

## 원저

## 葛根 추출물이 항산화에 미치는 영향

• 은영준\* · 권기록\*\* · 임태진\*\*\* · 송윤경\* · 임형호\*  
 \* 경원대학교 한의과대학 한방재활의학과교실  
 \*\* 상지대학교 한의과대학 침구과  
 \*\*\* 상지대학교 동물자원학부 생명공학과

## Effects of Puerariae Radix extract on the activity of antioxidant

Young-Joon Eun\* · Yun-Kyung Song\* · Hyung-Ho Lim\* · Ki Rok, Kwon\*\* · Tae Jin Rhim\*\*\*  
 \* Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, Oriental Medical College, Kyung-won University  
 \*\* Korean Medical College, Sangji University  
 \*\*\* Division of Animal resources and life science, Sangji University

## ABSTRACT

**Objective** The objective of this study was to investigate the antioxidative effects of Puerariae Radix extract. .  
**Method** Total antioxidant capacity (TAC), Total antioxidant response (TAR), Total phenolic content, Reactive oxygen species (ROS), 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities, lipid peroxidation were examined.  
**Result** Total antioxidant status was examined by total antioxidant capacity(TAC) and total antioxidant response(TAR) against potent free radical reactions. TAC and TAR of Puerariae Radix extract at the concentration of 5 mg/ml were 2.02 and 1.50 mM Trolox equivalents, respectively. Total phenolic content of Puerariae Radix extract at the concentration of 5 mg/ml was 2.29 mM gallic acid equivalent. Concentration of Puerariae Radix extract at which DPPH radical scavenging activity was inhibited by 50% was 5.91 mg/ml as compared to 100% by pyrogallol solution as a reference. The inhibitory effect of the extract on lipid peroxidation was examined using rat liver mitochondria induced by FeSO4/ascorbic acid. Puerariae Radix extract at the concentration of 1 mg/ml slightly but significantly decreased TBARS concentration. The extract further prevented lipid peroxidation in a dose-dependent manner. The effect of Puerariae Radix extract on reactive oxygen species (ROS) generation was examined using cell-free system induced by hydrogen peroxide/FeSO4. Addition of 1 mg/ml of Puerariae Radix extract significantly reduced dichlorofluorescein (DCF) fluorescence. The extract caused concentration-dependent attenuation of the increase in DCF fluorescence, indicating that the extract significantly prevented ROS generation in vitro. Thus antioxidant effects of Puerariae Radix extract seem to be due to, at least in part, the prevention from free radicals-induced oxidation, followed by inhibition of lipid peroxidation.  
**Conclusion** As a result, Puerariae Radix seems to have antioxidative effect and antioxidant compound.  
**key words** *Puerariae Radix, antioxidative effects, free radical*

## 1. 서론

평균 수명이 연장되고 소득수준이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 증대되고 있는 가운데, 醫食同源의 측면에서 의학적인 접근뿐만 아니라 식품·영양학적인 접근을 통해 면역, 질병예방 및 회복, 노화 억제를 하려는 노력이

증대되고 있다.

특히 인간의 질병 및 노화는 대사과정 중 발생하는 Superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitric oxide(NO<sup>·</sup>), nitrogen dioxide(NO<sub>2</sub><sup>·</sup>), hydroxyl(OH<sup>·</sup>), peroxy(ROO<sup>·</sup>), alkoxyle(RO<sup>·</sup>), hydroperoxyl radical(HO<sub>2</sub><sup>·</sup>) 등의 산화 반응에 기인하며, 이런 radical들은 체내 지질, 단백질 그

리고 핵산과 같은 구성물질의 손상을 유발한다. 그리고 체내에서는 유해한 radical을 제거하기 위해 여러 효소적·비효소적 반응이 진행된다.<sup>1,2)</sup>

현재 tocopherol과 L-ascorbic acid가 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그 중 tocopherol은 안정성은 높으나 단독으로 산화반응 저지 능력이 낮으며<sup>3)</sup> 가격이 비싸다는 단점이 있다. 화장품이나 식·의약품 등에 많이 사용되는 합성산화제로는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate), TBHQ(tertiary butylhydroquinone) 등이 있으나 이들을 실험동물에 고농도로 투여할 경우에는 간비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져있다.<sup>4)</sup>

이에 따라 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>5)</sup>

갈근은 예부터 식용으로 다양하게 응용되어 왔으며, 해열작용<sup>6)</sup>, 혈압강하작용<sup>7)</sup>, 항궤양효과<sup>8)</sup>, 항염증작용<sup>9)</sup>, 항산화효과<sup>10)</sup>, 알콜해독 및 간보호작용<sup>11)</sup>, 뇌신경세포 보호작용<sup>12)</sup>, 중금속 해독작용<sup>13,14)</sup>, 항지질효과<sup>15)</sup>, 골다공증 치료효과<sup>16,17)</sup>, 위장에 대한 진경작용<sup>18)</sup>, 항우울작용<sup>19)</sup>이 있는 것으로 밝혀졌다.

현재까지 갈근의 항산화 효능에 대한 연구<sup>10,20,21,22,23,24)</sup>에서는 주로 효소적 방어기구인 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase에 대한 연구와 간접적인 측정방법인 DPPH(electron donating ability) radical ability 및 nitrate reductase activity(NR), lipid peroxidase(LP), peroxide(PO) value, carbonyl(CO) value, 지방산 조성의 변화 검사 방법 사용하였다.

특히 연구방법이 대부분 효소계의 활성을 측정한 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, glutathione reductase의 활성 측정방법을 사용하였다. 그러나 이 방법은 항산화와 관련된 효소를 통해 항산화 능력을 측정하는 방법으로 비효소적 반응을 통한 free radical의 소거능력을 검증하기에는 부족하였다. 물론 DPPH 소거활성을 통해서 갈근 추출물의 free radical의 소거능력을 평가하였지만 free radical의 소거능력을 평가하는 다양한 방법이 갈근에 적용되는 경우는 드물었다.

따라서 본 연구에서는 갈근 추출물의 항산화작용을 규명하기 위해 free radical의 소거능력을 검증하는 방법 중에서 다용되고 있는 총 항산화능(TAC), 총 항산화 반응

(TAR), DPPH 자유유리기 소거작용에 대한 실험 및 직접적인 항산화능력 측정방법으로 TBARS 분석을 통한 갈근의 지질과산화 억제효과 및 활성산소종 억제효과를 살펴 보고, 그 외 천연물 항산화물질인 페놀성 화합물의 함량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 연구방법

### 1. 재료

#### 1) 갈근 추출물의 조제

葛根(Puerariae Radix)은 정선된 제품을 경원대학교 부속한방병원에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 100g의 갈근을 수침한 후 분쇄한 시료 99.15 g을 80% ethanol(HPLC-grade) 700 ml로 2번 추출한 뒤 evaporation시켰다. 최종적으로 동결건조기에서 회수된 19.75 g의 ethanol 추출물을 얻었으며, 회수율은 19.9%로 나타났다. 확보된 갈근 추출물은 50 mg/ml의 농도로 dH<sub>2</sub>O에 녹여 4℃에서 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약

2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate(DCFH-DA ; Molecular Probes, USA), 96-well plate(Becton Dickinson, USA)를 사용하였다. 생화학적 분석에 사용하는 모든 화학물과 용매들은 분석급 이상의 시약(Sigma Chemical, USA)으로 사용하였다.

#### 3) 실험동물

(주)대한바이오링크로부터 구입한 6주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하였고, 1주일의 적응기간을 거친 다음 간을 절제한 후 Hovius 등<sup>34)</sup>의 방법에 따라 미토콘드리아를 분리하였다.

### 2. 방법

#### 1) Total antioxidant capacity (TAC) 측정

Total antioxidant status(총 항산화능)는 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 방법<sup>35)</sup>의 방법을 수정한 Erel<sup>36)</sup>의 방법에 따라 TAC를 측정하였다. 산성

pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonate, ABTS)는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 청록색의 ABTS.+로 산화되게 된다. 만일 추출물 내 항산화물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 ABTS.+는 탈색되며, 이러한 색 변화반응의 결과는 660 nm에서의 흡광도로 조사하였다. 시료 추출물의 TAC 측정을 위해 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5, 2.25 및 3 mM의 Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

Trolox는 총 항산화능 측정에 광범위하게 사용되는 전형적인 표준시약으로, TAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다.

#### 2) Total antioxidant response (TAR) 측정

Free radical 반응에 대한 총 항산화능은 ferric reducing/antioxidant power assay(FRAP) 방법<sup>37)</sup>을 수정한 Erel<sup>38)</sup>의 방법에 따라 TAR을 측정함으로써 결정하였다. 산성 pH에서 무색의 환원형 o-dianisidine은 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical(OH.)에 의해 황갈색의 dianisidyl radical로 변화하게 된다. 만일 추출물 내에 항산화물질이 존재하게 되면, 이들 농도에 비례하여 산화반응을 억제시켜 색 변화가 감소하게 된다. 이러한 반응은 444 nm에서의 흡광도로 조사하였다. 시료 추출물의 TAR 측정을 위해 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5, 2.25 및 3 mM의 Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다. TAR 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다.

#### 3) Total phenolic content 측정

추출물 내 총 phenolic 함량은 gallic acid를 표준시약으로 사용하여, Singleton과 Orthofer의 방법<sup>39)</sup>에 따라 760 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

시료 추출물의 총 phenolic 함량 측정을 위해 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.67 및 2.5 mM의 gallic acid를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

Gallic acid는 총 phenolic 함량 측정에 가장 많이 사용되는 전형적인 표준시약으로 총 phenolic 함량은 mM gallic acid equivalent로 표기하였다.

#### 4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거활성 측정

DPPH free radical 소거활성은 Malterud 등<sup>40)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 µg/ml methanol)을

추출물과 혼합한 다음 515 nm에서 흡광도의 감소를 30초 간격으로 5분간 측정하였다. Free radical 소거활성은 pyrogallol 용액(125 µg/ml DMSO)의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표기하였다.

#### 5) 지질과산화 측정

추출물의 지질과산화 억제 효과는 간 미토콘드리아 배양액의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 농도를 측정함으로써 결정하였다. 간 미토콘드리아(0.5 mg/ml)를 10 µM FeSO<sub>4</sub>와 100 µM ascorbic acid와 함께 추출물 농도별로 37°C에서 60분간 배양하였다.

미토콘드리아 배양액의 지질과산화는 Stacey와 Klaassen<sup>41)</sup>의 방법에 따라 excitation 파장 530 nm와 emission 파장 590 nm에서 형광도를 측정함으로써 결정하였다.

TBARS 농도 측정을 위해 0, 16.2, 8.1, 4.05, 2.025, 1.013 및 0.506 µM의 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

#### 6) Reactive oxygen species (ROS) 측정

Sodium hydroxide(0.008 N) 처리에 의해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 DCFH로 탈에스테르화(deesterification)되며, 생성된 DCFH는 ROS에 의해 dichlorofluorescein(DCF)으로 산화하게 된다. Cell-free system에서 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1 µM FeSO<sub>4</sub>에 의해 ROS를 생성하였다. DCF 형성에 따른 형광도 증가는 LeBel 등<sup>42)</sup>의 방법에 따라 excitation 파장 488 nm와 emission 파장 525 nm에서 2분 간격으로 10분간 측정하였다. 형광도 감소는 추출물 내 항산화물질에 의한 ROS 생성 억제를 나타낸다.

#### 7) 단백질 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시약으로 사용하여 Lowry 등<sup>43)</sup>의 방법에 따라 측정하였다.

### 3. 통계 분석

추출물 농도별 TBARS 농도와 DCF의 형광도는 일원분산분석을 사용하여 조사하였으며, 농도별 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

### III. 결과

#### 1. Total antioxidant capacity (TAC) 측정 결과

Trolox 농도와 660 nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식은  $Y=1.403-0.321X$  (Y는 660 nm에서의 흡광도이며, X는 Trolox 농도)이었다. Trolox의 농도가 증가함에 따라 유의적으로( $r^2=0.989$ ) 660 nm에서의 흡광도가 감소하였다.

0.1, 1 mg/ml 농도의 같은 추출물의 TAC는 각각 0.13, 0.63 mM Trolox equivalent으로, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 5, 10 및 50 mg/ml 농도에서는 각각 2.02, 2.76 및 3.81 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 같은 추출물은 농도의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 1).

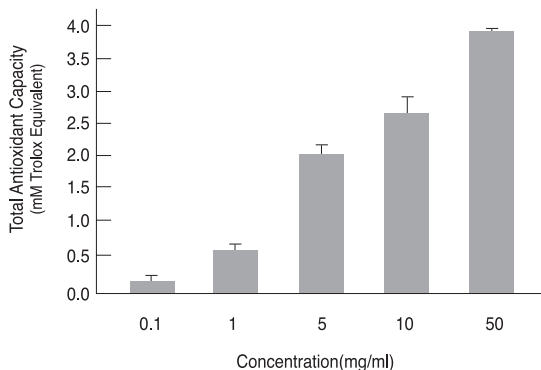


Fig. 1 Total antioxidant capacity of various concentrations of Puerariae Radix extract. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations.

#### 2. Total antioxidant response (TAR) 측정 결과

Trolox 농도와 444 nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식은  $Y=1.076-0.174X$  (Y는 444 nm에서의 흡광도이며, X는 Trolox 농도)이었다. Trolox의 농도가 증가함에 따라 유의적으로( $r^2=0.987$ ) 444 nm에서의 흡광도가 감소하였다.

0.1 mg/ml 농도의 같은 추출물의 TAR은 0.4 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAR도 비례적으로 증가하여 1, 5, 10 및 50 mg/ml 농도에서는 각각 0.69, 1.50, 2.33 및 3.04 mM Trolox

equivalent를 나타내었다. 따라서 같은 추출물은 농도의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 2).

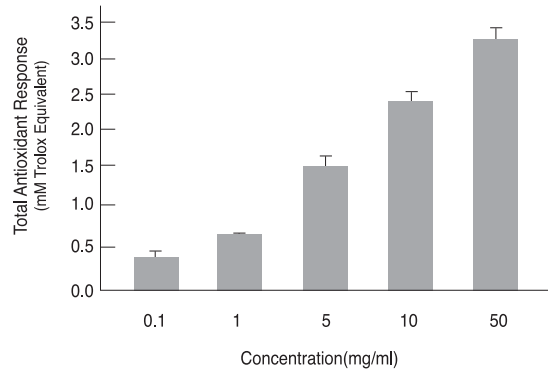


Fig. 2 Total antioxidant response of various concentrations of Puerariae Radix extract. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations.

#### 3. Total phenolic content 측정 결과

Phenolic compound는 식물에 존재하는 대표적인 항산화물질이다. Gallic acid 농도와 760 nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식은  $Y=0.002+0.719X$  (Y는 760 nm에서의 흡광도이며, X는 gallic acid 농도)이었다. Gallic acid의 농도가 증가함에 따라 유의적으로( $r^2=0.998$ ) 760 nm에서의 흡광도도 증가하였다.

0.1 mg/ml 농도의 같은 추출물의 총 phenolic 함량은 0.14 mM gallic acid equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총 phenolic 함량도 비례적으로 증가하여 1, 2.5, 5 및 10 mg/ml 농도에서는 각각 0.73, 1.37, 2.29 및 3.21 mM gallic acid equivalent를 나타내었다(Fig. 3).

#### 4. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거활성 측정 결과

DPPH radical은 짝을 이루지 못하는 전자쌍 때문에 진한 자색을 띠게 되며, 515 nm에서 45 ug/ml 농도의 DPPH의 흡광도는 약 1.2로 나타났다. DPPH 용액과 신속히 혼합한 시료의 흡광도 감소는 free radical 소거활성을 나타내며, 시료의 free radical 소거활성은 pyrogallol 용액의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표시하였다.

추출물 농도 1 mg/ml의 radical 소거활성은 12.0%이었고, 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여 5 및 10, 50 mg/ml의 농도에서 radical 소거활성은 각각 42.3 및 82.3, 93.68 %로 관찰되었다. 추출물 농도와 free radical 소거활성 간의 회귀분석 결과 50%의 radical 소거활성에 필요한 같은 추출물의 농도는 5.91 mg/ml으로 나타났다(Fig. 4).

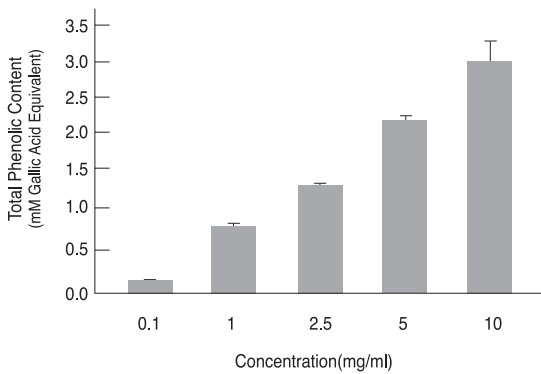


Fig. 3 Total phenolic content of various concentrations of Puerariae Radix extract. Data results were expressed as in terms of mM gallic acid equivalent, Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

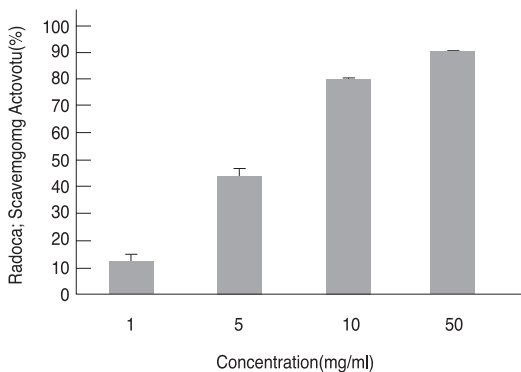


Fig. 4 DPPH free radical scavenging activities of various concentrations of Puerariae Radix extract. Data results were expressed as % radical scavenging activity relative to 100% radical scavenging activity of pyrogallol solution as a reference. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

### 5. 지질과산화 억제효과

미토콘드리아는 과산화 연구에 주요한 모델로 사용되고 있으며, 본 연구에서는 랫드 간 미토콘드리아(0.5 mg 단백질/ml)를 이용하여 추출물의 지질과산화에 미치는 영향을 조사하였다. 지질과산화는 hydroxyl radical을 생성하는 FeSO<sub>4</sub>/ascorbic acid로 유발시켰으며, TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였다.

표준시약 농도와 excitation 파장 530 nm/emission 파장 590 nm에서의 형광도 간의 회귀방정식은  $Y=5.957+26.673X$ (Y는 형광도이며, X는 TBARS 농도)이었다.

TBARS 농도가 증가함에 따라 유의적으로( $r^2=0.987$ ) 형광도가 증가하였다.

추출물을 첨가하지 않았을 경우, 즉 0 mg/ml 농도에서 10 uM FeSO<sub>4</sub>와 100 uM ascorbic acid에 의해 유도된 지질과산화는 TBARS 농도를 11.26 uM로 증가시켰다.

1 mg/ml 농도의 같은 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 10.79 uM로 약간(4% 정도) 그러나 유의적( $p<0.05$ )으로 감소시켰다.

추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여, 10 및 20 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 지질과산화를 30.8(7.79 uM) 및 99% 정도(0.10 uM) 억제하였다(Fig. 5).

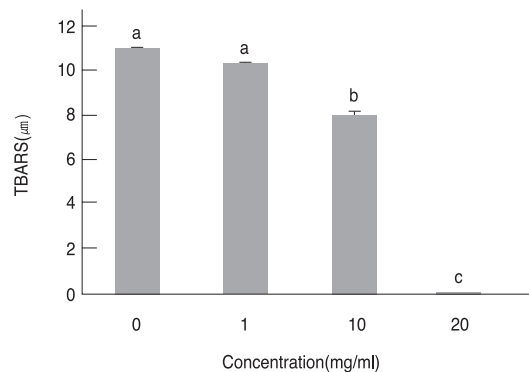


Fig. 5 The effect of Puerariae Radix extract on lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Rat liver mitochondria were incubated with FeSO<sub>4</sub>/ascorbic acid in the absence or presence of various concentrations of Puerariae Radix extract. Lipid peroxidation was determined by measuring the release of TBARS. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

## 6. ROS 생성 억제효과

FeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와에 의해 생성된 ROS에 의해 DCFH는 DCF로 산화되며 형광도가 증가하게 된다. 따라서 추출물 내의 항산화물질이 존재하는 경우 추출물 첨가에 의해 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다.

추출물을 첨가하지 않았을 경우 DCFH의 산화에 따른 DCF 형광도는 0 분에서 419, 10분 후에는 597.3이었다.

같은 추출물의 ROS 생성 억제에 미치는 효과는 1 mg/ml 농도의 같은 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도가 0 및 10분에 각각 395.7 및 484.4를 나타내어, 무첨가에 비해 DCF 형광도가 10분에서 유의적(p<0.05)으로 감소되었다.

추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하였고, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 333.6 및 414.9로 감소되어 20 및 30%의 ROS 생성 억제를 나타내었다.

50 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 240.0 및 328.7로 더욱더 감소되어 43 및 45%의 ROS 생성 억제를 나타내었다(Fig. 6).

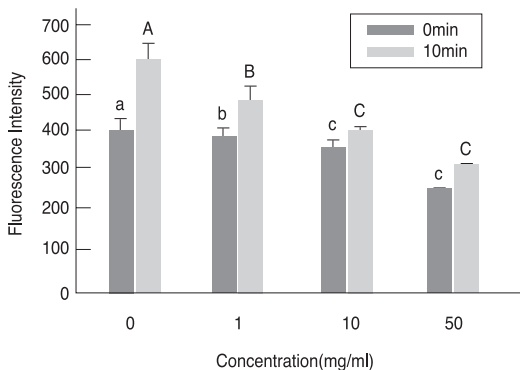


Fig. 6 The effect of Puerariae Radix extract on ROS generation. DCFH oxidation to DCF by FeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS generation in the absence or presence of various concentrations of Puerariae Radix extract was measured for 10 min. Each bar represents the mean±SEM of triplicate determinations.

## IV. 고찰

인체가 섭취한 산소의 95% 이상은 세포의 대사과정에서 생성되는 전자와 결합하여 물로 환원되지만 2~3%의 일부 산소는 불완전 환원으로 전자를 흡수하려는 활성적 반응과정에서 세포의 파괴작용을 초래하는데, 이를 산소 라디칼 또는 활성산소종(Reactive Oxygen species, ROS)이라고 한다<sup>25)</sup>.

활성산소는 일종의 유해산소로서 흡수의 전자를 갖는 chemical species로서 쌍을 이루지 못한 전자를 갖는 분자는 열역학적으로 불안정하여 매우 반응성이 높기 때문에 다른 분자와 결합하여 자유전자쌍을 만들려고 한다. 활성산소종은 식균 작용이나 면역체계에서도 생성되어 이물질 침입에 대한 방어기작으로 이용되고 있으나, 체내에 고농도로 존재하는 경우 높은 반응성으로 인하여 질환을 일으킨다.

활성산소종에는 hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>), superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-·</sup>), peroxy radical(ROO<sup>·</sup>), nitric oxide(NO<sup>·</sup>), nitrogen dioxide(NO<sub>2</sub><sup>·</sup>), alkoxy(RO<sup>·</sup>), hydroperoxyl radical(HO<sub>2</sub><sup>·</sup>)과 같은 free radical과 radical의 형태가 아닌 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxygen, 오존 등이 있는데 이러한 과정으로 생성된 활성산소종은 생체막 지질의 과산화를 유발하여 그 2차 산물로 결국 malondialdehyde(MDA)나 4-hydroxynonenal(4-HNE)와 같은 지질과산화물을 축적시킨다<sup>26,27)</sup>. 그 결과 세포막의 파괴, 세포의 노화, 세포의 괴사 등 생체기능이 저하되어 노화를 유발할 뿐만 아니라 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 당뇨병, 심장병, 신부전, 암 등 여러 가지 급만성 질환의 병인으로 인정되고 있다<sup>28,29)</sup>.

이러한 자유유리기로부터 세포를 방어하는 체계에는 효소적 방어기구인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px), catalase, NADPH-quinon oxidoreductase, conjugation enzymes, glutathione reductase, epoxide hydrolase<sup>30)</sup>와 비효소적 항산화물질인 비타민 A, C, E, α-tocopherol, β-carotene, glutathione, flavonoid, urate, Selenium, Coenzyme Q<sub>10</sub> 등이 있으며<sup>31,32,33)</sup>, 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxy anisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate), TBHQ(t-butylhydroquinone) 등이 있다<sup>34,35,36,37)</sup>.

천연항산화제 개발연구재료는 미생물 대사산물<sup>38)</sup>, 버섯류<sup>39)</sup>, 조류<sup>40)</sup>, 식물<sup>41)</sup>, 다류<sup>42)</sup> 등 다양하다.

한의학계에서는 石斛<sup>41)</sup>, 薄荷<sup>43)</sup>, 兔絲子<sup>44)</sup>, 補骨脂<sup>44)</sup>, 蛇床子<sup>44)</sup>, 淫羊藿<sup>44)</sup>, 黃芩<sup>45)</sup>, 葛根<sup>20)</sup>, 大黃<sup>46)</sup>, 山查<sup>47)</sup> 와 같은 단미제와 加味小健中湯<sup>48)</sup>, 五子衍宗丸<sup>49)</sup>, 斑龍丸<sup>50)</sup>, 清心蓮子湯<sup>51)</sup>, 補中益氣湯<sup>52)</sup>, 六味地黃丸<sup>52)</sup> 등의 복합처방 및 약침<sup>53)</sup> 등 다양한 약제 및 처방의 항산화 효과에 대한 연구가 있었다.

葛根은 豆科(콩과; Leguminosae)에 속한 다년생 藤本인 菝 Pueraria thunbergiana BENTH. (P. lobata(WILLD.) OHWI)의 뿌리를 건조한 것으로, 性은 平(涼) 無毒하고, 味는 甘辛하다. 脾胃로 歸經하여 升陽解肌, 透疹止瀉. 除煩止渴하는 효능이 있다<sup>54)</sup> 주요 성분은 flavonoids로 daidzin, daidzein, puerarin, daidzein-4', 7-diglycoside, pueranin-7-xyloside, 4', 6'-o-diacetyl puerarin, 4'-methoxypuerarin 등이 있다. Triterpenoidal sapogenol도 sophoradiol, soyasapogenin A, B 등이 있고, 그 외 allantoin,  $\beta$ -sitosterol, starch 등이 함유되어<sup>55)</sup>, 해열작용<sup>6)</sup>, 혈압강화작용<sup>7)</sup>, 항궤양효과<sup>8)</sup>, 항염증작용<sup>9)</sup>, 항산화효과<sup>10)</sup>, 알콜해독 및 간보호작용<sup>11)</sup>, 뇌신경세포 보호작용<sup>12)</sup>, 중금속 해독작용<sup>13,14)</sup>, 항지질효과<sup>15)</sup>, 골다공증 치료효과<sup>16,17)</sup>, 위장에 대한 진경작용<sup>18)</sup>, 항우울작용<sup>19)</sup>이 있는 것으로 밝혀졌다.

갈근의 항산화 효능에 대한 주요 연구방법으로 대부분 효소계의 활성을 측정하는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px), catalase, glutathione reductase의 활성 측정방법을 사용하였다. 이는 직접적인 free radical의 소거능력을 측정하는 것은 아니다. 물론 DPPH 소거활성을 통해서 free radical의 소거능력을 평가하였지만, 아직까지 free radical의 소거능력을 평가하는 다양한 방법이 갈근에 적용되는 경우는 드물었다. 따라서 본 연구에서는 free radical 소거능력을 측정할 수 있는 방법으로서 Total anti-

oxidant capacity(TAC), Total antioxidant response(TAR) 등을 측정하고, 기존의 연구에서 시행되었던 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성, 지질과산화 억제효과 및 Reactive oxygen species(ROS) 억제효과를 측정하고 천연물 항산화물질인 페놀성 화합물(Total phenolic content)의 함량을 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

0.1 및 1 mg/ml 농도의 갈근 추출물의 TAC는 0.13 및 0.63 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 5, 10 및 50 mg/ml

농도에서는 각각 2.02, 2.76 및 3.81 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 갈근 추출물은 농도의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 1).

0.1 및 1 mg/ml 농도의 갈근 추출물의 TAR은 각각 0.69 및 0.4 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAR도 비례적으로 증가하여 5, 10 및 50 mg/ml 농도에서는 각각 1.50, 2.33 및 3.04 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 갈근 추출물은 농도의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 2).

식물에 존재하는 대표적인 항산화물질인 Phenolic compound는 0.1 mg/ml 농도의 갈근 추출물에서 phenolic 함량은 추출물 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하여 1, 2.5, 5 및 10 mg/ml 농도에서는 각각 0.73, 1.37, 2.29 및 3.21 mM gallic acid equivalent를 나타내었다(Fig. 3).

DPPH 용액과 신속히 혼합한 시료의 흡광도 감소는 free radical 소거활성을 나타내며, 추출물의 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여 5, 10 및 50 mg/ml의 농도에서 radical 소거활성은 각각 42.3, 82.3 및 93.68%로 관찰되었다. 추출물 농도와 free radical 소거활성 간의 회귀분석 결과 50%의 radical 소거활성에 필요한 갈근 추출물의 농도는 5.91 mg/ml로 나타났다(Fig. 4).

과산화 연구에 주요한 모델인 미토콘드리아(0.5 mg 단백질/ml)를 이용하여 추출물의 지질과산화에 미치는 영향을 조사한 결과 1 mg/ml 농도의 갈근 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 10.79 uM로 약간(4% 정도) 그러나 유의적(p<0.05)으로 감소시켰다. 추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여, 10 및 20 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 지질과산화를 30.8(7.79 uM) 및 99% 정도(0.10 uM) 억제하였다(Fig. 5).

추출물 내의 항산화물질이 존재하는 경우 추출물 첨가에 의해 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다. 1 mg/ml 농도의 갈근 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도가 0 및 10분에 각각 395.7 및 484.4를 나타내어, 무첨가에 비해 DCF 형광도가 10분에서 유의적(p<0.05)으로 감소되었다. 추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하였고, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 333.6 및 414.9로 감소되어 20 및 30%의 ROS 생성 억제를 나타내었다. 50 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에

각각 240.0 및 328.7로 더욱더 감소되어 43 및 45%의 ROS 생성 억제제를 나타내었다(Fig. 6).

이와 같이 갈근은 free radical 소거활성이 있는 것으로 나타났고, 유의한 페놀 함량이 있으며, 지질과산화 억제효과, ROS 생성억제 효과가 있는 것으로 나타났으므로 갈근이 항산화 효과가 있음을 알 수 있다. 갈근은 항산화 효과뿐만 아니라 인체의 질병과 노화에 대한 다양한 효과가 있으므로 향후 지속적인 연구 및 개발이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

갈근의 항산화 효능에 관한 실험적 연구를 시행한 결과는 다음과 같다.

1. TAC 측정결과 갈근 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내었다.
2. TAR 측정결과 갈근 추출물은 농도 의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내었다.
3. 총 페놀 함량은 갈근 추출물 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 gallic acid equivalent를 나타내었다.
4. DPPH 소거활성 측정결과 갈근 추출물의 농도가 증가할수록 소거활성도 증가함을 나타내었다.
5. 지질과산화 억제효과 측정결과 갈근 추출물의 농도가 증가할수록 TBARS 농도도 유의적( $p < 0.05$ )으로 억제하였으며, 20 mg/ml 농도의 갈근 추출물 첨가는 지질과산화를 99% 정도 억제하였다.
6. ROS생성 억제효과 측정결과 갈근 추출물의 농도가 증가할수록 DCF 형광도가 감소되어 1 mg/ml 농도의 갈근 추출물의 첨가 10분 후 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소되었다.

이상의 실험결과 갈근은 유의한 항산화작용이 있는 것으로 볼 수 있다.

## 참고문헌

1. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radical antioxidant and nutrition. Nutrition. 2002;18:872-9.
2. Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidant in health and disease. Int Dairy Journal. 1998;8:463-72.
3. Halliwell B, Hoult RJ, Blake DR. Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs. FASEB J. 1988;2:2867-70.
4. Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. J Natl Cancer Inst. 1983;70(2):343-52.
5. Larson RA. The antioxidant of higher plants. Phytochemistry. 1988;27:969-78.
6. 丹野與三太. 葛根の 解熱作用に就きて. 日藥物誌. 1941;33:263-8.
7. 홍자혜, 박평심, 이명렬. 갈근 추출물이 Alloxan으로 유발된 가토의 고혈당에 미치는 영향. 자연과학연구. 1992;15(1):123-9.
8. 엄기전, 정명현. 갈근 에탄올 엑기스의 실험적 위궤양에 미치는 영향. 약학연구. 1982;4(1):33-42.
9. 남궁순영. 갈근으로부터 분리한 isoflavone 유도체 및 합성 biochanin A 유도체들의 항염증작용과 in vitro 림프구증식능 억제작용. 약학연구. 1993;6:71.
10. 손화영, 이가순, 오만진. 갈근 추출물의 항산화효과. 농업과학연구. 1990;17(2):130-41.
11. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl<sub>4</sub>중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 동서의학연구소 논문집. 1997:233-51.
12. 부일권, 김연섭. 갈근이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마신경세포 손상에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004;19(1):77-82.
13. 정영희, 한성희, 신미경. 카드뭉을 급여한 흰쥐에서 갈근 열수 추출액의 해독작용효과. 한국식생활문화학회지. 2002;17(4):456-64.
14. 한성희. 갈근 추출물이 납을 투여한 흰쥐의 혈청 효소활성도 및 조직의 납 축적에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2000;32(4):914-9.
15. 이정숙, 정재홍. 한국산 족차와 갈근차가 흰쥐의 지방대사와 지질과산화에 미치는 영향. 보건과학연구소보. 1996;6:105-12.
16. 김정숙, 하혜경, 김혜진, 이제현, 송계용. 칩의 부위



- 별 골다공증 치료 효과. 한국식품과학회지. 2002;34(4):710-8.
17. Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(5):268-75.
  18. S Shibata, M Harada, T Murakami. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. II. Antispasmodic action of the constituent of Pueraria root. *Yakugaku Zasshi.* 1959;79:863.
  19. Yan B, Wang DY, Xing DM, Ding Y, Wang RF, Lei F, Du LJ. The antidepressant effect of ethanol extract of Radix Puerariae in mice exposed to cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;78(2):319-25.
  20. 김상현, 김연섭. 갈근의 뇌해마 신경세포 손상보호와 항산화 효능에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2005;19(2):416-25.
  21. 이옥희. 갈근 추출물이 흰쥐 혈액의 항산화계에 미치는 영향. 자연과학연구소 논문지. 2004;9(1):73-9.
  22. 임규, 박용기, 강병수. 칩의 부위별 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 2001;16(2):101-11.
  23. Kang KA, Chae S, Koh YS, Kim JS, Lee JH, You HJ, Hyun JW. Protective effect of Puerariae Radix on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(7):1154-60.
  24. Lee MK, Cho SY, Jang JY, Cho MS, Jeon SM, Jang MK, Kim MJ, Park YB. Effects of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. *Am J Chin Med.* 2001;29(2):343-54.
  25. Alessio HM. Exercise induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(2):218-224.
  26. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Critical Reviews in Toxicology.* 1993;23:21-48.
  27. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition.* 1996;16:33-50.
  28. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90:7915-22.
  29. David R. Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J Pharm. Pharmacol.* 1989;41:505-11.
  30. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* 1982;257(10):5751-4.
  31. Sies H. Oxidative stress, Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5.
  32. Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. *Am Fam Physician.* 2005;72(6):1065-70.
  33. El-Khawaga OA. Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice. *J Physiol Biochem.* 2005;61(4):501-6.
  34. Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydrotoluene, butylated hydroxynisole. *J Am Oil Chem Soc.* 1975;52:59-63.
  35. Giese J. Antioxidants, Tools for preventing lipid oxidation. *Food Tech.* 1996;50:73.
  36. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Medicines.* 1995;49:357.
  37. Hahm TS, King DL, Min DB. Food antioxidants. *Foods and Biotechnology.* 1993;2:1-8.
  38. Kim WG, Kim JP, Yoo ID. Benzastatins A, B, C, and D: new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643. II. Structural determination. *J Antibiot.* 1996;49(1):26-30.
  39. Lee IK, Yun BS, Cho SM, Kim WG, Kim JP, Ryoo IJ, Koshino H, Yoo ID. Betulinans A and B, two benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*. *J Nat Prod.* 1996;59(11):1090-2.

40. 이윤형, 강규찬, 백상봉, 이규순, 박재한. 식용 해조류에서 항산화 물질의 분리. 한국식품과학회지. 1991;23(3):256-61.
41. 김영균, 양기호, 조수인. 석곡의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005;20(4):53-60.
42. 여생규, 안철우, 이요우, 이태기, 박영호, 김선봉. 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화효과. 한국식품영양과학회지. 1995;24:299-304.
43. 정광희, 이영중, 성낙술. 박하의 항산화효능에 대한 연구. 대한본초학회지. 2005;20(4):103-12.
44. 오명숙, 김도림, 강지웅, 김산웅, 유태원, 박정열, 김동민, 박완수, 박성규, 장문석, 박수연. DPPH 방법을 통한 토사자, 보골지, 사상자, 음양곽의 항산화 활성에 대한 연구. 방제학회지. 2005;13(2):101-10.
45. 조수인, 오원우. 황금의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005;20(3):67-74.
46. 명성화, 김연섭. 대황의 항산화와 신경세포손상 보호효능에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2005;19(3):647-65.
47. 김경호, 이송실, 백진웅, 이상재, 김광호. 산사가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방의학회지. 2004;8(2):65-80.
48. 박선영, 서정민, 백정한. 가미소견중탕이 D-galactose로 노화를 유발시킨 백서의 항산화능에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2005;19(1):153-71.
49. 김기홍, 정국훈, 김광호, 고성규. 오자연중환이 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방의학회지. 2005;9(1):49-63.
50. 최영아, 강석봉. 반룡환이 D-galactose로 유발된 노화 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(4):129-39.
51. 한병삼, 배영춘, 송승연, 박혜선, 이재홍, 김경요. 청심연자탕의 항산화효과와 기전에 대한 연구. 사상체질의학회지. 2004;16(1):130-47.
52. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-91.
53. 임창수, 김갑성. 작약 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1997;14(2):191-8.
54. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 영림사. 1995:148.
55. 김호철, 한약약리학. 집문당. 2001:92.