

## 생약 추출물에 의한 superoxide와 hydroxyl 라디칼 소거능 검색 방법의 개선

강대길\* · 이호섭

원광대학교 한의학전문대학원 신약개발학과

## An Improved method in Screening of Superoxide and Hydroxyl Radical Scavenging Activities of Plant Medicinal Extracts

Dae Gill Kang\* and Ho Sub Lee

Dept. of Newly-developed Drugs, Professional Graduate School of Oriental Medicine  
Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, Korea

**Abstract** – The present study was designed for the improvement of routine measurement of superoxide and hydroxyl radical scavenging activities utilized by a microplate reader. Superoxide radical scavenging activity by the ascorbic acid, which is a well-known superoxide scavenger, was determined in a dose-dependent manner. Hydroxyl radical scavenging activity by the thiourea, which is a well-known hydroxyl radical scavenger, was also well detected in a dose-dependent manner. Our results suggest that the use of microplate reader to assay the superoxide and hydroxyl radical scavenging activities improves the accuracy of data and enables the use of much smaller amounts of samples and/or reagents, with much simpler experimental procedure. Therefore, these methods appear to be suitable for screening of superoxide and hydroxyl radical scavenging activities in both the plant medicinal extracts and the isolated compounds.

**Key words** – microplate reader, superoxide radical, hydroxyl radical, scavenging activity

생체 내에서 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 불활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥 경화, 심-혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>1-3)</sup> 이러한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화제를 개발하기 위한 연구가 오랫동안 꾸준히 진행되어 왔다. 특히 최근에 생약에서 항산화제를 개발하기 위한 노력도 활발히 진행되고 있다. 생약 중에는 polyphenols, flavonoids, terpenes, 그리고 다양한 생약 추출물들이 항산화 활성을 가지고 있는 것으

로 알려져 있다.<sup>4-10)</sup> 생약에서 항산화제를 개발하기 위해서는 일차적으로 다양한 생약추출물에서 항산화 효과를 검색하여야 하는데 지금까지 다양한 검색 방법이 제시되어 왔다. 그 중에서 DNA의 분절을 측정하는 방법, 지질 과산화를 측정하는 방법, 단백질의 분절이나 활성도를 측정하는 방법, superoxide의 소거능을 측정하는 방법, hydroxyl 라디칼의 소거능을 측정하는 방법, 용혈 반응의 억제를 측정하는 방법 등이 개발되어 항산화제의 검색에 이용되어 왔다.<sup>6,11-13)</sup> 최근 Liu 등<sup>6)</sup>은 superoxide 소거능을 측정하는 간편한 방법을 개발하여 생약 추출물의 항산화능을 측정하는데 이용하였고, Li 등<sup>9)</sup>과 Hu 등<sup>11)</sup>은 hydroxyl radical을 소거하는 방법을 개발하여 생약 추출물에서 항산화제를 개발하는데 이용하여 왔다.<sup>5,6,10)</sup> 하지만 이

\*교신저자 : Fax : 063-850-7324

들의 방법은 1) 총 용량이 3 ml의 분석으로 많은 시약과 생약 추출물이 소모되고, 2) 또한 측정하는데 많은 시간이 소모되고, 3) 측정 과정이 불편하고, 4) 생약 추출물의 고유한 색에 의한 측정 방해를 받을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이들의 방법을 개선하여 microplate reader를 이용하여 시약과 생약 추출물의 소비를 줄이고 시간을 단축시키는 방법을 개발하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험 재료** – 본 실험에서 사용된 감잎은 전북 익산에 있는 감나무에서 2000년 10월에 채취하여 사용하였다.

**시약 및 실험 기기** – 본 실험이 사용된 시약은 Sephadex G-15를 제외하고는 모두 Sigma 제품을 이용하였고 분석에 이용된 microplate reader는 Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) 사의 기기를 이용하였다.

**생약의 추출 및 분획** – 감잎 50 g을 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말로 하였으며 250 ml의 methanol로 6시간 씩 2회 추출하여 건조시킨 후 이를 다시 물에 혼탁하였다. 물에 혼탁된 추출물을 hexane, ethyl acetate, butanol, 물의 순서로 차례로 분획하여 실험 재료로 이용하였다. Hexane과 ethylacetate 분획 층은 50% ethanol에 1 mg/ml의 농도로 녹여서 사용하였고 butanol과 물 분획층은 물을 용매로 하여 각각 1 mg/ml 농도로 하여 사용하였다.

**Superoxide ( $\cdot O_2^-$ ) 소거능의 측정** – Superoxide는 phenazine methosulfate (PMS)- $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (환원형 NADH) 계에서 NADH 산화에 의하여 생성되고 nitroblue tetrazolium (NBT)의 산화에 의하여 측정한다. Microplate (96 wells)에 여러 농도의 생약 추출물을 20  $\mu$ l, 30 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)을 100 ml, 100  $\mu$ M의 PMS를 20  $\mu$ l을 차례로 넣고 microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 읽었다 (A1). Microplate에 0.5 mM의 NADH를 40  $\mu$ l, 0.5 mM NBT를 20  $\mu$ l을 차례로 첨가한 후에 다시 microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다 (A2). 시료 대신에 20  $\mu$ l의 ascorbic acid (최종 농도 500  $\mu$ g/ml)를 positive control로 이용하였고, 20  $\mu$ l 증류수를 negative control (Ao)로 하여 다음 식을 이용하여 superoxide의 소거능

을 측정하였다.

$$\text{Superoxide 소거능}(\%) = \frac{(A_o - A_2 - A_1)}{(A_o - A_1)} \times 100$$

(단, Ao는 증류수의 흡광도, A2는 시료의 흡광도)

**Hydroxyl 라디칼 소거능의 측정** – Hydroxyl 라디칼은 L-ascorbic acid-CuSO<sub>4</sub> 계에서 생성되고 cytochrome C의 산화에 의하여 측정한다. Microplate (96 wells)에 여러 농도의 생약 추출물을 20  $\mu$ l, 30 mM Na-phosphate 완충용액 (pH 7.4)을 100  $\mu$ l, 증류수 30  $\mu$ l, 1 mM ascorbic acid 20  $\mu$ l, 1 mM CuSO<sub>4</sub>를 차례로 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 background의 흡광도를 측정하였다 (A1). Microplate에 환원된 cytochrome c ( $A_{550} = 10$ )을 10  $\mu$ l 첨가하고 25°C에서 90분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다 (A2). 환원된 cytochrome C는 cytochrome C에 DL-dithiothreitol (DTT)를 과량으로 첨가하여 환원시킨 후 sephadex G-15 겔-여과 크로마토그래피 (Pharmacia 제품)를 이용하여 DTT를 제거한 후 550 nm에서의 흡광도를 10으로 조정하여 사용하였다. Thiourea (최종 농도 500  $\mu$ g/ml)을 positive control (A<sub>T</sub>)로 증류수를 negative control (Ao)로 측정하여 다음 식에 의해 hydroxyl 라디칼의 제거능을 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl 라디칼 소거능}(\%) = \frac{(A_2 - A_o - A_1)}{(A_T - A_o - A_1)} \times 100$$

## 결과 및 고찰

Microplate reader를 이용하여 superoxide 라디칼 소거능을 측정하는 방법이 신뢰할 수 있는 방법인지를 판단하기 위하여 superoxide 라디칼 소거능이 뛰어나다고 알려진 ascorbic acid<sup>5,6</sup>를 농도 의존적으로 첨가한 후 superoxide 라디칼 소거능을 측정하였다. NBT가 superoxide 라디칼에 의하여 산화됨에 따라 560 nm에서의 흡광도는 증가하는데 ascorbic acid를 첨가하여 주었을 때 농도 의존적으로 560 nm에서 흡광도가 정비례식으로 감소하였다 (Fig. 1). Fig. 2에서는 hydroxyl 라디칼 소거능을 microplate reader를 이용한 방법이 신뢰할 수 있는 방법인지를 측정하기 위하여 hydroxyl 라디칼 소거능이 뛰어나다고 알려진 thiourea<sup>3,6</sup>를 농도 의존적으로 첨가한 후 550 nm에서

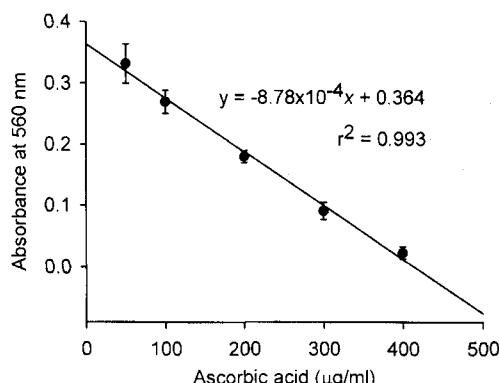


Fig. 1. Direct linear plot for superoxide radical scavenging activities as determined by the microplate reader. Values are mean  $\pm$  S.E. (n=3).

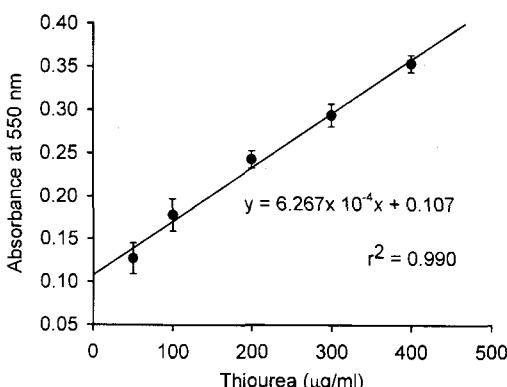


Fig. 2. Direct linear plot for hydroxyl radical scavenging activities as determined by the microplate reader. Values are mean  $\pm$  S.E. (n=3).

cytochrome C의 산화 정도를 측정하였다. 그 결과 thiourea 농도 의존적으로 cytochrome C의 산화가 정비례로 억제되었다. 따라서 microplate reader를 이용한 superoxide와 hydroxyl 라디칼의 소거능 측정 방법이 신뢰할 만한 수준이라 판단되어 항산화 물질을 많이 함유한 것으로 알려진<sup>14)</sup> 감잎(한약재 명: 시엽)을 선택하여 이 방법을 적용하였다. 감잎을 methanol로 추출한 후 hexane, ethylacetate, n-butanol, H<sub>2</sub>O로 각각 용해도 차이에 의해 분획하여 항산화 활성을 측정하였다. 감잎의 분획물 중에서 물, n-butanol, ethyl acetate 분획물 순서로 superoxide 라디칼 소거능이 가장 높았고 hexane 분획물이 가장 낮았다 (Table I). Hydroxyl radical 소거능은 n-butanol 층이 100% 억제하였고 ethylacetate, 물, hexane 분획물

Table I. The superoxide radical scavenging activities of partitions of *Morus alba* leaves as determined by microplate reader method

	Solvents			
	Hexane	Ethylacetate	n-Buthanol	H <sub>2</sub> O
200 μg/ml	13.6 ± 1.04	72.1 ± 1.31	76.3 ± 1.05	87.8 ± 0.32
100 μg/ml	1.2 ± 5.62	41.6 ± 3.93	67.4 ± 0.96	69.7 ± 3.55

Data means % scavenging activities of superoxide radical. Values represent mean  $\pm$  S.E. (n=3)

Table II. The hydroxyl radical scavenging activities of partitions of *Morus alba* leaves as determined by microplate reader method

	Solvents			
	Hexane	Ethylacetate	n-Buthanol	H <sub>2</sub> O
200 μg/ml	20.1 ± 3.56	42.1 ± 7.11	101.0 ± 1.18	39.8 ± 0.74
100 μg/ml	9.1 ± 2.95	33.0 ± 0.90	54.2 ± 0.82	19.6 ± 1.28

Data means % scavenging activities of hydroxyl radical compared to positive control (500 μg/ml of thiourea). Values represent mean  $\pm$  S.E. (n=3)

순서로 hydroxyl 라디칼 소거능이 높았다 (Table II). 최근 연구에서 감잎에는 kaemferol 유도체, quercetin 유도체와 같은 flavonoids가 다량 함유되어 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>14)</sup> 감잎을 용매를 이용하여 분획하였을 때 n-butanol 층의 항산화 활성이 가장 높은 것은 이와 같은 flavonoids가 대부분 n-butanol 층으로 분획되어지기 때문이라 여겨진다.

생약 추출물에서 유효 성분을 검색할 때는 많은 수의 시료를 분석해야 하기 때문에 실험 과정이 간단하고 짧은 시간에 분석을 할 수 있으면 좋다. 그리고 분석에 필요한 시약이나 추출물이 적은 양이 들어갈 수록 유리하다. 본 연구에서 이용된 superoxide 라디칼 소거능 검색은 한번 분석에 생약 추출물이 20 μg만 필요하고 분석에 필요한 시간도 96가지 시료를 분석하는데 단지 30분이 소요되었다. 그리고 Liu 등의 방법<sup>5,6,10)</sup>에 비해 1/15의 시약으로도 분석이 가능하였다. Hydroxyl 라디칼의 소거능 또한 Hu 나 Li 등의 방법<sup>5,9,10,11)</sup>에 비해 훨씬 적은 양의 생약 추출물 (1/15)로 짧은 시간에 적은 양의 시약으로도 분석이 가능하였다. 생약 추출물은 정제하는 과정에서 그 양이 계속 적어진다. 그러므로 항산화 화합물을 정제할 때 이러한 방법을 이용하는 것은 매우 유리하리라 사료된다. 또한 생약 추출물은 여러 가지의 flavonoid, 엽록소, alkaloid 등을 포함하고 있기 때문에 고유의 색

을 띠게 되는데 이러한 고유한 색은 superoxide 나 hydroxyl 라디칼의 소거능 분석시 방해 작용을 할 수 있다. 하지만 Liu 나 Hu 등의 분광광도계를 이용한 분석법에서는 이러한 background를 효과적으로 제거하기가 힘들다. microplate reader를 이용한 방법은 생약 추출물이 가지는 고유의 색에 의한 흡광도를 간단하고 효과적으로 제거할 수 있었다.

## 결 론

생약 추출물에서 superoxide 라디칼과 hydroxyl 라디칼의 소거능을 검색하는 방법을 개선하기 위하여 microplate reader를 이용한 방법을 개발하였다. 그 결과 superoxide 라디칼과 hydroxyl 라디칼의 소거능이 ascorbic acid와 thiourea에 의하여 농도 의존적으로 정비례하게 증가됨을 관찰하였다. 김잎을 용매로 분획한 시료에서는 물 분획물이 superoxide 라디칼 소거능이 가장 높았고, n-butanol 분획물이 hydroxyl 라디칼의 소거능이 가장 높았다. 분석에 이용된 시료와 생약 추출물은 기존의 방법에 비해 1/15 정도로 적은 양으로도 분석이 가능하였고, 분석에 필요한 시간도 크게 단축되었으며, 생약 추출물의 고유한 색에 의한 분석 방해 작용을 제거할 수 있어서 더 정확한 분석을 할 수 있었다.

## 사 사

이 연구는 교육부의 두뇌한국 21(BK-21)과 2000년도 원광대학교 의약자원연구센터(MRRC)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Kensler, T. W., Trush, M. A. (1984) Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ. Mutagen.* **4**: 593-616.
- Richter, C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* **241**(1-2): 1-5.
- Cerutti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet* **344**(8926): 862-863.
- Zhou, Y. C., Zheng, R. L. (1991) Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **42**(6): 1177-1179.
- Ng, T. B., Liu, F., and Wang, Z. T. (2000) Antioxidant activity of natural products from plants. *Life Sciences.* **66**(8): 709-723.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., and Chang, S. T. (1997) Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences.* **60**(10): 763-771.
- He, Z. D., Lau, K. M., Xu, H. X., Li, P. C., and But, P. P. H. (2000) Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 483-486.
- Duh, P. D. and Yen, G. C. (1997) Antioxidant activity of three herbal water extracts. *Food Chem.* **60**(4): 639-645.
- Li, J., Zheng, R. L., Liu, Z. M., Jia, Z. J. (1992) Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides on superoxide and its antioxidation effect. *Acta Pharmacologica Sinica.* **13**(5): 427-430.
- Liu, F. and Ng, T. B. (2000) Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences.* **66**(8): 725-735.
- Hu, T. X., Chen, J. Y., Lu, J. Y., Yang, Q. Y. (1992) *Acta Biochim. Biophys. Sinica.* **24**: 465-470.
- Amstrong, D. (1998) Free radical and antioxidant protocol. Humana Press, New Jersey.
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302-310.
- Kim, S. Y., Gao, J. J., Lee, W. C., Ryu, K. S., Lee, K. R., Kim, Y. C. (1999) Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Arch. Pharm. Res.* **22**(1): 81-85.

(2001년 8월 11일 접수)