 420 nm without test sample before incubation
C : Absorbance at 420 nm with test sample after incubation
D : Absorbance at 420 nm with test sample before incubation



Scheme 2. Procedure of TBARS assay on Cu^{2+}-induced oxidized LDL.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분획물의 Thin Laver Cromatography 확인 시험

각 분획별 TLC 패턴은 4가지 서로 다른 검출방법으로 확인 시험한 결과 전반적인 패턴형태는 유사하게 관찰되었다. Figure 1과 Figure 2의 TLC는 각 분획물에 따른 패턴을 알아보기 위한 것으로서 각 30% 메탄올과 60% 메탄올 분획물에서 다양한 성분들이 확인됨에 따라 그 성분의 계열을 위해 Figure 3과 Figure 4와 같이 검출방법을 달리하여 확인시험 하였다.

Dragendorf solution에서 보여지는 60% 메탄올 분획물에서는 alkaloids로 예상되는 물질이 Rf 치가 서로 다른 3개의 위치에서 확인되었고, 또한 phenolics로 예상되는 물질은 2% Ethanolic-$FeCl_3$ solution 관찰되었는데 이 역시 Rf 치가 3개의 위치에서 확인되었다. 한편 30%메탄올 분획물에서는 Figure 5에서 보듯이 phenolics로 예상되는 물질이 일부 관찰되었다.

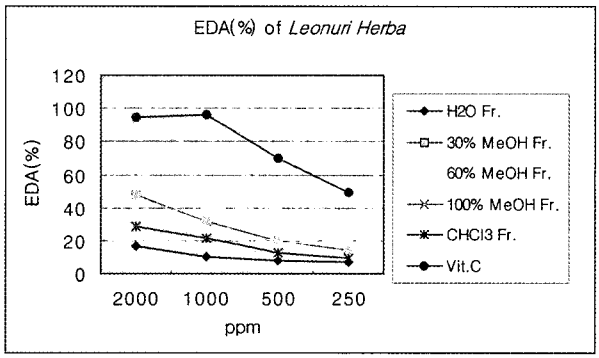


Figure 5. The free radical scavenging activities of *Lenonuri Herba* on DPPH.

3.2. 분리된 분획 및 성분의 활성실험

3.2.1. DPPH를 이용한 항산화능 측정

익모초의 분획을 농도별로(250 ~ 2000 ppm)조제하여 실험한 결과 익모초의 free radical scavenging activity가 우수하였으며 IC_{50} (μg/mL)가 H_2O 462.326 ± 1.238 μg/mL < $CHCl_3$ 182.676 ± 2.044 μg/mL < 30% MeOH 103.771 ±

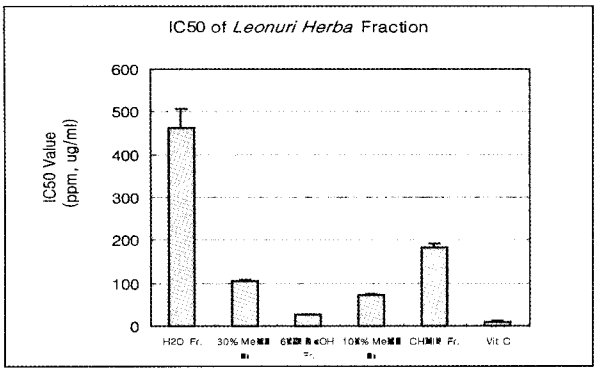


Figure 6. IC_{50} Values of fraction from *Lenonuri herba* on DPPH.

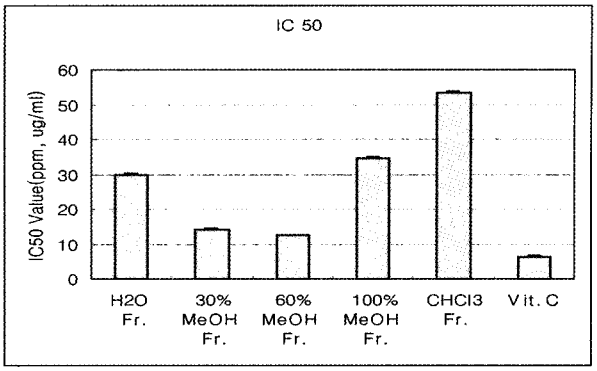


Figure 8. IC_{50} value of fractions from *Lenonuri herba* on Cu^{2+}-induced lipid peroxidation.

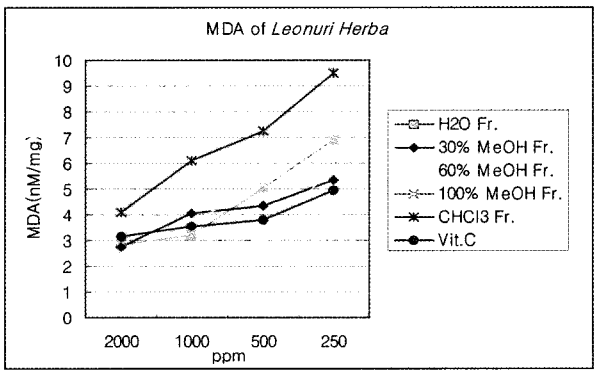


Figure 7. Effect of fraction from *Lenonuri herba* on Cu^{2+}-induced lipid peroxidation.

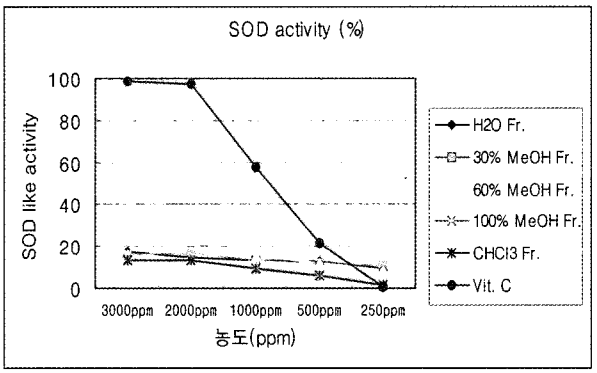


Figure 9. The SOD activity of fraction from *Lenonuri herba* on pyrogallol.

0.348 μg/mL < 100% MeOH 72.582 ± 0.414 μg/mL < 60% MeOH 26.341 ± 0.552 μg/mL의 순으로 나타났다. 그리고 60% MeOH 분획물이 위의 IC_{50} 수치를 보았을 때 강한 free radical scavenging activity를 나타내었다(Figure 5).

3.2.2. LDL 산화에 대한 억제효과 측정

익모초의 각각의 분획을 농도별로(250 ~ 2000 ppm) 조제하여 실험한 결과 익모초의 지질과산화에 대한 억제활성은 우수하였으며, IC_{50} (μg/mL)은 $CHCl_3$ 53.324 ± 0.923* μg/mL < 100% MeOH 21.420 ± 1.563 μg/mL< H_2O 29.991 ± 2.553 μg/mL < 60% MeOH 12.470 ± 0.984 μg/mL 분획순으로 우수하게 나타났다. 60% MeOH, 30% MeOH의 분획물의 항산화작용 활성이 강하게 나타내었으며, 특히 60% MeOH의 분획물은 DPPH의 IC_{50}에서도 가장 우수한 항산화작용 활성을 나타내었다.

3.2.3. Superoxide Dismutase 활성 측정

익모초의 각각의 분획을 농도별로(250 ~ 3000 ppm) 조제하여 실험한 결과 익모초의 SOD 활성은 30% MeOH의 분획물에서 25.86%라는 비교적 높은 수치를 나타내었으며 다른 농도에서도 활성을 나타내고 있었다. 500 ~ 3000 ppm까지는 Vit. C와 비교하여 보았을 때는 활성이 상대적으로 낮지만 250 ppm의 농도에서는 60% MeOH 분획물과 30% MeOH의 분획물 등에서의 활성이 Vit. C보다 SOD 활성이 강하게 나타내었다. 이는 실제로 *in vivo*상에서의 혈중농도에서는 그 약물의 농도는 상대적으로 낮은 경향이 있는데 이는, 위의 분획에서의 실제 적용시에는 VitC보다 SOD 활성이 더 높게 나타날 수 있다는 것을 시사한다. SOD는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화 수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD에 생성된 과산화수소는 peroxidase나 catalase에 의하여 물분자와 산소분자로 전환시켜 산소상해로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려 있다. 그러나 SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하며 열에 약하여 70℃ 이상의 온도에서 쉽게 불활성화 되며 pH 10 이상에서는 매우 불안정한 단점을 가지고 있다. 따라서 이를 보완할 수 있는 저분자 물질이 필요한 상황이며 이에 위의 익모초 분획물들은 비

교적 저분자 물질이며 온도나 유기 용매 등에 비교적 안정한 물질한 저분자 SOD 활성을 지닌 물질로서 개발 가능성이 있다고 볼 수 있을 것이다.

4. 결 론

실험결과 각분획별 TLC 패턴을 알아보았다. 60% 메탄올 분획물에서 phenolics로 예상되는 물질과 alkaloids로 예상되는 물질이 관찰되었고 30% 메탄올 분획물에서는 phenolics로 예상되는 물질이 일부 확인되었고, 이를 바탕으로 DPPH free radical에 대한 scavenging activity와 LDL의 lipidperoxidation을 이용한 TBARS assay로 항산화 활성을 실험하였다. 그 결과 대부분의 H_2O 분획물과 100% MeOH 분획물을 제외한 30% MeOH, 60% MeOH 분획물은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였으며, 이 두 분획물은 Vitamin C와 비교해 볼 때 강한 활성을 나타내었다. 또한 pyrogallol를 이용한 SOD 활성을 보았을 때는 모든 농도에서 비슷한 활성도를 나타내었고, 특히 250 ppm에서는 Vitamin C보다 우수한 활성을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. 김학순, 윤수홍, 익모초 추출액이 간장해에 미치는 영향, *생약학회지*, **5**(2), 93 (1999).
2. 본초학, 한국생약학 교수 협의회 (1994).
3. 신순이, 익모초의 약효 성분에 관한 연구, *생약학회지* **15**(2), 104 (1984).
4. 서화중, 이명렬, 益母草 絞汁이 흰쥐의 胃液分泌機能에 미치는 影響, *한국식품영양과학학회지*, **15**(4), 47 (1986).
5. 안병용, 이갑상, 맹일경, 송근섭, 최동성, 아플라톡신에 대한 익모초의 돌연변이 억제 효과, *한국식품영양학회지*, **9**(3), 294 (1996).
6. 홍성수, 황지상, 이선아, 황방연, 하광원, 제금련, 성낙선, 노재섭, 이경순, 익모초로부터 *Leonurine*의 분리 및 함량 분석에 관한 연구, 충북대학교 약학대학 (2001).
7. 과학, 백과사전 출판사편, 약초의 성분과 이용, 일월서각, **511** (1994).
8. 임현정, 가시연의 항산화 성분, 3, 중앙대학교 약학대학 (2004).
9. 김종평, 노화 억제를 위한 항산화제 연구 **58** (2001).
10. 장진아, 노화방지 화장품의 특허동향, 보건산업기술동향, 특허동향 **89** (2001).
11. 강정란, 향유의 항산화 활성 및 멜라닌 생성억제 활성, 4, 중앙대학교 약학대학 (2004).
12 H. Sies, Oxidative stress : oxidants and antioxidants, Academic Press, N. Y (1991).
13. A. Oikarinen, The aging of skin; chronoaging versus photoaging, photodermatol. *Photoimmunol. Photomed.*, **7**, 3 (1990).
14. M. Yamanchi, P. Prisayanh, Z. Haque, and D. T. woodley, Collagen cross-linkingin sun-exposed and unexposed sites of aged human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 938 (1991).