

수영 전초 추출물의 항산화 활성 평가 및 성분 분석

정유민·김호재*·이수현*·장도윤*·최예찬*·민나영*·공봉주·박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, *한성과학고등학교
(2014년 11월 5일 접수, 2014년 11월 10일 수정, 2014년 12월 22일 채택)

Antioxidative Effects and Component Analysis of Extracts of the *Rumex acetosa* L.

Yoo Min Jeong, Ho Jae Kim*, Su Hyun Lee*, Do Yun Jang*, Yae Chan Choi*, Na Young Min*,
Bong Ju Gong, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology,
232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

*Hansung Science High School, 279-79 Tongil-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-080, Korea

(Received November 5, 2014; Revised November 10, 2014; Accepted December 22, 2014)

요약: 본 연구에서는 수영 전초 추출물에 대하여 항산화 활성 평가와 성분 분석을 실시하였다. 실험에는 수영 전초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘(aglycone) 분획을 사용하였다. 자유라디칼 소거활성(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, FSC₅₀)의 크기는 아글리콘 분획 > 에틸아세테이트 분획 > 50% 에탄올 추출물 순으로, 아글리콘 분획(45.10 µg/mL)이 가장 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계를 이용한 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)도 에틸아세테이트 분획 > 아글리콘 분획 > 50% 에탄올 추출물 순으로 에틸아세테이트 분획(2.68 µg/mL)에서 가장 큰 항산화능을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획의 총항산화능은 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid (6.88 µg/mL)보다 큰 것으로 나타났다. 활성산소인 ¹O₂으로 유도된 사람 세포 손상에 있어서, 수영 전초 추출물은 모두 농도 의존적(1 ~ 25 µg/mL)으로 세포보호 활성을 나타내었다. 특히 아글리콘 분획(τ₅₀, 104.80 min)은 가장 큰 세포 보호 활성을 나타내었다. TLC, HPLC, LC/ESI-MS/MS를 이용하여 수영 전초 추출물 중 에틸아세테이트 분획에 대하여 성분 분석을 실시하였다. 그 결과, 에틸아세테이트 분획은 orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin 등의 플라보노이드가 함유되어 있음을 확인하였다. 이상의 결과들은 수영의 전초 추출물이 ¹O₂을 비롯한 활성산소종을 소광 또는 소거함으로써 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며 항노화 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects and component analysis for the extracts of *Rumex acetosa* L. were investigated. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from dried *R. acetosa* L.. Free radical scavenging activities (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) size of, in the order of aglycone fraction > ethyl acetate fraction > 50% ethanol extract, aglycone fraction (45.10 µg/mL) showed the highest radical scavenging activity. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (total antioxidant capacity, OSC₅₀) on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system was also, in the order of ethyl acetate fraction > aglycone fraction > 50% ethyl acetate fraction, ethyl acetate fraction (2.68 µg/mL) was shown a great antioxidant capacity. The total antioxidant capacity of the ethyl acetate fraction was found to be greater than L-ascorbic acid, known as a typical hydrophilic antioxidant (6.88 µg/mL). The cellular protective effects of *R. acetosa* L. extracts on the ¹O₂-induced cellular damage of

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

human erythrocytes were exhibited at all concentration-dependent (1 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$). Especially, aglycone fraction (τ_{50} , 104.80 min) in 25 $\mu\text{g/mL}$ showed the most protective effect among extracts. Components of the ethyl acetate fraction obtained from *R. acetosa* L. extracts were analyzed by TLC, HPLC chromatogram, LC/ESI-MS/MS. As a result, the ethyl acetate fraction contained several flavonoids, such as orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin. These results indicate that the *R. acetosa* L. extracts can be used as antioxidants in biological systems, particularly skins exposed to UV radiation by quenching and/or scavenging $^1\text{O}_2$ and other ROS. Thus, the extracts of *R. acetosa* L. could be applicable to new anti-aging cosmeceutical ingredients.

Keywords: *R. acetosa* L., antioxidative activity, photoaging, component analysis, cosmeceutical

1. 서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부 및 세포에 광산화적 손상을 일으키는 강한 산화력을 갖는 산소종으로서, superoxide anion radical ($\text{O}_2 \cdot^-$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)과 같은 비라디칼종 그리고 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxy radical ($\text{ROO} \cdot$), alkoxy radical ($\text{RO} \cdot$) 등이 ROS에 포함된다[1-4]. ROS는 산소의 대사과정에서도 생성되며, 자외선 및 스트레스와 같은 외부 환경적 요인에 지속적으로 노출될 때는 과잉의 활성산소가 생체 내에 생성된다[5-7]. 이러한 과잉의 활성산소종은 피부 항산화제를 파괴함으로써 항산화 방어망을 붕괴시키고 이어서, 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 물질들에 대한 산화와 변질을 초래한다. 뿐만 아니라 진피 결합 조직 단백질 성분인 콜라겐 등을 분해시키는 matrix metallo proteinase-1 (MMP-1) 등의 발현을 증가시켜 콜라겐과 같은 결합조직 성분의 사슬절단 및 비정상적인 교차 결합을 야기시켜 주름 생성을 수반한 피부 노화를 가속화시킨다[8]. 태양 자외선에 노출된 피부에서의 활성산소 생성과 이들 활성산소에 의한 세포막에서의 자동산화반응에 의한 과산화지질 생성과 세포막 파괴, 피부의 콜라겐, 히아루론산 등의 결합조직의 손상 및 절단, 8-하이드록시 구아노신(8-hydroxy guanosine) 생성을 수반하는 DNA 손상은 피부 광노화에 있어서 중요한 단계이다[9-16]. 이러한 활성산소에 대항하여 피부에는 활성산소를 제거하는 항산화 방어 시스템이 존재한다. 그러나 이들 방어 시스템은 자외선 등으로 유도된 활성산소량이 많으면 쉽게 파괴될 수 있다. 활성산소 중에서도 피부세포 및 조직 손상을 주도하는 가장 반응성이 큰 활성산

소는 $^1\text{O}_2$ 과 $\cdot\text{OH}$ 등으로 알려져 있다. 이들은 생체 내 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어 시스템을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 하고 결국에는 탄력감소, 주름 및 기미·주근깨 등의 피부노화를 가속화시킨다. 피부노화를 지연시키고 억제시키기 위해서는 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하고 활성산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화 방어 시스템 구축에 필요한 적절한 새로운 항산화제 개발에 대한 요구가 증대되고 있다[1-2,17].

수영(*Rumax acetosa* L., Sorrel)은 마디풀과의 다년생 초본식물로, 온대지방 각지에 걸쳐 서식하고 있으며 동아시아 지역에 널리 분포하고 있는 식물이다[18-19]. 수영의 잎은 유럽이나 미국에 존재하는 강한 신맛이 나는 시금치와 비슷하게 생겼으며, sorrel이라는 이름으로도 알려져 있는 식물이다[18]. 수영(*R. acetosa*)의 추출물은 해열, 이뇨, 살충, 항균, 항암활성 등에 효능이 있다고 알려져 있다[20-22]. 또한, 수영을 달인 물은 관절염, 위염, 위궤양 등의 치료에 민간요법으로 쓰이는 것으로 보고되고 있다. 수영의 성분으로는 잎에서 vitexin과 quercitrin[23], 뿌리에서 chrysophanol을 비롯한 anthraquinone 및 그 배당체[24], 지상부에서 orientin을 비롯한 플라보노이드류 및 그 배당체[25]가 보고되어 있다[25-27].

따라서 본 연구에서는 수영의 전초를 이용하여 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 제조하였으며, 이들 분획의 항산화 활성 및 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 작용에 대해 평가하고, 그 활성에 영향을 주는 활성물질에 대한 성분 분석을 실시하였다. 이와 같은 수영 전초 추출물의 분획별 비교 연구를 통해 수영 전초 추출물의 항산화 및 항노화 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 검토

하였다.

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)사 제품을 사용하였다. EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose bengal, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 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. 완충용액 제조에 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, trizma base, HCl 그리고 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. HPLC 용매 제조에 사용된 acetonitrile은 J. T. Baker사와 B&J사의 HPLC grade 제품을 사용하였다. 비교 물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, 알부틴은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 본 실험에 사용한 수영은 2014년 7월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 수영의 분획 및 추출

건조된 수영의 전초(뿌리 제외) 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 50% 에탄올 파우더를 얻었다. 또한 에틸아세테이트 분획을 얻기 위해, 50% 에탄올 추출물을 감압 농축한 후 물과 n-헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이어서 얻어진 물층과 에틸아세테이트를 이용하여 분획한 뒤 이를 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 또한 에틸아세테이트 분획 파우더 일부를 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시켜 아글리콘 분획을 제조하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 아세트산 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트를 이용해 추출하고 이를 감압·농축하여 실험에

사용하였다.

2.3. 수영 전초 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자공여능을 통하여 시료의 환원력을 측정하는 실험법이다. 실험은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 *R. acetosa* L. 전초 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 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 비교하였다. 공시험(blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료의 영향을 보정하였다. 자유라디칼 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로서 표기하였으며, 자유라디칼(DPPH) 소거활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

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

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 다양한 ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있으며, 이 총항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 *R. acetosa* L. 전초 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL 를 가한 후 35 mM luminol 80 μL 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 항온 시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μL 를 넣고 루미놀과 ROS와의 반응에 의한 화학발광

Table 1. TLC Mobile Phase for Separation of Ethyl Acetate Fraction from *R. acetosa* L

Eluent system	
EtOAc fraction	ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v).

을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O 대신 증류수를 첨가한 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

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

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였으며, 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 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 수영 전초 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시켜주었다. Incubation 후에 광증감제 rose-bengal (12 µM) 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 × 20 cm × 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) h에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온에서 수행하였다. 수영 전초 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation h와 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 h 인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

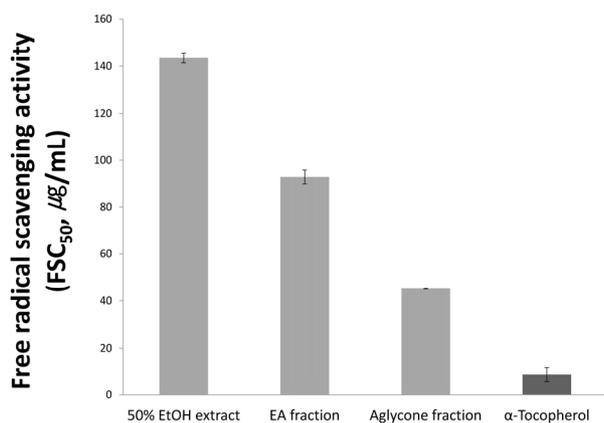
2.5. TLC 및 HPLC를 이용한 수영 전초 추출물의 플라보노이드 분석

수영 전초 추출물 중 에틸아세테이트 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 µm)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC 및 비극성 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료와 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 발색법을 이용한 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 수용액과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고 HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다. 또한, 수영 전초 추출물의 성분 분석을 위해 TLC로 분리된 각각의 띠들을 끊은 후 75% 에탄올에 추출, 여과한 뒤

Table 2. HPLC Condition for Separation of Ethyl Acetate Fraction from *R. acetosa* L

Condition of HPLC analysis	
Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 nm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Detection wavelength	370 nm
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 μ L
Mobile phase	2% AA ^{a)} in water : 0.5% AA ^{a)} in 50% ACN ^{b)} = 70 : 30 ~ 10 : 90 (gradient)

^{a)}AA : acetic acid, ^{b)}ACN : acetonitrile

**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extract and fractions of *R. acetosa* L. extract and reference.

감압 농축하였다. 이때 얻어진 시료는 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45 μ m)를 이용하여 여과하고 그 여액을 HPLC, LC/ESI-MS/MS 분석에 이용하였다.

2.6. LC/ESI-MS/MS를 이용한 수영 전초 추출물의 플라보노이드 분석

LC 분석은 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo scientific, USA)를 사용하였다. 컬럼은 Phenomenex P/No. 00D-4424-Y0, Desc. Synergi 4u Fusion-RP 80A, size 100 x 3,00 mm 4 micron, S/No. 460415-1을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid (in water) (solution A) : acetonitrile (solvent B)으로 하였으며, injection volume은 5 μ L, 유속은 200 μ L/min으로 하였다. MS/MS 분석은 LCQ Deca XP plus (Thermo

Scientific, USA)을 사용하였고, negative mode로 capillary voltage는 - 15 V, spray voltage는 5 kV, 그리고 capillary temperature는 275 $^{\circ}$ C에서 행하였다.

2.7. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 수영 전초 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

작을 이루지 않은 홀전자를 가지고 있는 자유 라디칼은 에너지가 높고 다른 물질과의 반응성이 크다. 세포막에서 생성된 라디칼은 지질 과산화라디칼로 이어지는 연쇄반응을 개시하여 세포막 손상과 파괴를 야기시킨다. 이러한 라디칼 연쇄반응에서 전자를 제공할 수 있는 항산화제가 존재하면 라디칼 연쇄반응은 종결되고 세포는 라디칼 또는 활성산소의 공격으로부터 보호를 받게 된다. 이와 같이 항산화제가 어느 정도 라디칼을 소거하는 능력(환원력)이 있는지를 측정함으로써 항산화능을 평가할 수 있다. 라디칼 소거활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력을 측정해서 알 수 있다. 수영 전초 추출물의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 결과를 Figure 1에 나타내었다. 수영 전초의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 FSC₅₀은 각각 143.37 μ g/mL, 92.96 μ g/mL 및 45.10 μ g/mL로

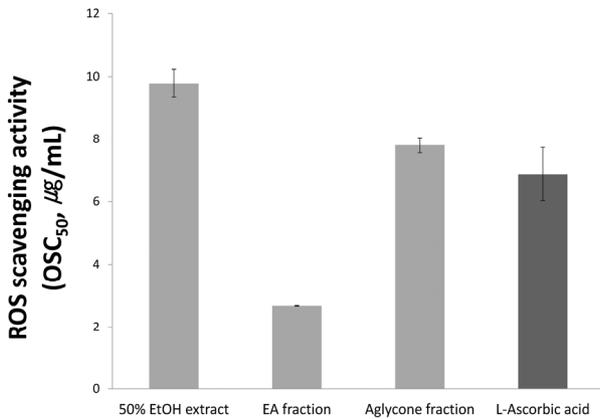


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *R. acetosa* L., fractions and reference in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

나타났다. 50% 에탄올 추출물에 비해 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획에서 더 큰 라디칼 소거활성을 보여주고 있다. 이들 분획은 항산화작용을 나타내는 플라보노이드 등의 페놀성 화합물이 많이 함유된 결과로 보인다. 이들 분획의 라디칼 소거활성은 Park 등 (2003)이 이전에 발표했던 대두 플라보노이드인 제니스틴 및 그 아글리콘인 제니스테인(각각 >7000 및 >6500 µg/mL) 보다도 훨씬 큰 소거활성을 나타냄을 알 수 있다[28]. 대두 플라보노이드는 화장품의 원료로서 이미 널리 사용되고 있다. 따라서 수영 전초 추출물 및 분획도 라디칼 소거작용을 나타내는 항산화제로 화장품에 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

3.1.2. Luminol 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는 Fe과 H_2O_2 에 의해 Fenton 반응이 일어난다. 이러한 계에서는 Fenton 반응으로 $^1\text{O}_2$ 을 제외한 대부분의 활성산소종($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2)이 생성되고 존재한다. 이 계에서 철과 같은 전이금속은 반응성이 매우 큰 $\cdot\text{OH}$ 를 생성시키는데 중요한 역할을 한다.

본 실험에서는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 루미놀 발광법을 이용하여 여러 가지 종류의 활성산소에 대한 활성산소 소거활성(총항산화능)을 측정하였다. 루미놀은 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소와 반응하여 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고, 이어 아미노프탈산이 다시 바닥상태로 떨어지면서 화학발광(420 ~

450 nm)을 한다. 이 계에 항산화제가 존재하면 활성산소와 반응하기 때문에 상대적으로 루미놀의 발광이 감소하게 된다. 이로부터 활성산소의 소거능을 구할 수 있다.

수영 전초 추출물의 총항산화능(OSC₅₀) 실험 결과를 Figure 2에 나타내었다. 수영 전초의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 OSC₅₀은 각각 9.78, 2.68 및 7.80 µg/mL로 나타났다. 대조군인 강력한 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid의 OSC₅₀은 6.88 µg/mL이었다. 수영 전초 추출물의 에틸아세테이트 분획은 L-ascorbic acid보다 약 2.56배 더 우수한 항산화능을 나타내었다. 아글리콘 분획도 L-ascorbic acid와 거의 유사한 항산화능을 보여주고 있다.

3.2. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

피부 내에서는 포르피린과 같은 광증감제가 존재한다. 포르피린은 자외선에 노출되면 광증감 반응을 통하여 $^1\text{O}_2$ 과 같은 활성산소를 생성시킨다. $^1\text{O}_2$ 은 반응성이 매우 큰 활성산소로 세포막 구성 성분인 인지질과 반응하여 과산화지질 라디칼을 생성시키는 라디칼 연쇄반응을 개시시킨다. 하지만 세포나 조직에는 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 을(또는 $\cdot\text{OH}$) 없앨 수 있는 항산화 효소가 존재하지 않는다. 생체 내에서는 광증감반응에 의해 생성된 $^1\text{O}_2$ 과 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 다양한 활성산소종이 생성되어 세포 구성 성분들인 지질 및 단백질의 산화와 파괴를 통해서 세포 용해를 야기시킬 수 있다. 이 실험 계에 항산화제를 첨가하면 항산화제의 구조적 물리화학적 특성에 따라 세포막 침투 정도가 결정되고 세포막에 들어간 항산화제는 라디칼 연쇄반응을 차단하여 세포가 용혈 분해되는 것을 억제할 수 있다. 항산화제가 세포의 용혈을 억제시키는 정도는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 h (τ_{50})으로 표시하였다. 이 값은 시료의 세포 보호 활성이 클수록 높게 나타난다.

대조군으로 시료를 넣어주지 않고 혈구만 존재할 때의 τ_{50} 을 확인하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50} 이 31.10 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. 수영 전초 50% 에탄올 추출물의 경우 τ_{50} 이 5, 10, 25 µg/mL의 농도에서 각

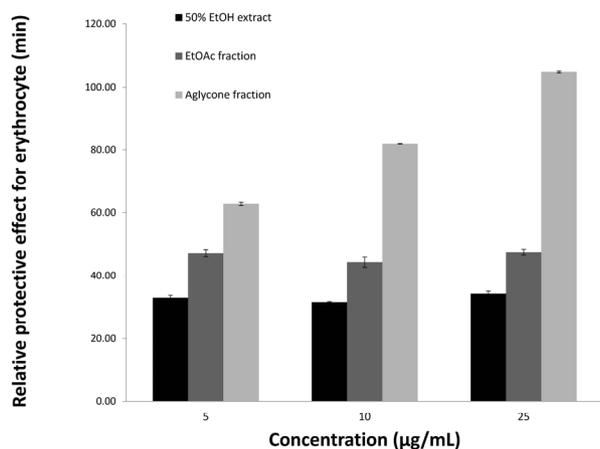


Figure 3. Cell protective effects of *R. acetosa* L. extract and fraction against $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes (control=31.10 \pm 1 min).

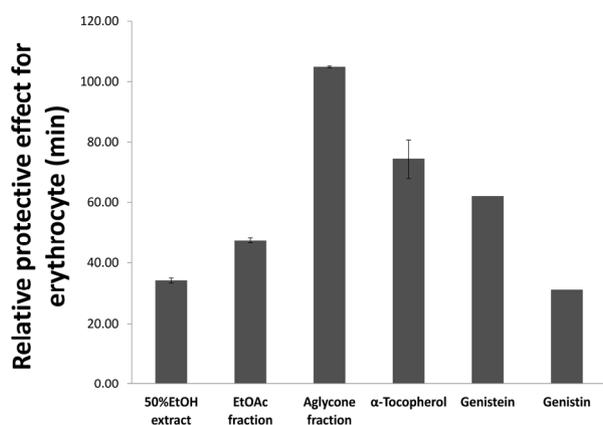


Figure 4. The effects of extract and fractions from *R. acetosa* L. extract and reference at 25 $\mu\text{g/mL}$ on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (control = 31.10 \pm 1 min).

각 33.00, 31.60 및 34.30 min, 에틸아세테이트 분획의 경우는 47.10, 44.30 및 47.40 min으로 농도와 거의 무관하게 약간의 세포보호 효과만을 나타내었다. 그러나, 아글리콘 분획의 경우 62.70, 81.90 및 104.80 min으로 농도 의존적으로 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 아글리콘 분획의 경우는 비교적 높은 농도(25 $\mu\text{g/mL}$)에서 제일 큰 세포보호 효과를 나타내었다 (Figure 3).

가장 큰 세포보호 효과를 나타내었던 25 $\mu\text{g/mL}$ 를 기준으로 수영 전초 추출물의 세 분획과 지용성 항산

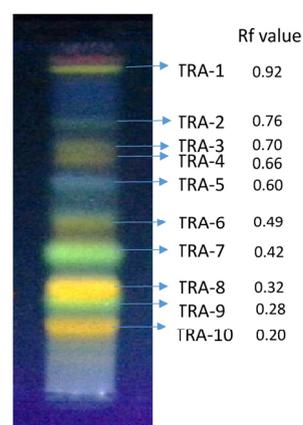


Figure 5. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *R. acetosa* L. extract and reference. Eluent system : ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v).

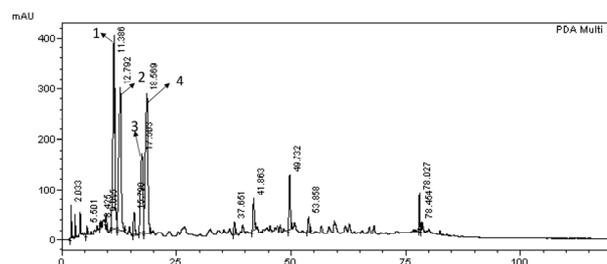


Figure 6. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *R. acetosa* L. extract at $\lambda = 280$ nm. ① isoorientin, ② orientin, ③ vitexin, ④ isovitexin.

화제인 (+)- α -tocopherol (74.30 \pm 6.40 min), 대두플라보노이드인 제니스테인과 그 배당체인 제니스틴(62, 31 min)의 τ_{50} 을 비교하였다(Figure 4)[28]. 수영 전초 추출물의 아글리콘 분획의 τ_{50} 이 104.80 \pm 0.30 min으로, 비교 물질인 (+)- α -tocopherol보다 1.41배, 제니스테인보다 1.69배, 제니스틴보다 3.38배 높은 세포보호 효과를 나타냈다. 수영 전초 추출물의 아글리콘 분획은 천연 항산화제로서 화장품에 응용 가능성이 있음을 시사한다.

3.3. 수영 전초 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.3.1 수영 전초 추출물의 TLC 성분분석

수영 전초 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 5에 나타내었다. 에틸아세테이

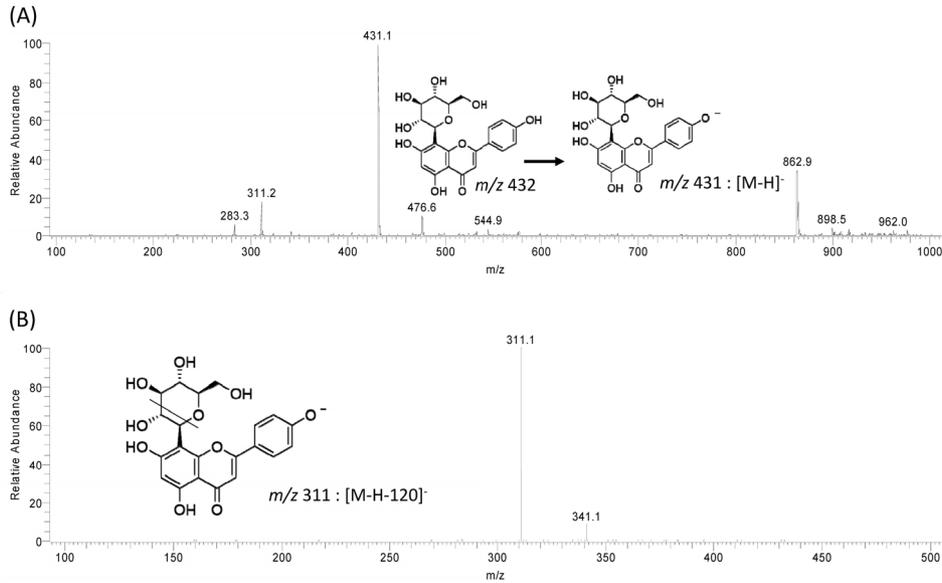


Figure 7. Mass spectra of TRA-7 in negative mode (LC-MS) : (A) full Ms spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 431.

트 분획과 다양한 표준물질을 점적한 TLC를 자외선과 NP (2-aminoethyl-diphenylborinate)-PEG (polyethylene glycol) 발색시약으로 확인하였다. 플라보노이드 배당체들을 분리할 수 있는 이동상 조건 하에서 수영 전초 추출물의 에틸아세테이트 분획은 10개의 띠로 분리되었다. 각각의 띠들을 위에서부터 1번으로 하여 총 10번까지 TRA-1 ~ TRA-10으로 명명 후 실험을 진행하였다. 그 중에 띠가 가장 선명하게 분리된 네 개의 띠를 중점적으로 조사하였다. 표준 물질과 비교하여 Rf 값이 0.42인 TRA-7은 vitexin, Rf 값이 0.32인 TRA-8는 orientin, Rf 값이 0.28인 TRA-9는 isovitexin, Rf 값이 0.20인 TRA-10은 isorientin으로 표준 물질과 동일한 Rf 값을 가짐을 확인하였다.

3.3.2. 수영 전초 추출물의 HPLC 분석

수영 전초 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. 표준물질을 사용하여 실험한 결과 peak 1은 isorientin이고 peak 2는 orientin, peak 3은 vitexin, peak 4는 isovitexin과 동일한 위치에서 피크가 확인되었고 이러한 결과는 TLC의 결과와도 일치하였다.

3.3.3. 수영 전초 추출물의 LC/ESI-MS/MS 분석

앞서 진행한 TLC 상에서의 표준물질과 비교 및

HPLC 분석을 통해 네 가지 물질 모두 페놀성 플라보노이드 성질을 가지고 있는 것으로 예측할 수 있다. Vitexin으로 예측되는 TRA-7, orientin으로 예측되는 TRA-8, isovitexin으로 예측되는 TRA-9, isorientin으로 예측되는 TRA-10의 구조분석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다.

3.3.3.1. TRA-7 (Rf 0.42)의 구조결정

머무름 h 10.50 min; UV, 238, 268, 336 nm; MS, 431.1 $[M-H]^-$; MS/MS $[M-H]^-$, 341.1 $[(M-H)-90]^-$, 311.1 $[(M-H)-120]^-$. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, apigenin-8-C-glucoside (vitexin)으로 예상되는 TRA-7의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다. 그 결과, negative ion 모드에서 molecular ion $[M-H]^-$ 이 m/z 431.1에서 나타났다(Figure 7). Figure 7 (B)에 표시된 단위의 소실로 인하여 m/z 431.1 → m/z 311.1을 나타내었다. 따라서 수영 전초 추출물의 TRA-7은 apigenin-8-C-glucoside (vitexin)으로 동정하였다.

3.3.3.2. TRA-8 (Rf 0.32)의 구조결정

머무름 h 7.70 min; UV, 255, 348 nm; MS, 447.1 $[M-H]^-$; MS/MS $[M-H]^-$, 393.2 $[(M-H)-54]^-$, 369.1 $[(M-H)-78]^-$, 357.1 $[(M-H)-90]^-$, 327.1 $[(M-H)-120]^-$. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, luteo

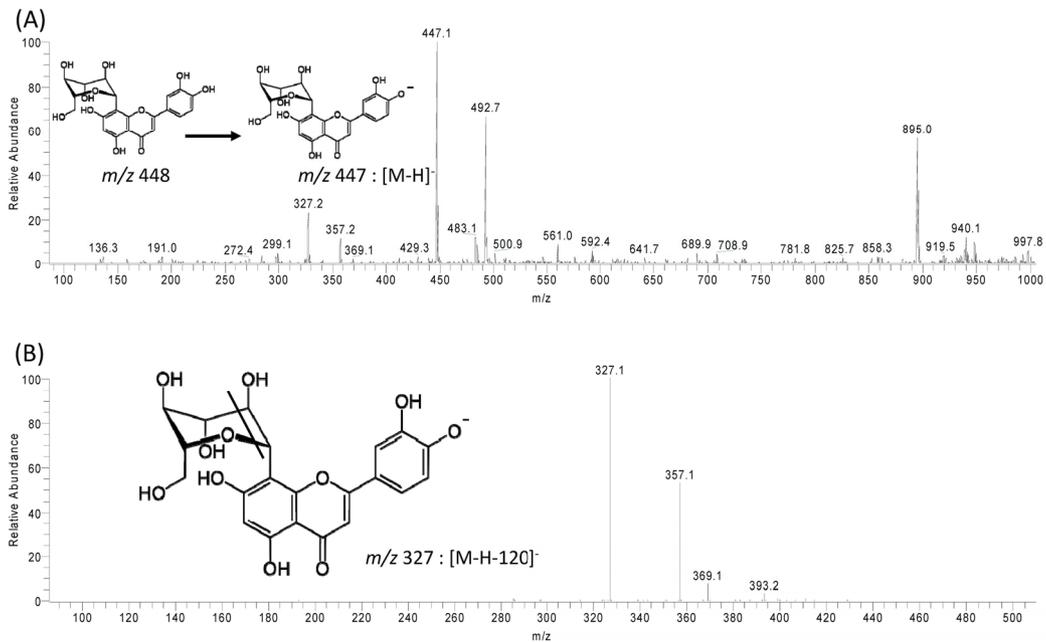


Figure 8. Mass spectra of TRA-8 in negative mode (LC-MS) : (A) full Ms spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 447.

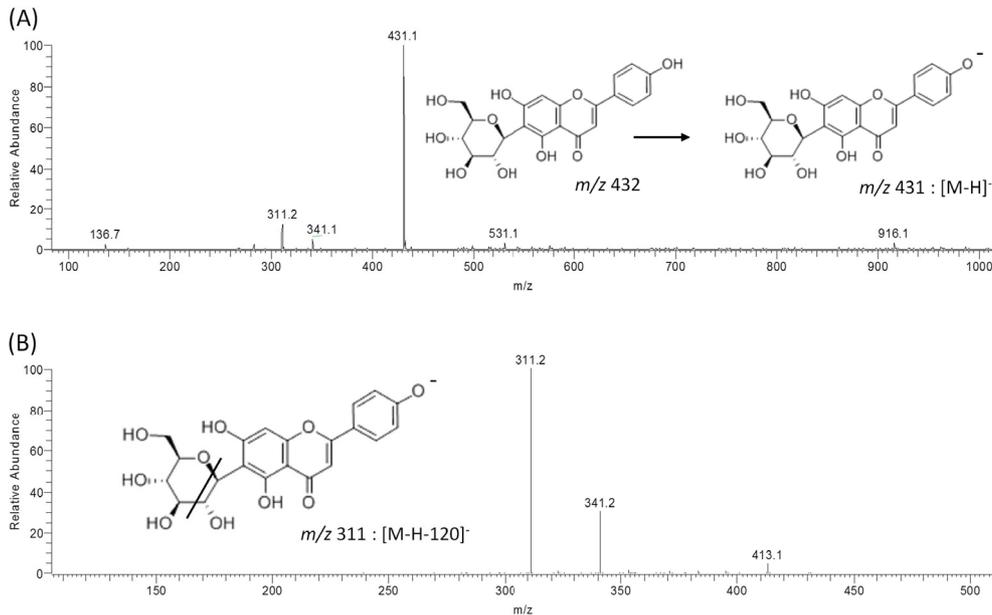


Figure 9. Mass spectra of TRA-9 in negative mode (LC-MS) : (A) full Ms spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 431.

lin-8-C-glucoside (orientin)으로 예상되는 TRA-8의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다. 그 결과, negative ion 모드에서 molecular ion $[M-H]^-$ 이 m/z 447.1 에서 나타났다(Figure 8). Figure 8 (B)에 표시된 단위의 소실로 인하여 m/z 447.1 \rightarrow m/z 327.1을 나타

내었다. 따라서 수영 전초 추출물의 TRA-8은 luteolin-8-C-glucoside (orientin)으로 동정하였다.

3.3.3.3. TRA-9 (Rf 0.28)의 구조결정

머무름 h 11.40 min; UV, 236, 270, 337 nm; MS,

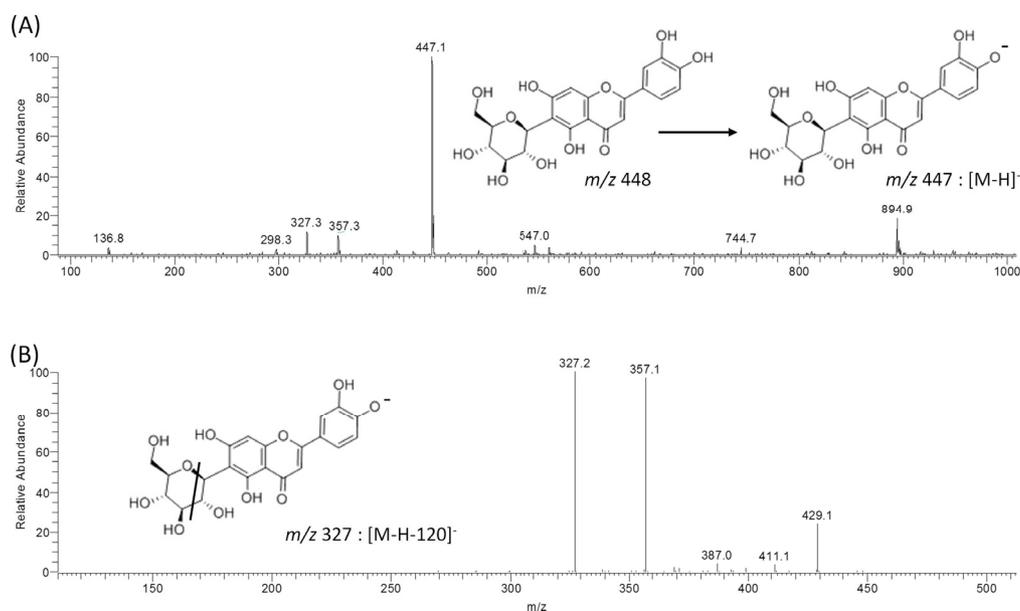


Figure 10. Mass spectra of TRA-10 in negative mode (LC-MS) : (A) full MS spectra; (B) MS/MS from precursor ion m/z 447.

431.1 $[M-H]^-$; MS/MS $[M-H]^-$, 413.1 $[(M-H)-18]^-$, 341.2 $[(M-H)-90]^-$, 311.2 $[(M-H)-120]^-$. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, apigenin-6-C-glucoside (isovitexin)으로 예상되는 TRA-9의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다. 그 결과, negative ion 모드에서 molecular ion $[M-H]^-$ 이 m/z 431.1에서 나타났다 (Figure 9). Figure 9 (B)에 표시된 단위의 소실로 인하여 m/z 431.1 \rightarrow m/z 311.2를 나타내었다. 따라서 수영 전초 추출물의 TRA-9은 apigenin-6-C-glucoside (isovitexin)으로 동정하였다.

3.3.3.4. TRA-10 (Rf 0.20)의 구조결정

머무름 h 7.00 min; UV, 269, 348 nm; MS, 447.2 $[M-H]^-$; MS/MS $[M-H]^-$, 429.1 $[(M-H)-18]^-$, 411.0 $[(M-H)-36]^-$, 387.0 $[(M-H)-60]^-$, 357.1 $[(M-H)-90]^-$, 327.2 $[(M-H)-120]^-$. 앞서 진행한 TLC와 HPLC 분석을 통해, luteolin-6-C-glucoside (isoorientin)으로 예상되는 TRA-10의 구조 분석을 위해 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다. 그 결과, negative ion 모드에서 molecular ion $[M-H]^-$ 이 m/z 447.2에서 나타났다(Figure 10). Figure 10 (B)에 표시된 단위의 소실로 인하여 m/z 447.2 \rightarrow m/z 327.2를 나타내었다. 따라서 수영 전초 추출물의 TRA-10은 luteolin-6-C-glucoside (isoorientin)으로 동정하였다.

4. 결 론

1) 수영 전초 추출물의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과, (+)- α -tocopherol (8.98 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획(45.105 $\mu\text{g/mL}$) > 에틸아세테이트 분획(92.96 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물(143.37 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다. 따라서 수영 전초 추출물의 항산화제로서 가능성을 확인할 수 있었다.

2) 수영 전초 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획(2.68 $\mu\text{g/mL}$) > L-ascorbic acid (6.88 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획(7.8 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물(9.78 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다. 따라서, 수영 전초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 비교 물질인 L-ascorbic acid보다 높은 활성산소 소거 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

3) 수영 전초 추출물의 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과 실험에서 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 농도에 따른 차이 없이 대조군보다 다소 양호한 세포보호 효과를 보인 반면, 아글리콘 분획만 농도 의존적인 세포보호 효과를 나타내었다. 또한 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 기준으로 아글리콘 분획의 τ_{50} 은 104.80 min으로 수영 전초 추출물의 아글리콘 분획이 비교 물질인 (+)- α -tocopherol (74.30 min)보다 높은 세

포보호 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

4) 자유라디칼 소거활성 및 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과는 아글리콘 분획이, 활성산소 소거 활성에 대한 효과는 에틸아세테이트 분획이 우수한 활성을 나타내었다. 이를 통해 수영 전초 추출물 중 에틸아세테이트를 이용한 유효성분을 정제한 분획이 우수한 항산화 활성 및 세포보호 효과를 나타내는 유효 성분 추출에 적합한 조건으로 사료된다.

5) 수영 전초 추출물의 주성분 분리, 정제 및 구조 분석을 통해 주 성분인 vitexin, isovitexin, orientin 및 isoorientin을 동정하였고, 이러한 성분들로 인해 우수한 항산화 활성 및 세포보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 수영 전초 추출물은 항산화 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 크다고 사료된다.

Reference

1. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In: Free radical damage and its control, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, Elsevier Science B.V., 239 (1994).
2. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy, eds. H. Sies, Advances Pharmacology, (1997).
3. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
4. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
5. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
6. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
7. 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).
8. Y. J. Ahn, B. R. Won, M. K. Kang, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavendula angustifolia* extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 125 (2009).
9. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Thesis, Seoul National University (1989).
10. S. B. Han, S. S. Kwon, B. J. Gong, K. J. Kim, and S. N. Park, Antioxidative Effect and Tyrosinase Inhibitory Activity for the Unripened Fruit by *Rubus coreanus* Miquel Extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(4), 295 (2013).
11. R. S. Sohal and W. C. Orrb, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**(3), 539 (2012).
12. L. C. Magdalena, and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
13. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases : Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
14. M. J. Davies, Reactive Oxygen Species, Metalloproteinases, and Plaque Stability, *Journal of the American Heart Association*, **23**, 2382 (1998).
15. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
16. S. B. Berman and T. G. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**(3), 1185 (1997).
17. J. J. Thiele, C. O. Barland, R. Ghadially, and P. M. Elias, Permeability and antioxidant Barriers in aged epidermis, Skin Aging (B. A. Gilchrest, J. Krutman, eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany,

- 65 (2006).
18. J. Y. Bae, Y. S. Rhee, S. Y. Han, E. J. Jeong, M. K. Lee, J. Y. Kong, D. H. Lee, K. J. Cho, H. S. Lee, and M. J. Ahn, A Comparison between Water and Ethanol Extracts of *Rumex acetosa* for Protective Effects on Gastric Ulcers in Mice, *Biomol. Ther.*, **20**(4), 425 (2012).
 19. C. B. Lee, Coloured Flora of Korea I. 246, Hyangmoonsa, Seoul (2003).
 20. N. J. Lee, J. H. Choi, B. S. Koo, S. Y. Ryu, Y. H. Han, S. I. Lee, and D. U. Lee, Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2158 (2005).
 21. K. Gescher, A. Hensel, W. Hafezi, A. Derksen, and J. Kühn, Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1, *Antiviral Res.*, **89**, 9 (2011).
 22. M. Wegiera, U. Kosikowska, A. Malm, and H. D. Smolarz, Antimicrobial activity of the extracts from fruits of *Rumex* species, *Cent. Eur. J. Biol.*, **6**, 1036 (2011).
 23. M. Aritomi, I. Kiyota, and T. Mazaki, Flavonoid constituents in leaves of *Rumex acetosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 1470 (1965).
 24. T. Kato and Y. Morita, Anthraquinone components in *Rumex acetosa* L., *Shoyakugaku Zasshi*, **41**, 67 (1987).
 25. T. Kato, Y. Morita, C-Glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2277 (1990).
 26. J. W. Fairbairn and F. J. El-muhtadi, Chemotaxonomy of anthraquinones in *Rumex*, *Phytochemistry*, **11**, 263 (1972).
 27. N. J. Lee, K. H. Lee, D. U. Lee, S. S. Park, Y. H. Han, and S. Y. Ryu, Antimutagenic activity and cytotoxicity of the whole plant of *Rumex acetosa*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **32**(4), 338 (2001).
 28. 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).