

전자상자성공명법을 이용한 오가피나무추출물의 항산화효과에 대한 연구

최 신 욱[†] · 김 창 수 · 최 명 수* · 김 보 현* · 김 학 수* · 최 대 성**

(주)래디안, *소망화장품(주) 연구소, **정선군 농업기술센터
(2005년 2월 22일 접수, 2005년 3월 9일 채택)

The Study for Antioxidative Effects of *Acanthopanax sessiliflorus* Extract as a New Cosmetics Ingredients Using Electron Paramagnetic Resonance

Shin Wook Choi[†], Chang Su Kim, Myoung Soo Choi*, Bo Hyeon Kim*, Hack Soo Kim*, and Dae Sung Choi**

Radiant Inc., Bioindustry Foundation, 198-53, Hupyong-dong, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-957, Korea
*R&D Center, Somang Cosmetics Co.

**Jeongseon Agricultural Technology & Extension Center

(Received February 22, 2005; Accepted March 9, 2005)

요약: 본 연구는 천연물로부터 기능성화장품의 소재로 이용할 수 있는 새로운 항산화제를 개발하기 위하여 정선산 오가피나무 추출물의 항산화 효과를 측정하였다. 통상적 항산화력 평가기법인 DPPH 라디칼 소거능 평가 방법은 천연물의 항산화능을 평가하기에 가장 쉬운 방법중에 하나이나 생체내에서 발생하는 특정 라디칼에 대한 항산화능을 평가하기에는 부적합하여 본 연구진은 전자상자성공명법이라는 방법을 이용하여 특정 라디칼에 대한 오가피나무 추출물의 항산화능을 평가하였다. 전자상자성공명법을 이용한 항산화능 평가 결과 오가피나무의 추출물은 유해산소종 및 유해질소종에 대한 매우 우수한 항산화능을 가지고 있음이 밝혀졌으며, 이러한 결과로 보아 오가피나무 추출물은 새로운 항산화제 소재 및 피부내의 산화적 스트레스 방지목적의 기능성 화장품소재로서의 개발가능성이 매우 높음을 알 수 있었다.

Abstract: This work was carried out to investigate the antioxidative effects of *Acanthopanax sessiliflorus* from Jeongseon County for the purpose of development of a novel antioxidant from natural products. The antioxidant activity was determined by using electron paramagnetic resonance (EPR), not measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) which have been used for antioxidant activity of natural sources. Although DPPH radical scavenging activity assay have been generally used for antioxidant activity, this assay is not appropriated for determining which radical is scavenged by extracts from natural products. Using EPR, we determined whether *A. sessiliflorus* extracts from Jeongseon County scavenge specific radicals or not. On experiment of scavenging superoxide anion radical, hydroxyl radical, nitrogen dioxide and peroxynitrite, Extracts from *A. sessiliflorus* showed high antioxidant activities to reactive oxygen and nitrogen species. These result suggest that extracts from *A. sessiliflorus* act as an antioxidant by scavenging reactive oxygen and nitrogen species and used as new cosmetic ingredients for anti-oxidative stress in skin.

Keywords: electron paramagnetic resonance, antioxidants, free radical, *acanthopanax sessiliflorus*, plant extracts

1. 서 론

식물이 다양한 활성성분을 포함하고 있다는 것은 익히 알려진 사실이며 많은 식물 추출물들이 통증완화, 해독, 해열, 방부, 수렴, 항염, 항산화 등의 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며[1], 최근에 일고 있는 환경친화적이

고 자연지향적인 추세에 따라 화장품에 들어가는 유효성분들도 화학물질뿐만 아니라 식물유래의 천연물이 그 유효성을 기반으로 하여 여러 가지 형태로 화장품에 배합되어 사용되고 있다.

최근에 노화(aging)와 성인병 질환의 원인이 활성산소종(reactive oxygen species)에 기인된다는 학설이 인정됨에 따라 산소나 질소로부터 유래되는 활성산소종을 조절할 수 있는 천연 항산화제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고

† 주 저자 (e-mail: biotour@chol.com)

있다. 유해산소로 알려져 있는 활성산소종은 가장 안정한 형태인 삼중항산소 ($^3\text{O}_2$)가 환원되면서 superoxide anion radical ($\text{O}_2\cdot^-$), 과산화수소 (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), 지질 peroxide (ROOH)나 여기서 생기는 free radical ($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$) 등의 과산화지질로서, 이러한 활성산소종이 정상적으로 소거되지 않을 때, free radical로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)가 생체에 가해져 노화나 암 등의 여러 가지 성인병의 원인이 되고 있다. 이러한 활성산소종을 조절하거나 제거할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 데, 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxidase (GPx) 등과 천연 항산화제인 tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathion, 그리고 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), Trolox-C 등 다양한 항산화제가 알려져 있고, 그 외 많은 항산화제에 관한 연구가 계속 보고되고 있다[2,3]. 이들 항산화제 중 tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, 효과가 우수한 BHA, BHT, Trolox-C 등의 합성 항산화제가 의약품 및 식품분야 등에서 활용되고 있으나, 변이원성 및 독성이 지적되고 있어, 더욱 안정하고 효과가 우수한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다[4,5].

또한 활성질소종(reactive nitrogen species)에 대한 생체에 대한 손상기작들이 속속 밝혀지면서 생체내에서 생성되는 활성질소종에 대한 관심이 급격히 증가하고 있는 추세이나 이에 대한 항산화제의 연구는 미비한 실정이며, 활성질소종에 대한 천연 항산화제나 합성 항산화제 연구 또한 활성산소종에 대한 항산화제의 연구에 못미치는 수준이다. 이와 아울러 대기중의 오염물질로 알려진 활성질소종의 일종인 이산화질소에 대한 천연항산화제의 개발이나 연구 또한 이루어지지 않은 실정이다.

오가피나무는 오갈피과(Araliaceae)에 속하는 오가피나무(*Acanthopanax sessiliflorum seeman*) 또는 기타 동속 식물로서 중국 및 우리나라 전국 각처 해발 100 ~ 140 m 지역 숲 속에서 자생하는 낙엽관목이며, 높이는 3 ~ 4 m 이고 수피는 회색, 뿌리 근처에서 가지가 많이 갈라지며 사방으로 퍼지고 수지는 회갈색이며 지름 3 ~ 4 mm로 털이 없고 가지도 거의 없다. 잎은 호생하고 장상복엽이며 소엽은 3 ~ 5개, 8 ~ 9월에 자주색 꽃이 피고 10월에 열매가 성숙한다[6]. 한방에서는 오가피는 주로 자양, 강장, 강정, 신경통, 음위, 진경, 근골동통, 신기복통 등의 효능이 있어 주로 강장약으로 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병 및 류마티스성 관절염 등의 치료 등에 이용되고 있다. 현재까지 알려진 오가피속 식물의 성분으로는 eleutheroside A, B, B1, B4, C, D, E, I, K, L, M과 chlorogenic acid, sesamin, caffeic acid, sitosterol 등이 알려져 있다[7-12].

본 연구에서는 오가피나무의 뿌리, 잎, 줄기, 열매로부

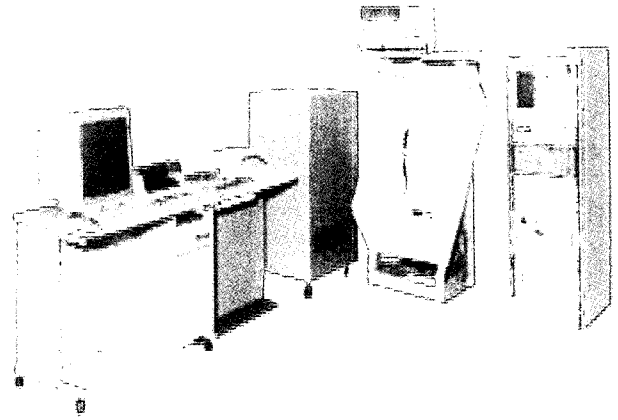


Figure 1. A photograph of a electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometer.

터 추출한 추출물의 항산화 활성을 지질산화 억제력이나 DPPH 소거능으로 측정하던 기존의 항산화능 평가방법에서 탈피하여 spin-trapping 기법을 활용한 electron paramagnetic resonance (EPR) 방법을 적용하여 각각의 유해산소 및 유해질소에 대한 항산화 활성을 측정하여 이들의 효능에 대한 근본적인 효과를 알아보고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

오가피나무(*A. sessiliflorus*)는 정선군 농업기술센터에서 제공받아 실험에 사용하였으며, 오가피나무의 각 부위별로 정제수로 세척한 후 음지에서 건조한 후 작은 조각으로 파쇄한 뒤, 여기에 그 건조중량의 1 ~ 10배의 70% 에틸알코올을 첨가하였다. 실온에서 2일간 추출한 뒤 300 메쉬 여과포로 여과하고 다시 와트만 5번 여과지로 여과한 후, 회전 감압 증발기로 건조하였다. 건조된 오가피 각 부위별 분말을 80% 1,3-부틸렌 글리콜에 용해한 뒤 본 실험에 사용하였다. EPR을 이용한 항산화능 평가시에는 건조된 각 부위별 분말을 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

EPR 기기는 강원대학교 공동실험실습관에 비치되어 있는 JEOL사의 JES-TE200 모델을 사용하였다(Figure 1).

2.2. 활성산소종에 대한 추출물의 항산화 효과 측정

2.2.1. Superoxide Radical에 대한 항산화효과

Superoxide radical은 DMPO와 반응하여 DMPO-OOH·이라는 새로운 라디칼을 만들어내며, 이는 EPR 신호를 가지고 있다. 이를 이용하여 superoxide radical 소거에 따른 DMPO-OOH·의 EPR 신호 세기의 감소를 통해 특정 물질의 superoxide radical의 소거활성을 정량적으로

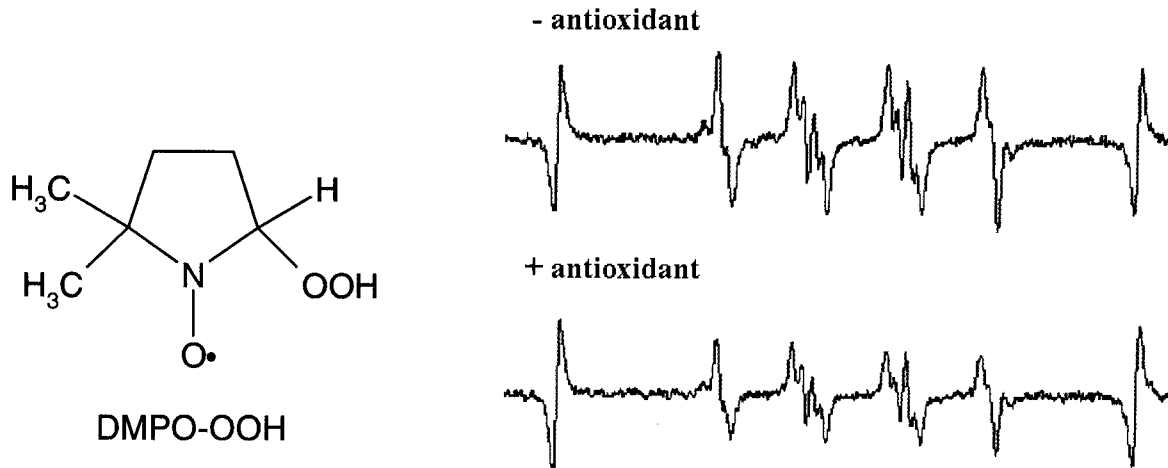


Figure 2. Structure and EPR signal of DMPO-OOH.

측정할 수 있다[9].

Xanthine/xanthine oxidase system으로 superoxide을 발생시키고 추출물의 superoxide의 제거 속도를 DMPO spin trap을 이용하여 EPR로 측정한다. 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호 세기의 값을 기준으로 추출물의 항산화력을 대조군에 대한 상대적인 EPR 신호 세기 감소로 표시하였다.

2.2.2. Hydroxyl Radical에 대한 항산화 효과

과산화수소와 2가의 철염을 첨가하면 OH·가 발생되고, 이는 다시 DMPO와 반응하여 DMPO-OH· 라디칼을 생성한다. DMPO-OH·의 EPR 신호를 측정함으로써 hydroxyl radical에 대한 추출물의 항산화활성을 조사할 수가 있다. 추출물이 첨가된 실험에서 항산화 활성이 있을 경우 hydroxyl radical을 소거하여 EPR의 신호가 약해진다. 이를 이용하여 특정물질의 hydroxyl radical 소거 효과를 정량적으로 측정할 수 있다[9].

Fenton 반응으로 hydroxyl radical을 발생시킨 후 DMPO spin trap을 이용한 EPR방법으로 정량하였다. 추출물들을 가하고 이들의 hydroxyl radical 제거 능력을 EPR 신호의 감소로 측정하였으며, 이 때 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호를 기준으로 하여 추출물을 넣었을 때의 EPR 신호를 측정하여 상대적인 신호 값으로 표시하였다.

2.3. 활성질소종에 대한 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. 이산화질소에 대한 항산화 효과

Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration으로 NO₂·을 생성시킨 후 DMPO spin trap을 이용하여 DMPOX의 EPR 신호 세기의 감소를 추출물을 넣지 않은 대조군의 신호를 기준

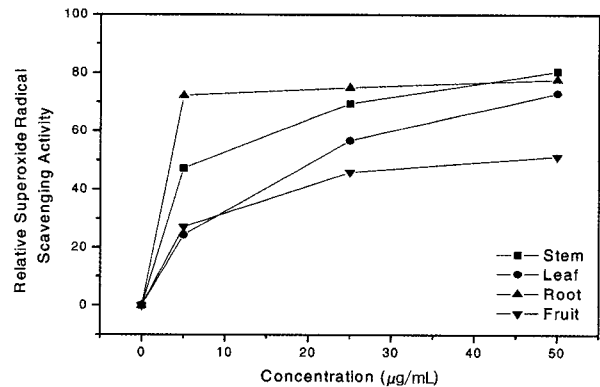


Figure 3. The superoxide radical scavenging activities of *A. sessiliflorus* extracts.

으로 상대적인 EPR 신호세기의 감소율로 나타내었다[9].

2.3.2. Peroxynitrite에 대한 항산화 효과

Peroxynitrite는 isoamylnitrite와 과산화수소를 반응시켜 제조한 후 높은 pH 상태에서 보관하였고, 실험을 할 경우에 반응액에 신속히 첨가하여 사용하였다. Peroxynitrite에 의한 dihydrorhodamine의 산화를 형광으로 측정함으로써 peroxynitrite 자체를 정량하고 추출물에 의한 형광의 억제(즉, peroxynitrite 제거효과)를 측정하였다. 흡수파장은 505 nm이고, 방출파장은 526 nm이다[9].

3. 결과 및 토론

3.1. 유해산소에 대한 항산화능 평가

3.1.1. Superoxide Radical에 대한 항산화능

추출물의 superoxide radical에 대한 항산화 활성은

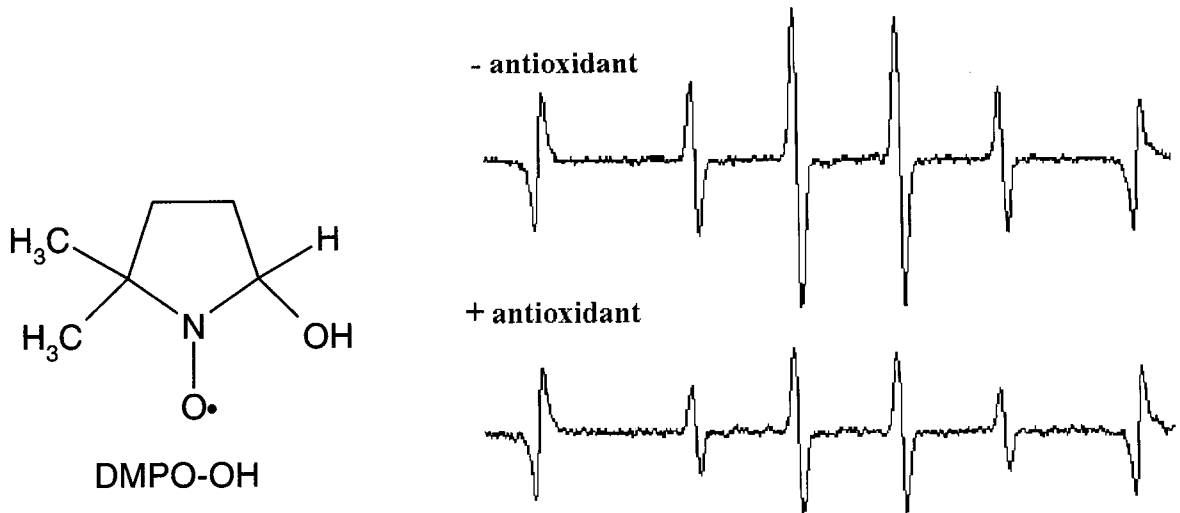


Figure 4. Structure and EPR signal of DMPO-OH·.

Figure 2에서 보는 바와 같이 superoxide 제거에 의한 DMPO-OOH·의 EPR 신호의 세기의 감소로 나타낼 수 있다. 추출물의 항산화력을 다음 식에 의해 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호세기의 값을 기준으로 대조군에 대한 상대적인 EPR 신호세기의 감소로 나타내었다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 EPR을 이용한 오가피 추출물의 superoxide radical에 대한 항산화활성 측정 결과 5 µg/mL의 동일 농도하에서는 오가피 뿌리가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 오가피 줄기, 잎, 그리고 열매의 순으로 모든 추출물이 superoxide radical에 대한 높은 항산화 활성을 나타내었다.

3.1.2. Hydroxy Radical에 대한 항산화능

과산화수소와 2가의 철염을 첨가하면 OH·가 발생되고, 이는 다시 DMPO와 반응하여 DMPO-OH· 라디칼을 생성한다. Figure 4에서 보는 바와 같이 DMPO-OH·의 EPR 신호를 측정함으로써 hydroxyl radical에 대한 추출물의 항산화활성을 조사할 수가 있다. 추출물이 첨가된 실험에서 항산화 활성이 있을 경우 hydroxyl radical을 소거하여 EPR의 신호가 약해진다. 이 때 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 control의 신호를 기준으로 하여 추출물을 넣었을 때의 EPR 신호를 측정하여 상대적인 신호 값으로 나타내었다.

오가피 추출물의 hydroxyl radical에 대한 항산화 활성 측정 결과를 Figure 5에서 보는 바와 같이 오가피 뿌리와 줄기가 상대적으로 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 잎과 열매는 뿌리와 줄기보다 약한 항산화 활성을 지니는 것으로 측정되었다. 오가피나무의 부위 중 특히 hydroxy radical에 대해 높은 항산화 활성을

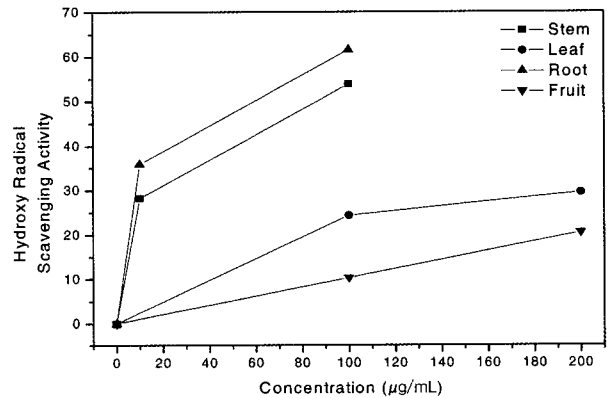


Figure 5. The hydroxy radical scavenging activities of *A. sessiliflorus* extracts.

나타낸 뿌리와 줄기 추출물의 경우에는 추출물의 농도 증가에 따라 항산화 활성이 증가함을 확인할 수 있었다.

3.2. 활성질소종에 대한 추출물의 항산화 효과 측정

3.2.1. 이산화질소에 대한 항산화 효과

오가피 각 부위별 추출물의 이산화질소항산화 활성은 Mb-catalyzed tyrosin nitration으로 NO₂·을 생성시킨 후 DMPO spin trap을 이용한 EPR방법으로 정량하였다. 이때의 EPR 신호는 NO₂·에 의해 DMPO가 DMPOX로 산화될 때 나타나는 신호이다. 추출물이 첨가된 실험에서는 추출물이 항산화 활성을 가질 경우 NO₂·을 소거하여 EPR의 신호가 약해진다(Figure 6). 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 control의 신호를 기준으로 하여 추출물을 넣었을 때의 EPR 신호를 측정하여 상대적인 신호 값으로 나타내었다.

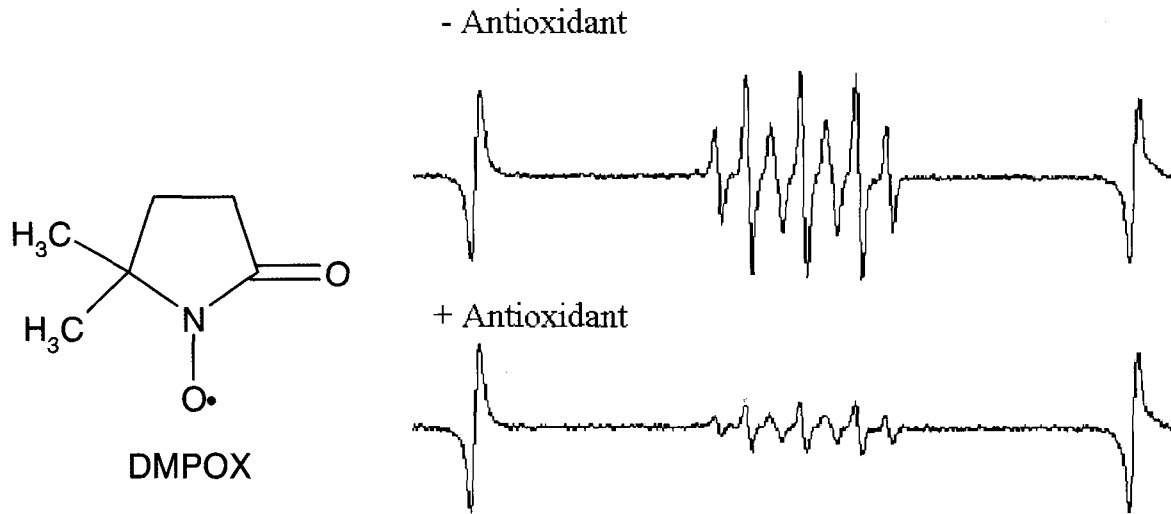


Figure 6. Structure and EPR signal of DMPOX.

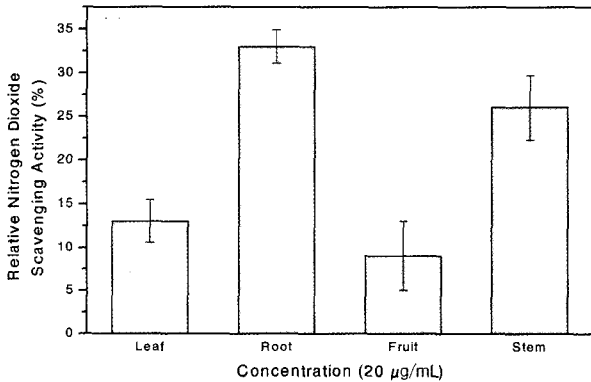


Figure 7. The nitrogen dioxide radical scavenging activities of *A. sessiliflorus* extracts.

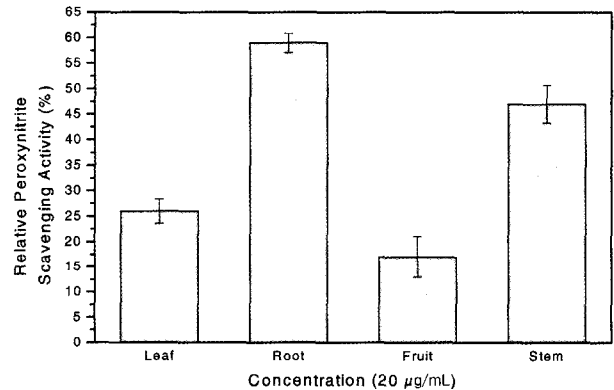


Figure 8. The peroxynitrite scavenging activities of *A. sessiliflorus* extracts.

로 나타내었다.

Figure 7에서 보는 바와 같이 이산화질소에 대한 추출물의 항산화 활성결과에서 오가피나무의 뿌리와 줄기 추출물에서 상당한 수준의 항산화 활성을 보여주었으며, 잎과 열매의 경우에는 뿌리와 줄기 추출물보다는 낮지만 이산화질소에 대한 약한 항산화 활성을 보여 주었다.

3.2.2. Peroxynitrite에 대한 항산화 효과

추출물의 유해질소중에 대한 항산화 활성을 측정하는 또 다른 방법으로 peroxynitrite에 의해 산화되는 dihydrorhodamine (DHR)의 형광의 감소를 이용하는 방법이 있다. 이러한 형광의 감소는 추출물에 의한 peroxynitrite의 소거로 인해 peroxynitrite의 DHR의 산화를 감소시킴으로서 형광이 줄어든다. 이 때 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 control의 형광값에 대한 상대적인 형광 감소로 나타내었다.

추출물에 의한 산화된 DHR의 형광 감소 정도에 따른 peroxynitrite에 대한 항산화 활성을 Figure 8에 나타내었다. 측정된 결과에 따르면 동일 농도(20 µg/mL)하에서 뿌리와 줄기가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서는 새로운 항산화제 소재로서 정선산 오가피나무를 이용하여 부위별 추출물에 대한 항산화 활성을 지질산화 억제력이나 DPPH 소거능으로 측정하던 기존의 항산화능 평가방법에서 탈피하여 spin-trapping 기법을 활용한 electron paramagnetic resonance (EPR) 방법을 적용하여 유해질소종인 superoxide와 hydroxyl radical, 유해질소종인 이산화질소 및 peroxynitrite 등 각각의 라디칼에 대한 항산화 활성을 측정하여 오가피나무 추출물의 항산화제로서의 효과를 측정하여 보았다. EPR을 이용

한 superoxide radical에 대한 항산화 활성 측정에서 오가피나무의 뿌리와 줄기가 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 잎과 열매 또한 뿌리와 줄기보다는 낮지만 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났다. Hydroxy radical에 대한 항산화 효과 또한 superoxide radical에 대한 항산화 효과와 마찬가지로 뿌리와 줄기 추출물이 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 보인다. 이산화질소와 peroxinitrite 등 유해질소종에 대한 항산화 활성의 경우, 뿌리와 줄기 추출물이 열매와 잎 추출물보다는 좀 더 높은 항산화 활성을 지니고 있음이 밝혀졌다.

이러한 실험결과를 미루어 볼 때 여러 유해산소종과 유해질소종에 대한 우수한 항산화 효과를 보이는 오가피나무의 추출물은 새로운 항산화제의 개발가능성이 높다고 볼 수 있으며, 산화적 스트레스에 의하여 발생하는 피부의 주름생성이나 색소침착 등에 효과적인 기능성화장품 소재로 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. P. Ody, Herbal insights - A close look at active constituents of medical herbs, *SOFE Journal*, **121**, 8 (1995).
2. E. A. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Psacual, and M. D. Castillo, Evaluation of total antioxidant potencial and total reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, *Free Radic. Biol. Med.*, **18**(2), 153 (1995).
3. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, and A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based methods for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**(1), 29 (1995).
4. M. M. Corl, Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxy-toluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**(1), 59 (1975).
5. Y. H. Choi, M. J. Kim, H. S. Lee, B. S. Yun, C. Hu, and S. S. Kwak, Antioxidative compounds in aerial parts of *Potentilla fragarioides*, *Kor. J. Pharmacol.*, **31**(1), 79 (1998).
6. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순, 원역중약대사전, 3907, 도서출판 정담, 서울 (1998).
7. S. K. Kim, Y. G. Kim, M. K. Lee, J. S. Ham, J. H. Lee, and H. Y. Lee, Comparison of biological activity according to extracting solvents of four *Acanthopanax* root bark, *Korean J. Medical Corp. Sci.*, **8**(1), 21 (2000).
8. J. K. Ahn, W. Y. Lee, S. J. Oh, Y. H. Park, S. D. Hur, and M. S. Choi, The contents of chlorogenic acid and elutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Ruper. et Maxim) Harms, *J. Korean For. Soc.*, **89**(2), 211 (2000).
9. M. Miyakoshi, Y. Ida, S. Isoda, and J. Shoji, Alpha-hydroxyoleanane-type triterpene glycosyl esters from leaves of *Acanthopanax spinosus*, *Phytochemistry*, **34**(6), 1599 (1993).
10. H. Sawada, M. Miyakoshi, S. Isoda, Y. Ida, and J. Shoji, Saponins from leaves of *Acanthopanax sieboldianus*, *Phytochemistry*, **34**(4), 1117 (1993).
11. Y. Q. Zhao, S. S. Yang, J. H. Liu, and G. R. Zhao, Chemical constituents of *Acanthopanax senticosus* (Rupt. et Maxim) Harms, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **18**(7), 428 (1993).
12. J. Z. Wang, H. Tsumura, N. Ma, K. Shimura, and H. Ito, Biochemical and morphological alterations of macrophages and spleen cells produced by antitumor polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots, *Planta Med.*, **59**(1), 54 (1993).
13. J. H. Jung, S. W. Choi, and S. Han, Screening for antioxidative effects of cultivated crop from jeongseon county using electron paramagnetic resonance, *J. Sanhakyeon Reg. Consortium Center, Kangwon Nat'l Univ.*, **7**, 23 (2003).