

## 쇠뜨기 추출물의 항산화 작용에 관한 연구(I)

양 희 정 · 박 수 남<sup>†</sup>

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2007년 5월 28일 접수, 2007년 6월 3일 채택)

## Evaluation of Antioxidant Potential of Extract/Fractions of *Equisetum arvense* (I)

Hee Jung Yang and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, College of Nature & Life Science, Seoul National University of Technology, 172,  
Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea  
(Received May 28, 2007; Accepted June 3, 2007)

**요약:** 본 연구에서는 쇠뜨기 추출물의 항산화능을 조사하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물(182.04 µg/mL) < ethylacetate 분획(54.50) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(14.13) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 총항산화능은 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(OSC<sub>50</sub>, 3.54 µg/mL) < 50 % 에탄올 추출물(0.80) < ethylacetate 분획(0.006) 순으로 ethylacetate 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 쇠뜨기 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 보호효과를 조사하였다. 50 % 에탄올 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 100 µg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 ethylacetate 분획에서 당을 제거시킨 aglycone 추출물은 10 µg/mL 농도에서 τ<sub>50</sub>이 161.10 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다. 이상의 결과들은 쇠뜨기 추출물이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects of *Equisetum arvense* extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>) of extract/fractions of *Equisetum arvense* was in the order: 50 % ethanol extract (182.04 µg/mL) < ethylacetate fraction (54.50 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (14.13 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of some *Equisetum arvense* extracts on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system were investigated using the luminol- dependent chemiluminescence assay. The order of ROS scavenging activity was deglycosylated flavonoid aglycone fraction (OSC<sub>50</sub>, 3.54 µg/mL) < 50 % ethanol extract (0.80 µg/mL) < ethylacetate fraction (0.006 µg/mL). Ethylacetate fraction showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Equisetum arvense* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The ethanol extract (50 %) suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner, particularly deglycosylated aglycone extract exhibited the most prominent cellular protective effect (τ<sub>50</sub>, 161.10 min at 10 µg/mL). These results indicate that extract/fractions of *Equisetum arvense* can function as antioxidants 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.

**Keywords:** *Equisetum arvense*, free radical, reactive oxygen species, antioxidative activity, photohemolysis

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

## 1. 서 론

피부는 항시 산소와 접촉하고 있고 또한 태양 자외선에 계속 노출되어 있다. 따라서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상 위험은 실질적으로 높은 상태이다. 활성산소종이란 반응성이 매우 큰  $^1\text{O}_2$  및  $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROOH}$  및  $\text{HOCl}$  등을 포함한다. 생체내에서 생성된  $\text{O}_2^-$ 는 생체내 효소인 superoxide dismutase (SOD)에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 전환된다. 이  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 비교적 수명이 길고 세포막들을 쉽게 통과하여 이동할 수 있다.  $\text{O}_2^-$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 반응성이 약하여 직접적으로 조직손상에 참여하는 경우는 드물지만  $\cdot\text{OH}$ 과 같은 반응성이 매우 큰 라디칼종의 생성에 참여한다. 즉,  $\text{O}_2^-$ 은  $\text{Fe(III)}$ 와 같은 전이금속을 환원시킬 수 있고, 환원된  $\text{Fe(II)}$ 은 과산화수소와 반응하여  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시킨다(Fenton 반응)[1]. 태양 자외선에 피부가 노출되면 노출부위에 철 수준이 증가하고[2,3], 땀에도 라디칼 반응을 촉매할 수 있는 양의 철 및 구리와 같은 전이금속이 존재하는 것으로 알려져 있다[4]. 따라서 Fenton 반응에 의해 생성된  $\cdot\text{OH}$ 은 피부 손상 및 노화에 관여할 수 있다.  $\cdot\text{OH}$ 과 함께  $^1\text{O}_2$ 도 피부 광노상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속화시킨다[5].

$^1\text{O}_2$ 은 수명이 짧은 특히 해로운 분자이며, 주로 광증감 반응으로 피부에서 생성되고, 광노화에 있어서 핵심적 역할을 한다. 특히  $^1\text{O}_2$ 은  $\cdot\text{OH}$ 과 함께 ROS 중에서 반응성이 가장 큰 활성종으로 생체 내에는 이들 활성산소를 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않으며 특히 피부노화를 주도하는 것으로 보고되고 있다. 사람 피부 세포에 있어서 지질과산화물의 생성, 단백질 및 DNA 산화 손상뿐만 아니라 UV-A (320 ~ 380 nm) 의존성 세포 사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 기여하는 것으로 기술되고 있다[6,7]. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이[1,8,9]. 사람 피부 섬유아세포에서  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 MMPs (matrix metalloproteinases)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다. ROS가 광노화에 포함되기 때문에[10-12], 항산화제에 의한 자외선 노출 후

ROS의 감소는 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 효과적인 전략임은 분명하다.

쇠뜨기(*Equisetum arvense*)는 양치식물, 속새과(Equisetaceae)에 속하는 다년생 초본 식물로서 북반구의 온대지방을 중심으로 널리 분포하고 있으며[13], 우리나라에 자생하는 쇠뜨기는 7종이 알려져 있다[14]. 가을에 캐서 그늘에 말린 것을 한방에서는 문형이라 하며, 이뇨제나 지혈제로 사용되어 왔다. 쇠뜨기는 유럽, 아시아, 아메리카에서는 피부 항염제로, 터키나 미국에서는 항균제로 이용되었다는 보고가 있다[15-17].

쇠뜨기에 함유된 성분에는, onitin, onitin-3-O-glucoside, apigenin, luteolin, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-7-O-diglucoside, apigenin-5-O-glucoside, luteolin-5-O-glucoside가 알려져 있고, onitin 및 luteolin은 인체 간 유래의 Hep G2 세포 모델 실험에서 간기능 보호효과가 있는 것으로 보고되었다[18,19]. Gua 등은 용매별 쇠뜨기 추출물의 항산화 활성과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 조사하였고 그중에서 70% 에탄올 추출물에서 free radical (DPPH) 소거활성( $\text{FSC}_{50}$ , 182.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성(1 mg/mL에서 82% 저해)이 비교적 크다고 보고하고 있다[20].

따라서 본 연구에서는 쇠뜨기 추출물로부터 항산화 활성이 큰 분획을 얻고 이들에 대한 free radical 소거활성,  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, 그리고  $^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포손상(광용혈 실험)에 대한 보호활성에 대하여 알아보았다. 또한 몇 가지 다른 항산화제들을 대조군으로 하여 쇠뜨기의 항산화능을 비교 평가하였다.

## 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 meter는 Istek (Korea)사의 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 광증감제로 사용된 rosebengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)  $\text{H}_2\text{O}_2$ 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, 그리고

ethanol (EtOH), methanol, ethylacetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

실험 재료인 쇠뜨기는 2006년 6월경 청계산에서 채취, 건조시킨 후 사용하였다.

## 2.2. 쇠뜨기의 플라보노이드 분획 추출

건조된 쇠뜨기 200 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 4 L에 일주일간 침적시킨 후 여과하고, 이 여액을 감압 농축한 후, 그 일부는 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이어 ethylacetate로 추출하여 플라보노이드 분획 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

Ethylacetate 분획 추출물에서 당이 제거된 aglycone 제조 : Ethylacetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 플라보노이드 aglycone 분말을 만들고 이를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethylacetate 가용분 일정량에 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 아세트산용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류냉각 시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethylacetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 당이 제거된 aglycone 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

## 2.3. 쇠뜨기 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

쇠뜨기 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 유기 자유라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하였다. 실험방법은 0.2 mM DPPH 메탄올 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 간 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 활성 저해율을 나타내었다. 소거활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Experiment} - \text{Blank})}{\text{Control}} \times 100$$

### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40

µL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min간 항온 시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 간 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 과산화수소와 철 이온이 들어있지 않은 것으로 하였다. 반응용액 중의 각 시약의 농도는 다음과 같다. [FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O] = 25 µM, [EDTA] = 50 µM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 3 mM, [luminol] = 1.4 mM 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광 측정 저해율(inhibition)은 다음식을 이용하여 계산하였고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, µg/mL)로 표기하였다.

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

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포막 보호효과 측정

활성산소에 의한 세포막 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 의한 세포손상(파괴)에 대한 보호효과를 측정할 수 있다.

### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm에서 5 min간 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 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.

### 2.4.2. 쇠뜨기 추출물의 광용혈 억제효과

1.5 × 10<sup>7</sup> cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min간 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory

sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min간 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min간 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 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. 쇠뜨기 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 postincubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 32 min으로 오차범위  $\pm 1$  min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

## 2.5. 통계처리

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

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 쇠뜨기 추출물의 수득율

#### 3.1.1. 쇠뜨기 추출물

건조한 쇠뜨기를 50 % 에탄올에 침적시킨 후 여과·압하여 파우더를 수득율 16.2 %로 얻었다. 또 50 % 에탄올로 추출한 건고물로부터 hexane 처리 후 플라보노이드가 주성분인 ethylacetate 층 분획은 수득율이 1.7 % 이었다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, ethylacetate 분획 및 ethylacetate 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 플라보노이드 아글리콘 분획을 실험에 사용하였다.

### 3.2. 쇠뜨기 추출물의 항산화 활성

#### 3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)- $\alpha$ -Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응

**Table 1.** Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Equisetum arvense* and References

Compounds	Scavenging activity (FSC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> , $\mu\text{g/mL}$
<i>Equisetum arvense</i> extract (50 % EtOH)	182.04 ( $\pm$ 8.04)
<i>Equisetum arvense</i> extract (EtOAc fraction)	54.50 ( $\pm$ 2.68)
Deglycosylated extract from <i>Equisetum arvense</i> (EtOAc fraction)	14.13 ( $\pm$ 0.09)
L-Ascorbic acid (with 50 % EtOH solution)	3.79 ( $\pm$ 0.83)
(+)- $\alpha$ -Tocopherol (with 100 % EtOH)	8.98 ( $\pm$ 2.93)
Quercetin (with 100 % EtOH solution)	3.43 ( $\pm$ 0.15)
Rutin (with 50 % EtOH solution)	5.03 ( $\pm$ 0.23)

<sup>1)</sup> FSC<sub>50</sub> : 50 % of free radical scavenging activity

을 종결시킨다. 이때 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 자유 라디칼인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

쇠뜨기추출물과 비교물질인 L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol, quercetin 및 rutin의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)을 측정된 결과는 Table 1 및 Figure 1과 같다. 쇠뜨기 50 % 에탄올 추출물은 182.04  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획은 54.50  $\mu\text{g/mL}$ 이고 ethylacetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone은 14.13  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 50 % 에탄올 추출물보다도 ethylacetate 분획에서 그리고 플라보노이드 aglycone 분획에서 라디칼 소거활성이 큼을 알 수 있다. Gua 등이 보고한 쇠뜨기 추출물의 free radical 소거활성은 70 % 에탄올 추출물에서 168.1  $\mu\text{g/mL}$ , 70 % 메탄올에서 187.8  $\mu\text{g/mL}$ 이었다고 보고하였으나[19], ethylacetate 분획이나 당을 제거시킨 aglycone 분획에 대한 항산화능에 대한 보고는 없다. 따라서 본 실험에서 확인된 플라보노이드 aglycone 분획의 우수한 free radical 소거활성은 추출물에 대한 간단한 당 제거 과정만을 통해서도 활성이 큰 기능성 소재를 발굴할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

이 외에 비교 물질로 사용한 수용성의 L-ascorbic acid는 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>)이 3.79  $\mu\text{g/mL}$ , 플라보노이드 비교물질로 사용되는 quercetin은 3.43  $\mu\text{g/mL}$ , 그의 배당체인 rutin은 5.03  $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

#### 3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성 측정

Luminol 발광법을 이용해 쇠뜨기 추출물의 농도에 따

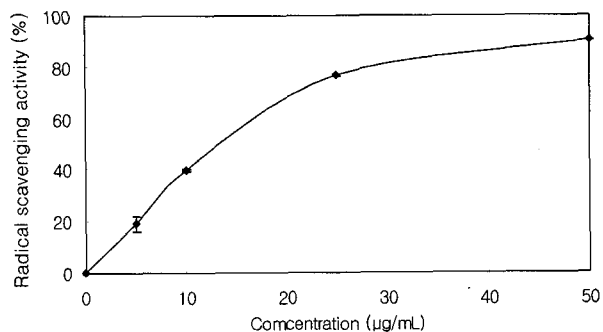


Figure 1. Free radical scavenging activity of deglycosylated extract from *Equisetum arvense* (EtOAc fraction).

Table 2. Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Equisetum arvense* and References.

Compounds	Scavenging activity
	(OSC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> , µg/mL
<i>Equisetum arvense</i> extract (50 % EtOH)	0.82 (± 0.31)
<i>Equisetum arvense</i> extract (EtOAc fraction)	0.0062 (± 0.0003)
Deglycosylated extract from <i>Equisetum arvense</i> (EtOAc fraction)	3.54 (± 0.12)
L-Ascorbic acid (with 50 % EtOH solution)	1.50 (± 0.85)
Quercetin (with 100 % EtOH solution)	0.05 (± 0.02)
Rutin (with 50 % EtOH solution)	0.13 (± 0.12)

<sup>1)</sup> OSC<sub>50</sub>: 50 % of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, •OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) scavenging activity.

른 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 Table 2 및 Figure 2에서 알 수 있다.

활성산소(ROS) 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 쇠뜨기 50 % 에탄올 추출물, 0.82 µg/mL, ethylacetate 분획, 0.0062 µg/mL, ethylacetate 분획의 당 제거한 aglycone 추출물은 3.54 µg/mL로 나타났다. 이 결과는 ethylacetate 분획의 추출물의 활성산소 소거활성이 매우 큼을 알 수 있다. Ethylacetate 분획 추출물의 활성산소 소거활성은 비교물질로 사용한 quercetin (0.05 µg/mL)보다 더 큰 활성을 나타내고 있으며, 비교물질로 사용한 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다 더 큰 활성을 나타내고 있다. 이는 ethylacetate 분획에 있는 플라보노이드의 페놀성 부분과 당 부분이 철에 대한 킬레이트 작용에 의해 활성산소의 생성에 대한 억제작용과 소거작용이 함께 한 결과라고 사료된다[21,22]. Ethylacetate 분획에서 당이 제거된 aglycone 분획은 ethylacetate 분획보다도 ROS 소거능이 작음을 보여주고 있다. 이는 아마도 본 실험 조건

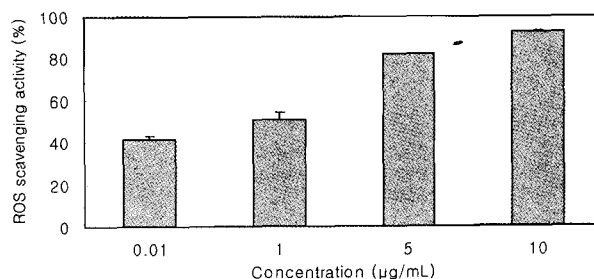


Figure 2. Oxygen radical scavenging activity of extract from *Equisetum arvense* (50 % EtOH).

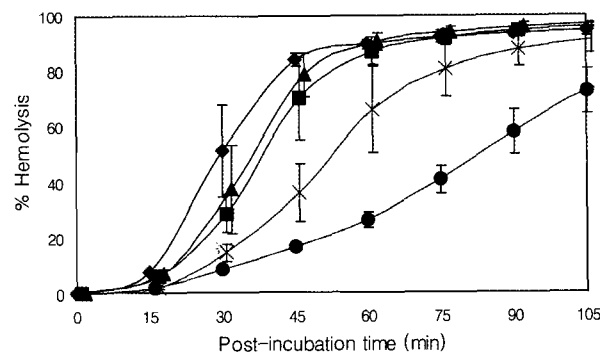


Figure 3. Effects of extracts of *Equisetum arvense* (50 % EtOH) on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Irradiation time; 15 min, pre-incubation time; 30 min, [rose-bengal] = 1.5 µM, concentrations of extract of *Equisetum arvense* (50 % EtOH); ◆-◆: control, ▲-▲: 1 µg/mL, ■-■: 10 µg/mL, \*-\*: 50 µg/mL, ●-●: 100 µg/mL.

에서 aglycone 분획의 물에 대한 낮은 용해도에 기인되거나 또는 플라보노이드 배당체가 주성분인 ethylacetate 분획에 비해 철에 대한 킬레이트 작용이 약함에 기인되어 ROS 소거능이 작게 나온 것으로 추정된다.

### 3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 활성

활성 산소로부터 적혈구 세포막을 보호하는 쇠뜨기 추출물의 효과를 Table 3 및 Figure 3에 제시하였다.

50 %의 적혈구 세포가 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 쇠뜨기 추출물(50 % 에탄올 추출물)의 세포보호 효과는 1 ~ 100 µg/mL의 농도범위에서 농도 의존적인 경향을 보여, 1, 10, 50, 100 µg/mL에서의 τ<sub>50</sub> 이 각각 36.17, 41.67, 55.83, 75.84 min인 것으로 확인되었다. 한편 ethylacetate 분획의 경우는 오히려 세포보호 활성이 미약한 것으로 나타났다. 10 µg/

**Table 3.** Effects of Extract from *Equisetum arvense* and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis <sup>1)</sup> )			
	1	10	50	100
<i>Equisetum arvense</i> extract (50 % EtOH)	36.17 ( $\pm$ 4.87)	41.67 ( $\pm$ 7.58)	55.83 ( $\pm$ 8.45)	75.84 ( $\pm$ 4.87)
<i>Equisetum arvense</i> extract (EtOAc fraction)	34.33 ( $\pm$ 4.01)	45.53 ( $\pm$ 1.91)	19.90 ( $\pm$ 1.07)	9.87 ( $\pm$ 0.19)
Deglycosylated extract from <i>Equisetum arvense</i> (EtOAc fraction)	42.93 ( $\pm$ 3.09)	161.1 ( $\pm$ 10.12)	32.33 ( $\pm$ 1.25)	23.20 ( $\pm$ 2.43)
Rutin (with 50 % EtOH solution)	35.20 ( $\pm$ 1.40)	40.50 ( $\pm$ 10.44)	-	-
Quercetin (with 100 % EtOH)	51 ( $\pm$ 3.03)	147 ( $\pm$ 15.01)	-	-
(+)- $\alpha$ -Tocopherol (with 100 % EtOH)	-	38.00 ( $\pm$ 1.80)	74.33 ( $\pm$ 6.35)	-

<sup>1)</sup> Control,  $\tau_{50}$  = 32.02  $\pm$  0.60 min

mL의 농도에서는 비교적 큰 세포보호 활성(45.53 min)을 보여주다가 농도가 증가함에 따라 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 19.90, 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 9.87 min으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출용매에 따른 추출물의 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용 등)에 기인된 영향으로 생각된다. 이러한 특성은 ethylacetate 분획물에서 당을 제거시킨 aglycone 추출물에서도 일부 나타났다. 당이 제거된 aglycone 추출물은 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는  $\tau_{50}$ 이 161.10 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 32.33, 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 23.20 min으로 농도가 증가할수록 용혈을 촉진하는 것으로 나타났다. 이 역시 ethylacetate 분획에서와 같은 경향을 보여주었다. 자세한 메카니즘은 더 연구해 볼 필요가 있다고 사료된다.

비교물질로 사용한 플라보노이드 배당체인 rutin은 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 40.50 min, quercetin은 동일농도에서 147 min, (+)- $\alpha$ -tocopherol은 38 min을 나타내었다. Quercetin은 quercetin 배당체체인 rutin 보다도 세포보호 활성이 훨씬 큼을 보여주고 있다. 이는 rutin 보다도 quercetin이 세포막의 접근과 세포막 내로의 침투가 더 용이함을 나타내며 이는 세포막에서 일어나는 활성산소에 의한 인지질의 산화와 세포막 파괴를 플라보노이드 aglycone인 quercetin이 보다 더 효율적으로 억제함을 보여주고 있다. Rutin은 2개의 당(rutinoses)이 결합한 형태로 rutin 분자 주위에서 큰 물결집이 형성되어 세포막 내로의 접근에 상당한 어려움이 있어 세포보호 활성도 낮게 나타난 것으로 판단되어진다.

#### 4. 결 론

1) 쇠뜨기 추출물의 수득율의 경우 50 % 에탄올 추출물은 16.2 %, ethylacetate 분획의 경우 1.7 %이었다.

2) 쇠뜨기 추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 쇠뜨기 50 % 에탄올 추출물 182.04  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획 54.50  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획에서 당 제거시킨 아글리콘은 14.13  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

3) 쇠뜨기 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 쇠뜨기 50 % 에탄올 추출물, 0.80  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획, 0.006  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획의 당 제거한 아글리콘 추출물은 3.54  $\mu\text{g/mL}$ 로 ethylacetate 분획에서 매우 큰 활성을 나타냈다.

4) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 쇠뜨기 추출물은  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위(1 ~ 100  $\mu\text{g/mL}$ )에서 농도- 의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 억제하였다. 특히 ethylacetate 분획물에서 당을 제거시킨 아글리콘 추출물은 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 161.10 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

이상의 결과들은 쇠뜨기 추출물이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다.

#### 참 고 문 헌

1. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy,

- antioxidants in disease mechanism and therapy, *Advances in Pharmacology*, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
2. D. L. Bissett, R. Chatterjee, and D. P. Hannon, Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators, *Photochem. Photobiol.*, **54**, 215 (1991).
  3. D. L. Bissett and J. F. McBride, Iron content of human epidermis from sun-exposed and non-exposed body sites, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **43**, 215 (1992).
  4. J. M. C. Gutteridge, D. A. Rowley, B. Halliwell, D. F. Cooper, and D. M. Heeley, Copper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes, *Clinica Chimica Acta*, **145**, 267 (1985).
  5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**(1), 75 (1997).
  6. R. M., Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**(4), 407 (1989).
  7. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, 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 Biology & Medicine*, **18**(4), 721 (1995).
  8. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.* **331**, 304 (1993).
  9. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
  10. A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
  11. A. Oikarinen and M. Kallioinen, A Biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
  12. L. H. Kligman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: A contrast to UVB effects. In "Biological Responses to Ultraviolet A radiation", ed. F. Urbach, 209 Valdemar, Overland Park (1992).
  13. D. J. Mabberly, A portable dictionary of the higher plants, Cambridge Univ., Cambridge, England (1990).
  14. H. K. Park, Y. S. Lim, H. O. Jin, and H. C. Shin, Taxonomy of genus *Equisetum* L. (equisetaceae) in Korea, *Kor. J. Plant Tax.*, **33**, 17 (2003).
  15. P. Ody and D. Kindersley, In the complete medicinal herbal. *DK Publishing*, New York (1993).
  16. D. Hoffman, In the new holistic herbal. Element, Shaftesbury (1990).
  17. S. Mineo, M. Takayasu, H. Kaori, T. Yoshiro, S. Taisuke, and M. Masaaki, Studies on bathing agent: antiinflammatory effect of bathing agent which used for skin disease, *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 1 (1993).
  18. H. C. Oh, D. H. Kim, J. H. Cho, and Y. C. Kim, Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolics petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*, *J. Ethnopharmacology*, **95**, 421, (2004).
  19. E. U. Graete and M. veit, Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*, *Phytomedicine*, **6**(4), 239 (1999).
  20. J. Gua, Y. S. Jin, W. Han, T. H. Shim, J. H. Sa, and M. H. Wang, Studies from component analysis, antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from *Equisetum arvense*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **49**(1), 77 (2006).
  21. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food, Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
  22. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).