

니아올리 잎 추출물의 항산화 효과 및 성분 분석

김문진 · 김은종 · 박수남[†]

[†]서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소
(2014년 12월 5일 접수; 2014년 12월 19일 수정; 2014년 12월 26일 채택)

Antioxidative Effect and Component Analysis of Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Leaf Extracts.

Moon Jin Kim · Eun Jong Kim · Soo Nam Park[†]

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

(Received December 5, 2014; Revised December 19, 2014; Accepted December 26, 2014)

요약 : 니아올리 잎 추출물의 항산화 효과와 성분 분석에 관한 연구를 시행하였다. 실험에 사용한 시료는 건조된 니아올리 잎의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 이용하였다. 자유라디칼(1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 에틸아세테이트 분획이 10.05 $\mu\text{g/mL}$ 로, 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (8.89 $\mu\text{g/mL}$)과 유사한 효과를 나타내었다. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 니아올리 잎 추출물의 총 항산화능(OSC₅₀)에서 에틸아세테이트 분획은 1.61 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획은 1.07 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈다. 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획 모두 항산화 활성이 매우 큰 비교 물질인 L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$)와 비슷한 활성산소 소거활성을 나타내었다. Rose-bengal로 광증감된 ¹O₂에 의한 세포손상에 대한 세포보호능 측정에서 추출물 및 분획 모두 농도 의존적(5 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$)으로 세포보호 활성을 나타내었다. 특히 아글리콘 분획과 50% 에탄올 추출물의 τ_{50} 은 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 158.80 min, 50.1 min으로 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (38.0 min)보다 더 큰 세포 보호 효과를 나타내었다. TLC와 HPLC를 이용하여 니아올리 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획으로부터 avicularin과 quercitrin이 존재함을 처음 확인하였다. 이상의 결과들은 니아올리 잎 추출물 또는 분획이 항산화 원료로서 화장품에 응용 가능성을 시사한다.

Abstract : The antioxidative effects and component analysis of the *Melaleuca quinquenervia* leaf extracts were investigated. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from dried *M. quinquenervia* leaves. The DPPH (1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activity (FSC₅₀) of ethyl acetate fraction (10.05 $\mu\text{g/mL}$)

[†]Corresponding author
(E-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

of *M. quinquenervia* leaf extracts was similar to (+)- α -tocopherol(8.89 $\mu\text{g/mL}$) known as a typical antioxidant. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC_{50}) of the ethyl acetate fraction (1.61 $\mu\text{g/mL}$) and aglycone fraction (1.07 $\mu\text{g/mL}$) of leaf extracts of *M. quinquenervia* on ROS generated in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system using the luminol-dependent chemiluminescence assay were similar to that of L-ascorbic acid (1.50 $\mu\text{g/mL}$). The cellular protective effect of the extracts on the rose bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes was increased in a concentration dependant manner (1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$). Especially, the cellular protective effects of Aglycone fraction ($\tau_{50} = 158.80$ min) and 50% Ethanol extract ($\tau_{50} = 50.1 \pm 0.2$ min) on the $^1\text{O}_2$ -induced cellular damage of human cells were exhibited the higher than (+)- α -tocopherol ($\tau_{50} = 38.0$ min). TLC and HPLC were used to analyse active components in the ethylacetate fraction of the extracts. Results showed that avicularin and quercetrin were active components of the extracts. These findings suggest that the *M. quinquenervia* leaf extracts can be applied to new cosmetics products as an effective antioxidant ingredient.

Keywords : *Niaouli leaf extract, flavonoid, antioxidative activity, avicularin, quercitrin.*

1. 서론

피부 노화는 피부내 생리적 요인들의 기능 감소에 의해 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외부 환경에 의한 외인성 노화(exogenous aging)로 구분 할 수 있다. 특히, 피부가 노화하는 데 가장 큰 영향을 미치는 외인성 요인으로 자외선을 꼽을 수 있다[1,2]. 자외선으로부터 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부의 광산화적 손상을 일으켜 피부노화를 가속화시킨다[3,4]. ROS는 큰 산화력을 갖는 O_2^- (superoxide anionin radical), $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)과 같은 산소중심의 라디칼과 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide)와 같은 비라디칼종을 포함한다. 이들 ROS는 피부 항산화제를 파괴하고, 지질 과산화반응을 개시하며 피부 내 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로써 주름생성을 유도하고 피부노화를 가속화시킨다[4-7]. 또한 DNA 손상 및 활성에 영향을 미치며 멜라닌세포에 영향을 미쳐 멜라닌세포의 증식과 멜라닌 합성을 증가시킨다[8-10]. 이러한 ROS로부터 유도된 산화적 스트레스에 대항하기 위해 피부에는 항산화 방어망이 구축되어 있다. superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 효소적 항산화제와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione 등과 같은 비효소적 항산화제들이 서로 상호보완하며 피부에 항산화 네트워크를 형성

한다. 하지만 피부는 직접적으로 여러 환경적인 요인과 접촉하고 있기 때문에 ROS가 과도하게 생성되면 항산화 네트워크가 붕괴되고 과산화지질 및 산화생성물이 축적되어 피부노화가 촉진된다[11-13]. 따라서 피부노화를 지연시키기 위해서 자외선을 차단하거나 피부에서의 ROS의 생성을 억제하거나 생성된 ROS를 효율적으로 제거하여 ROS로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화제 개발이 요구되고 있다[14,15].

니아울리(Niaouli, *Melaleuca quinquenervia*)는 도금양과에 속하는 멜라루카 종이다. 니아울리는 뉴칼레도니아 지역 또는 오스트레일리아 동부해안 등에 널리 분포되어 있다. 니아울리 추출물 관련 연구는 주로 에센셜 오일로써의 응용 사례가 대다수이다. 니아울리 잎에는 gallic acid, ellagic acid 및 3-O-methylelagic acid 등이 함유되어 있다는 보고가 있고, 항균활성 등에 대한 연구가 일부 보고되고 있다[16,17]. 그러나 니아울리 오일이 아닌 잎 추출물 또는 분획의 피부상재균에 대한 항균활성이나 항산화 활성 및 성분 분석에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에 앞서 저자들은 피부 상재균에 대한 니아울리 잎 추출물의 항균활성을 조사하였으며, 그 결과 니아울리 잎 50% 에탄올 추출물/분획이 피부 상재균에 대한 항균활성을 나타내는 천연 방부제로서 화장품에 응용 가능성이 있음을 최근에 시사한바 있다[18].

본 연구에서는 니아울리 잎 추출물/분획을 가

지고 피부노화의 큰 원인인 활성산소에 따른 세포손상에 대한 보호작용, 총 항산화능 및 free radical 소거능에 대한 항산화능을 비교 평가하였으며, 니아올리 추출물의 생리활성 물질을 밝혀내어 항산화제로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 시료 및 분석

본 연구에 사용된 건조된 니아올리 잎은 코스메칼 코리아에서 제공받았으며, 이 니아올리 잎은 뉴칼레도니아(New Caledonia)에서 자생하는 니아올리 잎을 채취하여 건조시킨 것이다. UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB 9505 LT, 적혈구 광용혈 실험에는 Milton Roy Co. (USA)사의 Spectronuc 20D라는 제품을 사용하였으며, pH 측정에는 Hanna (Korea)사의 pH미터를 사용하였다. 자유라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 EDTA, luminol, heparin, 광증감제로 사용된 rose-bengal 및 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol과 L-ascorbic acid, avicularin, quercitrin은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)사에서, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사에서 구입하였다. 완충용액제에 사용된 NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 그리고 에탄올(EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 플라보노이드 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F254 (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다.

2.2. 니아올리 분획 및 추출

건조된 니아올리 잎 50 g을 잘게 자른 후, 50% 에탄올 500 mL를 넣고 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이러한 침적 및 여과과정을 2회 반복하여 실험하였다. 이 여액 일부를 감압 건조하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻어 실험에 사용하였다. 나머지 50% 에탄올 추출물은 n-헥산을 처리하여 비극성 성분을 완전히 제거하고, 이어서 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농

축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻어 실험에 사용하였다. 에틸아세테이트 분획물 일부를 산으로 가수분해하여 당을 제거시킨 후 감압 농축하여 아글리콘 분획물을 제조하였다. 아글리콘 제조방법은 에틸아세테이트 파우더 일정량에 H_2SO_4 및 아세트온 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕가열하면서 환류 냉각시켰다. 환류시킨 용액을 5% KOH-methanol 용액으로 중화적정하고 증류수로 세척 과정을 거친 후에 다시 에틸아세테이트로 추출하고 이를 감압·농축하여 얻어진 아글리콘 분획물을 실험에 사용하였다.

2.3. 니아올리 잎 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거 능력을 비교적 짧은 시간 내에 확인할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 주개를 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 따라서 니아올리 잎 추출물의 라디칼 소거 활성을 DPPH를 통하여 확인하였다. 실험방법을 요약하면 다음과 같다. 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올과 시료를 각각 1 mL씩 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10분 동안 방치 후 spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하였다. 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율은 계산되었으며, DPPH 소거 활성에 따른 추출물의 항산화능은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity concentration, FSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로서 표기하였다.

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

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

루미놀은 각종 ROS (O_2^- , $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2)에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm) 하는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 루미놀과 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 각종 ROS간의 반응을 통한 화학 발광을 측정함으로써 총 항산화능을 측정할 수

있다. 실험방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 니아올리 잎 추출물과 2.5 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 μ L를 가한 후 35 mM 루미놀 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 화학발광기의 cell holder에 튜브를 꽂는다. 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 일으키기 위해 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를 첨가하지 않았다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 활성산소 소거활성은 다음 식에 의해 계산되었고 활성산소 소거활성의 크기는 화학 발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

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

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포 손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 사람 피부의 자외선에 의한 노화를 방어할 수 있는 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 사람 유래 적혈구 세포를 이용한다는 점이 실질적이다. 따라서 본 실험에서는 이 실험법을 이용하여 활성산소에 대한 천연물 추출물의 세포보호 효과를 측정하였다.

2.4.1. 적혈구 현탁액제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 헤파린이 첨가된 시험관에 담은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리 하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은

700 nm에서 O.D.가 0.6 이었으며 이 때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 니아올리 잎 추출물의 광용혈 억제효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 니아올리 잎 추출물을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제로 사용된 rose-bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 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 10sec 동안 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온을 유지하며 진행하였다. 니아올리 잎 추출물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군(control)은 τ_{50} 이 30.6 min으로 오차범위 \pm 1min 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 3회 반복하여 평균내었다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

2.5. TLC 및 HPLC를 이용한 니아올리 잎 추출물의 플라보노이드 분석

니아올리 추출물 중 에틸아세테이트 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC 및 비극성 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석에서 에틸아세테이트 분획의 전개용매는 ethyl acetate : formic acid : chloroform : D.W = 8 : 1 : 1 : 0.1 (v/v)를 사용하여 분석하였다. 성분 확인은 플라보노이드

표준물질의 Rf 값과 자외선 및 NP-PEG 발색법을 이용한 띠의 색상과 이미 보고된 분광학적 자료를 이용하여 확인하였다. HPLC 분석은 기용기 용리법으로 분리하였고, 에틸아세테이트 분획의 HPLC 분리 조건은 Table 1에 나타내었다.

2.6. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 니아울리 잎의 분획별 추출 수득률

니아울리 잎 50 g을 50% 에탄올 500 mL에 24 h 동안 침적시킨 후 여과 및 감압하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올 추출물을 헥산 처리하여 클로로필이나 오일과 같은 비극성 물질을 완전히 제거한 후 에틸아세테이트로 분획하여 추출하였으며, 에틸아세테이트 분획을 산 가수분해 시켜서 당을 제거한 아글리콘 분획을 제조하였다. 각각의 수득률은 50% 에탄올 추출물 21.81%, 에틸아세테이트 분획 1.78%, 아글리콘 분획 0.49% 이었다.

3.2. 니아울리 잎의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

피부가 자외선에 노출되어 생성되는 ROS 에는 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 과 같은 홀 전자를 갖는 자유라디칼이

포함되어 있다. 이러한 홀 전자를 가지고 있는 라디칼은 에너지가 높고 반응성이 크기 때문에 세포막에서 지질 과산화반응의 자동산화반응을 개시시킬 수 있다. 자동산화 반응이 개시되면, 생체 내 구성물질이 산화과정을 거치며 피부노화가 일어나게 된다. 이 때, (+)- α -tocopherol, flavonoids 등의 항산화제는 ROS 및 유도된 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응인 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 시료의 항산화능은 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통하여 측정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여 니아울리 잎 추출물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 니아울리 잎 추출물과 기준에 강력한 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 니아울리 잎 50% 에탄올 추출물의 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 20.80 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획물 10.05 $\mu\text{g/mL}$, 아글리콘 분획은 13.95 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타내었다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 8.80 $\mu\text{g/mL}$ 로 니아울리 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획이 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol과 유사한 효과를 보임을 확인하였다.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fraction from *M. quinquenervia* Leaf Extract

Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 nm, LD : 4.6 mm)
Detector	UVD 170s DIONEX
Detection wavelength	365 nm
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 μL
Mobile phase	2% AA ^{a)} in water : 0.5% AA ^{a)} in 50% ACN ^{b)} (70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for EA fraction

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

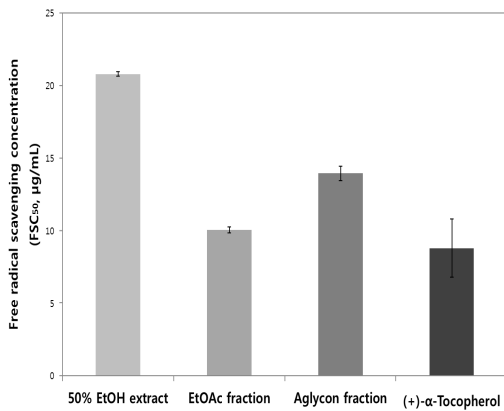


Fig. 1. Free radical scavenging activities of extracts and fractions of *M. quinquenervia* leaf extracts and reference.

3.2.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성 산소 소거활성 (총 항산화능)

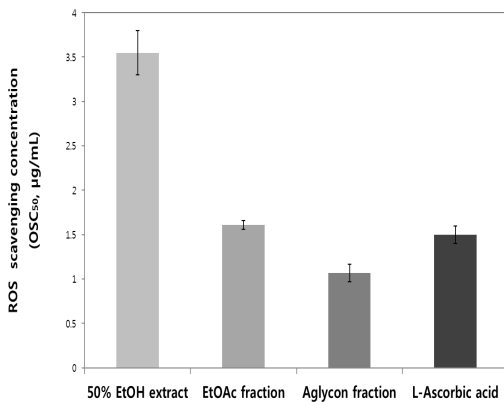


Fig. 2. Reactive oxygen species scavenging activities of extracts and fractions of *M. quinquenervia* leaf extracts and reference.

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서는 Fenton 반응을 통해 생성된 ·OH, H₂O₂와 같은 ROS가 생성되고, 생성된 ROS는 루미놀을 산화시킨다. 루미놀은 ROS 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420 ~ 450 nm에서 발광하는 것으로 알려져 있다. 이 계에서는 다양한 종류의 활성산소가 생성되기 때문에 이들 활성산소종들에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. Fig. 2은 니아올리 잎 추출물의 ROS 소거활성(총 항산화능)을

나타내었다. 니아올리 잎 50% 에탄올 추출물의 활성산소 소거활성은 3.55 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 1.61 µg/mL, 아글리콘 분획은 1.07 µg/mL로 나타났다. 비교물질은 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며 비교물질의 총 항산화능은 1.50 µg/mL로 나타났다. 니아올리 잎 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획 모두 비교물질과 비슷한 활성산소 소거활성을 나타내었다.

3.3. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

생체에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 광증감제가 존재하며, 이러한 광증감제는 자외선 노출 시 광증감반응이 일어나 주 활성산소인 ¹O₂를 비롯하여 다양한 종류의 ROS 생성을 유발시킨다. 특히 ¹O₂는 반응성이 매우 큰 산화제로서 피부가 자외선에 노출될 시 생성되지만, 생체 내에서 이를 처리할 수 있는 효소는 존재하지 않는다. 또한, 세포막에서 라디칼 반응을 개시시킴으로써 지질과산화반응을 일으켜서 세포 손상을 야기시킨다. 이러한 연쇄반응을 통하여 세포는 파괴되고 피부노화는 가속화된다. 따라서 적혈구의 광용혈 실험법은 활성산소로부터 세포보호효과를 측정하는데 매우 효과적이다. 본 실험에서는 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 니아올리 잎 추출물 각각의 분획에 따른 세포보호효과를 측정하였고 니아올리 잎 추출물의 항산화제로서의 이용 가능성을 세포수준에서 확인하고자 하였다.

니아올리 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획물에 대하여 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도에서 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})을 측정함으로써 세포 보호 효과를 비교하였다(Fig. 3). 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 길게 나타난다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우, 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간은 30.6 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. 니아올리 50% 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 µg/mL 각각의 농도에서 τ_{50} 이 각각 39.7, 50.1, 99.4, 214.1 min으로, 에틸아세테이트 분획은 31.7, 32.4, 36.9, 47.7 min으로, 아글리콘 분획은 110.8, 158.8, 282.8, 316.4 min을 나타내었다. 니아올리 잎추출물은 모든 분획에서 농도 의존적인 세포보호활성을 나타내었다. 에탄올 분획 및 아글리콘 분획은 비교

물질 보다 우수한 효과를 보였다. 특히 아글리콘 분획의 경우, 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol보다 매우 우수한 세포 보호 활성을 보였다. 각 분획의 성분 차이로 인해 세포막에서의 보호효과 차이가 생긴 것으로 사료된다. 농도 10 μ g/mL를 기준으로 니아울리 잎 추출물 분획 별로 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol (38.0 ± 1.8 min)의 τ_{50} 을 비교하였다(Fig. 4).

50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획의 τ_{50} 은 각각 50.1 ± 0.2 , 32.4 ± 2.5 , 158.8 ± 4.2 min으로 나타났다. 에틸아세테이트의 경우는 비교물질인 (+)- α -tocopherol에 비해 큰 효과를 보이지 않았다. 반면, 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획은 이는 비교물질인 (+)- α -tocopherol보다 각각 1.3 배, 4.2 배로 활성산소(1O_2)로 유도된 세포 손상에 있어서 우수한 세포보호 효과를 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 니아울리 잎 추출물 분획 중 아글리콘 분획이 활성산소에 대한 세포보호 활성이 우수하며 항산화제로서 응용가능성이 있다고 여겨진다.

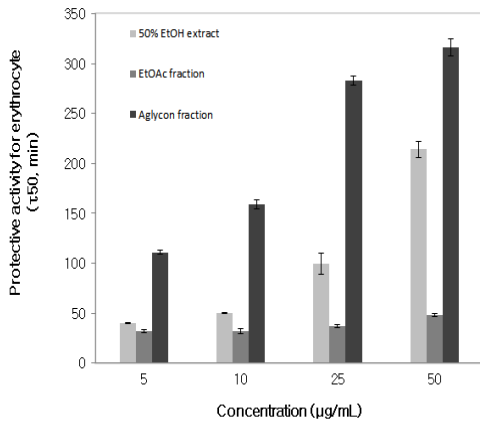


Fig. 3. Cell protective effects of *M. quinquenervia* leaf extracts and fractions against 1O_2 -induced photohemolysis of human erythrocytes.
*Control ($\tau_{50} = 30.6$ min \pm 1 min)

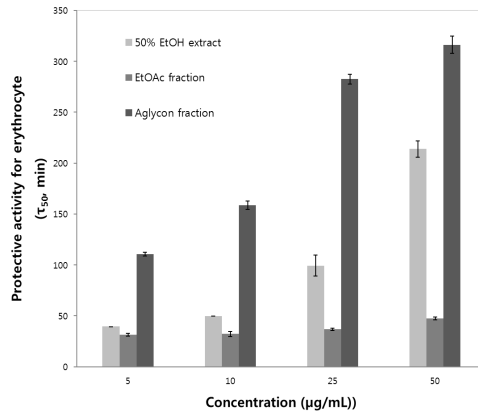


Fig. 4. The effects of *M. quinquenervia* leaf extracts and reference at 10 μ g/mL on the rose-bengal sensitized photo-hemolysis of human erythrocytes.
*Control ($\tau_{50} = 30.6$ min \pm 1 min)

3.4. 니아울리 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

3.4.1. 니아울리 잎 추출물의 TLC 성분분석

니아울리 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Fig. 5에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획은 11개의 띠로 분리되었으며, 에틸아세테이트 분획과 다양한 표준물질의 TLC 크로마토그램을 자외선과 NP (2-aminoethyl diphenylborinate) - PEG (polyethylene glycol) 발색시약으로 확인하였다. 그 중, 2개 띠 성분을 확인하였으며, R_f 값이 0.71인 TM-1은 avicularin, R_f 값이 0.64인 TM-2는 quercitrin으로 확인하였다.

3.4.2. 니아울리 잎 추출물의 HPLC 성분분석

니아울리 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램을 Fig. 6에 나타내었다. 표준 물질을 사용하여 확인한 결과 peak 1은 avicularin 이고 peak 2는 quercitrin인 것으로 TLC와 동일한 결과로 나타났다.

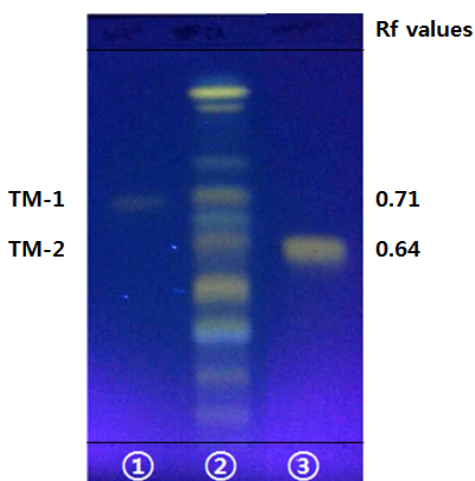


Fig. 5. TLC chromatogram of ethylacetate fraction from *M. quinquenervia* leaf extracts and references.

Eluent system : ethyl acetate : formic acid : chloroform : D.W = 8 : 1 : 1 : 0.1 (v/v)를 사용하여 분석. ① avicularin ② EA fraction ③ quercitrin

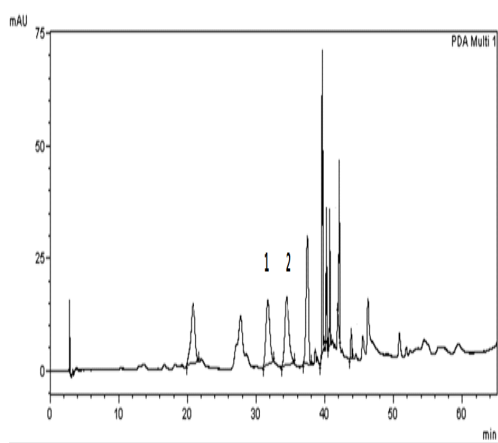


Fig. 6. HPLC chromatogram of ethylacetate fraction from *M. quinquenervia* leaf extracts at $\lambda = 365$ nm, 1: avicularin, 2: quercitrin.

4. 결론

니아울리 잎 추출물의 항산화 효능과 성분 분석 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 니아울리 잎 분획별 추출 수득을 계산 결과, 5df0%에탄올 추출물 21.81%, 에틸아세테이트 분획 1.78%, 아글리콘 분획 0.49% 이었다.
2. 니아울리 잎 추출물의 자유라디칼 소거 활성 (FSC₅₀) 측정 결과, 에틸아세테이트 분획 (10.05 $\mu\text{g/mL}$) > 아글리콘 분획 (13.95 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물 (20.80 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다. 니아울리 잎 세 분획 모두 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거 활성 (8.80 $\mu\text{g/mL}$)보다 낮은 자유라디칼 소거 활성을 보였으며, 에틸아세테이트 분획이 (+)- α -tocopherol과 유사한 소거 활성을 갖음을 확인하였다.
3. 니아울리 잎의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀)을 확인한 결과, 아글리콘 분획 (1.07 $\mu\text{g/mL}$) > 에틸아세테이트 분획 (1.61 $\mu\text{g/mL}$) > 50% 에탄올 추출물 (3.55 $\mu\text{g/mL}$) 순서로 나타났다. 비교물질로 사용된 L-ascorbic acid 활성산소 소거활성은 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 이는 에틸아세테이트, 아글리콘 분획과 비슷한 소거활성을 나타내었다. 따라서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획이 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid와 유사한 활성산소 소거 활성이 있음을 확인하였다.
4. $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구 파괴에 대한 니아울리 잎 추출물의 세포보호 효과(적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간, τ_{50})를 확인한 결과, 모든 분획에서 5 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도의존적인 세포보호 효과를 나타내었다. 세포보호 효과는 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 기준으로 아글리콘 분획 (158.80 min) > 50% 에탄올 추출물 (50.10 min) > 에틸아세테이트 분획 (32.40 min) 순서로 세포보호 효과를 나타냈으며, 50% 에탄올 추출물과 아글리콘 분획의 경우는 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol (38.00 min) 보다 1.3 배, 4.2 배 높은 세포보호 효과를 보였다.
5. TLC 크로마토그램에서 니아울리 잎 에틸아세테이트 분획 중에 avicularin (TM-1)과 quercitrin(TM-2)이 있음을 확인할 수 있었다.
6. HPLC 크로마토그램으로부터 니아울리 잎

에틸아세테이트 분획 중 avicularin 과 quercitrin의 조성비는 전체 성분의 약 15%, 17%를 차지하는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 니아올리 잎 추출물은 항산화 원료로서 응용 가능성이 있다고 사료되며, 아직 밝혀지지 않은 나머지 유효성분의 분리·정제 및 구조분석에 관한 연구가 추가로 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 2014년도 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

1. D. S. Lee, M. S. Lim, S. S. Kwan, S. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and componential analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 93 (2012).
2. M. Yaar, and B. A. Gilchrest, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157(5)**, 874 (2007).
3. 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(4)**, 324 (2007).
4. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Thesis, Seoul National University, (1989).
5. 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).
6. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Am. Heart J.*, **23**, 2382 (1998).
7. 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(1-3)**, 129 (1995).
8. Yamakoshi, J., F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultraviolet induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pigment Cell Res.*, **16(6)**, 629 (2003).
9. 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* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35(2)**, 125 (2009).
10. A. R. Kim, S. A. Park, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidative and inhibitory activities on melanogenesis of *Vitex negundo L.* leaf extract, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41(1)**, 135 (2013).
11. L. C. Magdalena, and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48(6)**, 749 (2010).
12. R. S. Sohal, and W. C. Orrb. The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52(3)**, 539 (2012).
13. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35(3)**, 510 (2003).
14. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, *Free radical damage and its control*, **28**, 239 (1994).
15. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissues of skin: Its prevention and therapy, *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639 (1997).
16. F. A. Moharram, M. S. Marzouk, S. A. A. El-Toumy, A. A. E. Ahmed, and E. A. Aboutabl, Polyphenols of *Melaleuca quinquenervia* leaves-pharmacological studies of Grandinin, *Phytother. Res.*, **17(7)**, 767 (2003).

17. C. W. Lin, C. W. Yu, S. C. Wu, and K. H. Yih, DPPH Free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils, *J. Food Drug Anal.*, **17(5)**, 386 (2009).
18. H. N. Jang and S. N. Park, Antimicrobial activity of Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) leaf extracts against skin flora, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40(3)**, 313 (2014).