

Liposome의 光酸化反應에 미치는 人蔘抽出物の 影響 제 1보 . Hydroperoxide 생성 억제 효과

백태홍 · 김영호 · 이준홍
한양대학교 자연과학대학 화학과
(1990년 11월 6일 접수)

The Effect of Ginseng Extracts on the Photooxidation of Liposome I. The protective effect on the formation of hydroperoxides

Tai-Hong Paik, Young-Ho Kim and Jun-Heung Yi
Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 136-075, Korea
(Received November 6, 1990)

Abstract □ In order to study the lipid peroxidation caused by light and the protective action against it in biological membrane, reverse-phase evaporation liposome (REV) was employed as a model membrane and the effect of several antioxidants and ginseng water extracts were tested.

In the presence of a photosensitizer, liposome was oxidized easily and the oxidation index due to the peroxidation was increased. The oxidation index of liposome was increased according to the increase in temperature. When dl- α -tocopherol, β -carotene or L-ascorbic acid was added into the reaction mixture, the photooxidation of liposome was inhibited. Ginseng water extract and crude saponin inhibited the rate of oxidation index of liposome in low concentration but increase in high concentration. On the other hand, when lipid hydroperoxide of liposome was tested by ferrothiocyanate method, ginseng water extract and crude saponin acted as antioxidants.

Keywords □ Ginseng extracts, photooxidation, liposome, lipid hydroperoxide, dl- α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid.

서 론

생체내에서의 지질 과산화반응은 노화에서 뿐만 아니라 악성종양의 유발, 동맥 경화, 고혈압, 노인성 질환 및 면역 이상등의 각종 퇴행성 변화를 수반하는 질병과 관련되어 많은 관심의 대상이 되고 있다.¹⁻³⁾

지질 과산화 반응은 지질에 singlet oxygen(1O_2), superoxide anion radical(O_2^-) 및 hydroxy radical($\cdot OH$)등의 활성 산소종이 작용하여 peroxide(-O-O-)구조를 갖는 과산화 지질을 생성하는 반응이다.

白등⁴⁾은 인삼 추출물이 이러한 지질 과산화 반응을 억제하는 작용이 있다고 보고하고 있으며 韓⁵⁾은 홍

삼의 초산에틸 분획에서 maltol과 수삼의 에틸에테르 분획에서 salicylic acid, vanillic acid 및 p-hydroxy cinnamic acid등 페놀성 성분들이 항산화 성분인 것으로 확인 보고되고 있다. 또한, 崔⁶⁾는 사포닌 및 그 분해 산물들(prosapogenin 및 aglycon)이 *in vivo*와 *in vitro*에서 매우 현저한 항산화 효과가 있었으며, panaxadiol saponin에 비하여 panaxatriol saponin의 항산화 효과가 보다 더 현저하다고 보고 하고 있다.

최근에는 인공세포막인 liposome에 대한 항산화 효과에 대한 연구가 활발히 진행중이나 liposome에 대한 인삼 추출물의 영향에 대해서는 보고된 바가 거의 없다.

본 연구에서는 생체막에서의 지질과산화 반응 연구의 일환으로 liposome을 모델로 하여 광증감제에 의한 인삼 추출물의 광산화 반응을 조사하고, dl- α -tocopherol, β -carotene, L-ascorbic acid 등 항산화제들의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. Phosphatidylcholine의 정제

Liposome의 제조에 사용한 sobean phosphatidylcholine(PC)는 Sigma(P3644) Type IV-S PC를 Rouser의 방법⁷⁾을 변형하여 silicic acid column chromatography로 정제하였다. 즉, silicic acid 30 g을 120°C에서 2시간 동안 activation한 후 chloroform 약 30 ml에 현탁시켜 column(30×2.5 cm)에 부은 후 column 부피 3배 가량의 chloroform으로 세척하고 여기에 Sigma Type IV-S PC 600 mg을 chloroform에 녹인 용액을 apply하여 i) chloroform, 1 column 부피 ii) 30% methanol in chloroform, 3 column 부피 iii) 50% methanol in chloroform, 3 column 부피로 elution하여 50% methanol in chloroform에서 용출된 분획을 chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4 v/v/v) 혼합 전개액으로 TLC로 전개하여 PC 표준 물질과 같은 R_f 값을 갖는 분획을 순수한 PC로 사용하였다.

2. Liposome의 제조

Liposome은 reverse-phase evaporation method⁸⁾로 제조하였다. 즉, PC 24 mg과 cholesterol 12 mg을 chloroform에 녹인 후 질소 기체로 건조하고 다시 diethylether 3 ml에 녹여 0.1 M phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4, 1 ml를 가하여 단일상의 현탁액이 될 때까지 sonication하였다. 단일상의 현탁액은 rotary evaporator로 감압 건조하여 diethylether를 증발시킨 후 PBS 9 ml를 더 가하고 1시간 동안 rotary evaporator로 남아 있는 미량의 diethylether를 제거하여 제조하였다. 제조한 liposome은 그대로 혹은 목적에 따라 원심 분리하여 시료로 하였다.

3. 인삼의 추출

인삼의 추출물 : 인삼 분말 100 g에 물 500 ml를 가하여 100°C에서 1시간 가열한 후 감압하에 여과하고 불용물은 다시 물 300 ml를 가하여 2회 반복 추출하였다. 전체 여과액을 300 rpm에서 10분간 원심 분

리하고 상층액은 감압하에서 농축하여 freeze dryer(Mitamura Riken kogyo Inc.)로 건조하여 분말로 만들었다.

인삼 saponin류 : 금산산 인삼(4년근) 10 kg을 70, 50 및 30% ethanol로 60°C에서 24시간씩 각각 추출하고 감압 농축하여 약 5 kg의 엑기스를 얻었다. 엑기스 2 kg을 물 30 l에 녹인 다음 ether 300 l로 추출하고 물층을 수포화된 n-butanol 80 l로 3회 추출하였다. 추출액을 물 30 l로 씻은 후 감압 농축하여 crude saponin을 얻었다. crude saponin 250 g을 methanol 1 l에 용해시킨 다음 chloroform 1 l와 물 900 ml를 가하여 혼합하고 chloroform 층과 methanol 층으로 분리시킨 후 methanol 층을 감압 농축하여 diol계 saponin을 얻었고, chloroform층을 감압 농축하여 triol계 saponin을 얻었다. 얻어진 saponin류는 HPLC로 분석하였으며, 얻어진 HPLC chromatogram은 전보⁹⁾와 같다.

4. 광산화 반응

광산화 반응은 UV용 quartz cuvette에 시료 용액을 넣고 판유리로 제작한 항온조 속에 넣고 일정 온도를 유지하면서 빛을 조사할 수 있도록 하였다. 광조사 직전에 증류수를 통과한 공기로 bubbling하였다. 광원으로는 300 W tungsten lamp를 사용하였으며 시료와의 거리는 30 cm되게 하였다.⁹⁾

5. Oxidation Index 측정^{10,8)}

Oxidation index를 측정하기 위한 시료는 liposome 0.1 ml에 일정 농도의 methylene blue 및 effector의 농도가 4.38×10^{-6} M되게 가하고, PBS를 가하여 3 ml 되게한 후 잘 혼합하여 UV-Visible Spectrophotometer(Kontron Co.제)로 λ_{max} , 233 nm, 300 nm에서의 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Oxidation Index} = \frac{A_{233} - A_{300}}{\lambda_{max} - A_{300}}$$

6. Ferrothiocyanate법에 의한 Hydroperoxide 측정

Hydroperoxide를 직접 측정하기 위한 ferrothiocyanate법은 liposome 1 ml에 일정 농도의 effector와 methylene blue를 8.76×10^{-6} M 되게 가한 후 PBS를 가하여 전체 부피가 3 ml 되게한 용액을 일정 시간 동안 광조사하였다. 광조사한 시료는 Bligh & Dyer 법¹²⁾으로 lipid를 추출한 후 95% ethanol 4.8 ml와 30% ammoniumthiocyanate 0.1 ml 및 3.5% HCl 용액

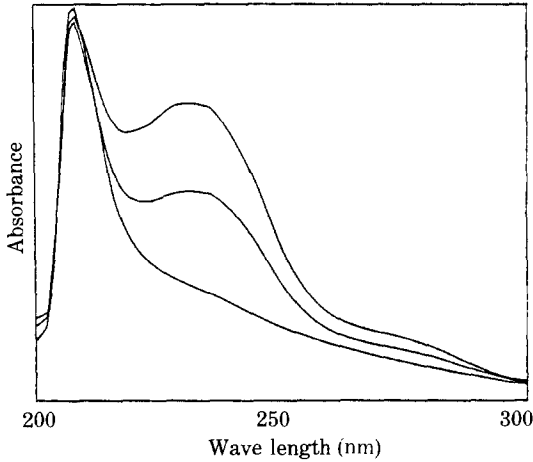


Fig. 1. Typical λ scan curves of liposomes which peroxidation level is different each other.

으로 제조한 5% Mohr's salt 1 ml를 가하여 잘 혼합하고 Mohr's salt 용액을 가한 후 정확히 3분이 되었을 때 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.¹¹⁾

7. 시약

Soybean phosphatidylcholine (Type IV-S), silicic acid(for lipid chromatography), dl- α -tocopherol, methylene blue, β -carotene 및 cholesterol은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였고, L-ascorbic acid는 Junsei Chemical Co.의 제품을 사용하였으며, 유기 용매등 일반 시약은 주로 Merck 제 특급 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Liposome의 광산화반응

Liposome 현탁액($2.16 \times 10^{-4} M$)에 광증감제인 methylene blue를 첨가하여 광조사를 시키면 Fig. 1과 같이 광조사 시간에 비례하여 233 nm에서의 흡광도가 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 이중 결합이 2개 이상인 불포화지방산의 1,4-pentadiene system이 conjugated diene system으로 변화 되면서 233 nm에서 최대흡수를 나타내기 때문이다. 따라서, Klein의 방법¹⁰⁾에 따라 최대 흡수 파장의 흡광도를 기준으로 하여 233 nm에서의 흡광도비를 oxidation index로 하여 전체 lipid에 대한 과산화지질의 생성 지표로 삼았다.

2. 광산화에 미치는 온도의 영향

온도에 따른 liposome의 광산화 정도를 알아보기 위해 5°C, 25°C, 37°C 및 45°C 각 온도에서 liposome을

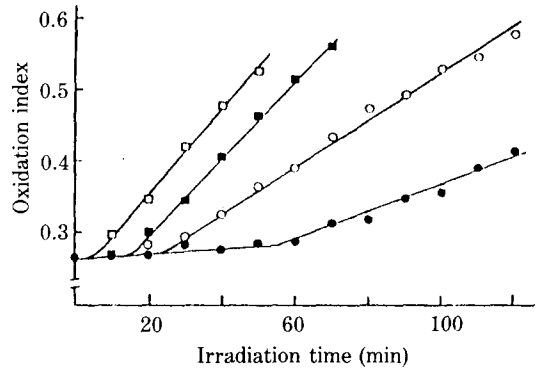


Fig. 2. The changes of oxidation index of liposome by photooxidation at different temperature. Three ml of reaction mixture contained 0.1 ml liposome and $4.38 \times 10^{-5} M$ methylene blue as photosensitizer. ●: 5°C, ○: 25°C, ■: 37°C, □: 45°C

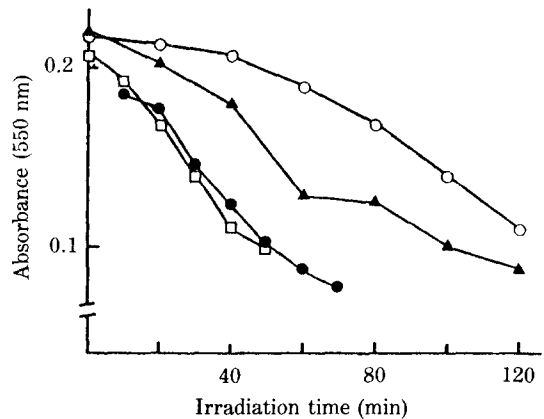
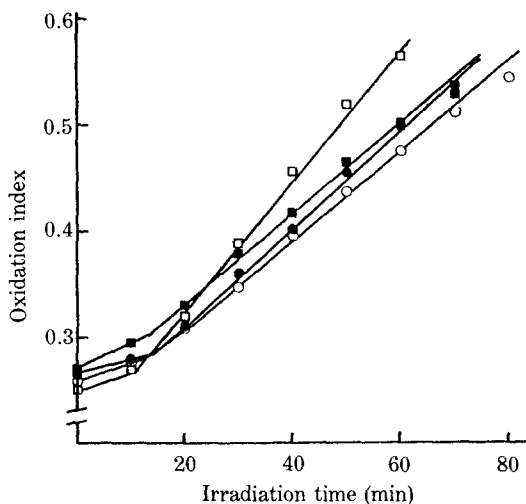


Fig. 3. The changes of turbidity of liposome solution by photooxidation at different temperature. Reaction conditions were the same as Fig. 2. ●: 5°C, ▲: 25°C, ■: 37°C, □: 45°C.

광산화시켜 oxidation index를 구한 결과는 Fig. 2과 같다. 즉, 온도가 높을수록 산화 정도는 매우 빠르며 induction period도 짧아짐을 알 수 있다. 이 결과는 Konigs¹³⁾가 광증감제를 사용하지 않고 MLV를 사용하여 liposome을 보관할 때 산화에 대한 안정성을 조사한 실험 결과와 같은 경향을 나타내고 있다. 이때 liposome의 turbidity를 550 nm에서 흡광도로 측정된 결과(Fig. 3)는 온도가 높을수록 또 산화 정도가 클수록 turbidity가 낮아지고 있어 산화가 진행되면서 liposome이 파괴되어 분해되거나 liposome의 크기가 줄어들기 때문이라고 생각된다

Table 1. The effects of ginseng water extract on photooxidation of liposome

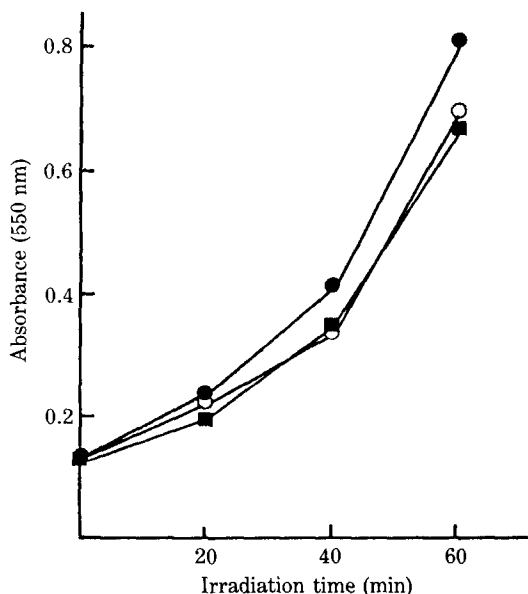
Irradiation time (min)	Concentration (%)				
	0	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹
0	0.265	0.258	0.263	0.282	1.065
10	0.267	0.272	0.283	0.311	1.078
20	0.296	0.296	0.304	0.347	1.077
30	0.342	0.339	0.351	0.395	1.039
40	0.405	0.386	0.400	0.464	
50	0.464	0.423	0.452	0.520	
60	0.516	0.472	0.495	0.548	
70	0.560	0.493	0.516	0.630	

**Fig. 4.** The effects of crude saponin on the photooxidation of liposome. Reaction conditions were the same as Fig. 2. Crude saponin added, ●: None, ○: 10⁻⁴%, ■: 10⁻³%, □: 10⁻²%

3. 광산화 반응에 미치는 인삼의 물 추출물 및 saponin류의 영향

인삼 물 추출물 및 crude saponin 류의 영향: Liposome의 광산화에 미치는 인삼 물 추출물과 crude saponin의 영향을 알아보기 위하여 liposome에 인삼 추출물의 최종 농도가 10⁻⁴%~10⁻¹% (w/v) 되도록 첨가했을 때 Table 1과 Fig. 4와 같이 인삼 추출물의 농도에 따라 oxidation index를 약간 저해하거나 오히려 증가시키는 결과를 나타내었다.

인삼 saponin이 계면 활성제로 작용¹⁴⁾ 한다고 보고된 이래 인삼 saponin 수용액의 critical micellar concentration(CMC)는 1.8% 정도이며, tocopherol¹⁵⁾, cholesterol 등¹⁶⁾과 공존하면 CMC가 저하된다고 보고

**Fig. 5.** The effects of saponin and water extract on the photooxidation of liposome measured by ferrothiocyanate method. Total lipid was extracted from irradiated reaction mixture. ●: None, ○: 10⁻³%, crude saponin, ■: 10⁻³%, ginseng water extract.

되어있다. 10⁻¹%의 인삼 물 추출물에서 매우 높은 oxidation index를 나타낸 것은 광산화 동안 유리된 lipid와 인삼 물 추출물이 micelle을 형성하여 λ_{max} 에서의 흡광도를 저하시켜 oxidation index를 증가시키기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 10⁻³%의 인삼 물 추출물에서 oxidation index를 처음에는 증가 시키다가 30분 이후 광조사에서는 oxidation index를 감소시켰으나, 이와 꼭 같은 농도에서 지질 과산화반응의 생성물인 hydroperoxide를 직접 검출할 수 있는 ferrothiocyanate 법으로 측정된 결과(Fig. 5), 10⁻³%에서 인삼 물 추출물이 뚜렷한 항산화작용이 있음을 확인 하였다. crude saponin도 oxidation index 측정시 물 추출물과 같은 경향을 보이고 있었으나, 지질 과산화 반응의 생성물인 hydroperoxide를 ferrothiocyanate 법으로 측정된 결과(Fig. 5), 역시 뚜렷한 항산화작용을 보였다. 따라서, 인삼물 추출물 및 crude saponin은 항산화 작용 이외에 계면활성 작용이 있는 것으로 생각된다.

Diol계 saponin 및 triol계 saponin의 영향: Diol계 saponin 및 triol계 saponin이 liposome의 광산화 반

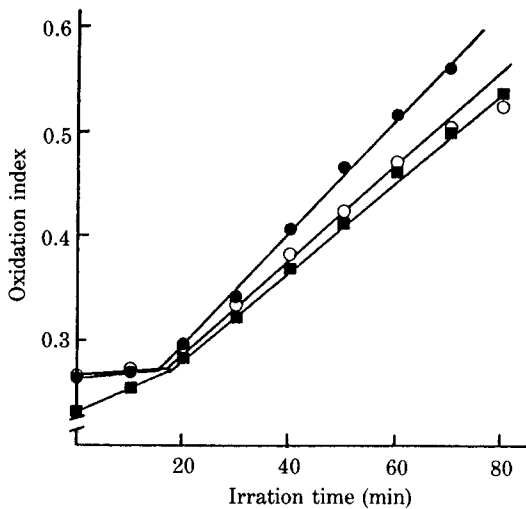


Fig. 6. The effect of diol saponin on the photooxidation of liposome. Reaction conditions were the same as Fig. 2. ●: None, ○: $10^{-3}\%$, ■: $10^{-2}\%$.

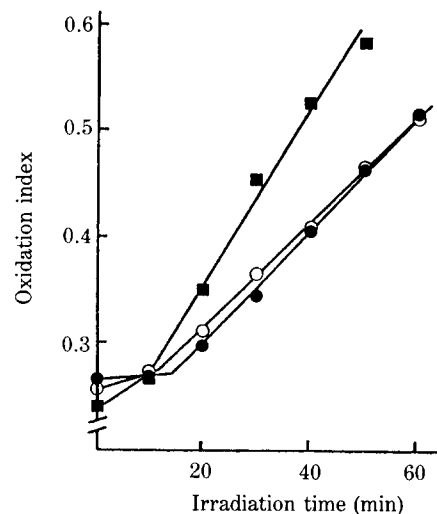


Fig. 7. The effect of triol saponin on the photooxidation of liposome. Reaction conditions were the same as Fig. 2. ●: None, ○: $10^{-3}\%$, ■: $10^{-2}\%$.

응에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6, Fig. 7 에서와 같이 diol계 saponin은 광조사에 의해 oxidation index를 억제 시켰으나, triol계 saponin은 oxidation index를 증가시키는 상반된 결과를 나타내었다.

Takagi 등¹⁷⁾은 diol계 saponin인 ginsenoside R_{b1} , R_{b2} , R_c 는 중추신경계에 진정 효과를 나타내는 반면, triol계 saponin인 ginsenoside R_{g1} 은 흥분 효과를 나타낸다고 보고하는 등 diol계 saponin과 triol계 saponin은 서로 상반되는 작용을 한다고 보고하고 있다. 崔 등¹⁸⁾은 triol saponin이 diol saponin 보다 항산화 작용이 더 큰 것으로 보고하고 있어 본 실험 결과는

인삼의 물 추출물 및 crude saponin 에서 논의된 바와 같이 인삼의 계면 활성제로서의 작용으로 인하여 triol계 saponin에서 증가된 oxidation index를 나타낸 것으로 생각된다.

4. 광산화 반응에 미치는 인삼 추출물과 항산화제들의 영향 비교

인삼 추출물이 liposome의 광산화반응에 미치는 영향을 1O_2 quencher로 알려져 있는 dl- α -tocopherol 이나 β -carotene 또는 radical quencher인 L-ascorbic acid의 영향을 비교하기 위해 1시간 동안 광조사 시킨 다음 oxidation index와 ferrothiocyanate 법으로 측정

Table 2. Changes in the absorbance of various antioxidants on the photooxidation of liposome (REV) in the presence of photosensitizer

Treatment	Ferrothiocyanate method		UV method	
	Absorbance (550 nm)	Relative absorbance	Oxidation index	Relative oxidation index
Control	0.811	100	0.516	100
dl- α -Toc.	0.659	81.3	0.375	72.7
β -Carotene	0.561	69.2	0.365	70.7
L-Ascorbic acid	0.695	83.99	0.373	77.3
Ginseng water ext.	0.673	83.0	0.495	85.9
Total saponin	0.699	86.2	0.501	97.1

Irradiation: 1 hr at 37°C . The final concentration of each antioxidant is dl- α -tocopherol: 5 mol%, β -carotene: 5 mol%, L-ascorbic acid: 0.2 mM, ginseng water ext.: $10^{-3}\%$, total saponin: $10^{-3}\%$.

비교한 결과는 Table 2와 같다. 인삼 물 추출의 경우는 15~17%의 억제 작용을 나타내었으며, dl- α -tocopherol, β -carotene 및 L-ascorbic acid 등도 좋은 항산화제 작용을 나타내고 있었다.

요 약

빛에 의한 지질 과산화반응과 그 보호 작용을 연구하기 위하여 reverse-phase evaporation법으로 제조한 liposome(REV)을 모델막으로 사용하여 여러 항산화제와 인삼 추출물이 미치는 영향을 검토하였다.

광증감제 존재하에서 liposome은 쉽게 산화되어 과산화반응에 의한 oxidation index가 증가하였다. 또한, liposome의 oxidation index는 온도의 증가에 따라 비례하여 증가하였다. dl- α -tocopherol, β -carotene 및 L-ascorbic acid를 liposome를 첨가 하였을 때, liposome의 과산화반응은 억제되었다. 인삼 물 추출물과 crude saponin은 낮은 농도로 첨가되었을 때는 liposome의 oxidation index를 저하시켰고, 높은 농도로 첨가 되었을 때는 oxidation index를 증가시켰다. 한편, Ferrothiocyanate법으로 측정하였을 때 인삼 물 추출물과 crude saponin은 항산화제로 작용하고 있음을 나타내었다.

인용문헌

1. Harman, D.: *J. Geronto*, **16**, 247 (1961).
2. Glavind, J. Hartman, S., Clemmesen, J., Jensen, K.E. and Dam, H.: *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **30**, 1 (1952).
3. Eddy, D.E., Harman, D.: *J. Am. Geriatr. Soc.*, **25**, 220 (1977).
4. Paik, T.H., Hong, J.T. and Hong, S.Y.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **14**(2), 130 (1982).
5. Choi, K.J., Kim, M.W., Hong, S.K. and Kim, D.H.: *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **26**(1), 8 (1983).
6. 崔鎮浩, 慶熙大學校 大學院 博士學位 論文(1967).
7. Kritchevsky, R.G. and Yamamoto, A.: *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. 1, Dekker. Inc. New York (1967).
8. Szoka, F. and Papahadjoulos, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 4195 (1978).
9. Paik, T.H., Chen, H.J., Kang, B.S. and Hong, J.T.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 234 (1989).
10. Klein, R.A.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **210**, 486 (1970).
11. 백태홍, 박찬식, 천현자: 한국유화학회지, **5**(1), 25 (1988).
12. Gregoriadis, G.: *Liposome Technology I*. CRC Press, Inc., p. 149 (1984).
13. Joo, C.N., Choi, I.S., Lee, S.J. Cho, S.H. and Son, M.H.: *Korean Biochem. J.*, **6**, 185 (1973).
14. Paik, T.H. and Yi, J.H.: *Korean Biochem. J.*, **19**, 199 (1986).
15. Joo, C.N. and Lee, S.J.: *ibid.*, **19**, 6044 (1980).
16. Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H.: *Japan. J. Pharmacol.*, **22**, 245 (1972).