

마디풀 추출물의 세포 보호 효과 및 주성분 분석

박수남*, 김민지, 김수지

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화학제품연구실, 화장품종합기술연구소

Received: December 3, 2013 / Revised: January 3, 2014 / Accepted: January 24, 2014

Protective Effects of Cellular Membrane and Component Analysis of *Polygonum aviculare* Extracts

Soo Nam Park*, Min Ji Kim, and Su Ji Kim

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Republic of Korea

In this study, the antioxidative effects and component analysis of *Polygonum aviculare* (*P. aviculare*) extracts were investigated. The ethyl acetate and the aglycone fraction from *P. aviculare* extracts were more active than (+)- α -tocopherol and L-ascorbic acid, which are known as strong antioxidants for their antioxidative activity by the DPPH method and chemiluminescence assay. The cellular protective effects of fractions of *P. aviculare* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes, increased in a concentration dependent manner (1-10 μ l). In particular, the ethyl acetate fraction at a concentration of 10 μ l showed the most prominent protective effect among all the extracts (τ_{50} , 314.70 min). TLC and HPLC chromatogram of the ethyl acetate fraction of *P. aviculare* extracts revealed 3 main bands (PA8, PA5, PA6) and peaks (peak 1, peak 2, peak 3), which were identified as myricetin-3-O-rhamnoside (myricitrin, PA8, peak 1), quercetin-3- α -rhamnoside (quercitrin, PA6, peak 3) by LC/ESI-MS/MS and 1 H-NMR respectively. These results indicate that fractions from *P. aviculare* could be applicable to new functional cosmetics as antioxidants.

Keywords: *Polygonum aviculare*, antioxidative activity, cellular protective effect, components analysis, myricitrin

서 론

태양광선에 노출된 피부에서는 자외선의 작용으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 따라서 ROS로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 실질적으로 증가하고 있다. ROS의 종류에는 singlet oxygen (1 O₂), superoxide anion radical (O₂⁻), hydroxyl radical (\cdot OH) 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 포함된다. 이들은 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성된다[1]. 생체 내에서 ROS의 과도한 생성은 염증, 돌연변이, 발암 그리고 콜라겐과 엘라스틴의 분해와 같은 단백질의 변성을 유발함으로써 피부 노화를 가속화시킨다[7-10]. 특히 1 O₂은 \cdot OH과 함께 ROS 중에서 반응성이 가장 큰 활성산소종으로 알려져 있으며, 사람 피부 세포에 있

어서 지질과 산화물의 생성, 단백질 산화 및 DNA 손상 뿐만 아니라 UV-A (320-380 nm) 의존성 세포 사멸이나 유전자 활성화에도 1 O₂ 등이 포함되는 것으로 기술되고 있다 [13, 14]. 콜라겐은 피부 진피 층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정에서 핵심이 되고 있다[11, 12, 15]. 특히 사람 피부 섬유아세포에서 1 O₂을 비롯한 ROS는 MMPs (matrix metalloproteinase)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 1 O₂이 매개할 수 있다고 보고되고 있다. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서 1 O₂을 포함하는 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. 따라서 이들 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 [5, 6], 자외선 노출 후 항산화제에 의한 ROS의 감소는 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다.

마디풀속(Polygonum)에 속하는 *P. aviculare*은 북반구 여러 곳에서 발견할 수 있으며 한국에서는 예로부터 마디풀 전초를 건조하여 황달, 복통, 혈뇨증 및 고혈압을 위한 천연 약

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

재료 사용해 왔다. 항염 등의 활성을 갖는 마디풀의 성분으로는 quercetin 등이 보고되었고[16, 17], 그 외에 항산화 및 항균 활성 등도 알려져 있다[2, 3]. 그러나 피부 광노화에 있어서 중요한 활성산소인 1O_2 으로 유도된 세포손상에 있어서의 세포 보호 작용이나 다양한 ROS가 생성되는 계에서 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 저자들은 마디풀 추출물의 flavonoid 분획을 제조하여 이를 대상으로 활성산소 유래 세포막 손상에 대한 보호작용[9], 총항산화능 및 항노화 활성을 평가하고자 하였고, 그 활성 성분들을 밝힘으로서 마디풀 추출물을 항산화제 및 기능성 화장품 원료로서의 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다. 마디풀 성분분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F254 (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였고, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 제품을 사용하였다. LC/ESIMS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명과학공동기기원에 분석 의뢰하였다.

(+)- α -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, 루미놀, 헤파린, 증감제로 사용된 rose-bengal, 자유라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 건조된 마디풀은 경동시장으로부터 구입하였다.

마디풀의 추출 및 용매 분획

건조된 마디풀 500 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 5 L를 이용하여 추출하였다[4]. 50% 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 핵산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸 아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 또한, 에틸 아세테이트 분획에서 아글리콘 분획을 얻기 위해 산 가수분해 반응을 이용하였다. 실험방법은 에틸 아세테이트 가용분 일정량에 5% H_2SO_4 및 아세톤 용액을 넣고 4 h

동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸 아세테이트 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 얻어진 아글리콘 파우더를 100% 에탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 피부노화의 주된 원인으로 알려져 있다. 따라서 마디풀 추출물에 대한 자유라디칼 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다[4]. 자유 라디칼 소거 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하여 변형된 방법으로 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 ml에 에탄올 1 ml를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 ml를 첨가하여 섞은 다음 25°C에서 10 min 동안 방치 후 자유 라디칼의 양을 분광광도계로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유 라디칼 소거 활성(FSC_{50})은 자유라디칼이 50% 소거되는데 필요한 시료의 농도로 정의된다.

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

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는 Fe^{3+} -EDTA의 촉매 작용으로 대부분의 ROS ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2)가 생성된다. 이렇게 생성된 ROS의 검출은 루미놀을 첨가하여 ROS와 루미놀이 반응할 때 방출되는 화학발광으로 측정할 수 있다[4]. ROS 소거 활성은 루미놀-의존성 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 ml를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μ l 및 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μ l을 가한 후 35 mM 루미놀 80 μ l를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 35°C로 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μ l를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. ROS 소거 활성(OSC_{50})은 ROS의 50%가 소거되는데 필요한 시료의 농도로 정의된다.

Photohemolysis 법을 이용한 세포보호 효과 측정

적혈구 현탁액 제조: 사람으로부터 얻은 피는 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer 적혈구 현탁액(15.0 million cells/ml)을 준비하기 위해서 pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/ml이었다.

마디풀 추출물의 광용혈 억제 효과: 적혈구 현탁액 3.5 ml를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물을 농도별로 각각 50 μ l씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μ M) 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 \times 20 cm \times 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) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온실에서 행하였다. 마디풀 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

마디풀 추출물의 성분분석

마디풀 추출물의 플라보노이드 성분을 동정하기 위하여 TLC, HPLC, LC/ESI-MS/MS 및 NMR을 이용하여 분석하였다.

TLC 및 HPLC를 이용한 마디풀 추출물의 플라보노이드 분석: TLC 분석에서 전개용매는 에틸 아세테이트 분획의 경우 ethyl acetate:chloroform:formic acid:distilled water = 8:1:1:1, 그리고 아글리콘 분획의 경우 *n*-hexane:ethyl acetate:acetic acid = 21:14:1을 사용하였다. 성분 확인은 플라보노이드 표준물질의 R_f 수치와 발색법을 이용한 색상 등으로 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid와 0.5% acetic acid (50% acetonitrile)을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때, HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 또한, 마디풀 추출물의 성분 분석을 위하여 TLC로 분리된

Table 1. HPLC conditions for separation of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *P. aviculare*.

Column	VP-ODS C18 (L; 250 nm, LD; 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile phase	2% acetic acid:0.5% acetic acid in H ₂ O in 50% acetonitrile solution (70:30-10:90, Gradient) for ethyl acetate fraction (50:50-0:100, Gradient) for aglycone fraction

각각의 띠를 긁은 후 50% 에탄올로 추출, 여과한 뒤 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 이 때 얻어진 파우더 중 일부는 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Millipore, 0.45 μ m) (Chemco Scientific, Japan)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

HPLC 및 LC/ESI-MS를 이용한 마디풀 추출물의 플라보노이드 분석: LC 분석에 Agilent Model 1100 (Waldbronn, Germany)을 사용하였다. 컬럼은 Pursuit XR_s C18 (2 \times 50 mm, 3 μ m) (Varian, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.5% formic acid (distilled water):0.5% formic acid (MeOH:Acetonitrile = 5:5) = 2:8로 하였으며, 유속은 200 μ l/min으로 하였다. MS/MS 분석은 ionspray source를 사용하였고, negative ion model로 capillary voltage는 -3500 V, nebulizer gas (N₂) 10 (arbitrary units), collision gas (N₂) 그리고 ion source temperature는 400°C에서 행하였다. ¹H-NMR 기기 분석은 Mercury 400 (Varian, USA)를 사용하였으며, 분석 용매는 deuterated methanol (CD₃OD)를 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 기준점(Si(CH₃)₄, δ = 0)으로 하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

마디풀 추출물에 대한 자유라디칼 소거활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical을 이용하였다. 마디풀 추출물 그리고 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Table 2와 같다. 마디풀 추출물의 에틸 아세테이트 분획의 FSC₅₀은 5.25 μ g/ml, 아글리콘 분획은 5.92 μ g/ml을 나타냈으며 이는 비교 물질인 (+)- α -tocopherol (8.98 μ g/ml)보다도 더 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다.

Table 2. Anti-oxidant activities of *P. aviculare* extracts.

Compounds	Scavenging activity	
	(FSC ₅₀ , μ g/ml)	(OSC ₅₀ , μ g/ml)
<i>P. aviculare</i> extract (EtOAc fraction)	5.25 \pm 0.05	0.07 \pm 0.03
<i>P. aviculare</i> extract (Aglycone fraction)	5.92 \pm 0.20	0.09 \pm 0.01
(+)- α -Tocopherol	8.98 \pm 2.93	-
L-Ascorbic acid	-	1.50 \pm 0.85

Table 3. Protective effect of cellular membrane of *P. aviculare* extracts and reference compounds on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

τ_{50} (Half time of hemolysis ^a)			
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	1	5	10
<i>P. aviculare</i> extract (EtOAc fraction)	43.69 \pm 3.86	190.07 \pm 10.35	314.70 \pm 6.38
<i>P. aviculare</i> extract (Aglycone fraction)	50.28 \pm 0.67	172.37 \pm 4.41	264.59 \pm 8.42
(+)- α -Tocopherol	-	-	38.00 \pm 1.80

^aControl, τ_{50} = 31.00 \pm 1.00 min.

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

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계를 이용한 총항산화능 실험 결과, 마디풀 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 Table 2에 나타내었으며 에틸 아세테이트 분획은 0.07 $\mu\text{g/ml}$, 아글리콘 분획은 0.09 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 총항산화능은 에틸 아세테이트 분획이 당을 제거시킨 분획보다 높게 나타났다. 모두 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/ml}$)보다 큰 소거활성을 보였으며, 결과적으로 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획이 free radical에 대한 매우 큰 환원력이 있음을 알 수 있었다.

¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

마디풀 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 에틸 아세테이트의 분획의 경우 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 농도 의존적으로 세포 파괴를 억제하였다(τ_{50} , 43.69, 190.07, 314.70 min). 당을 제거시킨 분획의 세포보호 효과는 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 τ_{50} 이 각각 50.28, 172.37, 264.59 min으로 나타났다. 또한 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 에틸 아세테이트 분획, 그리고 당이 제거된 분획(아글리콘) 모두 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol 보다도 세포보호 효과가 매우 큼을 알 수 있었다.

마디풀 추출물의 성분분석

마디풀 추출물의 TLC 및 HPLC 분석: *P. aviculare* 추출물의 TLC chromatogram을 Fig. 1, 3에 나타내었고 HPLC chromatogram은 Fig. 2, 4에 나타내었다. 마디풀 추출물 에틸 아세테이트 분획의 TLC 크로마토그램은 9의 띠(PA1, PA2, PA3, PA3-1, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8)로 분리되었다(Fig. 1). R_f value가 0.84인 PA1은 kaempferol로, R_f value가 0.77인 PA2는 quercetin으로 추정되었다. PA6은 quercetin 3-O- β -L-rhamnoside (quercitrin)로 추정되었다. 분리된 띠를 끊어 HPLC로 분석한 결과, Fig. 1의 TLC (normal phase) 크로마토그램에서 PA1 (R_f 0.84)은 Fig. 2의 HPLC (reverse phase) peak 9, PA2는 peak 8, PA3은

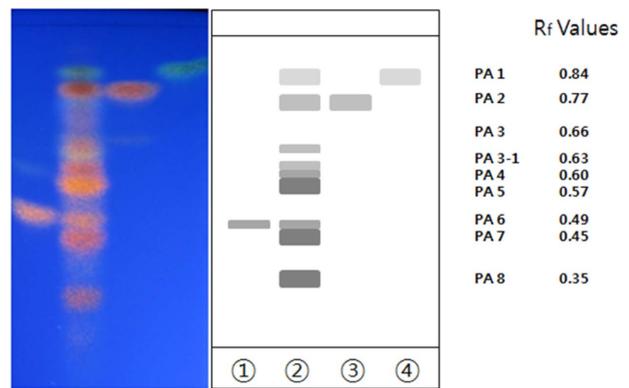


Fig. 1. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *P. aviculare* and references. Eluent system: ethyl acetate:chloroform:formic acid:water = 8:1:1:1 (v/v), ① quercitrin, ② ethyl acetate fraction, ③ quercetin, ④ kaempferol.

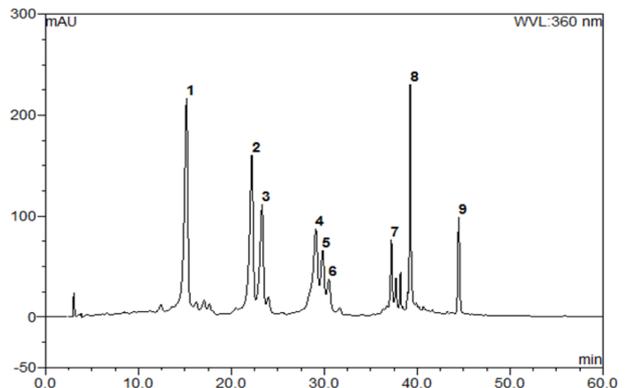


Fig. 2. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *P. aviculare*. (360 nm) (1) PA 8, (2) PA 5, (3) PA 6, (4) PA 7, (5) PA 3-1, (6) PA 4, (7) PA 3, (8) PA 2, (9) PA 1.

peak 7, PA3-1은 peak 5, PA4는 peak 6, PA5는 peak 2, PA6은 peak 3, PA7은 peak 4, PA8은 peak 1과 일치함을 확인하였다. 또한 표준물질을 사용하여 peak 3 (11.49%)은 quercetin 3-O- β -L-rhamnoside, peak 8 (9.40%)는 quercetin, peak 9 (5.79%)는 kaempferol임을 확인하였다. 그리고 PA7과 일치하는 peak 4, PA8과 일치하는 peak 1은 myricetin 배당체, PA3-1과 일치하는 peak 5는 kaempferol 배당체, peak

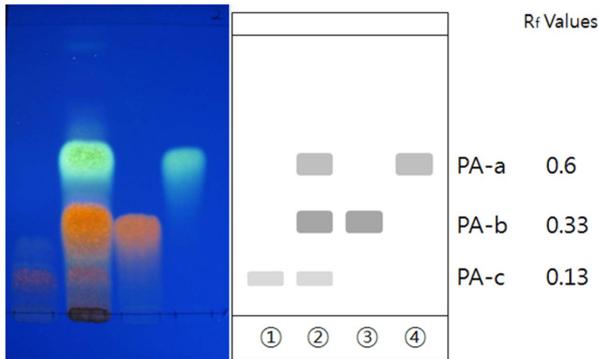


Fig. 3. TLC chromatogram of aglycone fraction from *P. aviculare* and references. Eluent system: hexane: ethyl acetate: acetic acid = 21:14:1 (v/v), ① myricetin, ② aglycone fraction (EtOAc fraction), ③ quercetin, ④ kaempferol.

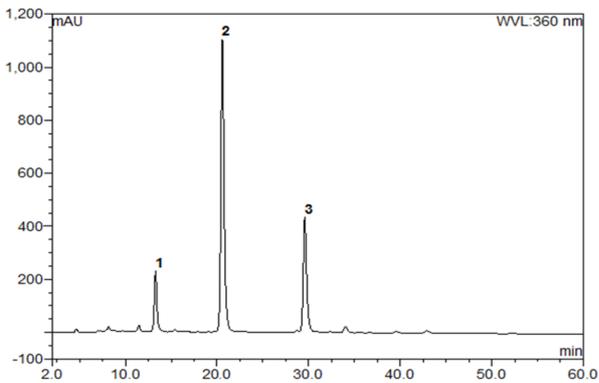


Fig. 4. HPLC chromatogram of aglycone fraction from *P. aviculare*. (360 nm) (1) Myricetin, (2) Quercetin, (3) Kaempferol.

2, 6은 각각 PA5, PA4와 일치하므로 quercetin 배당체로 추정되었다. 이어 상대적으로 함량이 많은 PA8 (24.52%), PA5 (18.16%), 그리고 PA6 (11.49%)은 LC/ESI-MS/MS와 NMR 스펙트럼을 분석하여 정확한 구조를 확인하였다. Fig. 3은 마디풀 추출물의 아글리콘 분획의 TLC chromatogram을 나타내었으며 아글리콘 분획은 3개의 띠(PA-a, PA-b, PA-c)로 분리되었고, 표준물질을 이용하여 HPLC로 확인한 결과 PA-a는 myricetin으로, PA-b는 quercetin, 그리고 PA-c는 kaempferol로 확인되었다.

마디풀 추출물의 HPLC 및 LC/ESI-MS 분석

PA8 (HPLC peak 1 of ethyl acetate fraction): TLC와 HPLC를 통해 PA8 (HPLC peak 1)은 quercetin 또는 myricetin 배당체로 추정, LC/MS/MS와 ^1H NMR을 이용하여 확인하였다. LC/ESI-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, negative ion 모드에서 분자 이온 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 가 m/z 463에서 나타났으며, glucoside 단위의 소실로 인한 이온 피크(m/z 463 \rightarrow m/z 316)를 나타내었다. 또한 보다 정확한 구조 분석을 위하여 ^1H NMR 분석을 실시한 결과(Fig. 5), (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 6.95 (2H, s, H-2',6'), 6.37 (1H, d, $J=2.10$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2.08$ Hz, H-6), 5.32 (1H, d, $J=1.54$ Hz, H-1''), 4.25-4.21 (1H, m, H-2''), 3.78 (1H, s, H-3''), 3.64-3.49 (2H, m, H-4'', 5''), 0.96 (1H, d, $J=6.18$ Hz, H-6'')로 나타났다. 따라서 PA8은 myricetin 3-O-rhamnoside (myricitrin)로 확인되었다.

PA5 (HPLC peak 2 of ethyl acetate fraction): TLC와 HPLC를 통해 quercetin 배당체로 추정된 PA5 (HPLC peak

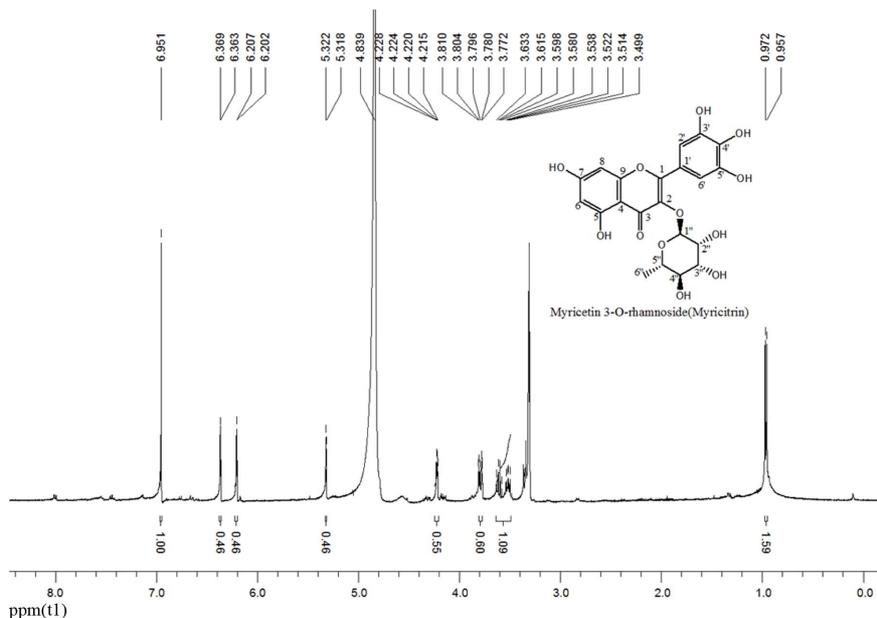


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum and structure of PA 8 (myricetin 3-O-rhamnoside, myricitrin).

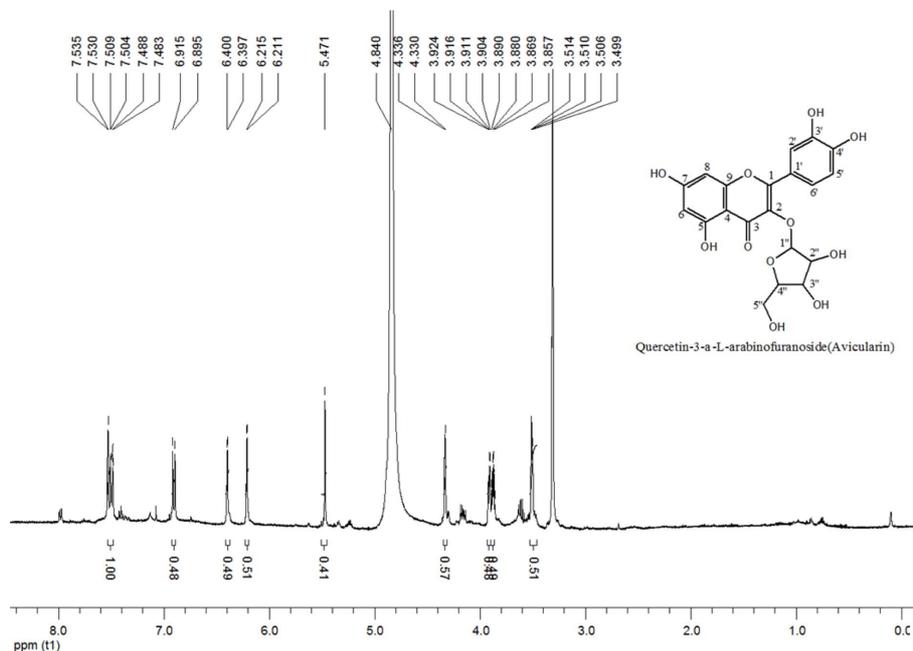


Fig. 6. $^1\text{H-NMR}$ spectrum and structure of PA 5 (quercetin-3- α -L-arabinofuranoside, avicularin).

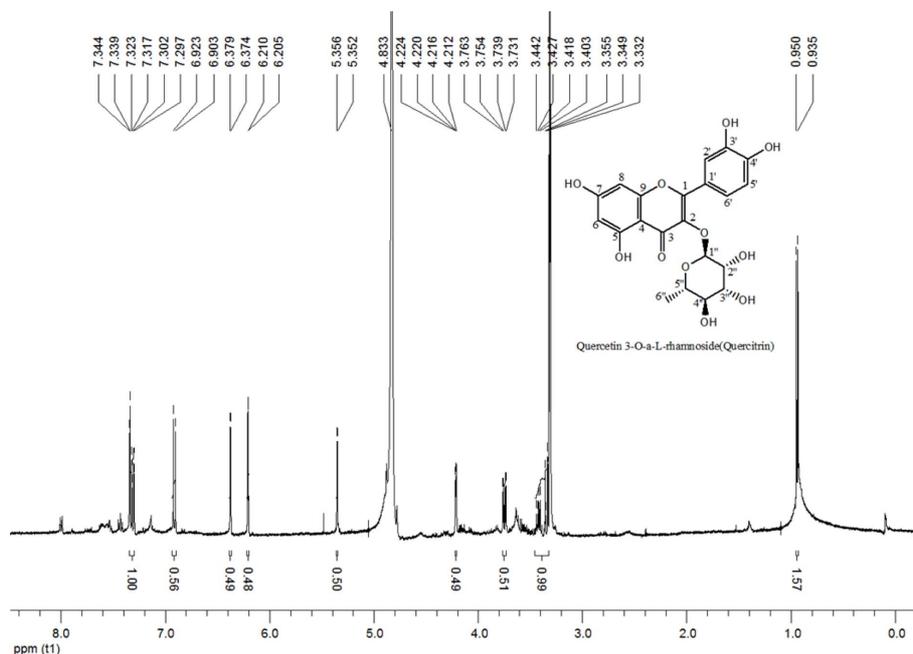


Fig. 7. $^1\text{H-NMR}$ spectrum and structure of PA 6 (quercetin 3-O- α -L-rhamnoside, quercitrin).

2)의 LC/MS/MS를 측정하였다. LC/ESI-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, negative ion 모드에서 분자 이온 $[\text{M-H}]^-$ 가 m/z 433에서 나타났으며, glucoside 단위의 소실로 인한 이온 피크(m/z 433 \rightarrow m/z 301)를 나타내었다. 또한 보다 정확한 구조 분석을 위하여 ^1H NMR 분석을 실시한 결과 (Fig.

6), (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.53 (1H, d, J = 1.82 Hz, H-2'), 7.49 (1H, dd, J = 8.36, 3.91 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, J = 8.36 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J = 1.48 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 1.72 Hz, H-6), 5.47 (1H, s, H-1''), 4.33 (1H, d, J = 2.61 Hz, H-4''), 3.91 (1H, d, J = 2.84 Hz, H-2''),

3.87 (1H, d, $J = 4.11$ Hz, H-3"), 3.51 (1H, dd, $J = 3.91, 2.12$ Hz, H-5")로 나타났다. 따라서 PA5는 quercetin-3- α -L-arabinofuranoside (avicularin)로 확인되었다.

PA6 (HPLC peak 3 of ethyl acetate fraction): TLC와 HPLC를 통해 quercetin 배당체로 추정된 PA6 (HPLC peak 3)을 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, negative ion 모드에서 분자 이온 [M-H]⁻가 m/z 447에서 나타났으며, glucoside 단위의 소실로 인한 이온 피이크(m/z 447 → m/z 301)를 나타내었다. 또한 보다 정확한 구조 분석을 위하여 ¹H NMR 분석을 실시한 결과(Fig. 7), (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.34 (1H, d, $J = 2.08$ Hz, H-2'), 7.33-7.29 (1H, m, H-6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.29$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.09$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.08$ Hz, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 1.58$ Hz, H-1"), 4.23-4.21 (1H, m, H-2"), 3.76-3.73 (1H, m, H-3"), 3.32 (2H, m, H-4", 5"), 0.94 (1H, d, $J = 6.10$ Hz, H-6")로 나타났다. 따라서 PA6은 quercetin 3-O- α -L-rhamnoside (quercitrin)로 확인되었다.

요약

본 연구에서 마디풀 추출물의 항산화 활성을 평가한 결과, DPPH법과 화학발광법에 의하여 마디풀 추출물의 에틸 아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 강력한 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol과 L-ascorbic acid 보다도 우수한 항산화 효능을 나타내었다. 세포막 보호 효과 또한 연구되었다. 마디풀 추출 에틸 아세테이트 분획과 아글리콘 분획 모두 지질과산화 연쇄반응의 차단제인 (+)- α -tocopherol ($\tau_{50} = 38$ min)에 비교하여 더 우수한 세포 보호 활성을 나타냄을 확인하였다($\tau_{50} = 314.7$ min and 264.6 min at 10 μ g/ml). 마디풀 추출물의 TLC, HPLC, LC/ESI-MS/MS, 그리고 NMR을 이용하여 주성분을 분석한 결과, 마디풀 추출물의 에틸 아세테이트 분획의 주성분은 myricitrin, avicularin, quercitrin으로 확인되었으며 마디풀 추출물의 아글리콘 분획의 주성분은 myricetin, quercetin, kaempferol로 확인되었다.

이상의 결과들로 다양한 종류의 플라보노이드를 함유한 마디풀 추출물은 에틸 아세테이트와 아글리콘 분획에서 여러 가지 활성산소종에 대한 총항산화능과 ¹O₂으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과가 큰 것으로 나타났다. 이는 마디풀 추출물이 기능성 화장품 원료로서의 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Acknowledgments

This study was supported by a grant of the Korea Healthcare Technology R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A103017).

References

1. Foote CS. 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen, 2nd Edn. Academic Press, New York.
2. Hsu CY. 2006. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biol. Res.* **39**: 281-288.
3. Kim HS. 1980. A study of antifungal activity with *Polygonum aviculare* L. *Korean J. Mycol.* **8**: 1-5.
4. Kim AR, Park SA, Ha JH, Park SN. 2013. Antioxidative, and inhibitory activities on melanogenesis of *Vitex negundo* L. leaf extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 135-144.
5. Oikarinen A, Kalliainen M. 1989. A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatology* **6**: 24-31.
6. Oikarinen A, Karvonen J, Uitto J, Hannuksela M. 1985. Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatology* **2**: 15-26.
7. Park SN. 1989. Ph. D. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
8. Park SN. 1997. Skin aging and antioxidant. *J. Korean Cosmet. Sci.* **23**: 75-132.
9. Park SN. 2003. Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I). *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **14**: 657-665.
10. Park SN. 2003. Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 510-518.
11. Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. 1995. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 194-198.
12. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H. 1993. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* **331**: 304-306.
13. Tyrrell RM. 1989. Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations. *Photochem. Photobiol.* **49**: 407-412.
14. Vile GF, Tyrrell RM. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radical Biol. Med.* **18**: 721-730.
15. Scharffetter-Kochanek K. 1996. Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *In Adv. Pharmacol.* **38**: 639-650.
16. Xu FQ, Guan HS, Li GQ, Liu HB. 2009. LC Method for analysis of three flavonols in rat plasma and urine after oral administration of *Polygonum aviculare* extract. *Chromatographia* **69**: 1251-1258.
17. Xu FQ, Liu HB, Luo JG, Zhang JL, Guan HS. 2010. Studies on the chemical constituents and meridian doctrine of *Polygonum avicular*. *Periodical of Ocean University of China*, **3**: 19.