J Korean Soc Food Sci Nutr
37(6), 677~683(2008)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2008.37.6.677

등나무 꽃 추출물의 항산화 활성

오원경[1] · 장인철[1] · 전경임[2] · 박은주[2] · 박해룡[1] · 이승철[1†]

[1]경남대학교 식품생명학과
[2]경남대학교 식품영양학과

Antioxidative Activity of Extracts from *Wisteria floribunda* Flowers

Won-Gyeong Oh[1], In-Cheol Jang[1], Gyeong-Im Jeon[2], Eunju Park[2], Hae-Ryong Park[1], and Seung-Cheol Lee[1†]

[1]Dept. of Food Science and Biotechnology, and [2]Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

The antioxidant activities of *Wisteria floribunda* flowers (WFF) were evaluated. The samples were prepared by extracting separately two different colored flowers (purple and white) with four different solvents (methanol, ethanol, acetone, and water). The antioxidant properties were evaluated by determining total phenolic contents (TPC), radical scavenging activity (RSA), and reducing power (RP). Water extract from purple WFF and ethanol extract of white WFF showed the highest total phenol contents (491 and 787 μM gallic acid equivalents), respectively. Water extracts of purple and white WFF also showed higher RSA. In the case of RP, ethanol extract of purple WFF, methanol and water extracts of white WFF showed relatively higher values. The 200 μM H_2O_2 induced oxidative DNA damage in human leukocytes was significantly inhibited with WFF extracts excluding ethanol and acetone extracts of purple flowers. These results suggest that *W. floribunda* flowers have significant antioxidative activity and protective effect against oxidative DNA damage.

Key words: *Wisteria floribunda* flower, antioxidant, DNA damage, comet assay

서 론

생체 내에서 자유라디칼 반응에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 DNA 분절과 단백질의 불활성화 및 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화 반응을 일으켜 생체기능을 저하시킴으로써 노화를 유발할 뿐만 아니라 류마티스성 관절염, 당뇨병, 심장병, 동맥경화, 암 등과 같은 여러 질환의 원인으로 잘 알려져 있다(1). 따라서 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 활성산소종을 조절할 수 있는 항산화제가 널리 사용되고 있다(2). 이러한 항산화제로는 tocopherol류, butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate, tertiarybutyl hydroxy quinone, ascorbic acid 등이 있으며, 그 중 항산화 효과가 뛰어난 BHT와 BHA는 변이원성 및 독성이 지적되면서 사용량이 격감되어 안전성과 관능상 문제가 되지 않는 식물기원의 천연 항산화제의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다(3).

근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 먹어왔던 식물로부터 항산화효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(4-6). 식물체는 다양한 형태의 항산화물질을 함유하고 있으며(4), 이들로부터 분리된 항산화물질들은 각종 프리라디칼이 관여하는 것으로 여겨지고 있는 노화 관련 질환에 예방효과(7-9)가 있을 것으로 추측되어 한층 활발한 연구가 되고 있는 실정이다(5).

등나무(*Wisteria floribunda*)는 쌍떡잎식물로서 콩과의 낙엽 덩굴식물이다. 우리나라 남부지방의 산야지 낮은 지대에 자생하고 백색 꽃이 피는 것을 흰 등이라 하며 5월에는 연한 자주색 꽃도 핀다. 야생 상태인 것도 있으나 사찰과 집 근처에서 흔히 자라며, 9월에는 부드러운 털로 덮여있는 꼬투리로 기부로 갈수록 좁아지고 겉에 털이 있는 열매가 익는다. 줄기는 식용·관상용 또는 세공재로도 쓰이고, 꽃은 양봉농가의 밀원자원에 쓰이고 있으며, 특히 여름에 그늘을 만들기 위해 흔히 심는 나무 덩굴이다. 본 실험에서는 등나무의 두 가지 색깔(흰색과 보라색)의 꽃으로부터 4가지 용매를 이용하여 추출물을 제조하고, 그 추출물의 항산화 특성을 조사하였다.

†Corresponding author. E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2684, Fax: 82-55-249-2995

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 등나무 꽃은 2007년 5월 경남 마산시 경남대학교 내에서 수집하였다. 항산화력 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu 시약은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), peroxidase, gallic acid는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Potassium ferricyanide, trichloroacetic acid(TCA), ferric chloride, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등을 비롯한 기타 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출

깨끗한 등나무 꽃 100 g에 1 L의 용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 물)를 각각 가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 4°C, 4,300×*g*에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하고 이것을 회전진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 40°C에서 농축하였다. 각 농축물은 50 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 4°C에서 보관하면서 각 농도별로 희석해서 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량

총 페놀 함량은 Gutfinger의 방법(10)을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na_2CO_3용액 1 mL를 가하고 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 첨가하여 반응시켜 30분간 상온에서 방치하였다. 이 혼합물을 10분간 13,400×*g*에서 원심분리한 후, 상징액 1 mL를 취하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg/g gallic acid equivalents(GAE) 단위로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Jeong 등의 방법(11)에 준하여 시료 0.1 mL에 4.1×10^{-5} M의 DPPH 용액 0.9 mL를 가한 후 상온에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 라디칼 소거능으로 계산하여 나타내었다.

$$\text{라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right)\times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

Muller(12)의 방법에 따라 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼 소거능을 측정하였다. 시료 0.1 mL에 0.1 M의 phosphate buffer(pH 5.0) 0.1 mL과 10 mM의 과산화수소 20 mL을 가하고 이 혼합물을 37°C에서 5분간 예비반응을 시켰다. 이 반응물에 1.25 mM의 ABTS와 peroxidase(1 unit/mL: 1 unit는 25°C, pH 5.0에서 분당 1 μmol의 ABTS를 산화시키는 양)를 0.03 mL씩 넣고 다시 37°C에서 10분간 반응을 시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의하여 ABTS 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right)\times 100$$

환원력의 측정

환원력은 Oyaizu의 방법(13)에 따라 측정하였다. 즉, 1 mL의 인산염 완충 용액(0.2 M, pH 6.6)에 1 mL의 진달래 추출물과 1%(w/v) potassium ferricyanide 용액 1 mL을 가하고 이 혼합물을 50°C에서 20분간 반응을 시킨 후, 10% (w/v) trichloroacetic acid 용액 1 mL을 넣었다. 반응이 끝난 혼합물을 13,400×*g*에서 원심분리하여 얻은 상층액 1 mL과 증류수 1 mL을 넣고 0.1% 염화철 용액 0.1 mL을 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

백혈구 산화적 DNA 손상 측정

건강한 성인 남성으로부터 채혈한 신선한 전혈을 Histopaque 1077을 이용해 백혈구만을 분리해낸 후 본 실험에 사용하였다. 분리해 놓은 백혈구에 DMSO로 희석한 각 추출물을 1, 10, 50 μg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 μM의 H_2O_2를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 등나무 꽃 시료 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 μM H_2O_2를 처리하였고, negative control인 용매(DMSO) 처리 세포에는 H_2O_2를 처리하지 않았다. 반응이 완료된 백혈구는 75 μL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 혼합 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 normal slide에 cell suspension과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 응고된 후 cover glass를 제거하고 그 위에 0.7% LMA 용액 75 μL로 중층하였다. 미리 준비해 둔 4°C의 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris)에 사용 직전 1% Triton X-100을 혼합하여 저온, 암실에서 slide를 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, slide를 전기영동 tank에 배열하고 4°C의 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA, pH>13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 빛을 차단한 상태에서 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반

복하여 slide를 건조시켰다. 20 μL/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 각 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA %함량(% Tail DNA)을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

통계처리

TPC(total phenolic contents), DPPH 라디칼 소거능 그리고 RP에 대한 데이터의 통계처리는 각 시료 당 3회 반복으로 행해졌으며, SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 평균과 표준오차, Student-Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검정하였다(14). 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 결과는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차를 구하고 각 추출물의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

일반적으로 페놀성 화합물은 식물체에서 항산화 및 방어기작 등의 중요한 역할을 하며 항산화 활성과 밀접한 관계가 있으므로(15), gallic acid를 표준용액으로 하여 작성한 검정곡선으로부터 등나무 꽃 추출물의 페놀함량을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 보라색 등나무 꽃은 물 추출물이 491 mM GAE(gallic acid equivalent)로 가장 함량이 많았고, 다음으로 에탄올(417 mM GAE), 아세톤(366 mM GAE), 메탄올(360 mM GAE) 추출물 순으로 페놀 함량이 많았다. 반면, 흰색 등나무 꽃은 에탄올 추출물이 787 mM GAE로 가장 함량이 많았고, 다음으로 물(637 mM GAE), 메탄올(405 mM GAE), 아세톤(318 mM GAE) 추출물 순으로 페놀 함량이 많았다. 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이것들의 phenolic hydroxyl이 단백질처럼 거대분자와 결합을 하여 항산화, 항균, 항암 등의 생리기능을 가지는 것으로 보고되고 있다(16). 따라서 이상의 결과로 등나무 꽃에는 항산화 작용에 깊게 관여할 수 있는 페놀성 화학물질이 다량 존재함을 확인할 수 있었다.

DPPH 라디칼 소거능

자유 라디칼은 산화에 의해 형성된 화학적 물질로서 항산화제는 이러한 자유라디칼을 소거하는 능력을 가지고 있다. DPPH는 513 nm에서 흡광도를 보이는 보라색의 화합물로 항산화 활성의 측정에 사용된다(17). 용매별 등나무 꽃 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 Table 2에 나타내었다. 모든 등나무 꽃 추출물 시료에서 추출물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 용매 중에서 물 추출물이 높은 활성을 보였는데, 1,000 μg/mL 농도에서 보라색은 58.21%, 흰색은 74.52%로 가장 높은 활성을 보였다. 식물의 꽃의 항산화활성으로써 동백나무 꽃의 메탄올 추출물이 100 μg/mL 농도에서 93.00%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며(18), 진달래꽃의 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC_{50}이 496 μg/mL인 것(19)과 비교해 보면 등나무 꽃의 경우는 다른 꽃에 비해 낮게 측정되었다.

Table 1. Total phenol contents of extracts from *Wisteria floribunda* flowers (μM GAE)

Flower color	Methanol	Ethanol	Acetone	Water
Purple	360.22 ± 28.88^{x}	417.17 ± 12.70^{y}	366.14 ± 3.44^{x}	490.52 ± 32.96^{z}
White	405.32 ± 15.78^{x}	786.68 ± 29.99^{z}	317.84 ± 2.09^{w}	636.78 ± 13.49^{y}

All values in Table are mean±standard deviation. Different letters (w-z) within a row are significantly different ($p<0.05$), n=3.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers (%)

Flower color	Conc. (μg/mL)	Methanol	Ethanol	Acetone	Water
Purple	50	-0.08 ± 0.13^{dz}	0.53 ± 0.61^{dz}	0.08 ± 1.08^{dz}	-16.65 ± 0.53^{dy}
	100	1.45 ± 0.87^{cy}	3.97 ± 0.23^{cz}	2.14 ± 0.13^{cy}	-10.92 ± 1.46^{cx}
	500	22.84 ± 0.13^{bx}	27.50 ± 1.66^{bz}	24.37 ± 0.46^{byx}	25.82 ± 1.49^{byz}
	1000	49.66 ± 0.66^{ax}	55.54 ± 1.39^{ay}	48.13 ± 1.60^{ax}	58.21 ± 0.35^{az}
White	50	13.85 ± 0.55^{dz}	13.71 ± 0.91^{dz}	11.58 ± 0.32^{dy}	13.30 ± 0.32^{dz}
	100	16.48 ± 0.52^{cy}	16.48 ± 0.91^{cy}	17.80 ± 0.12^{cyz}	18.35 ± 0.52^{cz}
	500	38.71 ± 0.72^{by}	36.57 ± 1.57^{bx}	25.35 ± 0.32^{bw}	55.96 ± 0.24^{bz}
	1000	59.70 ± 0.72^{ay}	56.58 ± 1.45^{ax}	38.85 ± 0.12^{aw}	74.52 ± 0.43^{az}

All values in Table are mean±standard deviation. Different letters within a column (a-d) and a row (w-z) are significantly different ($p<0.05$), n=3.

Table 3. Hydrogen peroxide scavenging activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers (%)

Flower color	Conc. (μg/mL)	Methanol	Ethanol	Acetone	Water
Purple	50	1.83 ± 1.10^{cyz}	-3.54 ± 2.38^{cy}	-14.60 ± 6.62^{cx}	6.92 ± 3.60^{dz}
	100	3.13 ± 0.83^{cy}	-2.09 ± 2.10^{cxy}	-7.50 ± 5.75^{cx}	21.27 ± 6.16^{cz}
	500	11.02 ± 4.85^{by}	10.82 ± 2.23^{by}	9.32 ± 7.66^{by}	40.20 ± 2.98^{bz}
	1000	23.70 ± 0.97^{ax}	18.97 ± 5.91^{ax}	33.68 ± 1.28^{ay}	64.50 ± 4.09^{az}
White	50	-4.36 ± 2.59^{bx}	10.13 ± 3.48^{by}	41.70 ± 7.68^{az}	13.33 ± 4.46^{by}
	100	-5.68 ± 12.54^{by}	4.05 ± 2.68^{byz}	25.97 ± 9.92^{abz}	23.71 ± 9.79^{bz}
	500	9.90 ± 4.57^{by}	21.92 ± 5.95^{ay}	21.47 ± 5.74^{by}	62.09 ± 4.45^{az}
	1000	28.65 ± 5.75^{ay}	27.78 ± 3.13^{ay}	27.86 ± 1.92^{aby}	73.07 ± 1.77^{az}

All values in Table are mean±standard deviation. Different letters within a column (a-d) and a row (w-z) are significantly different ($p<0.05$), n=3.

Table 4. Reducing power of extracts from *Wisteria floribunda* flowers (O.D)

Flower color	Conc. (μg/mL)	Methanol	Ethanol	Acetone	Water
Purple	50	0.122 ± 0.004^{dy}	0.135 ± 0.001^{dz}	0.115 ± 0.002^{dy}	0.118 ± 0.007^{dy}
	100	0.146 ± 0.003^{cx}	0.171 ± 0.003^{cz}	0.135 ± 0.004^{cw}	0.161 ± 0.003^{cy}
	500	0.392 ± 0.004^{by}	0.504 ± 0.003^{bz}	0.290 ± 0.001^{bw}	0.355 ± 0.004^{bx}
	1000	0.564 ± 0.019^{ay}	0.693 ± 0.007^{az}	0.474 ± 0.001^{aw}	0.534 ± 0.011^{ax}
White	50	0.119 ± 0.004^{dyz}	0.107 ± 0.005^{dy}	0.113 ± 0.005^{dy}	0.129 ± 0.009^{dz}
	100	0.157 ± 0.004^{cz}	0.139 ± 0.008^{cy}	0.154 ± 0.005^{cz}	0.165 ± 0.007^{cz}
	500	0.408 ± 0.019^{bz}	0.351 ± 0.002^{by}	0.315 ± 0.009^{bx}	0.405 ± 0.007^{bz}
	1000	0.638 ± 0.012^{az}	0.575 ± 0.009^{ay}	0.386 ± 0.015^{ax}	0.629 ± 0.004^{az}

All values in Table are mean±standard deviation. Different letters within a column (a-d) and a row (w-z) are significantly different ($p<0.05$), n=3.

ABTS 라디칼 소거능

용매별 등나무 꽃 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 Table 3에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능은 보라색에서 모든 추출물의 농도가 높을수록 ABTS 라디칼 소거 활성이 증가하였으며, 특히 물 추출물은 1,000 μg/mL에서 64.50%로 활성이 가장 높았다. 또한, 흰색 꽃의 경우에서도 물 추출물이 1,000 μg/mL 농도에서 73.07%의 가장 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다. ABTS는 DPPH와 같은 라디칼이지만 DPPH는 자유 라디칼이며 ABTS는 양이온 라디칼이라는 점에서 차이가 나며 항산화물질에 따라 두 라디칼에 결합하여 제거하는 능력이 차이가 난다(20).

환원력 측정

환원력은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(21). 그러므로 환원력은 항산화 활성에 대한 중요한 인자로 작용한다(22). 용매별 등나무 꽃 추출물의 환원력을 Table 4에 나타내었다. 본 연구의 4가지 용매 추출물은 농도가 증가할수록 환원력이 증가하였다. 보라색은 에탄올 추출물이 1,000 μg/mL에서 0.693으로 가장 높은 환원력이 보였고, 흰색은 1,000 μg/mL에서 메탄올 추출물이 0.638로 가장 높은 환원력을 보였다. 진달래꽃의 에탄올 추출물과 메탄올 추출물의 경우에는 각각 449 μg/mL과 469 μg/mL에서 0.500의 환원력을 나타내었으며(19), 상대적으로 등나무 꽃보다 우수한 환원력을 보였다.

이상의 결과에서 총 페놀 함량과 각 항산화력 분석 결과는 정확하게 일치하지는 않는다. 이는 페놀 화합물만이 항산화력을 담당한다고는 보기 어렵고(23), 실제로 항산화물질은 연쇄 반응 개시, 전이금속이온 결합, 과산화물의 분해, 라디칼 소거 등의 여러 단계에서 각각 작용하기 때문이라 여겨진다(24). 한편, 등나무에서는 세포막 복합당질의 당사슬과 결합하여 세포응집, 분열유발, 기능 활성화 등의 효과를 가지는 lectin 단백질이 발견되어 보고된 바 있으며(25,26), 단백질 가수분해효소 저해물질인 cystatin이 보고된 바 있으나(27) 이들 물질과 항산화작용과의 관계는 보고된 바 없다.

산화적 DNA 손상에 미치는 영향

Comet assay를 이용한 등나무 꽃 추출물의 과산화수소에 의한 산화적 DNA 손상 억제 효과 실험의 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 각 추출물을 1, 10, 50 μg/mL의 농도로 백혈구에 처리한 후 H_2O_2 200 μM의 농도로 처리하여 DNA 손상을 유도한 결과 손상된 DNA tail 부분의 DNA 함량을 측정한 tail intensity가 보라색 꽃의 경우 에탄올 50 μg/mL 처리구와 모든 농도의 아세톤 추출물 처리구를 제외하고는 H_2O_2 처리 양성 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 1). 반면, 흰색 꽃의 경우 모든 추출물에서 40~80% 정도의 높은 저해율을 보였다(Fig. 2). 이상의 결과에서 등나무 꽃 추출물은 산화적 스트레스 유발물질인 과산화수소에 의해 유도되는 DNA 손상을 효과적으로 억제시키고 있음을 알 수 있었고 DNA 손상 억제효과는 보라색 꽃보다는 흰색 꽃이 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 등나무 꽃 추출물의 DNA

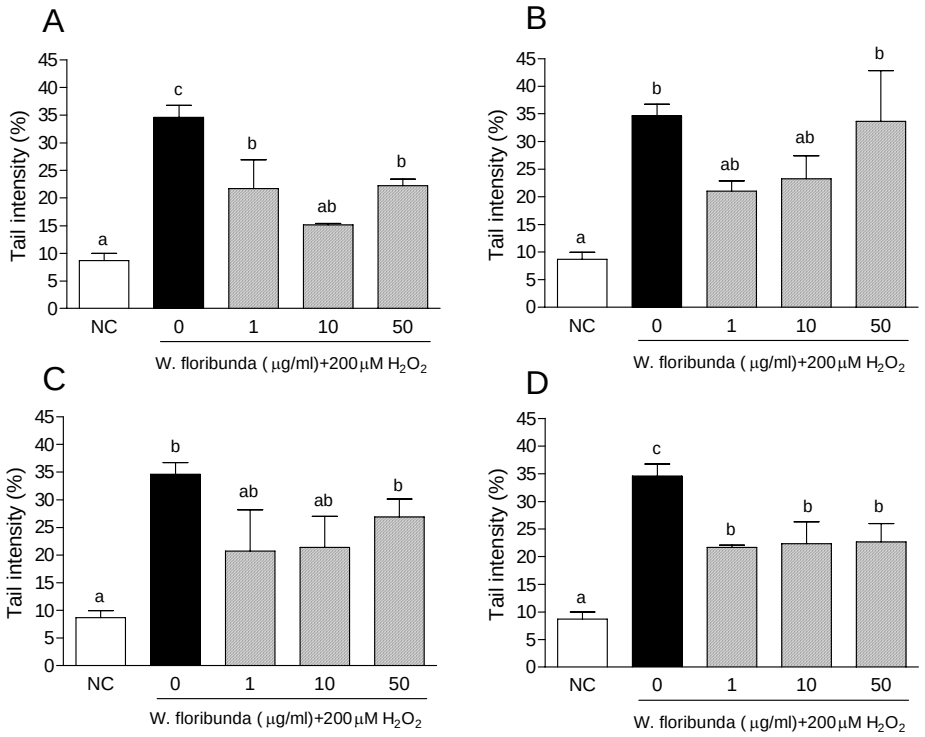

Fig. 1. Effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of *W. floribunda* (purple) on H_2O_2-induced DNA damage in human leukocyte. Values are mean with standard error of triplicate experiments. A, methanol; B, ethanol; C, acetone; D, water extracts; NC, DMSO-treated normal control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

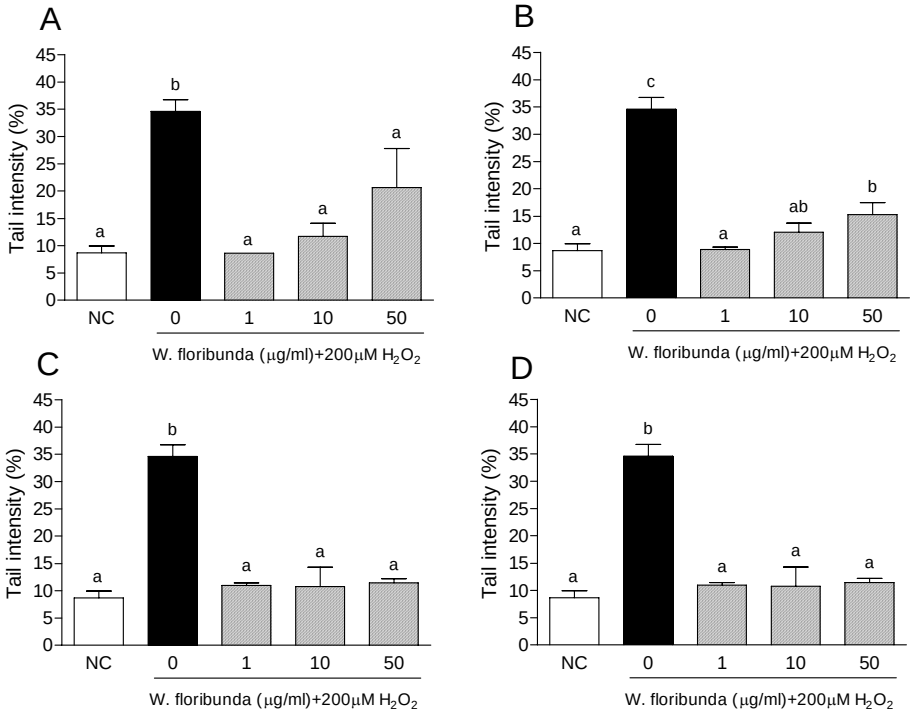

Fig. 2. Effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of *W. floribunda* (white) on H_2O_2-induced DNA damage in human leukocyte. Values are mean with standard error of triplicate experiments. A, methanol; B, ethanol; C, acetone; D, water extracts; NC, DMSO-treated normal control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

손상억제 효과는 앞의 실험에서 밝혀진 등나무 꽃에 함유된 페놀을 비롯한 항산화 성분에 의한 것으로 사료된다. 향후 등나무 꽃에 함유된 페놀 성분의 분리·동정 연구가 수행되어야 하겠지만, 일반적으로 식물의 꽃에는 flavonoids나 anthocyanins 등의 항산화 활성을 가진 폴리페놀이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(28). 등나무 꽃에 함유된 페놀 화합물은 수소공여자로서 작용하여 hydrogen peroxide에 의해 생성된 hydroxyl radical을 소거함으로 항산화 작용을 하는 것으로 사료된다(29). Labieniec과 Gabryelak은 tannic, ellagic, 그리고 gallic acid 등의 폴리페놀 화합물이 산화적 DNA 손상을 억제하는 효과가 있음을 comet assay 방법으로 입증한 바 있다(30).

요 약

등나무 꽃 50 g에 1 L의 네 가지 용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 물)를 각각 가하여 추출한 다음, 농축하여 각각의 용매별 추출물을 얻었다. 이 용매별 추출물을 이용하여 등나무 꽃의 항산화 활성을 조사하였다. 그 결과, 총 페놀 함량에서 보라색은 물 추출물이 491 μM GAE로 가장 높았고, 흰색은 에탄올 추출물이 787 mM GAE로 가장 높았다. 보라색 등나무 꽃의 DPPH 라디칼 소거능은 1,000 μg/mL 농도에서 물 추출물이 58.21%로 가장 높은 값을 가지는 것으로 나타났으며, 흰색 꽃도 물 추출물에서 74.52%로 가장 높은 값을 가졌다. ABTS 라디칼 소거능의 경우에도 1,000 μg/mL 농도에서 보라색 꽃과 흰 꽃의 물 추출물이 각각 64.50%와 73.07%로 가장 높은 활성을 보였다. 환원력은 보라색 꽃의 에탄올 추출물, 흰 꽃의 메탄올과 물 추출물이 비교적 높게 측정되었다. 한편, 등나무 꽃 추출물의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상억제효과를 평가하기 위해 1, 10, 50 μg/mL의 농도로 백혈구에 처리한 후 H_2O_2(200 μM)로 DNA 손상을 유도한 결과, 보라색 꽃의 에탄올 50 μg/mL 처리구와 모든 농도의 아세톤 추출물 처리구를 제외하고는 H_2O_2 처리 양성 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다. 흰색 꽃의 경우 모든 추출물에서 40~80% 정도의 높은 저해율을 보였다. 따라서 등나무 꽃 추출물이 천연 항산화제로서의 잠재적 가능성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2007학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
2. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Ineract* 160: 1-40.
3. Branen AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
4. Larson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
5. Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korean J Food Sci Technol* 24: 142-148.
6. Wang H, Cao G, Prior R. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705.
7. Shin MK. 1994. The science of green tee. *Korean J Dietary Culture* 9: 433-445.
8. Liu CX, Xiao PG. 1992. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol* 36: 27-38.
9. An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Choi GH, Park TS. 2005. Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 280-284.
10. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
11. Jeong SM, Kim SY, Park HR, Lee SC. 2004. Effect of far-infrared radiation on the activity of extracts from *Citrus unshiu* peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1580-1583.
12. Muller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobio Hyg* 259: 151-158.
13. Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
14. SAS. 1995. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, NC, USA.
15. Choi HJ, Park JH, Han HS, Son JH, Son GM, Bae JH, Choi C. 2004. Effect of polyphenol compound from Korean pear on lipid metabolism. *Kor J Food Sci Technol* 33: 299-304.
16. Park CS. 2005. Component and quality characteristics of powdered green tea cultivated in Hwagae area. *Kor J Food Preserv* 12: 36-42.
17. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. *Nature* 181: 1199-2000.
18. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 93-100.
19. Lee BB, Chun JH, Lee SH, Park HR, Kim JM, Park E, Lee SC. 2007. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from *Rhododendron mucromulatum* Turcz. flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1628-1632.
20. Wang MF, Shao Y, Yi JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoie EJ, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salivia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
21. Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 43: 1813-1819.
22. Shiddhuraju P, Mohan PS, Becker K. 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian laburnum (*Cassia fistula* L): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem* 79: 61-67.
23. Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assess-

ment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic Res* 36: 177-187.
24. Diplock AT. 1997. Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radic Res* 27: 511-532.
25. Härtig W, Brauer K, Brückner G. 1992. *Wisteria floribunda* agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3: 869-872.
26. Torres BV, McCrumb DK, Smith DF. 1988. Glycolipid-lectin interactions: reactivity of lectins from *Helix pomatia*, *Wisteria floribunda*, and *Dolichos biflorus* with glycolipids containing N-acetylgalactosamine. *Arch Biochem Biophys*r 262: 1-11.
27. Hirashiki I, Ogata F, Yoshida N, Makisumi S, Ito A. 1990. Purification and complex formation analysis of a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. *J Biochem* 108: 604-608.
28. Croft KD. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854: 435-442.
29. Tsai CH, Stern A, Chiou JF, Chern CL, Liu TZ. 2001. Rapid and specific detection of hydroxyl radical using an ultra-weak chemiluminescence analyzer and a low-level chemiluminescence emitter: application to hydroxyl radical-scavenging ability of aqueous extracts of food constituents. *J Agric Food Chem* 49: 3137-3141.
30. Labieniec M, Gabryelak T. 2005. Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicol Lett* 155: 15-25.

(2008년 4월 18일 접수; 2008년 5월 28일 채택)