Korean Journal of Life Science
Vol. 11. No. 6. 503~508, 2001

석창포 정유성분의 항산화활성

구병수 · 이동웅[1]*

동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실
[1]동국대학교 자연과학대학 생화학과

Antioxidative Effect of the Essential Oil from the Rhizomes of *Acorus gramineus*

Byung-Su Gu and Dong-Ung Lee[1]*

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Seoul 135 010, Korea
[1]Department of Biochemistry, College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

The essential oil of *Acorus gramineus* (Araceae), which has been used as an anticonvulsant in Korean folk medicine, was evaluated for its effects on antioxidative system *in vitro* and *in vivo*. This mixture of terpenes showed inhibitory effects on xanthine oxidase activity with 13.3% at 10 μg/ml and on aldehyde oxidase activity with 5.0% at 1 μg/ml. Lipid peroxidation was inhibited by 49.4% at 1.0 mg/ml of the essential oil *in vitro* and by 16.7% after 7 days inhalation of an oil as compared to PTZ-treated control group. DPPH radical scavenging activity of this essential oil was ralatively weak.

Key words – *Acorus gramineus*, Araceae, essential oil, antioxidative effect

서 론

석창포(石菖蒲; *Acorus gramineus* Solander)는 천남성과(Araceae)에 속하는 다년생 초본으로 한국, 중국, 일본등지에서 자생하고 있다[1]. 이 생약은 신농본초경[16]에 開心孔竅, 通九竅하는 效能이 있어 小兒溫瘧, 藿亂轉筋, 中惡卒死, 癲癎 등에 쓰이며, 腦神經의 疲鈍으로 인하여 나타나는 視聽障害, 氣閉, 神志不淸, 痰逆心竅, 昏暗, 健忘등에 사용한다 하였고, 오늘날 한방에서는 석창포의 근경을 진정, 항경련, 건위등의 목적으로 처방하고 있다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 054-770-2224, Fax : 054-742-9833
E-mail : dulee@dongguk.ac.kr

석창포에 관한 연구로는 추출물에 대한 항산화활성[12], GABA transaminase 억제활성[12], 억제성 신경수용체 효능활성[7], 흥분성 신경독성 억제효과[3,5], 중추신경계 억제효과[10]등이 보고된 바 있다. 그러나 석창포의 정유성분에 대한 약리효능에 관한 연구는 최근 저자 등이 뇌세포 보호효과를 보고[4]한 것 외에는 아직 이렇다 할 연구가 알려져 있지 않다. 석창포에는 0.11-0.42%의 정유가 함유되어 있으며 주성분인 β-asarone (63.2~81.2%) 외에 α-asarone (8.8~13.7%)을 비롯하여 약 30여종의 성분이 보고되어 있다[6].

최근, 각종 뇌신경질환과 허혈성 신경손상, 중추신경계 장애 등의 원인이 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성과 분해기구의 조절과 직접적인 관련이 있다

는 보고가 이어지고 있다[8,9,13]. 즉, 이러한 조절기구의 상실로 과잉의 ROS가 뇌조직의 지질과산화를 유도함으로써 세포막이 손상되어 각종 뇌신경계 장애가 발생한다는 사실이 계속 밝혀지고 있다.

저자 등은 천연물로부터 항산화활성 성분을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 한방에서 신경장애 질환에 처방되고 있는 9종의 생약에 대하여 항산화활성을 검색하여 석창포 추출물이 *in vitro* test에서 비교적 강한 항산화활성을 가지고 있음을 보고한 바 있다[12]. 이번 연구에서는 석창포 정유의 항산화활성을 *in vitro*에서 검토하고 또한 정유향기액의 흡입이 뇌중 과산화지질의 생성을 억제하는지를 확인하기 위하여 경련을 유발시킨 실험동물모델을 이용하여 *in vivo*에서 항산화활성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

석창포는 동국대학교 강남한방병원에서 처방하고 있는 약재를 사용하였으며 건조된 약재를 분말로 하여 사용하였다. Malondialdehyde, sodium dodecylsulfate, *N*-methylnicotinic acid amide, 2-thiobarbituric acid, xanthine mono sodium salt, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)등은 Sigma사 (St. Louis, USA) 제품을 사용하였으며 기타 시약은 국산 특급을 사용하였다. 실험동물은 한국실험동물개발로 부터 구입한 외관상 건강한 ICR계 웅성 mouse (30±1 g)를 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건으로 사육하여 실험에 사용하였다.

정유분획의 제조

석창포 건조분말 600 g에 *n*-hexane 2 ℓ를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다. 추출액을 여과한 다음, 여액에서 용매를 증류하여 제거하고 암록색의 맑은 정유액 6.6g을 얻었다.

효소원의 제조

실험동물에서 뇌조직을 적출한 다음, 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 약 4℃에서 homogenizer (Heidolph RZR 2021)로 마쇄하였다.이 마쇄균질액을 600×*g*에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상징액을 다시 1시간 동안 100,000×*g*에서 초원심분리하여 cytosol분획을 얻어 효소원으로 사용하였다. 상기의 모든 조작은 0~4℃에서 실시하였다.

Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase (type O) (EC 1.2.3.2) 활성 측정은 Stirpe 등의 방법[15]에 준해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine (mono sodium salt) 60 μM 및 효소원 0.2 ml를 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid 를 가하여 단백질을 제거시키고 원심분리하였다.이때 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다.

Aldehyde oxidase 활성 측정

Aldehyde oxidase (EC 1.2.3.1) 활성 측정은 Rajagopalan 등의 방법[14]에 의해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 *N*-methylnicotinic acid amide 1.5 mM과 효소원 0.4 ml를 첨가해 37℃에서 20분간 반응시킨 다음, 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료후, 생성된 6-pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 6-pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

과산화지질 함량 측정

*In vitro*에서의 과산화지질 함량 측정은 Ohkawa등의 방법[11]에 준해 뇌조직 마쇄균질액 0.1 ml에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% 2-thiobarbituric acid용액을 가해 95℃에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 착색물질을 n-butanol : pyridine (15 : 1, v/v) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1 g당 malondialdehyde의 양을 nmole로 나타내었다.

In vivo test에서는 석창포 정유액 5 g을 petri dish에 넣고 최소한의 공기만 통하는 특수 cage를 이용하여 7일간 실험동물에 흡입시켰으며 마지막 흡입 1시간 후 pentylenetetrazole 70 mg/kg을 0.1 ml 피하주사하고 30분후에 처치한 다음, 뇌를 적출하여 뇌중 과산화지질의 양을 위와

같은 방법으로 측정하였다.

DPPH radical 억제효과 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 함량 측정은 Blosi의 방법[2]에 따라 각 농도별 시료 0.1 ml에 DPPH radical의 1.5×10^{-5} M ethanol용액 4 ml를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. DPPH radical의 소거활성은 다음 식으로 산정하였다.

Radical scavenging activity (%) =

$$\{(OD_{control}-OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

단백질 정량 및 통계처리

효소원중의 단백질은 Bradford법으로 정량하였으며 모든 실험결과는 mean±S.E로 표시하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

Xanthine oxidase 활성에 미치는 영향

Xanthine oxidase는 free radical 생성효소의 일종으로 radical 생성과정에서 xanthine dehydrogenase로부터 형전환되어 생화학적 반응을 촉매하는 중요한 역할을 하고 있다. 흰쥐 뇌조직의 cytosol을 효소원으로 하고 xanthine을 기질로 하는 xanthine oxidase 활성을 측정하는 반응액내에 석창포 정유분획을 농도를 달리하면서 첨가시킨 다음, 효소활성을 측정한 결과, 0.01 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 13.3% 정도 효소활성을 억제시키는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 그리고 0.1 mg/ml의 농도에서는 대조군과 같은 활성을 보였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 효소활성을 증가시키는 것으로 나타나 과량의 정유는 효소억제 효과가 없는 것으로 관찰되었다.

Aldehyde oxidase 활성에 미치는 영향

Aldehyde oxidase는 xanthine oxidase와 마찬가지로 free radical을 생성하는 산화효소이며 acetaldehyde, 핵산염기, pyridoxal등의 산화에 관여하나 xanthine을 기질로 하지 않는다는 점에서 xanthine oxidase와 구별된다. 생체내의 조효소로서 다양한 생화학적 산화반응에 관여하며 여

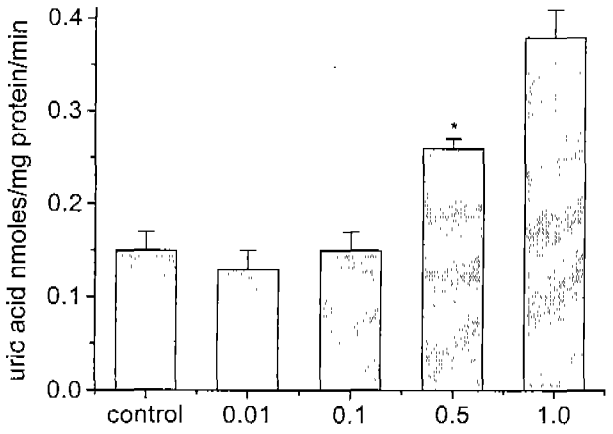

Fig. 1. Concentration-dependent inhibitory effect of the essential oil of *A. gramineus* on the brain xanthine oxidase activity *in vitro*.

Data represent the mean±S.E. of 3 independent experiments.

*: statistical significance ($p<0.05$) compared to the control group.

러종류의 생리기능을 조절, 보존하여 항상성유지에 중요한 역할을 하는 NAD의 대사산물인 *N*-methylnicotinic acid amide를 기질로 하고 흰쥐의 뇌 cytosol분획을 효소원으로 하는 반응액중에 석창포의 정유분획을 용량별로 첨가하고 aldehyde oxidase의 활성변화를 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.001 mg/ml의 낮은 농도에서 대조

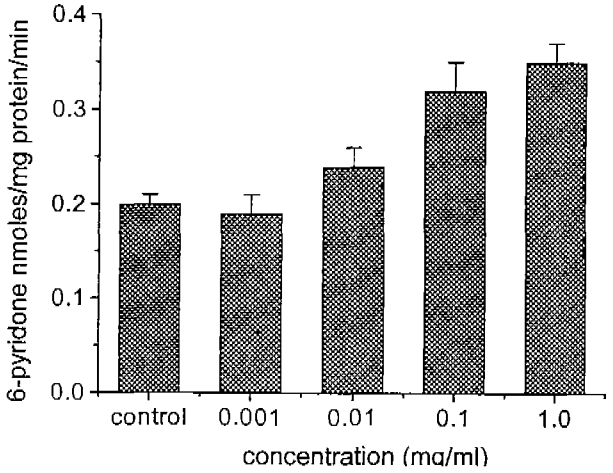

Fig. 2. Concentration-dependent inhibitory effect of the essential oil of *A. gramineus* on the brain aldehyde oxidase activity *in vitro*.

Data represent the mean±S.E. of 3 independent experiments.

군에 비해 5.0%의 효소활성 억제효과를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 오히려 효소활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 석창포 정유가 xanthine oxidase의 활성을 억제시키는 농도가 0.01 mg/ml이며 그 이상의 농도에서는 활성을 증가시킨다는 실험결과와 종합해보면, 두 종류의 활성산소종 생성계 효소활성은 낮은 농도의 정유액에서는 억제되나 농도가 높아질수록 오히려 증가되어 과량의 정유는 오히려 활성산소종 생성을 촉진시킬 수도 있는 것으로 예상된다.

*In vitro*에서의 지질과산화 억제효과

세포막의 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 각종 활성산소종에 의해 과산화반응을 일으키며, 이 때 생성된 과산화지질은 뇌신경세포를 비롯한 세포막 손상의 주요 원인이 되는 것으로 알려지고 있다. 따라서 지질과산화 반응의 억제는 생약의 항산화활성 검증에서 가장 중요한 지표로 이용되고 있다. 과산화지질 생성 실험조건의 시험관내에 뇌조직 마쇄액과 석창포 정유의 용량을 달리하면서 첨가시켜 과산화지질의 생성정도를 판찰하였다. 그 결과, 용량이 증가할수록 과산화지질의 생성이 크게 억제되는 용량의존적 경향을 보여주었다 (Fig. 3). 특히, 1.0 mg/ml의 농도에서 생성된 MDA의 양이 조직 1 g당 13.3 nmoles로서 대조군에 비해 지질과산화 반응이 49.4% 억제되었으며 10.0 mg/ml에서는 10.6 nmoles로서 56.7%가 억제되어 우수한 효과를 나타내었다.

*In vivo*에서의 지질과산화 억제효과

석창포 정유액을 흡입시킨 실험동물에서 인위적으로 유발된 지질과산화가 어느 정도 억제되는지를 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 생리식염수만을 투여한 대조군에서는 과산화지질의 양이 조직 1 g당 19.7 MDA nmoles이었으며 pentylenetetrazole (PTZ) 투여군에서는 25.8 MDA nmoles로 나타나 인위적인 경련유발시 뇌중 과산화지질이 23.6%정도 증가됨을 알 수 있었다. 그러나 향기액을 7일간 흡입시켰을 때는 뇌조직중의 과산화지질이 21.5 MDA nmoles로 떨어져 향기액 흡입으로 과산화지질의 양이 PTZ 투여군에 비해 16.7% 감소되는 것으로 조사되었다.

DPPH radical 소거효과

항산화활성을 검정하는 또 다른 지표로서 사용되는 DPPH 라디칼 소거효과에서는 석창포 정유액의 용량이 증가함에 따라 효과가 증가하는 경향은 있으나 그 효과는 낮게 나타

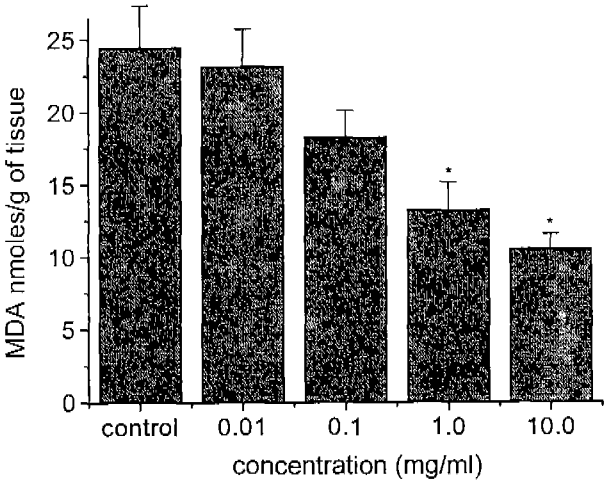

Fig. 3. Concentration-dependent inhibitory effect of the essential oil of *A. gramineus* on brain lipid peroxidation *in vitro*. Data represent the mean±S.E. of 3 independent experiments.
*: statistical significance ($p<0.05$) compared to the control group.

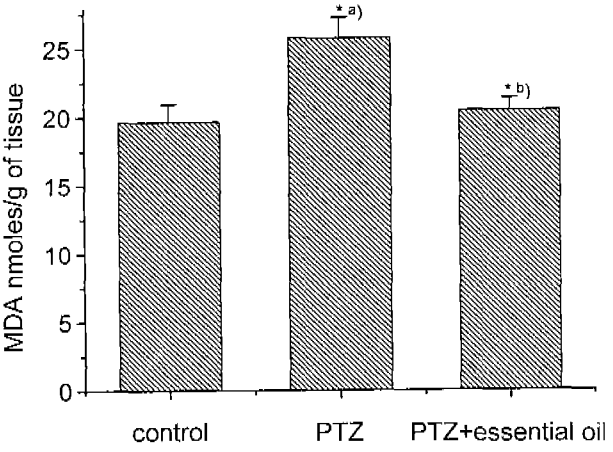

Fig. 4. Effect of the essential oil of *A. gramineus* on brain lipid peroxidation *in vivo*. Mice were inhalated with essential oil for 7 days.
Data represent the mean±S.E. of 3 independent experiments.
*a): statistical significance ($p<0.05$) compared to the control group.
*b): statistical significance ($p<0.05$) compared to the PTZ-treated group.

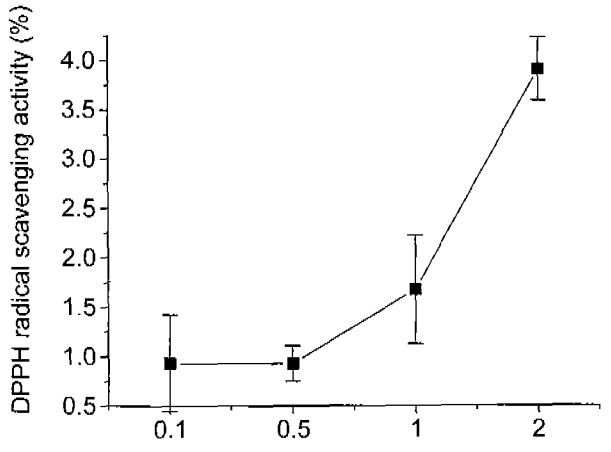

Fig. 5. Concentration-dependent DPPH radical scavenging activity of the essential oil of *A. gramineus*.
Data represent the mean±S.E. of 3 independent experiments.

나 2 mg/ml의 농도에서도 약 4%정도의 소거효과만을 보였다 (Fig. 5). 따라서 석창포 정유액은 라디칼을 직접적으로 제거하는 효과는 미약한 것으로 분석된다.

요 약

한방에서 경련억제의 목적으로 처방되고 있는 석창포의 정유액을 분리하여 활성산소종 생성계 효소인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase에 대한 억제활성을 *in vitro*에서 측정하고 지질과산화 억제효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 각각 조사하였으며 DPPH radical 소거효과를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

석창포 정유는 xanthine oxidase에 대해서는 0.01 mg/ml에서 13.3%, aldehyde oxidase에 대해서는 0.001 mg/ml에서 5.0% 각각 효소활성을 억제하였으나 과량에서는 오히려 효소활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 지질과산화 억제효과는 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 49.4% 억제하여 우수한 효과를 보였으며 향기를 7일간 흡입시킨 *in vivo* test에서는 인위적으로 지질과산화를 유발시킨 대조군에 비해 과산화지질이 16.7% 감소되었다. 그러나 DPPH radical에 대한 소거효과는 2.0 mg/ml에서 약 4%의 미미한 효과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Bensky, D. and A. Gamble. 1986. Chinese herbal medicine. 594-595, Eastland Press, Seattle.
2. Blosi, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable freeradical. *Nature* **181**, 1199-1202.
3. Cho, J. S., N. E. Joo, J. Y. Kong, D. Y. Jeong, K. D. Lee and B. S. Kang. 2000. Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of Acori graminei rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31-37.
4. Cho, J. S., J. Y. Kong, D. Y. Jeong, K. D. Lee, D. U. Lee and B. S. Kang. 2001. NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from therhizomes of Acorus gramineus. *Life Sci.* **68**, 1567-1573.
5. Cho, J. S., C. H. Yang, C. G. Park, H. S. Lee and Y. H. Kim. 2000. Inhibitionof excitotoxic neuronal cell death by total extracts from oriental medicines used for stroke treatment. *Yakhakhoeji* **44**, 29-35.
6. Fujita, S. I., R. Suemitsu and Y. Fujita. 1970. Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories. XXV. Components ofthe essential oils of Acorus gramincus. *Yakugaku Zasshi* **90**, 1367-1371.
7. Ha, J. H., D. U. Lee, Y. K. Park and B. S. Kang. 1999. Agonistic Activities to the Benzodiazepine Receptor by Extracts of Medicinal Plants (I). Screening of Some Sedative Plant Extracts. *Sengyakhak-Hoeji* **30**, 211-215.
8. Hall, E. D. and M. J. Braughler. 1988. The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute CNS trauma. In *'Oxygen radicals and tissueinjury'* (ed. Hallwell, B.), 92. FASEB Bethesda, M.D.
9. Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1614.
10. Liao, J. F., S. Y. Huang, Y. M. Jan, L. L. Yu and C. F. Chen. 1998. Centralinhibitory effects of water extract of Acori graminei rhizoma in mice. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 185-93.
11. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yaki. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
12. Park, Y. K., B. S. Kang, E. K. Yun, S. I. Kang, C. H. Park, D. U. Lee, J. H.Ha and K. Huh. 2000. Effects of some sedative oriental medicines onneurotransmission and antioxidative system *in vitro*. *Yakhakhoeji* **44**, 22-28.
13. Pellegrini-Giampietro, D. E., G. Cherici, M. Alesiani, V. Carla and F. Moroi. 1990. Excitatory amino acid release and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.* **10**, 1035-1040.

14. Rajagopalan, K. V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification andproperties. *J. Biol. Chem.* **237**, 922-928.
15. Stirpe, F. and E, Della Corte. 1969. Theregulation of rat liver xanthine oxidase : Conversionin vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
16. 牛兵占. 1996. 神農本草經. 9, 河北科學技術出版社. 河北省.

(Received August 26, 2001; Accepted November 2, 2001)