

원 저

紅花 추출물의 항산화 효과에 대한 연구

유진숙, 송윤경, 임형호

경원대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Studies on the Antioxidant Effects of *Carthami Flos* Extract

Jin-sook Yoo, Yun-kyung Song, Hyung-ho Lim

Dept. of Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Won University

Objective : The objective of this study was to investigate the antioxidative effects of *Carthami Flos* extract.

Methods : Total antioxidant status was examined by total antioxidant capacity(TAC) and total antioxidant response (TAR) against potent free radical reactions. The effect of *Carthami Flos* extract was examined for details of total phenolic content, concentration at which 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity was inhibited, the inhibitory effect on lipid peroxidation, and the effect on reactive oxygen species(ROS) generation.

Results :

1. TAC of *Carthami Flos* extract at the concentration of 5 mg/ml was 1.84 mM Trolox equivalent.
2. TAR of *Carthami Flos* extract, on the other hand, couldn't be determined due to interference from unidentified compounds.
3. Total phenolic content of *Carthami Flos* extract at the concentration of 5 mg/ml was 2.01 mM gallic acid equivalent.
4. Concentration of *Carthami Flos* extract at which DPPH radical scavenging activity was inhibited by 50% was 6.43 mg/ml as compared to 100% by pyrogallol solution as a reference.
5. The inhibitory effect of the extract on lipid peroxidation was examined using rat liver mitochondria induced by FeSO₄/ascorbic acid. *Carthami Flos* extract at the concentration of 10 mg/ml slightly but significantly decreased TBARS concentration. The extract continued to prevent lipid peroxidation in a dose-dependent manner.
6. The effect of *Carthami Flos* extract on reactive oxygen species(ROS) generation was examined using a cell-free system induced by hydrogen peroxide/FeSO₄. Addition of 1 mg/ml of *Carthami Flos* extract significantly reduced dichlorofluorescein(DCF) fluorescence. *Carthami Flos* extract caused concentration-dependent attenuation of the increase in DCF fluorescence, indicating that the extract significantly prevented ROS generation in vitro.

Conclusion : Antioxidant effects of *Carthami Flos* extract seem to be due, at least in part, to the prevention of free radical-induced oxidation, followed by inhibition of lipid peroxidation.

Key Words: *Carthami Flos*, antioxidant effect, free radical, lipid peroxidation

서 론

모든 생명체는 에너지를 얻는 과정에서 산소의 공급을 필요로 하고 정상적인 대사과정에서 유입

된 산소의 2-5%정도는 정상산소에 비해 반응성이 좋고 수명이 짧은 Superoxide, Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical, Singlet oxygen 등의 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)으로 바뀐다¹⁾. 이들 활성산소종은 세균을 살균하는 생체 방어 작용을 하는 장점도 있지만 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병의 원인이 되는 유해한 작용을 한다. 인체는 이러한 산화물질을 제거하거나 중화시킬 수 있는 방어기능을 가지고 있으며 이들은 크게

· 접수 : 2007년 2월 12일 · 논문심사 : 2007년 2월 12일
 · 채택 : 2007년 3월 2일
 · 교신저자 : 임형호, 서울시 송파구 송파동 20-8
 경원대학교 한의과대학 한방재활의학교실
 (Tel : 02-425-3456, Fax : 02-425-3560
 E-mail : omdlimhh@chollian.net)

항산화효소²⁾(superoxide dismutase;SOD, Catalase; CAT, peroxide;POD)와 항산화물질³⁾(Vit C;ascorbic acid, Vit E, Se, Coenzyme Q₁₀, aspirin, EDTA)로 나뉜다. 이러한 산화 촉진물과 항산화 작용을 하는 산화 억제 물질들의 균형이 깨지면서 유해 활성산소의 양이 증가하게 되면 지질산화등을 통한 세포와 조직손상, 암, 염증, 동맥경화, 심장병, 치매, 노화 등 각종 성인병과 난치성 질병에 쉽게 노출 될 수 있다는 연구 결과들이 나오면서 양, 한방뿐만 아니라 많은 분야에서 free radical의 발생을 억제하고 이들에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호하고 노화를 예방할 수 있는 항산화제 개발에 대한 관심이 증가하고 있다⁴⁻⁷⁾. superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD가 발견된 이후 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA)등의 합성항산화제에 대한 연구가 있었으나 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 문제로 인해 사용에 제한이 있어, 안전한 저분자 천연 항산화제 개발에 대한 연구⁸⁻¹⁰⁾가 활발하게 이루어지고 있다.

한의학계에서는 兔絲子, 補骨脂 및 蛇床子, 淫羊藿¹¹⁾, 六味地黃湯¹²⁾등 補腎하는 本草와 處方위주로 연구가 있어왔고 최근에는 血付逐瘀湯¹³⁾ 등 祛瘀血하는 처방의 항산화효과에 대한 보고가 있었다.

이에 저자는 活血祛瘀제 중 색소를 다량 함유하고 있는 紅花¹⁴⁾의 항산화 작용에 대한 검토가 홍화의 임상적 응용범위를 넓히는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료되어 본 연구를 계획하였다. 紅花씨의 항산화효과에 대한 연구로는 serotonin 화합물, 플라보노이드 성분인 acacatin 등이 함유되어 있다는 보고들을 바탕으로 한 여러보고가 있으며¹⁵⁻¹⁹⁾, 紅花에 대하여서는 紅花의 조혈작용²⁰⁾, 진통 및 항혈전 효능²¹⁾에 대한 보고가 있었다.

본 연구에서는 紅花 에탄올 추출물의 항산화효과를 알아보기 위해 총산화효과(Total antioxidant capacity;TAC, Total antioxidant response;TAR), 총 페놀함량(Total phenolic content), DPPH(1,1-

Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성효과, 지질과 산화 억제효과, 활성산소종 생성 억제효과등을 살펴 보았으며 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

연구 방법

1. 재료

1) 紅花 추출물의 조제

紅花(Carthami Flos)는 정선된 제품을 경원대학교 부속한방병원에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 분쇄한 시료 150 g을 80% ethanol (HPLC-grade) 700 ml로 2번 추출한 뒤 증류시켰다. 최종적으로 동결 건조기에서 회수된 45.0 g의 ethanol 추출물을 얻었으며, 회수율은 30.0%로 나타났다. 확보된 紅花 추출물은 50 mg/ml의 농도로 dH₂O에 녹여 4℃에서 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 시약

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

3) 실험동물

(주)대한바이오링크로부터 구입한 6주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 실험동물로 사용하였다. 사육실의 온도는 20-25℃를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 조절되었다. 사료와 물은 무제한 공급하였고, 1주일의 적응기간을 거친 다음 간을 절제한 후 Hovius 등²²⁾의 방법에 따라 미토콘드리아를 분리하였다.

2. 방법

1) Total antioxidant capacity(TAC) 측정

Total antioxidant status(총항산화능)는 Re 등²³⁾의 방법을 수정한 Erel²⁴⁾의 방법을 따랐다. 총항산

화능 측정에 광범위하게 사용되는 전형적인 표준 시약인 Trolox을 이용하여, Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로서 TAC 활성을 측정하였으며, TAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다. 산성 pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)는 H₂O₂에 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.

2) Total antioxidant response(TAR) 측정

Free radical 반응에 대한 총 항산화능은 ferric reducing/antioxidant power assay(FRAP) 방법²⁵⁾을 수정한 Erel²⁶⁾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 3mM의 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 Orthofer²⁷⁾의 방법에 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 측정

에 가장 많이 사용되는 전형적인 표준시약으로 총 phenolic 함량은 mM gallic acid equivalent로 표기하였다.

4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거 활성 측정

DPPH free radical 소거활성은 Malterud²⁸⁾등의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 ug/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 uM FeSO₄와 100 uM ascorbic acid와 함께 추출물 농도별로 37°C에서 60분간 배양하였다.

미토콘드리아 배양액의 지질과산화는 Stacey와 Klaassen²⁹⁾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 uM의 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

6) Reactive oxygen species(ROS) 측정

Sodium hydroxide(0.008 N)처리에 의해 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA)는 DCFH로 탈에스테르화(de-esterification)되며, 생성된 DCFH는 ROS에 의해 dichlorofluorescein(DCF)으로 산화하게 된다. Cell-free system에서 1 uM H₂O₂와 10 uM FeSO₄에 의해 ROS를 생성하였다. DCF 형성에 따른 형광도 증가는 LeBel 등³⁰⁾의 방법에 따라 excitation 파장 488 nm와 emission 파장 525 nm에서 2분 간격으로 10분간 측정하였다.

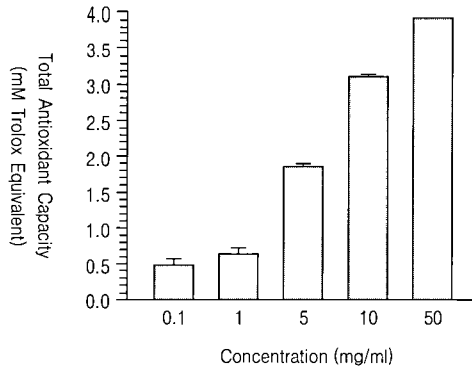


Fig. 1. Total antioxidant capacity of various concentrations of *Carthami Flos* extract. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

형광도 감소는 추출물 내 항산화물질에 의한 ROS 생성 억제를 나타낸다.

7) 단백질 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시약으로 사용하여 Lowry 등³¹⁾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 $p < 0.05$ 에서 유의성을 조사하였다.

결 과

1. Total antioxidant capacity(TAC)

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

0.1 mg/ml 농도의 紅花 추출물의 TAC는 0.47 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 1, 5, 10

및 50 mg/ml 농도에서는 각각 0.63, 1.84, 3.11 및 3.92 mM Trolox equivalent를 나타내었다.

따라서 紅花 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

2. Total antioxidant response (TAR)

Trolox 농도와 444 nm에서의 흡광도 간의 회귀 방정식은 $Y=1.076-0.174X$ (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 紅花 추출물의 TAR은 1.0 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAR은 감소하여 1 및 10 mg/ml 농도에서는 0.77 및 0.33 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 紅花 추출물의 농도가 증가함에 따라 444 nm에서의 흡광도는 오히려 증가하였고, 따라서 TAR이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. Total phenolic content

Gallic acid 농도와 760nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식은 $Y=0.002+0.719X$ (Y는 760 nm에서의 흡광도이며, X는 gallic acid 농도)이었다. Gallic

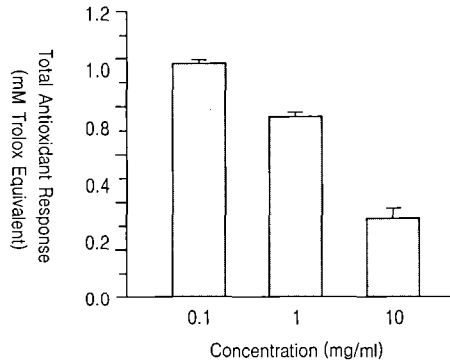


Fig. 2. Total antioxidant response of various concentrations of *Carthami Flos* extract. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

acid의 농도가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.998$) 760 nm에서의 흡광도도 증가하였다.

0.1 mg/ml 농도의 紅花 추출물에서 총 phenolic 함량은 0.12 mM gallic acid equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총 phenolic 함량도 비례적으로 증가하여 1, 2.5 및 5, 10 mg/ml 농도에서는 각각 0.62, 1.13 및 2.01, 3.14 mM gallic acid equivalent를 나타내었다(Fig. 3).

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

DPPH radical은 짝을 이루지 못하는 전자쌍 때

문에 진한 자색을 띠게 되며, 515nm에서 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 15.6%이었고, 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여, 10 및 25 mg/ml의 농도에서 radical 소거활성은 각각 72.7 및 84.7%로 관찰되었다. 추출물 농도와 free radical 소거활성 간의 회귀분석 결과, 50%의 radical 소거활성에 필요한 紅花 추출물의 농도는 6.43 mg/ml으로 나타났다(Fig. 4).

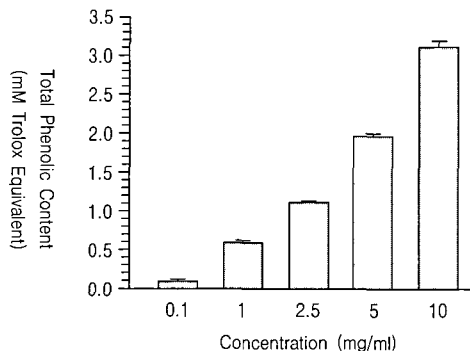


Fig. 3. Total phenolic content of various concentrations of *Carthami Flos* extract. Data results were expressed as in terms of mM gallic acid equivalent. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

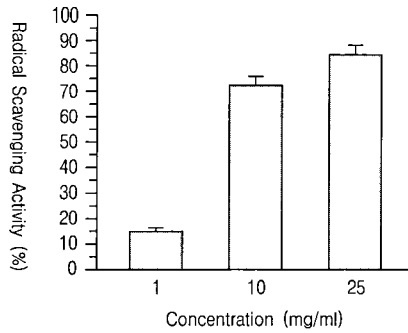


Fig. 4. DPPH free radical scavenging activities of various concentrations of *Carthami Flos* extract. Data results were expressed as % radical scavenging activity relative to 100% radical scavenging activity of pyrogallol solution as a reference. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

5. 지질과산화 억제효과

FeSO₄/ascorbic acid로 유발한 지질과산화는 TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였으며, TBARS가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.987$) 형광도가 증가하였다. 추출물을 첨가하지 않았을 경우, 즉 0 mg/ml 농도에서 10 uM FeSO₄와 100 uM ascorbic acid에 의해 유도된 지질과산화는 TBARS 농도를 11.26 uM로 증가시켰다.

1 mg/ml 농도의 紅花 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 감소시키지 못하였으나 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가에서 TBARS 농도는

10.78 uM로 무첨가에 비해 지질과산화를 4% 정도 유의하게($p<0.05$) 억제하였다. 추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여 20 및 30 mg/ml 농도의 추출물 첨가에서 TBARS 농도는 각각 5.51 및 0.29로 지질과산화를 51, 97% 억제하였으나 50 mg/ml 농도 첨가에서는 97.7% 억제로 30 mg/ml에 비해 유의한 억제는 아니었다(Fig. 5).

6. ROS 생성 억제효과

FeSO₄/H₂O₂에 의해 생성된 ROS에 의해 DCFH는 DCF로 산화되며 형광도가 증가하게 된다. 따

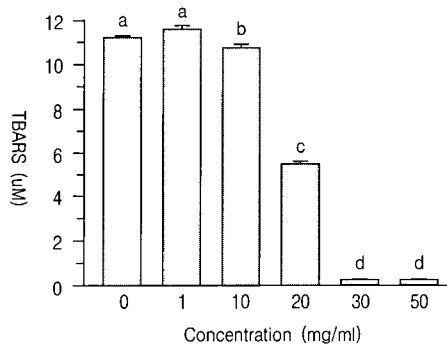


Fig. 5. The effect of *Carthami Flos* extract on lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Rat liver mitochondria were incubated with FeSO₄/ascorbic acid in the absence or presence of various concentrations of *Carthami Flos* extract. Lipid peroxidation was determined by measuring the release of TBARS. Each bar represents the mean±SEM of duplicate determinations.

a, b, c, d: significant differences were analyzed by ANOVA

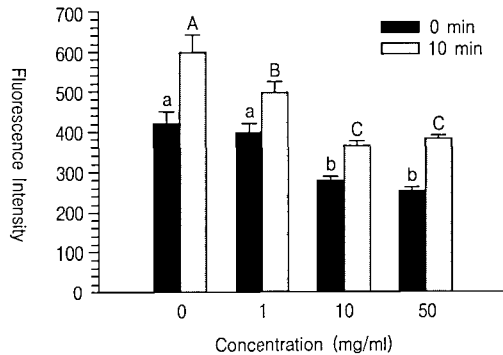


Fig. 6. The effect of *Carthami Flos* extracts on ROS generation. DCFH oxidation to DCF by FeSO₄/H₂O₂-induced ROS generation in the absence or presence of various concentrations of *Carthami Flos* extract was measured for 10 min. Each bar represents the mean±SEM of triplicate determinations. a, b, A, B, C: significant differences were analyzed by ANOVA

라서 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 0분에서 419, 10분 후에는 597.3이었다.

1 mg/ml 농도의 紅花 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도는 0 및 10분에 각각 398.7 및 495.3으로 무첨가에 비해 DCF 형광도가 10분에서 유의적(p < 0.05)으로 17% 정도 감소되었다. 추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하여 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 278.8 및 364.4로 감소되어 33 및 39%의 ROS 생성 억제를 나타내었다.

50 mg/ml 농도의 추출물 첨가시에는 0 및 10분에서 각각 252.2 및 381.4로 감소되어 10 mg/ml 농도의 첨가에 비해 유의한 형광도 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

고 찰

최근 노화 및 암, 염증, 동맥경화, 심장병, 치매 등 각종 질병과 free radical과의 관련성이 대두되

며 항산화제(antioxidants)에 대한 연구가 활발하다³²⁾. free radical들은 생체막에 존재하는 불포화 지방산을 산화시켜 막의 유동성을 저해하고, 효소와 receptor의 활성을 손상시키며, 막 단백질에 손상을 입혀 결국 세포의 불활성화를 일으키는 작용을 통하여 노화 및 각종 질병의 발생에 기여하는 것으로 알려져 있다³³⁾.

항산화제는 free radical 및 반응성 산소화합물 생성의 방지, 활성도 경감, 손상된 조직의 복원 혹은 다른 항산화제의 기능을 향상시키는 물질을 총칭하는 의미로 사용되며, 효소계 항산화제와 비효소계 항산화제로 나뉘는데, 효소계 항산화제(SOD, catalase, glutathione system)는 미토콘드리아의 기질이나 각 조직에 존재하여 free radical 및 반응성 산소화합물의 독성을 제거함으로써 신체 항상성을 유지하는 역할을 하며³⁴⁾, 비효소계 항산화제(비타민 E, C, B6, β-carotene, selenium, N-acetylcysteine)는 항산화 효소와는 달리 외부에서 섭취해야 하며, 항산화 효소와 함께 연쇄반응을 일으켜 그 효과를 증대시키는 것으로 알려진다³⁵⁾.

생체 조직들은 free radical과 반응하는 반응성 산소화합물의 독성에 대항하기 위한 방어기전을 가지고 있어, 그 효과를 반감시키거나 직접적으로

제거할 수 있으며, 비효소계 항산화제의 섭취가 그 농도를 낮추거나 반응을 지연시킬 수 있는 것으로 보고된다³⁶⁾. 최근 국내에서도 항산화제에 개발에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데, 천연 항산화물질 탐색을 통한 항산화 건강음료의 개발^{17,37)}, 운동으로 인한 산화 스트레스와 항산화 효소의 활성 및 항산화제의 섭취와의 관련성 등에 대한 연구³⁸⁾, 지질대사 및 adipocytokine과의 관련성에 대한 연구^{18,39)} 등이 그것이다.

活血祛瘀의 효능이 있는 紅花는 국화과에 속하는 잇꽃의 개화기 관상화를 말린 것으로, 味辛하고 性溫, 無毒하며, 歸經은 心肝經이며, 活血通經, 化瘀止痛의 효능이 있으며, safflower yellow, carthamin 등의 색소물질을 함유하고있다¹⁴⁾.

본 연구에서는 이미 항산화효과가 밝혀진 紅花^{17,18,19)}와 유사한 성분을 함유하고 있으며, 活血祛瘀 및 止痛의 목적으로 임상에서 사용되는 紅花의 항산화 효과를 알아보기 위해 시행되었다.

항산화능 측정법 기본적으로 지질과산화 연구와 관련이 있는 것으로 지질의 산화분해에서 항산화제를 함유한 시료의 효과를 측정하는 직접적인 방법과, 실질적인 산화분해나 금속전이 효과와는 관련이 없는 free radical들을 소거하는 능력을 측정하는 간접적인 방법이 있으며⁴⁰⁾, 본 연구에서는 간접적인 방법 중에서 가장 많이 사용되고 있는 TAC(Total antioxidant capacity), TAR(Total antioxidant response), DPPH radical 소거작용에 대한 실험 및 직접적인 방법인 TBARS 분석을 통해 紅花의 지질과산화억제효과를 살펴보았으며, 그 외 천연물 항산화물질인 페놀성 화합물(Total phenolic content)의 함량을 측정하였다.

총산화능을 살펴본 TAC, TAR 측정결과는 다음과 같다.

0.1 및 1 mg/ml 농도의 紅花 추출물의 TAC는 각각 0.47 및 0.63 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 1, 5, 10 및 50 mg/ml 농도에서는 각각

0.63, 1.84, 3.11 및 3.92 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 紅花 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

0.1 및 1 mg/ml 농도의 紅花 추출물의 TAR은 각각 1.0 및 0.77 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAR은 감소하여 10 mg/ml 농도에서는 0.33 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 紅花 추출물의 농도가 증가함에 따라 444 nm에서의 흡광도는 오히려 증가하였고, 따라서 TAR이 감소한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 아마도 紅花 추출물 내에 포함되어 있는 항산화물질과 무관한 색소물질이 444 nm에서의 흡광도 측정에 간섭하여 TAR을 이용한 총 항산화능 측정을 방해한 것으로 사료된다(Fig. 2).

총 phenolic 함량은 0.1 mg/ml 농도의 紅花 추출물에서 0.12 mM gallic acid equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총 phenolic 함량도 비례적으로 증가하여 5 및 10 mg/ml 농도에서는 각각 2.01 및 3.14 mM gallic acid equivalent를 나타내었다(Fig. 3).

DPPH 소거활성능을 살펴본 결과 추출물 농도 1 mg/ml의 radical 소거활성은 15.6%이었고, 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여, 10 및 25 mg/ml의 농도에서 radical 소거활성은 각각 72.7 및 84.7%로 관찰되었다. 추출물 농도와 free radical 소거활성 간의 회귀분석 결과, 50%의 radical 소거활성에 필요한 紅花 추출물의 농도는 6.43 mg/ml로 나타났다(Fig. 4).

지질과산화 억제효과 측정에서 1 mg/ml 농도의 紅花 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 감소시키지 못하였으나 10 mg/ml 농도의 紅花 추출물은 TBARS 농도는 10.78 uM로 무첨가에 비해 지질과산화를 4% 정도 유의하게(p<0.05) 억제하였다. 추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여 20, 30 및 50 mg/ml 농도의 紅花 추출물의 TBARS 농도는 5.51, 0.29

및 0.23 uM로 나타나 지질과산화물 51, 97 및 97.7% 정도 억제하였다(Fig. 5).

ROS 생성 억제효과를 살펴본 결과, 1 mg/ml 농도의 紅花 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도는 0 및 10분에 각각 398.7 및 495.3으로 무첨가에 비해 DCF 형광도가 10분에서 유의적(p<0.05)으로 17% 정도 감소되었다. 추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하여 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 278.8 및 364.4로 감소되어 33 및 39%의 ROS 생성 억제를 나타내었다. 50 mg/ml 농도의 추출물 첨가 시에는 0분 및 10분에서 각각 252.1 및 381.4로 10 mg/ml 농도의 첨가에 비해 더 이상 유의한 형광도 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

이상의 실험결과로 紅花는 유의한 항산화작용이 있는 것으로 볼 수 있으나 추출 용매의 종류나 추출조건별 분석을 바탕으로, in vivo 실험을 통한 생리 활성적 유효성에 대한 검증이 필요하다. 또한 活血祛瘀를 목적으로 紅花를 사용할 때 본 연구에서의 항산화효과에 대한 결과는 임상적 활용도를 넓히는데 기여할 것으로 생각되며, 향후 추가적인 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

결 론

紅花의 항산화작용을 규명하기 위해 수행된 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TAC 측정결과 紅花 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타냈다.
2. TAR 측정에서 紅花 추출물은 농도가 증가할수록 TAR이 감소된 결과를 나타냈다.
3. 총 phenolic 함량은 紅花 추출물의 농도가 증가할수록 비례하여 많아지는 결과를 나타냈다.
4. DPPH 소거활성도도 농도의존적으로 증가하였으며, 50%의 radical 소거활성능을 나타낸 紅花 추출물의 농도는 6.43 mg/ml이었다.

5. 지질과산화 억제효과는 10 mg/ml의 농도에서 유의하게 나타났으며, 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다.

6. ROS 생성 억제효과는 10 mg/ml의 농도 첨가 후 바로(0분) 유의하게 감소되었으며, 1 mg/ml의 농도 첨가에서는 10분 후 유의한 감소가 나타났다.

이상의 실험결과 紅花는 유의한 항산화작용이 있는 것으로 볼 수 있으며, 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sigh, A. In : CRC Handbook : Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol. I. (Miquel, J., Weber, H. and Quintanilha, A., Eds), 1989: 17-28, CRC Press, Boca Raton, FL.
2. Marletta, M. A., Tayeh, M. A. and Hevel, J. H. (1990). *Bidfactors* 2, 219-25.
3. Kono Y, Fredovich I, 'Superoxide radical inhibits catalase', *J Biol Chem.* 1982;257(10):5751-54.
4. 문진영, 최미정, 남경수, 임종국. 시호가 free radical에 의한 지질과산화 의 생성에 미치는 효과. *동국논집*, 1996;15:361-75.
5. 김창윤, 이정길, 강복수, 사공준, 권평보, 정종학, 이경수. 혈액과 발톱의 셀레니움 농도와 암과의 관련성. *영남의대학술지*. 1992;9(1):29-43.
6. 한명규. 지방질의 산화반응기구와 항산화제의 역할. *논문집*. 1998;15(1):869-84.
7. Dean RT, Giese, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1993;18:437-41.
8. McCord, J. M. and I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 1969;244: 6049-55.
9. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1975;52:

- 59-63.
10. Hahm TS, King DL, Min DB. Food antioxidants. *Food and Biotechnology*. 1993;2:1-8.
 11. 오명숙, 김도림, 강지웅, 김산웅, 유태원, 박정열, 김동민, 박완수, 박성규, 장문석, 박수연. DPPH 방법을 통한 토사자, 보골지, 사상자, 음양각의 항산화 활성에 대한 연구. *방제학회지*. 2005;13(2):101-10.
 12. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보충익기당과 육미지황탕이 노화 촉진 쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. *본초학회지*. 2003;18(4):175-91.
 13. 박선동, 주완석, 고원도. 血付逐瘀湯과 그 構成藥物群이 Alloxan 糖尿 白鼠의 血清組成 및 抗酸化效果에 미치는 影響. *대한본초학회지*. 2002;17(1):93-111.
 14. 전국한약과대학교수공편. *본초학*. 영림사. 1995: 424-5.
 15. Roh J.S., Sun W.S., Oh S.U., Lee J.I., Oh W.T. and Kim J.H. In vitro antioxidant activity of safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Sci. Biotechnol*. 1999;8:88-92.
 16. Kim H.J., Jun B.S., Kim S.K., Cha J.Y., and Cho Y.S. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower(*Carthamus tinctorius* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2000;29:1127-32.
 17. 김준한, 박준홍, 박소득, 최성용, 성종환, 문광덕. 紅花씨 추출분말 함유 건강음료의 제조와 항산화성. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL*. 2002;34(4):617-24.
 18. 조성희, 박영이, 윤지영, 최상원, 하태열. 紅花씨 폴리페놀이 HMG-CoA reductase, LDL 산화 및 Apo A1 분비에 미치는 영향. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL*. 2006;38(2):279-83.
 19. 백남인, 방면호, 송정춘, 이상양, 박남규. 紅花씨의 항산화활성 물질, N-feruloylserotonin. *한국농약학회지*. 1999;42(4):366-8.
 20. 서영배, 이용구, 이영철, 문평기. 紅花의 조혈작용에 대한 실험적 연구. *대한본초학회지*. 2002;17(1):13-28.
 21. 김동환, 이경섭, 송병기. 도인 및 紅花 약침의 진통·항혈전 효능에 관한 연구. *대한한방부인과학회지*. 2000;13(2):60-73.
 22. Hovius, R., H. Lambrechts, K. Nocolay and B. de Kruijff. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 1990;1021:217-26.
 23. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*. 1999;26:1231-37.
 24. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem*. 2004a;37:277-85.
 25. Benzie, I.F. and J.J. Strain. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant capacity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299:15-27.
 26. Erel, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem*. 2004b;37:112-19.
 27. Singleton, V.L. and R. Orthofer. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152-78.
 28. Malterud, K.E., T.L. Farbro, A.E. Huse and R.B. Sund. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 1993;47:77-85.

29. Stacey, N.H. and C.D. Klaassen. Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1981;58:8-18.
30. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos and S.C. Bondy. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5:227-31.
31. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.
32. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90:7915-22.
33. Dean RT, Giese, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1993;18:437-41.
34. Sen CK, O Hanninen. Physiological antioxidants. In exercise and oxygen toxicity, edited by Sen CK, L Paker, O Hanninen. Elsevier Science. 1994:89-126.
35. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol.* 1995;79(3):675-86.
36. Halliwell B, JMC Gutteridge. *Free radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press. 1989.
37. 김종덕, 김정환. 노화지연을 위한 항산화 차의 개발. *여수대학교 논문집.* 1999;14(2):401-9.
38. 진영수, 이왕록, 박준영. 최대운동시 항산화제 섭취가 골격근 항산화 효소의 활성에 미치는 영향. *대한스포츠학회지.* 2001;29(1):148-59.
39. 전태원, 신윤아, 김경배, 서동일, 김영경, 소성. 녹차섭취와 운동의 복합처치가 비만여성의 Adipocytokines 및 항산화 시스템에 미치는 영향. *운동과학.* 2006;15(2):137-46.
40. 박영기, 이위영, 안진권. 산림자원을 이용한 항산화 소재 개발 연구동향. *Trend in Agriculture & Life Science, TALS* 2006;4(1):1-13.