

해당화의 항산화 효과

¹이희정 · 안종웅 · ²이범종 · ³문성기 · †서영완

¹한국해양대학교 해양과학기술연구소, 한국해양대학교 해양과학부,

²인제대학교 화학과, 경성대학교, ³경성대학교 생물학과

(접수 : 2003. 12. 3., 게재승인 : 2004. 2. 23.)

Antioxidant Activity of *Rosa rugosa*

Hee-Jung Lee¹, Jong Woong Ahn, Burm-Jong Lee², Sung Gi Moon³, and Youngwan Seo†

¹Research Institute of Marine Science and Technology (RIMST), Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

²Department of Chemistry, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

³Department of Biology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

(Received : 2003. 12. 3., Accepted : 2004. 2. 23.)

An antioxidant activity of *Rosa rugosa* extract and its solvent-partitioned fractions was determined not only by measuring lipid peroxide produced when a mouse liver homogenate was exposed to the air at 37°C, using thiobarbituric acid (TBA) but also by evaluating the free radical scavenging effect against DPPH radical, authentic peroxyntirite, and 3-morpholinsydnonimine (SIN-1). All its partitioned fractions including crude extract showed potent scavenging effect against DPPH radical, peroxyntirite, and lipid peroxidation. *n*-BuOH fraction, in particular, was found to be the most effective in DPPH radical scavenging ability as well as inhibition against lipid peroxidation. The 15% aqueous MeOH fraction also showed a strong potency which was slightly lower than *n*-BuOH fraction. Based on these results, we suggest that *Rosa rugosa* could be useful for preventing an oxidative damage.

Key Words : *Rosa rugosa*, peroxyntirite, DPPH, radical scavenging activity, lipid peroxidation

서 론

해당화 (*Rosa rugosa* Thunb.)는 장미과에 속하는 낙엽관목으로 가시에 털이 있으며 바닷가 모래땅에 잘 자란다. 꽃은 민피화라 하여 중국 및 일본에서는 토혈, 하리, 월경과다 등에 이용되고 있다. 이 식물의 잎, 꽃, 과일, 지하부 등에서 화학 성분 연구가 이루어져 있으며(1), 일본에서는 꽃의 색소를 천연 착색료로 이용하기도 하고 특히, 우리나라에서는 해당화 지하부를 당뇨병 치료제로 사용하고 있다. 그 외 생리 활성 연구로는 항염증, 진경작용, 혈당 강하작용, 혈청 콜레스테롤치 저하작용, 혈압 강하작용, 항산화 효과, HIV protease 저해 활성 등이 보고되었다(2, 3).

산소는 정상적인 대사 과정 중 활성 산소 (reactive oxygen

species), 활성 질소 (reactive oxygen species) 또는 활성 염소를 가진 반응성이 매우 큰 유리 라디칼을 생성한다. 유리 라디칼은 최외각에 짝짓지 않은 전자를 가지는 분자를 말한다. 예로서는 superoxide, hydroxyl, peroxy, alkoxy, hydroperoxy radical 등이 있으며, 이들은 다시 다른 비라디칼 반응종인 hydrogen peroxide, hypochlorous acid (HOCl) 그리고 peroxyntirite (ONOO)와 같은 것으로 전환된다(4). 또한, nitric oxide (NO)는 *in vivo*에서 생산되어지는 유리 라디칼 중 하나이고, 이것은 혈관 평활근 세포와 혈소판 응집, 혈관 신생성 (angiogenesis) 등의 생리적인 기능에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 염증과 관련된 질환에도 관여하며, superoxide와 반응하여 peroxyntirite (ONOO)를 생성한다. 그리고 생성된 peroxyntirite는 강력한 산화제이며, 여러 가지 심각한 손상을 야기시킨다. 다른 유리 라디칼과 비교했을 때 peroxyntirite는 비교적 안정한 분자이다. 그러나 수소 원자 하나를 받아서 peroxyntirous acid (ONOOH)가 되면 세포 독성이 증가하게 된다. Peroxyntirite는 sulfhydryl, 지질, 아미노산, nucleotide를 포함하는 여러 가지 세포 구성분에 대해 강력한

† Corresponding Author : Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

Tel : +82-51-410-4328, FAX : +82-51-404-3538

E-mail : ywseo@hhu.ac.kr

산화 작용을 하는 세포 독성 분자이다. 과도한 양의 peroxynitrite는 알츠하이머병, 류마티스 관절염, 암, 동맥경화와 같은 몇몇 질환과 직접적인 관련이 있다. 그러나 이러한 peroxynitrite를 불활성화시키는 내인성 효소가 부족하기 때문에 특이적으로 peroxynitrite를 제거할 수 있는 분자를 찾는 것은 매우 중요하다(5-8).

본 연구에서는 염분 농도가 높아 일반 육상 식물이 생육할 수 없는 지역에 생육하며, 바닷가와 내륙에서는 염분이 있는 호숫가와 암염(岩鹽)이 있는 지대에서 자라는 염생식물(halophyte) 중의 하나인 해당화(*Rosa rugosa*)의 항산화 효과에 관해 연구하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 시약

Penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid) 과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical), thiobarbituric acid (TBA)는 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 ONOO는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 그 외 다른 모든 시약은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)나 Junsei사 (Tokyo, Japan)의 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

실험 재료 및 시료 추출물의 조제

본 실험에서 사용한 해당화는 경기도 대부도에서 2002년 8~9월에 채집하였으며, 모든 원료는 그늘에서 저온 (37℃) 건조하였고 추출에 적합하도록 세절한 후 추출관에 넣고 CH₂Cl₂와 MeOH로 연차적으로 각각 추출하였다. 각각의 시료 50g에 CH₂Cl₂ (시약용 1급)을 가하여 침지하였다. 24시간 방치한 후에 여과하고 잔사에 다시 CH₂Cl₂를 가하여 24시간 후 여과하였다. 그리고 남은 잔사에 MeOH (시약용 1급)을 가하여 24시간 침지한 후 여과하는 과정을 2회 반복 실행하였다. 얻은 각각의 CH₂Cl₂ 추출액과 MeOH 추출액을 40℃ 수욕상에서 진공 회전 농축기 (Eyela, Japan)로 농축한 후 건조하여 냉장보관하였다. 그리고 CH₂Cl₂ 추출물과 MeOH 추출물을 합하여 n-hexane, 15% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O로써 순차적으로 용매 분획하였으며 위와 동일한 방법으로 건조하고 냉장보관하면서 시료로 사용하였다(Fig. 1).

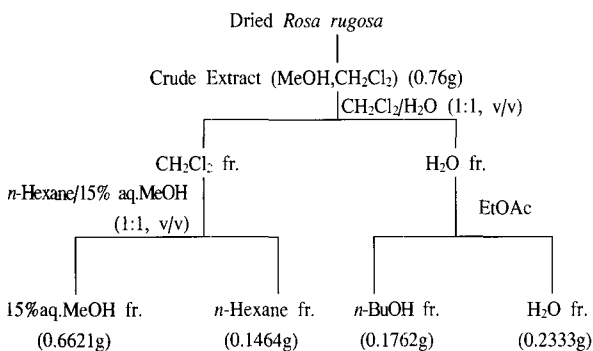


Figure 1. Extraction and fractionation of *Rosa rugosa*.

DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능 측정

DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹인 용액 1.2 ml에 다시 EtOH 3 ml과 DMSO 0.5 ml을 혼합한다. 그리고 시료 (f.c. 100 µg/ml) 50 µl와 제조한 DPPH용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다(9). 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다. 그리고 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다. 시료는 100% ethanol에 용해시켜 사용하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

Peroxynitrite (ONOO⁻) 소거 활성 측정

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine123 (DHR123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다(10). DHR 123 (5 mM)은 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80℃에 보관하고, DHR123 (f.c. 5 µM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 µM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 그리고는 multi-detection microplate fluorescense spectrophotometer Synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가할 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR123의 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 ONOO⁻ (f.c. 10 µM)의 바탕용액은 0.3 N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate로 행하였으며, 평균한 값으로 소거율을 계산하였다. 시료는 10% ethanol에 녹여 사용하였다.

$$\text{Peroxynitrite (ONOO}^{-}\text{) 소거 효과 (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{control blank}}}\right) \times 100$$

Mouse liver homogenate의 조제

실험동물은 암수 구별없이 체중 20~25 g의 ICR mouse로 온도 20 ± 2℃, 습도 50 ± 10%의 동물실에서 일주일간 고형시료 (삼양유지(주))로 사육하였다. 이 실험동물을 ether로 마취 후 해부하여 간 문맥에 0.15 M ice cold KCl 용액을 관류시켜 간 내 혈액 제거 후 적출하여 0.15 M ice cold KCl 용액으로 세척한 후 신속히 간 무게의 10배량의 ice cold KCl를 가하여 간을 세절하고 약 5분간 ice bath상에서 균질화하였다.

마우스 간 균질물을 이용한 지질 과산화물 생성 억제 측정

마우스 간 homogenate 0.3 ml에 8.1% SDS 0.3 ml과 증류수 0.1 ml 또는 시료 0.1 ml을 가하였다. 이것을 37°C에서 8시간 incubation하여 생성된 과산화지질을 20% acetic acid 1.5 ml과 1.2% TBA 시약 1 ml을 첨가하였다. 반응 혼합액을 100°C에서 30분간 가열한 뒤 실온에서 냉각시켰다. 냉각 후 2000 rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 흡광도를 spectrophotometer (532 nm)로 측정하여 정량하였다 (11). TBA 값은 532 nm에서의 흡광도가 0.1일 때를 1 unit으로 한 후, mouse 간 1 g에 대한 TBA 값을 환산하여 표시하였으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

해당화 추출물의 DPPH 자유 라디칼 소거 효과

해양에는 심해 열수대를 비롯하여 여러 특수 환경이 존재하는데 그 중에서 염생 습지는 해수와 담수가 끊임없이 교차하여 염분의 농도가 계속해서 변한다는 의미에서 또 하나의 극한 환경이라고 할 수 있다. 이런 극한 환경에 서식하는 염생 식물은 다른 생물들과는 다른 생물학적 이용 가능성이 높은 2차 대사산물이 풍부할 것으로 기대되며, 더구나 염생 식물에 대한 생리활성이나 화학 성분에 관한 연구 보고도 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 염생식물의 하나인 해당화의 항산화 효과를 탐색하기 위하여, 안정한 유리 라디칼로 알려져 있는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 해당화의 전자 공여능을 측정하였다. 생체 내에서 생성되는 유리 라디칼의 반응성과는 달리 DPPH 라디칼은 실온에서 1시간 정도는 methanol 용액 내에서 안정한 상태를 유지하고 있는 것으로 알려져 있다.

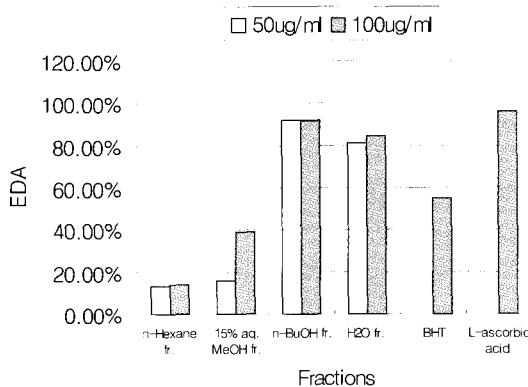


Figure 2. DPPH radical scavenging effect of *Rosa rugosa* fractions.

해당화의 조추출물인 methanol 추출물에 대한 DPPH 라디칼에 대한 효과는 대조군으로 사용되어진 L-ascorbic acid의 효과인 96.33%, α -tocopherol의 효과인 92.13%보다는 다소 떨어지기는 하지만 100 µg/ml의 농도에서 87.51%의 우수한 라디칼 소거 효과가 그리고 dichloromethane 추출물은 거의 효과가 없는 것으로 보고되었다(12). 이는 실험한 20종의 염

생 식물 중에서 가장 뛰어난 것이었다. 따라서 해당화의 methanol 추출물과 dichloromethane 추출물을 합하여 n-hexane, 15% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O로써 순차적으로 용매 분획하여 DPPH 라디칼의 소거 활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 n-BuOH획분이 100 µg/ml의 농도에서 92.11%, 50 µg/ml의 농도에서 91.79%로써 L-ascorbic acid와 비슷한 효과를 가지는 가장 강력한 DPPH 라디칼 소거 활성능이 있는 것을 확인하였다. 그리고 H₂O획분에서 100 µg/ml의 농도에서 84.84%, 50 µg/ml의 농도에서 81.37%로써 유의적인 DPPH 라디칼 소거활성이 있는 것을 알 수 있었다. 그 외 n-hexane 획분이나, 15% aq. MeOH 획분의 DPPH 라디칼 소거활성은 거의 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 EtOAc 획분과 n-BuOH 획분에서 가장 DPPH 라디칼 소거활성이 강한 것으로 보고된 문헌치와 잘 일치하는 결과였다 (13).

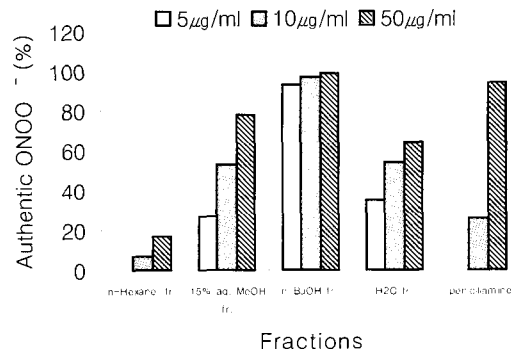


Figure 3. Peroxynitrite scavenging activity of *Rosa rugosa* fractions.

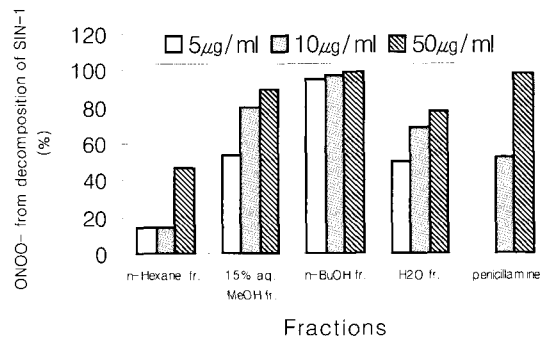


Figure 4. Peroxynitrite scavenging activity of *Rosa rugosa* fractions.

해당화 추출물의 peroxynitrite 소거 효과

해당화의 2가지 조추출물 중 methanol 추출물은 authentic peroxynitrite에 대해서 97.03%, 3-morpholinonydnonimine (SIN-1)에 대해서는 98.48%의 강력한 peroxynitrite 소거 효과가 있었으며, dichloromethane 추출물의 경우는 authentic peroxynitrite에 대해서 57.95%, SIN-1에 대해서는 32.43%의 peroxynitrite 제거 효과가 있음이 보고되었다(14).

해당화 조추출물의 n-hexane, 15% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O획분을 authentic ONOO⁻과 SIN-1에 대해서 실험한 결과 4가지 분획물들 모두 농도 의존적인 peroxynitrite 소거 효과

를 나타내었다(Fig. 3, 4). SIN-1은 *in vitro* 상에서 nitric oxide와 superoxide anion을 동시에 발생시켜서 신속하게 peroxynitrite를 생성시키기 때문에 흔히 사용되는 화합물이다. 특히, *n*-BuOH 획분은 authentic peroxynitrite에 대해서 99.03%, SIN-1에 대해서는 98.59%로서 대조군으로 사용한 penicillamine 화합물의 효과와 비슷한 효과였으며, 10 μ g/ml의 농도에서는 오히려 월등히 뛰어난 peroxynitrite 소거 효과가 확인되었다. 또한 15% aq. MeOH 획분과 H₂O 획분에 있어서도 비교적 우수한 peroxynitrite 소거 활성을 나타내었다. 그러나 *n*-hexane 획분은 거의 효과가 없는 것을 알 수 있었다.

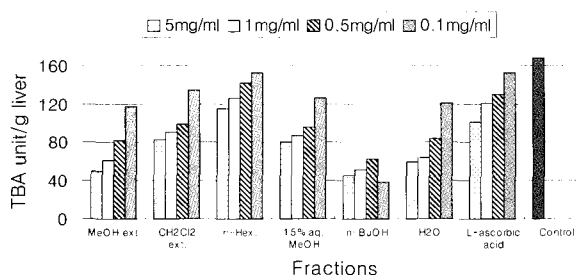


Figure 5. The antioxidative effect of the crude extract and several fractions from *Rosa rugosa* on lipid peroxidation of liver homogenate.

해당화 추출물의 지질과산화 저해 활성

해당화의 조추출물과 각 분획물들에 대한 마우스 간 균질물의 지질 과산화 억제 효과를 L-ascorbic acid의 활성과 비교하여 나타내었다(Fig. 5).

해당화의 조추출물과 각 분획물을 0.1~5 mg/ml의 농도로 첨가하였을 때 지질 과산화물 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 실험한 2개의 조추출물인 methanol 조추출물과 dichloromethane 조추출물의 지질 과산화 저해 활성은 5 mg/ml 농도의 시료를 첨가하였을 때 각각 70.03%, 50.35%의 효과를 나타내었다. 그리고 해당화 분획물들의 지질 과산화 억제 활성 정도는 *n*-BuOH, H₂O, 15% aq. MeOH, *n*-hexane 순이었다. 그 중에서도 *n*-BuOH 분획물이 DPPH 라디칼이나 peroxynitrite 소거 활성에서와 마찬가지로 지질 과산화 저해 활성이 매우 뛰어난 것으로 나타났다. 마우스 간 균질물의 지질 과산화물 생성 억제 효과가 표준 물질로 사용한 L-ascorbic acid보다도 강한 것을 알 수 있었다. 그리고 H₂O 획분에서도 *n*-hexane 획분과 15% aq. MeOH 획분보다는 비교적 우수한 효과가 확인되었다. 이러한 양상은 DPPH 라디칼의 소거 활성과 peroxynitrite 소거 활성에서 나타난 것과 거의 일치하였다. 이것으로 해당화의 항산화효과는 주로 분자량이 비교적 크고 극성이 매우 큰 구조를 가지는 화합물들에 의한 것임을 추정할 수 있다.

여러 가지 산화적인 스트레스는 유리 라디칼 생성과 지질 과산화물의 증가로 인하여 만성적인 질환을 일으키게 된다. 또한 격렬한 운동을 하거나 면역 세포들이 비정상적으로 활성화 되어 있는 사람 그리고 환경오염 물질에 많이 접해 있는 사람은 산소 사용의 높은 속도에 의해서 산화적 스트레스의 위험이 매우 높다. 이렇듯 분자 산소는 절대적으로 호기성 생활에 있어서는 필수 불가결한 것이라 할지라도 어떤 조

건하에서는 매우 유독할 수 있다. 따라서 해당화의 항산화 효과가 매우 뛰어난 것으로 보아 생체 내에서 일어나는 많은 산화적인 스트레스의 예방에 적절한 해산 자원 식물로 생각된다.

요약

본 연구에서는 염생식물의 하나인 해당화의 항산화효과를 탐색하기 위해 해당화의 dichloromethane과 methanol의 조추출물을 합하여 *n*-hexane, 15% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O로써 순차적으로 용매 분획하여 DPPH 라디칼, peroxynitrite의 소거 활성과 지질 과산화 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 각각의 실험에서 해당화의 유의적인 항산화 효과가 확인되었으며, 특히, 4개의 분획물들 중 *n*-BuOH 획분이 가장 뛰어난 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 해당화의 항산화 효과는 비교적 극성이 큰 2차 대사산물에 의한 것임을 추측할 수 있으며, 해당화의 많은 생물학적인 활성들 중 peroxynitrite 소거 효과와 마우스 간 균질물을 이용한 지질 과산화물 생성 억제 활성에 관한 보고는 이것이 처음이다.

감사

이 논문은 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원 (KRF-2002-005-C00008)에 의하여 이루어졌습니다.

REFERENCES

1. Hashidoko, Y. (1996), The phytochemistry of *Rosa rugosa*, *Phytochemistry* **43**(3), 535-549.
2. Park, J. C., H. Ito, and T. Yoshida (2003), ¹H-NMR Assignment of HIV Protease Inhibitor, procyanidine B3 isolated from *Rosa rugosa*, *Natural Product Sciences* **9**(2), 49-51.
3. Park, J. C. and K. D. Ok (1993), Phenolic compounds isolated from *Rosa rugosa* Thunb. in Korea, *Yakhak Hoeji* **37**(4), 365-369.
4. Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu (2002), Free radicals, antioxidants and Nutrition, *Nutrition* **18**(10), 872-879.
5. Nakagawa, T. and T. Yokozawa (2002), Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea, *Food Chemical Toxicology* **40**, 1745-1750.
6. Tsuda, T., Y. Kato, and T. Osawa (2000), Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins, *FEBS Letters* **484**, 207-210.
7. Virag, L., E. Szabo, P. Gergely, and C. Szabo (2003), Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention, *Toxicology Letters* **140-141**, 113-124.
8. Balavoine, G. G. A. and Y. V. Geletii (1999), Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. part I: convenient assay, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **3**(1), 40-54.
9. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
10. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994), Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radical Biology Medicine* **16**, 149-156.
11. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yaki (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *J. Biol. Chem.* **95**, 351-358.

12. Kim, Y. A., H. J. Lee, and Y. Seo (2003), Screening on radical scavenging activity of salt marsh plants, *Proc. Current Biotechnol. Bioeng.* (VI), April 11-12, Busan, Korea, pp673-675.
13. Choi, Y. H., M. J. Kim., H. S. Lee, C. Hu, and S. S. Kwak (1997), Antioxidants in leaves of *Rosa rugosa*, *Kor. J. Pharmacogn.* **28**(4), 179-184.
14. Lee, H. J., Y. A. Kim, K. E. Park, H. A. Jung, and Y. Seo (2003), Peroxynitrite scavenging activity of marine plants extracts, *Proc. Current Biotechnol. Bioeng.* (VIII), October 22-24, Seoul, Korea, pp791-792.