

## 양성자 빔을 이용한 식물자원의 항산화 활성에 관한 연구( I )

문병식 · 손귀엽 · 최진국 · 서동원 · 이갑득\*

동국대학교 자연과학대학 화학과

Received May 15, 2007 / Accepted August 13, 2007

**Research of Antioxidant Activity from Plant Resources using Proton Beam( I ).** Byung Sik Moon, Guiyoup Son, Jin Kuk Choi, Dongwon Seo and Kap Duk Lee\*. *Department of chemistry, Dongguk University, Kyungju, Kyungbuk, 780-714, Korea.* – In proton therapy, the Bragg peak is spread out by modulating or degrading the energy of the particles to cover a well-defined target volume at a given depth. Proton transfer plays a key role in a variety of biological, the origin of the elements, tests of the standard model along with applications in medicine, industry and chemical phenomena such as water autoionization, fast proton diffusion, acid-base neutralization. We have studied the radiolysis of various natural resources and have evaluated the antioxidant activity of radiolysis products by proton beam. The most of antioxidant activities of natural resources were decreased with increasing proton fluence. Proton beam induced antioxidant activities both in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazinesulfonic acid) cation radical (ABTS<sup>+</sup>) assay by a dose dependent fashion.

**Key words** – Antioxidant, proton beam irradiation, DPPH, ABTS

### 서 론

산소는 인간을 포함한 호기성 생물의 생존에 필요 불가결한 요소이지만, 부산물로 생성되는 활성산소 종은 반응성이 큰 free radical을 형성하여 인체에 각종 질병 및 노화 등을 유발한다. Free radical의 병리적 또는 생리적 역할은 광범위하게 연구되고 있으며 활성산소종이 생체 내 여러 소기관에서 여러 산화기작을 통해 DNA 손상, 단백질, 지질 등의 손상을 초래하게 된다. 이러한 free radical에 의해 발생하는 활성산소로부터 우리 몸이 손상되는 것을 막기 위하여 항산화제가 필요하다. 항산화제는 크게 천연항산화제와 합성항산화제로 분류할 수 있다. 천연물에 존재하는 대표적인 항산화물질은 phenolic compound[6], ascorbic acid, tocopherol[2], carotenoides[7], flavonoides[14] 등이 잘 알려져 있으며, 산화적 손상으로부터 세포를 보호함으로써 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 각종 질병의 예방 또는 치료 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[11,12,15,17]. 기존의 대표적인 합성 항산화제로는 butylated hydroxyl toluene (BHT), butylated hydroxy anisole (BHA), ascorbic acid 등이 알려져 있다 [8,9,10]. 그 중 합성 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol은 효능이 우수하나 가격이 비싼 단점이 있다. 그러나 현재 개발된 BHT와 BHA는 효과가 우수하고 저렴한 가격 때문에 널리 사용되고 있으나, 다량 투여 시 기형이 발생되거나 암을 유발할 가능성이[1]이 있기 때문에 천연물로부터 강력하면서도 독성이

없는 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절실히 요구 되고 있다. 최근에는 양성자를 이용한 다양한 연구가 이루어지고 있으며 그 중 양성자 빔 조사에 의한 연구로는 Au<sup>+</sup> nano 물질 모양에 대한 Ag<sup>+</sup> 농도효과 [16], 화훼류 및 채소작물[3,21], 버섯종균[13] 등에 양성자 빔을 조사한 결과 다양한 형태의 돌연변이가 나타남을 연구 보고된바 있다. 그러나 양성자 빔을 이용한 천연물 추출물에 관한 항산화 활성 연구는 아직 보고된 바 없다. 근래 양성자 가속기를 이용한 다양한 연구가 이루어지고 있으므로 천연물에 대한 연구도 활발하게 이루어 질 것으로 예측된다.

본 연구에서는 천연물 추출물에 양성자 빔을 조사하였을 때 양성자 빔에 의해서 천연물의 항산화 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 탐색하기 위한 연구의 일환으로 20종의 식물 추출물에 양성자 빔을 조사하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) 소거 활성법과 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazinesulfonic acid) cation radical (ABTS<sup>+</sup>) 소거 활성법을 통하여 항산화 활성변화를 관찰 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시료의 조제

본 실험에 사용한 17종류의 식물은 경북 경주시 월성 한약점에서 판매되고 있는 제품으로 전문기관에 감정을 의뢰한 후 200 g을 분쇄기로 마쇄한 다음 70% 메탄올 1,500 mL을 가하여 상온에서 48시간 추출하였다. 이 추출물을 여과한 후 증발 농축한 다음 등걸 건조기로 24시간 동안 진공 건조하였다. 양성자 빔 조사를 위해 두께 0.2 mm polypropylene

\*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2217, Fax : +82-54-770-2210

E-mail : kdlee@mail.dongguk.ac.kr

tube에 추출 액기스 1 g씩 채취하여 양성자 빔 조사 시료로 사용하였다. 양성자 빔 조사 후 시료는 대조구와 함께 -78℃에서 냉장 보관하여 항산화 활성 실험의 시료로 사용하였다.

**양성자 빔 조사조건**

양성자 빔 조사 조건은 빔 에너지 45 MeV, 빔 전류 10 nA, Dose rate[Gy/sec] 1.91 그리고 LET[KeV/μm] 1.6의 저선량 양성자 빔을 실온에서 각각 1,000, 5,000 및 10,000 Gray의 총 흡수선량을 시료에 조사 하였으며, 총 흡수선량의 오차범위는 ± 0.2 KGy였다.

**DPPH radical 소거활성검색**

비교적 안정한 free radical인 DPPH radical 소거활성은 Brand-Willams[14]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 96 well plate에 DPPH solution (1.5×10<sup>-4</sup>M, Ethanol) 90 μl와 시료 10 μl을 가한 후 실온에서 10분간 반응시킨 후 각 반응액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Scavenged DPPH (\%)} = (1 - A_{\text{test}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

여기서, A<sub>test</sub>는 시료와 반응한 10분후의 광흡수도이며, A<sub>control</sub>은 시료 대신 MeOH를 첨가한 대조구의 광흡수도이다. DPPH radical을 50% 소거하는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>으로

나타내었다. 각 시료의 활성은 대표적인 합성 항산화제인 BHA, BHT 및 ascorbic acid을 사용하여 항산화 효과를 비교하였다.

**ABTS<sup>+</sup> cation radical 소거활성**

ABTS<sup>+</sup> cation radical 소거활성은 radical 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 무색으로 변색되므로 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있다. 이 radical에 대한 소거활성은 여러 항산화 활성과 상관관계를 보이므로 항산화제 검색에 널리 사용되고 있다.

즉 14 mM 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolinesulfonic acid) cation (ABTS<sup>+</sup>) 용액과 4.9 mM potassium persulfate를 암 조건하에서 24시간 반응시킨 후 96 well plate에 50 μl의 H<sub>2</sub>O, 140 μl의 ABTS<sup>+</sup> cation radical (A<sub>734nm</sub>=0.7), 10 μl 시료를 혼합하여 실온에서 7분간 반응시킨 다음 흡광도 734 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**식물 메탄올 추출액의 DPPH radical 소거능**

17종의 식물 메탄올 추출물의 양성자 빔의 조사 양에 따른 DPPH radical 소거 효과를 측정된 결과 Table 1과 같다. 양성자 빔의 조사 에너지양에 따라서 20종의 시료는 각각 다

Table 1. DPPH radical inhibitory activities of methanol extracts from plant and antioxidants by proton beam irradiation

Dose rate (Gray)	0	1000	5000	10000	<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (μg/ml)
scientific name					
<i>Angelica polymorpha</i>	<sup>b</sup> 22±0.04	9±0.02	11±0.02	11±0.02	48 μg/ml
<i>Morus alba</i>	7±0.03	8±0.03	12±0.06	12±0.03	96 μg/ml
<i>Liriope platyphylla</i>	6±0.02	10±0.05	10±0.04	7±0.01	125 μg/ml
<i>Paeonia lactiflora</i>	13±0.05	13±0.06	15±0.05	15±0.06	76 μg/ml
<i>Poncirus trifoliata</i>	5±0.02	4±0.02	5±0.03	5±0.05	325 μg/ml
<i>Angelica gigas</i>	12±0.12	12±0.11	10±0.02	10±0.04	82 μg/ml
<i>Lycium chinense</i> Miller	6±0.02	12±0.03	6±0.03	6±0.02	234 μg/ml
<i>Epimedium koveanum</i>	5±0.03	12±0.06	12±0.05	12±0.05	252 μg/ml
<i>Astragalus membranaceus</i>	25±0.13	13±0.06	13±0.04	13±0.05	556 μg/ml
<i>Houttuynia Cordata</i>	8±0.01	8±0.03	20±0.02	20±0.11	56 μg/ml
<i>Vitex rotundifolia</i>	4±0.02	9±0.05	9±0.05	10±0.02	242 μg/ml
<i>Ephedra sinica stapf</i>	6±0.03	15±0.08	13±0.06	13±0.01	204 μg/ml
<i>Trichosanthes Semen</i>	2±0.01	6±0.02	9±0.06	9±0.02	263 μg/ml
<i>Prunus persica</i>	7±0.02	7±0.02	7±0.02	7±0.01	124 μg/ml
<i>Prunus armeniaca</i>	49±0.12	11±0.05	11±0.05	8±0.03	2.6 μg/ml
<i>Artemisia iwayomogi</i>	20±0.06	14±0.03	14±0.02	12±0.02	32 μg/ml
<i>Tussilago farfara</i>	17±0.08	8±0.01	8±0.02	8±0.04	62 μg/ml
BHT	20±0.04	22±0.03	22±0.08	22±0.06	5.0 μg/ml
BHA	33±0.06	34±0.07	34±0.11	34±0.07	4.3 μg/ml
Ascorbic acid	15±0.02	15±0.03	15±0.03	16±0.02	12.5 μg/ml

All data are means of three determinations.

<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> (μg/ml) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve at 1,000 Gray irradiation sample

<sup>b</sup> Scavenging activity (%)

양한 DPPH radical 소거 효과를 나타내었다. 이중 2종의 시료는 활성변화가 나타나지 않았으며, 6종의 시료는 DPPH radical 소거 효과가 감소하였다. 특히 관동화(*Tussilago farfara*)는 1,000 Gray에서 53%, 5,000 Gray에서 토천궁(*Ligusticum chuanxiong*)은 50%, 인진(*Artemisia iwayomogi*)은 10,000 Gray에서 40% 활성이 감소하였으며, 12종류의 식물은 활성이 증가하였다. 특히 1,000 Gray에서 마황(*Ephedra sinica stapf*)은 60%, 팔루인(*Trichosanthes Semen*)은 5,000 Gray에서 77.8%로 활성이 증가하였으며, 시판 되고 있는 BHA, BHT 및 ascorbic acid는 5,000 Gray에서 활성이 약간 증가하였다.

IC<sub>50</sub>값이 증가한 시료는 구기자(*Lycium chinense* Miller), 음양곽(*Epimedium koveanum*), 어성초(*Houttuyniae Cordata*), 만형자(*Vitex rotundifolia*), 마황, 팔루인 등이며, 1,000 Gray에서 구기자의 IC<sub>50</sub>값은 50%, 음양곽은 70%, 만형자는 50%, 마황은 64% 그리고 팔루인은 77.8%로 높은 활성 증가를 나타내었으며, 어성초는 5,000 Gray에서 65%의 증가를 나타내었다. 그러나 토천궁과 관동화는 1,000 Gray에서 50%이상 감소하는 경향을 나타내었다.

#### 식물 매탄올 추출액의 ABTS· cation radical 소거 능

17종류의 식물 매탄올 추출물의 양성자 빔의 조사 양에 따른 ABTS<sup>+</sup> cation radical 소거 효과를 측정된 결과 Table

2과 같다. 17종의 식물 추출물 중 대조구에 비해서 1,000 Gray조사에서 토천궁은 38.5% 활성이 감소하였으며, 12종류의 식물은 활성이 증가하였다. 특히 1,000 Gray에서 백작약(*Paeonia lactiflora*) 64.3%, 오수유(*Evodia officinalis* Dode) 60%, 5,000 Gray에서 원지(*Polygala tenuifolia*) 50%, 뽕쭉(*Artemisia feddei* Lev.) 76.5% 활성이 증가하였다. 그러나 6종의 식물은 활성 변화가 거의 없었으며 합성 항산화제인 BHA, BHT 및 ascorbic acid는 약간의 활성증가를 보였다.

ABTS cation radical 소거활성에 대한 IC<sub>50</sub>에 대한 값은 Table 2와 같다. 17종의 식물추출물에 양성자 빔 조사한 결과 5,000 Gray에서 뽕쭉 추출물은 IC<sub>50</sub>값이 2.4 µg/ml로 활성이 가장 증가하였다. 그러나 양성자 빔을 이용한 식물 추출물에 대한 항산화 연구는 보고 된 바 없다. 최근 양성자 빔을 이용한 화훼류 및 채소작물의 신품종개발 및 변이체의 연구 보고에 의하면 이들 종자에 양성자 빔을 조사한 결과 다양한 종류의 유도 돌연변이가 생성 되었으며[3,21], 벚꽃삽사체와 포자에 양성자 빔을 조사한 결과 벚꽃 갖의 색깔이 다른 것이 발견되었고 양성자 빔의 에너지 수준이 45 MeV 저선량으로 돌연변이 유도에 대한 결과는 감마선 처리 결과와 유사한 경향을 보였다[13].

감마선을 포함한 방사선은 저 선량일 경우, 다양한 생물자극 효과에 의해 뇌질환을 막아주고 산화적 스트레스에 대한

Table 2. ABTS radical inhibitory activities of methanol extracts from plant and antioxidants by proton beam irradiation

scientific name	Dose rate (Gray)				<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	0	1000	5000	10000	
<i>Angelica polymorpha</i>	<sup>b</sup> 13±0.10	10±0.08	10±0.02	8±0.05	12.5 µg/ml
<i>Morus alba</i>	7±0.08	7±0.06	16±0.07	7±0.04	14.5 µg/ml
<i>Liriope platyphylla</i>	12±0.05	9±0.03	9±0.03	9±0.02	125 µg/ml
<i>Paeonia lactiflora</i>	5±0.01	14±0.02	14±0.01	5±0.03	5.2 µg/ml
<i>Polygala tenuifolia</i>	5±0.08	7±0.02	10±0.02	10±0.04	78 µg/ml
<i>Evodia officinalis</i> Dode	8±0.03	20±0.05	20±0.03	11±0.05	62 µg/ml
<i>Houttuynia Cordata</i>	10±0.01	9±0.06	10±0.07	10±0.03	6.8 µg/ml
<i>Forsythia viridissima</i> Lindly	15±0.07	15±0.05	15±0.05	15±0.03	5.2 µg/ml
<i>Lycium chinense</i> Miller	12±0.09	12±0.02	22±0.03	12±0.02	26 µg/ml
<i>Sophora japonica</i> Linne	16±0.03	25±0.03	25±0.08	25±0.05	5.4 µg/ml
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	20±0.05	27±0.01	27±0.05	26±0.05	4.8 µg/ml
<i>Tussilago farfara</i> Linne	19±0.02	25±0.02	25±0.01	25±0.03	5.2 µg/ml
<i>Artemisia feddei</i> Lev.	8±0.02	8±0.03	34±0.03	11±0.02	2.4 µg/ml
<i>Prunus armeniaca</i>	13±0.10	13±0.05	14±0.09	13±0.05	246 µg/ml
<i>Torilis japonica</i> Decandolle	3±0.05	3±0.07	3±0.03	3±0.04	214 µg/ml
<i>Ephedra sinica</i> stapf	9±0.03	20±0.02	5±0.07	5±0.01	128 µg/ml
<i>Schisandra Chinensis</i>	4±0.10	3±0.04	3±0.05	4±0.02	84 µg/ml
<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance	20±0.06	20±0.02	20±0.03	20±0.05	4.8 µg/ml
BHT	35±0.05	35±0.05	36±0.07	35±0.12	2.3 µg/ml
BHA	30±0.06	32±0.05	32±0.02	32±0.03	2.5 µg/ml
Ascorbic acid	22±0.03	22±0.06	24±0.05	24±0.05	4.6 µg/ml

All data are means of three determinations.

<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> (µg/ml) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve at 1,000 Gray irradiation sample

<sup>b</sup> Scavenging activity (%)

내성을 증가 시키며[5], 식물유지의 항산화 능을 증가시키며 [4]. 대두[14]는 주로 isoflavonoid 화합물과 polyphenol 화합물이 항산화 활성을 증가시키며, 펩티드 및 아미노산, 인지질 등도 항산화효과에 영향을 미친다는 연구보고가 있다[19,20]. 양성자 빔 조사에 의한 항산화 활성 증가는 천연물에 존재하는 아미노산, 인지질, polyphenol 및 isoflavonoid 화합물 등의 고분자화합물들이 분해되거나 결합하여 새로운 화합물이 생성되거나 구조변화에 의해서 활성에 영향을 미친 것으로 사료된다. 양성자 빔 조사에 의한 항산화 활성 증가 및 감소에 의한 원인을 규명하기 위하여 앞으로 이들 물질들을 분리 정제 및 구조분석을 통한 더 많은 연구가 이루어져야 될 것이다.

## 요 약

합성항산화제 3종과 17종의 식물 추출물을 이용하여 양성자 빔을 1,000, 5,000, 10,000 Gray 수준으로 처리하여 에너지 양에 따른 항산화 활성에 미치는 영향을 탐색 하고자 DPPH radical 소거능 과 ABTS cation radical 소거능의 활성에 대하여 조사하였다. 이중 6종류의 시료는 양성자 빔을 조사한 결과 활성이 감소하였으며, 2종류의 시료는 활성변화가 없었으며, 12종류의 시료는 활성이 증가하였다. DPPH radical 소거효과는 1,000 Gray에서 마황은 60%, 팔루인은 5,000 Gray에서 77.8%로 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. ABTS cation radical 소거효과에서 토천궁은 1,000 Gray의 양성자 빔을 조사한 결과 38.5% 활성이 감소하였으며, 합성 항산화제는 활성변화가 거의 없으나, 팽죽 추출물은 5,000 Gray에서 IC<sub>50</sub>값이 2.4 µg/ml로 BHT의 IC<sub>50</sub>값 2.3 µg/ml과 유사하였다.

## 감사의 글

이 연구는 한국원자력연구소 양성자기반공학기술 사업단의 지역협력 프로그램 연구(2006-0538-0)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Babizhayev, M. A., M. C. Seguin, J. Gueyne, R. P. Evstigneeva, E. A. Ageyeva and G. A. Zheltukhina. 1994. L-carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) and carcinine ( $\beta$ -alanyl-histamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *J. Biochem.* **304**, 509-516.
- Barnes, H. T. and C. C. Akoh. 2003. Effect of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6858-6860.
- Bae, C. H. 2005. Development of new ornamental plants and analysis of the mutants derived from ion beam irradiated plant organisms. *Proton Engineering Frontier Project, Korea Atomic Energy Research Institute.*

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **28**, 25-30.
- Brieskorn, C. H., A. Fuch, J. B., Bredenberg, J. D. Mcchensney and E. Wenkert. 1964. The structure of carnosol. *J. Org. Chem.* **29**, 2293-2299.
- Foot, C. S. and R. W. Denny. 1968. Chemistry of singlet oxygen quenching by  $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6233-6239.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 966-968.
- Hayes, R. E., G. N. Bookwalter and E. B. Bagley. 1977. Antioxidant activity of soybean flours and derivatives-A review. *J. Food Sci.* **42**, 1527-1632.
- J. K. Jangand and J. Y. Han. 2002. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 524-528.
- Jeong, M. R., B. S. Kim and Y. E. Lee. 2002. Physicochemical characteristics and antioxidant effects of Korean figs. *J. East. Asian. Soc. Dietary. Life.* **6**, 12-17.
- Jung, G. T., I. O. Ju., J. S. Choi and J. S. Hong. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrate scavenging effects of Schizandra Chinesis Ruprecht (Omija) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 928-935.
- Kwon, H. J. 2005. Inducing mutation of mushroom by using proton beam. *Proton Engineering Frontier Project, Korea Atomic Energy Research Institute.*
- K. Miura and N. Nakatani. 1989. Antioxidative activity of flavonoid from Thyme. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3043-3045.
- Kim, S. M., E. J. Kim, Y. S. Cho and S. K. Sung. 1999. Antioxidant of pine extracts according to preparation method. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **28**, 984-989.
- Kim, Y. J., G. J. Cho and J. H. Song. 2007. Ag+concentration effect on the shape of Au nanomaterials under proton beam irradiation. *NIMB.* **B254**, 73-77.
- Lee, I. K., Yun B. S., Y. H. Kim and I. D. Yoo. 2002. Two Neuroprotective Compounds from Mushroom *Daldinia concentrica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 692-694.
- Marfak, G. M., Trouillas, P., D. P. Allais and J. L. Duroux. 2003. Radiolysis of Kaempferol in Water/Methanol Mixtures. Evaluation of Antioxidant Activity of Kaempferol and Products Formed. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1270-1277.
- Marnett, L. J. 1987. Peroxyl free radical: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* **8**, 1365-1373.
- Sangor, M. R. and D. E. Pratt. 1974. Lipid oxidation and fatty acid changes in beef combined with vegetables and textured vegetable protein. *J. Am. Diet. Assoc.* **64**, 268-270.
- Y. I. Lee and K. S. Lee. 2005. Mutation breeding of ornamental and vegetable crops by using ion beam. *Proton Engineering Frontier Project, Korea Atomic Energy Research Institute.*