

## 오가피 분획 추출물의 항산화효과

임 경 란 · 김 미 진 · 정 택 규 · † 윤 경 섭  
(주)사임당화장품 기술연구소  
(접수 : 2008. 3. 14., 게재승인 : 2008. 8. 7.)

### Antioxidant activity of partially purified extracts isolated from *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman

Kyung-ran Im, Mi-jin Kim, Teak-Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon†  
R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., Chungbuk 370-802, Korea  
(Received : 2008. 3. 14., Accepted : 2008. 8. 7.)

The antioxidant activity and the qualitative analysis of *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman were studied by partially purified extract using various methods : extraction by using ethanol solutions and temperatures, and absorption to Diaion HP20 column chromatography using 10%, 20%, 40%, 60% ethanol solutions. Major constituents, chlorogenic acid, caffeic acid, eleutheroside E, was determined by HPLC method in *Acanthopanax sessiliflorum* S. 10% and 20% ethanol solutions contain chlorogenic acid ( $3.020 \pm 0.080\%$ ,  $20.500 \pm 1.150\%$ , respectively). 40% ethanol solution contains caffeic acid and eleutheroside E ( $12.270 \pm 0.360\%$ ,  $1.670 \pm 0.140\%$ , respectively). Diaion HP20 fractions (10%, 20%, 40%, 60% ethanol solutions) showed the scavenging activity of radicals and reactive oxygen species with the IC<sub>50</sub> values of  $81.534 \pm 0.992 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.748 \pm 0.098 \mu\text{g/ml}$ ,  $11.487 \pm 1.768 \mu\text{g/ml}$ ,  $21.960 \pm 0.547 \mu\text{g/ml}$  against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and  $1713.548 \pm 34.565 \mu\text{g/ml}$ ,  $131.419 \pm 2.235 \mu\text{g/ml}$ ,  $200.681 \pm 2.444 \mu\text{g/ml}$ ,  $757.897 \pm 6.868 \mu\text{g/ml}$  against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. Especially, 20% and 40% ethanol fractions showed more antioxidant activity than dl- $\alpha$ -tocopherol. These results suggest that *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract and Diaion HP20 fractions may be useful as a potential source of nutraceutical and cosmetic products.

**Key Words :** *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman, Diaion HP20, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, superoxide radicals

#### 서 론

오가피 (*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman)는 오갈피과 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 오가피속 (*Acanthopanax*) 식물로 낙엽활엽 관목이다. 우리나라를 비롯하여 중국 남경, 일본 북해도 등에 널리 자생하며, 높이 1.5~2.0 cm, 줄기에는 드물게 큰 가시가 있고, 잎은 장상복엽으로 3~5엽이다(1-3). 우리나라에서 한약재로 사용되었던 주된 오가피 품종은 오가피 (*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman), 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus* Harm), 털오가피 (*Acanthopanax rufinerve* Nakai), 지리산오가피 (*Acanthopanax chiisanensis* Nakai), 서울오가피 (*Acanthopanax*

*seoulense* Nakai) 등이며, 국내에 자생하고 있는 오가피는 14종이 알려져 있다(4-6).

한방에서는 오가피가 신농본초경 중품에 수재되어 있고, 중풍, 장장, 강정, 신경통, 당뇨, 피로회복 등에 이용된다고 하였으며, 민간 또는 한방에서 술로 우려내거나 물로 다려서 사용되어 왔다(7, 8).

1960년대 러시아의 Brekhman 등에 의해 리그난 배당체인 eleutheroside B와 E 성분이 비특이적으로 생체에 대한 생리적, 화학적 환경에 대하여 생체의 저항력을 증대시켜 주는 adaptogen 작용을 갖고 있어 항피로작용과 항스트레스작용을 한다는 결과가 보고되면서 세계적으로 주목받기 시작하여 약리학적 연구가 진행되었다(9-11).

현재까지 알려진 오가피속 식물의 성분은 eleutheroside A, B, C, D, E, I, K, L, M과 sesamin, chiisanoside, caffeic acid, chlorogenic acid, campesterol, 비타민, 미네랄 등으로 항스트레스작용 및 항피로작용, 항염증작용, 간기능 보전과 해독작용, 항히스타민작용, 항알러지작용, 항산화작용, 항암작용,

† Corresponding Author : R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 805-5 Gyesan-ri, Yeongdong-eup, Yeongdong-gun, Daejeon 301-803, Korea  
Tel : +82-43-743-5338, Fax : +82-43-744-4857  
E-mail : ksyoonjh@hanmail.net

콜레스테롤 저해효과 등이 보고되어 좋은 약제로 평가받고 있다(11-21).

이러한 효능 때문에 여러 측면을 연구한 결과 건강보조식품, 식품이나 화장품 등의 첨가제로 사용되며, 오가피의 성분 분석과 효능에 관한 연구는 계속되고 있다(22).

그러나 오가피 연구의 대부분은 가온 용매추출이나 열수추출을 통한 단순 추출물 자체의 유효성분 분리와 생리활성 연구에 치중되어 있다. 따라서 본 연구에서는 온도 및 추출용매를 조절하여 최적 추출조건을 검색하였으며, 오가피의 분리, 정제를 통하여 주 유효성분을 확인하였다. 또한, 오가피의 성분들 중에 다양한 생리활성 작용을 하는 chlorogenic acid를 유효성분으로 함유하는 정제된 오가피추출물을 제조함과 동시에 그들의 항산화효과를 기존의 잘 알려진 성분들과 비교 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 오가피는 충북 제천에서 재배하고 있는 오가피 (*Acanthopanax sessiliflorum* S.)를 절단된 상태로 제천 시장에서 구입하여 사용하였다. 오가피의 추출과정 및 분획에 사용된 용매들은 시약급을 구입하여 그대로 사용하였고, HPLC 분석용 용매로는 acetonitrile (ACN)과 water를 HPLC grade로 Fisher사에서 구입하여 사용하였다. Diaion HP20 (Mitsubishi Kasei Kogyo Co., Ltd. Japan), silica gel 60 (Merk, 70-230 mesh), ODS-A (YMC-GEL, 12 nm, Germany), sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech., Uppsala)을 resin으로 사용하였으며, 오가피추출물에 포함된 생리활성 성분 중 지표성분인 chlorogenic acid (Sigma, approx. 95%), caffeic acid (Fluka, approx. 95%) 및 eleutheroside E (International Laboratory USA, approx. 95%)는 초저온 냉장고 -40°C에서 보관하여 사용하였다. 기기로는 HPLC (Agilent Technologies 1200 series, UV detector), rotary evaporator (Eyela, Buchi), UV-Visible Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601), pH Meter (Thermo Electron Co., Orion 420 A+), 휘발분측정기 (Infrared Moisture Determination Balance, Kett Electric Lab., FD-240)가 사용되었다.

### 오가피의 부위별 추출

오가피의 줄기, 줄기피, 뿌리 각각 50 g를 정량하여 추출기에 넣은 후, 75% 에탄올수용액으로 4시간씩 2회 반복 환류 냉각 추출하였다. 추출여액을 와트만 2번 여과지로 여과하고 회전식 증발 건조기로 감압 농축하여 오가피 분말을 얻어, 추출수율 및 지표성분의 함량을 측정하였다.

### 최적 추출용매 조성 및 추출방법 결정

오가피추출물은 추출용매와 추출방법으로 구분하여 제조하였다. 추출용매를 선정하기 위해서는 25%, 50%, 75%, 100%의 에탄올수용액 및 정제수를 사용하여 환류 냉각 추출하였다. 오가피의 추출방법을 선정하기 위해서는 75% 에탄올수용액을 이용하여 환류 냉각 추출 (80°C 이상), 상온교반 (25°C) 및 초음파 추출 (50°C) 하여 비교하였다.

### 최적화된 조건에서 오가피의 추출 및 분리

오가피 40 kg에 75% 에탄올수용액 400 L을 넣고 3일 동안 상온 교반 후 300 메시 여과포로 여과한 다음 추출여액을 회전식 증발 건조기로 40°C로 감압 농축하여 오가피 조추출물 (5.32 kg)을 얻었다. 다음, 추출물 전량을 미리 10% 에탄올수용액으로 평형화시켜 놓은 Diaion HP20으로 충전시킨 직경 40 cm, 길이 2 m의 column에 충전 후 순차적으로 10%, 20%, 40%, 60% 에탄올수용액으로 350 L씩 용출하여 4개의 분획으로 분리하였다. 감압 농축한 20% 에탄올 용출분획 중 일부분 (300 mg)을 취하여 ODS-A (2.5 cm×20 cm) column chromatography를 실시하였다. 30% 에탄올로 용출하여 5개의 소분획으로 나누는 후, 이 중 Fr. 2 (120 mg)를 다시 30% 에탄올을 용출 용매로 사용하여 ODS-A column chromatography를 실시하여 2개의 소분획으로 나누었다. 이 중 Fr. 2는 LH-20 column chromatography로 80% 에탄올을 용출 용매로 사용하여 성분을 분리하여 chlorogenic acid (A)를 분리하였다. 다시 Diaion HP20 column chromatography의 감압 농축한 40% 에탄올 용출분획 중 일부분을(1 g) CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O=65 : 35 : 10을 용출 용매로 2차 silica gel column chromatography를 실시하여 7개의 소분획으로 나누었다. 이중 Fr. 1 (250 mg)을 40% 에탄올을 용출 용매로 ODS-A를 실시하여 2개의 소분획으로 나누었다. 다시 Fr. 2 (160 mg)를 LH-20 column chromatography로 80% 에탄올을 용출 용매로 사용하여 성분을 분리하여 caffeic acid (B)를 얻었다. 2차 ODS-A column chromatography에서 분리된 Fr. 3 (150 mg)은 40% 에탄올을 용출 용매로 사용하여 ODS-A column chromatography를 실시하여 2개의 소분획으로 나누었다. 이 중 Fr. 2는 LH-20 column chromatography로 80% 에탄올을 용출 용매로 사용하여 성분을 분리하여 eleutheroside E (C)를 분리하였다(Fig. 1).

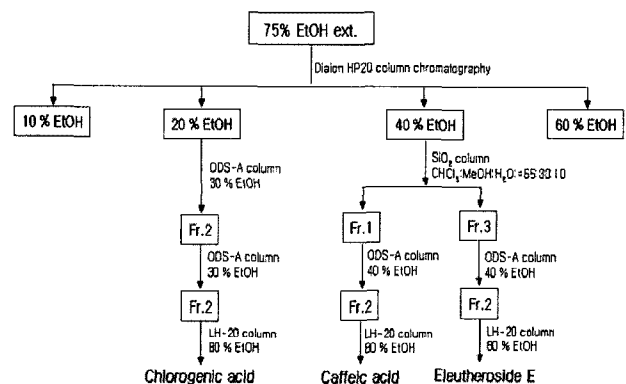


Figure 1. Schematic procedure for isolation and purification of three compounds from *Acanthopanax sessiliflorum* S.

### 지표성분 정량분석

용매별 추출물 및 Diaion HP20 분획층은 오가피 지표성분인 chlorogenic acid, caffeic acid, eleutheroside E의 고속액체크로마토그래피 (HPLC) 분석을 행하였다.

HPLC 분석 조건으로 칼럼은 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm×250 mm), 검출기는 자외부흡광광도계로 측정파장은 330 nm로 하였다. 유속은 1.0 ml/min이며, 이동상은 용매 A (0.1% 초산을 함유한 ACN)와 용매 B (0.1% 초산을 함유한 정제수) 기율기용리로 하여 Table 1의 조건에 따라 실시하였다.

**Table 1.** Condition for HPLC analysis

Time (min)	Solvent A <sup>a)</sup>	Solvent B <sup>b)</sup>
0	10	90
5	20	80
10	20	80
15	30	70
20	30	70
25	40	60
30	40	60
35	10	90
40	10	90

a) Solvent A : 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in ACN.

b) Solvent B : 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in H<sub>2</sub>O.

**물성평가**

오가피추출물의 물리적 성질로 고형분, pH, 색상을 측정하였다. 고형분 측정은 휘발분측정기를 이용하여 1 g, 110°C, 3 h의 조건에서 측정하였다. pH는 pH meter를 이용하여 50% 에탄올 수용액을 100배 희석한 후 측정하였으며, 오가피추출물의 색상은 색차계를 사용하여 측정하였다.

**DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거효과**

항산화활성은 DPPH (Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 방법을 활용하였다(23). 0.2 mM DPPH 메탄올 용액에 시료를 각각의 농도로 메탄올에 희석하여 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후 UV-VIS Spectrophotometer 로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 Diaion HP20의 용매별 분획시료를 사용하였다. 대조구는 시료액 대신 메탄올을 넣으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH radical 소거율은 다음의 식 (1)에 따라 계산하였다.

$$\text{자유라디칼소거율 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (1)$$

**Superoxide radical 소거효과**

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) 방법에 의해 측정하였다(24). 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, bovine serum albumin (BSA), 0.75 mM NBT와 시료를 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 20분 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. Superoxide radical 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식 (2)에 따라 계산하였다.

$$\text{활성산소소거율 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (2)$$

**세포독성 평가**

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,

Sigma] 정량은 Mosmann (25)의 방법을 변형하여 실시하였다.

사람 섬유아세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 15시간 정도 배양한 후, 각 well에 적당한 농도로 오가피추출물을 처리하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 더 배양하였다. MTT 용액(5 mg/ml) 10μl를 첨가하고 4시간 후 상등액을 제거하고 150 μl dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가한 후 540 nm에서 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식 (3)에 따라 계산하였다.

$$\text{세포증식율 (\%)} = \frac{\text{시료첨가구의 흡광도} - \text{대조구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100 \quad (3)$$

**피부안전성 시험**

오가피추출물에 대한 피부 안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 한국식품의약품안전청 기준 피부안전성 검사법에 따라 인체척포시험을 실시하였다.

피험자로 20세 이상 50세 이하의 건강한 성인 남, 여 30명을 선정하였고, 척포시험은 대상자 상박 내측에 척포를 부착하였으며, 48시간이 지난 후 척포를 제거하였다. 약 60분간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 척포 부착 후 96시간이 경과한 후 2차 판독을 시행하였다. 판정기준은 Table 2에 나타내었다.

**Table 2.** Evaluation criteria for marking of human patch test

Response	Grade	Interpretation criteria
-	0	No response
±	0.5	Doubtful reaction
+	1	Weak (non-vesicular) reaction
++	2	Strong (oedematous or vesicular) reaction
+++	3	Strong, infiltrated erythema and accompanying vesiculae or superficial

척포 부착 후 48시간과 96시간에 판독한 결과의 피부반응도를 다음의 식 (4)에 따라 계산하였다.

$$\text{피부반응도 (\%)} = \frac{\sum(\text{가중치}) \times (\text{반응인원수})}{\text{최대가중치} \times \text{전체인원수}} \times 100 \quad (4)$$

상기 계산식에 의해 계산되는 피부반응도를 미리 정한 다음의 Table 3의 판정기준에 준하여 각 시료의 피부반응도를 판정하였다.

**Table 3.** Evaluation criteria of skin reactions

Average reaction	Evaluation criteria
0.0 ~ 0.9	No irritation
1.0 ~ 2.9	Weak irritation
3.0 ~ 4.9	Medium irritation
> 5.0	Strong irritation

## 결과 및 고찰

### 부위별 추출물의 지표성분 함량비교

오가피의 부위별 추출물의 고형분의 양과 지표성분의 함량을 Table 4에 나타내었다. 오가피의 대부분의 부위에서 chlorogenic acid 및 eleutheroside E가 1% 이상 다량 함유되어 있었으며, caffeic acid는 약 0.3% 로 소량 함유되어 있음을 알 수 있었다. 부위별로 지표성분의 함량 차이를 보였고, 전반적으로 줄기 > 뿌리 > 줄기피의 순으로 지표성분이 고르게 함유되어 있었으며, 전체 고형분의 양은 뿌리 > 줄기피 > 줄기임을 알 수 있었다. 지표성분의 함량 및 고형분의 양을 고려한다면 줄기나 뿌리를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되며, 본 연구소에서는 약재의 시중가를 고려하여 줄기부위로 연구를 진행하였다.

**Table 4.** The contents of chlorogenic acid in stem, stem bark, root of *Acanthopanax sessiliflorum* S.

Material	Amount of dry contents (g/50 g)	Chlorogenic acid	
		Contents (%)	Amount (mg/50 g)
stem	3.350 ± 0.187	2.748 ± 0.053	0.092 ± 0.007
stem bark	4.346 ± 0.046	2.443 ± 0.052	0.106 ± 0.003
root	6.290 ± 0.062	2.758 ± 0.018	0.173 ± 0.001

### 용매별 추출물의 chlorogenic acid의 함량비교

오가피의 용매별 추출물의 고형분의 양과 오가피의 주 생리활성물질인 chlorogenic acid의 함량을 Table 5에 나타내었다. 오가피의 주 활성성분 중에서 chlorogenic acid는 UV 흡광도계에 대하여 400 및 200 nm에서 흡수피크를 나타내기 때문에 UV detector가 장착된 HPLC를 이용하여 쉽게 정성 및 정량 분석이 가능하며, 오가피의 가장 풍부한 성분이므로 최적 추출 조건을 검색 시 지표성분으로 선정하였다. 정제수의 함량이 증가할수록 전체 고형분의 양이 증가하였으며, 100% 정제수 및 100% 에탄올의 단일 용매로의 추출보다 에탄올수용액을 사용하여 추출시 chlorogenic acid의 함량이 증가함을 알 수 있었다. 에탄올수용액에서의 chlorogenic acid의 함량과 전체 고형분의 양은 큰 차이가 없으므로 농축시간 고려하여 70~85% 에탄올 수용액으로 추출하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

**Table 5.** Quantitative analysis of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract with extraction solvents

Extracts	Amount of dry contents (g/50 g)	Concentration of chlorogenic acid <sup>a)</sup> (%)	Amount of chlorogenic acid <sup>b)</sup> (mg/50 g)
75% EtOH	2.920	2.266	0.066
50% EtOH	3.500	2.117	0.074
25% EtOH	3.560	2.183	0.078
100% H <sub>2</sub> O	3.870	1.180	0.046

a) Concentration of chlorogenic acid within dry powder of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract

b) Amount of chlorogenic acid within dry powder of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract

### 추출방법별 chlorogenic acid의 함량 및 물성비교

오가피의 환류냉각, 상온교반, 초음파 추출을 통하여 온도에 따른 chlorogenic acid의 함량과 pH 및 색상 차이를 Table 6에

나타내었다. chlorogenic acid의 함량 및 pH는 큰 차이가 없었으나, 색상의 차이는 육안으로도 심한 차이를 보였다. 상온교반 및 초음파 추출은 50°C 이하에서 추출되는 조건으로 추출물이 밝은 노란색을 보인 반면, 환류냉각 추출물은 80°C 이상의 높은 열로 인하여 어두운 갈색을 보였다. 이는 오가피의 구성성분들이 열에 불안정하여 갈변현상을 나타내므로 50°C 이하의 온도에서 상온교반 및 초음파 추출하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

**Table 6.** Physical properties and quantitative analysis of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extracts with extraction methods

Extracts	Concentration of chlorogenic acid <sup>a)</sup> (%)	pH <sup>b)</sup>	Color	
			L <sup>c)</sup>	b <sup>d)</sup>
25°C-Stirring	2.183 ± 0.107	6.58	87.32	42.51
50°C-Sonication	2.223 ± 0.026	6.49	73.15	43.89
100°C-Reflux	1.187 ± 0.057	6.10	36.70	81.15

a) Concentration of chlorogenic acid within dry powder of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract.

b) Condition : 0.1 g *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract in 100 ml 50% EtOH.

c) L : Lightness.

d) Yellow direction (+ value : yellow color increase).

### Diaion HP20 용매별 분획층의 지표성분 함량 및 물성비교

75% 에탄올수용액으로 상온 교반한 추출물의 Diaion HP20 4개 분획층에 대하여 지표성분들의 함량과 pH 및 색상 차이를 Table 7과 8에 나타내었다. 10% 및 20% 에탄올수용액 층은 chlorogenic acid가 각각 3.020 ± 0.080%, 20.500 ± 1.150%로 주 구성성분이었으며, 40% 에탄올수용액 층은 caffeic acid 및 eleutheroside E가 12.270 ± 0.360%, 1.670 ± 0.140%로 주 구성성분임을 확인하였다. chlorogenic acid 및 오가피에 포함된 주요 화합물의 화학구조를 Fig. 2에 나타내었으며, HPLC 크로마토그램은 Fig. 3에 나타내었다. 오가피 Diaion HP 분획층의 pH는 4.5~6.5 사이의 값을 나타내었으며, 색상은 에탄올의 함량이 높을수록 상대적으로 진한 색상을 보였다.

**Table 7.** Quantitative analysis of Diaion HP20 fraction layers for *Acanthopanax sessiliflorum* S.

Fraction	Contents (%)		
	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Eleutheroside E
10% EtOH	3.020 ± 0.080	-	-
20% EtOH	20.500 ± 1.150	-	-
40% EtOH	-	12.270 ± 0.360	1.670 ± 0.140
60% EtOH	-	-	-

**Table 8.** Physical properties of Diaion HP20 fraction layers for *Acanthopanax sessiliflorum* S.

Fraction	pH <sup>a)</sup>	Color	
		L <sup>b)</sup>	b <sup>c)</sup>
10% EtOH	6.54	94.25	7.86
20% EtOH	4.80	92.19	23.46
40% EtOH	4.88	87.55	44.33
60% EtOH	5.41	69.88	87.46

a) Condition : 0.1 mg *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract in 100 ml 50% EtOH.

b) L : Lightness.

c) Yellow direction (+ value : yellow color increase).

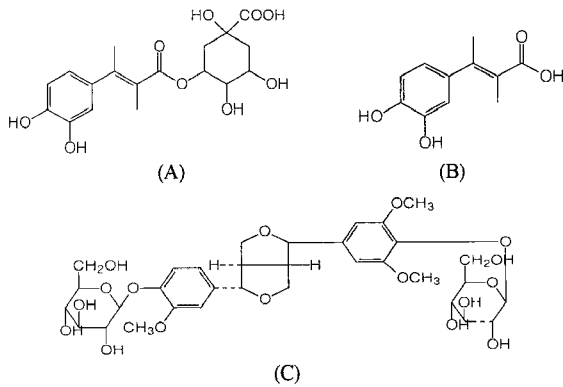


Figure 2. Chemical structures of chlorogenic acid (A), caffeic acid (B), eleutheroside E (C).

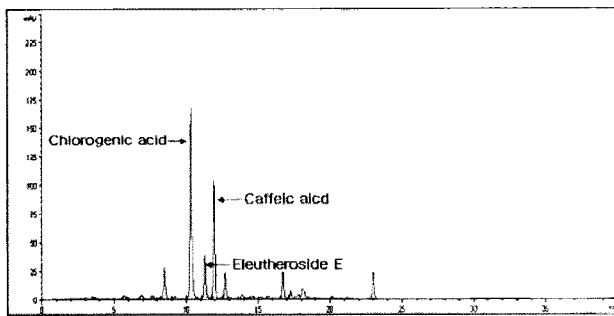


Figure 3. HPLC chromatogram of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract.

**DPPH radical 소거효과**

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다.

오가피추출물의 항산화효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화효과를 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 ascorbic acid와 dl- $\alpha$ -tocopherol (1000 IU/g, Sigma)을 이용하여 오가피추출물의 Diaion HP20 분획층과 항산화효과를 비교하였다. 그 결과 free radical을 50% 소거할 수 있는 농도 (IC<sub>50</sub>)가 20% 에탄올 분획층 1.748  $\pm$  0.098  $\mu$ g/ml, ascorbic acid 3.018  $\pm$  0.167  $\mu$ g/ml, 40% 에탄올 분획층 11.487  $\pm$  1.768  $\mu$ g/ml 그리고 dl- $\alpha$ -tocopherol 18.316  $\pm$  0.030  $\mu$ g/ml, 60% 에탄올 분획층 21.960  $\pm$  0.547  $\mu$ g/ml, 10% 에탄올 분획층 81.534  $\pm$  0.992  $\mu$ g/ml의 순으로 측정되었으며, 20% 에탄올 분획층은 ascorbic acid보다 약 2배 이상의 free radical 소거효과를 나타내었다(Table 9).

**Superoxide radical 소거효과**

Superoxide radical 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다.

양성 대조군으로 dl- $\alpha$ -tocopherol (1000 IU/g, Sigma)을 이용하였다. 그 결과 superoxide를 50% 소거할 수 있는 농도 (IC<sub>50</sub>)는 20% 에탄올 분획층 131.419  $\pm$  2.235  $\mu$ g/ml, 40% 에탄올 분획층 200.681  $\pm$  2.444  $\mu$ g/ml, ascorbic acid 225.327  $\pm$  4.278  $\mu$ g/ml 그리고 60% 에탄올 분획층 757.897  $\pm$  6.868  $\mu$ g/ml, 10% 에탄올 분획층 1713.548  $\pm$  34.565  $\mu$ g/ml의 순으로

측정되었으며, 20% 및 40% 에탄올 분획층은 dl- $\alpha$ -tocopherol 보다도 높은 superoxide radical 소거활성을 나타내었다(Table 9). DPPH radical 소거활성과 같이 종합해 볼 때, 오가피에 다량으로 함유되어 있는 chlorogenic acid와 caffeic acid의 함량에 의존적으로 항산화효과가 있음을 알 수 있었다. 특히, 20% 및 40% 에탄올 분획층은 지질 radical과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

Table 9. Antioxidative effect of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract

Fraction	IC <sub>50</sub>	
	DPPH scavenging activity ( $\mu$ g/ml)	SOD-like activity ( $\mu$ g/ml)
10% EtOH	81.534 $\pm$ 0.992	1713.548 $\pm$ 34.565
20% EtOH	1.748 $\pm$ 0.098	131.419 $\pm$ 2.235
40% EtOH	11.487 $\pm$ 1.768	200.681 $\pm$ 2.444
60% EtOH	21.960 $\pm$ 0.547	757.897 $\pm$ 6.868
ascorbic acid	3.018 $\pm$ 0.167	-
dl- $\alpha$ -tocopherol	18.316 $\pm$ 0.030	225.327 $\pm$ 4.278

IC<sub>50</sub> : Concentration of the sample required for 50% the radical to be scavenged.

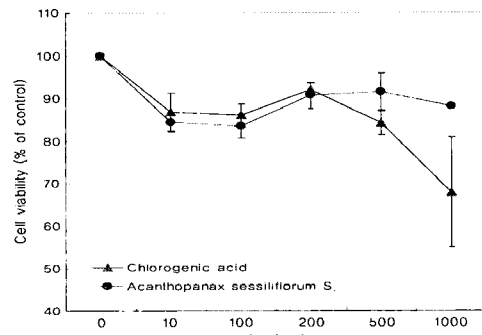


Figure 4. Relative cell viability of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract and chlorogenic acid on human dermal fibroblasts by MTT assay. The cells were treated with various concentration of samples for 24 h. The results were expressed as the average of duplicate samples.

**세포독성 효과**

시험 시료들의 세포독성과 더불어 시험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. Chlorogenic acid의 단일 성분은 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서는 급격하게 생존력 저하를 보였으며, chlorogenic acid 등의 항산화물질을 함유한 오가피추출물 1000  $\mu$ g/ml 농도에서도 80% 이상의 생존력을 보였다.

**피부안정성 시험**

피험자 30명에 대하여 실시한 첩포시험의 검사 결과에 근거하여 계산된 피부 반응도를 Table 5에 나타내었다. 시험결과 chlorogenic acid를 함유한 오가피추출물 1%에 대한 피부반응도는 0으로 Table 10의 피부반응도 판정기준에 의하여 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다. 세포독성과 같이 종합해 볼 때, 독성이 거의 존재하지 않는 안정한 소재임을 알 수 있다.

Table 10. Skin irritation index of *Acanthopanax sessiliflorum* S. extract

Material	Response (%)						
	48 hr +	48 hr ++	96 h +	96 h ++	48 hr	96 hr	
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> S. extract (1% in water)	-	-	-	-	0.00	0.00	0.00

## 요 약

오가피는 건강보조식품, 식품이나 화장품 등의 첨가제로 좋은 약재로 평가되고 있다. 그러나 오가피의 연구의 대부분은 가온 용매추출이나 열수추출을 통한 유효성분의 추출과 생리활성 연구에 치중되어 있다. 따라서 온도 및 추출용매를 조절하여 추출하고 Diaion HP20 분획을 통한 유효성분의 함량 및 항산화활성에 대하여 연구하였다.

오가피추출물은 열에 불안정하여 갈변현상을 보이므로 상온추출 및 냉온추출하는 것이 좋으며, 에탄올 함량별로 추출시 주 활성성분인 chlorogenic acid의 함량을 보면 100% 정제수 및 100% 에탄올의 단일 용매 추출보다 에탄올수용액을 사용하여 추출시 chlorogenic acid의 함량이 증가함을 알 수 있었다. 에탄올수용액에서의 chlorogenic acid의 함량은 유사하므로 농축시간을 고려하여 70~85% 에탄올수용액으로 추출하는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 최적화된 조건에서 추출된 오가피추출물은 Diaion HP20 column chromatography를 이용하여 10%, 20%, 40%, 60% 에탄올수용액으로 분획 후, 각 분획층의 주 활성성분 함량과 항산화효과를 확인하였다. 10% 및 20% 에탄올 수용액층은 chlorogenic acid가 주 구성성분이었으며, 40% 에탄올 수용액층은 caffeic acid 및 eleutheroside E가 주 구성성분임을 알 수 있었다. Chlorogenic acid와 caffeic acid 함량이 높은 20% 및 40% 에탄올수용액 분획층에서 우수한 DPPH와 superoxide radical에 대한 소거효과를 나타내었다. DPPH radical 소거효과에서 20% 및 40% 에탄올수용액 분획층은 각각 IC<sub>50</sub> 값이 1.748 ± 0.098 µg/ml, 11.487 ± 1.768 µg/ml을 나타내었으며, superoxide radical 소거효과에서는 131.491 ± 2.235 µg/ml, 200.681 ± 2.444 µg/ml로 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 동등하거나 dl-α-tocopherol보다 우수한 항산화효과를 보였다. 각 분획층의 항산화효과를 미루어 볼 때, 20% 및 40%의 주 구성성분을 조합하여 오가피추출물을 제조하면 더욱 우수한 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

본 기술연구소에서는 최적화된 조건에서 추출된 오가피추출물 및 Diaion HP20 분획물을 이용하여 B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성저해 효과를 연구하여 새로운 미백제를 개발 중에 있으며, 건강보조식품, 기능성 향장품소재 등으로의 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 2007년도 산업자원부 지역연구진흥사업의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Yook, C. S. (2001), Medicinal Herbes of Acanthopanax in Asia. 83, 72-77, Kyung Won Media, Seoul, Korea.
2. Lee, W. T. (1996), Lineamenta Florae Korea, 770 Academi-CO., Seoul, Koera.
3. Ministry of Health and Welfare. (2002), The Korean Phamacopoeia, 8th Ed, Medical index, Seoul, Koera.
4. Lee, W. T. (1979), Distribution of Acanthopanax plants in korea. *Kor. J. Pharmacol.* 10, 103-107.
5. Song, M. S., Y. W. Lee, and J. D. Kim (2003), Extraction of Acanthopanax Senticos us by Supercritical Fluid. *Hwahak Konghak* 41, 207-212.
6. Ahn, J. K., S. Y. Park, W. Y. Lee, and J. J. Lee. (2005), Effects of Growth Regulators on Adventitious root growth and eleutherosides and chlorogenic acid accumulation in air lift bioreactor culture of Eleutherococcus koreanum. *Korean J. Plant Biotechnol.* 32, 57-61.
7. Lee, Y. S., S. S. Lim, S. H. Jung, S. H. Lee, and K. H. Shin. (2001), Effects of the water extract from the stem bark of Acanthopanax senticosos on hyperlipidemia in rats. *J. Pharmacogn.* 32, 103-107.
8. Kim, Y. S., Y. G. Kim, M. K. Lee, J. S. Han, and H. Y. Lee. (2000), Comparison of biological activity according to extracting solvents of four acanthopanax root bark. *J. Med. Crop. Sci.* 8, 21-28.
9. Kao, K. B. (1981), Heilongjiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Chinese Ciwujiia Studies. p2, China.
10. Brekhmann II, Dardymov IV. (1969), New Substances of plant origin which increase non specific resistance. *Annu. Rev. Pharmacol.* 9, 419-430.
11. Lee, K. H., J. O. Nam, and W. H. Yoon. (2007), Effect of protein-bond polysaccharide isolated from Acanthopanax senthophanax in reducing the toxic effect of cisplatin. *Korean J. Pharmacog.* 38, 1-17.
12. Hacker, B and P. K. Medon. (1984) Cytotoxic effects of Eleutherococcus senticosus aqueous extracts in combination with N6-(delta 2-isopentenyl)-adenosine and 1-beta-D-arabinofuranoscytosine against 11210 leukemia cells. *J. Pharma. Sci.* 73, 270-282.
13. Bohn, B., C. T. Nebe, and D. Birr. (1987), Flow-cytometric studies with Eleutherococcus senticosus extract as an immunomodulatory agent. *Drug Res.* 37, 1193-1196.
14. Fujikawa, T., A. Yanaguchi, I. Morita, H. Takeda, and S. Nishibe (1996), Protective effects of Acanthopanax senticosus harms form Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1227-1230.
15. Kim, C. J. and D. R. Hahn. (1980), The biological activity of a new glycoside, chiisanoside from Acanthopanax chiisanensis nakai leaves. *Yakhak Hoeji* 24, 123-134.
16. Yook, C. S., Y. S. Rho, S. H. Shin, J. Y. Leem, and S. H. Han. (1996), Chemical compounds of Acanthopanax divaricacatus and anticancer effect in leaves. *Yakhak Hoeji* 24, 215-261.
17. Shin, W. T. and K. S. Lee. (2004), The effect of Ogapis ingestion exercise performance and SOD, MDA for 12 weeks. *Korean Sport Res.* 15, 1309-1320.
18. Yoon, J. T., I. C. Seol, S. H. Kim, and H. S. Kim. (2001), An experimental study of antiallergic activity of medicinal acupuncture solution of Acanthopanax senticosus. *J. Korean Acup. Moxi. Soc.* 18, 136-149.
19. Han, Y. S. (2002), A study on the effect of antiinflammatory plant extracts on melanogenesis. Ph. D. these. Ajou University. Suwon, Korea.
20. Szolomicki, S., I. Samochowiec, J. Wojcicki, and M. Drozdziak. (2000), The influence of active compounds of Eleutherococcus senticosus on cellular defence and physical fitness in man. *Phytotherapy Res.* 14, 30-35.
21. Hiroaka, N., J. I. Chang, R. L. Bohn, and B. A. Bohn. (2002), Furanocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild Glehnia littoralis in North America. *Biochem. System. Ecol.* 30, 120-124.
22. Hahn, D. R., R. Kasai, J. H. Kim, S. Taniyasu, and O. Tanaka. (1984), A New Glycosyl Ester of a 3, 4-Secoterpene from Korea Medical Plant Acanthopanax Chilsanensis, *Chem. Pharm. Bull.* 32(3), 1244-1247.
23. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181, 1199-1200.
24. Noro, T., O. M. Yasushi, U. Toshio, S. Akira, and S. Fukushima (1983), Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of Daphne genkwa, *Chem. Pharm. Bull.* 31, 3984-3987.
25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods* 65, 55-63.