

## Free radical scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower

Qi Qi Pang<sup>1</sup>, Sanghyun Lee<sup>2,3</sup>, Ji-Hyun Kim<sup>1\*</sup>, Eun Ju Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

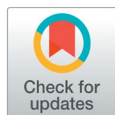
<sup>3</sup>Natural Product Institute of Science and Technology, Anseong 17546, Korea

\*Corresponding authors: llissunll@gmail.com, ejcho@pusan.ac.kr

### Abstract

Balance between reactive oxygen species (ROS) production and ROS quenching is important in all living organisms. If the balance is broken, the ROS consecutively generate other reactive species with toxic impact and cause oxidative stress, which is associated with chronic degenerative diseases including cancer and metabolic, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. Therefore, natural materials as ROS scavengers are required and necessary to stabilize the ROS balance in the body. The aim of this study was to demonstrate and compare the antioxidant properties in ethanol extract and four different fractions (*n*-butanol, ethyl acetate, chloroform, *n*-hexane) of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower under *in vitro* assay. *Cirsium japonicum* var. *maackii* was extracted with ethanol and then partitioned with *n*-butanol, ethyl acetate, chloroform, and *n*-hexane. The antioxidant capacities of the ethanol extract and four fractions were investigated based on the ability to quench several free radicals including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, superoxide anion radicals, and nitric oxide. All of the ethanol extract and fractions from *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower exerted high antioxidant activities. These results suggest that the ethyl acetate fractions of ethanol extract from *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower could provide antioxidant potential as free radical scavengers.

**Key words:** *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower, oxidative stress, reactive oxygen species



### OPEN ACCESS

**Citation:** Pang QQ, Lee S, Kim JH, Cho EJ, Free radical scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower. Korean Journal of Agricultural Science 50:19-26. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220095>

**Received:** August 03, 2022

**Revised:** August 08, 2022

**Accepted:** November 29, 2022

**Copyright:** © 2023 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Introduction

‘Reactive oxygen species’ (ROS)는 산소분자에서 유리된 산화물의 종류에 일반적으로 사용되는 단어이다(Sies et al., 2022). Singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl (·OH), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 포함하는 ROS는 다양한 생체활동에 신호분자로 활용되므로 모든 살아있는 생명체의 기관에서 필요하고 기본적인 생리적 과정에서 요구된다(Castro et al., 2021). 그러나 ROS의 생리적 농도가 높아지면 비특이적으로 단백질, 지질, 핵산 그리고 탄수화물과 반응하고, 연속적으로 다른 독성이 있는 활성종들을 생성하게 되어 직접적인 산화적 손상을 유발할 수 있다(Sies and Jones, 2020). 결국, 산화적 스트레스를 일으키게 되어 다양한

만성 질환(당뇨병, 만성신장병, 신경퇴행성질환, 심장병 등)의 원인이 된다(Leyane et al., 2022). 따라서 모든 살아있는 생명체의 기관은 ROS의 생성과 소거가 균형을 이루어야 한다.

한편, ROS에 대응하고 ROS를 중화하기 위해서 인체는 효소적(superoxide dismutase, SOD; glutathion peroxidase, GPX; catalase, CAT) 그리고 비효소적(carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, hydrophilic vitamin C, flavonoids) 항산화물을 생성한다(Bratovic, 2020). ROS와 항산화물의 균형은 인체의 적절한 생리적 기능을 위해서 필수조건이다(Castro et al., 2021). 그러나 인체에서 생성하는 항산화물만으로는 과도하게 생성되는 ROS에 의해 균형이 무너질 수 있으므로 이를 유지할 수 있는 추가적인 보호방안이 필요하다. 이와 관련하여, 국제 공중보건을 책임지는 World Health Organization은 항산화물을 식품으로 섭취하는 것은 가장 중요한 방법이라고 보고해왔다(WHO, 2002). 따라서, 세계적으로 항산화력이 뛰어난 생리활성 물질에 대한 관심이 높아졌고, 많은 연구자들은 부작용이 거의 없는 천연 생리활성 물질의 탐색을 위해 많은 노력을 기울임과 동시에 고부가가치의 기능성 식품 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)는 국화과(Compositae) 다년생 초본으로 한국, 중국, 일본 등 동아시아 지역에서 식용 및 약용으로 쓰이는 자생식물이다(Kim, 1984). 많은 연구에서 영경귀의 약리적 활성으로 항산화, 항염증, 항암, 간보호, 신경보호 효과를 보고하였다(Jung et al., 2017; Park et al., 2017; Shin et al., 2017; Lee et al., 2018; Kim et al., 2020). 특히, 영경귀의 꽃 부위는 잎, 줄기, 뿌리 같은 다른 부위에 비하여 연구가 많이 되어 있지 않다. 영경귀 꽃의 알려진 활성 연구로 영경귀의 다양한 부위(지상부, 줄기, 뿌리, 꽃)를 메탄올 추출하여 다양한 용매로 분획한 시료를 이용해서 제2형 당뇨와 알츠하이머병의 중요하고 대표적인 효소인  $\alpha$ -glucosidase와  $\beta$ -secretase 활성을 검토하였고, 영경귀의 부위 중 꽃의 메탄올 추출물은 우수한  $\beta$ -secretase 효소 억제활성을 나타내는 것을 확인했다(Wagle et al., 2019). 게다가 Oh 등(2021)은 영경귀 꽃 메탄올 추출물을 이용하여 암에 대한 작용기전을 검토한 결과 항염증 반응을 통하여 우수한 항암 효능이 있을 것이라고 제안했다. 이 외에 영경귀 꽃에 관한 연구는 거의 보고되어 있지 않다. 일반적으로 식물의 꽃은 식용이 가능한 것으로 알려져 있고, 식물의 색소 및 향기와 같은 고유한 천연성분과 생리활성물질을 함유하는 중요한 부위이므로 건강 기능성 식품 소재로의 가능성이 제시되어 왔다(Gostin and Waisundara, 2019; Chen et al., 2020; Kang et al., 2020). 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성이 알려진 영경귀의 부위 중 연구가 부족한 영경귀 꽃 부위를 이용하여 ethanol (EtOH) 추출물과 4가지 분획물(*n*-hexane, Hex; chloroform, CHCl<sub>3</sub>; ethyl acetate, EtOAc; *n*-butanol, BuOH)의 *in vitro* 실험계에서 자유라디칼 소거능을 확인하여 기능성식품 분야에서 생리기능성 천연 소재로서 영경귀 꽃의 활용도 향상에 기여하고자 한다.

## Materials and Methods

### 실험 재료 추출 및 분획

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)의 꽃은 임실생약(Imsil Herbal Medicine, Imsil, Korea)에서 제공받아 실험재료로 사용하였다. 건조한 영경귀 꽃 3 kg을 EtOH 15 L로 총 5회 반복으로 각 5시간씩 추출하여 필터한 후 환류 냉각장치를 이용하여 농축하였고, 추출물 470 g을 얻었다. 추출물은 유기용매를 이용하여 각각 분획하였고, 분획물로 Hex (17.4 g), CHCl<sub>3</sub> (2.1 g), EtOAc (3.0 g), BuOH (7.7 g) 분획물을 얻었다. 이렇게 준비한 영경귀 꽃 추출물과 분획물은 dimethyl sulfoxide에 녹여 실험 재료로 사용하였다.

## 시약

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2-deoxy-ribose 및 griess reagent는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 EtOH은 Duksan Co., Ltd. (Ansan, Korea)의 제품을 사용하였다.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서, thiobarbituric acid (TBA)는 Acros Organics (New Jersey, USA)에서, trichloroacetic acid (TCA)는 Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. EDTA disodium salt dehydrate와 phosphoric acid는 Samchun Pure Chemical Co., Ltd. (Pyeongtaek, Korea)에서,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Junsei (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. Phenezine methsulfate (PMS), NADH disodium salt 및 nitrotetrazolium blue chloride (NBT)는 Bio Basic Inc. (Toronto, Canada)에서, SNP는 Wako (Tokyo, Japan)사에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 분석한 흡광도는 Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd. (Hamburg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

## DPPH 라디칼 소거능 측정

영경귀 꽃의 EtOH 추출물과 4가지 분획물(BuOH, EtOAc,  $\text{CHCl}_3$ , Hex)을 농도별(100, 250, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )로 EtOH에 녹인 시료 100  $\mu\text{L}$ 와 60  $\mu\text{M}$  DPPH solution 100  $\mu\text{L}$ 를 96 well plate에서 혼합하고 실온에서 30분 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성대조군과 비교하여 라디칼 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다(Hatano et al., 1989).

## Hydroxyl 라디칼( $\cdot\text{OH}$ ) 소거능 측정

10 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA 용액, 10 mM의 2-deoxyribose 용액과 영경귀 꽃의 EtOH 추출물 및 분획물의 농도별 시료용액을 혼합한 후, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 첨가하여 37°C에서 4시간동안 방치하였다. 이 혼합액에 2.8% TCA solution과 1.0% TBA solution를 각각 첨가하여 20분간 끓인 후 식혀서 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Chung et al., 1997).

## Superoxide anion 라디칼 ( $\text{O}_2^-$ ) 소거능 측정

증류수에 녹인 영경귀 꽃의 EtOH 추출물 및 분획물의 농도별 시료 500  $\mu\text{L}$ 와 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 용액 100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$  PMS 용액 200  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{M}$  NBT 용액 200  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{M}$  NADH 용액 400  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여  $\text{O}_2^-$  라디칼 소거능을 백분율(%)로 나타내었다(Nishikimi et al., 1972).

## Nitric oxide (NO) 소거능 측정

10 mM SNP 용액에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 영경귀 꽃의 EtOH 추출물 및 분획물의 농도별 시료를 넣고 실온에서 150분간 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 혼합액은 96 well plate에서 griess reagent를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 저해 활성을 확인하였다(Marocci et al., 1994).

## 통계분석

실험 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, SPSS (version 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 실험 결과로부터 analysis of variance를 구한 후 Duncan's multiple test를 이용하여 각 군 사이의 평균의 유의성을 검정하였다( $p < 0.05$ ).

## Results and Discussion

### 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 실험법은 보라색을 띠는 DPPH 라디칼이 시료에 의하여 환원되면서 노란색으로 전환되는 원리를 이용하여 천연물의 항산화 활성을 검토하는데 널리 활용되는 방법이다(Sánchez-Moreno, 2002; Kedare and Singh, 2011). 영경귀 꽃 EtOH 추출물과 4가지 분획물(BuOH, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, Hex)의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 1에 나타내었다. 영경귀 꽃 EtOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 시료 농도가 100 µg·mL<sup>-1</sup>일때 85.13 ± 3.26%의 소거능을 나타냈고, 250 µg·mL<sup>-1</sup>과 500 µg·mL<sup>-1</sup>에서는 유의적으로 증가하여 각각 94.23 ± 0.86%과 93.45 ± 1.27%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 게다가 4가지 분획물(BuOH, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, Hex)의 DPPH 라디칼 소거능 결과에서는 농도별 차이는 있었지만 가장 높은 농도 처리군에서는 BuOH (100.75 ± 3.28%) > EtOAc (96.78 ± 3.29%) > CHCl<sub>3</sub> (89.73 ± 3.23%) > Hex (54.12 ± 2.82%) 분획물의 순서로 DPPH 라디칼 소거능이 나타났다. 이 같은 결과는 분획물들을 EtOH 추출물과 비교하면, BuOH과 EtOAc 분획물의 500 µg·mL<sup>-1</sup> 처리군에서 EtOH 추출물보다 더욱 우수한 DPPH 라디칼 소거능이 확인되었다. 두 분획물 사이에서 통계적 유의성을 확인하기 위해서 고농도 처리군인 500 µg·mL<sup>-1</sup> 처리군에서 BuOH와 EtOAc 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 t-test를 이용하여 분석한 결과, 두 분획물 사이에 통계적 유의성은 없었다(data not shown).

**Table 1.** DPPH radical scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower.

Treatment (µg·mL <sup>-1</sup> )	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	BuOH Fr.	EtOAc Fr.	CHCl <sub>3</sub> Fr.	Hex Fr.
100	85.13 ± 3.26 <sup>b</sup>	88.06 ± 2.67 <sup>b</sup>	81.97 ± 2.35 <sup>c</sup>	77.80 ± 3.18 <sup>b</sup>	6.41 ± 3.53 <sup>c</sup>
250	94.23 ± 0.86 <sup>a</sup>	88.43 ± 4.14 <sup>b</sup>	86.37 ± 3.36 <sup>b</sup>	79.50 ± 2.02 <sup>b</sup>	24.64 ± 1.03 <sup>b</sup>
500	93.45 ± 1.27 <sup>a</sup>	100.75 ± 3.28 <sup>a</sup>	96.78 ± 3.29 <sup>a</sup>	89.73 ± 3.23 <sup>a</sup>	54.12 ± 2.82 <sup>a</sup>

Values are mean ± standard deviation (n = 6).

DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Ext., extraction; Fr., fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

### 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 hydroxyl 라디칼 소거능

Hydroxyl 라디칼은 반응성이 커서 DNA와 지질을 산화시킴으로써 대부분의 세포내의 독성을 유발시킨다(Gaschler and Stockwell, 2017). 본 실험에서는 Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 반응인 Fenton 반응에 의해 hydroxyl 라디칼이 생성되고, 이렇게 생성된 hydroxyl 라디칼이 2-deoxyribose를 산화시켜 malondialdehyde로 분해하는 원리(Zou et al., 2002; Herraiz and Galisteo, 2015)를 이용한 실험법으로 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 4가지 분획물(BuOH, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, Hex)의 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 2). 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 4가지 분획물들은 BuOH 분획물을 제외한 모든 실험군에서 농도 유의적으로 hydroxyl 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 시료의 최고 농도인 500 µg·mL<sup>-1</sup> 농도 처리군에서는 모든 추출물 및 분획물에서 80% 이상의 hydroxyl 라디칼 소거능을 보였다. 특히, EtOAc 분획물의 500 µg·mL<sup>-1</sup> 농도에서 89.14 ± 0.37%로 영경귀 꽃의 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

**Table 2.** Hydroxyl radical scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower.

Treatment ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	BuOH Fr.	EtOAc Fr.	CHCl <sub>3</sub> Fr.	Hex Fr.
100	49.54 ± 1.76c	58.85 ± 2.55b	58.74 ± 1.30c	74.45 ± 1.50c	69.11 ± 1.02c
250	84.59 ± 1.41b	83.51 ± 1.43a	74.11 ± 2.01b	80.28 ± 0.73b	79.91 ± 0.86b
500	87.66 ± 0.90a	85.53 ± 1.45a	89.14 ± 0.37a	83.14 ± 1.25a	83.57 ± 1.13a

Values are mean ± standard deviation (n = 6).

Ext., extraction; Fr., fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 superoxide anion 라디칼 소거능

Superoxide anion은 가장 먼저 생성되는 독성이 강한 ROS로 정상적으로는 SOD에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환되고, 그 후에 CAT나 peroxidase 등에 의해서 물과 산소로 분해된다(Ighodaro and Akinloye, 2018). 그러나 superoxide anion이 다른 ROS로 전환되면 결국에는 지질, 단백질, DNA등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 노화에 관여하게 된다(Campos Chiste et al., 2015). Table 3는 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 superoxide anion 소거능 실험결과를 나타내었다. 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물은 모두 superoxide anion 소거능을 보였지만 다른 추출물과 분획물과 비교했을 때 특히, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  농도 처리군에서 BuOH 분획물(73.75 ± 1.25%)과 EtOAc 분획물(73.63 ± 0.64%)의 superoxide anion 소거능이 가장 뛰어났고, *t*-test를 이용하여 유의성을 확인하였으나 두 분획물 사이의 통계적 유의성은 없었다(data not shown). 이와 같은 결과는 영경귀 꽃이 superoxide anion 라디칼에서 대해서 소거활성이 뛰어나고, 따라서 superoxide anion 자유라디칼에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호 효능이 있을 것으로 생각된다.

**Table 3.** Superoxide anion radical scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower.

Treatment ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	BuOH Fr.	EtOAc Fr.	CHCl <sub>3</sub> Fr.	Hex Fr.
100	43.77 ± 0.35 <sup>b</sup>	65.64 ± 1.26 <sup>b</sup>	44.27 ± 0.95 <sup>c</sup>	7.99 ± 1.17 <sup>c</sup>	2.73 ± 1.31 <sup>c</sup>
250	57.88 ± 0.74 <sup>a</sup>	74.64 ± 0.63 <sup>a</sup>	64.91 ± 1.01 <sup>b</sup>	17.80 ± 0.67 <sup>b</sup>	10.65 ± 0.80 <sup>b</sup>
500	58.76 ± 0.99 <sup>a</sup>	73.75 ± 1.25 <sup>a</sup>	73.63 ± 0.64 <sup>a</sup>	33.57 ± 0.80 <sup>a</sup>	31.87 ± 0.79 <sup>a</sup>

Values are mean ± standard deviation (n = 6).

Ext., extraction; Fr., fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 NO 소거능

활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 ROS와 더불어 생성되는 활성종으로 NO, nitrous oxide, nitrogen dioxide, peroxynitrite 등이 속한다(Adams et al., 2015; Ford and Miranda, 2020). 특히 NO는 L-arginine을 통해 nitric oxide synthase를 생성하고 종양, 세균, 기생충, 곰팡이 등의 방어에 관여하여 사멸시키는 기능을 하는 반면, 과도하게 생성되면 독성을 유발하여 세포, 조직 및 유전자 손상을 일으키게 된다(Wu et al., 2021). 게다가 NO는 superoxide anion 라디칼과 반응하여 peroxynitrite를 생성하고, 이는 다양한 만성 질환과 관련되어 있다(Pryor and Squadrito, 1995; Pekarova et al., 2011). 따라서 본 실험에서는 SNP의 처리로 생성된 NO에 대하여 영경귀 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 처리에 의한 소거능을 griess reagent 반응을 통해서 측정하였다(Table 4). DPPH, hydroxyl, superoxide anion 라디칼과 마찬가지로 NO 소거능은 영경귀 꽃 EtOH 추출물과 분획물의 처리 농도에 비례하여 증가하였다. 다만, 100

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  농도에서 EtOH 추출물과  $\text{CHCl}_3$  분획물에서는 소거능을 보이지 않았다. 그러나 250, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  농도에서는 농도 유의적으로 NO 소거능이 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 그 외에 다른 분획물들은 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  농도부터 농도 유의적으로 NO 소거능이 확인되었다. 특히, 엉겅퀴 꽃 EtOAc 분획물의 NO 소거능( $87.66 \pm 0.90\%$ )이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

**Table 4.** Nitric oxide scavenging activity of *Cirsium japonicum* var. *maackii* flower.

Treatment ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	BuOH Fr.	EtOAc Fr.	$\text{CHCl}_3$ Fr.	Hex Fr.
100	-	$22.10 \pm 0.69\text{c}$	$9.25 \pm 1.56\text{c}$	-	$11.85 \pm 1.58\text{c}$
250	$26.4 \pm 0.58\text{b}$	$37.13 \pm 1.50\text{b}$	$34.40 \pm 0.75\text{b}$	$23.96 \pm 0.70\text{b}$	$27.61 \pm 1.26\text{b}$
500	$41.06 \pm 0.46\text{a}$	$38.46 \pm 0.56\text{a}$	$48.74 \pm 0.31\text{a}$	$40.87 \pm 0.72\text{a}$	$36.64 \pm 0.62\text{a}$

Values are mean  $\pm$  standard deviation (n = 6).

Ext., extraction; Fr., fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

이상의 결과에서 엉겅퀴 꽃 EtOH 추출물 및 4가지 분획물(BuOH, EtOAc,  $\text{CHCl}_3$ , and Hex)은 우수한 DPPH, hydroxyl, superoxide anion 라디칼과 NO 소거능을 나타내었다. 높은 농도 처리군인 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  농도에서 BuOH 분획물은 DPPH 라디칼 소거능에서(BuOH fr. > EtOAc fr. > EtOH ext. >  $\text{CHCl}_3$  fr. > Hex fr.) 가장 높은 활성을 나타냈지만 EtOAc 분획물과 통계적 유의성은 없었다(data not shown). EtOAc 분획물은 hydroxyl 라디칼(EtOAc fr. > EtOH ext. > BuOH fr. > Hex fr. >  $\text{CHCl}_3$  fr.) 소거능에서 다른 추출물 및 분획물보다 가장 높은 활성을 보였고, superoxide anion 소거능(BuOH fr. > EtOAc fr. > EtOH ext. >  $\text{CHCl}_3$  fr. > Hex fr.)에서는 BuOH 분획물과 EtOAc 분획물은 농도 의존적으로 소거능이 증가하였고, 다른 추출물 및 분획물 중에서 가장 높은 소거능을 보였다. 그리고 BuOH 분획물과 EtOAc 분획물 사이에 통계적 유의성은 없었다(Data not shown). 한편, NO 소거능(EtOAc fr. > EtOH ext. > BuOH fr. >  $\text{CHCl}_3$  fr. > Hex fr.)에서는 EtOAc 분획물이 가장 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이전의 연구에서 엉겅퀴 봄 지상부의 EtOH 추출물을 이용하여 DPPH, hydroxyl, superoxide 라디칼 소거능을 측정하고 결과를 보고하였다(Lee et al., 2018). 엉겅퀴 봄 지상부의 EtOH 추출물로부터 EtOAc 분획물과 엉겅퀴 꽃 EtOH 추출물에서 EtOAc 분획물의 라디칼 소거능을 비교하였을 때, DPPH와 hydroxyl 라디칼에서는 엉겅퀴 꽃 EtOAc 분획물의 소거능(DPPH,  $96.78 \pm 3.29\%$ ; hydroxyl,  $89.14 \pm 0.37\%$ )이 엉겅퀴 EtOAc 분획물(DPPH,  $88.23 \pm 1.55\%$ ; hydroxyl,  $87.21 \pm 0.26\%$ )보다 높았고, superoxide anion 라디칼 소거능에서는 엉겅퀴 지상부 EtOAc 분획물의 소거능( $79.52 \pm 2.00\%$ )이 엉겅퀴 꽃 EtOAc 분획물( $73.63 \pm 0.64\%$ )보다 높았다. 따라서, 엉겅퀴 봄 지상부 EtOH 추출물 및 분획물의 소거능에 비하여 엉겅퀴 꽃 EtOH 추출물 및 분획물의 라디칼 소거 활성이 다소 높은 것을 확인할 수 있었다. Lee 등(2017)의 보고에 따르면 엉겅퀴 꽃의 EtOH 추출물에는 cirsimaritin, hispidulin, 그리고 cirsimaritin이 주요 활성물질로 확인되었다. 이러한 항산화 기능이 뛰어난 활성물질이 엉겅퀴 꽃에 존재하고 있으므로 인해서 우수한 라디칼 소거 활성이 나타난 것으로 여겨지고 따라서, 엉겅퀴 꽃의 우수한 생리활성이 기대된다. 본 연구 결과를 통하여 엉겅퀴 꽃이 잠재적인 천연 항산화 소재로 향후 기능성 식품 분야에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgements

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No.2021R111A1A01058704).

## Authors Information

Qi Qi Pang, <http://orcid.org/0000-0001-6831-7061>

Sanghyun Lee, <http://orcid.org/0000-0002-0395-207X>

Ji-Hyun Kim, <http://orcid.org/0000-0001-8232-2932>

Eun Ju Cho, <http://orcid.org/0000-0003-4282-3219>

## References

- Adams L, Franco MC, Estevez AG. 2015. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine* 240:711-717.
- Bratovic A. 2020. Antioxidant enzymes and their role in preventing cell damage. *Acta Scientifi Nutritional Health* 4:1-7.
- Campos Chiste R, Freitas M, Zerlotti Mercadante A, Fernandes E. 2015. Superoxide anion radical: Generation and detection in cellular and non-cellular systems. *Current Medicinal Chemistry* 22:4234-4256.
- Castro B, Citterico M, Kimura S, Stevens DM, Wrzaczek M, Coaker G. 2021. Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature Plants* 7:403-412.
- Chen D, Ding Y, Chen G, Sun Y, Zeng X, Ye H. 2020. Components identification and nutritional value exploration of tea (*Camellia sinensis* L.) flower extract: Evidence for functional food. *Food Research International* 132:109100.
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61:118-123.
- Ford PC, Miranda KM. 2020. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 103:31-46.
- Gaschler MM, Stockwell BR. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482:419-425.
- Gostin AI, Waisundara VY. 2019. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Trends in Food Science & Technology* 86:381-391.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37:2016-2021.
- Herraz T, Galisteo J. 2015. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of  $\beta$ -carboline alkaloids. *Food Chemistry* 172:640-649.
- Ighodaro O, Akinloye O. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54:287-293.
- Jung HA, Abdul QA, Byun JS, Joung EJ, Gwon WG, Lee MS, Kim HR, Choi JS. 2017. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 209:62-72.
- Kang MW, Kim GW, Kang KO, Shim JY, Son JY. 2020. Antioxidant activities and functional components of ginseng root, ginseng fine root and ginseng flower extracts. *Food Service Industry Journal* 12:181-194. [in Korean]
- Kedare SB, Singh R. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48:412-422.

- Kim J. 1984. Illustrated natural drugs encyclopedia (color edition). Namsandang, Seoul, Korea. [in Korean]
- Kim MJ, Kim JH, Kim JH, Lee S, Cho EJ. 2020. Amelioration effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract/fractions on amyloid beta 25–35-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and identification of the main bioactive compound. *Food & Function* 11:9651-9661.
- Lee AY, Kim MJ, Lee S, Shim JS, Cho EJ. 2018. Protective effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against oxidative stress in C6 glial cells. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:509-519. [in Korean]
- Lee J, Rodriguez JP, Lee KH, Park JY, Kang KS, Hahm DH, Huh CK, Lee SC, Lee S. 2017. Determination of flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Applied Biological Chemistry* 60:487-496.
- Leyane TS, Jere SW, Hourelid NN. 2022. Oxidative stress in ageing and chronic degenerative pathologies: Molecular mechanisms involved in counteracting oxidative stress and chronic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 23:7273.
- Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201:748-755.
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46:849-854.
- Oh KK, Adnan M, Cho DH. 2021. Network pharmacology-based study to uncover potential pharmacological mechanisms of Korean thistle (*Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum.) flower against cancer. *Molecules* 26:5904.
- Park JY, Kim HY, Shibamoto T, Jang TS, Lee SC, Shim JS, Hahm DH, Lee HJ, Lee S, Kang KS. 2017. Beneficial effects of a medicinal herb, *Cirsium japonicum* var. *maackii*, extract and its major component, cirsimaritin on breast cancer metastasis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27:3968-3973.
- Pekarova M, Lojek A, Martiskova H, Vasicek O, Bino L, Klinke A, Lau D, Kuchta R, Kadlec J, Vrba R. 2011. New role for L-arginine in regulation of inducible nitric-oxide-synthase-derived superoxide anion production in raw 264.7 macrophages. *The Scientific World Journal* 11:2443-2457.
- Pryor WA, Squadrito GL. 1995. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 268:L699-L722.
- Sánchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8:121-137.
- Shin MS, Park JY, Lee J, Yoo HH, Hahm DH, Lee SC, Lee S, Hwang GS, Jung K, Kang KS. 2017. Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27:3076-3080.
- Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, Murphy MP, Yamamoto M, Winterbourn C. 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23:499-515.
- Sies H, Jones DP. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21:363-383.
- Wagle WA, Seong SH, Shrestha S, Jung HA, Choi JS. 2019. Korean thistle (*Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum.): A potential dietary supplement against diabetes and Alzheimer's disease. *Molecules* 24:649.
- WHO (World Health Organization). 2002. Joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO, Geneva, Switzerland.
- Wu G, Meininger CJ, McNeal CJ, Bazer FW, Rhoads JM. 2021. Role of L-arginine in nitric oxide synthesis and health in humans. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1332:167-187.
- Zou H, Tai C, Gu XX, Zhu RH, Guo QH. 2002. A new simple and rapid electrochemical method for the determination of hydroxyl radical generated by Fenton reaction and its application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373:111-115.