

땀무 추출물의 항산화 활성 및 항균 효과

이정호¹⁾ · 임용광²⁾ · 김윤경³⁾ · 임진아⁴⁾ · 이기남^{4)*}

¹⁾송호대학 자연건강관리과, ²⁾보건행정학과

³⁾원광대학교 약학대학 한약학과, ⁴⁾원광대학교 한의학전문대학원

Effects of Antioxidant and Antimicrobial of *Geum japonicum* Thunb

Jeong Ho Lee,¹⁾ Yong Kwang Lim,²⁾ Yun Gyoung Kim³⁾

Jin A Lim⁴⁾ & Ki Nam Lee^{4)*}

¹⁾Department of Natural Health Management and ²⁾Health Administration, Songho College

³⁾Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy &

⁴⁾Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract

Herbal medicine has been traditionally used for prevention and treatment of disease, because herbal medicine has few side effects in the human body. Anti-medicines such as antimicrobial medicine and anti-cancer medicine, which contains herbal medicine, are being studied vigorously by researchers. The effects of *Geum Japonicum* Thunb are restorative, blood circulation and detoxification. It also treats hematemesi, menstruation and furunculus. The ingredients of *Geum Japonicum* Thunb include geoside and tannin.

This study measured antioxidative activation and antifungal activation by using *Geum Japonicum* Thunb water and methanol extract. The crude extract, which was used for this study, was Korean herbal medicine and the results are as follows. As *Geum Japonicum* Thunb extracts get stronger, the antioxidative activation tended to increase. The antioxidative activation hit its peak when the density of methanol extract was 120ug/ml. The experiment showed that a 1.0mm clear zone appeared when the density of the *Geum Japonicum* Thunb methanol extracts were 1000ug/ml in the *Staphylococcus epidermidis* and 1.1mm clear zone at *Pseudomonas aeruginosa*.

* Corresponding author : Ki Nam Lee, Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea. Tel : 82-63-850-6836

E-mail : kinaml@wonkwang.ac.kr

The results of this study concludes that the antioxidative activation is lubricated in the *Geum japonicum* Thunb extracts. In addition, the antifungal activation occurred in the fungus of the *Staphylococcus epidermidis* and the *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words : *Geum japonicum* Thunb, DPPH, Superoxide dismutase (SOD), antibacterial

I. 서론

한약재는 전통적으로 질병 예방과 치료에 사용되어 왔으며, 인체에 부작용이 적은 장점을 가지고 있다. 뱀무(*Geum japonicum* Thunb.)는 여러해사이풀로써 높이는 35~100cm로 전체에 털이 있으며, 제주도, 울릉도, 경남, 경북, 전북, 전남의 산과 들에 자생하고 있으며, 일본, 만주에 분포한다, 뱀무의 전초를 수양매(水楊梅)라고 하며, 보허(補虛), 익신(益腎), 활혈(活血), 해독(解毒) 등의 효능이 있으며, 두운목현(頭暈目眩), 사지무력(四肢無力), 해수(咳嗽), 토혈(吐血), 월경불순(月經不順), 창종(瘡腫) 등을 치료한다. 뱀무의 성분으로는 geoside, tannin 등이 함유되어 있다¹⁾.

현대인들의 질적인 삶의 향상과 함께 건강과 장수에 대한 관심이 고조되고 있으며, 그동안 인위적인 화학합성된 의약품, 식품, 화장품 등은 부작용을 초래하였다. 항산화제는 한약재나 식품 등에 함유된 활성 효과중의 하나로 인체의 노화방지, 성인병을 예방하는 등 인체활성 효과를 가지고 있으며, 인체 세포막의 손상은 세포의 기능을 원활하지 못하게 하고 암, 노화, 각종 성인병을 유발한다²⁻⁴⁾. 난치성 성인병의 발생과정에서 superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등의 활성 산소는 세포막 지방질의 과산화를 유발하여 막투과성의 변화를 초래한다³⁻⁵⁾. 생체

내의 유해한 활성산소가 정상적으로 소거되지 않을 때 oxidative stress가 생체내에 가해져 과산화지질이나 산화 분해물을 생성하고 생체 조직을 손상시키게 되어 노화, 동맥경화, 암 등의 성인병을 발병시킨다⁵⁻⁷⁾. 따라서 생체내에서 일어나는 산화과정을 억제하고 예방하는 것이 질병예방의 일차적인 방법이 될 수 있다.

이에 본 연구에서는 뱀무 추출물을 이용하여 항산화 활성과 항균활성을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 약재인 뱀무는 전북 완주군에서 채취하여 외부형태를 검정한 후, 음건한 후 물과 메탄올로 추출하여 4℃ 냉장 보관하여 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하여 시료로 사용하였다.

2. 실험기기

CO₂ incubator(NUAIRE), Deep freezer(IIshin), Nitrogen freezer(MVE, XC34/14), Elisa roader (Molecular devices, spectra MAX 340), Microscope(Olimpus, CK2), Micropipette(Gilson), 96 well(Falcon), Conical tube(Falcon).

3. 시약

RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, nutrient broth(Difco), nutrient agar(Difco), brain heart infusion broth(Difco), brain heart infusion agar(Difco), sabouraud dextrose broth(Difco), sabouraud dextrose agar(Difco), D-PBS(Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS(Hanks' balanced salt solution)등은 Gibco 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

4. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

Brand-Willams⁸⁾의 방법을 변형하여 자유 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여효과로 나타나는 시료의 환원력을 측정하였다. 유리시험관에 메탄올과 증류수에 녹인 시료를 유리시험관에서 1mg/ml의 농도로 녹인후 희석하여 사용하였다. 시료 0.8ml에 0.35mM DPPH 시약 0.2ml을 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{DPPH Scavenging Effect(\%)} = 100 - \left[\left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \right]$$

A_{sample} 는 시료와 반응한 10분후의 흡광도이고 A_{control} 은 대조군의 흡광도이다.^{9,10)}

5. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

Marklund와 Marklund¹¹⁾의 방법에 따라 각 농도별 시료(0.2mL)에 tris-HCl buffer(50mM

tris[hydroxymethyl]amino methane containing 10mM EDTA, pH 8.5, 3mL)와 7.2mM pyrogallol(0.2mL)을 가하고 25℃에서 10분간 방치하였으며, 1N HCl(1mL)로 반응을 정지시킨 후 420nm에서흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 다음 식에 의하여 활성을 검증하였다.

$$\text{SOD Effect(\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \right) \times 100 \right]$$

6. 균주배양

Mueller Hinton broth 배지를 사용하여 37℃ 배양기에서 16~20시간동안 배양하였다.

7. 항균측정

항균력은 Microdilution Broth Method법¹²⁾를 이용하여 측정하였다. 각 추출물을 10% DMSO 생리식염수에 용해시켜 단일콜로니를 액체배지에 접종하고, 37℃ 배양기에서 18시간동안 배양한 균주를 접종한 후 24시간 배양한 후 항균력을 측정하였다.

8. 통계학적 해석

실험결과와 통계학적처리는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출물의 수득율

뱀무 200g을 물과 메탄올을 이용하여 상온에서 24시간 3회 반복 추출한 후 0.4 μ m필터로

Table 1. Extracts and fractions yield of *Geum japonicum* Thunb.

solvent	Mass(mg)	Yield(%)
water extract	14.86	7.43
methanol extract	24.24	12.12

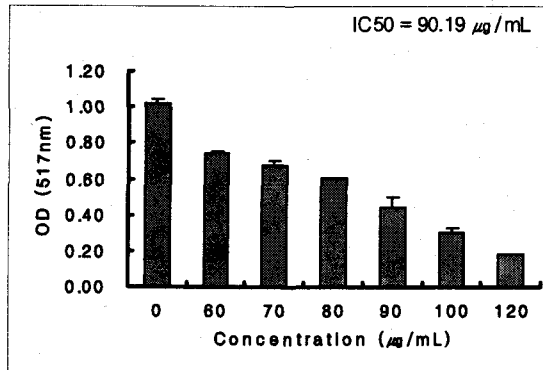


Fig.1. DPPH free radical scavenging activities of methanol extracts from *Geum japonicum* Thunb.

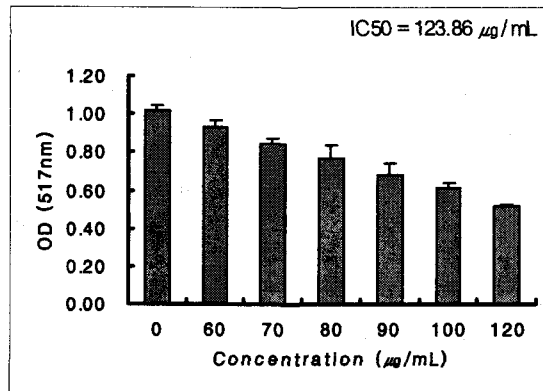


Fig.2. DPPH free radical scavenging activities of water extracts from *Geum japonicum* Thunb.

여과시켜 진공증류기로 35°C에서 감압 농축하였다. 추출물의 수득율은 Table. 1과 같다.

2. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

항산화물질로부터 전자나 수소를 받아 불가

역적으로 안정한 분자를 형성하는 DPPH의 특성을 이용한 항산화활성을 측정하였다. 뱀무물 추출물과 메탄올 추출물을 농도별로 처리하여 DPPH방법으로 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig.1과 2와 같다. 뱀무물 추출물은 처리농도가 증가함에 따라 항산화 활성도 증가하는 경향을 나타냈다. 메탄올 추출물의 처리농도가

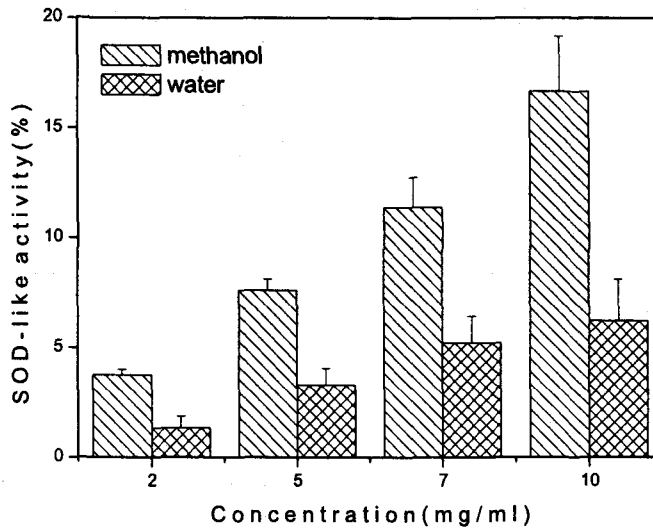


Fig.3. Superoxide dismutase activities of extracts from *Geum japonicum* Thunb.

증가할수록 항산화 활성도 처리 농도에 의존하여 증가하였으며, 처리 농도가 120 μ g/ml에서 가장 높은 항산화 활성이 나타났으며, 물 추출물에서도 처리 농도가 증가할수록 항산화 활성도 증가하였으나 메탄올 추출물보다는 활성이 낮게 나타났다^{13,14}.

뱀무 메탄올 추출물과 물 추출물을 처리하여 IC₅₀ 값을 측정하였다. 메탄올 추출물에서 90.19 μ g/ml과 물 추출물에서는 128.48 μ g/ml으로 활성을 나타내었다^{15,16}.

3. Superoxide dismutase(SOD)

유사활성

항산화 효소인 SOD는 세포 산소종(superoxide)을 과산화수소로 전환시키는 효소로 SOD로 인하여 생성된 H₂O₂는 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. SOD 활성을 측정한 결과 뱀무 각 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 SOD활성도 증가하였다. 메탄올 추출물의 처리

농도가 10mg/ml에서 16.65 \pm 2.51%로 SOD 활성이 높게 나타났지만 물 추출물에서는 6.23 \pm 1.89%로 활성이 낮게 나타났으며, 뱀무 물 추출물보다 메탄올 추출물에서 SOD 활성이 높게 나타났다^{17,18}.

4. 항균활성

뱀무 메탄올 추출물과 물 추출물을 이용하여 *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*을 이용하여 paper disk plate법으로 이용하여 항진균 효과를 측정할 결과 *Staphylococcus epidermidis* 처리농도가 500 μ g/ml에서 0.9mm와 1000 μ g/ml에서 1.0mm의 clear zone이 나타났고, *Pseudomonas aeruginosa*에서 500 μ g/ml에서 clear zone이 나타나지 않았으나, 1000 μ g/ml에서 1.1mm의 clear zone이 나타났다¹⁹.

Table 2. Antifungal activity of *Geum japonicum* Thunb against fungus.

Extract	Concentration (µg/ml)	Fungus					
		Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Salmonella typhimurium	Enterobacter aerogenes	Escherichia coli
Methanol	500	0.9 mm	0.3 mm	0.3 mm	0.3 mm	0.2 mm	0.3 mm
	1000	1.0 mm	1.1 mm	0.5 mm	0.65 mm	0.6 mm	0.5 mm
Water	500	0.3 mm	0.3 mm	-	-	-	-
	1000	0.5 mm	0.5 mm	0.3 mm	-	0.3 mm	-

IV. 고찰

환경오염과 부적절한 음식문화 등으로 인하여 암, 노화, 퇴행성 질환 등 성인병의 발생 빈도가 높아졌다. 특히 외인성 화학물질에 의한 세포막의 손상은 세포의 기능을 저하시키고 DNA 및 생체내 단백질을 손상시킨다^{2,3}. 성인병의 발생과정에서 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂), 지질과산화에 의한 alkoxy radical(RO·), alkyl peroxy radical(ROO·), nitric oxide(NO), superoxide anion(·O₂⁻)이 반응하여 활성산소종(reactive oxygen species)을 생성한다^{2,3,8}. 활성 산소종은 인체내에서 세포막 지방질의 과산화를 유발시켜 막투과성을 변화시키고, 세포막 내의 불포화 지방산이나 nucleotides, sulfhydryl 결합과 반응하여 인체의 생화학적인 변화유발, 단백질, 핵산, 생체막 등을 손상시키고, DNA를 산화시켜 염증을 유발시키는 등 생체조직을 손상시킨다^{19,20}. 뱀무 추출물의 처리농도가 증가할수록 환원력도 증가하였다. 남등²⁰의 연구결과와 비슷한 환원력이 나타났으며, DPPH 활성에서도 뱀무 추출물의 처리농도가 증가할수록 항산화 활성도 증가하였다. 이러한 결과는 뱀무 메탄올 추출물에 극성이 큰 화합물이 많이 포함되어 있는 것을 알 수

있었다. 또한 DPPH 구조에 전자를 하나 공여하고도 안정한 구조를 유지할 수 있는 phenol 성 구조의 화합물들로 인하여 라디칼 소거가 일어난 것으로 생각된다^{20,21}. 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)는 세포에 해로운 환원 산소종(superoxide)을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD에 의해 생성된 유해산소종인 H₂O₂는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. SOD는 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하고 체외로 배출되며, 열과 pH에 불안정하다. 따라서 SOD와 유사한 활성을 가지면서 SOD의 단점을 보완할 수 있는 SOD 유사활성 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다^{19,21}. 뱀무 추출물의 superoxide(O₂⁻) 산화억제작용을 측정하기 위한 방법인 superoxide와 반응하는 pyrogallol 자동산화반응을 측정하여 SOD 유사활성을 측정한 결과 뱀무 메탄올 추출물의 10mg/ml 처리농도에서 16.65±2.51%로 우수한 SOD 유사활성을 나타냈다.

V. 결론

한국산 생약재중 뱀무 물 추출물과 메탄올 추출물을 이용하여 항산화 활성화 항균활성을 측정한 결과는 다음과 같다.

1. 뱀무 각 추출물은 처리농도가 증가함에 따라 항산화 활성도 증가하였으며, 처리 농도가 120 μ g/ml에서 가장 높은 항산화 활성이 나타났다.

2. SOD 활성에서는 메탄올 추출물의 처리농도가 10mg/ml에서 16.65 \pm 2.51%로 SOD 활성이 높게 나타났다.

3. *Staphylococcus epidermidis*에서 처리농도가 500 μ g/ml에서 0.9mm와 1000 μ g/ml에서 1.0mm의 clear zone이 나타났고, *Pseudomonas aeruginosa*에서 않았으나, 1000 μ g/ml에서 1.1mm의 clear zone이 나타났다.

이상의 결과를 종합해 본 결과 뱀무 메탄올 추출물에서 항산화 활성이 좋은 것으로 나타났으며, *Staphylococcus epidermidis*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 균에서 항균활성이 나타났다.

참고문헌

1. 배기환, 한국의 약용식물, 교학사, 2003.
2. Kim, S. J., Cho, Y. S. and Park, S. W. : Cytotoxicity of methanol extracts of edible herbs against L1210 cells with the changes of antioxidant enzymes activities, *Kor. J. Pharmacogn.*, 33(4) : 376-383, 2002.
3. Lee, H. K., Kim, J. S., Kim, N. Y., Kim, M. J., Park, S. U. and Yu, C. Y. : Antioxidant, Antimutagenicity and anti-cancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA, *Korean J. Medicinal Crop Sci*, 11(1) : 53-61, 2003.
4. Cui, C. B., Lee, D. S. and Ham, S. S. : Antioxidative, Antimutagenic and cytotoxic effects of *Rhodiola sachalinensis* extract, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(2) : 211-216, 2003.
5. Jin, L. H., Han, S. S. and Choi, Y. S. : Antioxidant effects of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. *Kor. J. Pharmacogn*, 33(4) : 359-363, 2002.
6. Lee, J. W., Do, J. H. and Shin, K. H. : Antioxidant activity of the water soluble browning reaction products isolated from korean Red Ginseng, 1. DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging. *J. Ginseng, Res*, 23(2), 176-181. 1999.
7. Kim, C. H., Park, J. H., Lim, J. K., Lee, K. J., Chung, G. Y. and Jeong, H. J. : The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus*. A, Berger. *Korean J. Medicinal Crop Sci*, 11(1), 31-39, 2003.
8. Williams B. W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. : Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technol*, 28, 25-30, 1995.
9. Kim, J. W., Moon, B. S., Park, Y. M., Yoo, N. H., Ryoo, I. J., Chinh, N. T., Yoo, I. D. and Kim, J. P. : Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*, *J. Korean, Soc. Appl. Biol. Chem.* 48(1), 93-97, 2005.
10. Oyaizu, M. : Studies on products of browning reaction ; Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Jpn, J. Nutr*, 44, 307-315, 1986.
11. Krenn CG, Hedenstierna G, Basu S, Marklund SL, Hjoberg J. : Maintaining nitric oxide-induced airway relaxation with superoxide dismutase. 1: Nitric Oxide. *Epub*, 16(4) : 419-24. 2007.

12. Kim, Y. S., Eo, S. K., Kim, H. J., Lee, D. I., Kim, K. H. and Han, S. S.(1999): Antiherpetic activities of natural quercitrin aloe and in combinations with nucleoside antiherpetic agents. *J. Applied Pharmacology*, 7, 168-173.
13. Choi, E. Y., Oh, H. J., Park, N. K., Chun, H. J., Ahn, J. W., Jeon, B. H., Han, D. S., Lee, H. D. and Baek, S. H.: Screening of Cytotoxicity and Antimicrobial effects of extracts from *Atractylodes macrocephala* Koidz, *Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol.* 16(2): 348-352, 2002.
14. Nishiya, H., Ishiwata, K., Komatsu, K., Nakata, O., Kitamura, K., Fujih.S.: Platelet aggregation inhibitors from Jyu-yaku(HouttuyniaeHerb). *Chem. Pharm. Bull*, 36(5) 1902-1909, 1988.
15. Cha, B. C., Park, H. J., Lee, E., Cho, M. Y. and Rhim, T. J.: Comparison of antioxidant and composition in *Glycine max* Merr and *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Kor, J. Pharmacogn.*, 27(1): 19-195, 1996.
16. Chung, S. D., Hong, W. H. and Myong, G. C.: Genetic diversity in korean populations of *Glycine soja*(Fabaceae), *J. Plant Biol.*, 38(1): 39-45, 1995.
17. Xiong, Q., Kadota, S., Tadada, T. and Namba, T.: Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*, *Biol. Pharm. Bull*, 19: 1580-1585, 1996.
18. Kim, Y. I., Lee, S. H. and Cho, T. S. : Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. *Kor. J. Phramacogn*, 27(3): 238-245, 1996.
19. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M.: Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium(MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27: 897-900, 1991.
20. Nam, S. H. and Kang, M. Y.: Screening of antioxidative activity of legume species. *J, Korean, Soc, Agric, Chem, Biotechnl*, 46(1), 32-38.
21. Mun, Y. J., Nam, Y. J., Lee, K. G., Chol, D. H., Lee, S. W., Ahn, S. H., Chol, M. K. and Woo, W. H.(2002): The water extract of caesalpinia sappan induces apoptosis on human lung cancer call line, A549 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 16(3): 521-527, 2002.