

골풀 부위별 추출물의 항산화 효과

최 창 환 · 원 두 현 · 황 준 필 · 박 수 남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실 화장품종합기술연구소
(2012년 4월 16일 접수, 2012년 9월 17일 수정, 2012년 9월 22일 채택)

Antioxidative Effect of Extracts from Different Parts of *Juncus effusus* L.

Chang Hwan Choi, Doo Hyun Won, Jun Pil Hwang, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D center,
Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea
(Received April 16, 2012; Revised September 17, 2012; Accepted September 22, 2012)

요약: 이번 연구에서 우리는 골풀의 부위별 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. 골풀의 부위는 상층부와 하층부, 고갱이 부위로 결정하였다. 실험은 골풀 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획, 아글리콘(aglycone) 분획 세 가지로 진행하였다. 항산화 활성 중 라디칼인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성(FSC₅₀)을 살펴본 결과 50 % 에탄올 추출물의 경우 고갱이 부위(42.9 µg/mL)가, 에틸아세테이트 분획은 지하 부위(12.1 µg/mL), 아글리콘 분획은 지하 부위(12.1 µg/mL)가 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종에 대한 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)을 살펴본 결과, 50 % 에탄올 추출물은 고갱이 부위(0.29 µg/mL), 에틸아세테이트 분획은 지하 부위(0.25 µg/mL), 아글리콘 분획은 고갱이 부위(0.20 µg/mL)가 가장 높은 총 항산화능을 나타내었다. Rose-bengal로 증감된 ¹O₂에 의한 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과는 10 µg/mL 농도에서 고갱이 부위의 아글리콘 분획이 τ₅₀ 321.0 min으로 가장 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 이와 같은 항산화 효과로 볼 때 골풀의 지하 부분과 고갱이 부위의 추출물은 천연 항산화제로서 여러 산업 분야에 응용 가능할 것이라 생각된다. 특히 높은 τ₅₀ 값을 갖는 것으로 보아, 태양광 노출에 의해서 ¹O₂이 많이 생성되는 부위인 피부를 효과적으로 보호해줄 수 있을 것으로 생각되어진다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects of extracts from different parts of *Juncus effusus* L. were investigated. The three parts (above-ground part, below-ground part, medulla part) were selected. 50 % ethanol extract, ethyl acetate and aglycone fractions of *J. effusus* L. were used in experiments. The highest DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities (FSC₅₀) was shown by medulla part (42.9 µg/mL) in 50 % ethanol extracts, below-ground part (12.1 µg/mL) in ethyl acetate fractions, and below-ground part (12.1 µg/mL) in aglycone fractions. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system using the luminol-dependent chemiluminescence assay showed the most prominent effect of medulla part (0.29 µg/mL) in 50 % ethanol extracts, below-ground part (0.25 µg/mL) in ethyl acetate fractions, and medulla part (0.20 µg/mL) in aglycone fractions. The cellular protective effects of extract/fractions of *J. effusus* L. on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were increased in a concentration dependent manner (0.5 ~ 10 µg/mL). Especially, aglycone fraction of medulla part at a concentration of 10 µg/mL showed the most prominent protective effect among all extracts (τ₅₀, 321.0 min). These results indicate that extracts from below-ground part and medulla part of *J. effusus* L. extracts can be used as a natural antioxidant. Particularly, *J. effusus* L. can protect suggesting a high τ₅₀ skin where many ¹O₂ was generated by sunlight exposure.

Keywords: *J. effusus* L., antioxidative activity, singlet oxygen, cell protection

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

1. 서 론

우리의 신체는 생명을 유지하기 위해서 에너지를 소비하고 생산하는 대사활동을 끊임없이 하고 있다. 하지만 불행하게도 미토콘드리아에서 대사활동에 사용되는 산소 중 일부는 에너지가 높은 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)로 변하게 된다[1]. 또한, 면역체계를 구성하고 있는 백혈구는 외부의 유해물질을 제거하기 위해 일부러 활성산소종을 생성, 이용하기도 한다[2]. 이러한 내적인 요인뿐만 아니라, 호흡 중 외부의 대기 오염물질에 의해서도 신체는 활성산소종에 노출된다[3]. 무엇보다 가장 큰 활성산소종 생성 요인은 높은 에너지를 가지고 있는 태양광선에 포함된 자외선이다[4].

이와 같은 요인들로 인해 생성되는 활성산소종이란 일반적인 삼중항 상태의 산소($^3\text{O}_2$)보다 반응성이 큰 물질로, superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) 등과 이들이 불포화 지방산과 반응하면서 생성되는 peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$), hydroperoxide (ROOH) 등을 포함한다[5,6]. 이러한 활성산소종은 높은 산화력을 가지고 있어서 신체의 구성물질과 조직들을 손상시킨다[7]. 세포막의 구성물질인 지질을 산화시켜 세포 용혈을 일으키기도 하며, 단백질을 손상시켜서 제 기능을 못하게 하고, DNA를 산화시켜 돌연변이 및 발암을 유도하기도 한다[8]. 피부를 예로 들어보면, 활성산소종은 직접적으로 피부 조직을 손상시키기도 하며, MMPs와 같은 효소의 발현을 유도하여 콜라겐, 엘라스틴과 같은 피부 구성물질의 분해를 촉진시킨다. 결과적으로 이러한 손상들의 축적이 노화와 직접적 또는 간접적으로 연관이 있다고 알려져 있다[9-14]. 이러한 문제점은 우리의 삶이 현대화 될수록 대기 오염물질에 노출될 가능성이 높아지고, 음식 소비의 증가에 따른 대사활동 중 생성되는 활성산소종의 양도 증가하면서 더욱 대두되고 있다.

이러한 활성산소종으로부터 보호하기 위해 우리의 몸은 비타민 C, 비타민 E와 같은 항산화 네트워크를 구성하고 있다. 하지만 활성산소종이 과량으로 생성되면 이러한 항산화 네트워크가 붕괴되며 신체 구성물질이 산화되기 시작한다. 이러한 산화적 환경에 항산화제를 보충시켜 주면, 항산화 네트워크를 회복시키고, 높은 환원력으로 자신이 먼저 산화되면서 신체 조직을 보호하게 된다. 따라서 항산화 효과가 뛰어난 항산화제 개발이 활발하게 이루어지고 있다[10-14]. 그 중 가장 활발히 연구가

이루어지고 있는 분야 중 하나는 식물유래 천연 항산화제 분야이다. 천연 항산화제는 합성 항산화제들에 비해 독성이 적을 확률이 높아 안전하고, 응용가능성이 높은 이점이 있다.

이번 연구에서 실험한 물질은 골풀(*J. effusus* L.)이다. 골풀은 습지에서 잘 자라며, 세계적으로 널리 분포하고 있어 구하기가 쉬운 이점이 있다. 한국에서도 전국 강가, 습지, 논 주변에서 야생으로 자라고 있는 골풀을 쉽게 발견할 수 있다. 골풀은 오래전부터 민간에서 뿌리와 고갱이 부위가 약초로 사용되었고 한국과 중국의 생약 규격집에 등록된 한약재이다. 하지만 현재 한국에서는 대부분 고갱이 부위만 약재로 사용하고 있는 추세이다. 한약재로 판매되는 골풀의 고갱이 부위를 등심초(골풀의 줄기 껍질을 제거한 연한 속)라 하고 소염, 해열, 이뇨, 지혈 등의 약리 작용을 위해 사용한다.

골풀과 관련된 항산화 연구는 1996년 메탄올 추출물을 이용한 비효소적 측정 방법 중 하나인 Fe^{2+} /ascorbate 법으로 측정한 것이 전부였으며[15] 그 이후 더 이상의 항산화 연구는 발견하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 골풀을 부위별로 추출해서 총체적인 항산화 실험을 진행하였다. 부위는 지상 부위, 지하 부위, 고갱이 부위를 사용하였고 각각을 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획으로 나누어 항산화 실험을 수행하였으며, 항산화 실험으로는 자유라디칼인 DPPH 소거능, 각종 활성산소종(H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ 등)이 생성되는 계(Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계)에서의 총 항산화능, 빛으로 유도된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포손상에 관한 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH 미터는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

EDTA, 루미놀, 헤파린, 증감제로 사용된 rose-bengal, 자유라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl ,

H₂SO₄ 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), *n*-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, 알부틴은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 골풀 재료는 초여름의 야생 상태의 식물을 직접 채취하여 사용하였으며, 골풀의 고갱이 부위는 경동시장 약약사를 통해 한약재로 판매되는 수입 원료를 구입하였다.

2.2. 골풀의 분획 및 추출

통풍이 되는 곳에서 하루 동안 음건한 골풀을 50 % 에탄올로 지상 부위는 1 : 20, 지하 부위는 1 : 10 비율로 일주일 동안 침적 후 여과하였고, 고갱이 부위는 1 : 70 비율로 침적시켰다. 이후 filter paper를 이용해 거른 여액을 감압 건조시켜 파우더를 얻었고 수율은 지상 부위가 3.6 %, 지하 부위가 3.0 %, 고갱이 부위가 4 % 얻어졌다. 이렇게 얻어진 50 % 에탄올 추출물 파우더의 일부를 물과 헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획의 수율은 지상 부위가 0.2 %, 지하 부위가 0.1 %, 고갱이 부위가 1.0 %로 확인되었다.

에틸아세테이트 분획에서 얻은 파우더 중 일부를 산 가수분해 반응시켜 당이 제거된 아글리콘 파우더를 얻었다. 실험 방법은 에틸아세테이트 파우더를 H₂SO₄ 및 아세톤 용액을 넣고, 70 °C에서 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다. 에틸아세테이트에서 아글리콘으로의 수율은 지상 부위가 15 %, 지하 부위가 22 %, 고갱이 부위는 40 %로 얻어졌다.

2.3. 골풀 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

자유라디칼은 높은 반응성으로 인해 신체를 구성하고 있는 여러 물질과 반응함으로 구조의 변질과 조직 손상을 야기한다. DPPH는 상대적으로 안정한 자유라디칼에 속하기 때문에 실험에 많이 응용되는 산화제이다. 따라서 DPPH를 이용하여 골풀 추출물에 대한 자유라디칼의 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해된 0.2 mM DPPH 용액 1 mL, 에탄올 1 mL, 다양한 농도의 골풀 추출물 1 mL을 혼합한 후 실온에서 10 min 동안

반응시간을 주고 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μ g/mL)로서 표기하였다. 자유라디칼(DPPH) 소거 능력(%)은 다음 식을 통해 계산하였다.

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

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

먼저 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 준비한 농도별로 시료를 넣는다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 μ L를 가한 후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어서 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 용매를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 총 항산화능은 luminol이 활성산소종에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 활성산소 소거활성 저해율은 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μ g/mL)로서 표기하였으며 다음 식으로 구하였다.

(C=Control, S=Sample, B=Blank)

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

2.4. 광용혈법을 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 사람 유래 적혈구 세포를 이용한다는 점이 실질적이다. 따라서 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

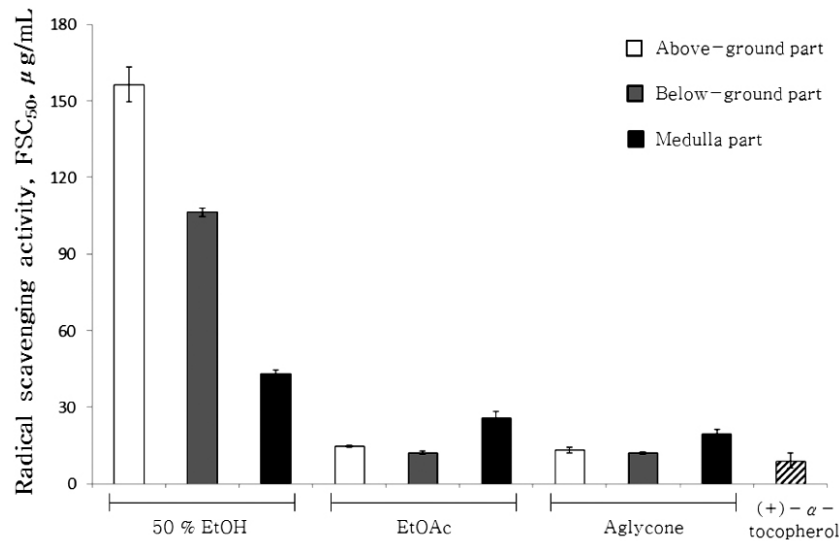


Figure 1. Free radical scavenging activities of extracts and fractions from *J. effusus* L. and references.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 헤파린이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3 회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 골풀 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 농도가 다른 골풀 추출물을 각각 50 µL씩 첨가하였다. 시험관의 입구를 막은 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 다시 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 × 20 × 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 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation)에 의한 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다.

이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 골풀 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

2.5. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 골풀 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

(+)-α-Tocopherol과 같은 항산화제는 지질과산화 반응과 같이 산소 유래 라디칼에 의해 일어나는 여러 가지 손상 반응에서 라디칼을 환원시켜 손상을 방지하고 지질과산화 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 항산화제는 환원력이 클수록 생체 보호 효과가 크다. 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력은 상대적으로 안정한 라디칼 구조를 갖는 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

골풀 추출물과 기존에 강력한 항산화제로 알려진 (+)-α-tocopherol의 자유라디칼 소거활성 측정 결과를 Figure 1에 나타내었다. 결과는 자유라디칼을 50 % 소거

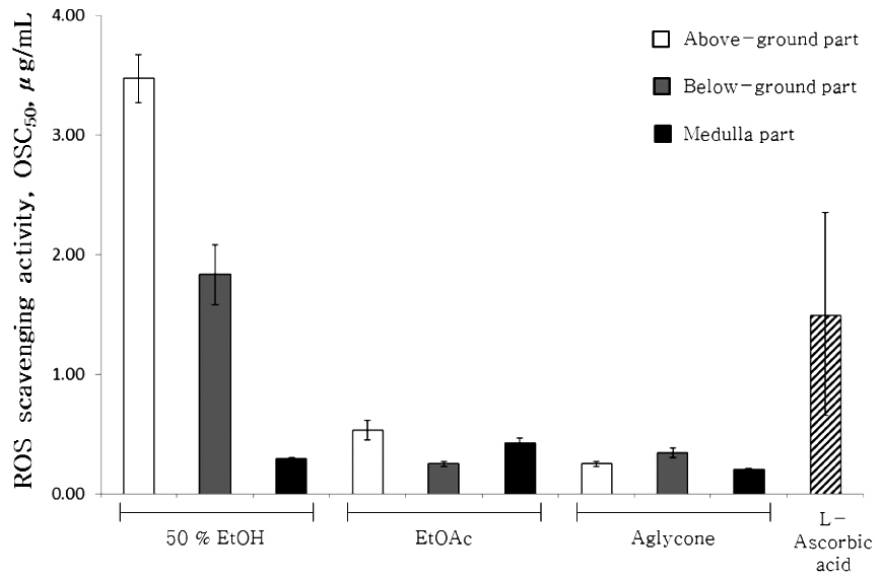


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of extracts and fractions from *J. effusus* L. and references in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

하는데 필요한 농도인 FSC_{50} (Free radical scavenging concentration)로 나타내었다. 골풀의 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC_{50} 이 지상 부위 : $156.3 \pm 6.8 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $106.3 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $42.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ 로 고갱이 부위가 가장 우수하게 나타났다. 에틸아세테이트 분획은 지상 부위 : $14.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $12.1 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $25.8 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ 로 지하 부위가 가장 높은 효과를 보였다. 아글리콘 분획의 경우 지상 부위 : $13.2 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $12.1 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $19.5 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ 로 지하 부위가 가장 높은 효과를 보였다. 이러한 값을 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 FSC_{50} ($9.0 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교해보면, 골풀의 지상과 지하 부분의 에틸아세테이트, 아글리콘 분획이 (+)- α -tocopherol과 유사한 자유 라디칼 소거 능력이 있음을 확인하였다.

3.1.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는 Fenton 반응에 의해 여러 가지 활성산소종이 생성되고, 이는 루미놀의 발광으로 확인할 수 있다. 활성산소종에 의해 산화된 루미놀은 들떴다가 다시 바닥 상태로 떨어지면서 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 골풀 추출물의 총 항산화능에 해당하는 활성산소 소거활성을 Figure 2에 나타내었다. 결과값은 ROS를 50 % 소거하는 농도인 OSC_{50} (Reac-

tive oxygen species scavenging activities)로 나타내었다. 골풀의 50 % 에탄올 추출물인 경우 OSC_{50} 이 지상 부위 : $3.47 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $1.83 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $0.29 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 로 고갱이 부위가 가장 우수하게 나타났다. 에틸아세테이트 분획은 지상 부위 : $0.53 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $0.25 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $0.42 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ 로 지하 부위가 가장 높은 효과를 보였다. 아글리콘 분획의 경우 지상 부위 : $0.25 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, 지하 부위 : $0.34 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$, 고갱이 부위 : $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 로 고갱이 부위가 가장 높은 효과를 보였다. 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid의 OSC_{50} 은 $1.50 \pm 0.85 \mu\text{g/mL}$ 으로 확인되었다. 따라서 데이터를 비교해보면, 골풀의 에틸아세테이트와 아글리콘 분획에서는 모든 부위가 상당한 총항산화능을 가지고 있는 것을 확인할 수 있다. 한 가지 주목할 점은 고갱이 부위의 경우 50 % 에탄올 추출물을 포함한 모든 분획에서 L-ascorbic acid보다 높은 활성산소종 환원력을 가졌다는 점이다.

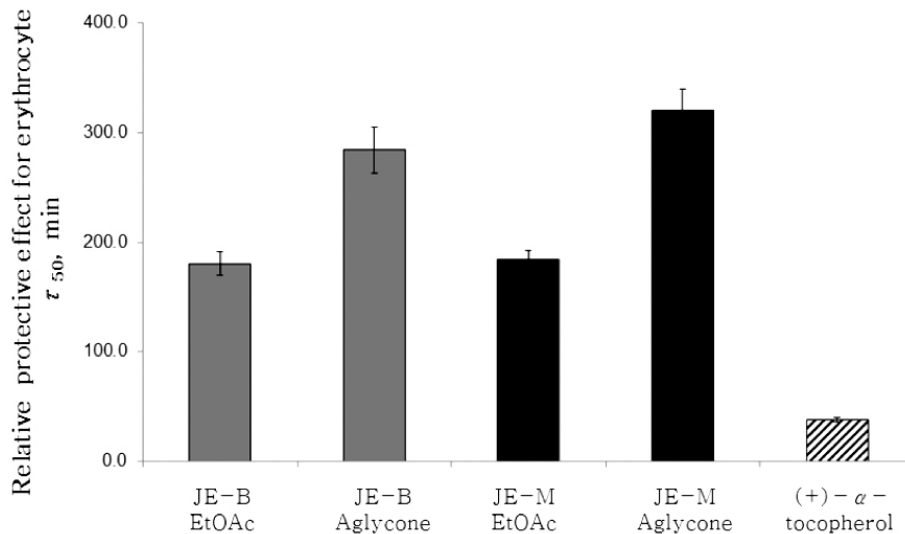
3.2. 1O_2 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

골풀 추출물을 이용해서 활성산소에 의해 발생하는 세포 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다.

Table 1. Cellular Protective Effects of Extracts and Fractions from *J. effusus* L. and Reference Compounds on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)			
	0.5	1	5	10
Below-ground part (50 % EtOH)	30.1 (\pm 2.1)	31.8 (\pm 1.8)	36.0 (\pm 1.1)	40.0 (\pm 1.4)
(EtOAc fraction)	35.0 (\pm 2.8)	43.5 (\pm 3.0)	56.2 (\pm 2.3)	180.5 (\pm 10.9)
(Aglycone fraction)	44.6 (\pm 1.1)	52.9 (\pm 2.9)	193.2 (\pm 9.4)	284.2 (\pm 21)
Medulla part (EtOAc fraction)	33.4 (\pm 1.7)	57.3 (\pm 3.0)	117.1 (\pm 6.3)	184.3 (\pm 7.7)
(Aglycone fraction)	48.0 (\pm 3.0)	61.5 (\pm 4.1)	197.4 (\pm 3.1)	321.0 (\pm 18.8)
(+)- α -Tocopherol	-	-	-	38.00 \pm 1.80

¹⁾ Control, $\tau_{50} = 30.0 \pm 1.0$ min

**Figure 3.** The effects of extract and fractions from *J. effusus* L. and references at 10 $\mu\text{g/mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 30.00 \pm 1.00 min).

(JE-B : Below-ground part, JE-M : Medulla part)

대조군으로 시료 또는 기준 물질과 같은 항산화제를 넣어주지 않았을 경우에 rose-bengal로 유도된 $^1\text{O}_2$ 상에서 적혈구의 τ_{50} 을 확인하였다. 대조군은 시료 대신 각 시료에 해당하는 용매를 넣어주고 다른 조건은 실험군과 같게 하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50} 이 30 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 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. 실험군은 각 골풀의 부위, 분획별로 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 실험을 진행하였다.

골풀의 지상 부위의 경우 실험을 진행하였더니 모든 농도에서 대조군보다 적혈구가 더 빨리 파괴되었다(Data is not shown). 이는 태양빛을 받는 부위인 지상 부위에서 광증감제로 작용할 수 있는 chlorophyll이 다량 존재하기 때문인 것으로 보인다. 골풀의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 세포 보호 효과는 Table 1에서 나타내었다. 실험을 진행한 모든 분획에서 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 확인되었다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 고갱이 부위의 아글리콘 분획이 가장 우수한 세포 보호 활성을 나타내었다. 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol의 세포 보호 효과는 10 $\mu\text{g/mL}$ 의

농도에서 38.0 min로, 골풀 추출물들이 (+)- α -tocopherol 보다 세포 보호 효과가 월등히 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

4. 결 론

1) 골풀(*J. effusus* L.)의 지상부위와 지하부위의 50 % 에탄올 추출물 수득률은 3.6 %와 3 %, 에틸아세테이트 분획은 0.2 %와 0.1 %, 아글리콘 분획은 각각의 에틸아세테이트 분획으로부터 15 %와 22 %의 비율로 얻어졌다. 고갱이 부위의(*medulla of J. effusus* L.) 50 % 에탄올 추출물 수득률은 4 %, 에틸아세테이트 분획은 1 %, 아글리콘 분획은 각각의 에틸아세테이트 분획으로부터 40 %의 비율로 얻어졌다.

2) 골풀의 free radical 소거능력 (FSC₅₀)에서 50 % 에탄올 추출물은 지상부위 < 지하부위 < 고갱이부위, 에틸아세테이트 분획은 고갱이부위 < 지상부위 < 지하부위, 아글리콘 분획은 고갱이부위 < 지상부위 < 지하부위 순으로 나타났다. 가장 높은 FSC₅₀ 값은 50 % 에탄올 추출물에서 고갱이부위 42.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 지하부위 12.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 12.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

3) 골풀의 활성산소 소거능력 (OSC₅₀)은 50 % 에탄올 추출물에서 지상부위 < 지하부위 < 고갱이부위, 에틸아세테이트 분획에서 지상부위 < 고갱이부위 < 지하부위, 아글리콘 분획에서 지하부위 < 지상부위 < 고갱이부위 순으로 나타났다. 가장 높은 OSC₅₀ 값은 에틸아세테이트 분획에서는 지하부위 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 % 에탄올 추출물과 아글리콘 분획에서는 고갱이부위 0.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

4) Rose-bengal과 빛으로 유도된 사람 적혈구의 용혈에 대한 세포보호 활성은 50 % 에탄올 분획과 지상부위의 경우 세포 보호 활성이 미약한 것으로 나타났으나, 지하부위와 고갱이부위의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에서 세포 보호 활성이 큰 것으로 나타났다. 전체적으로 고갱이 부위에서 가장 우수하게 측정되었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 τ_{50} 값은 에틸아세테이트 분획에서 184.3 min과 아글리콘 분획에서 321 min 이었다. 비교 물질인 α -Tocopherol 보다 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

이상의 결과들로 골풀 추출물은 에틸아세테이트와 아글리콘 분획에서 다양한 활성산소종에 대한 총 항산화 능력과 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과가 큰 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

참 고 문 헌

1. A. Klaus and H. Heribert, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373 (2004).
2. D. J. Kang, S. H. Song, and C. B. Kang, *et. al.*, Production of reactive oxygen species and nitric oxide by anticancer agents in rat polymorphonuclear leukocytes, *J. Vet. Clin.*, **26**(1), 8 (2009).
3. T. Florence, G. F. Beatriz, and K. Lester, Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates, *Free Radic. Biol. Med.*, **35**(4), 327 (2003).
4. H. J. Jee, H. J. Kim, A. J. Kim, Y. S. Bae, S. S. Bae, and J. Yun, UV light induces premature senescence in Akt1-null mouse embryonic fibroblasts by increasing intracellular levels of ROS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**, 358 (2009).
5. J. H. Michael and E. D. Frederick, An epigenetic perspective on the free radical theory of development, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1023 (2007).
6. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
7. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin : Anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 85 (2010).
8. R. R. Ruben, L. C. Lizbeth, and E. C. Mariano, *et. al.*, Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells, *Mutat. Res.*, **674**, 109 (2009).
9. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
10. S. Y. Kim, D. H. Won, M. S. Lim, and S. N. Park, Cellular protective effect and component analysis of *Euphorbia humifusa* extracts, *Kor. J. Pharmacogn.*, **41**(4), 264 (2010).

11. S. I. Kim, Y. J. Ahn, E. H. Kim, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
12. H. J. Lee, G. N. Lim, and S. N. Park, *et. al.*, Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. don extracts, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(1), 63 (2011).
13. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation, *Biomed. & Pharmacother.*, **53**, 181 (1999).
14. S. Valentina, M. Soren, and J. Marina, *et. al.*, Aging of different avian cultured cells: Lack of ROS-induced damage and quality control mechanisms, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 48 (2010).
15. C. J. Kim, I. J. Ryoo, D. J. Park, H. S. Lee, Y. H. Kim, and I. D. Yoo, Screening of Biologically Active Compounds from various weeds, *Agric. Chem. Biotechnol.*, **39**, 5, (1996).