

## 땅빈대 추출물의 세포 보호 효과 및 성분 분석에 관한 연구

김선영 · 원두현 · 임명선 · 박수남\*

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과, 그린코스메틱연구개발센터

### Cellular Protective Effect and Component Analysis of *Euphorbia humifusa* Extracts

Sun Young Kim, Doo Hyun Won, Myoung Sun Lim and Soo Nam Park\*

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Science and Technology, 172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea, Research Center for Development of Green Cosmetic

**Abstract** – In this study, the cellular protective effect, antioxidative property and component analysis of *Euphorbia humifusa* extracts were investigated. The ethyl acetate fraction (3.68 µg/mL) and aglycone fraction (3.15 µg/mL) of *Euphorbia humifusa* extract showed prominent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (OSC<sub>50</sub>) of *Euphorbia humifusa* extract on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system was investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction (0.43 µg/mL) and aglycone fraction (0.35 µg/mL) of extract showed higher ROS scavenging activity than L-ascorbic acid (1.50 µg/mL). The cellular protective effects of fractions of *Euphorbia humifusa* extract on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethyl acetate fraction and aglycone fraction of extract protected cellular membranes against ROS in a concentration dependent manner (5~25 µg/mL), and was more effective than (+)-α-tocopherol, lipid peroxidation chain blocker. Aglycone fraction from *Euphorbia humifusa* extract showed 2 bands in TLC and 2 peaks in HPLC. In HPLC chromatogram of aglycone fraction, peak 1 and peak 2 were identified as quercetin and kaempferol, respectively. And these components are very effective as antioxidant. Thus, these results indicate that fractions of *Euphorbia humifusa* extracts can function as antioxidant in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. Fractions of *Euphorbia humifusa* extracts can be applicable to new functional cosmetics for antioxidant.

**Key words** – *Euphorbia humifusa*, Cellular protective effect, Antioxidant, Quercetin, Kaempferol

피부는 신체의 최외각을 둘러싸고 있으며 외부의 여러 유해환경으로부터 신체를 보호하는 일차적 장벽이다. 하지만 피부는 태양광선과 산소 등의 외부 스트레스와 계속적으로 접촉함으로써 손상을 받기 쉽고 광산화적 손상의 위험에 노출되어 있다. 특히, 과도한 자외선에 의해 높은 농도의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 이로 인하여 항산화 방어체계와 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분들의 손상과<sup>1-8)</sup> 주름생성 및 멜라닌생성 과정 등을 가속화 하여 피부 광노화를 야기시킨다.<sup>9)</sup> 활성산소종이란 산소중심의 라디칼인 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, ·OH를 비롯하여 비라디칼종인 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 생체 성분과 활성산소종의 반응에서 유래된

ROO·, RO·, ROOH, 및 HOCl 등이 포함된다. 이러한 활성산소종의 생성은 생체내 존재하는 광증감제 분자에 의해 이루어진다. 광증감반응은 Type I 혹은 Type II의 형태로 일어나며, Type I 반응의 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, 반면에 Type II 반응은 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, ·OH 그리고 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>를 포함하는 활성산소종을 생성시킨다. 이러한 활성산소종은 생체 내에서 superoxide dismutase (SOD), catalase 등의 촉매 작용으로 상호 전환이 가능하다.<sup>10-12)</sup>

항산화 물질들은 활성산소종을 제거하거나 생성을 억제 시킴으로써 과량 생성된 활성산소에 의해 발생하는 각종 질병의 예방 및 치료와 피부 노화억제를 목적으로 이용될 수 있을 것이다. 이러한 항산화제에 대한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich가 superoxide radical을 소거하는 효소

\*교신저자(E-mail): snpark@seoultech.ac.kr  
(Tel): +82-2-970-6451

인 SOD를 발견한 이후 시작되어 최근에는 식품첨가물로서의 항산화제 개발, 각종 질병의 예방을 위한 건강식품, 노화억제를 목적으로 하는 의약품 및 화장품산업으로까지 다양화되고 있는 추세이다. 따라서 인체에 무해하면서도 강한 항산화 효과를 나타내는 천연 항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있다.<sup>13-14)</sup> 따라서 자외선 및 외부 환경으로부터 피부를 보호하고 노화 및 각종 질병을 예방하기 위하여, 항산화제의 개발은 필수적이다.

땅빈대(*Euphorbia humifusa*) 쌍떡잎식물 쥐손이풀목 대극과(Euphorbiaceae)의 한해살이풀로 한국, 일본 등에서 널리 자생하는 식물이다. 지금초, 내모초 등으로 불리기도 하며, 길이는 10~30 cm 정도로 옆으로 뻗는다. 자르면 흰색의 즙을 분비하여 자주색 빛이 도는 많은 수의 가지가 줄기 밑부분에서 갈라진다. 앞은 마주나고 긴 타원모양이며, 끝은 둔하고 밑 부분은 비대칭이며 좁다.<sup>15)</sup>

현재까지, 땅빈대에 관하여 보고된 바로는, 땅빈대 추출물의 라디칼 소거능 및 세포독성 효과에 관한 연구<sup>16)</sup>와 기타 항산화능에 관한 연구<sup>17)</sup>가 보고되어 있다. 그러나 광노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소 소거활성과 그 생리활성 성분들에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 땅빈대를 구입하여 땅빈대의 전초 추출물과 분획을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 활성산소 소거 활성 및  $^1O_2$ 에 대한 실질적인 적혈구 세포 보호 효과 그리고 땅빈대 추출물의 주요 생리활성 물질을 밝혀내어 항산화제로서의 땅빈대 추출물의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**실험 재료** - 본 실험에서 사용한 땅빈대는 제주도 서귀포시에서 채취한 것을 2010년 03월 청량리 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

**기기 및 시약** - UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, pH meter는 Istek (Korea)사의 pH213 Micro processor pH Meter를 사용하였고 High performance liquid chromatography는 Dionex (USA)사의 HPLC 9001series를 사용하였다. pH 표준용액 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), acetic acid, acetonitrile 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F254 (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -Tocopherol, L-ascorbic acid, quercetin, kaempferol은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

**땅빈대의 분획 및 추출** - 건조된 땅빈대 200 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 4 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하고 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻어서 이

를 실험에 사용하였다. 또한 50% 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 n-hexane을 이용하여 엽록소, 지질 등의 비극성 성분을 제거하였으며, 이후 ethyl acetate로 3회 반복 처리한 분획을 감압 농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 파우더 일정량에  $H_2SO_4$  및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류 냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압 농축하여 얻은 당이 제거된 aglycone 파우더(deglycosylated 분획)를 실험에 사용하였다.

**DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성** - 홀 전자를 갖는 원자단을 free radical이라 하며 이는 짝을 짓지 않은 활성 전자를 가지고 있기 때문에 불안정하고, 매우 큰 반응성을 갖는다. Free radical의 이러한 큰 반응성으로 피부뿐만 아니라, 신체 구성 성분들에 손상을 주며 결과적으로 노화를 가속화시킨다. DPPH 실험법은 이러한 free radical의 소거능을 확인하는 대표적인 실험으로, 비교적 간편하다는 장점이 있다. 땅빈대 추출물 또한 free radical 소거활성을 DPPH법을 통하여 확인하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 소거 활성 저해율을 나타내었다. Free radical 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity,  $FSC_{50}$ , g/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

**Luminol 발광법을 이용한  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)** -  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계의 Fenton 반응과 그 후의 연쇄반응에 의해 각종 활성산소종( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  그리고  $H_2O_2$ )가 생성되며, 철은 이 반응의 촉매제로서 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 여러 가지 활성산소종에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 총항산화능은 luminol이 활성산소종에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 땅빈대 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu L$  및 5 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  10  $\mu L$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu L$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM  $H_2O_2$  40  $\mu L$ 를 넣고 화

화발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정 한 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, g/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

**Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정** - 사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 이 실험법을 이용하여 알아볼 수 있다. 무엇보다 자외선에 의한 피부노화를 방어할 수 있는 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 사람 적혈구 세포를 이용한다는 점이 실질적이다. 따라서 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

**적혈구 현탁액 제조** - 적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 9.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10<sup>7</sup> cells/mL이었다.

**땅빈대 추출물의 광용혈 억제 효과** - 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관 (No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시

**Table I.** HPLC conditions for separation of aglycone fractions from *Euphorbia humifusa* extracts

Column	Luna 5 µ C <sub>18</sub> (L: 250 mm, LD: 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2% acetic acid in H <sub>2</sub> O : 0.5% acetic acid in 50% acetonitrile solution (50 : 50~0 : 100, Gradient) for aglycone fraction

간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온실에서 행하였다. 땅빈대 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ<sub>50</sub>을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ<sub>50</sub>이 31 min으로 오차범위 ±1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

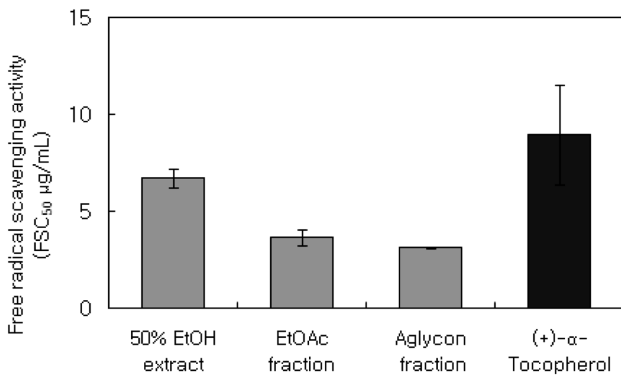
**TLC 및 HPLC를 이용한 땅빈대 추출물의 플라보노이드 분석** - 땅빈대 추출물 분획 중에서 활성산소소거능과 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 대한 세포 보호 효과가 우수하게 나타난 aglycone 분획 (deglycosylated 분획)을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 µm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 aglycone 분획의 전개용매는 n-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)을 사용하여 분석하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준 물질의 R<sub>f</sub> 값과 자외선 및 NP-PEG 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다.

HPLC 분석은 기율기 용리법으로 분리하였고, aglycone 분획의 HPLC 분리조건은 Table I에 나타내었다.

**통계처리** - 모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

## 결과 및 고찰

**DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성** - (+)-α-Tocopherol, flavonoids 등의 항산화제는 활성산소종 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 땅빈대(*Euphorbia humifusa*) 추출물들의 free radical 소



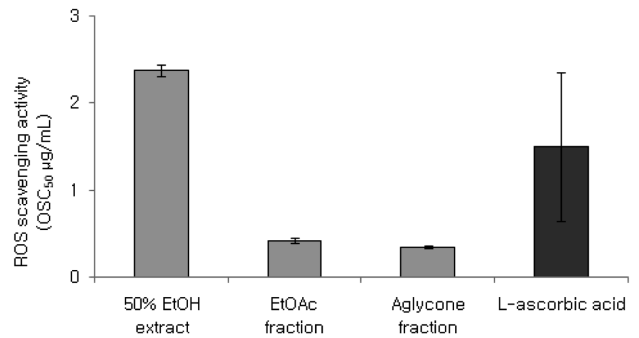
**Fig. 1.** Free radical scavenging activities of extract and fractions of *Euphorbia humifusa* and reference.

거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 땅빈대 50% ethanol 추출물의 경우 6.75 μg/mL, ethyl acetate 분획의 경우 3.68 μg/mL, aglycon 분획은 3.15 μg/mL으로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol의 FSC<sub>50</sub>는 8.98 μg/mL로 나타났다. 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol과 비교하여 볼 때, 땅빈대 추출물의 ethyl acetate 분획은 (+)-α-tocopherol보다 약 2.5배, aglycon 분획은 약 2.8배 더 우수한 free radical 소거활성을 나타내었다.

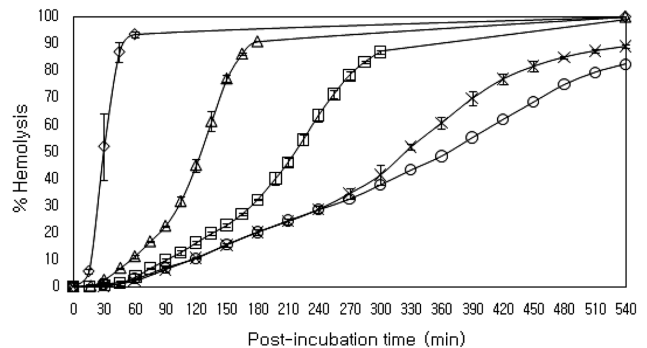
**Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능) -**Luminol은 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420~450 nm에서 발광한다. Fe 이온과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 Fenton 반응에 의해 활성산소종이 생성되어 luminol과 반응한다. 땅빈대 50% ethanol 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 1.65 μg/mL, ethyl acetate 분획의 총항산화능은 0.43 μg/mL으로 나타났으며 aglycon 분획의 총항산화능은 0.35 μg/mL로 나타났다. 비교물질은 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 L-ascorbic acid의 총항산화능은 1.50 μg/mL로 나타났다. 땅빈대 추출물의 ethyl acetate 분획 및 aglycon 분획 모두 L-ascorbic acid 보다 약 3~4배 정도의 뛰어난 활성산소 소거활성을 나타내었다.(Fig. 2)

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과 -**땅빈대 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 적혈구 광용혈법으로 측정하였고 aglycon 분획의 농도에 따른 세포 보호 효과를 Fig. 3에 나타내었다.

적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 세포 보호활성이 클수록 크게 나타난다. 땅빈대 추출물의 aglycon 분획 경우는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)이 농도 범위 5 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL에서 각각 71.7 min, 107.5 min, 235.4 min으로, aglycone 분획의 경우 같은 농도 범위에서 각각 125.0 min, 217.5 min, 324.0 min



**Fig. 2.** Reactive oxygen species scavenging activities of *Euphorbia humifusa* extracts and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.



**Fig. 3.** Cellular protective effects of *Euphorbia humifusa* extracts (aglycon fraction) against <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 30±2.80). Irradiation time ; 15 min, pre-incubation time; 30 min, [rose-bengal] = 12 μM, concentrations of ethyl acetate fraction from *Euphorbia humifusa* extract; ◇-◇ : control, △-△ : 5 μg/mL, □-□ : 10 μg/mL, X-X : 25 μg/mL, ○-○ : 50 μg/mL.

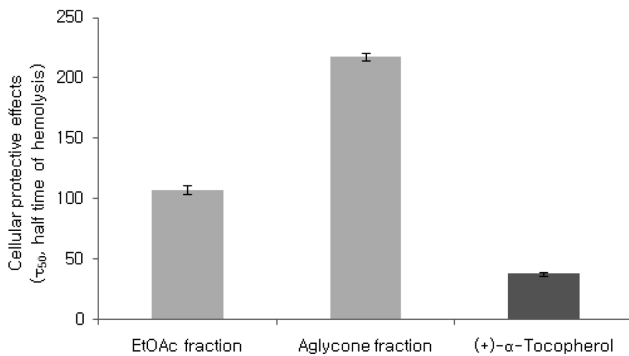
으로 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었다.(Table II, Fig. 4) 땅빈대 추출물들의 세포보호 효과는 10 μg/mL에서 ethyl acetate 분획 (107.5 min)에 비하여 aglycon 분획 (217.5 min)이 우수하게 나타났고, 비교물질로 사용한 지용성 항산화제 (+)-α-tocopherol의 세포 보호효과는 동일농도 10 μg/mL에서 38.00 min으로 나타났다. 특히 땅빈대의 aglycon 분획은 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol과 비교하여 볼 때 동일 농도에서 약 5~6배 정도 우수한 세포보호 활성을 나타내었다.

**땅빈대 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석 -**땅빈대 추출물의 TLC 성분 분석: 땅빈대 추출물의 TLC 크로마토그램은 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5은 땅빈대 추출물의 ethyl acetate 분획을 당제거한 aglycon 분획의 TLC 크로마토그램이며, 2개의 띠로 분리되었다. 공통적으로 확인된 2개의 띠들은 자외선 및 NP-PEG 발색법으로 확인한 결과, R<sub>f</sub> 값이 0.86인 EH1은 kaempferol로 나타났고, R<sub>f</sub> 값이 0.63인 EH2는 quercetin으로 나타났다.

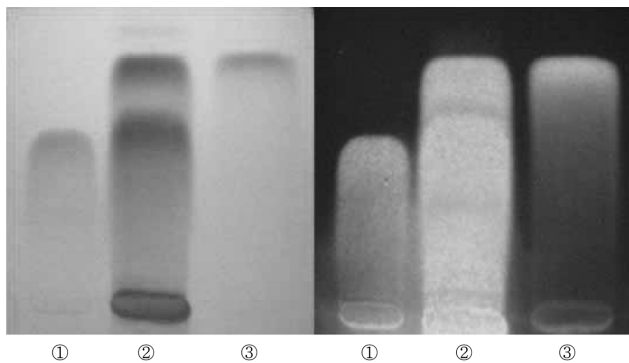
**Table II.** Cellular protective effects of extracts from *Euphorbia humifusa* and reference compounds on the Rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes

	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis <sup>1)</sup> )		
Concentration (g/mL)	5	10	25
<i>Euphorbia humifusa</i> extract (ethyl acetate fraction)	71.70 ±3.02	107.50 ±3.54	235.40 ±7.03
Aglycone fraction from <i>Euphorbia humifusa</i> extract (ethyl acetate fraction)	125.00 ±2.36	217.50 ±3.32	324.00 ±4.00
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	-	38.00 ±1.80	-

<sup>1)</sup>Control,  $\tau_{50} = 31.00 \pm 1.00$  min

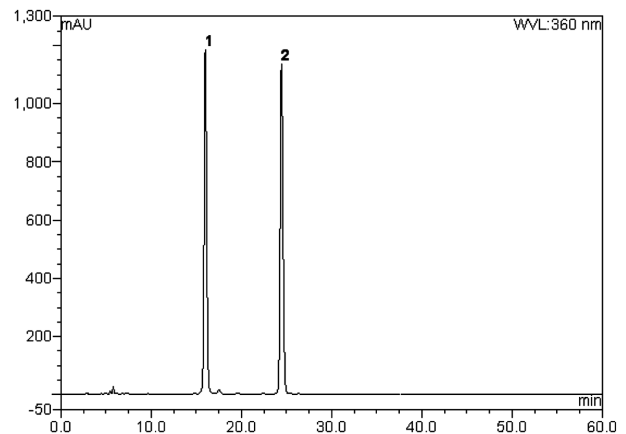


**Fig. 4.** Cellular protective effects of extracts from *Euphorbia humifusa* and (+)- $\alpha$ -tocopherol on the Rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.



**Fig. 5.** TLC chromatogram of deglycosylated fraction from *Euphorbia humifusa* and references. Eluent system: 21(n-hexane) : 14(ethyl acetate) : 5(acetic acid) (v/v). ①: quercetin, ②: aglycone fraction, ③: kempferol.

땅빈대 추출물의 HPLC 성분분석 비교: 땅빈대 추출물 중 aglycon 분획의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 6과 같다. 크로마토그램은 2개의 peak로 나타났다. 각각의 peak를 동정하기 위하여, Fig. 5에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 긁어서 추출여과하고 용매를 감압 건조시킨 후 얻은 파



**Fig. 6.** HPLC chromatogram of aglycone fraction from *Euphorbia humifusa* at  $\lambda = 360$  nm, 1: quercetin. 2: kaempferol.

**Table III.** HPLC quantitative analysis data of ethylacetate fraction from *Euphorbia humifusa*

No.	Ret. time (min)	Peak name	Area (mAu)	Rel. ratio (%)
1	16.00	quercetin	380.51	47.97
2	24.44	kaempferol	412.63	52.03
Total			793.14	100.00

우더를 에탄올로 녹인 후 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과 땅빈대 추출물 중 aglycon 분획에 대한 Fig. 5의 TLC (normal phase) 크로마토그램에서  $R_f$  값이 가장 큰 띠인 EH1 ( $R_f$  0.86)은 Fig. 6의 HPLC (reverse phase) peak 2로, EH2 ( $R_f$  0.63)는 peak 1과 일치함을 확인하였다. HPLC로 밝혀낸 각각의 성분에 대한 정량적인 데이터를 Table III에 정리하여 나타내었다.

## 결론

본 연구에서는 땅빈대 추출물의 세포 보호 작용, 항산화능 및 성분 분석에 관한 조사를 수행하였다. 땅빈대 추출물의 free radical 소거활성( $FSC_{50}$ )은 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획이 각각  $3.68 \mu\text{g/mL}$ ,  $3.15 \mu\text{g/mL}$ 로 (+)- $\alpha$ -Tocopherol ( $8.98 \mu\text{g/mL}$ )에 비하여 우수하게 나타났다. 또한 luminol-의존성 화학발광법을 이용한  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 활성산소종에 대한 땅빈대 추출물의 총항산화능 또한 ethyl acetate 분획( $0.43 \mu\text{g/mL}$ )과 aglycone 분획( $0.35 \mu\text{g/mL}$ )에서 큰 소거 활성을 나타내었다. 땅빈대 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였고, 농도 의존적( $5 \sim 25 \mu\text{g/mL}$ )으로 세포보호 효과를 나타내었다. 특히 aglycone 분획의 경우, 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -Tocopherol에 비하여 약 5.7배

더 뛰어난 세포보호 작용을 확인할 수 있었다. 땅빈대 추출물 aglycone 분획의 이러한 항산화능과 세포보호 효능은 quercetin과 kaempferol에 의한 작용임을 TLC와 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 땅빈대 추출물은 항산화제로서 충분한 가능성이 있다고 사료된다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(과제 고유번호 : A092055)

## 인용문헌

1. Fantone, J. C. and Ward, P. A. (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction. *Ann. J. Path.* **107(3)**: 395-418.
2. Jurkiewicz, B. A. and Buettner, G. R. (1994) Ultraviolet light-induced free radical formation in skin : An electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* **59(1)**: 1-4.
3. Davies, K. J. A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radical. *J. Biol. Chem.* **262(20)**: 9902-9907.
4. Park, S. N. (1989) Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea.
5. Jurkiewicz, B. A. and Buettner, G. R. (1994) Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: An electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* **59**: 1-4.
6. Packer, L. (1994) Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants. In: Free radical damage and its control. Rice-Evans, C. A. and Burdon, R. H. (eds.). 239-253. *Elsevier Science*, St. Louis.
7. Jurkiewicz, B. A., Bissett, D. L. and Buettner, G. R. (1995) Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 484-488.
8. Thomas, J. P. and Girotti, A. W. (1988) Photogeneration of singlet oxygen by membrane bound hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* **47**: 79s.
9. Zheng, P. and Kligman, L. H. (1992) UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin : A comparison to UVB-Induces Damage. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 194-199
10. Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**: 659-666.
11. Darr, D. and Fridovich, I. (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 671-675.
12. Scharffetter-Kochanek, K. (1997) Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *Adv. Pharmacol.* **38**: 639-655.
13. Cheseman, K. H. and Slater, T. F. (1993) Free radicals in medicine. *British Medical Bulletin* **49(3)**: 566-576.
14. McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6103.
15. 배기환 (2000) 한국의 약용식물, 277. 교학사, 서울.
16. Eeo, S. I., Hu, W., Han, W. and Wang, M. H. (2008) Antioxidant activity and cytotoxic effect of extracts from *Euphorbia humifusa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 295-299.
17. Cha, B. C. Lee, S. K. Lee, H. W. E. Choi, M. Y. Rhim, T. J. and Park, H. J. (1997) Antioxidative effect of domestic plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **28(1)**: 15-20

(2010. 11.15 접수; 2010. 11.12 심사; 2010.12.16 게재확정)