

진달래꽃 추출물의 항산화 효과 및 인체 KB cell에 대한 세포독성

박승우[†] · 김상교 · 김미정
경상북도보건환경연구원

Antioxidative Activity and Cytotoxicity on Human KB cell of Extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. Flower

Seung-Woo Park[†], Sang-Gyo Kim and Mee-Jeoung Kim
Gyeongsangbuk-Do Institute of Health and Environment, Daegu 702-702, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the antioxidative activity and cytotoxicity on human KB cell of extract from *Rhododendron mucronulatum* flower, and also to determine the contents of total polyphenol and flavonoid. The methanol extract of *Rhododendron mucronulatum* flower was fractionated with various solvents such as hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water. The DPPH radical scavenging activities of ethyl acetate fraction had stronger activity than other fractions. So, antioxidative substances of ethyl acetate fraction were crude purified by silica gel column chromatography. The DPPH radical scavenging activities of crude purified fraction 2 and 3 were more than 90% at 40 ppm. In the presence of 100 µg/mL, growth inhibition on human KB cell by WST-1 assay showed 81.2% in chloroform fraction and 74.6% in hexane fraction. The contents of total polyphenol and flavonoid of ethyl acetate fraction were 32.70% and 20.30%, respectively. The antioxidative activity showed correlation with total polyphenol and flavonoid contents.

Key words : *Rhododendron mucronulatum*, antioxidative activity, KB cell, cytotoxicity

서 론

진달래(*Rhododendron mucronulatum* Turczaninow)는 철쭉과에 속하는 낙엽 활엽 관목으로 우리나라 전국에 야생하며 꽃은 옅은 홍색으로 4월에 잎보다 먼저 핀다(1). 진달래꽃잎과 찹쌀로 빚은 두견주는 향취가 좋은 술로 하루에 한두 잔 마시면 혈액순환을 촉진시키고 혈액 속의 콜레스테롤을 낮추며 혈압강하, 피로회복, 류마티스 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(2). 또한 진달래꽃은 강장, 이뇨, 건위와 같은 약리적 효능을 가진 것으로 알려져 있다(3). 진달래꽃에는 flavonoid 성분인 quercetin, myricetin, afzelin, quercitrin, catechin, dihydroflavonol 등이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(4). 식물체의 flavonoid 성분은 항산화, 항암, 항균, 항염증, 심장질환 및 당뇨병 예방 등 여러 가지

생리적 기능을 나타내는 것으로 보고되었다(5-8). 진달래꽃에 관한 최근의 연구로는 항산화 및 항암에 관한 연구(9), 화장품 소재 개발에 관한 연구(10), 플라보노이드 성분의 분리 및 항산화 작용에 관한 연구(4), 진달래꽃 탄화수소류의 곡자에 의한 분해(11) 등이 있다. 진달래꽃은 우리나라에 많이 분포하고 있고 전래적으로 식용으로 이용해왔던 꽃이나 생리활성에 관한 연구는 그리 많지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 진달래꽃 추출물과 부분 정제한 물질에 대하여 항산화 효과와 인체 비인두암 세포주인 KB cell에 대한 항암효과를 조사하였으며, 또한 총 폴리페놀 화합물과 플라보노이드의 함량을 측정하여 항산화성과의 상관성을 검토하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 진달래꽃은 2005년 4월 경북 군위군

[†]Corresponding author. E-mail : prince4692@hanmail.net,
Phone : 82-53-602-5323, Fax : 82-53-956-9094

부계면 춘산리 일대의 야산에서 채취하여 실온에서 1주간 음건한 후 분말로 하여 재료로 사용하였다.

추출물의 조제

음건한 시료(수분 13.4%) 250 g에 10배량의 메탄올을 가하여 3회 환류 추출하여 농축한 후 메탄올 조추출물로 하였다. 조추출물에 10% 메탄올을 가하여 용해한 후 용매의 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올 순으로 순차 분획하고 분획물을 감압 농축하여 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

에칠아세테이트 분획의 부분 정제

항산화 활성이 높게 나타난 에칠아세테이트 분획을 silica gel column chromatography를 통하여 부분 정제하였다. 유리 칼럼(2.5×40 cm)에 활성화 시킨 silica gel G(230 mesh) 60 g을 충전하고 평형화 시킨 후 에칠아세테이트 분획물 8.4 g 중 2 g을 loading 하였다. 클로로포름 500 mL를 흘려보낸 후 CHCl₃:MeOH(5:1), CHCl₃:MeOH(3:1), CHCl₃:MeOH(1:1), MeOH, 각각 500 mL로 용출하여 감압농축한 후 용출순서에 따라 fraction 1, 2, 3, 4로 하였다.

항산화 활성 측정

항산화 활성은 DPPH(2,2-dipicryl-1-picrylhydrazyl) radical 소거활성을 측정하는 방법으로 Blois의 방법(12)을 약간 변형하여 다음의 방법으로 시험하였다. DPPH 16 mg을 에탄올 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 가하고 여과지로 여과하였다. DPPH 용액은 대조구의 흡광도가 1.0 정도 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. DPPH 용액 4 mL에 에탄올에 녹인 시료 1 mL를 20 ppm 및 40 ppm 농도로 가하여 혼합한 후 10분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도(JASCO Spectrophotometer, V-560, Japan)를 측정하였다. 3회 반복 실험 후 평균값으로 나타내었다.

세포독성 시험

본 실험에는 인체 비인두암 세포인 KB cell을 사용하였다. 세포의 배양은 KB cell을 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 minimum essential medium (MEM)에 pencillin/streptomycin 100 µg/mL을 첨가하여 성장배지로 사용하고 37°C, 5% CO₂ 조건을 갖춘 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포독성은 WST-1 assay(13)로 측정하였다. 96 well plate에 대수증식기의 KB cell을 세포수 5×10³ 농도로 각 well에 첨가하고 1개의 well에는 세포 부유액 대신 배지만 넣어 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. Plate를 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 각 well에 시료를 50 µg/mL와 100 µg/mL 농도가 되도록 100 µL씩 분주하였다. 세포 부유액을 넣은 well 중 마지막 well에는 시료 대신 PBS를 첨가하여 100% 생존군(control)으로 하였다. 시료를 첨가한 plate를

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 WST-1 reagent 10 µL씩을 첨가한 후 3시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 ELISA reader(Behring ELISA Processor II, Germany)로 파장, 450 nm(ref. 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 실시하여 평균값을 사용하였으며, 실험군의 암세포 성장 저해율은 대조군에 대한 저해율로 나타내었다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(14)에 따라 측정하였다. 시료 1 mL에 Folin-Ciocalteu reagent 5 mL를 가하여 3분간 방치 후 10% Na₂CO₃ 용액 5 mL를 가하였다. 1시간 정치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 gallic acid를 이용하여 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 3회 반복 실험 후 평균값으로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법(15)에 의하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 80% 에탄올 4.3 mL를 각각 가하여 실온에서 40분간 방치한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 quercetin을 이용하여 작성하였으며, 총 플라보노이드 함량은 3회 반복 실험 후 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

항산화 활성

진달래꽃 메탄올 추출물의 용매 분획별 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 항산화 활성을 측정하는 방법의 하나인 DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정한 결과, 에칠아세테이트 분획, 메탄올 조추출물, 부탄올 분획 순으로 활성이 높게 나타났다. 에칠아세테이트 분획은 대조군으로 사용한 α-tocopherol 보다 높은 활성을 나타내었는데 20 ppm 농도에서 84.2%, 40 ppm 농도에서 94.5%의 활성을 나타내었다. 반면 헥산과 물 분획은 항산화 활성이 거의 나타나지 않았다. 이상의 결과로 미루어 진달래꽃의 에칠아세테이트 분획에는 강력한 항산화 물질이 존재하는 것으로 판단되었다. 항산화 활성이 높게 나타난 에칠아세테이트 분획을 silica gel column을 이용하여 부분 정제한 후 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 모든 분획에서 α-tocopherol 보다 높은 활성을 나타내었으며 특히, fraction 2와 3은 40 ppm 농도에서 90% 이상의 항산화 활성을 나타내었다. An 등(9)이 진달래꽃 에탄올 추출물을 50 ppm 농도에서 실험한 결과 60%의 활성을 나타내었다는 보고와 비교하여 본 실험의 메탄올 추출물이 높은 활성을 보여주었다.

Table 1. Antioxidative activities on DPPH radical of methanol extract and different solvent fraction of *Rhododendron mucronulatum* flower

Fractions	Electron donating ability(%)	
	20 ppm	40 ppm
MeOH	58.6	67.3
Hexane	11.5	20.2
CHCl ₃	26.5	42.1
EtOAc	84.2	94.5
BuOH	43.7	60.4
Water	3.4	7.4
α -Tocopherol	58.8	75.5

Table 2. Antioxidative activities on DPPH radical of different fraction by silica gel column chromatography from ethyl acetate fraction

Fractions	Electron donating ability(%)	
	20 ppm	40 ppm
Fraction 1	62.0	78.3
Fraction 2	81.8	90.5
Fraction 3	89.6	96.3
Fraction 4	68.6	81.2
α -Tocopherol	58.8	75.5

Fraction 1; CHCl₃:MeOH(5:1), Fraction 2; CHCl₃:MeOH(3:1),
Fraction 3; CHCl₃:MeOH(1:1), Fraction 4; MeOH.

KB cell에 대한 세포독성

인체 비인두암 세포주인 KB cell에 대한 진달래꽃 추출물의 세포독성을 WST-1 assay 로 실험한 결과는 Table 3과 같다. WST-1 assay는 세포독성 실험방법으로 많이 이용되는 MIT assay에 비하여 감도가 좋고 유기용제에 의한 가용화가 필요하지 않아 시간을 단축시킬 수 있는 새로운 방법으로 알려져 있다. 메탄올 추출물의 용매 분획별 암세포 성장 저해율은 클로로포름과 헥산, 에칠아세테이트 분획 순으로 높게 나타났다. 100 μ g/mL 농도에서 클로로포름과 헥산 분획은 70% 이상의 KB cell 성장을 저해하였다. 항산화 활성이 높게 나타난 에칠아세테이트 분획을 silica gel로 부분 정제한 분획에서는 fraction 1이 가장 높은 활성을 나타내었다. 항산화 실험 결과와 비교할 때 항암 작용을 나타내는 성분은 클로로포름 분획에서 가장 높은 것으로 나타나 항산화 작용과 항암 작용을 나타내는 성분은 다른 물질에 의한 것으로 생각된다. 향후 여러 가지 암 세포주에 대한 항암 활성과 항암 성분에 대한 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

총 폴리페놀 함량

진달래꽃 메탄올 추출물의 각 용매 분획과 에칠아세테이트 분획을 silica gel로 부분 정제한 분획의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 7.12%였고, 메탄올 추출물을 순차용매 분획

Table 3. Growth inhibitory effect of different solvent fraction of *Rhododendron mucronulatum* flower on human KB cell

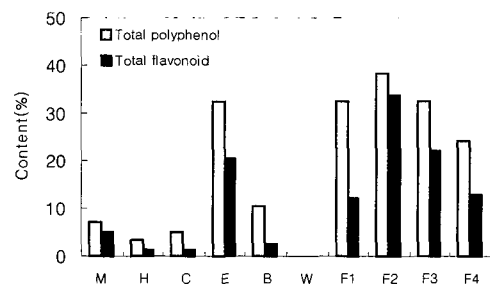
Samples	Fractions	Cell growth inhibition(%)	
		50 μ g/mL	100 μ g/mL
MeOH	Hexane	37.1	74.6
	CHCl ₃	72.3	81.2
	EtOAc	23.0	68.3
	BuOH	10.9	8.5
	Water	0.0	6.2
EtOAc	Fraction 1	20.1	70.1
	Fraction 2	14.8	64.8
	Fraction 3	12.3	30.3
	Fraction 4	12.6	29.7

Fraction 1; CHCl₃:MeOH(5:1), Fraction 2; CHCl₃:MeOH(3:1),
Fraction 3; CHCl₃:MeOH(1:1), Fraction 4; MeOH.

했을 때는 에칠아세테이트 분획이 32.70%로 가장 높았으며 다음으로 부탄올 분획이 10.23%였다. 항산화 활성이 높았던 에칠아세테이트 분획에서 페놀화합물 함량도 높게 나타났다. 에칠아세테이트 분획을 silica gel로 부분 정제한 분획에서는 fraction 2가 가장 높은 함량을 나타내었고, fraction 1과 3이 비슷한 함량을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량

진달래꽃 메탄올 추출물의 각 용매 분획과 에칠아세테이트 분획을 부분 정제한 분획의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 메탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 5.10%였고, 메탄올 추출물을 순차용매 분획했을 때는 에칠아세테이트 분획이 20.30%로 가장 높았으며 다음으로 부탄올 분획이 2.63%였다. 총 플라보노이드의 함량도 항산화 활성이 높았던 에칠아세테이트 분획에서 높게 나타났다. 에칠아세테이트 분획을 silica gel로 부분 정제한 분획에서는 fractions 2가 33.77%, fraction 3이 21.93% 함유하고 있었다.

**Fig 1. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol extract and different solvent fraction of *Rhododendron mucronulatum* flower.**

M; MeOH extract, H; Hexane fraction, C; Chloroform fraction, E; Ethyl acetate fraction, B; Butanol fraction, W; Water fraction, F1, F2, F3 and F4; Fractions by silica gel column chromatography of ethyl acetate fraction.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화성과의 상관성

진달래꽃 추출물의 주요 성분인 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량과 항산화성과의 상관관계를 조사한 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. 추출물의 농도 20 ppm에서의 전자공여능(EDA)과 총 폴리페놀 함량과의 상관관계(Fig. 2)는 $r^2=0.8869$, 총 플라보노이드와의 상관관계는(Fig. 3)는 $r^2=0.8469$ 로 나타나 상관관계가 인정되었다. 따라서 진달래꽃 추출물의 항산화 작용은 진달래꽃에 존재하는 페놀성 화합물이 주된 역할을 하는 것으로 판단되었다.

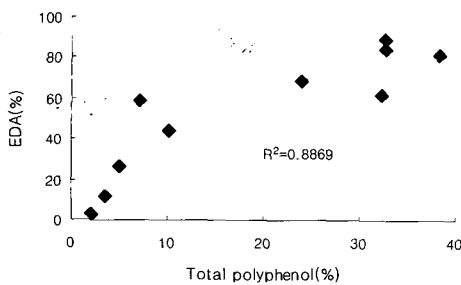


Fig. 2. Correlation of EDA and total polyphenol content.

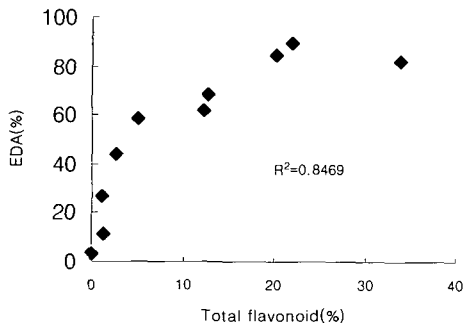


Fig. 3. Correlation of EDA and total flavonoid content.

요 약

진달래꽃 추출물의 항산화 효과와 인체 비인두암 세포인 KB cell에 대한 세포독성을 조사하였다. 또한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정하고 항산화성과의 상관성을 검토하였다. 진달래꽃 메탄올 추출물을 용매 분획하여 항산화 활성을 측정한 결과, 에칠아세테이트 분획의 활성이 가장 높게 나타났다. 에칠아세테이트 분획을 silica gel column chromatography로 부분 정제하여 항산화 실험을 한 결과 fraction 2와 3은 40 ppm 농도에서 90% 이상의 활성을 나타내었다. 인체 비인두암 세포주인 KB cell의 성장 저해

율은 100 µg/mL 농도에서 클로로포름 분획이 81.2%, 헥산 분획이 74.6% 였다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 에칠아세테이트 분획에는 총 폴리페놀 32.70%, 총 플라보노이드 20.30% 함유하고 있었다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화성과의 상관관계는 총 폴리페놀에 대하여는 $r^2=0.8869$, 총 플라보노이드에 대하여는 $r^2=0.8469$ 로 상관성이 인정되었다.

참고문헌

1. 육창수 (1990) 원색한국약용식물도감. 도서출판 아카데미서적. 서울. p.418
2. 류상채 (1993) 약이 되는 술. 서해문집. 서울. p.165
3. Chung, T.Y., Kim, M.A. and Daniel, J. (1996) Antioxidative activity of phenolic acids isolated from Jindalae Flowers(*Rhododendron mucronulatum* Turcz.). Agric. Chem. Biotechnol. 39, 506-511
4. Chung, T.Y., Kim, M.A. and Daniel, J. (1996) Antioxidative activity of flavonoids isolated from Jindalae Flowers(*Rhododendron mucronulatum* Turcz.). Agric. Chem. Biotechnol. 39, 320-326
5. Yang, J., Meyers, K.J., Heide, J. and Lui R.H. (2004) Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. J. Agric. Food Chem., 52, 6787-6793
6. Park, J.C., Hur, J.M. and Park J.G. (2002) Biological activities of Umbelliferae family plants and their bioactive flavonoids. Food Industry and Nutrition, 7, 30-34
7. Moon T.C., Park, J.O., Chung, K.W., Son, K.H., Kim, H.P., Kang, S.S. and Chang, H.W. (1999) Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. Yakhak Hoeji, 43, 117-123
8. Lee, O.H., Lee, H.B. and Son J.Y. (2004) Antimicrobial activities and nitrite-scavenging ability of olive leaf fractions. Korean J. Soc. Food Cookery Sci., 20, 204-210
9. An, B.J., Lee, C.E., Son, J.H., Lee, J.Y., Choi, G.H. and Park, T.S. (2005) Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 48, 280-284
10. An, B.J., Lee, J.T., Lee, C.E., Son, J.H., Lee, J.Y. and Park, T.S. (2005) A study on the development cosmeceutical ingredient, *Rhododendron mucronulatum*, and the application of rheology properties. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 48, 273-279

11. Hong, T.H. (1999) The degradation of hydrocarbons in petal of Azalea by Gokja. Korean J. Food and Nutr., 12, 415-421
 12. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200
 13. Hiroshi, S., Yasuhide, M., Masuko, K. and Tojiro, T. (1996) Effects of some vegetable extracts on the growth of human cell lines measured by the WST-1 assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 43, 64
 14. Folin, O. and Denis W. (1912) On phsphotungasticphosphomolybdic compounds as color reagent. J. Biol. Chem., 12, 239-249
 15. Moreno, M.I.N., Isla, M.I.N., Sampietro, A.R. and Vattuone M.A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. J. of Enthnopharmacology, 71, 109-114
-
- (접수 2006년 4월 9일, 채택 2006년 7월 28일)