

DPPH 방법을 통한 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿의 항산화 활성에 대한 연구

오명숙¹, 김도림¹, 강지웅¹, 김산웅¹, 유태원¹, 박정열¹, 김동민¹, 박완수¹,
장문석², 박수연³, 박성규¹

1: 경희대학교 한의과대학 방제학교실, 2: 하버드대학교 의과대학 소아병원,
3: 경희대학교 체육과학연구소

ABSTRACT

Study on Antioxidant Potency of Cuscutae Semen, Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus and Epimedii Herba by DPPH Method

Myung Sook Oh¹, Do Rim Kim¹, Ji Ung Kang¹, San-Woong Kim¹, Tae Weon Yu¹,
Jung Yeul Park¹, Dong Min Kim¹, Wan Su Park¹, Mun Seog Chang², Soo Yeon
Park³, Seong Kyu Park¹

1Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, #1
Hoeki-dong Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea

2Dept. of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard
Medical School

3Research institute of Physical education, Kyung Hee Univ.

The present study was conducted to compare antioxidant activity of Cuscutae Semen,

교신저자 : 박성규

130-701 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 방제학교실

Tel: 02-961-0330, Fax: 02-961-0536, E-mail: cervus@chol.com

접수 : 2005/ 11/ 1 수정 : 2005/ 11/ 7 채택 : 2005/ 11/ 15

Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus and Epimedii Herba by DPPH radical scavenging activity. The extract was studied using diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) for DPPH method. DPPH radical scavenging activity was measured after 10, 20 and 30 minutes. The extract was tested by 1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000 µg/ml concentrations. The results showed that the extract scavenged DPPH radical with time-dependent manner. Also, the extract showed dose-dependent DPPH radical scavenging activity.

The extract of Cuscutae Semen, Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus and Epimedii Herba scavenged DPPH radical with the IC50 being 2.7, 3.2, 2.9 and 1.1 mg/ml, respectively.

In conclusion, the extract of Epimedii Herba, Cuscutae Semen, Cnidii Fructus and Psoraleae Fructus have antioxidant activity for the treatment of male sterility.

Key words: Cuscutae Semen, Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus, Epimedii Herba, diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), IC50, antioxidant activity

I. 緒 論

인체의 陽氣를 복돋아 陽虛證을 개선하는 약물을 補陽藥이라 하는데, 陽虛證은 종종 腎陽虛와 밀접한 관계가 있어 補陽藥은 주로 腎陽을 補하는 약물이 된다. 腎陽을 補하는 약물은 일반적으로 腎陽을 溫補하는 외에 益精髓하므로 精髓不足, 不孕不育의 병증에도 사용할 수 있다. 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿은 대표적인 補陽藥으로 분류되며 益精髓, 溫腎助陽, 補腎壯陽의 효능으로 遺精, 陽痿遺精, 男子陽痿, 陽痿不舉 등의 남성불임증 치료에 활용되어 왔다¹⁾.

남성 불임은 精子가 만들어져 수송되고 射精행위에 의해 배출되어 卵子和 결합되는 과정 중에서 문제가 생길 때 발생하지만, 남성 불임의 50% 정도는 그 원인이 명확하게 밝혀지지 않은 상황이다. 그러나 원인이 명확하지 않은 남성 불임 그룹들에서 정자의 농도가 낮거나 정자의 운동성이

저하되거나 형태적인 이상이 발견되는 경우들이 종종 발견되며²⁾, 특히 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 고농도의 reactive oxygen species (ROS)가 관여되어 있는데, 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다³⁾.

이에 남성불임증 치료에 사용되는 補陽藥인 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿에 대한 항산화 효과를 연구하기 위하여, 각 약물들이 DPPH에 의한 radical 소거활성에 미치는 변화를 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 시약 및 기기

본 실험을 위해서 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ethanol (Duksan, Korea), 2-thiobarbituric acid

(TBA, Sigma, USA), n-butanol (Sigma, USA), pyridine (Sigma, USA) 등이 사용되었다.

본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporatory (Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA) 등이다.

2. 약재 및 시료의 제조

1) 약재

본 실험에서 사용된 菟絲子는 갯실새삼 *Cuscuta chinensis* Lamark, 補骨脂는 보골지 *Psoralea corylifolia* L., 蛇床子는 사상자 *Torilis japonica* Dc., 淫羊藿은 음양곽 *Epimedium brevicornum* Maxim 으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

2) 시료의 제조

각각의 약물 50 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 환류추출기에 1차 증류수 1,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 시료로 사용하였다.

3. DPPH radical 소거 작용의 측정

DPPH radical scavenging activity를 알아보기 위하여 Tanaka (2003)의 방법⁴⁾을

이용하였다⁵⁾. 동결건조된 각각의 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도로 시액을 조제하였다. 양성 대조군으로 시료와 같은 농도의 ascorbic acid를 사용하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 ethanol에 녹인 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 10, 20, 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다⁶⁾.

DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB- absorbance of blank sample, AT- absorbance of tested extract solution.

4. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준오차 (Mean ± S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여 $p < 0.05$ 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. Ascorbic acid의 시간 및 농도 변화에 따른 DPPH radical 소거 활성의 비교

DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가한 후 10, 20, 30 분간 경과한 후 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid는 10, 20, 30 분간 경과한 모든 시간대에서 농도의

존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며 (Fig. 1), 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 10, 20, 30 분간 경과에 따라 각각 0.01, 0.008, 0.009 mg/ml이었다.

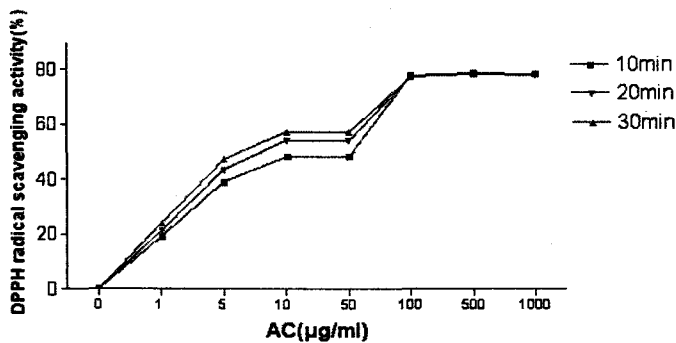


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested ascorbic acid.

2. 토사자의 DPPH radical 소거 활성의 비교

토사자는 측정된 모든 시간대에서 농도 의존적인 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 최대 DPPH radical 소거 활성은 10 분간 경과한 후 1000 µg/ml의 농도에

서 22.8%를 나타냈으며, 20 분간 경과한 후 1000 µg/ml의 농도에서 26.5%, 30분간 경과한 후 1000 µg/ml의 농도에서 30.9%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

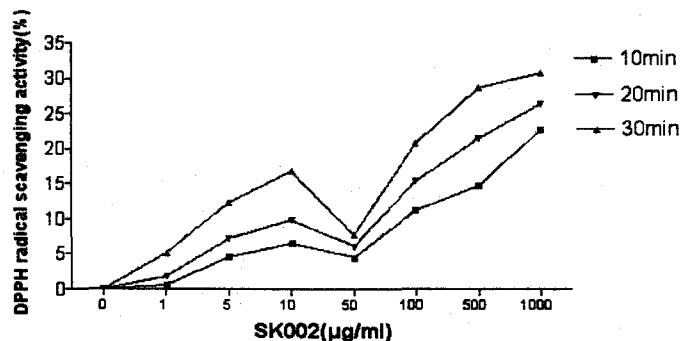


Fig. 2. DPPH radical-scavenging activity of aqueous extract from Cuscutae Semen (SK002): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

3. 보골지의 DPPH radical 소거 활성의 비교

보골지는 측정된 모든 시간대에서 농도의존적인 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 최대 DPPH radical 소거 활성은 10분간 경과한 후 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서

12.9%를 나타냈으며, 20 분간 경과한 후 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 18.8%, 30분간 경과한 후 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 20.4%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 3).

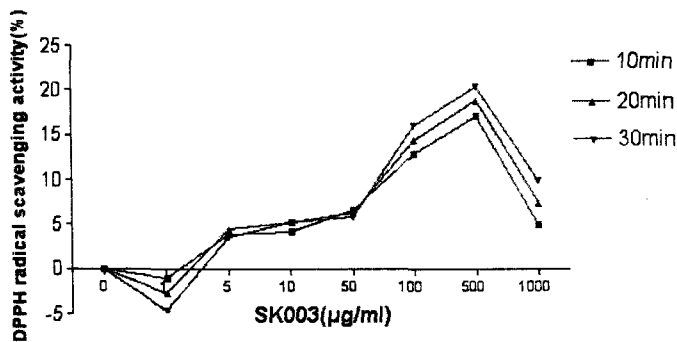


Fig. 3. DPPH radical-scavenging activity of aqueous extract from Psoraleae Fructus (SK003): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

4. 사상자의 DPPH radical 소거 활성의 비교

사상자는 측정된 모든 시간대에서 농도의존적인 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 최대 DPPH radical 소거 활성은 10 분간 경과한 후 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에

서 15.9%를 나타냈으며, 20 분간 경과한 후 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 19.1%, 30분간 경과한 후 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 21.8%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 4).

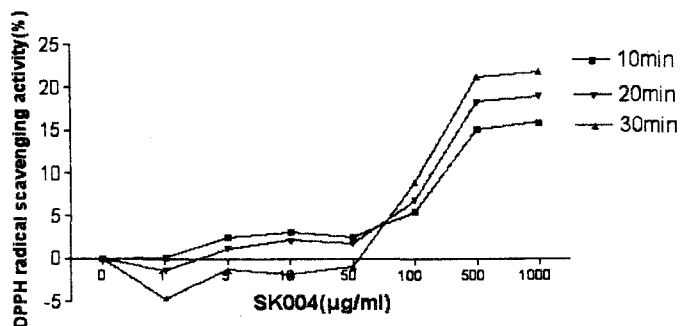


Fig. 4. DPPH radical-scavenging activity of aqueous extract from *Cnidii Fructus* (SK004): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

5. 음양곽의 DPPH radical 소거 활성의 비교

음양곽은 측정된 모든 시간대에서 농도 의존적인 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 최대 DPPH radical 소거 활성은 10 분간 경과한 후 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에

서 48.8%를 나타냈으며, 20 분간 경과한 후 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 49.7%, 30분간 경과한 후 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 49.7%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 5).

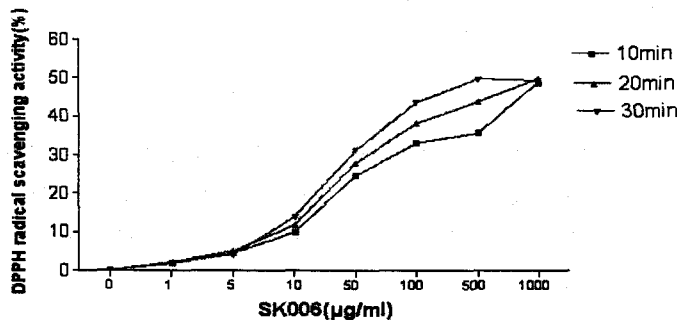


Fig. 5. DPPH radical-scavenging activity of aqueous extract from *Epimedii Herba* (SK005): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

6. 시료의 농도별 DPPH radical 소거 활성의 비교

30 분간 경과한 후 각 시료의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 또한 활성은 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 비교하였다. Ascorbic acid는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 토사자는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 30.9%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며,

100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 20.1, 28.7%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 보골지는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 20.4%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 16.1, 9.9%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 사상자는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 21.8%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 8.9, 21.2%의 DPPH radical

소거 활성을 나타내었다. 음양곽은 500 μ g/ml의 농도에서 49.7%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100,

1,000 μ g/ml의 농도에서 각각 43.5, 49.2%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 6).

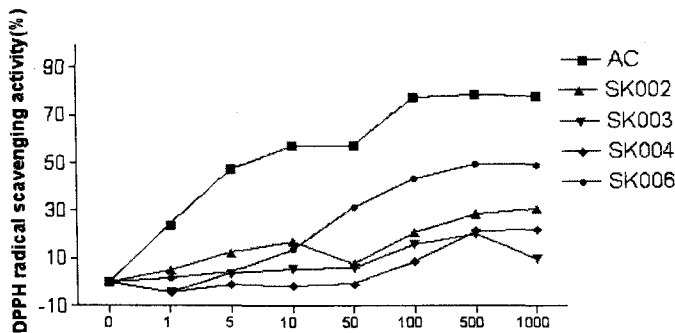


Fig. 6. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and aqueous extract from *Cuscutae Semen* (SK002), *Psoraleae Fructus* (SK003), *Cnidii Fructus* (SK004), *Epimedii Herba* (SK005): Values indicate the mean \pm S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/AB] \times 100$, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

7. 시료의 50%의 DPPH radical 소거 활성 농도 (IC50) 비교

Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 ascorbic acid

는 0.009 mg/ml이었으며, 토사자는 2.7 mg/ml, 보골지는 3.2 mg/ml, 사상자는 2.9 mg/ml, 음양곽은 1.1 mg/ml이었다 (Fig. 7).

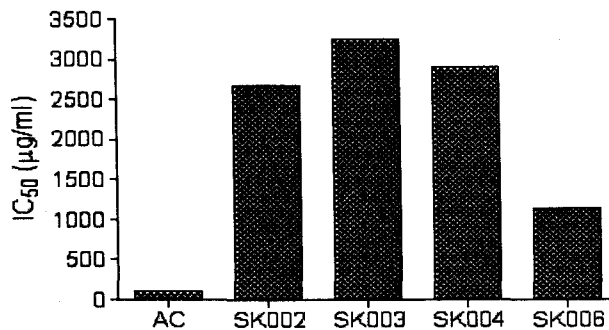


Fig. 7. Fifty percent inhibitory concentrations (IC50) of DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and aqueous extract from *Cuscutae Semen* (SK002), *Psoraleae*

Fructus (SK003), Cnidii Fructus (SK004), Epimedii Herba (SK005).

IV. 考 察

補陽藥이 腎陽虛症에 사용된 예를 살펴 보면 精關이 不固하면 覆盆子, 山茱萸, 五味子 등을 배합하여 固腎澁精하게 하는 菟絲子丸이 있으며, 陽痿를 겸하면 淫羊藿, 萆子, 蛇床子, 仙茅 등을 배합하여 壯陽起痿하게 하는 贊育丹이 활용되어 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿 등이 주요 구성 약물로 사용되었음을 알 수 있다⁷⁾.

菟絲子は 補陽하고 또한 益陰시키는 효능이 있어 腎虛로 인한 陽痿와 遺精의 증상을 치료하는데 상용한다. 비록 陰虛와 陽虛로 인한 병증에 모두 응용할 수 있으나 補陽시키는데 편중하였으므로 腎陽不足으로 인한 병증에 주로 사용한다. 菟絲子와 蛇床子를 비교하면 菟絲子は 溫益精, 溫腎의 효능이 있으며 藥性이 燥하지 않으므로 補腎陽하며 益腎陽의 치료에 효과가 있으며, 蛇床子は 溫腎壯陽 하는데 藥性이 燥에 치우치므로 陽痿, 女性不妊 등의 증상이 나타나되 腎陽이 아직 虧虛하지 않은 상태를 치료하는데 적합하다. 補骨脂는 陰寒의 증상을 개선하고 補腎하므로 下元을 견고하게 하며 命門의 火를 補하고, 腎陽不足으로 인한 下元不固와 脾腎兩虛의 증상에 상용하는 약물이 된다. 淫羊藿은 溫腎壯陽의 효능이 비교적 강하여 腎陽不足으로 인한 男子의 陽痿와 女子의 자궁발육부전 및 風寒痺痛의 병증에 많이 응용하며 효과 또한 비교적 좋다¹⁾.

이와 같이 補陽藥의 대표적인 약물인 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿는 腎陽을 補하는 공통적인 작용이 있지만 각각의 특

성에 따라 구별되어 사용되기도 한다. 이상 4종 약물이 남성 불임에 미치는 영향을 비교하기 위하여 DPPH 자유기 소거 작용에 의한 항산화 효과를 측정 비교하였다.

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광 흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다⁸⁾. 일반적으로 반응성이 강한 DPPH radical은 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물인 DPPH-H로 전환하는 것으로 알려져 있다.

각각의 시료의 농도별 희석액이 DPPH radical 소거 효과가 있는지의 여부를 관찰하기 위하여 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 각각의 시료 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교하였다. 각각의 시료 농도는 저농도와 고농도의 차이를 비교하기 위하여 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도 범위에서 측정하였으며, 10, 20, 30 분 후 시간의 경과에 따른 DPPH radical 소거 활성의 차이를 비교하였다.

실험 결과 ascorbic acid는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 토사자는 시간 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였으며, 50 µg/ml의 농도를 제외하고는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 보골지는 시간 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였으며, 500 µg/ml의

농도에서 최대 DPPH radical 소거 활성이 나타났다. 사상자는 시간 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였으며, 1000 µg/ml의 농도에서 최대 DPPH radical 소거 활성이 나타났다. 음양곽은 시간 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였으며, 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. Dose-response curve로부터 산출된 30 분간 경과 후 측정된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 ascorbic acid는 0.009 mg/ml이었으며, 4종 약물은淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂의 순서로 DPPH radical 소거 활성 효과가 우수함이 확인되었다.

V. 結 論

補陽藥으로 사용되는 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿이 남성불임에 미치는 작용을 비교하기 위하여 항산화 효과의 지표로 사용되는 DPPH radical 소거 활성 효과를 측정하였다.

- 대조군으로 사용되는 ascorbic acid는 시간 및 농도 의존적으로 우수한 DPPH radical 소거 활성 효과를 나타내었다.
- 10분 경과 후 측정된 결과淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂의 순서로 DPPH radical 소거 활성 효과가 나타났다.
- 20분 경과 후 측정된 결과淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂의 순서로 DPPH radical 소거 활성 효과가 나타났다.
- 30분 경과 후 측정된 결과淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂의 순서로 DPPH radical 소거 활성 효과가 나타났다.
- 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂의 순서로 DPPH radical 소거 활성 효과가 나타났다.

이상의 결과에서淫羊藿, 菟絲子, 蛇床子, 補骨脂은 DPPH에 의한 free radical에 대한 소거 활성이 확인되었으며 남성불임의 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

- 全國韓醫科大學 本草學教授, 本草學, 서울, 永林社, 1999, pp.602-631
- Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG. Male infertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2003;17(2):211-229
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. Urology. 2000;55(6):881-885
- Tanaka N, Nishikawa K, Ishimaru K. Antioxidative capacity of extracts and constituents in *Cornus capitata* adventitious roots. Agric Food Chem. 2003;51(20):5906-5910
- 오명숙, 김도림, 김소연, 장문석, 박성규. 補骨脂가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 2005;19(1):81-86
- 오명숙, 김도림, 성은진, 장문석, 박성규. 山茱萸가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 2005;19(6):1541-1545

7. 박성규, 김상찬, 김선희, 노승현, 박선동, 변성희, 서부일, 서영배, 이상인, 이태희, 주영승, 최호영. 방제학. 서울, 永林社, 2004. pp.312-313
8. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. Nature. 1958;181:1199-1200