



조팝나무(*Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*)

에탄올 추출물 분획물의 항산화 활성

Anti-oxidative activity of water-ethanol fractions from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* ethanol extract

김수환 · 서진형 · 이성진 · 이선영 · 박천웅*

(주)차메디텍 연구원 · 충남대학교 식품영양학과 석사 과정 · (주)차메디텍 책임연구원
· 충남대학교 식품영양학과 교수 · 충북대학교 약학대학 교수*

Kim, Suhwan¹⁾ · Suhr, Jinhyung²⁾ · Lee, Sungjin¹⁾ · Ly, Sunyung²⁾ · Park, Chunwoong*

CHA Meditech Co., Ltd.¹⁾

Department of Food & Nutrition, Chungnam National University²⁾

College of Pharmacy, Chungbuk National University*

Abstract

The purpose of this study was to examine the anti-oxidative activities of water-ethanol fractions (SP 0, SP 30, SP 60, SP 80, SP 100, respectively) obtained from 70% ethanol extract of *Spiraea prunifolia* var. *Simpliciflora* (SP). To determine antioxidant activities of each fraction, total polyphenol content, DPPH and ABTS radicals scavenging activities, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) value were measured. Next, we established the inhibitory effects of SP fractions on H₂O₂-induced oxidative stress in B16F10 cells. The total polyphenol contents of the SP fractions were significantly higher in SP 30, 60, and 80, respectively, than in SP 0 and 100, and DPPH or ABTS radicals scavenging activities and FRAP values of SP 30, 60, and 80, respectively, were higher than those of SP 0. In particular, the total polyphenol content of the SP 60 was 304.77±0.31 mgGAE/g and DPPH radical scavenging activity was 0.03±0.00 mg/mL, similar to that of the ascorbic acid, and the ABTS radical scavenging activity was at a level of 1/4-1/5 of the ascorbic acid. The FRAP value was 1269.88 ± 12.01 mg ISHE/g. As a result, the SP 60 showed a significantly higher antioxidant capacity compared to other fractions. All of the fractions showed no cytotoxicity up to 125 µg/mL in the B16F10 cells. The SP fractions showed strong cytoprotective effects in H₂O₂-treated B16F10 cells by reducing the ROS production and DNA damage (p<0.05) and increasing the enzyme activities of SOD and catalase (p<0.05). The anti-oxidant activities were highest at SP 60, followed by SP 80 and SP 30, respectively. Aside from the above results, SP is expected to be used as a functional food and cosmetic material with excellent antioxidant capacity.

Keywords: *Spiraea prunifolia* var. *Simpliciflora*, Anti-oxidative activity, B16F10 cells

I. 서론

피부는 자외선, 미세 먼지, 오염물질 등의 외부 스트레

스에 노출될 때 주위의 화합물과 빠르게 반응하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생하며, ROS는 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radicals (·OH), 그리

본 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 과학기술인력교류활성화지원사업 성과의 일부임 (No.NRT-2018H1D2A2076153).

* Corresponding author: Park, Chunwoong
Tel: +82-43-261-3330, Fax: +82-43-268-2732
E-mail: cwpark@cbnu.ac.kr

© 2019, Korean Association of Human Ecology. All rights reserved.

고 non radical hydrogen peroxide(H_2O_2)와 같은 free radical을 포함한다. 이는 화학적으로 반응하여 DNA, 단백질, 탄수화물, 지질 등을 손상시킬 수 있고, 과도한 ROS가 세포의 방어체계를 무너뜨리게 되면 산화 환원 항상성을 변화시켜 산화적 스트레스를 유발한다. 이렇게 발생한 산화적 스트레스는 AIDS, 파킨슨병, 알츠하이머와 같은 인간의 퇴행성 질환의 주요한 위험요인으로 알려져 있으며 노화, 특히 피부노화의 발생기전으로도 알려져 있다(홍재기, 2009). 인체는 산화적 스트레스에 대한 보호 기전으로 다양한 항산화 방어시스템을 보유하고 효소에 의한 방어기전과 비효소적 방어기전으로 나뉜다. 효소적 보완체계에는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT), thioredoxin reductase 등이 인체 내에서 작용하고 있으며 이들 효소들은 상호보완하여 활성산소를 제거할 수 있다(Curtin et al., 2002). 비효소적 보완체계로는 항산화 물질에 의한 것으로 이들은 항산화 효소에 의해 제거되지 않는 활성산소들을 제거할 수 있다(형인혁 외, 2006). 체내에 활성산소의 농도가 지나치게 높거나 방어기능이 저하되는 상황에서는 인체가 기본적으로 지닌 효소적 또는 비효소적 항산화 기능만으로 산화적 스트레스를 완전히 제어하기가 어렵고 비효소적 항산화 물질들은 외부에서 공급되는 것도 유사한 효능을 보이기 때문에 최근 항노화 물질로 항산화제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Coleman et al., 2003; Lee et al., 2003; Thaipong et al., 2006).

비효소적 항산화제는 α -tocopherol, L-ascorbic acid, carotenoids, flavonoids 등이 있다. 이중 flavonoid는 폐쇄성 화합물로 식물에 많이 함유되어 있고, 특히 일부 식물 소제는 항산화능이 α -tocopherol이나 L-ascorbic acid보다 크다는 연구도 보고되어 있다(박수남, 1997). 이에 자연 친화적이고 환경 지향적인 최근의 소비 트렌드에 따라 flavonoid와 같은 다양한 천연 소재를 이용한 기능성 식품과 천연화장품의 개발 시장이 확대되고 있다(김지은 외, 2019; Shim et al., 2017).

장미과(Rosaceae)에 속하는 조팝나무(*Spiraea prunifolia*)는 함경도를 제외한 한반도 전역과 중국, 일본 등에 약 10종 6변종 16종류가 자생하며 예부터 중국에서는 어린잎이나 과일, 뿌리를 이노제, 해독제, 염증 치료제 및 진통제로 사용해왔다(배지영 외, 2012; 이은희 외, 1996). 심미옥 외(2017)은 조팝나무(*Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai) 뿌리 열수 추출물이 면역

세포에서 항산화 및 항염 작용이 있음을 보고하였고 다른 연구에서도 조팝나무의 뿌리 추출물이 신경세포를 보호하고 항암 효능이 있다고 보고되었다(심미옥 외, 2017; 오선민 외, 2018; 이은희 외, 1996). 그러나 아직 조팝나무의 가지와 잎을 포함한 에탄올 추출물에 대한 연구는 이루어지지 않았으므로 본 연구에서는 조팝나무(*Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*) 가지와 잎의 에탄올 추출물에 대하여 물-에탄올 분획물을 얻어 이들의 항산화 활성을 측정함으로써 항산화능이 높은 분획물을 확인하고자 하였다.

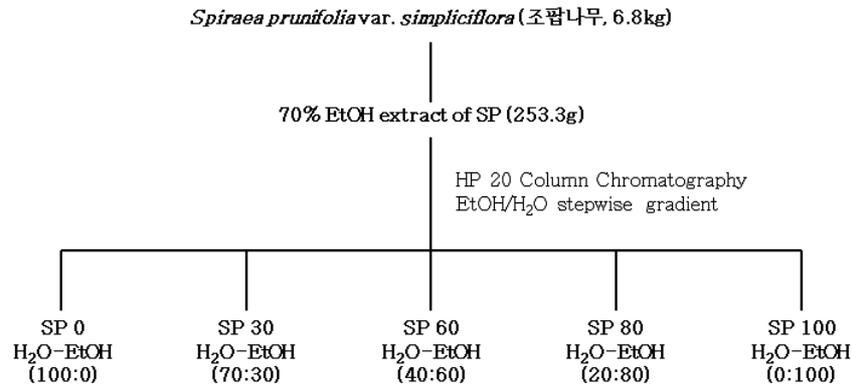
II. 연구재료 및 방법

1. 조팝나무 분획물 및 분획물 제조

본 실험에 사용된 조팝나무(*Spiraea Prunifolia* var. *Simpliciflora*)는 충북 영동에서 2018년 10월에 채취하였으며 뿌리와 과실을 제외하고 가지와 잎을 사용하였다. 본 연구에서는 조팝나무 성분들을 추출하는 과정에서 항산화활성을 최대한 보유하고 추출효율도 높일 수 있는 방법으로 용매의 비등점 이하에서 추출을 수행하였다. 조팝나무 중량의 8배수 양의 70% 에탄올을 첨가하여 70°C에서 3시간동안 3회 반복 교반 추출하고 추출액을 모두 합하여 여과지(Advantec No.3, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 회전증발농축기를 사용하여 농축하였다. 얻어진 추출물에 대하여 극성에 따른 분획을 실시하였다. 분획은 H_2O -EtOH 혼합용액을 용출용매로 사용하고 흡착제로 HP20 resin을 사용하여 column chromatography를 실시하였다. 총 5개의 분획물 [SP 0; H_2O -EtOH(100:0), SP 30; H_2O -EtOH (70:30), SP 60; H_2O -EtOH(40:60), SP 80; H_2O - EtOH(20:80), SP 100; H_2O -EtOH(0:100)]을 얻어 회전증발농축기로 농축한 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다[그림 1].

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin & Denis, 1912)으로 측정하였다. 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약과 증류수를 섞은 혼합액과 분획물을 1:1로 섞어 암실에 방치한 뒤 20% sodium carbonate(Na_2CO_3 , Junsei



[그림 1] 조팝나무 추출물 및 분획물 제조 방법

Chemical, Chuo-ku, Japan) 150 μ L를 첨가해 반응 시키고 ELISA reader(Microplate absorbance spectrophotometer, Bio-rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 765nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 각 분획물 내의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

3. 항산화 활성 측정

각 분획물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 대한 라디칼 소거능은 Blois법(Blois, 1958)을 이용하여 측정하였다. 31.3, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, 1000.0 μ g/mL의 농도로 희석한 분획물에 0.15mM DPPH 용액을 섞어 암실에 방치한 후, ELISA reader를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거능은 Fellegrini et al.(1999)의 방법으로 측정하였다. 7mM ABTS용액과 140mM K₂S₂O₈ (Sigma-Aldrich Co.)를 잘 혼합한 혼합용액을 absolute ethanol과 1:88의 비율로 섞어 사용하였다. 농도별로 희석한 분획물 10 μ L에 ABTS 혼합용액 200 μ L를 혼합하여 암실에 방치한 후, ELISA reader를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 농도별로 산출하여 IC₅₀값을 구하였고 양성대조군으로는 모두 ascorbic acid를 사용하였다. 분획물의 FRAP에 의한 환원력은 Benzie와 Strain법(Benzie & Strain, 1996)으로 측정하였다. 300mM Sodium acetate buffer(pH 3.5), 10mM TPTZ(2,4,6-tris(2-pyridyl)-

s-triazine)와 20mM FeCl₃ · 6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 섞어 FRAP reagent를 제조하였다. 농도별로 희석한 분획물 10 μ L와 FRAP reagent 300 μ L 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader를 이용하여 593nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 농도별로 제조한 표준물질 FeSO₄ · 7H₂O의 검량곡선에 의거하여 FRAP value를 산출하였다.

4. B16F10 세포 배양

본 연구에서는 소재의 항산화능이 확인될 경우 화장품 소재로 개발할 목적을 가지고 있었으므로 실험에 사용된 세포는 murine melanoma 세포주인 B16F10 세포를 사용하였다. 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS(fetal bovine serum; Gibco, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin(Pen Strep; Gibco)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM; Gibco)을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator(BB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

5. 분획물의 세포 독성 평가

각 조팝나무 분획물의 세포 독성은 water soluble tetrazolium(WST)을 이용한 cell proliferation assay를 실시하여 평가하였다. 96-well 배양 용기에 1X10⁶ cells/mL의 농도로 희석한 B16F10 세포액을 분주하여 24시간 동안 배양하여 부착 및 안정화 시킨 후, 분획물을 농도별(0, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 μ g/mL)로 처리하여 24시간 전배양 하였다. 배양이 끝난 후 EZ-Cytox WST assay

reagent(Dogenbio Co., Ltd., Seoul, Korea)를 각 well에 10 μ L씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건에서 3시간 동안 반응시켜 ELISA Reader(Microplate absorbance spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. B16F10 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 측정

세포 내 활성산소의 농도 변화가 발생하는지 측정하기 위하여 형광 probe로 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma, USA)를 이용하였다. DCF-DA는 비형광물질로 세포 내 H $_2$ O $_2$ 와 같은 과산화물이 존재 할 때 ROS에 의해 산화되고 2,7-dichlorofluorescein로 탈에스틸화되어 형광을 띄게 된다(서승희 외, 2013). 96-well 배양 용기에 5 \times 10 4 cells/well의 농도로 B16F10 세포액을 분주하여 24시간 동안 부착 및 안정화 시킨 후, 125 μ g/mL 농도의 조팝나무 분획물과 24mM H $_2$ O $_2$ 를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 이후에 PBS로 세척하고, DCF-DA (20 μ M)를 첨가하여 30분간 반응시켜 Beckman Coulter DTX 800 Multimode Detector (Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 excitation 485nm, emission 535nm에서 DCF fluorescence를 측정해서 ROS의 변화량을 측정하였다.

7. 세포 내 항산화 효소 활성 측정(SOD와 catalase 활성)

조팝나무 분획물의 세포 내 항산화 효소의 활성을 평가하기 위하여 SOD와 catalase 활성을 측정하였다. 24-well 배양 용기에 1 \times 10 6 cells/mL 농도로 세포액을 분주하여 24시간 동안 부착 및 안정화 시킨 후, 125 μ g/mL 농도의 조팝나무 분획물 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS로 세척한 뒤, 24mM H $_2$ O $_2$ 를 30분간 처리한 후 다시 세척하였다. Trypsin EDTA(Gibco, Gland Island, NY, USA)를 이용하여 세포를 회수한 뒤 lysis buffer(0.1M Tris/HCl, pH 7.4, 0.5% triton X-100, 5mM β -Me, 0.1mg/mL phenylmethane sulfonyl fluoride) 200 μ L를 첨가한 후 3분 동안 초음파 처리하여 세포를 파쇄하고 균질화하였다. B16F10세포의 SOD 활성은 세포용액을 14,000g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 얻어 SOD activity assay kit(Biovision Inc.,

Milpitas, CA, USA)를 이용해 측정하였고, catalase 활성은 균질화시킨 세포용액을 1,000g에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 catalase activity colorimetric/fluorometric assay kit(Biovision Inc., Milpitas, CA, USA)를 이용해 측정하였다.

8. Single cell gel electrophoresis assay(comet assay)

24-well 배양 용기에 5 \times 10 5 cells/mL의 농도로 세포액을 분주하여 24시간 동안 부착 및 안정화 시킨 후, 125 μ g/mL 농도의 조팝나무 분획물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS로 세척하고 24mM H $_2$ O $_2$ 를 15분간 처리한 후 다시 PBS로 세척하고 trypsin EDTA(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 0.75% low melting agarose gel(LMA)과 섞어 0.5% normal melting agarose gel(NMA)이 미리 도포된 슬라이드에 분주하였다. 그 후 alkaline lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM Na $_2$ EDTA, 10mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에서 1시간, electrophoresis buffer (300mM NaOH, 1mM Na $_2$ EDTA, pH 13)에서 40분 동안 암실에서 정치시킨 후, 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4M Tris buffer(pH 7.5)에서 세척 및 DNA를 20 μ g/mL ethidium bromide로 염색하여 light microscope(DM 2000, Leica Co., Wetamar, German)을 이용하여 관찰하였다. 분석은 Komet 5.5 image analyzing system(Andor Co., Nottingham, UK)를 이용하여 각 샘플마다 50개의 DNA를 무작위로 선택하여 분석하였다. DNA손상 정도는 핵으로부터 이동하여 퍼져나간 DNA의 분율(tail-DNA, %)과 DNA과편의 길이(tail length), tail-DNA와 tail length를 곱한 값인 tail moment로 나타내었다.

9. 통계분석

실험 결과에 대한 분석은 SPSS/Windows 24.0(Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계분석을 실시하였고 모든 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 각 군간 평균값의 차이는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA) 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 α = 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 조팝나무 70% 에탄올 추출물의 수율

조팝나무 70% 에탄올 추출물의 수율은 3.72%이었다. 용매추출은 일반적으로 추출온도가 높아질수록 추출효율이 증가하지만(정문호, 최용희, 1990) 에탄올 비등점 이상에서 환류추출은 시료의 항산화 효능에 영향을 미치게 되므로 비등점 이하에서 용매추출하였다. 조팝나무는 함경도를 제외한 전국에서 자생하고 있으며 생육도 순조롭기 때문에 쉽게 구할 수 있고 가을에 가지 등을 채취하기가 쉬우므로 이러한 방법의 추출이 비록 수율은 높지 않지만 경제적이고 대량생산이 가능하여 항산화능이 있는 소재의 개발과정에서는 의의가 있다고 볼 수 있다<표 1>.

2. 조팝나무 분획물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성

조팝나무 분획물의 항산화 활성을 알아보기 위하여 수행한 실험 결과는 <표 2>과 같다. 조팝나무 분획물들의

총 폴리페놀 함량을 측정된 결과, SP 60군(304.77±0.31 mgGAE/g)의 총 폴리페놀 함량이 가장 높았고, 그 다음으로 SP 30(300.14±0.30mgGAE/g) > SP 80(217.18±0.22 mgGAE/g) > SP 100(74.22±0.07 mgGAE/g) > SP 0(23.11±0.02mgGAE/g) 순서로 폴리페놀 함량이 높았다. 본 연구의 조팝나무와 유사한 장미과에 속하는 참조팝나무(*Spiraea fritschiana* Schneid)의 지상부의 메탄올 분획물에서는 폴리페놀 함량이 212.78µgGAE/mg으로 측정되어(최은영 외, 2016; 현선희 외, 2007), 본 연구의 SP 60과 SP 30 분획물의 폴리페놀 함량이 더 높음을 알 수 있었다. 추출식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물은 2차 대사산물의 하나로, 다양한 구조와 분자량을 가진다. 페놀성 물질은 phenolic hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물로 단백질, 거대분자와 같은 여러 화합물과 쉽게 결합하여 항산화 같은 생리활성을 나타내며, 암, 심장질환, 당뇨병 등에 대한 예방효과가 있는 것으로 보고되었다(정민숙 외, 2004; Azuma et al., 1999). 최문희, 신현재(2015), Kim et al.(2018)에 의하면 폴리페놀 함량은 항산화능과 양의 상관관계를 가지고 있어 폴리페놀 함량이 높을수록 항산화 활성이 높다고 보고하였다. 이전부터 대표

<표 1> 조팝나무 70% 에탄올 추출물의 수율

시료명	추출조건	중량(kg)	건조중량(g)	수율(%)
<i>Spiraea prunifolia</i> var. <i>simpliciflora</i>	70% EtOH	6.8	253.3	3.72

<표 2> 조팝나무 분획물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성

실험군	총 폴리페놀 (mgGAE/g) ¹⁾	IC ₅₀ (mg/mL) ²⁾		FRAP 값 (mgISHE/g) ³⁾
		DPPH 라디칼 소거능	ABTS 라디칼 소거능	
SP 0	23.11±0.02 ^{4,5)a}	5.45±0.48 ^b	34.31±8.14 ^b	49.05±1.54 ^a
SP 30	300.14±0.30 ^d	0.06±0.00 ^a	0.44±0.01 ^a	517.5±12.8 ^c
SP 60	304.77±0.31 ^d	0.03±0.00 ^a	0.37±0.00 ^a	1269.88±12.01 ^d
SP 80	217.18±0.22 ^c	0.08±0.01 ^a	0.45±0.02 ^a	520.57±10.47 ^c
SP 100	74.22±0.07 ^b	0.08±0.00 ^a	2.57±0.05 ^a	486.23±8.88 ^b

¹⁾GAE: 갈산 당량.

²⁾라디칼을 50% 소거할 수 있는 시료의 양, 단위는 mg/mL.

³⁾ISHE: 황산철 당량(FeSO₄·7H₂O).

⁴⁾모든 결과는 평균±표준편차로 나타냄(반복수=3).

⁵⁾위첨자(a-d)를 공유하는 실험군 간에는 차이가 없음을 나타냄(p<0.05).

적인 항산화 활성 물질로 이용되고 있는 ascorbic acid, catechin, α -tocopherol과 같은 천연 항산화제, butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxy-toluene(BHT) 등의 합성 항산화제가 있지만, 합성 항산화제는 생체에서 일으키는 부작용 등의 안전성 논란이 있어 식품 및 의약품에의 사용이 규제되었다(최석영, 양규환, 1982). 따라서 본 실험의 소재인 조팝나무 분획물은 항산화능이 높을 것으로 예측되므로 식품 및 의약품에 항산화제로서 적용이 가능할 것으로 사료된다.

조팝나무 분획물들의 항산화 활성을 측정하기 위한 다양한 분석 방법 중 일반적으로 이용되는 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀값은 SP 0(5.45±0.48mg/mL), SP 30(0.06±0.00 mg/mL), SP 60(0.03±0.00mg/mL), SP 80(0.08±0.01 mg/mL), SP 100(0.08±0.00mg/mL)으로 SP 60군에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다. IC₅₀값으로 나타낸 ABTS 라디칼 소거능은 SP 0~SP 100 까지 각각 34.31±8.14mg/mL, 0.44±0.01mg/mL, 0.37±0.00mg/mL, 0.45±0.02mg/mL, 2.57±0.05mg/mL 으로 DPPH 라디칼 소거능과 마찬가지로 SP 60군이 가장 높은 소거능을 나타냈다. 조팝나무 분획물 중 폴리페놀 함량이 가장 높았던 SP 60의 DPPH 라디칼 소거능은 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid(0.02±0.00mg/mL)와 유사하였고 ABTS 라디칼 소거능은 ascorbic acid(0.08±0.00mg/mL)에 비하여 1/4 ~1/5 정도의 효능을 나타냈다. 따라서 조팝나무 분획물 중 SP60은 상당히 높은 항산화 활성을 지니고 있다고 사료된다. 이준영 등(2014)의 장미과 식물 줄기의 항산화 활성 연구에서 가장 우수한 항산화 활성을 보인 쉬

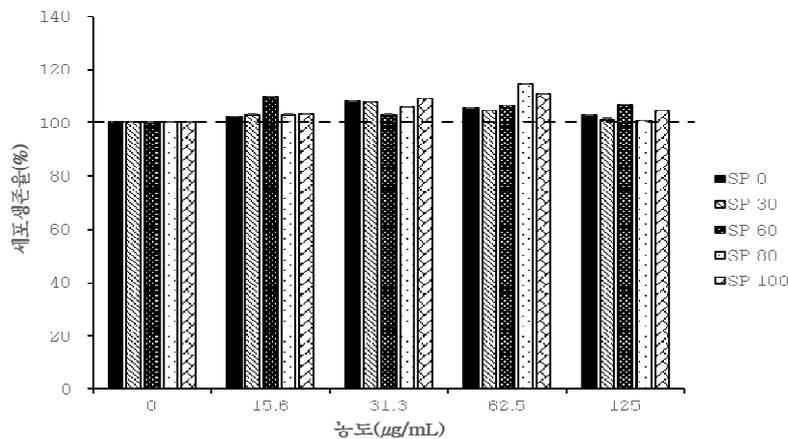
땅나무 줄기 추출물의 라디칼 소거능은 RC₅₀값(DPPH: 0.47±0.03mg/mL, ABTS: 0.52±0.05mg/mL)를 보여 본 연구에서 사용한 조팝나무 분획물들은 유사한 식물들에 비해서도 훨씬 높은 항산화 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

또한 ferric tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ)복합제가 환원제에 의해 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 철이온 환원력으로 항산화능을 평가하는 FRAP 값 (mgISHE/g)은 SP 0~SP 100 까지 각각 49.05±1.54mg ISHE/g, 517.5±12.8mg ISHE/g, 1269.88±12.01mg ISHE/g, 520.57±10.47mg ISHE/g, 486.23±8.88mg ISHE/g 으로 역시 SP 60군의 FRAP 값이 다른 군들 보다 유의하게 높았다(p<0.05).

이와 같은 결과들을 종합하여 볼 때 조팝나무 분획물들의 우수한 항산화 효능을 확인할 수 있었으며 이중 특히 SP 60군이 가장 우수한 것을 알 수 있었다.

3. 조팝나무 분획물의 세포 독성 평가

조팝나무 분획물이 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포 배양 후 조팝나무 분획물을 0, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 μ g/mL 농도로 첨가한 후 24 시간 동안 배양 한 뒤, WST(water soluble tetrazolium salts) assay를 실시한 결과는 [그림 2]와 같다. So et al. (1999)의 연구에 의하면 조팝나무 메탄올 추출물을 RAW 264.7 세포에 48시간 처리하였을 때 200 μ g/mL 농도까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않아, 저농도에서의 조팝나무 추출물은 비교적 세포에 안정한 추출물이라고 보



[그림 2] 조팝나무 분획물 처리 후 세포 생존율

고하였다(So et al., 1999). 본 연구 결과, 조팝나무 분획물 모두에서 125µg/mL 까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였으며 이 결과를 바탕으로 이후 B16F10 세포 대상 항산화 효능평가는 모든 분획물의 농도 125µg/mL 에서 진행하였다.

4. 조팝나무 분획물의 ROS 억제능

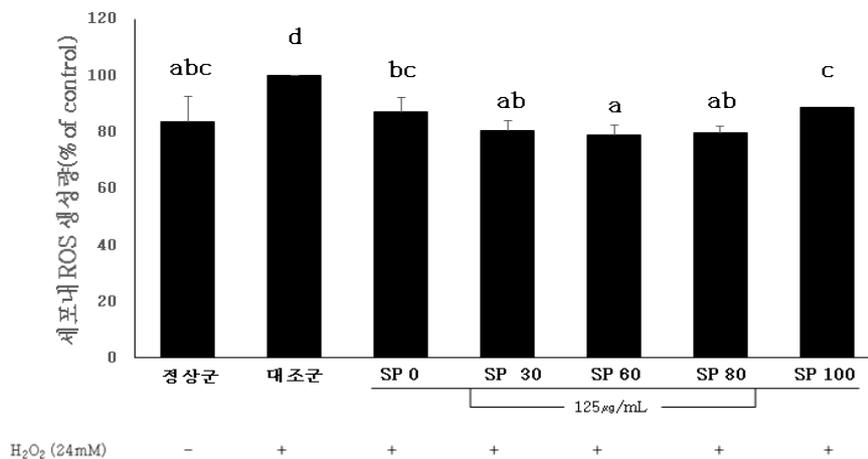
인체 내 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 노화의 발병과 진행에 큰 영향을 미치며, 특히 피부의 노화를 촉진시킨다(Sander et al., 2002). 세포가 산화적 스트레스를 받게 되면 세포질 내의 효소작용에 의해 ROS가 생성되고 생체의 항산화 기전이 작동되거나 ROS가 과도하게 생성되어 미처 처리되지 못하면 과잉의 ROS가 조직을 손상시키고 대사변화를 일으킨다(Fridlyand, Philipson, 2005). H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 B16F10 세포에서 조팝나무 분획물의 ROS 억제능을 측정한 결과는 [그림 3]과 같다. B16F10 세포에 산화적인 스트레스를 주기 위하여 배양액에 H₂O₂를 처리한 결과 산화적인 스트레스를 유발하지 않은 세포(정상세포군)에 비해 ROS 생성량이 16% 증가하였다. H₂O₂와 함께 분획물들 SP 0, SP 30, SP 60, SP 80, SP 100을 125µg/mL 의 농도로 배양액에 처리하였을 때 H₂O₂만 처리하고 분획물을 처리하지 않은 군(대조군)에 비해 ROS 생성량이 유의하게 감소하였다 (p<0.05). 각 분획물 처리시 그 효과는 조금씩 다르게 나타났다는데, 대조군에 비하여 ROS생성량이 SP 0군은 13%,

SP 100군 11%, SP 30과 SP 80 군의 경우 20%, 그리고 SP 60군에서는 21% 감소하였다. 이중 가장 억제효과가 높았던 분획물인 SP 60 처리 시 ROS 생성량은 H₂O₂로 산화적 스트레스를 주지 않은 정상군과 거의 차이가 없는 수준으로 강력한 세포보호효과를 확인할 수 있었다. 심미옥 외(2017)는 조팝나무 뿌리의 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 125µg/mL 의 농도에서 유의하게 억제효과를 보였다고 보고하여 소재와 추출방법, 실험한 세포주 간에 차이가 있으나, 조팝나무는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과를 보유하는 성분을 보유하는 것으로 볼 수 있다.

5. 조팝나무 분획물의 항산화 효소 활성

인체는 산화적 스트레스로 인한 조직의 손상을 보호하기 위한 보호체계로서 항산화 체계를 가지고 있고, 활성산소를 조절하기 위하여 SOD, catalase, glutathione등의 항산화 효소를 갖는다(김은혜, 이동권, 2009). SOD는 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 치환시키고, 이는 catalase와 glutathione peroxidase(GSH-Px)에 의해 분해된다. 분해되지 않은 활성산소는 hydroxyl radical로 전환되어 DNA, 세포내 단백질, 세포막들에 손상을 야기하여 노화를 유발한다(김지현 외, 2008; Fridovich, 1978; Guemouri et al., 1991).

조팝나무 분획물의 항산화 효소 활성을 확인하기 위해 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 B16F10 세



[그림 3] H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 B16F10 세포에서 조팝나무 분획물(SP 0 ~ 100) 처리에 의한 활성산소종(ROS) 생성량. 위첨자(a-d)를 공유하는 실험군 간에는 차이가 없음을 나타냄(p < 0.05).

포에 조팝나무 분획물 처리 후 SOD와 catalase 활성을 측정 한 결과는 <표 3>와 같다. SOD 활성을 측정한 결과, H₂O₂만 처리한 대조군의 SOD 활성(13.66±4.78U/mL)은 정상군(17.53±1.63U/mL)에 비하여 약 22% 감소하였으며(p<0.05), 분획물들을 125µg/mL의 농도로 H₂O₂와 함께 처리한 군들의 SOD 활성은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고 정상군 보다는 약 5% 낮은 값을 나타내었다 (SP 0, SP 30, SP 60, SP 80, SP 100 군 각각 16.20±1.59 U/mL, 16.27±2.65U/mL, 16.27±1.53U/mL, 16.13±2.59 U/mL, 15.60±2.63U/mL).

Catalase 활성을 측정한 결과, H₂O₂만 처리한 대조군의 catalase 활성은 60.14±4.52nmol/min/mL로 정상군 (181.40±8.43nmol/min/mL)에 비하여 약 67% 감소하였다. 그러나 H₂O₂와 함께 조팝나무 분획물을 처리한 군들의 catalase 활성은 111.71~135.58nmol/min/mL 로 대조군에 비하여 모두 유의하게 높았고 활성은 정상군의 70% 수준으로 유의하게 증가하였다. 분획물들 중 활성이 가장 높게 측정된 분획물은 SP 30 이었고 그 다음은 SP 80와 SP 60이었으나 분획물 처리군 간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

따라서 B16F10 세포에 H₂O₂처리로 인하여 유도된 산화 스트레스에 대응하는 효소활성을 높여 활성산소를 처리하는 기능을 보인 조팝나무 분획물들은 산화적 스트레스를 완화시킬 수 있는 천연물 유래 항산화제로서의 가치가 있다고 볼 수 있다.

6. DNA 산화적 손상에 대한 보호효과

Comet assay는 세포수준에서의 DNA 손상에 대한 보호효과를 직접 확인할 수 있는 방법으로 DNA의 산화적 손상을 확인하는 연구에 많이 사용된다(Ostling & Johanson, 1984; Wasson et al., 2008). 조팝나무 분획물이 B16F10 세포에서 H₂O₂처리로 유도된 DNA 산화적 손상 억제 효과를 확인하고자 single cell gel electrophoresis assay(Comet assay)를 실시한 결과는 <표 4>과 같다. B16F10 세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 대조군은 정상군에 비하여 tail DNA (78.6%), tail length(87%), tail moment(96%)가 모두 유의하게 큰 폭으로 증가하였다(p<0.05). H₂O₂와 함께 처리한 조팝나무 분획물은 125µg/mL 농도에서 대부분 지표의 값을 낮추었다. 특히 H₂O₂만 처리한 대조군에 비하여 SP 60군의 tail DNA는 67.6%, tail length는 80.9%, tail moment는 91.4% 감소하여 DNA fragmentation이 정상군과 같은 수준으로 감소하였다(p<0.05). 이는 조팝나무 분획물이 강력한 항산화 기능으로 DNA 손상을 억제하여 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

이러한 결과는 비록 소재의 종류나 추출방법이 달라도 유사한 조팝나무의 항산화 효능을 검증한 최은영 외(2016)의 연구와 심미옥 외(2017)의 연구 결과를 뒷받침하는 결과라 할 수 있다.

<표 3> B16F10 세포에서의 항산화 효소 활성

실험군	SOD 활성(U/mL)	Catalase 활성(nmol/min/mL)
정상군	17.53±1.63 ^{1)2)c}	181.40±8.43 ^c
대조군	13.66±4.78 ^a	60.14±4.52 ^a
SP 0	16.20±1.59 ^{bc}	123.43±1.20 ^b
SP 30	16.27±2.65 ^{bc}	135.58±30.44 ^b
SP 60	16.27±1.53 ^{bc}	127.27±15.06 ^b
SP 80	16.13±2.59 ^{bc}	130.46±13.56 ^b
SP 100	15.60±2.63 ^{ab}	111.71±15.97 ^b

¹⁾모든 결과는 평균±표준편차로 나타냄(반복수=3).

²⁾위첨자(a-d)를 공유하는 실험군 간에는 차이가 없음을 나타냄(p<0.05).

〈표 4〉 B16F10 세포에서 DNA fragmentation

실험군	Tail DNA(%)	Tail length(μm)	Tail moment
정상군	3.53±0.43 ^{1)2)a}	4.86±0.50 ^a	0.41±0.08 ^a
대조군	16.52±1.25 ^f	38.05±2.56 ^d	10.35±1.28 ^c
SP 0	10.67±1.13 ^{de}	30.34±3.15 ^{bc}	7.50±1.28 ^{bc}
SP 30	6.68±0.68 ^{bc}	10.82±0.95 ^a	1.40±0.27 ^a
SP 60	5.35±0.59 ^{ab}	7.24±0.73 ^a	0.89±0.15 ^a
SP 80	8.30±0.87 ^{cd}	23.83±2.64 ^b	4.78±0.88 ^b
SP 100	11.86±1.17 ^c	34.04±4.13 ^{cd}	9.64±2.15 ^c

¹⁾모든 결과는 평균±표준편차로 나타냄.

²⁾위첨자(a-d)를 공유하는 실험군 간에는 차이가 없음을 나타냄(p<0.05).

IV. 요약 및 결론

본 연구는 조팝나무가 항산화 기능을 보유하는지 확인하고자 70% 에탄올 추출물을 물-에탄올 혼합물로 분획하여 얻은 5종 분획물(SP 0, SP 30, SP 60, SP 80, SP 100)의 항산화 효능을 평가하였다. 각 분획물의 총 폴리페놀 함량, DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 값을 측정하였으며 세포 수준에서의 항산화 기능을 확인하기 위하여 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도한 B16F10 세포에 병행처리하고 ROS 생성, SOD와 catalase 활성을 측정하였으며 DNA손상에 대한 방어효과를 확인하였다. 연구결과 조팝나무 분획물들의 총 폴리페놀 함량은 SP 0과 100에 비하여 SP 30, 60, 80이 유의하게 높았으며 DPPH나 ABTS 라디칼 소거능과 FRAP값도 SP 0에 비하여 다른 분획물들이 높았다. 특히 SP 60군에서는 총폴리페놀 함량이 304.77±0.31mg GAE/g 었고 DPPH 라디칼 소거능은 0.03±0.00mg/mL 로 양성대조군인 ascorbic acid와 유사하였고, ABTS 라디칼 소거능은 0.37±0.00mg/mL 으로 ascorbic acid의 1/4~1/5 수준으로 나타났다. FRAP 값은 1269.88±12.01mg ISHE/g 로서 SP 60은 다른 분획물에 비하여 월등히 높은 항산화능을 보여주었다. B16F10 세포에 조팝나무 분획물을 처리하였을 때 모두 125 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성이 나타나지 않았다. H₂O₂ 처리로 산화적 스트레스를 유도한 B16F10 세포에서 조팝나무 분획물들은 모두 ROS의 생성량을 유의하게 감소시켰고(p<0.05) SOD와 catalase의 효소 활성을 유의하게 높였으며

(p<0.05) 세포가 산화적 스트레스에 의해 DNA 손상이 일어나는 것을 유의하게 억제하여(p<0.05) 전반적으로 모든 지표에서 강력한 세포보호 효과를 보였다. 이러한 결과는 SP 60에서 가장 높게 나타났고 그 다음은 SP 80과 SP 30 순으로 나타났다.

이상의 결과들로 미루어 조팝나무 분획물, 특히 SP 60 군은 천연물 유래 항산화 소재로서 건강 기능 식품이나 천연 화장품의 원료로 유용하게 사용될 수 있다.

주제어: 조팝나무, 항산화능, B16F10 세포

REFERENCE

- 김은혜, 이동권(2009). 인삼의 항산화 작용. *고려인삼학회지*, 33(1), 1-7.
- 김지은, 배수미, 남유리, 배은영, 이선영(2019). 클로로필을 제거한 영하구기엽 에탄올 추출물의 항산화 활성. *한국영양학회지*, 52(1), 26-35.
- 김지현, 손인숙, 김정상, 김기훈, 권정숙(2008). 상황버섯 자실체 메탄올 추출물과 분말의 지방소화효소 억제 및 항산화 활성. *한국식품영양과학회지*, 37(2), 154-161.
- 박수남(1997). 피부노화와 항산화제, *대한화장품학회지*, 23(1), 75-132.
- 배지영, 이창훈, 안미정, 박종희(2012). 민간약 「조팝나

- 무」의 생약학적 연구. *생약학회지*, 43(3), 193-197.
- 서승희, 최미옥(2013). Hydrogen peroxide로 산화적 스트레스가 유도된 HaCaT keratinocyte에서 금은화의 세포 보호 효과. *대한분초학회지*, 28(4), 57-62.
- 심미옥, 이현주, 장지훈, 이효은, 정호경, 김태목, 노종현, 정자균, 정다운, 조현우(2017). 조팝나무 뿌리 열수 추출물이 RAW264.7 세포에서 미치는 항산화 및 항염증 활성. *한국자원식물학회지*, 30(4), 335-342.
- 오선민, 최두진, 김형근, 이재원, 이영섭, 이정훈, 이승은, 김금숙, 백남인, 이대영(2018). 조팝나무로부터 분리한 페놀 화합물의 신경세포 보호효과. *한국응용생명화학학회지*, 61(4), 397-403.
- 이은희, 정순옥, 김종원, 우미희(1996). 조팝나무 뿌리의 성분 연구. *한국생약학회지*, 27(4), 389-396.
- 이준영, 유주한, 김상욱(2014). 장미과 식물 줄기의 항산화 효과와 총 페놀류 함량에 관한 연구. *한국환경과학회지*, 23(12), 2129-2134.
- 정민숙, 이건순, 채희정(2004). 무 에탄올 추출물의 in vitro 생리활성 분석. *한국응용생명화학학회지*, 47(1), 67-71.
- 정문호, 최용희(1990). 보리차 및 결명자차의 추출조건의 변화에 따른 추출량 및 추출속도 예측 모델. *경북대농학지*, 8, 95-106.
- 최문희, 신현재(2015). 국산 블루베리 착즙액의 항산화 활성 및 멜라닌생성 저해효과. *대한피부미용학회지*, 13(2), 261-266.
- 최석영, 양규환(1982). 항산화제 BHT와 BHA의 안전성. *한국식품과학회지*, 14(3), 283-288.
- 최은영, 허성일, 권용수, 김명조(2016). 참조팝나무 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과. *한국약용작물학회지*, 24(1), 31-37.
- 현선희, 정성근, 좌미경, 송창길, 김지훈, 임상빈(2007). 제주 자생식물로부터 항산화 및 화장품 기능성 소재 탐색. *한국식품과학회지*, 39(2), 200-208.
- 형인혁, 문상은, 배성수(2006). 활성산소에 대한 고찰. *대한물리의학회지*, 1(1), 139-146.
- 홍재기(2009). 활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰. *대한피부미용학회지*, 7(2), 51-62.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H., & Higashio, H. (1999). Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(10), 3963-3966.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Coleman, M. D., Fernandes, S., & Khanderia, L. (2003). A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C and α -lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methemoglobin formation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14(1-2), 69-75.
- Curtin, J. F., Donovan, M., & Cotter, T. G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265(1-2), 49-72.
- Fellegrini, N., Ke, R., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*, 299, 379-389.
- Folin, O., & Denis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, 12(2), 239-243.
- Fridlyand, L. E., & Philipson, L. H. (2005). Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann N Y Acad Sci*, 1066(1), 136-151.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Journal of Science*, 201(4359), 875-880.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C.,

- Cuny, G., & Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Journal of Clinical Chemistry*, 37(11), 1932-1937.
- Kim, H. C., Moon, H. G., Jeong, Y. C., Park, J. U., & Kim, Y. R. (2018). Anti-oxidant, skin whitening, and antibacterial effects of *Canavalia gladiata* extracts. *Medical Biological Science and Engineering*, 1(1), 11-17.
- Lee, W., Kim, A., & Kim, S. J. (2003). The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Journal of Food Science and Industry*, 36(3), 2-14.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
- Sander, C. S., Chang, H., Salzman, S., Müller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2002). Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 618-625.
- Shim, E., Song, E., Choi, K.S., Choi, H., & Hwang, J. (2017). Inhibitory effect of *Gastrodia elata* Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma. *Nutrition Research and Practice*, 11(3), 173-179.
- So, H. S., Park, R., Oh, H. M., Pae, H. O., Lee, J. H., Chai, K. Y., Chung, S. Y., & Chung, H. T. (1999). The methanol extract of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* root inhibits the generation of nitric oxide and superoxide in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3), 209-217.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Wasson, G. R., McKelvey-Martin, V. J., & Downes, C. S. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*, 23(3), 153-162.

Received 15 November 2019;

1st Received 04 December 2019;

Accepted 18 December 2019