

냉이(*Capsella bursa-pastoris*)로부터 Superoxide Anion Radical 소거물질의 정제 및 이화학적 성질

곽재혁 · 권미향* · 나경수** · 성하진*** · 양한철
고려대학교 식품공학과, *고려대학교 생물공학연구소
대구공업전문대학 식품영양과, *고려대학교 유전공학과

Purification and Physicochemical Properties of Superoxide Anion Radical Scavenger from *Capsella bursa-pastoris*

Jae-Hyock Kwak, Mee-Hyang Kweon*, Kyung-Soo Ra**, Ha-Chin Sung***, Han-Chul Yang

Department of Food Technology, Korea University

*Institute of Biotechnology, Korea University

**Department of Food and Nutrition, Taegu Technical Junior College

***Department of Genetic Engineering, Korea University

Abstract

A scavenger of superoxide anion radical which causes oxygen toxicity was isolated from *Capsella bursa-pastoris*, and its physicochemical properties were investigated. The scavenger was isolated and purified by solvent fractionation and liquid column chromatographies (Amberlite XAD-2, Sephadex LH-20, Bio gel P-2, ODS (silica gel with 100% octadecyl silanization)). An active compound of 0.25 g was finally isolated by Fast Protein Liquid chromatography (FPLC) from 100 g ethanol extract of *Capsella bursa-pastoris*. A 50% decrease of superoxide anion radical was obtained with the scavenger compound of 0.58 g. The compound was assumed to be a phenolic glycoside from its physicochemical properties.

Key words: superoxide free radical scavenger, *Capsella bursa-pastoris*, phenolic glycoside

서 론

최근 각종 한약재, 동식물성 식품재료 등의 천연물로부터 인체에 무해한 항산화성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 국내에서도 다양한 소재로부터 항산화 활성에 대한 검색⁽¹⁾ 및 인삼⁽²⁾, 해조류⁽³⁾, 더덕⁽⁴⁾, 칩뿌리⁽⁵⁾, 산사 및 가지⁽⁶⁾, 마늘⁽⁷⁾, 붉나무⁽⁸⁾에서 항산화 효과가 보고되어 있다. 대표적인 천연 항산화 물질로 보고된 것으로는 ascorbic acid, tocopherols와 같은 비타민류⁽⁹⁾, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀산류, catechine과 같은 tannin류⁽¹⁰⁾, quercetin, kampferol과 같은 flavonoid류⁽¹¹⁾, carotenoid 류, Maillard 반응의 반응 생성물⁽¹²⁾ 등이 있으며, 그밖에 펩타이드⁽¹³⁾나 단백질, alkaloid류, phospholipid와 같은 물질에서도 이러한 효과를 볼 수 있다⁽¹⁴⁾.

한편 최근 활성산소 및 유리 라디칼의 유해성이 대두⁽¹⁵⁾되면서 특히 산소독성에 영향을 미치는 superoxide anion radical (SAD)을 소거하는 효소인 SOD (superoxide dismutase)⁽¹⁶⁾가 주목을 받고 있으며, 항산화제 역시 지질라디칼 이외에도 각종 라디칼을 소거하는 것으로 밝혀지고 있다⁽¹⁷⁾. 홍 등⁽¹⁸⁾은 냉이 에탄올 추출물이 항산화 효과 이외에도 각종 라디칼에 대한 소거 효과를 가진다고 보고하였다.

본 실험에서는 지질 라디칼 및 각종 라디칼에 대해 높은 소거 효과를 보인 냉이로부터 SAD에 대한 소거 물질을 정제하고 이 물질의 이화학적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

냉이는 1994년 봄 서울 보문동 소재 보문시장에서 구입하여 사용하였다.

Corresponding author: Mee-Hyang Kweon, Institute of Biotechnology, Korea University, Anam-dong 5-1, Sungbukku, Seoul 136-701, Korea

시약

Cytochrome c (from horse heart, M.W. 12,384), xanthine, xanthine oxidase (from milk, Grade IV), Sephadex LH-20, ODS (Derivatized silica gels with Octadecyl (C₁₈)), Dowex 50W 및 Dowex 1 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며, Amberlite XAD-2는 Rohm and Haas사로부터, Bio gel P-2는 Bio Rad사로부터, Sep-Pak (C₁₈) cartridge는 Waters사로부터, cellulose-coated plastic sheet는 Merck사로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 분석시약은 1급 이상의 시약을 사용하였다.

냉이 에탄올 추출물의 분획

건조된 냉이를 10배량의 95% 에탄올로 80°C에서 3회 환류 추출한 후 농축, 건조하여 에탄올 추출물을 얻고 이를 적정량의 물에 분산시킨 후 Fig. 1과 같은 방법으로 순차분획하였다. 즉 분획 여두(separating funnel)에서 동량의 n-hexane을 가한 후 3회씩 추출 농축하여 Fraction (Fr.) H을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 수층을 ethyl ether, ethyl acetate, n-butanol로 추출 농축하여 각각 Fr. E, Fr. EA, Fr. B 및 최종 수층을 농축한 Fr. D를 얻었다.

SAD에 대한 소거활성 측정

SAD에 대한 소거활성은 xanthine/xanthine oxidase에 의한 cytochrome c 환원법을 이용하여 측정하였다⁽¹⁹⁾.

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 SAD에 대한 소거활성 측정법과 같이 반응액을 제조하고 293 nm에서 3분간 흡광도 증가를 측정하였다⁽¹⁹⁾.

SAD 소거물질의 정제

SAD에 대해 높은 소거 활성을 보인 Fr. B에 대하여 Fig. 2와 같이 정제를 실시하였다.

즉 증류수로 평형화된 Amberlite XAD-2 column (3.2×30 cm)에 Fr. B를 주입하고 흡착되지 않은 성분을 증류수로 세척한 후 용매의 비극성도를 높여가며 (30% MeOH, 70% MeOH, 30% Acetone, 70% Acetone 순으로 stepwise elution) 각 획분 당 500 ml 씩 용출하여 활성 획분을 얻었다. 이 활성 획분을 농축한 후 10% methanol로 평형화된 Sephadex LH-20 column (1.75×87 cm)에 주입하고 동일 용매로 12.5 ml/hr의 속도로 용출하여 활성이 있는 부분만을 농축하였다. 여기서 얻어진 활성 획분을 20% ethanol로 평형화된 Bio gel P-2 column (1.75×23 cm)에 주입하고

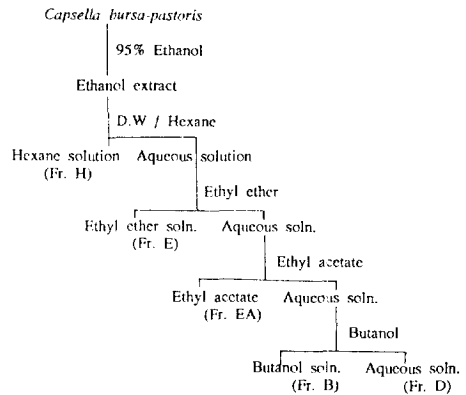


Fig. 1. Fractionation of the ethanol extract of *Capsella bursa-pastoris* into various solvents

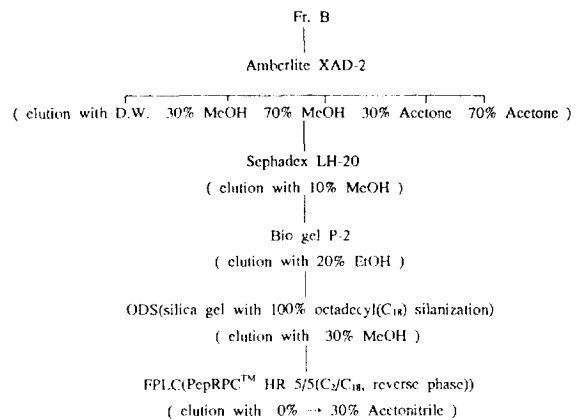


Fig. 2. Purification of the superoxide anion radical scavenger from *Capsella bursa-pastoris*

동일 용매로 7.66 ml/hr의 속도로 용출하여 활성이 있는 부분만을 농축하였다. 여기서 얻어진 활성 획분을 30% methanol로 평형화된 ODS column (1.5×18 cm)에 주입하고 동일 용매로 7.66 ml/hr의 속도로 용출하여 활성이 있는 부분만을 농축하였다. 최종적으로 정제의 확인을 위해 ODS column에서 얻어진 활성 획분을 Sep-Pak (C₁₈) cartridge 통과 후 FPLC(Fast protein Liquid Chromatography)를 이용하여 분획하였다. 분석 조건은 Pharmacia FPLC system으로 Pharmacia Monitor UV-M (at 254 nm, AU 0.1) detector와 PepRPCTM HR 5/5 (C₂/C₁₈, reverse phase) column을 사용하였으며, 이동상의 조건은 100% H₂O에서 30% acetonitrile (H₂O : acetonitrile, 7 : 3)까지의 농도구배로 용출하였으며, 유속은 1 ml/min으로 하였다.

소거물질의 이화학적 성질

응점 측정: 건조된 정제시료 10 mg을 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimeter, DSC 1500, Stanton Redcroft)를 사용하여 응점을 측정하였다. 이 때 가열속도는 10°C/min로 하였다.

pH 안정성 측정: 정제시료를 1000 µg/ml의 농도로 pH 3 (diluted HCl), pH 7(증류수), pH 10 (diluted NaOH) 수용액에 녹인 후 24시간 방치한 다음 소거활성을 측정하였다.

전하적 성질: 이온교환수지인 Dowex 50W (H⁺ form)과 Dowex 1 (Cl⁻ form)에의 흡착 여부를 확인하기 위해 시험관에 각각의 이온교환수지를 5 mg 첨가한 후 각각의 pH에 해당하는 용액을 3 ml 가하여 흡착시킨 후 상징액을 취하고, 여기에 2 M NaCl 2 ml를 가하여 흡착된 물질을 탈착하여 비흡착 부분과 흡착 부분의 소거활성을 측정하였다. 소거활성은 cytochrome c 환원의 저해율로 표시하였다.

정색반응: 정제시료에 대하여 ninhydrin(0.2% 수용액), Enrich (10% *p*-dimethyl amino benzaldehyde in conc. HCl), ferric chloride, 1 N NaOH, anthrone (0.2% anthrone in H₂SO₄) 및 Molish (5% α-naphtol in ethanol) 반응을 실시하였다.

용해도 측정: 정제시료를 1,000 µg/ml의 농도로 각종 용매(H₂O, methanol, ethanol, acetone, butanol, ethyl acetate, chloroform 및 hexane)에 녹인 다음 원심 분리(100×G, 5분)하여 가용과 비가용 부분으로 분획하고 이들의 소거활성을 측정하였다.

박층 크로마토그래피(thin layer chromatography) 상의 R_f 값 결정: 정제시료를 methanol에 녹여 cellulose-coated plastic sheets (Merck, 5577)에 점적한 후 *n*-BuOH : acetic acid : H₂O (4 : 1 : 5), 15% acetic acid 수용액 및 H₂O 등의 용매로 각각 전개시킨 후 1 M NaOH로 발색시켜 각각의 R_f 값을 구하였다.

자외선 흡수 특성: 정제시료를 methanol에 녹여 자외선 흡수 특성을 관찰하였다. 사용기는 Uvicon-930 spectrophotometer를 사용하였으며, 500 nm/min의 scan speed로 190 nm부터 500 nm까지의 자외선 흡수 특성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

냉이 에탄올 추출물 분획의 SAD 소거능 검토

Fig. 1의 각 분획의 SAD 소거 활성 측정 결과 Fr. B와 Fr. E가 다른 분획에 비해 높은 활성을 나타내었는데, 이 반응계에 의해 측정되는 소거 활성에 있어서 어떤 물질에 의해 반응계 자체가 억제될 경우, 즉 xan-

thine oxidase의 활성이 저해되는 경우, 그 물질의 실제 라디칼 소거 효과보다 높은 활성으로 나타날 수도 있다. 따라서 냉이 추출물의 실제 superoxide anion radical 소거활성에 대한 xanthine oxidase의 활성 저해에 의한 영향을 알아보고 특히 탄닌을 비롯한 많은 페놀류들에 있어서 xanthine oxidase에 대한 저해 활성이 보고되고 있는 바 냉이 추출물의 xanthine oxidase 저해활성을 조사하였다. 그 결과 Fr. D를 제외한 각 분획에서 효소 저해 활성을 나타내는 것으로 나타났고 특히 Fr. E에서는 다른 분획에서보다 월등한 저해 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 Fr. E의 superoxide anion radical에 대한 소거 활성은 라디칼에 대한 소거 활성이라기보다 xanthine oxidase의 저해에 의해 라디칼 형성 자체가 억제됨으로써 나타나는 현상으로 생각된다⁽¹⁵⁾. 따라서 실제 superoxide anion radical에 대해 높은 소거 활성을 보인 Fr. B에 대하여 정제를 진행하였다.

Superoxide anion radical 소거물질의 정제

높은 활성을 보인 Fr. B를 Amberlite XAD-2 column에 주입하고 흡착되지 않은 성분을 증류수로 세척한 후 용매의 비극성도를 높여가며(30% methanol, 70% methanol, 30% acetone, 70% acetone 순으로 stepwise elution) 용출하였다. 각각의 획분에 대해 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과 70% methanol 획분에서 가장 활성이 높았다.

이 획분을 10% methanol로 평형화된 Sephadex LH-20 column에 주입하여 용출한 결과 Fr. 110-160 부분에서 활성이 나타났다. 한편 이 물질의 silica gel chromatography 결과 강하게 흡착되어 silica gel로의 정제가 어려워 Sephadex LH-20만을 사용하였으며, 용매강도(solvent strength)가 큰 용매조건인 10% methanol을 사용하여 용출하였다. 이 경우 분리하는데 시간이 오래 걸린다는 단점이 있으나, 극성이 큰 물질 사이에서의 분리능을 향상시킬 수 있어 이 용매조건을 사용하였다. 한편 Sephadex LH-20의 경우 고분자의 축합형 탄닌 등의 특정 탄닌과 흡착되어 용매로도 제거하기 어려우며, 장기간 사용시 gel의 수명을 단축시킬 염려가 있다고 보고⁽²⁰⁾되었는데, 실제로 Sephadex LH-20 gel에 색소 성분들이 흡착되어 떨어지지 않는 것이 관찰되어 이러한 물질의 superoxide anion radical에 대한 소거 활성에 대해서는 배제하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 얻은 활성 획분을 Bio gel P-2 column에 주입하여 용출시킨 결과 활성이 낮은 앞부분의 획분을 제거할 수 있

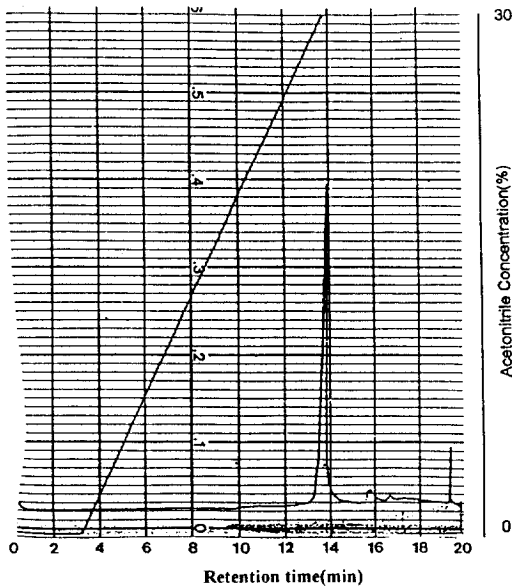


Fig. 3. FPLC chromatogram of active fraction from ODS FPLC was performed on Pharmacia FPLC system equipped with UV detector (at 254 nm) and PepRPC™HR 5/5 (C₂/C₁₈, reverse phase) column using acetonitrile gradient

Table 1. Summary of purification of superoxide anion radical scavenger

Step	Yield (%)	IC ₅₀ ¹⁾ on O ₂ ^{·-} (μg)	IC ₅₀ on XOD (μg)
Ethanol extracts	100.00	20.23	>500
F. BuOH	16.29	12.00	396.73
Column chromatography			
XAD-2	3.38	7.54	141.83
LH-20	0.34	2.00	89.36
P-2	0.29	0.68	>200
ODS	0.28	0.65	>200
F. FPLC	0.25	0.58	>200

¹⁾The concentration of 50% inhibition

었다. 크기 배제(size exclusion) 효과가 Sephadex G-25 (fraction range 분자량 1,000-5,000) 수준인 Sephadex LH-20의 정제 양상을 볼 때 활성 획분이 뒤에 위치하므로 이보다 더 작은 분자량에서 분리 효과가 우수한 Bio gel P-2(fraction range : 100-1,800 daltons)를 사용하여 분리하였다.

Bio gel P-2 column chromatography에 의해 얻은 활성 획분을 ODS column에 주입하여 용출한 결과 단일 peak를 얻었다. ODS column에서 얻어진 활성 획분을 FPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다(Fig. 3). 정제된 물질의 superoxide anion radical을 50% 억제하는

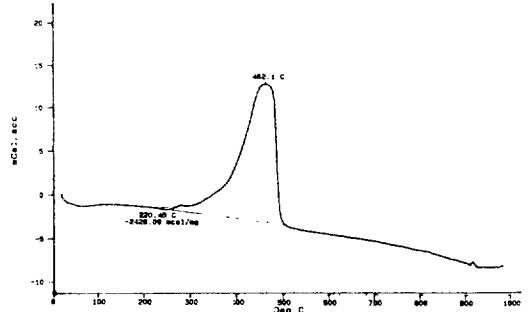


Fig. 4. Thermal events of DSC of O₂-scavenger from *Capsella bursa-pastoris* DSC curve was recorded on DSC 1500 (Stanton redcroft) at the heating rate of 10°C/min

농도(IC₅₀)는 0.58 μg이었다.

Table 1에서는 각 정제 단계의 superoxide anion radical의 소거 활성을 비교하였는데, 정제가 진행될수록 활성은 증가하지만, xanthine oxidase에 대한 저해 활성은 감소하는 것을 알 수 있어 이 물질의 소거 효과는 xanthine oxidase 활성의 저해로 인한 활성이라기 보다 실제 라디칼 소거 효과라 볼 수 있다.

소거물질의 이화학적 성질

융점: 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimeter, DSC)를 사용하여 융점을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 일반적으로 무정형(amorphous state)인 flavonoids의 경우 가열을 받으면 200°C 전후에서 plastic한 성질을 갖다가 그 이상의 온도에서 녹기 시작하는데, 이 물질의 경우 보통의 flavonoids보다 높은 융점⁽²¹⁾을 가짐을 알 수 있었다. 일반적으로 시차주사열량계에서의 융점 결정은 T_m(melting/transition temperature)으로 하므로 이 물질의 융점을 약 350°C 정도로 추정하였다.

pH 안정성: Fig. 5와 같이 이 물질의 경우 산성이나 알칼리 조건 하에서 소거 활성이 감소되는 것을 볼 수 있다. 특히 알칼리에서 활성 감소가 심한 것은 이 물질의 구조가 phenol성 물질에 기인하는 바 산성인 phenol기⁽²²⁾가 알칼리 조건에서 해리되어 소거 활성이 감소된다고 생각된다.

전하적 성질: 이 물질의 양이온 및 음이온 교환수지에의 흡착 여부를 실험한 결과 Fig. 6과 같이 Dowex 50W에 흡착되는 것으로 보아 이 물질이 염기성인 성질을 가지며 양이온을 띠는 기능을 갖는 것으로 생각된다.

정색반응: Table 2와 같이 phenol성 물질의 정성에 사용되는 ferric chloride와 당의 정성에 사용되는 Mol-

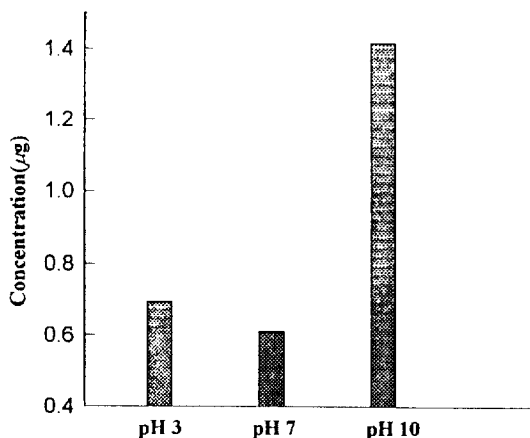


Fig. 5. pH stability of the scavenging material of superoxide anion radical from *Capsella bursa-pastoris*

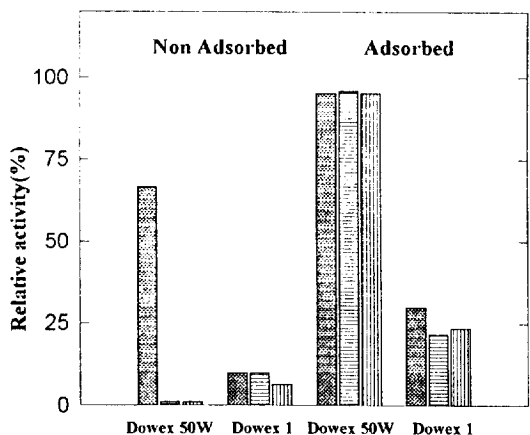


Fig. 6. Electric nature of the scavenging material of superoxide anion radical from *Capsella bursa-pastoris*
 ■: pH 3, ▨: pH 7, ▩: pH 10

ish 및 anthrone 시약에 반응하는⁽²⁴⁾ 것으로 보아 이 물질을 phenolic 배당체로 추정하였다. 일반적으로 phenolic 화합물은 자연계에서 aglycone의 형태보다 안정한 형태인 배당체로 존재하는 경우가 많다고 보고되었다⁽²⁵⁾.

용해도 측정: 일반적으로 phenolic 물질과 그 배당체의 경우 H₂O에는 잘 녹지 않고, 유기용매에 더 잘 녹으나, 이 물질의 경우 Table 2와 같이 H₂O 및 methanol에만 잘 녹는 것으로 관찰되어 이 물질이 극성에 보다 친화력이 있음을 알 수 있다. 따라서 이 물질의 경우 당(sugar)과 같은 극성을 띠는 기능기의 존재로 극성에 친화력이 강한 것으로 사료된다.

자외선 흡수 특성: Fig. 7과 같이 superoxide anion radical 소거물질의 methanol 용액에서의 UV spec-

Table 2. The physicochemical properties of superoxide anion radical scavenger

Appearance	Amorphous greenish yellow	
Nature	Basic	
Melting point	About 350°C	
Color reaction	Positive	Ferric chloride
		NaOH
		Molish
Solubility	Soluble	H ₂ O, MeOH
	Slightly soluble	EtOH
	Insoluble	Acetone, BuOH, EtOAc, CHCl ₃ , Hexane
Rf on TLC ¹⁾	BAW ²⁾	0.476
	15% HOAc	0.652
	H ₂ O	0.278
UV λ _{max}	260 nm, 269 nm, 347 nm	

¹⁾TLC was carried out on cellulose-coated plastic sheets (Merck, 5577)

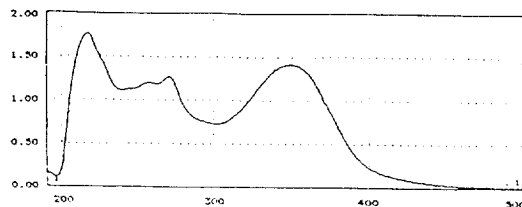


Fig. 7. UV spectrum of the scavenger of superoxide anion radical from *Capsella bursa-pastoris*

trum을 확인한 결과 260, 269 nm의 band II, 347 nm의 band I 및 264 nm의 shoulder가 관찰되었다. 이는 일반적인 phenolic 물질의 흡수 특성을 나타내으며, 가지 광선부위에서 peak가 발견되지 않은 것으로 보아 이 물질이 anthocyanins계 phenol 화합물이 아닌 것으로 추정되었다.

요 약

냉이(*Capsella bursa-pastoris*)로부터 산소독성에 영향을 미치는 superoxide anion radical에 대하여 소거작용을 하는 물질을 분리하고 이 물질의 이화학적 성질을 검토하였다. 냉이를 에탄올로 추출한 후 용매분획과 각종 column chromatographies (Amberlite XAD-2, Sephadex LH-20, Bio gel P-2, ODS)를 통해 정제하였고, 최종적으로 FPLC (Fast protein liquid chromatography)를 사용하여 활성의 단일물질을 얻었다. 냉이 에탄올추출물 100 g으로부터 0.25 g의 정제물질을 얻었으며, superoxide anion radical을 50% 소거하

는 농도(IC₅₀)는 0.58 µg이었다. 이 물질에 대해 각종 이화학적 성질을 검토한 결과 phenolic 화합물의 배당체로 추정하였다.

문헌

1. 최웅, 신동화, 장영상, 신재익 : 식물성 천연 항산화물질의 검색과 그 항산화력 비교. 한국식품과학회지, **24**, 142 (1992)
2. 위재준 : 인삼의 항산화 및 조혈활성 분획성분의 분리 및 동정. 서울대학교 박사 학위논문 (1989)
3. 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순 : 식용 해조류에서 항산화 활성 물질의 분리. 한국식품과학회지, **23**, 256 (1991)
4. 맹영선, 박혜경 : 디덕 에탄올 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지, **23**, 311 (1991)
5. 오만진, 이가순, 손화영, 김성렬 : 칩부리의 항산화 성분. 한국식품과학회지, **22**, 793 (1990)
6. 김정숙, 이기동, 권중호, 윤형식 : 산사 및 가자 에테르 추출물의 항산화 효과. 한국농화학회지, **36**, 203 (1993)
7. 전희정, 이성우 : 마늘 성분의 산화방지 작용에 관한 연구. 대한 가정학회지, **24**, 43 (1986)
8. 장영상, 최웅, 신동화, 신재익 : 항산화 효과가 있는 붉나무 추출물의 몇가지 synergist 첨가 효과. 한국식품과학회지, **24**, 149 (1992)
9. Hudson, B. J. F.: *Food Antioxidants*, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, pp.102-135 (1990)
10. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T.: Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radicals, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2016 (1989)
11. Bros, W. and Saran, M.: Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Rad. Res. Comm.* **2**, 289 (1987)
12. 손종연 : 마이알 반응 생성물의 항산화작용에 미치는 카페인산의 효과. 고려대학교 박사학위논문 (1992)
13. Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: Antioxidant effect of peptide in combination with sugar on autoxidation of edible oils. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 987 (1981)
14. Larson, R. A.: The Antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969 (1988)
15. Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7761 (1989)
16. 大柳 善彦 : SODと活性酸素調節劑. 日本醫學館, 東京, pp.45-70 (1989)
17. 丹羽鞠負, 本山示 : Natural products 含有の anti-oxidant activityとその効果. 製薬工場, **7**, 129 (1987)
18. 홍정일 : 냉이(*Capsella bursa-pastoris*)에탄올 추출물의 유리 라디칼 소거 및 Xanthine oxidase 저해활성. 고려대학교 석사학위논문 (1994)
19. 홍정일, 나경수, 양한철 : 냉이(*Capsella bursa-pastoris*)에탄올 추출물의 유리 라디칼 소거 및 항산화 활성. 한국식품영양학회지, **7**, 169 (1994)
20. Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: New methods of analyzing tannins. *J. Natural Products*, **52**, 1 (1989)
21. Harborne, J. B.: *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic press, London, pp.223-227, (1967)
22. Markham, K. R.: *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic press, London, pp.113-151 (1982)
23. 김동훈 : 식품화학. 탐구당, 서울, pp.66-70 (1988)
24. Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J.: *Bioactive Natural Product*. CRC Press. Boca Raton, p.405 (1993)

(1995년 10월 26일)