

제주 자생 물사과 가지 유래 Flavonoid 화합물의 항산화 활성

염현숙·이남호·현주미[†]

제주대학교 화학·코스메틱스학과

(2018년 4월 12일 접수, 2018년 5월 14일 수정, 2018년 5월 23일 채택)

Anti-oxidative Activities for the Flavonoids of the *Syzygium aqueum* Burm.f. Alston Branches from Jeju Island

Hyun Sook Yeom, Nam Ho Lee, and Ju Mi Hyun[†]

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

(Received April 12, 2018; Revised May 14, 2018; Accepted May 23, 2018)

요약: 본 연구에서는 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성과 세포보호효과를 검색하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 규명하였다. 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 우수한 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또한 H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인한 결과, 20 µg/mL의 농도에서 추출물 및 에틸아세테이트 분획물에서 보호효과가 나타남을 확인하였다. 항산화 활성이 좋은 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분을 찾고자 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 실시하여 2개의 화합물을 분리하였으며 ¹H 및 ¹³C NMR 데이터 분석 및 문헌 비교를 통하여 화학구조를 동정하였다; pinocembrin (1), desmethoxy-matteucinol (2). 분리된 화합물에 대한 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, 화합물 1, 2 모두 농도의존적으로 우수한 라디칼 소거 활성이 나타났다. 100 µM의 농도에서 화합물 1, 2는 H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대하여 세포보호효과를 나타냈다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 물사과 가지 추출물은 천연 항산화 소재로써 활용 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, we investigated the anti-oxidative activities and cell protective effects of the constituents isolated from *S. aqueum* branches. DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities were screened for the ethanol extract and solvent fractions, ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH) fractions showed potent activities. When HaCaT cells were treated with H₂O₂, the ethanol extract and EtOAc fractions (20 µg/mL) protected the cells against oxidative damage. Two constituents were isolated from the EtOAc fraction of *S. aqueum* branches; pinocembrin (1), desmethoxymatteucinol (2). The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including ¹H and ¹³C NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values. Anti-oxidative activities and cell protective effects were studied for the isolated compounds. For the anti-oxidative activities, all of the compounds 1 and 2 showed DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. Also, from the cell protective effect test, the compounds 1 and 2 protected the cell against oxidative stress by H₂O₂. Based on these results, *S. aqueum* branches extract could be potentially applicable as anti-oxidant ingredients in cosmetic industries.

Keywords: *S. Aqueum*, anti-oxidation, cell protective effect, isolation, flavonoid

[†] 주 저자 (e-mail: jumi1578@jejunu.ac.kr)
call: 064)754-3548

1. 서 론

인간의 노화 과정은 시간에 따라 여러 기능이 저하되는 과정으로 노화가 진행됨에 따라 생물체 내의 여러 요인으로부터 초래된 산화적 스트레스를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 되고, 세포 내의 항상성을 잃게 된다[1]. 이러한 노화 현상의 주요인에는 여러 가지가 있지만, 대표적으로 활성산소 종(reactive oxygen species, ROS)을 꼽을 수 있다. 활성산소는 세포에 손상을 입히는 변형된 산소의 모든 종류를 말하는 것으로 산소의 대사과정에서 생성되거나 자외선 및 스트레스와 같은 외부 환경적 요인에 지속적으로 노출되었을 경우 생체 내에 생성된다. 활성산소의 종류로는 superoxide radical anion ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 및 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 있으며 이들은 피부 세포 및 조직 손상을 주도하여 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 탄력을 감소시키고, 주름 및 기미, 주근깨 등을 생성하는 피부 노화를 가속화 시킨다[2-5]. 따라서 피부 노화 방지를 위해서는 과잉의 활성산소 종 생성을 억제하고 또한 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이 필요하다. 이러한 시스템으로 합성 항산화제가 사용되고 있으며 대표적으로 butylated hydroxyl toluene (BHT) 및 butylated hydroxyl anisole (BHA) 등이 있다. 그러나 이 같은 합성 항산화제는 항산화 활성이 매우 우수하지만 장기간 섭취할 경우, 발암, 돌연변이 및 독성 등의 안전성이 문제되면서 최근 사용 제한에 대한 논의가 계속되고 있다. 따라서 독성과 부작용이 적은 천연물 내 생리 활성 성분 등을 이용한 항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다[6].

천연 항산화제는 주로 식물 추출물로 페놀성 화합물들이 주성분이다. 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 히드록시기(hydroxyl group)로 치환된 방향족환(aromatic ring)을 가지고 있으며 자연에 대략 8000여 종이 존재하고 항산화, 항암 등의 기능성을 지니고 있다[7]. 특히 폴리페놀의 일종인 플라보노이드(flavonoid)의 골격구조는 대부분 A, B환에 페놀성 히드록시기를 가지고 있다. 이러한 구조적 이유로 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 많이 활용되고 있다[8].

지난 100년간 지구의 평균기온은 약 0.74 °C 상승하였으나 최근 50년 동안 0.5 °C 상승하여 지구 온난화가 더욱 가속화 되는 경향이다. 우리나라는 최근 100년간 평균기온이 약 1.7 °C 정도 상승하여 세계 평균의 2배 이상 빠른 속도로 온난화가 진행되고 있다. 기후학자에 의하면 아열대(Subtropical zone)는 겨울철 평균기온이 -3 ~ -18°C이고 월 평균기온이 10 °C 이상이 8개월 이상인 기후대로 우리나라 경우 현재 제주도와 전남 고흥, 경남 거제도 등 남부 도서지역이 해당된다. 농촌진흥청 자료에 의하면 기후변화에 대응한 아열대 도입 작물은 2010년 15종에서 2012년 28종으로, 재배면적은 2001년 30 ha에서 2012년 259.4 ha로 재배면적이 점차 증가되고 있다. 이러한 기후 변화는 농업뿐만 아니라 모든 산업에 영향을 미칠 것으로 예상되며 이에 대한 다양한 연구가 이루어져야 한다[9].

물사과(*Syzygium aqueum* Burm.f. Alston)는 도금양과(Myrtaceae)에 속하는 식물로 ‘수분이 많은 사과 같은 과일’이라는 뜻의 영어 이름인 water apple을 직역한 아열대 작물이다. 인도 남부에서 말레이시아 동부에 이르는 동남아시아 지역이 원산지이며, 우리나라에서는 제주도에 재배되고 있다[10]. 물사과 잎(leaves) 추출물에 대해서는 항산화[11], 항고혈당 등의 효능이 알려져 있고 myricetin-3-O-rhamnoside, phloretin 및 hydroxybenzaldehyde 등의 유효 성분이 분리 보고 되어 있다[12].

그러나 아직까지 물사과 가지(branches)를 대상으로 한 유효 성분 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 제주도에 자생하고 있는 아열대 작물인 물사과 가지 추출물의 유효성분을 분리·동정하고 추출물 및 분리된 화합물의 항산화 활성에 관한 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. MPLC (SP, Biotage Co.)에는 역상 silica gel (KP-C18-HS, 40+M, Biotage Co.) 컬럼을 사용하였다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL사의 NMR 전용 용매

인 CD₃OD를 사용하였다.

2.2. 물사과 가지의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 물사과 가지(시료번호:474)는 제주시 오등동에 위치한 국립원예특작과학원 온난화대응농업 연구소에서 2016년 12월에 채집하였다. 채집한 시료는 동결 건조 후 분쇄하여 사용하였으며 시료 500.0 g을 70% 에탄올 10 L에 넣고 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 148.8 g을 얻었으며 얻어진 추출물 90.0 g을 증류수 6 L에 현탁시키고 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 얻었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

에틸아세테이트 분획물 5.0 g을 극성에 따라 세분화하기 위하여 MPLC를 수행하였다. H₂O-MeOH (20-100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 30 mL씩 용출하여 총 48개의 분획물을 얻었다(Fr. 1-48). MPLC 분획물 중 Fr. 27로부터 화합물 **1** (14.6 mg)을 얻었고, Fr. 36으로부터 화합물 **2** (19.7 mg)를 얻었다. 화합물 **1**, **2**의 NMR 데이터는 아래와 같다.

Pinocembrin (**1**) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.49 (2H, dd, *J* = 1.8, 8.7 Hz, H-2', 6'), 7.39 (3H, m, H-3', 4', 5'), 5.94 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 5.90 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 5.46 (1H, dd, *J* = 3.2, 12.8 Hz, H-2), 3.09 (1H, dd, *J* = 12.8, 17.4 Hz, H-3), 2.77 (1H, dd, *J* = 3.2, 17.4 Hz, H-3), ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 197.5 (C-4), 168.6 (C-7), 165.6 (C-5), 164.8 (C-9), 140.6 (C-1'), 129.9 (C-4'), 129.8 (C-3', 5'), 127.5 (C-2', 6'), 103.5 (C-10), 97.3 (C-8), 96.4 (C-6), 80.6 (C-2), 44.3 (C-3)

Desmethoxymatteucinol (**2**) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.51 (2H, m, H-2', 6'), 7.39 (3H, m, H-3', 4', 5'), 5.43 (1H, dd, *J* = 3.2, 12.4 Hz, H-2), 3.05 (1H, dd, *J* = 12.4, 16.9 Hz, H-3), 2.80 (1H, dd, *J* = 3.2, 16.9 Hz, H-3), 2.02 (3H, s, CH₃-8), 2.01 (3H, s, CH₃-6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 198.1 (C-4), 164.4 (C-7),

160.5 (C-5), 159.2 (C-9), 141.0 (C-1'), 129.8 (C-3', 5'), 129.6 (C-4'), 127.3 (C-2', 6'), 105.1 (C-8), 104.3 (C-6), 103.4 (C-10), 80.2 (C-2), 44.4 (C-3), 8.3 (CH₃-6), 7.6 (CH₃-8)

2.4. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Deinis 방법[13]을 응용하였고 각 시료 용액 100 μL에 증류수 900 μL와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μL를 가하여 상온에서 3 min간 반응시켰다. 여기에 7% (w/v) Na₂CO₃ 용액 200 μL와 증류수 700 μL를 가하여 실온에서 1 h 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법[14]을 응용하였고 각 시료 용액 15 μL에 ethylene glycol 150 μL와 0.1 N NaOH 15 μL를 가하여 상온에서 1 h 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2.5. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법[15]을 응용하였고 96-well plate에 각 시료 용액 20 μL와 0.2 mM DPPH 라디칼 용액 180 μL를 혼합하여 상온에서 20 min간 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거율이 50%일 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

2.6. ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 양이온 라디칼 소거 활성 실험은 Re 등의 방법[16]을 응용하였고 7.0 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 상온, 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02가 되도록 에탄올로 희석하여 실험에 사용하였다. 96-well plate에 각 시료 용액 20 μL와 ABTS⁺ 라디칼 용액 180 μL를 혼합하여 상온, 암소에서 20 min간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거율이 50%일 때의 농

도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

2.7. 세포보호효과 측정

2.7.1. 세포 배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.7.2. 세포독성 평가(MTT Assay)

96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전 배양 후 FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 첨가하여 37 °C에서 3 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음 ELISA reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.7.3. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과

HaCaT cell을 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전 배양 후 배지를 제거하였다. 세포독성 평가로 결정된 농도의 과산화수소를 처리하여 30 min간 배양한 후, 과산화수소를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 2회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 희석하여 처리하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 배양한 후 MTT assay로 세포 생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인하였다.

2.8. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었다.

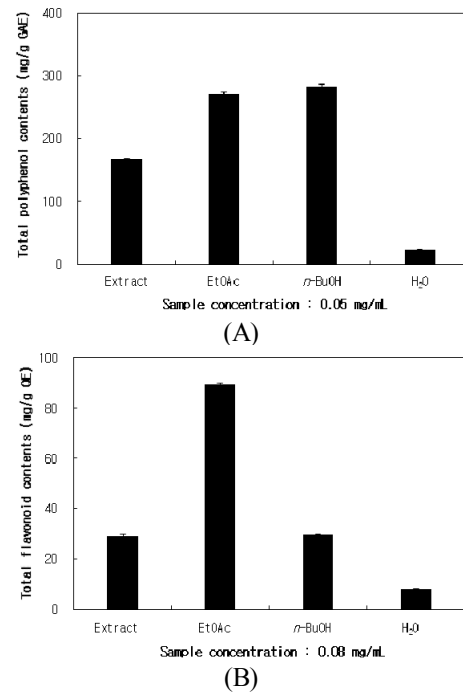


Figure 1. Total polyphenol contents (A) and total flavonoid contents (B) of extract and solvent fractions from *S. aqueum* branches. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

물사과 가지의 항산화 활성을 확인하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 자연계에 널리 분포하는 대표적인 천연 항산화 물질 중 폴리페놀 및 플라보노이드는 천연물의 항산화력을 결정 짓는데 매우 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.

물사과 가지는 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며 얻어진 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량 측정 결과, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 많은 폴리페놀(270.6, 283.5 mg/g GAE)이 함유되어 있음을 알 수 있었다(Figure 1A). 또한 총 플라보노이드 함량 측정 결과, 에틸아세테이트 분획물이 가장 많은 플라보노이드(89.2 mg/g QE)를 함유하고 있었다(Figure 1B).

Table 1. SC₅₀ Values of Extract and Solvent Fractions from *S. aqueum* on DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities

Fractions	70% EtOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	Ascorbic acid
DPPH radical (μg/mL)	17.8	10.6	10.5	> 25.0	6.4
ABTS ⁺ radical (μg/mL)	9.5	5.8	6.1	> 25.0	5.7

3.2. 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

인체에 유해한 활성산소 중 중에는 hydroxyl radical (·OH)과 같은 홀 전자를 갖는 자유 라디칼이 포함되어 있다. 일반적으로 전자는 쌍으로 존재하려는 경향 때문에 홀로 있으면 다른 분자들과 반응하려는 경향이 크다. 따라서 ·OH 와 같은 라디칼의 활성산소 종이 가진 자유 전자로 인해 구조적으로 불안정한 상태가 되므로 생체 분자의 전자와 빠르게 반응하여 세포를 손상시킨다. 시료의 항산화능은 이러한 홀 전자에 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통하여 측정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH 및 ABTS⁺를 이용하여 물사과 가지 추출물의 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 두 가지 방법은 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작이 공통적이며 대부분 유의적인 상관성을 나타낸다.

추출물 및 용매 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 10.6, 10.5 μg/mL로 대조군인 ascorbic acid 만큼 우수한 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또한 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험 결과도 마찬가지로 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 5.8, 6.1 μg/mL로 대조군인 ascorbic acid 만큼 우수한 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다(Table 1).

본 결과로 미루어 볼 때 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많았던 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 라디칼 소거 활성이 뛰어난 것을 확인하였고 이에 따라 두 실험 결과가 항산화 활성 결과와 유의성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

3.3. 세포보호효과 측정

3.3.1. 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 HaCaT 세포독성 평가

MTT assay로 추출물 및 용매 분획물이 사람각질형

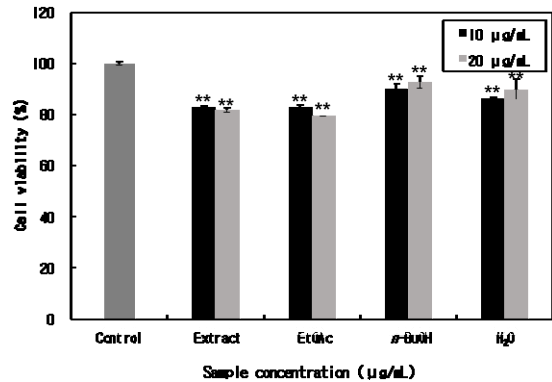


Figure 2. Effects of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ***p* < 0.01.

성세포인 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 확인함으로써 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 10, 20 μg/mL의 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 세포독성 평가 결과 세포 생존율이 모두 80% 이상을 나타내는 최고 농도인 10, 20 μg/mL로 설정하였다(Figure 2).

3.3.2. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과

산소의 대사과정에서 생성되거나 자외선 및 스트레스와 같은 환경적 요인에 의해서 과잉 생성된 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속이온과 반응하고 다른 활성산소를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다. 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 과산화수소를 HaCaT 세포를 대상으로 농도별로(2, 4, 6, 8 mM)로 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 4 mM의 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 실험군에 비하여 약 60%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 3A). 이를 바탕으로 세포 손상이 유도된 HaCaT 세포에서 농도별 물사과 가지

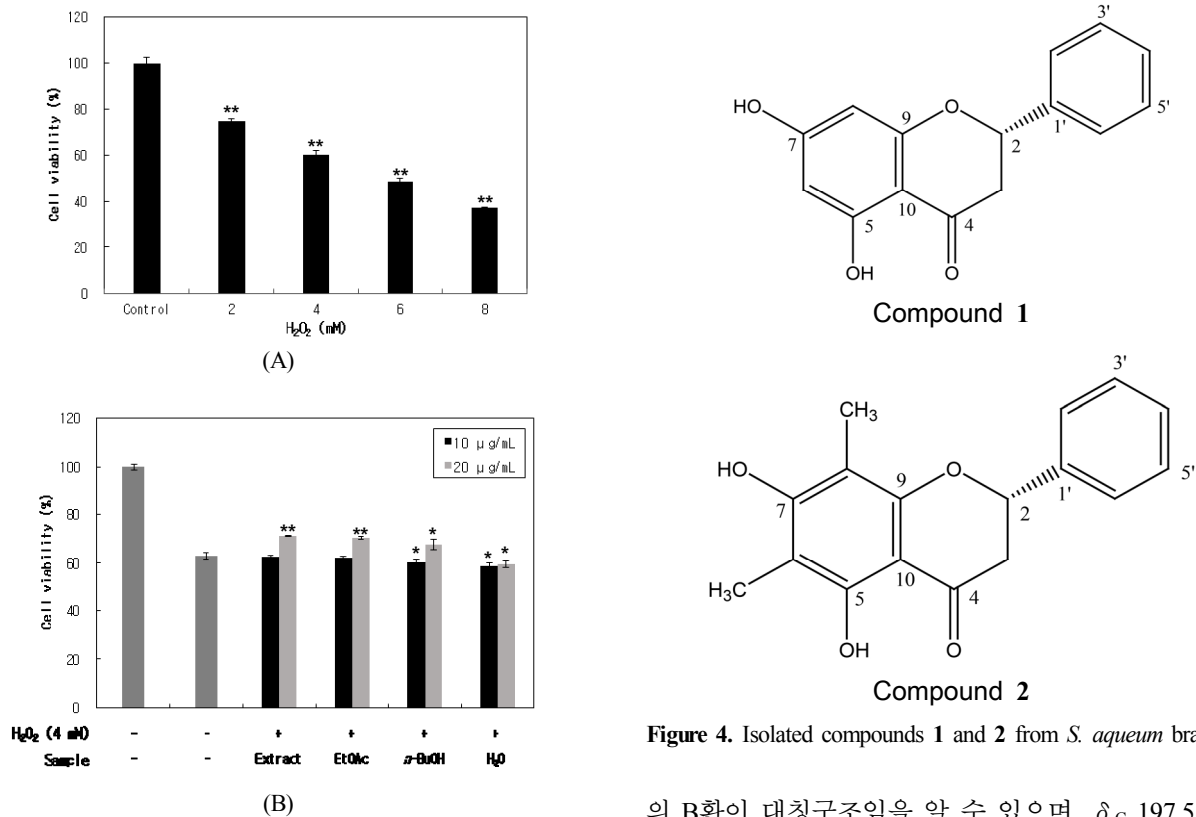


Figure 4. Isolated compounds 1 and 2 from *S. aqueum* branches.

Figure 3. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. (B) Cell protective effects of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

추출물 및 용매 분획물의 세포보호효과를 확인하였다. 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 세포 생존율은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 미미한 수준으로 증가하지 않았다. 그러나 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 세포 생존율은 각각 71.0, 70.3%로 우수한 세포보호효과가 있음을 확인하였다(Figure 3B).

3.4. 물사과 가지로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항산화 활성이 좋은 에틸아세테이트 분획물에 대해 MPLC를 수행하여 단일물질들을 분리하였다. ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 2개의 화합물을 동정하였다. 화합물 1은 δ_{H} 7.39-7.49 (5H, m)의 피크를 통해 플라보노이드

의 B환이 대칭구조임을 알 수 있으며, δ_{C} 197.5의 피크는 카보닐기로 예상할 수 있다. δ_{H} 2.77-3.09 및 δ_{C} 44.3, 80.6의 피크를 통해 플라보노이드 골격임을 알 수 있으며, 문헌[16]과 비교하여 pinocembrin으로 동정하였다(Figure 4). 화합물 2는 δ_{H} 2.01 (3H, s), 2.02 (3H, s) 및 δ_{C} 7.6, 8.3의 피크가 더 나타난 것으로 보아 2개의 메틸기가 치환되어 있을 것이라 예상할 수 있었으며, 문헌[18]과 비교하여 desmethoxymatteucinol로 동정하였다(Figure 4). 화합물 2는 물사과 가지에서 처음으로 분리된 물질이다.

3.5. 물사과 가지로부터 분리된 flavonoid 화합물의 항산화 활성

물사과 가지에서 분리된 화합물의 항산화 활성을 확인하기 위해 기존에 널리 알려진 천연 항산화제인 ascorbic acid를 대조군으로 하여 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험을 진행하였다. DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과 화합물 1, 2의 SC₅₀ 값이 각각 248.0, 255.3 μM 로 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였으며 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험 결과에서도 화합물 1, 2의 SC₅₀ 값이 각각 73.5, 86.8 μM 로 소거 활성이 있음

Table 2. SC₅₀ Values of Isolated Compounds 1 and 2 from *S. aqueum* on DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities

Compounds	1	2	Ascorbic acid
DPPH radical (μM)	248.0	255.3	43.2
ABTS ⁺ radical (μM)	73.5	86.8	26.8

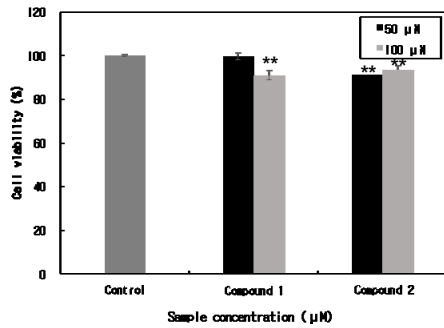
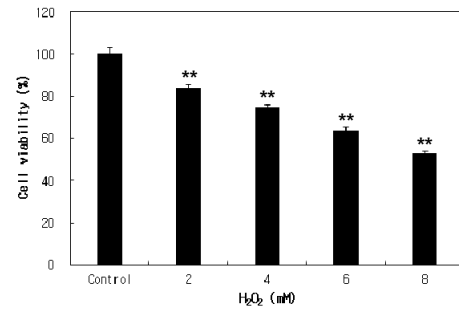


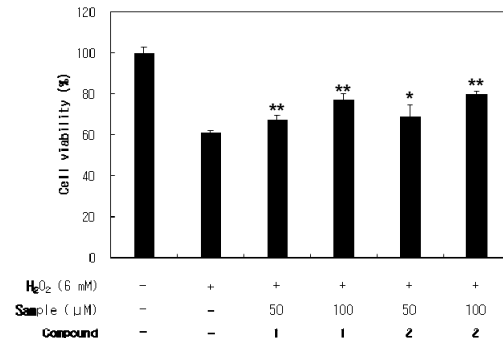
Figure 5. Effects of isolated compounds 1 and 2 on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by MTT assay. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$.

을 확인할 수 있었다(Table 2).

과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 세포보호효과를 확인하였다. 우선 MTT assay로 분리된 화합물의 사람각질형성세포에 대한 세포독성을 확인함으로써 실험에 사용될 화합물의 농도 범위를 결정하였다. 50, 100 μM 의 농도에서 화합물 1, 2는 세포독성 평가 결과, 세포 생존율이 모두 80% 이상이었다. 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 50, 100 μM 로 설정하였다(Figure 5). 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 세포보호효과를 확인한 결과, 6 mM의 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 실험군에 비하여 약 60%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 6A). 화합물 1, 2의 세포 생존율은 50 μM 의 농도에서 각각 68.2%, 68.9%로 증가하였으며, 100 μM 의 농도에서 각각 77.3, 77.9%로 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 화합물 1, 2는 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 우수한 세포보호효과를 나타냈다(Figure 6B).



(A)



(B)

Figure 6. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. (B) Cell protective effects of isolated compounds 1 and 2 on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4. 결론

현재 물사과(*S. aqueum* Burm.f. Alston) 가지에 대해서는 생리 활성 및 유효성분 연구에 대해 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성을 검색하고, 활성 성분을 확인하기 위해 단일물질 분리 과정을 진행하여 유효성분의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 활성을 확인하여 천연 항산화제로써의 활용가능성을 검토하였다.

물사과 가지 70% 에탄올 추출물을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 얻었다. 항산화 활성을 측정한 결과, 에틸아세테이트 분획물에 대하여 우수한 활성을 확인하였다. 항산화 실험에서 모두 우수한 활성을 보인 에틸아세테이트 분획물을 대상으로 유효 성분을 찾고자

MPLC를 수행하여 단일물질을 분리하였다. 분리된 단일물질은 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석을 통해 화학구조를 확인한 결과 pinocembrin (**1**), desmethoxymatteucinol (**2**)로 확인되었다.

분리된 화합물에 대한 항산화 활성 실험을 진행한 결과 모든 화합물에서 항산화 활성을 나타냈다. 화합물 **1**, **2**는 플라보노이드 계열의 화합물이다. 화합물 **2**는 화합물 **1**과 비교하였을 때 C_6 , C_8 위치에 메틸기가 치환되어 있는 구조적 차이를 보이는데 항산화 활성 실험에서 두 화합물이 유사하게 우수한 효과를 나타내는 것으로 보아 이러한 구조적 차이는 결과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 화합물 **1**, **2**와 같은 플라보노이드 계열의 화합물들은 대부분 A, B환에 히드록시기의 개수와 결합 위치에 따라 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[19, 20]. 본 연구 결과에서도 두 화합물 A 환에 위치한 히드록시기에 의해 항산화 활성이 나타나는 것으로 예상 할 수 있다. 이상의 연구를 바탕으로 몰사과 가지 추출물은 천연 항산화제로써 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2017R1A6A3A11036375)

Reference

1. S. Y. Lee, H. J. Kim, and S. W. Choi, Study on the antioxidant activity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(1), 61 (2011).
2. B. Halliwell, Antioxidants in human health and disease, *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 33 (1996).
3. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
4. S. Yasuko and H. Takashi, Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation, *J. Dermatol. Sci.*, **14**(3), 225 (1997).
5. S. N. Park, Effects of natural products on skin cells -Action and suppression of reactive oxygen species-, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**, 77 (1999).
6. J. H. Yoon, S. G. Park, M. J. Lee, J. Y. Park, K. S. Seo, K. C. Woo, and C. E. Lee, Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata Reichenbach fil.* fractions as cosmetic, *J. Life Science*, **23**(9), 1073 (2013).
7. M. B. Kim, S. H. Hyun, J. S. Park, M. A. Kang, Y. H. Ko, and S. B. Lim, Integral antioxidative capacity of extracts by pressurized organic solvent from natural plants in Jeju, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(11), 1491 (2008).
8. E. C. Kim, S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row, Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **16**, 348 (2005).
9. J. H. Kang, Y. S. Lee, D. M. Son, S. H. Nam, B. Y. Oh, S. K. Lee, K. J. Jung, and K. J. Choi, The characteristics of subtropical vegetables and its application, *Food Preservation and Processing Industry*, **12**(1), 40 (2013).
10. K. J. Kim, Tropical fruit resources, 408, GeoBook, Seoul, Korea (2012).
11. H. Osman, A. A. Rahim, N. M. Isa, and N. M. Bakhir, Antioxidant activity and phenolic content of *Paederia foetida* and *Syzygium aqueum*, *Molecules*, **14**(3), 970 (2009).
12. T. Manaharan, D. Appleton, H. M. Cheng, and U. D. Palanisamy, Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential anithyperglycaemic agents, *Food chemistry*, **132**(4), 1802 (2012).
13. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**(11), 966 (1981).
14. F. B. Davis, E. Middleton, P. J. Davis, and S. D. Blas, Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation in vitro of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity, *Cell Calcium*, **4**(2), 71 (1983).
15. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
16. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. pannala, M.

- Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
17. A. Y. Ching, T. S. Wah, M. A. sukari, G. E. C. Lian, M. Rahmani, and K. Khalid, Characterization of flavonoid derivativers from *Boesenbergia rotunda* (L.), *Mal. J. Anal. Sci.*, **11**(1), 154 (2007).
18. K. A. Mustafa, N. B. Perry, and R. T. Weavers, Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros species* (Myrtaceae), *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**(10), 1049 (2005).
19. E. N. Frankel, J. B. Cerman, J. E. Kinsella, E. Parks, and J. Kanner, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *The Lancet*, **341**(8843), 454 (1993).
20. K. L. Khanduja and A. Bhardwaj, Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared *in vitro* with some other bioflavonoids, *Indian J. Biochem. & Biophys.*, **40**(6), 416 (2003).