

산지별 곰취 에탄올 추출물의 항산화 효능

이재연 · 조영락 · 안은경 · 서찬곤 · 김진규 · 서동완¹ · 오좌섭^{1*}
(재)경기과학기술진흥원 바이오센터, ¹단국대학교 약학대학

Anti-oxidant Effect of *Ligularia fischeri* Ethanol Extracts from District Areas in Korea

Jae Yeon Lee, Young-Rak Cho, Eun-Kyung Ahn, Chan Gon Seo,
Jin-Kyu Kim, Dong-Wan Seo¹, and Joa Sub Oh^{1*}

Bio-center, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion
¹College of Pharmacy, Dankook University

Abstract

Ligularia fischeri (LF) (Ledebour) Turczaninow (Compositae) has been used as a medicine to treat erysipelas, scarlet fever, and rheumatic arthritis in traditional eastern Asia including Korea, China, and Japan. In this study, we investigated the anti-oxidant effect of LF using a variety of *in vitro* systems, DPPH, ABTS, and ORAC. To assess and compare the anti-oxidant effect and production places of LF, the ethanolic extract of LF from different places in Korea (Taebaek, Jeongseon, Yanggu, Pyeongchang, and Inje) were prepared. However, only the extract from Inje-county did have anti-oxidant activity, while other extract had little or no anti-oxidant activity. In addition, the compounds of LF ethanolic extract from Inje-area, such as chlorogenic acid, neochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid C were investigated in the same analysis. Isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C were the best effect of anti-oxidant among these compounds. Taken together, these findings provide the first description of anti-oxidant activities of LF from different production places in Korea, and suggest that LF from Inje-area has anti-oxidant effect.

Key words: *Ligularia fischeri*, DPPH, ABTS, ORAC, anti-oxidant activity

서 론

최근 우리나라는 평균수명의 연장과 함께 고령화 사회가 급속히 진행되면서 건강한 삶과 질병 치료에 대한 관심이 높아지고 있다(Lee et al., 2003; Jin et al., 2012; Na et al., 2013). 특히 버섯, 청국장, 김치 등의 식품들이 다양한 생리활성 조절을 통하여 건강과 질병 예방에 도움을 주고 있는 것으로 보고되면서 천연물소재에 대한 의약품 및 기능성 제품 원료로의 연구가 더욱 활발해 지고 있다(Jung et al., 1995; Jeong et al., 1995; Kim et al., 1996; Kang et al., 2009; Link et al., 2010).

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 단백질, 당, 지질 및 DNA 등의 비가역적 파괴로 인한 만성 염

증질환, 뇌졸중 및 심장질환 등이 보고되면서 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있다. 하지만 다양한 합성 항산화제의 부작용이 보고 되면서 천연물 유래의 항산화제에 관한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Song et al., 2002). 항산화 활성 측정 기법으로는 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 법(Blois, 1958), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)법(Rice-Evans & Miller, 1994), oxygen radical absorbance capacity (ORAC)법(Ghiselli et al., 1995) 등이 개발되어 있으며 널리 사용되고 있다.

곰취(*Ligularia fischeri*)는 국화과 곰취속에 속하는 여러 해살이 풀로써 예로부터 우리나라와 중국, 일본 등의 동아시아 지역에서 식용뿐만 아니라 전통 의약품으로 사용하였으며, 진해, 거담, 진통 및 혈액순환에 효과가 있는 것으로 보고되면서 의약품 및 건강기능성 제품의 원료로 연구가 진행되고 있다. 최근에는 곰취의 다양한 생리활성 물질들이 항산화(Choi, 2007; Shang et al., 2010), 항염(Hwang et al., 2002; Choi & Kim, 2008; Kim et al., 2011), 항비만(Cha et al., 2012) 효과를 지닌다고 보고하였으며, Cho et al. (2013)은 곰취 추출물이 epidermal growth factor

*Corresponding author: Joa Sub Oh, College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandae-ro, Cheonan 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-1435; Fax: +82-41-559-7899
E-mail: jsroh@dankook.ac.kr

Received June 8, 2015; revised July 30, 2015; accepted September 3, 2015

receptor (EGFR)와 integrin의 발현 조절을 통하여 폐암 세포주의 증식과 이동을 조절한다고 보고하였다. 그러나 국내 재배 지역에 따른 곰취의 생리활성에 차이가 있는지에 대한 과학적 자료 및 증거는 확보되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식용으로 사용하는 곰취를 국내 산지별(태백, 정선, 양구, 평창, 인제)로 수집하여 항산화 효과를 평가하였으며, 곰취의 활성성분 분리를 통한 항산화 효능 평가를 통하여 산지별 곰취의 항산화 효능에 대한 탐색 및 소재 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용된 곰취(*Ligularia fischeri*)는 2012년 5월 강원도 태백, 정선, 양구, 평창, 인제군에서 채취하여 음건 후 추출물 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

표준품 isochlorogenic acid B와 isochlorogenic acid C (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., Chengdu, China)는 순도 98% 이상을 구입하여 사용하였고, 용매는 특급 및 1급 시약을, column chromatography용 Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden), Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Corporation, Tokyo, Japan)을 사용하였다. TLC plate는 pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 발색 시약은 10% H₂SO₄을 사용하였으며 UV 흡광도는 254 nm, 365 nm에서 확인하였다. HPLC는 HPLC 1200 series (Agilent Technologies, San Diego, CA, USA)와 prep-HPLC (LC-8A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 NMR spectra는 700 MHz NMR spectrometer (Avance 700, Bruker, Fallanden, Switzerland)를, 그리고 MS는 Finnigan TSQ Quantum mass spectrometer (TSQ Quantum, Thermo, Watertown, MA, USA)를 각각 이용하여 측정하였다.

추출 및 분리정제

곰취(*Ligularia fischeri*) 3 kg에 50% EtOH (20 L)로 24 시간 2회 냉침 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 감압농축기를 이용하여 50% 에탄올 추출물 750 g을 얻었으며, 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane (0.76 g), CH₂Cl₂ (0.38 g), ethyl acetate (EtOAc, 1.32 g) 및 n-BuOH (3.75 g)로 용매 분획 후 동결건조하였다. EtOAc 분획물 (1.32 g)은 용리용매로 100% H₂O, MeOH (20%, 40%, 60%, 80%, 100%)을 사용하여 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피를 실시하여 6개의 소분획(G49-1~6)으로 분취하였다. G49-2 (92.5 mg) 분획물은 CH₃CN (10% → 100%,

0.1% TFA)을 이동상으로 prep-HPLC를 시행하여 화합물 1 (7.3 mg)과 2 (3.3 mg)를 분리하였으며 G49-3 (78.3 mg)은 CH₃CN (30% → 100%, 0.1% TFA)을 이동상으로 prep-HPLC를 실시하여 화합물 3 (11.5 mg), 4 (8.7 mg) 및 5 (8.7 mg)를 분리하였다. 또한, BuOH 분획물(790 mg)은 H₂O-MeOH (2:1, v/v)을 이동상으로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 화합물 5 (26.0 mg)를 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR 및 ESI-MS data로 확인 후 기존의 문헌과 비교하여 규명하였다.

Chlorogenic acid (1)

¹H-NMR (700 MHz, MeOH-*d*₄) (caffeoyl group): δ 7.42 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'), 7.03 (1H, s, H-2'), 6.98 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.15 (H, d, *J*=16 Hz, H-8'), (quinic group): 5.06 (2H, m, H-3), 3.92 (1H, s, H-5), 3.42 (1H, s, H-4), 2.03-1.77 (2H, H-2,6); ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 176 MHz) δ 175 (COOH), 165.8 (C-9'), 148.4 (C-4'), 145 (C-3'), 145.6 (C-7'), 125.6 (C-1'), 121.4(C-6'), 115.8 (C-5'), 114.8 (C-8'), 114.3 (C-2'), 73.5 (C-1), 70.9 (C-4), 70.3 (C-5), 68 (C-3), 37.2 (C-2), 36.2 (C-6), ESI-MS (negative mode) m/z 179 [M-H]⁻.

Neochlorogenic acid (2)

¹H-NMR (700 MHz, MeOH-*d*₄) (caffeoyl group): δ 7.46 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'), 7.02 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.97 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.20 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8'), (quinic group): 5.17 (2H, m, H-3), 3.86 (1H, dd, *J*=12.4 Hz, H-5), 3.54 (1H, dd, *J*=4.0 Hz, H-4), 2.02-1.85 (2H, H-2,6); ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 176 MHz) δ 176 (COOH), 166.1 (C-9'), 148.1 (C-4'), 144.3 (C-3'), 145.5 (C-7'), 125.7 (C-1'), 121.1 (C-6'), 115.8 (C-5'), 115 (C-8'), 114.6 (C-2'), 72.9 (C-1), 71.2 (C-4), 71 (C-3), 67.2 (C-5), 39.5 (C-6), 35.1 (C-2). ESI-MS (negative mode) m/z 179 [M-H]⁻.

Isochlorogenic acid A (3)

¹H-NMR (700 MHz, MeOH-*d*₄) (caffeoyl groups); δ 7.62 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-3'), 7.57 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-3'), 7.07 (1H, d, *J*=1.70 Hz, H-5'), 7.07 (1H, d, *J*=1.7 Hz, H-5'), 6.98 (1H, dd, *J*=1.7, 8.2 Hz, H-9'), 6.96 (1H, dd, *J*=1.7, 8.2 Hz, H-9'), 6.78 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-8'), 6.78 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-8'), 6.35 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-2'), 6.26 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-2) (quinic acid moiety); 5.43 (1H, ddd *J*=3.2, 3.9, 7.1 Hz, H-5), 5.38 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, dd, *J*=3.2, 7.4 Hz, H-4), 2.32 (1H, dd, *J*=3.9, 13.8 Hz, H-6a), 2.25 (2H, m, H-2), 2.17 (1H, dd, *J*=7.1, 13.8 Hz, H-6b); ¹³C-NMR (176 MHz, MeOH-*d*₄):

(caffeoyl groups); δ 177.5 (C-7), 169.0 (C-1'), 168.5 (C-1'), 149.8 (C-7'), 149.7 (C-7'), 147.4 (C-3'), 147.2 (C-3'), 147.0 (C-6'), 147.0 (C-6'), 128.1 (C-4'), 128.0 (C-4'), 123.2 (C-9'), 123.1 (C-9'), 116.6 (C-8'), 116.6 (C-8'), 115.8 (C-2'), 115.4 (C-5'), 115.3 (C-5'), 115.3 (C-2') (quinic acid moiety); 74.8 (C-1), 72.7 (C-5), 72.3 (C-3), 70.8 (C-4), 38.0 (C-2), 36.1 (C-6). ESI-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻.

Isochlorogenic acid B (4)

¹H-NMR (700 MHz, MeOH-*d*₄): δ : 7.59 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7"), 7.56 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2"), 7.04 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-6'), 6.93 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-6"), 6.78 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5"), 6.30 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8"), 6.27 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8'), 5.65 (1H, dt, $J=12.6, 7.2$ Hz, H-3), 5.05 (1H, dd, $J=10.8, 3.6$ Hz, H-4), 4.34 (1H, dt, $J=6.0, 3.6$ Hz, H-5), 2.14~2.36 (4H, m, H-2, 6); ¹³C-NMR (176 MHz, MeOH-*d*₄) (caffeoyl groups); δ 178.0 (C-7), 167.1 (C-1'), 167.0 (C-1'), 148.2 (C-7'), 148.2 (C-7'), 145.9 (C-3'), 145.4 (C-3'), 141.5 (C-6'), 141.5 (C-6'), 126.3 (C-4'), 126.3 (C-4'), 121.8 (C-9'), 121.8 (C-9'), 115.0 (C-8'), 115.0 (C-8'), 113.8 (C-2'), 113.8 (C-5'), 113.5 (C-5'), 113.5 (C-2') (quinic acid moiety); 76.5 (C-1), 75.3 (C-5), 70.4 (C-3), 66.0 (C-4), 41.8 (C-2), 37.2 (C-6). ESI-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻.

Isochlorogenic acid C (5)

¹H-NMR (700 MHz, MeOH-*d*₄): δ : 7.62 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7"), 7.53 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7'), 7.04 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2"), 7.02 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-6'), 6.93 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-6"), 6.77 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5"), 6.30 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8"), 6.21 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8'), 5.13 (1H, dd, $J=7.8, 3.2$ Hz, H-4), 4.38 (1H, q, $J=3.2$ Hz, H-3), 2.10~2.33 (4H, m, H-2, 6); ¹³C NMR (176 MHz, MeOH-*d*₄) (caffeoyl groups); δ 175.6 (C-7), 167.1 (C-1'), 166.8 (C-1'), 148.3 (C-7'), 148.3 (C-7'), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-3'), 145.3 (C-6'), 145.3 (C-6'), 126.3 (C-4'), 126.2 (C-4'), 121.7 (C-9'), 121.7 (C-9'), 115.1 (C-8'), 115.1 (C-8'), 113.7 (C-2'), 113.7 (C-5'), 113.3 (C-5'), 113.3 (C-2') (quinic acid moiety); 74.7 (C-1), 74.4 (C-5), 68.0 (C-3), 67.6 (C-4), 38.0 (C-2), 37.0 (C-6). ESI-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻.

항산화 성분의 정량분석

검체는 지역별 곰취 추출물 약 12 mg을 취해 50% EtOH을 가하여 10 mL로 조제하였다. 표준품은 isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C 각각 1.4 mg, 3.5 mg을 취해 50% EtOH에 녹여 25 mL로 표준원액을 조제한 후 표준원액 5 mL를 취해 50% EtOH을 가하여 25 mL로 희석하여 분석하였다.

HPLC의 분석조건으로는 칼럼은 Kromasil 100-5C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) (Eka Chemicals AB, Bohus, Sweden), 검출기는 UV detector 330 nm로 하였다. 이동상은 용매 A (0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 water)와 용매 B (ACN)를 기울기 용리(0-20 min, 90% A: 10% B; 20-30 min, 82% A: 18% B; 30-64 min, 82% A: 18% B)로 실시하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Ozgen et al. (2006)과 Lee et al. (2014)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별로 희석한 산지별 곰취 EtOH 추출물 및 인제산 곰취 compound 100 μ L에 MeOH에 용해시킨 200 μ M DPPH 용액 100 μ L를 넣어서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. ELISA reader (SPECTRAMax 190PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 산지별 곰취 EtOH 추출물과 인제산 곰취 compound의 IC₅₀ 값을 구해 평가하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Miller et al. (1993)과 Lee et al. (2014)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS (Sigma, St. Louis, MO, USA)용액과 2.45 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈) (Sigma, St. Louis, MO, USA)용액을 ABTS: K₂S₂O₈=2:1로 섞은 후 12-16시간 차광하여 반응시켜 양이온 (ABTS⁺)을 형성시키고 734 nm에서 흡광도의 값이 1.35 \pm 0.05이 나오도록 희석하였다. 희석된 용액 100 μ L와 농도별로 희석한 산지별 곰취 EtOH 추출물 및 인제산 곰취 compound 100 μ L를 상온에서 6분간 반응시키고 ELISA reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 항산화제인 BHA를 사용하였고, 산지별 곰취 EtOH 추출물과 인제산 곰취 compound에 대한 IC₅₀ 값을 구해 평가하였다.

ORAC 측정

ORAC value는 Ou et al. (2002)과 Lee et al. (2014)의 방법을 변형하여 ORAC activity assay kit (Cell Biolabs #STA-345, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. Antioxidant standard인 trolox를 농도별로 희석하여 96

well plate에 25 µL를 넣고 1×Fluorescein solution을 각 well 마다 150 µL씩 넣어 잘 섞은 후, 37°C에서 30분 배양하였다. Free radical initiator solution을 각 well 마다 25 µL씩 넣고 잘 섞은 뒤 excitation (480 nm)과 emission (520 nm)으로 37°C에서 60분간 2분 간격으로 30번 fluorescence의 감소율(Victor3 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, Hubbardston, MA, USA)을 측정하였다. 결과 값은 산지별 곰취 EtOH 추출물과 인제산 곰취 compound 첨가와 blank의 area under curve (AUC)값을 나타낸 후 trolox를 이용하여 작성한 검량선에 대입하여 나타내었다.

$$AUC = 1 + RFU_1/RFU_0 + RFU_2/RFU_0 + \dots + RFU_{59}/RFU_0 + RFU_{60}/RFU_0$$

RFU₀ = relative fluorescence value of time point zero

RFU_x = relative fluorescence value of time points

Net AUC (Area under the curve)

= AUC (antioxidant) – AUC (blank)

통계 처리

본 시험에서 얻은 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시한 후, 유의성이 인정될 경우 Dunnett's t-test를 실행하여 통계학적 유의성을 검정하였다. p<0.05인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였고, SPSS 14.0 통계프로그램(Spss Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다(*p<0.05; **p<0.01).

결과 및 고찰

산지별 곰취 50% EtOH 추출물의 항산화 활성

산지별(태백, 정선, 양구, 평창, 인제) 곰취 50% EtOH 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위해 DPPH, ABTS 그리고 ORAC assay를 수행하였다. DPPH에 의한 항산화 활성 측정 방법은 항산화 물질의 전자공여능으로 방향족 화합물과 아민류 등이 환원되는 것을 지표로 하여 항산화 활성과 free radical 소거능을 측정하는 원리로 가장 널리 이용된다(Blois, 1958; Bondet et al., 1997). 산지별 곰취 50% EtOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성능을 측정할 결과, Fig. 1에서와 같이 인제산 곰취 EtOH 추출물의 농도에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것이 확인되었고, 100 µg/mL 보다는 오히려 50 µg/mL의 농도에서 가장 높은 71.77%의 소거능이 관찰되었으며, DPPH 소거 활성능에 대한 IC₅₀값은 22.53 µg/mL로 측정되어 다른 산지별 곰취 추출물보다 높은 항산화 효능이 관찰되었다. ABTS 라디칼 소거능은 폐놀성 화합물을 함유한 시료의 첨가로 인해 ABTS가 산화되어 라디칼 양이온인 ABTS⁺가

Sample	IC ₅₀ (µg/ml)
Taebaek LF 50% EtOH	>100
Jeongseon LF 50% EtOH	>100
Yanggu LF50% EtOH	70.68
Pyeongchang LF 50% EtOH	>100
Inje LF 50% EtOH	22.53**
BHA	18.16

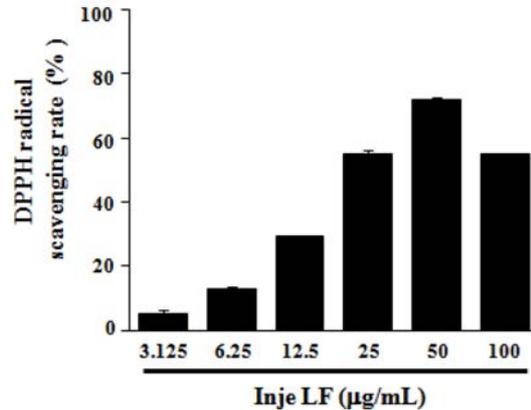


Fig. 1. Anti-oxidant activity of *Ligularia fischeri* ethanol extract (LF) by DPPH assay. Free radical scavenging activity of LF (3.125-100 mg/mL) was determined as described in Materials and Methods. Butylated hydroxyanisole (BHA) was used as a positive control. IC₅₀ values represent the concentration required for 50% inhibition of radical scavenging. Values represent the mean±SD of three independent experiments.

생성되고 이것의 분해를 측정하여 항산화 활성을 측정하는 방법으로(Dudonne et al., 2009), 측정방법이 간단하여 DPPH 라디칼 소거능과 함께 널리 이용된다. 산지별 곰취 EtOH 추출물에 의한 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사하게 인제산 곰취 EtOH 추출물에서 높은 소거능이 관찰되었고, 25 µg/mL의 농도에서 가장 높은 98.95%의 ABTS 라디칼 소거능이 관찰되었으며, 인제산 곰취 EtOH 추출물의 ABTS 라디칼 소거능에 대한 IC₅₀값은 13.03 µg/mL로 측정되었다(Fig. 2). 마지막으로 ORAC assay를 통해 곰취 EtOH 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. ORAC assay는 퍼옥시라디칼에 의한 형광 감소를 이용하여 항산화능을 측정하는 방법으로(Ou et al., 2002) 표준물질인 Trolox와 비교하여 정량하였다. ORAC activity assay kit를 이용하여 60분간 2분마다 fluorescence의 감소율을 측정할 결과, Fig. 3에서와 같이 인제산 곰취 EtOH 추출물에서 가장 높은 항산화 활성이 관찰되었고, ORAC를 Trolox equivalent (TE)값으로 산출한 결과 100 µg/mL의 농도에서 290.19±5.79 µM TE/g으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 본 결과를 통하여 DPPH, ABTS 그리고 ORAC assay를 이용하여 산지별(태백, 정선, 양구, 평창, 인제)곰취의 항산화 활성을 분석한 결과, 인제산 곰취 50% EtOH 추출물이 가장 우수한 항산화 활성을

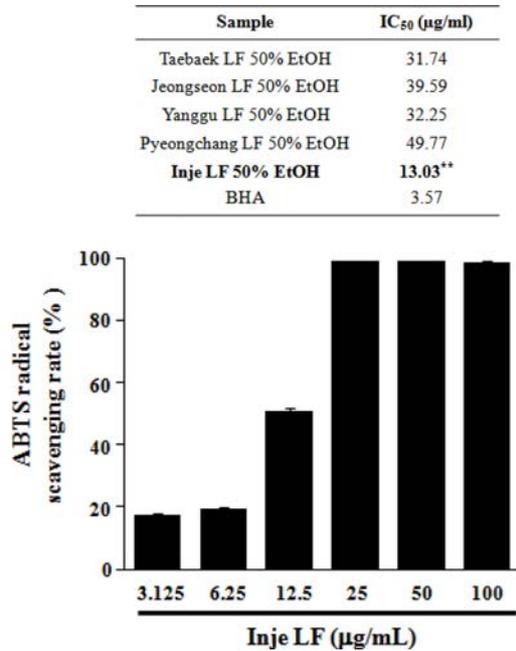


Fig. 2. Anti-oxidant activity of LF by ABTS assay. Free radical scavenging activity of LF (3.125-100 µg/mL) was determined as described in Materials and Methods. Butylated hydroxyanisole (BHA) was used as a positive control. IC₅₀ values represent the concentration required for 50% inhibition of radical scavenging. Values represent the mean±SD of three independent experiments.

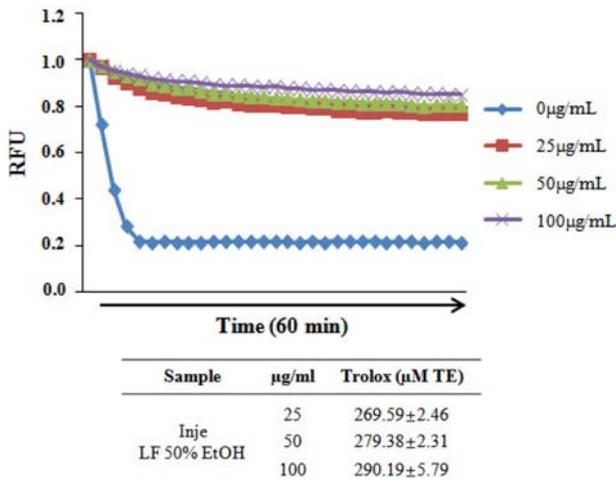


Fig. 3. Anti-oxidant activity of LF by ORAC assay. Oxygen radical absorbance capacity of LF (25-100 µg/mL) was determined as described in Materials and Methods. Relative ORAC values are expressed as Trolox equivalents (µM TE/g). Values represent the mean±SD of three independent experiments.

나타내는 것을 확인할 수 있었다.

곰취 compound의 항산화 활성

인제산 곰취 50% EtOH 추출물로부터 유효물질 5개 (chlorogenic acid (1), neochlorogenic acid (2), isochlorogenic acid A (3), isochlorogenic acid B (4), isochlorogenic acid

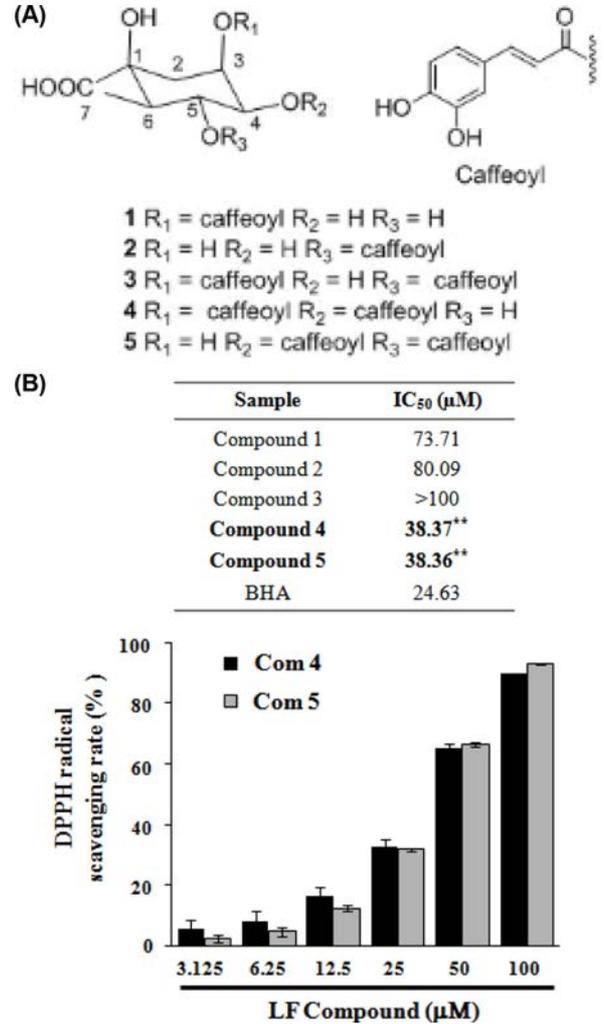


Fig. 4. Anti-oxidant activity of compounds from *Ligularia fischeri* by DPPH assay. (A) Chemical structures of compounds (Chlorogenic acid (1), Neochlorogenic acid (2), Isochlorogenic acid A (3), Isochlorogenic acid B (4), Isochlorogenic acid C (5)). (B) Free radical scavenging activity of compound 4 and 5 (3.125-100 µM) were determined as described in Materials and Methods. Butylated hydroxyanisole (BHA) was used as a positive control. IC₅₀ values represent the concentration required for 50% inhibition of radical scavenging. Values represent the mean±SD of three independent experiments.

C (5)를 분리하여(Fig. 4A), 곰취에서 분리된 화합물의 항산화 활성을 분석하기 위해 곰취 EtOH 추출물과 동일하게 DPPH, ABTS 그리고 ORAC assay를 수행하였다.

DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, Fig. 4B에서와 같이 곰취 compound 4, 5 (isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C)의 농도에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것이 확인되었고, 100 µM의 농도에서 각각 89.76%와 92.72%의 가장 높은 라디칼 소거능이 관찰되었으며 IC₅₀값은 각각 38.37 µM, 38.36 µM로 측정되었다. ABTS 라디칼 소거능 역시 곰취 compound 4, 5에서 가장 높게 관찰되었으며, 100 µM의 농도에서 각각 99.09%, 98.95%의 높은

ABTS 라디칼 소거능이 관찰되었고(Fig. 5), IC₅₀값은 각각 16.16 μM, 12.20 μM로 측정되었다. 마지막으로 ORAC assay를 통해 인제산 곰취 compound의 항산화 활성을 측정한 결과, Fig. 5에서와 같이 곰취 compound 4, 5의 농도에 따라 높은 항산화 활성이 관찰되었고, ORAC value는 100 μM의 농도에서 각각 362.56±5.91 μM TE/g, 362.35±1.92 μM TE/g으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 본 결과를 통하여 인제산 곰취 50% EtOH 추출물의 유효물질 가운데 compound 4, 5가 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 분리된 caffeoyl quinic acid계 화합물은 금은화, 참쭉, 취나물 등에서 분리하여 보고(Nugroho et al., 2009; Lee et al., 2010a; Lee et al., 2010b)한 바 있으며 Xu et al. (2012)은 chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, B 및 C의 다양한 항산화 효능 평가를 통해 isochlorogenic acid C가 caffeoyl quinic acid 유도체 화합물 중에서 가장 우수 항산화 효능을 갖는 결과를 보고하였다.

상기의 결과들을 통해 산지별 곰취 50% EtOH 추출물 가운데 인제산 곰취 50% EtOH 추출물이 높은 항산화 활성을 보유하는 것을 확인할 수 있었으며, 인제산 곰취 50% EtOH 추출물의 유효물질 가운데 compound 4와 5에서 가장 높은 항산화 활성을 확인할 수 있었다.

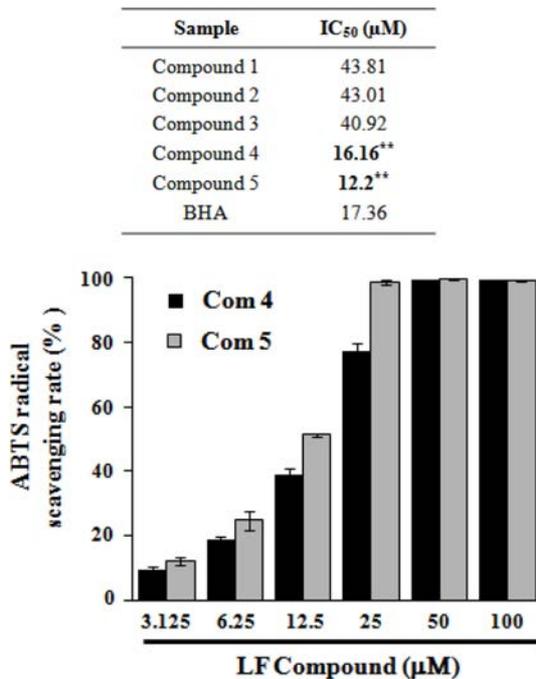


Fig. 5. Anti-oxidant activity of compounds from *Ligularia fischeri* by ABTS assay. Free radical scavenging activity of compound 4 and 5 (3.125-100 μM) were determined as described in Materials and Methods. Butylated hydroxyanisole (BHA) was used as a positive control. IC₅₀ values represent the concentration required for 50% inhibition of radical scavenging. Values represent the mean±SD of three independent experiments.

항산화 성분의 함량분석

산지별로 50% EtOH로 추출물을 조제한 후 이들 중 항산화 활성이 우수한 isochlorogenic acid B와 isochlorogenic acid C의 함량을 HPLC 분석법으로 정량하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 인제산이 항산화 활성이 가장 우수했던 isochlorogenic acid B와 isochlorogenic acid C의 함량이

Table 1. Isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C contents in *Ligularia fischeri* in different district

District	Amount (%)	
	Isochlorogenic acid B	Isochlorogenic acid C
Taebaek	0.096	0.444
Jeongseon	0.062	0.413
Yanggu	0.021	0.357
Pyeongchang	0.014	0.174
Inje	0.532	1.543

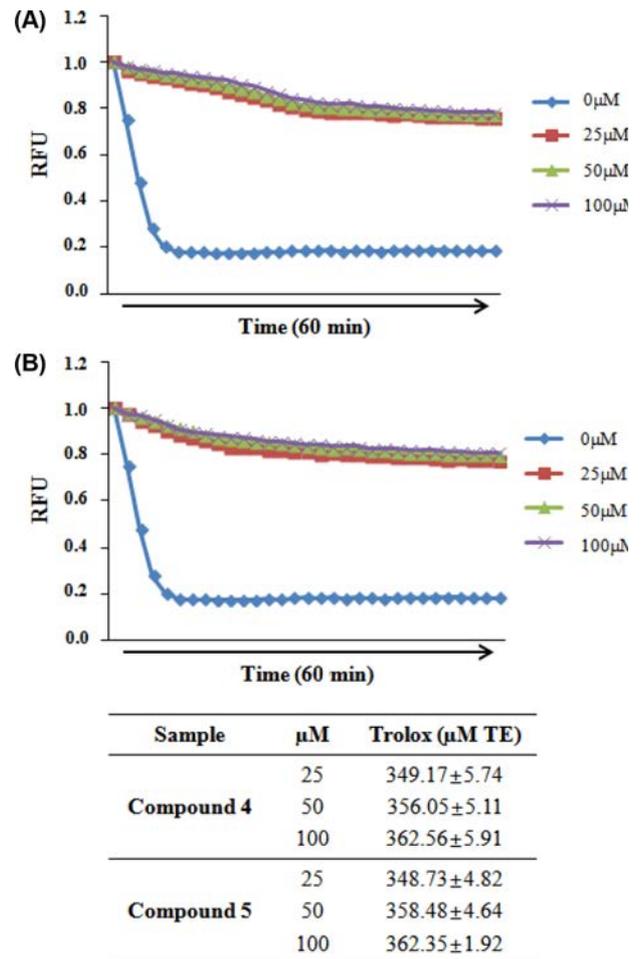


Fig. 6. Anti-oxidant activity of compounds from *Ligularia fischeri* by ORAC assay. Oxygen radical absorbance capacity of compound 4 (A) and 5 (B) (25-100 μM) were determined as described in Materials and Methods. Relative ORAC values are expressed as Trolox equivalents (μM TE/g). Values represent the mean±SD of three independent experiments.

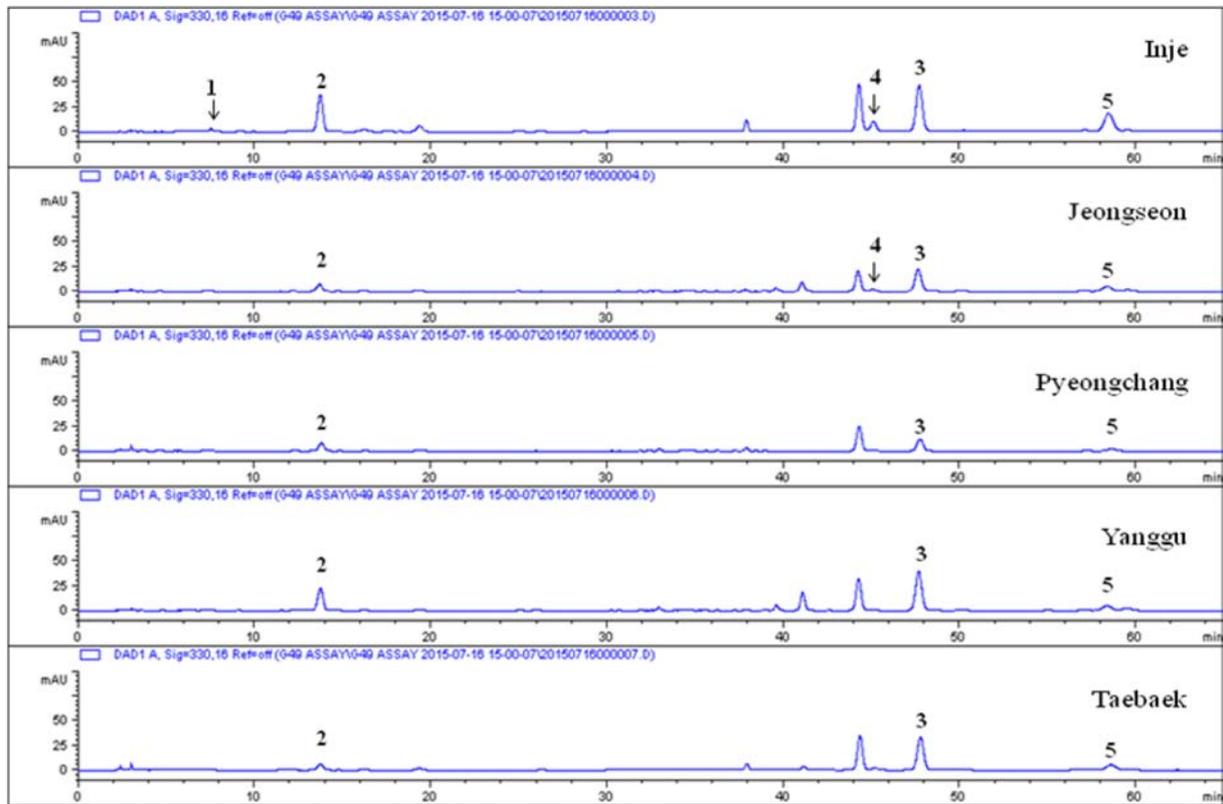


Fig. 7. HPLC chromatogram of *Ligularia fischeri* in different districts. 1: neochlorogenic acid, 2: chlorogenic acid, 3: isochlorogenic acid A, 4: isochlorogenic acid B, 5: isochlorogenic acid C.

각각 0.53%와 1.54%로 다른 지역보다 훨씬 높게 나타났으며 이러한 결과가 인제산이 다른 지역 보다 항산화 활성이 높은 결과를 나타낸 것으로 판단된다. Kwak et al. (2005)은 한국산 석류 과피의 항산화 성분 ellagic acid와 punicalagin을 산지별로 분석한 결과 곱취와 유사하게 지역별로 함량의 차이가 매우 커 약용자원을 제표화 할 경우 산지 선택이 중요한 요소가 될 수 있음을 보고하였다. 지표성분의 결정에 따라 달라질 수 있으나 산지별로 그 차이가 크게 나타날 수 있다는 보고와도 유사한 결과를 나타내었다(Im et al., 2010). 산지별로 성분의 함량의 차이는 식물의 재배환경이 많은 영향을 주었을 것으로 생각되며 산마늘, 곱취, 곤달비의 광도 변화에 따른 ascorbic acid의 함량을 분석한 결과 곱취는 약피음 처리구(상대투과율; 64-73%)에서 가장 높은 함량을 나타내었다(Kim et al., 2010). 산채류는 생육에 있어서 광도뿐만 아니라 온도, 습도, 토양환경, 경쟁식생, 수분함량 등 여러 가지 다양한 환경인자가 관여하기 때문에 지역별 항산화 성분의 함량이 다르게 나타나는 것으로 예측된다. 곱취 추출물의 성분 패턴 분석에서도 주요 함유 성분의 차이점은 없으며 산지별 성분의 함량의 변화가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이런 성분의 함량 차이가 산지별 항산화 효능에 큰 차이를 나타낸 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 식용으로 사용하는 곱취의 국내 산지별(태백, 정선, 양구, 평창, 인제) 항산화 효과를 평가하고, 곱취의 유효성분 분리를 통해 항산화 효능평가를 수행함으로써 산지별 곱취의 항산화 효능에 대한 탐색 및 소재 개발 가능성을 검토하고자 하였다. 그 결과, 인제산 곱취 50% EtOH 추출물의 농도에 따라 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능이 각각 71.77%, 98.95%로 높은 항산화 활성이 관찰되었다. 또한, ORAC activity assay kit를 이용한 항산화 활성 측정 결과에서도 인제산 곱취 50% EtOH 추출물의 농도에 따라 높은 항산화 활성이 관찰되었고, 100 µg/mL의 농도에서 290.19 ± 5.79 µM TE/g으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 산지별 가운데 가장 높은 항산화 활성을 보인 인제산 곱취 50% EtOH 추출물로부터 유효물질 5개(chlorogenic acid (1), neochlorogenic acid (2), isochlorogenic acid A (3), isochlorogenic acid B (4), isochlorogenic acid C (5))를 분리하여 곱취 compound의 항산화 활성을 분석한 결과, 인제산 곱취 50% EtOH 추출물과 유사하게 compound 4, 5 (isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C)의 농도에 따라 높은 DPPH 라디칼 소거능(89.76%, 92.72%)과 ABTS 라디칼 소거능(99.09%,

98.95%)이 관찰되었고, ORAC assay에서도 compound 4, 5에서 각각 $362.56 \pm 5.91 \mu\text{M TE/g}$, $362.35 \pm 1.92 \mu\text{M TE/g}$ 으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이러한 결과들을 통해 산지별 곰취 50% EtOH 추출물 가운데 인제산 추출물이 높은 항산화 활성을 보유하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 인제산 곰취 추출물에는 높은 항산화 활성 성분(compound 4: isochlorogenic acid B, compound 5: isochlorogenic acid C)이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 본 결과는 식용으로 사용되고 있는 곰취의 항산화 활성을 보유한 기능성 소재로서의 활용을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부에서 시행한 “고부가가치 식품 기술개발사업” (곰취를 이용한 혈행개선용 건강기능식품 개발, 112060-03-3-SB020)의 지원으로 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.* 30: 609-615.
- Cha KH, Song DG, Kim SM, Pan CH. 2012. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *J. Agr. Food Chem.* 60: 7152-7157.
- Cho YR, Kim JK, Kim JH, Oh JS, Seo DW. 2013. *Ligularia fischeri* regulates lung cancer cell proliferation and migration through down-regulation of epidermal growth factor receptor and integrin b1 expression. *Genes Genom.* 35: 741-746.
- Choi EM. 2007. *Ligularia fischeri* leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis. *J. Appl. Toxicol.* 27: 176-182.
- Choi EM, Kim YH. 2008. A preliminary study of the effects of an extract of *Ligularia fischeri* leaves on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Food Chem. Toxicol.* 46: 375-379.
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agr. Food Chem.* 57: 1768-1774.
- Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 29-36.
- Hwang BY, Lee JH, Koo TH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. 2002. Furanoligularenone, an eremophilane from *Ligularia fischeri*, inhibits the LPS-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in macrophage Raw264.7 cells. *Planta Med.* 68: 101-105.
- Im KR, Kim MJ, Jung TK, Yoon KS. 2010. Analysis of isoflavonoid contents in *Astragalus membranaceus* Bunge cultivated in different areas and at various ages. *KSBB J.* 25: 271-276.
- Jeong YK, Yang WS, Kang JO, Kong IS, Kim JO. 1995. Fibrinolysis of fermented Kimchi. *Korean J. Life Sci.* 5: 203-210.
- Jin KS, Oh YN, Park JA, Lee JY, Jin S, Hyun SK, Hwang HJ, Kwon HJ, Kim BW. 2012. Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic, and Anti-Inflammatory Activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract and its Solvent Fractions. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 40: 371-379.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han D. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 891-896.
- Kang MC, Lee JY, Ko RK, Kim HB, Hong SH, Kim GO. 2009. Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dicentra corallacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 311-316.
- Kim DH, An BJ, Kim SG, Park TS, Park GH, Son JH. 2011. Anti-inflammatory effect of *Ligularia fischeri*, *Solidago virgaurea* and *Arunca dioicus* complex extracts in Raw 264.7 cells. *J. Life Sci.* 21: 678-683.
- Kim GN, Cho MS, Kwon KW. 2010. Analysis growth performance and ascorbic acid contents of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*, *Ligularia fischeri*, and *L. stenocephala* under changing light intensity. *J. Kor. Forest Soc.* 99: 68-74.
- Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 screened from ChungkookJang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2482-2488.
- Kwak HM, Jeong HH, Sohng BH, Kim JG, Lee JM, Hur JM, Song KS. 2005. Quantitative analysis of antioxidants in Korean pomegranate husk (*Granati pericarpium*) cultivated in different site. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 431-434.
- Lee EJ, Kim JS, Kim HP, Lee J-H, Kang SS. 2010a. Phenolic constituents from the flower bud of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chem.* 120: 134-139.
- Lee HJ, Lee JY, Kim SM, Nho CW, Jung SH, Song DG, Kim CY, Pan CH. 2010b. Inhibitory effects of dicaffeoylquinic acids from *Artemisia dubia* on aldo-keto reductase family 1B10. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 826-830.
- Lee JE, Kim HJ, Choi EK, Chai HY, Yun YW, Kim DJ, Nam SY, Lee BJ, Ahn B, Kang HG, Kim YB. 2003. Four-week repeated-dose toxicity study on *Pinellia* extract. *Korean J. Lab. Anim. Sci.* 19: 127-141.
- Lee JY, Ahn EK, Ko HJ, Cho YR, Ko WC, Jung YH, Choi KM, Choi MR, Oh JS. 2014. Anti-Melanogenic, Anti-Wrinkle, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Effects of *Xylosma congesta* leaf Ethanol Extract. *J. Appl. Biol. Chem.* 57: 365-371.
- Link A, Balaguer F, Goel A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1771-1792.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 84: 407-412.
- Na CS, Hong CY, Na DS, Kim JB, Yoon SY, Lee SB, Dong MS. 2013. Hotwater Extract of *Hovenia dulcis* Peduncle Improves Exercise Performance and Anti-fatigue Effect in Mice. *Korean J.*

- Pharmacogn. 44: 83-90.
- Nugroho A, Kim KH, Lee KR, Alam MB, Choi JS, Kim WB, Park HJ. 2009. Qualitative and quantitative determination of the caffeoylquinic acids on the Korean mountainous vegetables used for chwinamul and their peroxynitrite-scavenging effect. Arch. Pharm. Res. 32: 1361-1367.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J. Agr. Food Chem. 50: 3122-3128.
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. J. Agr. Food Chem. 54: 1151-1157.
- Rice-Evans C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Method Enzymol. 234: 279-293.
- Shang YF, Kim SM, Song DG, Pan CH, Lee WJ, Um BH. 2010. Isolation and identification of antioxidant compounds from *Ligularia fischeri*. J. Food Sci. 75: C530-C535.
- Song HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS, Lee YT. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 889-892.
- Xu JG, Hu QP, Liu Y. 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. J. Agr. Food Chem. 60: 11625-11630.