

옷나무류의 항산화력 및 항산화 효소 활성

정형진, 김은희¹⁾, 이건주, 정규영, 임종국, 유정민, 심영은, 박재호
안동대학교 자연과학대학 ¹⁾서라벌대학

Evaluation of the antioxidant potential and enzyme activities in species of *Rhus*

Hyung jin Jeong, Eun Hee Kim¹⁾, Kun Ju Lee, Gyu Young Chung,
Jong Kuk Lim, Jung Min Yoo, Young Eun Shim and Jae Ho Park
Natural Science College, Andong National University, Andong, 760-749, Korea.
¹⁾Sorabol College, Kyongju, 780-711, Korea.

ABSTRACT

Comparison of the antioxidant potential and enzyme activities of the extracts of *Rhus* showed considerable differences. The antioxidative activities of *Rhus javanica* were the highest of three species tried (7 $\mu\text{g/ml}$). The highest activities showed in fraction No. 3 of 12 fractions by Sephadex LH-20 column chromatography and the antioxidative activity showed, in purified extract of each stem, 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (in *Rhus verniciflua*), 1.9 $\mu\text{g/ml}$ (in *Rhus javanica*) and 2.3 $\mu\text{g/ml}$ (in *Rhus tricocarpa*) respectively. These were identified as phenolic compounds which are well known antioxidant compounds such as 2-propenoic acid (Caffeic acid), Benzoic acid (Gallic acid), 7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-Benzopyran-2-one (Scopoletin). POD activities of stem were higher than leaf. Especially, POD activity in stem of *Rhus javanica* was 193 times higher than leaf. *Rhus tricocarpa*, however, showed very low POD activity. SOD activities of stem were higher than that of leaf in *Rhus javanica* and *Rhus verniciflua* but in *Rhus tricocarpa*, the activity of leaf was 25 times higher than that of stem.

Key words : DPPH, *Rhus javanica*, *Rhus verniciflua*, *Rhus tricocarpa*

서 언

옷나무과 (Anacardiaceae)에 속하는 옷나무 (*Rhus verniciflua*)는 중국으로부터 도입된 낙엽활엽 소교목으로, 옷나무의 수액을 옷이라하여 도료 및 공업

용으로 사용하고 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비 등에 약재로 사용한다 (Shin, 1986). 옷나무의 화학성분은 수피의 물 추출물에서 fisetin, fustin이 알려져 있고, gum 추출물에서 분리한 urushiol은 독성을 갖는데 토끼의 혈압을 낮추고 사람의 피부에 patch-test

Corresponding author: 정 형 진, 우. 760-749, 경북안동시 송천동 388 안동대학교 생명자원과학부
E-mail: jhj@andong.ac.kr

에서 양성반응을 일으킨다고 알려져 있다 (Chae 등, 1988).

인류의 기원이래 암등과 같은 만성적 질병이 꾸준히 증가하고 있어 인간수명의 연장은 불가능한 것처럼 보여지고 있다 (Ames 등, 1993). 1956년에 인간의 노화는 산소라디칼에 의해서 결정되어진다고 주장한 이래 (Harman, 1956), 노화에 대한 free radical의 이론에 대한 상당한 증거가 축적 되어지고 있다 (Beckman 과 Ames, 1998; Shigenaga 등, 1994). 특히 노화는 세포에 손상되고, 산화된 단백질의 축적이라고 하며, 이러한 현상은 산화된 단백질을 분해시키는 효소인 Proteasome능력의 감소에 있다고 한다 (Stadtman, 1992; Rivette, 1985). 활성산소종은 생물계에 있어서 전자전달 반응과정동안에 이루어진다.

모든 호기성 진핵생물에서 산소분자의 감소는 superoxide anion radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide, hydroxyl peroxide, hydroxyl radical과 같은 독성이 높은 활성산소종을 생성시킨다 (Allen, 1995; Fridovich, 1986; Pitcher 등, 1996). 이로 인하여 세포의 유사분열과 암세포의 증식을 초래 한다. 따라서 생물들은 이런 독성으로부터 자신을 보호하기 위하여 방어 물질인 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), glutathione reductase, ascorbate peroxidase 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathion, carotenoid 등의 항산화물질을 생성시킨다 (Alscher 와 Hess 1993). Endogenous 비효소적 항산화제들은 extracellular와 intracellular 활성산소종에 대해 주요 방어를 하고 특히 glutathion은 free radical의 scavenger, 항산화효소인 glutathione peoxidase (GPX)의 기질로서 산화적 DNA의 직접적 repair로서 항산화 방어기작으로 작용한다. α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid 같은 exogenous 항산화분자들은 지질의 peroxidation에 의한 free radical chain 반응에 관여하는 것으로 보고되어 있다 (Lee, 1997; Yu 1994). 이러한 항산화 물질들은 종양생성 및 환부의 전이를 촉진 시키는 protease 억제제들을 억제시켜 세포의 성장조절을 유도시킨다고 알려져 있다 (Suh 등, 1999).

따라서 본 연구에서는 비록 혐오 및 독성식품이

지만 민간에서 위통 및 숙취제거로 사용되고 특히 구전으로 여러 가지 효능있다고 알려지고 있는 옷나무류의 항산화 효과를 탐색하기 위해 한국에서 자라고 있는 옷나무속 3종으로 부터 부위별 항산화성 물질을 분리 동정하고 항산화 효소활성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 추출

옷나무속인 개옷나무 (*Rhus tricocarpa*), 옷나무 (*Rhus verniciflua*) 및 붉나무 (*Rhus javanica*)를 경북 영양 일월산 일대에서 1999년 7월에 부위별로 채취하여 양건 후 분쇄하여 시료로 사용하였다. 추출은 Fig. 1과 같이 분획 추출하여 ethyl acetate층을 질소가스로 농축한 후 냉동보관하여 항산화활성 assay를 위한 시료로 사용하였다. Ethyl acetate 추출 시료를 Sephadex LH-20 column chromatography (100% MeOH)를 행하여 12개의 활성분획을 얻었으며, 이를 항산화활성 assay와 GC/MS 분석 시료로 사용하였다.

DPPH free radical scavenging activity 측정

Cuvette내에 농도별 test sample과 300 μ M DPPH 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응 후 515 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다. UV 측정시 반응액의 흡광도가 1.0이 넘지 않도록 DPPH 용액을 희석하여 조정하였다. 시료처리에 의한 억제율은 DMSO가 처리된 대조구와 비교하여 계산하였고, IC₅₀ 가는 50% DPPH free radicals를 제어시키는 시료 농도로 계산하였다.

Antioxidant 동정 - GC/MS 분석

항산화물질의 동정을 위하여 GC/MS (Hewlett Packard 6890/5973)을 이용하였으며, Column은 Ultra-2 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane), Oven 조건은 80 $^{\circ}$ C에서 시작하여 분당 3 $^{\circ}$ C씩 250 $^{\circ}$ C까지 승온하였으며, 250 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였다. 운반체는 He 가스를 사용하였으며, 유속은 0.8 ml/min로 분석하였다.

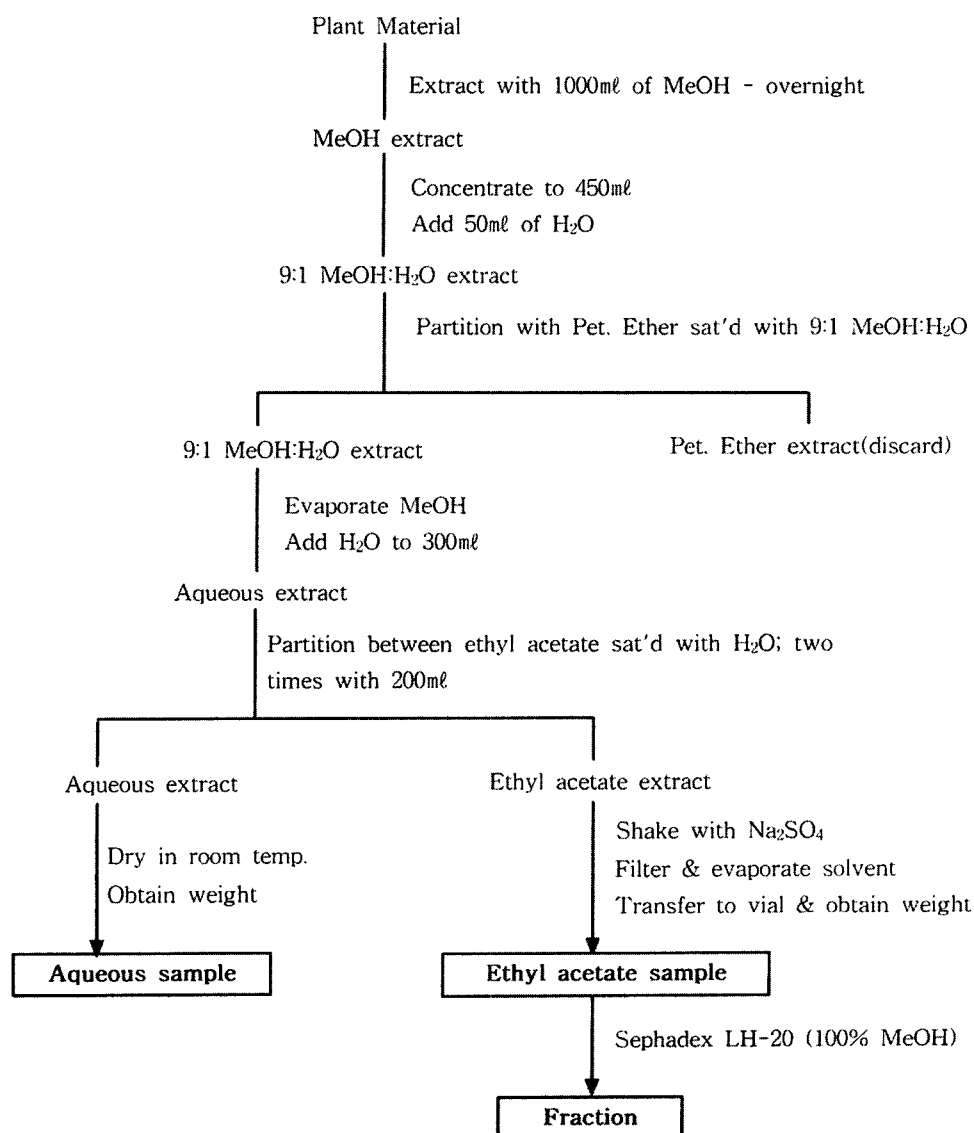


Fig. 1. Isolation procedure of the antioxidative compounds from the plant extracts of species of *Rhus*.

Table 1. Antioxidant activities of leaf and stem in three species of *Rhus*

Taxa	Plant position	IC ₅₀ ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Rhus tricarpha</i> Miquel	Leaf	32
	Stem	34
<i>Rhus verniciflua</i> Stokes	Leaf	39
	Stem	21
<i>Rhus javanica</i> Linnaeus	Leaf	7
	Stem	7

^aIC₅₀: DPPH Free radical scavenging activity.

결과 및 고찰

POD, SOD activity 측정

옷나무속의 식물체 부위별로 생체중을 각각 1 g 씩 10 ml 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.8)과 함께 마쇄한 후, 4℃에서 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. POD 활성은 pyrogallol (Sigma, Cot# P-0381)을 기질로 사용하고 100 μl 조효소액에 2.9 ml assay buffer를 첨가하여 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도변화를 측정하였다.

SOD 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 xanthine/xanthine oxidase system을 superoxide radicals (O₂⁻)의 공급원으로 이용하여 superoxide radicals에 의한 cytochrome c의 환원속도를 550 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. SOD 활성 1 unit는 25℃에서 반응을 시작하여 150초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 xanthine oxidase 활성이 50% 억제되는 것으로 정의하였다.

DPPH free radical 소거법을 이용하여 3종의 옷나무속 각 부위별 ethyl acetate 추출물에 대한 항산화능을 조사한 결과 (Table 1), 개옷나무의 잎과 줄기에서 IC₅₀ 이 각각 32, 34 μg/ml, 옷나무의 잎과 줄기에서 각각 39, 21 μg/ml의 항산화활성을 나타내었다. 붉나무의 잎과 줄기에서 각각 7 μg/ml의 활성을 나타내어, 종간 그리고 부위별 항산화능의 차이를 보였다.

옷나무속의 항산화 성분을 조사하기 위하여 종간에 큰 차이를 나타내는 줄기 부위의 추출물을 Sephadex LH-20 column chromatography (100% MeOH)으로 분획하여 각 fraction별로 DPPH free radical 소거법을 이용하여 항산화능을 측정한 결과 (Table 2), IC₅₀은 옷나무가 1.5, 붉나무가 1.9, 개옷나무가 2.3 μg/ml로 각각 나타났으며, 전체 fraction 별로도 옷나무가 타 두 종에 비해 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 Lee(1997)가 700여종의 식물추출물로부터 항산화 활성이 높다고 분류한 대부분의 식물추출물의 DPPH free radical scavenging 활성이

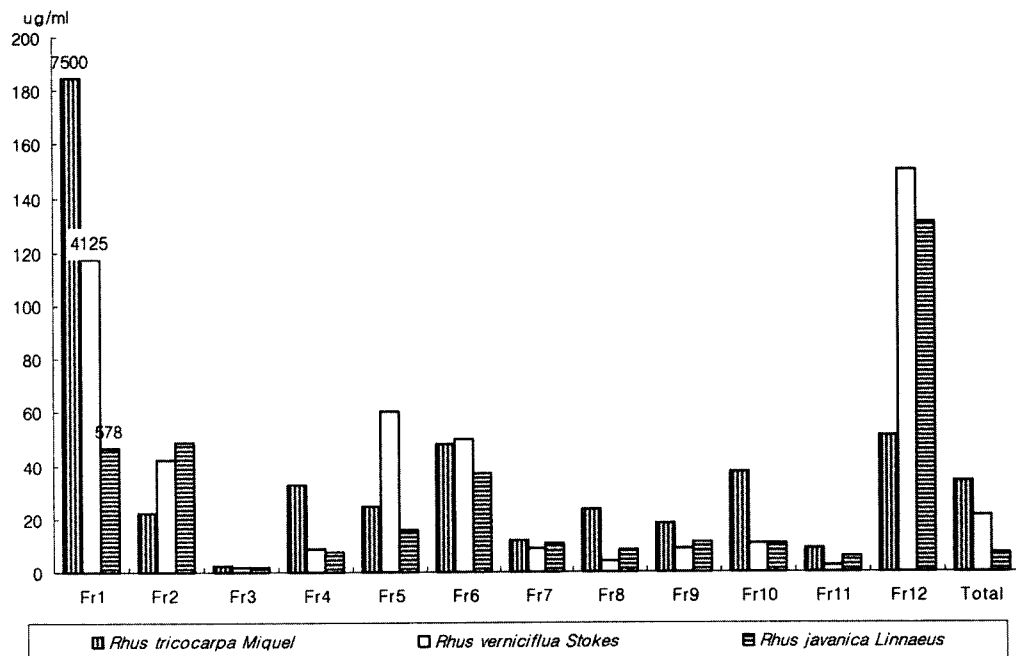


Fig. 2. Antioxidant activities of each fraction by Sephadex LH-20 column chromatography from in three species of *Rhus*.

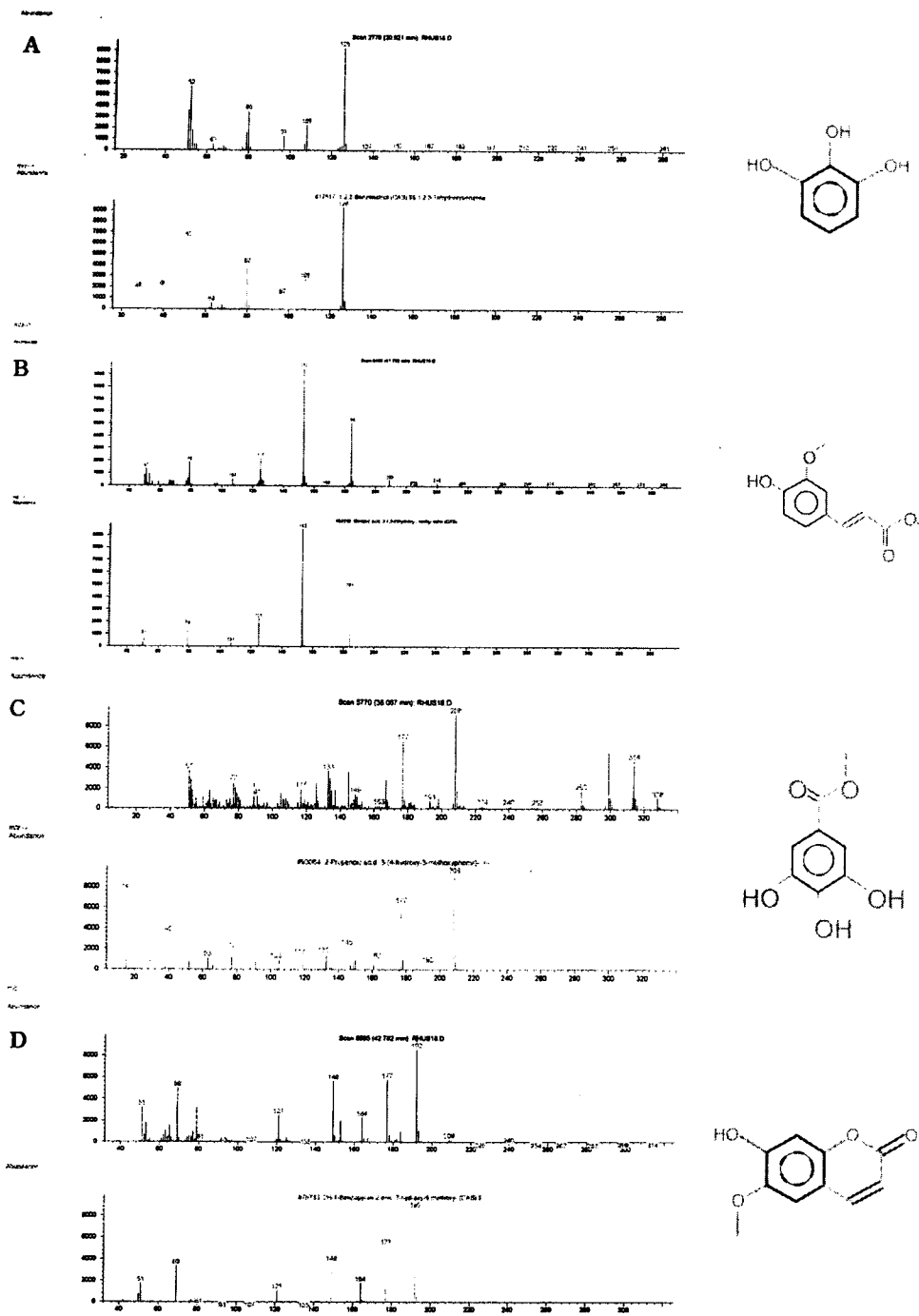


Fig. 3. GC/MS spectrum of extracted antioxidative compounds in three species of *Rhus*.
 A: 1,2,3-Trihydroxybenzene, B: 2-propenoic acid, C: Benzoic acid,
 D: 7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-Benzopyran-2-one.

Table 2. Compounds of fraction No. 3 by Sephadex LH-20 column chromatography in three species of *Rhus*
(Peak area/I.S.T.D area)

N.O.Compounds	Fraction No. 3		
	<i>Rhus tricocarpa</i> Miquel	<i>Rhus verniciiflua</i> Stokes	<i>Rhus javanica</i> Linnaeus
1 2,3-dihydro-benzofuran	6.08	49.16	12.80
2 4-vinyl-2-methoxy-pheol	59.84	963.12	166.72
3 Pyridine-4-carboxaldehyde, Phenol	2.06	8.00	52.8
4 1,2,3-Trihydroxybenzene	350.79	597.01	472.64
5 Phenol	55.68	82.26	16.00
6 Benaldehyde	5.79	3 6.97	11.20
7 Methyl 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoate	15.18	91.02	37.76
8 2-propenoic acid	-	8.28	6.40
9 Benzoic acid	48.27	68.68	64.40
10 7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-Benzopyran-2-one	-	-	79.04

8.9~84.9인 것으로 미루어 보아 조사된 옷나무들의 활성이 매우 높은 것으로 판명되었다.

항산화능이 가장 높게 나타난 fraction을 GC/MS로 분석하여 10가지 성분을 분리 동정한 결과(표 2), 특히 antioxidant로 알려진 2-propenoic acid (Caffeic acid), Benzoic acid (Gallic acid), 7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-Benzopyran-2-one (Scopoletin) 등과 같은 phenol계 물질들이 동정되었다. 이러한 페놀성 화합물은 과일이나 채소의 분해시와 녹차, 흑차 및 wine에서 보통 발견되는 화합물로서 항세균, 항알레

르기 예방에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 (Vijaya 등, 1995; Ohmori 등, 1995), 특히 퇴행성질환의 발병빈도를 저하시키고(Goldbohm 등, 1996; Hertog, 1996), 실험적증거에 의하여 인간의 건강증진을 위하여 천연 생리화학적 항산화물질로서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 (Halliwell, 1996; Serafini et al., 1996; Sadzuka et. al., 1996; Stoner과 Mykhtar, 1995).

옷나무속 3종의 부위별 POD 활성을 측정해 본 결과 (그림 5), 잎에 비해 줄기에서 활성이 높게 나타났

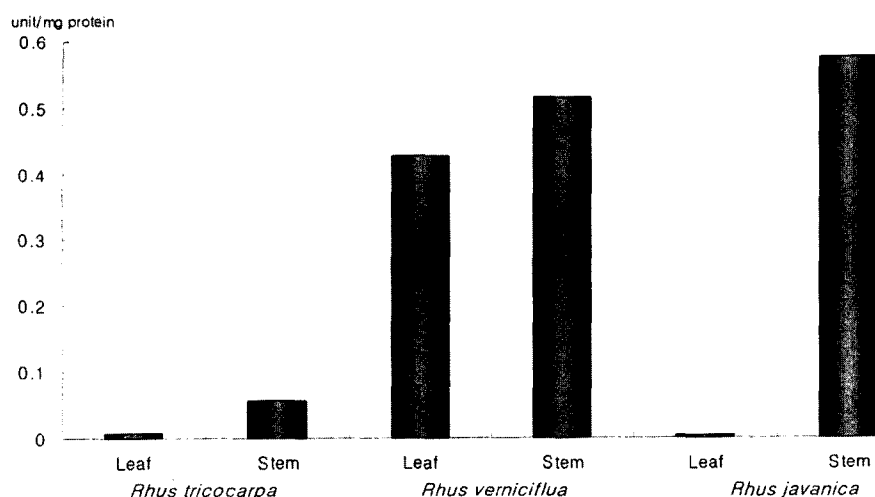


Fig. 4. Peroxidase activity in leaf and stem among three species of *Rhus*.

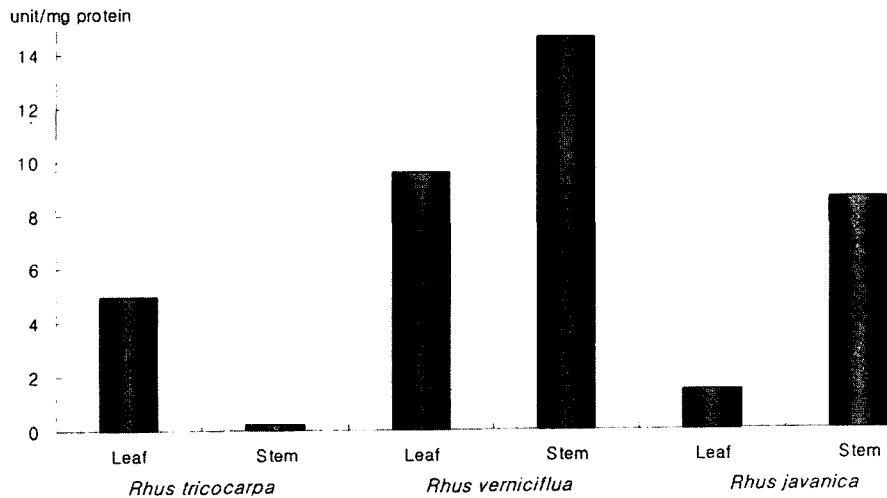


Fig. 5. Superoxide dismutase activity in leaf and stem among three species of *Rhus*.

다. 붉나무, 개웃나무의 경우 줄기가 잎에 비해 각각 193배, 8배 높은 활성을 나타내었으나, 웃나무는 부위별로 큰 차가 없었다. 종간에는 붉나무가 0.58 unit/mg protein로 가장 높게 나타났으며 웃나무, 개웃나무 순으로 높게 나타났다.

웃나무속 3종의 SOD 활성을 부위별로 측정해 본 결과 (그림 6), 타 기관에 비하여 줄기에서 높은 활성이 나타났다. 웃나무와 붉나무는 잎에 비해 줄기에서 높은 활성이 나타내었으나, 개웃나무는 잎이 줄기에 비해 25배 높게 나타났다. 이는 항산화효소 활성이 식물의 계통분류와 무관하며 식물의 형태적 특성 과도 관계가 없다는 연구 보고 (김 등, 1994; 유 등, 1996)와 생육환경에 따라서 활성의 차이가 나타난다는 보고 (정 등, 1996)로 미루어 보아 공시재료로 사용된 세 종의 웃나무가 나타내는 활성의 차이는 종의 유전적 조성 차이와 생육환경의 차이 때문인 것으로 사료된다. 공시된 재료중에서는 웃나무의 줄기에서 14.67 unit/mg protein로 가장 높은 항산화효소 활성을 나타내었다.

따라서 한국에서 자라고 있는 웃나무속에는 항산화물질이 내재하고 있었으며, 항산화효소의 활성도 매우 높은 것으로 판명되었다. 이들에 대한 실용적인 측면의 접근은 알레르기를 야기시키는 우루시올

물질의 제거법이 이루어 진다면, 판명된 성분들에 대한 생물학적 평가가 추후 이루어 질 필요성이 있다고 생각된다.

적 요

한국에서 자라고 있는 웃나무속 3종의 항산화력을 조사하여 본 결과, 웃나무속 3종의 각 부위별 ethyl acetate 추출물에 대한 항산화능은 개웃나무의 경우 잎과 줄기에서 각각 32, 34 $\mu\text{g/ml}$, 웃나무의 경우 잎과 줄기에서 각각 39, 21 $\mu\text{g/ml}$ 의 활성을 나타내었다. Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 줄기 부위의 추출물을 12개의 fraction으로 분리하여 항산화능을 측정 한 결과, fraction No.3이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 웃나무가 1.5, 붉나무가 1.9, 개웃나무가 2.3 $\mu\text{g/ml}$ DPPH가를 나타내었다.

줄기 추출물로부터 2-propenoic acid (Caffeic acid), Benzoic acid (Gallic acid), 7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-Benzopyran-2-one (Scopoletin) 등과 같은 phenol계 물질들이 동정되었다.

웃나무속 3종의 부위별 POD 활성은 잎에 비해 줄기에서 193배 활성이 높게 나타났고 종간에는 붉나

무가 0.58 unit/mg protein로 가장 높게 나타났으며 옷나무, 개옷나무 순으로 높게 나타났다.

SOD 활성은 옷나무와 붉나무의 잎에 비해 줄기에서 높은 활성이 나타났으나, 개옷나무는 잎이 줄기에 비해 25배 높게 나타났다.

인 용 문 헌

김수경, 광상수, 정경희, 민성란, 박일현, 유장렬. 1994. Peroxidase 고생산 식물세포주의선발. 한국생화 학회지. 27(2): 132-137.

정형진, 유정민, 광상수, 우영명, 오세명, 김건우, 정규영. 1996. 생육환경이 더덕 (*Codonopsis lanceolate*)의 항산화효소 활성에 미치는 영향. 한국자원식물학회. 9(3): 203-210.

유순희, 김석원, 김상호, 유장렬, 광상수. 1996. Superoxide dismutase 고생산 식물세포주의 선발 및 isoenzyme 분석. 식물조직배양학회지. 23(2): 103-106.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7915-7922.

Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol. 107: 1049-1054.

Alscher, R.G., Hess, J.L. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton. 1-17.

Beckman, K.B and Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev. 78:547-581.

Chae, Y.B., Kim, W.J., Ji, P., Ahn, M.J., and No, Y.J. 1988. Comprehensive Korean useful plants resource. Korean Research Institute of Chemical Technology. Seoul, Korea. pp52-55.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247: 1-11.

Goldbohm, R.A., Hertog, M.G., Brant, H.A., Van Poppel, G., Van der Brandt. P.A. 1996. Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. J. Natl. Cancer Inst.

88:93-100.

Halliwel, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Ann. Rev. Nutr. 16:33-50.

Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J.Gerontol. 11:298-300.

Hertog, M.G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. Proc. Nutr. Soc. 55:385-397.

Lee, S.K. 1997. Evaluation of cancer chemopreventive activity mediated by antioxidants and modulators of tumor promotion. Ph.D thesis of university of illinois at Chicago.

McCord, J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.

Pitcher, L.H., Zilinskas, B.A. 1996. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. Plant Physiol. 110: 583-588.

Ohmori, Y., Ito, M., Kishi, M., Mizutani, H., Katada, T. and Konishi, H. 1995. Antiallergic constituents from oolong tea stem. Biol. Pharm. Bull. 18: 683-686.

Rivett, A.J. 1985. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthase. Characterization a high molecular weight cysteine proteinase. J. Biol. Chem. 260: 12600-12606.

Sadzuka, Y., Sugiyama, A., Nozawa, Y. and Hirota, S. 1996. The effects of theanine, as a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of adriamycin. Cancer Lett. 105: 203-209.

Serafini, M., Ghiselli, A. and Ferro-Luzzi, A. 1996. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. Eur. J. Clin. Nutr. 50: 28-32.

Shin, M.K. 1986. Limsangbonchokk. Nam-San Dang. Seoul, Korea pp460-461.

Shigenaga, M and Hagen, T.M and Ames, B.N. 1994, Oxidative damage and mitochondrial decay in aging.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:10771-10778.
- Suh, Y.A., Arnold R.S., Lassegue., Shi.J., Xu. X., Sorescu. D., Chung. A.B., Griendling. K.K and Lambeth. J.D. 1999, Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature 401:79-82.
- Stadtman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. Science 257:1220-1224.
- Stoner, G.D. and Mykhtar, H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. J. Cell. Bio. Chem. 22: 169-180.
- Vijaya, K., Ananthan, S. and Nalini, R. 1995 Antibacterial effect of theaflavin, Polyphenon 60 (Camellia Sinensis) and Euphorbia hirta on Shigella spp. J. Ethnopharmacol. 49:115-118.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Biol. Rev. 74: 139-162.
- (접수일 2001. 8. 20)
- (수락일 2001. 9. 20)