

감마선 조사에 의한 소목추출물의 색상변화 및 항산화 활성 평가

권형준¹ · 정우희¹ · 박혜란¹ · 신동화² · 조성기^{1†}

¹한국원자력연구원 방사선과학연구소 방사선생명공학연구센터
²전북대학교 식품공학과

Effects of Gamma Irradiation on Color Changes and Antioxidative Activities of *Caesalpinia sappan* L.

Hyung Jun Kwon¹, Uhee Jung¹, Hae Ran Park¹, Dong Hwa Shin² and Sung Kee Jo^{1†}

¹Radiation Research Center for Biotechnology, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup Campus of Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract

Caesalpinia sappan L. is an indeciduous tree distributed in China, India, Myanmar and Vietnam. Its heartwood has long been used in oriental folk medicines to treat diseases. In this study, antioxidative activities of *Caesalpinia sappan* L. and the effect of gamma irradiation on its chemical and biological properties were investigated. The ethyl acetate fraction (EtOAc fr.) of *Caesalpinia sappan* L. was irradiated with 100 kGy of gamma ray. The dark red color of EtOAc fr. was significantly ($p < 0.05$) removed by irradiation (Hunter L and b values increased and a value decreased). The total phenolic content of EtOAc fr. was 865 mg/g and it was increased to 1195 mg/g by gamma irradiation. DPPH radical and superoxide anion radical scavenging activities and lipid peroxidation inhibitory activity of EtOAc fr. were very high and its activities were also increased by gamma irradiation. EtOAc fr. also inhibited the irradiation-induced DNA damage of lymphocyte as determined by comet assay. In conclusion, EtOAc fr. of *Caesalpinia sappan* L. extract showed high antioxidative activities *in vitro*. Furthermore, gamma irradiation on EtOAc fr. ameliorated the color and antioxidative properties. Therefore, it can be suggested that *Caesalpinia sappan* L. may be a good material for antioxidant function and gamma irradiation may be applied for the improvement of chemical and biological properties of *Caesalpinia sappan* L.

Key words: *Caesalpinia sappan* L., color, gamma irradiation, antioxidative activities

서 론

모든 생물은 생명유지를 위해 에너지를 필요로 한다. 특히 호기성 생물의 경우 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하게 되는데 흡입된 대부분의 산소는 체내 대사과정에서 안전한 물(H₂O)로 환원되지만 일부는 반응성이 매우 큰 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(Reactive nitrogen species, RNS)으로 전환된다. 이러한 유해산소($\cdot\text{O}_2^-$, OH \cdot , H₂O₂, ¹O₂, ROO \cdot)의 과잉생산으로 인한 산화적 스트레스는 세포나 소포 소기관의 막 지질 과산화에 의한 microsome 및 mitochondria 등의 소기관 손상, 효소 단백질의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 DNA손상을 유도하여 노화와 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다(1-5). 따라서 활성산소들을 소거할 수 있는 물질

(free radical scavenger)이나 과산화 반응 억제물질과 같은 항산화 물질은 활성산소종에 의해 유발되는 각종 질환 치료제 및 노화 억제제로서 뿐만 아니라 보존제로서도 활용이 크게 증가하고 있다. 현재 다양한 합성항산화제들이 개발되어 왔으나, 경제성 및 안전성의 문제와 체내 흡수물질의 일부를 독성물 혹은 발암성 물질로 변화시킨다는 연구결과에 따라 BHA와 BHT 등만이 사용되고 있다. 이러한 이유로 식물계에 널리 분포하는 페놀성 화합물과 그 배당체들을 가지고 많은 연구자들은 tocopherol과 같은 천연물로부터 유래한 기능성 물질의 탐색에 대한 연구를 꾸준히 하고 있다(6-9).

한편 방사선 조사는 식품 및 소재의 부패방지, 제품의 안전성 및 보존성 향상의 효과가 보고되어 식품뿐만 아니라 제약, 의료 및 화장품과 같은 공중보건산물에 널리 사용되며 또한 감마선 조사기술은 잔류독성이 전혀 없고 식품원래의

[†]Corresponding author. E-mail: skjo@kaeri.re.kr
Phone: 82-63-570-3220, Fax: 82-63-570-3229

품질을 유지하면서 여러 가지 긍정적인 효과가 보고된 바 있고, 가공 공정 및 기능성 향상까지 이용범위가 확대되고 있는 추세로 앞으로도 식품산업의 여러 분야에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 최근에는 천연 추출물에 감마선 조사를 응용하여 첨가제 등으로 사용하기에 바람직하게 선택을 받고 투명하게 변화시키면서 본래 가지고 있던 생리활성은 유지할 수 있다는 연구결과가 보고되었으며, 이의 공중 보건 제품 소재로서 활용도 진행 중에 있다(10-14).

소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 Leguminosae에 속한 낙엽 관목으로서 인도의 동부, 중국의 남부와 동남아시아에 재배되며, 최근 연구에 의하면 소목의 성분 중 brazilein과 brazilin의 중추신경억제작용, 항보체효과, 항균작용, 혈관완화작용과 항경련작용 등의 효과가 있음이 보고되었으며, 한 방에서는 어혈로 인한 타박손상, 월경통, 월경폐색, 현훈, 출산 후 각종 증상에 사용해 왔다(15-19). 따라서 본 연구에서는 소목(*Caesalpinia sappan* L.) 추출물을 기능성 소재로서 활용하기 위해 감마선 조사 후 색상 및 항산화활성 변화를 보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 심재(心材)를 음건한 것으로 서울 한약거래상에서 구입하여 이물질을 선별한 후 시료로 사용하였다.

소목 추출 및 분획

약탕기에 각각 200 g씩 나누어 넣고 이에 3차 증류수 2000 mL를 가하여 3시간 끓여 추출하였다. 이를 원심분리기(Union 5KR Hanil, Korea)를 이용하여 상정액을 분리하고 Whatman No. 4와 No. 2 여과지로 중복 여과한 여액을 rotary evaporator(EYELA N-1000, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 부피를 줄인 후 freeze dryer(Ilshin FD5505, Korea)를 이용하여 완전히 건조하였다. 열수추출 건조물을 각각 50°C의 증류수 500 mL에 녹여 chloroform(CHCl₃), ethyl-acetate(EtOAc), *n*-butanol(*n*-BuOH)로 순차적으로 분획하고, magnesium sulfate(MgSO₄) 또는 sodium sulfate(Na₂SO₄)를 이용하여 H₂O를 제거하였다. 그리고 위와 동일한 방법에 따라, 용매를 감압 농축하여 각 분획별 건조물을 얻었다.

시료의 감마선 조사 및 파우더 제조

소목 추출물(50 mg/mL)의 감마선 조사는 방사선과학연구소 내 선원 40만 Ci의 Cobalt-60 감마선 조사시설(IR-221 MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, Canada)을 이용하여 실온(12±1°C)에서 시간당 10 kGy의 선량율로 100 kGy의 흡수선량으로 수행하였다. 흡수선량의 확인은

alanine dosimeter(지름 5 mm, Bruker, Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. 선량계 보정은 영국의 National Physical Laboratory(NPL) 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2%이내였다. 비조사구는 동일한 온도효과를 얻기 위하여 감마선 조사 시설 외부에 둔 후 조사 직후 처리구와 함께 4°C 냉장고에 저장하였다. 감마선 조사 및 비조사된 소목 추출액은 rotary evaporator(EYELA N-1000, Japan)를 이용하여 용매를 제거한 후 -60°C 냉동고에서 동결하고, freeze dryer(Ilshin FD5505, Korea)를 이용하여 동결건조한 후 분쇄하였다. 제조된 소목 파우더는 -20°C에 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

소목 추출물의 색도 측정

소목 추출물의 감마선 조사에 따른 시료의 색변화를 측정하기 위해 추출물을 quartz cell(CM A-98, 10 mm in width)에 옮기고 Color Difference Meter(Spectrophotometer CM-3500D, Minolta Co, Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 Illuminant D65 10° 광원에서 측정하였다. 기기는 측정 전 표준흑판과 표준백판으로 표준화한 후 사용하였으며, Hunter color L(명도, lightness), a(적색도, redness) 및 b(황색도, yellowness)를 측정하였다. 측정된 값은 Spectra Magic Software(version 2.11, Minolta Cyber Chrom Inc., Osaka, Japan)를 이용하여 기록하였다.

소목 추출물의 총 폴리페놀 함량

소목 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법(20)을 사용하여 분석하였다. 소목추출물을 메탄올로 녹여 최종 농도를 1,000 ppm으로 하였고 각각의 시료 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.2 mL 첨가하고 23°C에서 1분간 유지시켰다. 그 후 5% Na₂CO₃ 3 mL를 가하여 23°C에서 1시간 방치 후 분광광도계(UVIKON XS, SECOMAN, France)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 검량곡선을 작성한 후 계산에 활용하였다.

DPPH 라디칼 소거 시험

DPPH 라디칼 소거활성 시험은 각 시료 10 µL에 0.15 mM DPPH 용액(99.9% methanol에 용해) 990 µL씩을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하여 30분 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron Donating Abilities, EDA)은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소 차이를 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Superoxide anion radical 소거 활성 측정

시료 7.5 μL, 1 mM EDTA가 포함된 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 75 μL, 0.5 mU xanthine oxidase, WST-8(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) solution 7.5 μL를 96-well plate에 첨가하여 1분간 실온에서 안정화시켰다. 2.5 mM xanthine 60 μL를 첨가한 후 30분에 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm(ref. 650 nm) 파장에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion radical 소거활성은 시료첨가구와 대조구의 흡광도 차이를 대조구의 흡광도를 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Superoxide scavenging activity (\%)} = \frac{(Ac - As)}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Ab: 시료와 xanthine oxidase를 첨가하지 않은 blank의 흡광도

Rat liver microsomes의 분리

흰쥐의 간으로부터 microsome 분리는 Hogeboom의 방법(21)에 따라 차등원심분리법으로 하였으며, 모든 조작은 0~4°C의 저온에서 행하였다. 흰쥐로부터 적출한 간을 0.9% NaCl 용액에 넣어 2~3회 세척하고 여지로 NaCl 용액을 제거한 후 세질하여 간 1 g 당 4 mL의 완충용액(0.25 M sucrose)을 가한 다음 조직 분쇄기를 사용하여 4°C에서 균질화하였다. 균일하게 마쇄한 간을 9,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 이것을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 침전물을 취함으로써 기타 세포내 가용성 물질이 제거된 microsome 분획을 얻었다. 이것을 0.15 M KCl buffer로 분산시켜 BCA Protein Assay Reagent kit로 단백질 정량을 한 후 10 mg protein/mL이 되도록 완충용액으로 희석하여 -70°C에 보관하였다.

지질과산화 억제 활성 측정 방법

Potassium phosphate 완충용액(50 mM, pH 7.4) 740 μL, premixture(0.8 mM FeSO₄, 2 mM ascorbic acid) 200 μL와 microsome(10 mg protein/mL) 50 μL를 넣고 메탄올에 녹인 시료 10 μL를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 20% TCA 용액 250 μL를 가하여 반응을 정지시킨 후 1% TBA 용액 250 μL를 가하고 100°C에서 15분간 끓인 후 5,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상정액의 흡광도를 532 nm 측정하였다. 각 시료의 지질과산화 억제활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 MDA 생성 감소 정도를 다음 식과 같이 산출하였다.

$$\text{Lipid peroxidation inhibition (\%)} = \frac{(Ac - As)}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Ab: 시료와 Fe²⁺/ascorbate를 첨가하지 않은 blank의 흡광도

방사선에 의해 유발된 DNA 손상 측정

분리된 림프구의 방사선 조사는 방사선과학연구소에 소재하는 irradiator(Gammacell 40 Exactor, Nordion International Inc., Ontario, Canada)를 이용하여 ¹³⁷Cs-γ선(선량율: 1.14 Gy/min)을 2 Gy의 선량으로 1회 조사하였다. 림프구는 방사선 조사 후 DNA 수복을 차단하기 위하여 전기영동을 시행하기 전까지 4°C를 유지하였다. 림프구 DNA 손상 정도는 Singh 등(22)의 방법에 준하여 시행하였다.

0.6% normal melting agarose(GIBCO BRL; Grand Island Co., NY., USA)가 처리된 Frosted slide에 방사선 조사 림프구를 0.5% low melting agarose(GIBCO BRL) 75 μL와 혼합하여 이를 점적 후 coverglass로 덮고 4°C에서 10분간 굳힌 다음 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10)에 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 세포를 전기영동완충액(300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>12.3) 하에서 20분간 정치시켜 DNA의 양가닥이 풀리게 한 다음 25 V, 300 mA에서 20분간 어두운 조명상태에서 전기영동을 시행하였다. 고 알칼리 상태를 중화시키기 위해 tris buffer(0.4 M Tris, pH 7.4)로 3회 세척하여 슬라이드를 중화시키고 DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 ethanol에 1시간 침적하였다. 슬라이드를 건조시킨 후 ethidium bromide(20 μg/mL)로 염색한 후 세포의 DNA 손상정도를 CCD 카메라가 부착된 형광현미경을 사용하여 측정하였고, 이미지분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통해 분석하였다. DNA 손상정도는 절단된 DNA 가닥이 이동하여 형성된 tail 길이인 tail length(TL; μm) 또는 tail 길이와 tail 내 DNA 파편(fragment)의 양을 수치화시킨 다음과 같은 식으로 정의되는 tail moment(TM)로 나타내었으며, TL 및 TM 값이 증가할수록 DNA가 손상을 많이 받은 것을 의미한다.

$$\text{Tail moment} = (\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \%DNA}/100$$

Tail mean과 head mean은 각 부위의 염색강도의 평균값 Tail%DNA는 전체 염색강도에 대한 tail 부분의 비율

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 mean±SD로 표시하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

용매 순차 분획물에서의 항산화 활성 비교 및 감마선 조사에 의한 활성변화

소목 열수추출물을 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH, H₂O로 분획

Table 1. Comparison of DPPH radical scavenging activity of solvent fractions from gamma-irradiated *Caesalpinia sappan* L.

kGy	Fraction	IC ₅₀ (μg/mL)
0	CHCl ₃	233.9
	EtOAc	0.71
	<i>n</i> -BuOH	99.8
	H ₂ O	250<
100	CHCl ₃	250<
	EtOAc	0.61
	<i>n</i> -BuOH	52.7
	H ₂ O	250<

한 후, 각 분획물에 예비실험을 통해 결정된 선량인 100 kGy의 감마선을 조사시킨 후, 비조사군과 조사군의 전자공여능을 비교하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 4가지 유기용매 분획물 중 EtOAc 분획물의 전자공여능이 현저히 높았으며, 다른 유기용매 분획물에서는 전자공여활성이 낮게 측정되었다. Shrishailappa 등(23)의 소목에 대한 항산화 활성에서 각 분획물에 대한 활성도는 CHCl₃(>1000 μg/mL), EtOAc (1.71 μg/mL) 순이었으며, 본 실험의 IC₅₀ 값이 더 낮아 다소 차이가 있었지만 경향은 일치하여 본 실험이 적합하게 행하였음을 알 수 있었다. 이후의 실험에서는 유기용매 분획물 중 가장 활성이 높은 EtOAc 분획물을 시료로 사용하였다.

소목 EtOAc 분획물의 총 페놀 함량 및 색차에 대한 감마선 조사의 효과

식물계에 널리 존재하는 페놀성 화합물은 이차 대사산물로 이들의 종류는 구조에 따라 분류하며 다시 세부적으로는 수산기의 위치에 따라 그리고 다른 치환기의 수와 위치에 따라 분류된다. 페놀성 화합물 중 가장 널리 분포하고 다양한 종류의 플라보노이드는 주된 항산화 물질로 알려져 있다. 감마선 조사가 항산화력에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 선정된 EtOAc 분획물의 감마선 조사에 따른 총 페놀 함량 변화를 Table 2에 나타내었다. 소목 EtOAc 분획물의 총 페놀 함량은 비조사군이 865 mg/g인데 반해, 조사군은 1195 mg/g으로 통계적으로 유의하게 증가함을 보였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 방사선에 의해 페놀성 화합물 배당체의 이탈로 인해 페놀 함량도 증가되었다. 이것은 Beaulieu 등(24)이 양송이에 2 kGy의 감마선을 처리한 경우 총 페놀 함량이 증가하였다는 보고와 부합한다. 소목 EtOAc 분획물의 감마선 조사 전후의 색차변화를 측정된 결과, 조사 후 명도(L값)는 46.5에서 93.7로 증가한 것으로 나타나 상당히 밝은색을

나타냄을 확인하였고, 적색도(a값)는 53.1에서 1.6으로 급격히 떨어졌으며 황색도(b값)의 경우에도 76.7에서 131로 조사 후에 증가하였다. 또한 총 색차값(ΔE)에서도 색도의 큰 변화가 있음을 확인할 수 있었다.

소목 EtOAc 분획물의 DPPH 라디칼 소거효과

전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 연쇄반응을 중단시키는 역할을 하여 세포 내 지질과산화 억제나 인체 내 노화억제작용의 척도로 이용되고 있다. 따라서 본 실험에서는 환원성 물질의 분석시약으로 안정한 free radical인 DPPH를 이용하여 소목 추출물의 전자공여능을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과, 시료의 농도가 증가할수록 DPPH에 대한 전자공여능도 증가하는 경향을 보였으며, 비조사 시료군에 비해 감마선 조사 시료군 전자공여능이 낮은 농도(0.4 μg/mL, 0.8 μg/mL)에서는 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 이것은 방사선을 조사한 시료의 페놀화합물의 함량이 증가함과 부합한다. 또한 대조물질로 ascorbic acid와 비교했을 때 전체 농도에서 대조물질보다 더 높은 전자공여능을 확인할 수 있었고 이러한 결과는 Shrishailappa 등(23)이 보고한 결과와 일치하였다. Kim 등(25)의 국내산 생약 추출물의 전자공여능 측정결과와 비교하면, 300 ppm의 농도에서 작약(86.6%), 목단(80.4%) 및 오미자(85.7%) 등의 결과를 나타내었는데 소목 추출물의 경우 비조사 추출물 50 ppm(89.5%)에서 더 높은 결과를 나타내어 소목 추출물은 전자공여능이 상당히 높아 천연항산화제의 이용가치가 있는 것으로 생각

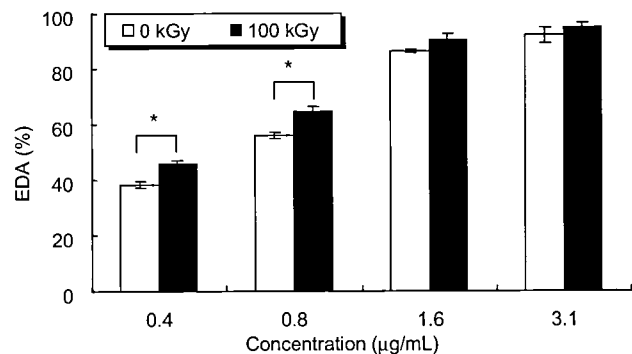


Fig. 1. Electron donating ability (%) of non-irradiated and irradiated EtOAc fr. of a *Caesalpinia sappan* L. at various concentrations.

EDA (electron donating ability) = [(1 - absorbance of sample treatment at 517 nm) / absorbance of control treatment at 517 nm] × 100. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated EtOAc fr.

Table 2. Hunter color value, and total phenol content of ethyl acetate fraction of a *Caesalpinia sappan* L.

Irradiation (kGy)	Hunter color value				Total phenolic content (mg/g sample)
	L	a	b	ΔE ¹⁾	
0	46.5 ± 0.01	53.1 ± 0.01	76.7 ± 0.01		865 ± 1.40 ^b
100	93.7 ± 0.01*	1.6 ± 0.01*	131.0 ± 0.01*	88.47	1195 ± 2.16 ^a

¹⁾ ΔE = Overall color difference [(ΔL)² + (Δa)² + (Δb)²]^{1/2}.

* $p < 0.05$ compared to irradiated EtOAc fr. of a *Caesalpinia sappan* L.

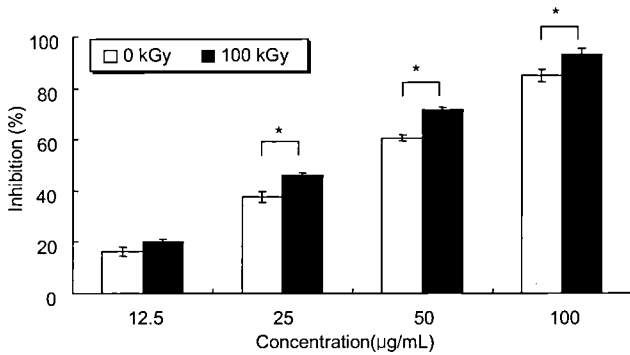


Fig. 2. Superoxide anion radical scavenging activity of non-irradiated and irradiated EtOAc fr. of a *Caesalpinia sappan* L.
 Inhibition (%) = [(1 - absorbance of sample treatment at 450 nm / absorbance of control treatment at 450 nm) × 100].
 *p < 0.05 compared to non-irradiated EtOAc fr.

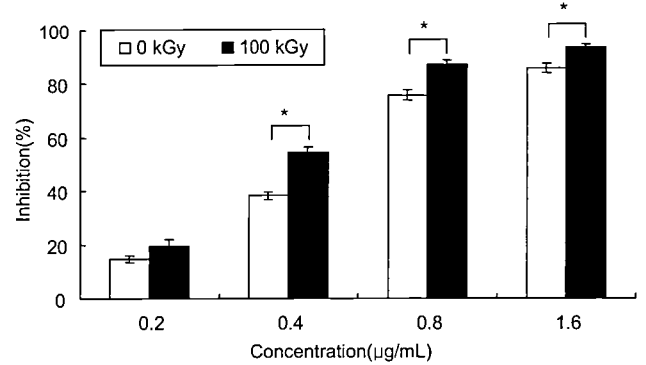


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory activity of non-irradiated and irradiated EtOAc fr. of a *Caesalpinia sappan* L.
 Inhibition (%) = [(1 - absorbance of sample treatment at 532 nm / absorbance of control treatment at 532 nm) × 100].
 *p < 0.05 compared to non-irradiated EtOAc fr.

된다.

Superoxide anion radical 소거활성

생체의 산화적 손상에 주된 요인인 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)에 대한 EtOAc 분획물의 활성을 xanthine/xanthine oxidase 반응계를 이용한 WST-8 방법으로 살펴 보았다(Fig. 2). EtOAc 분획물은 농도 의존적인 superoxide anion radical에 대한 소거활성을 나타내었다. 또한 합성 항산화제인 BHT와 비교 시 농도 및 선량률에 따라 비슷한 활성을 나타내었다. 첨가수준 50 µg/mL 이상의 농도에서는 60% 이상의 소거력을 나타내었다. 또한 감마선 조사시료군의 활성이 비조사 시료군에 비해 유의적으로 높았다(p < 0.05).

지질과산화 억제 효과

생체 내에서 형성되는 과산화 지질은 각종 효소나 lipoprotein을 변성시키고 세포막을 파괴하여 급성 조직 장애를 일으키거나 lipocin으로 축적되어 세포노화를 유도하며 혈소판 응집과 혈관폐색을 유발하는 등 많은 병태반응들을 일으키는 것으로 알려져 있다(26). Fe^{2+} /ascorbate 반응계에서 microsome을 기질로 이용하여 발생하는 MDA의 양에 대한 EtOAc 분획물의 억제효과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 시료는 농도 의존적으로 높은 지질과산화 억제효과를 나타내었으며, 합성 항산화제인 BHT와 비교했을 때 비슷한 정도의 활성을 볼 수 있었다. 또한, 감마선 조사시료군의 첨가량 0.4 µg/mL와 0.8 µg/mL 농도에서 비조사 시료군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(p < 0.05).

단세포전기영동법(Single-Cell Gel Electrophoresis: Comet assay)

EtOAc 분획물을 첨가하여 배양한 림프구를 방사선 조사 후 DNA 외가닥 절단에 미치는 영향을 단세포전기영동분석으로 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 결과, 방사선에 의해 절단된 DNA 가닥은 전기영동 상에서 양극(+)방향으로 이동하여 head와 tail로 구성된 혜성(comet) 모양으로 관찰되

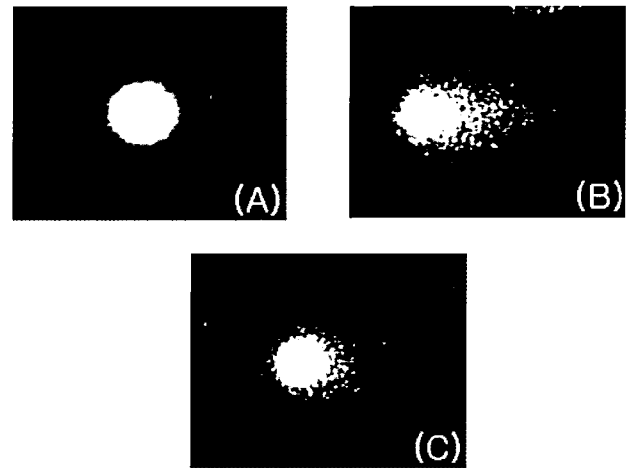


Fig. 4. Fluorescence images of lymphocyte in single cell gel electrophoresis.
 (A) Typical control cells with no induced damage; (B) cells with 2 Gy of gamma-irradiation; (C) Cells and EtOAc fr. treatment (10 µg/mL) with 2 Gy of gamma-irradiation.

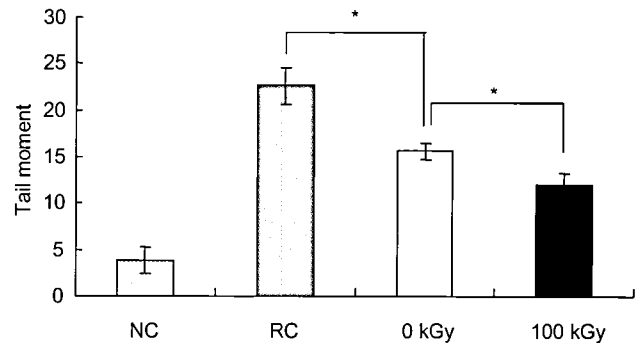


Fig. 5. The inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* L. on DNA damage in the mouse lymphocytes induced by 2 Gy of gamma-irradiation.
 NC: Normal control, RC: Radiation control (2 Gy).
 □ Ethyl acetate fraction of gamma-nonirradiated, ■ Ethyl acetate fraction of gamma-irradiated.
 TM (tail moment) = (tail mean - head mean) × tail %DNA/100.
 *p < 0.05; Significantly different from radiation control group or non-irradiated EtOAc fr.

며 손상을 받지 않은 정상적인 세포는 핵체로 생각되는 원형의 양상을 나타내었다(Fig. 4). 생쥐 림프구에서 방사선에 의한 DNA 외가닥 절단 정도를 측정된 결과 $22.6(\pm 0.38)$ 로 정상대조군의 $3.85(\pm 0.15)$ 에 비해 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$). EtOAc 분획물의 DNA 외가닥 절단 정도는 $15.6(\pm 0.28)$ 로 방사선 대조군에 비해 유의한 억제효과를 보였다($p < 0.05$). 또한 방사선 조사시료군은 비조사 시료군에 비해 더 많이 억제함을 확인하였다($p < 0.05$).

요 약

본 연구에서는 소목 열수추출물을 용매 순차 분획하여 얻은 EtOAc 분획물을 가지고 감마선 조사(100 kGy)한 후 색상 변화와 항산화활성 향상 변화를 평가하였다. 평가시험으로서 소목 용매 순차 분획물과 선정된 EtOAc 분획물에 감마선을 조사(100 kGy)후 DPPH 라디칼 소거활성에서 4가지 유기용매 분획물(chloroform, ethylacetate, *n*-butanol, H₂O) 중 EtOAc 분획물의 전자공여능 IC₅₀ 값이 비조사구와 조사구 각각 0.71 및 0.61 µg/mL로 현저히 높았으며, 비조사구와 조사구 각각 38.5~91.5% 및 45.7~94.8%의 라디칼 소거활성을 보여 조사구의 활성이 높게 나타났다. 또한 감마선 조사(100 kGy)한 EtOAc 분획물의 색상 변화는 명도(L값) 및 황색도(b값)의 경우 조사 후 증가한 반면, 적색도(a값)는 감소하였다. 총 페놀 함량은 비조사구와 조사구 각각 865 및 1195 mg/g으로 조사 후 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). Superoxide anion radical 소거활성 시험에서 EtOAc 분획물의 비조사구와 조사구 각각 16.3~84.7% 및 20.2~92.5%로 조사구의 superoxide anion radical에 대한 소거활성이 높게 나타났고 첨가수준 50 µg/mL 이상의 농도에서는 60% 이상의 소거력을 나타내었다. 지질과산화 억제 시험에서 EtOAc 분획물의 비조사구와 조사구 각각 14.6~85.6% 및 19.5~93.4%로 조사구의 지질과산화에 대한 억제 효과가 높게 나타났고 첨가수준 0.4 µg/mL와 0.8 µg/mL 농도에서는 비조사 시료에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다($p < 0.05$). Comet assay를 이용한 EtOAc 분획물의 DNA 방어효과 시험에서 생쥐 림프구에서 방사선에 의한 DNA 외가닥 절단 정도를 측정된 결과 TM 값은 정상대조군에서 $3.85(\pm 0.15)$ 이었고 방사선 조사군의 경우 $22.6(\pm 0.38)$ 로 증가되었다. 감마선 조사시킨 시료처리군의 경우 10 µg/mL에서 각각 $15.6(\pm 0.28)$, $12.01(\pm 0.31)$ 로서 DNA의 외가닥 절단에 대한 유의한 억제효과를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 소목의 구성성분 중 brazilin, brazilin, gallic acid, quercetin 같은 다양한 페놀성 화합물과 플라보노이드의 배당체들이 방사선 조사에 의해 이탈됨에 따른 페놀 함량이 증가하여 항산화 활성도 향상됨을 확인할 수 있었다. 따라서 소목 추출물에 감마선 조사기술을 이용한다면 항산화 활성

의 향상과 색택 개선 등 산업적으로 활용도가 높은 천연소재를 제조할 수 있으리라 사료된다.

문 헌

- Freeman BA, Grapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Lynch RE, Fridovich I. 1978. Effect of superoxide on erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253: 1838-1845.
- Wayner DDM, Burton GW, Ingold KV, Locke SJ. 1987. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924: 408-419.
- Mavelli I. 1982. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 106: 286-290.
- Ito N, Fukushima S, Haqiwari A, Shibata M, Oqiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. *J Nat Cancer Inst* 70: 343-52.
- Takahashi O, Sakamoto Y, Hirage K. 1985. Lung hemorrhagic toxicity of butylated hydroxyanisole in the rat. *Toxicol Lett* 27: 15-19.
- Ong ASH, Packer L. 1992. Lipid-soluble antioxidants. In *Biochemistry and Clinical Applications*. Birkhäuser, Basel. p 590-605.
- Lrson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969- 978.
- Byun MW. 1994. Application of irradiation techniques to food industry. *Radioisotope News* 9: 32-37.
- Thayer DW. 1990. Food irradiation: benefits and concerns. *J Food Quality* 13: 147-169.
- Lee JW, Yook HS, Cho KH. 2001. The change of allergenic and antigenic properties of egg white albumin (Gal dl) by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 500-504.
- Jo C, Son JH, Byun MW. 2003. Irradiation application for color removal and purification of green tea leaves extracts. *Radiat Phy Chem* 66: 179-184.
- Jo C, Jeong IY, Cim DS, Son JH, An BJ, Choi JS, Byun MW. 2005. Comparison of the biological activity between a radiation processed natural extract and a commercial counterpart for an industrial application. *Food Engineering Progress* 9: 177-181.
- Shin DW. 2003. Screening and using of antioxidative effect and antimicrobial activity from plant. *Food Science Industry* 36: 81-89.
- Nagai M, Nagumo S, Lee SM, Eguchi I, Kawai KI. 1986. Protosappanin A, a novel biphenyl compound from *Caesalpinia sappan* L. *Chem Pharm Bull* 34: 1-6.
- Xie YW, Ming DS, Xu HX, Dong H, But PP. 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci* 67: 1913-1918.
- Baek NI, Jeon SG, Ahn EM, Hahn JT, Bahn JH, Jang JS, Cho SW, Park JK, Choi SY. 2000. Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L. *Arch Pharm Res* 23: 344-348.
- Safitri R, Tarigan P, Freisleben HJ, Rumampuk RJ, Murakami A. 2003. Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L. *Biofactors*

- 19: 71-77.
20. McCord JM. 1974. Free radical and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531.
 21. Hogeboom GH. 1965. General methods for the isolation of liver cell components: fraction of cell components of animal tissues. *Meth Enzymol* 1: 16-19.
 22. Singh NP, Graham MM, Singh V, Khan A. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. *Int J Radiat Biol* 68: 563-569.
 23. Shrishailappa B, Sudheer M, Sujay R, Elango K. 2003. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* Heartwood. *Biol Pharm Bull* 26: 1534-1537.
 24. Beaulieu M, Daprano MB, Lacroix M. 1999. Dose rate effect of gamma irradiation on phenolic compounds, polyphenol oxidase, and browning of mushrooms. *J Agric Food Chem* 47: 2537-2543.
 25. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medical plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
 26. Roubal WT, Tappel AL. 1966. Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch Biochem Biophys* 113: 5-8.

(2007년 5월 7일 접수; 2007년 7월 28일 채택)