

## 하슬 및 관동화 에탄올 추출물의 항산화 및 항용혈 효과

강현주<sup>1#</sup>, 김홍준<sup>2</sup>, 정승일<sup>3</sup>, 김현수<sup>4</sup>, 전인화<sup>4</sup>, 목지예<sup>4</sup>, 심재석<sup>1</sup>, 장선일<sup>4\*</sup>

1: 임실생약조합, 2: 우석대학교 한의과대학 방제학교실, 3: 전주생물소재연구소, 4: 전주대학교 보건관리학과

### Antioxidant and Antihemolytic Activities of Ethanol Extracts of Carpesii Fructus and Farfarae Flos

Hyun Ju Kang<sup>1#</sup>, Hong-Jun Kim<sup>2</sup>, Seung-Il Jeong<sup>3</sup>, Hyeon Soo Kim<sup>4</sup>, In Hwa Jeon<sup>4</sup>,  
Ji Ye Mok<sup>4</sup>, Jae-Suk Shim<sup>1</sup>, Seon Il Jang<sup>4\*</sup>

1 : Imsil Herbal Medicine Association, 2 : Department of Oriental Medical Prescription, Woosuk University,  
3 : Jeonju Biomaterials Institute, 4 : Department of Healthcare & Science, Jeonju University

#### ABSTRACT

**Objectives** : To develop a natural antioxidant and anti-hemolytic agents, we investigated the effects of ethanol extracts of Carpesii Fructus and Farfarae Flos.

**Methods** : Aerial parts of Carpesii Fructus and Farfarae Flos were extracted with 80% ethanol. Antioxidant activity of Carpesii Fructus or Farfarae Flos extract was evaluated by employing three different assays, i.e., 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium (ABTS) scavenging and reducing power activities. Also, anti-hemolytic activity of Carpesii Fructus or Farfarae Flos extract was determined using [2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)]-induced hemolysis, glutathione (GSH) depletion and malondialdehyde (MDA) formation in normal rat red blood cells (RBC) or plasma.

**Results** : The extracts obtained from Carpesii Fructus and Farfarae Flos dose-dependently increased the scavenging activity on DPPH- or ABTS-induced radicals and the reducing power activities. Carpesii Fructus and Farfarae Flos were similar to the scavenging activity and the reducing power of butylated hydroxy anisole effect at high concentration (1,000 µg/mL). RBC oxidative hemolysis and plasma MDA formation induced by AAPH were significantly suppressed by the extracts of Carpesii Fructus and Farfarae Flos in a dose-dependent manner. Also, Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts prevented the depletion of cytosolic antioxidant GSH in RBCs. Carpesii Fructus generally had better than the free radical scavenging activity, the reducing power and anti-hemolytic effects of Farfarae Flos.

**Conclusions** : These results suggest that Carpesii Fructus and Farfarae Flos may have value as the potential antioxidant and anti-hemolytic medicinal plant.

**Key words** : Carpesii Fructus, Farfarae Flos, antioxidant, red blood cells, anti-hemolytic effect

#### 서론

최근 인간의 수명이 연장되면서 노화 및 혈행과 관련된 만성질환이 급증하고 있는데, 이러한 원인은 생체의 대사과정에서 발생

되는 하이드록시 라디칼 ( $\cdot$ OH), 슈퍼옥사이드 라디칼 ( $\cdot$ O<sub>2</sub>-), 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등과 같은 활성 산소류 (reactive oxygen species, ROS)에 의한다고 알려졌다<sup>1,2)</sup>. 활성 산소는 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등에 대하여 비선택적,

\*교신저자 : 장선일, 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200, 전주대학교 대체의학대학  
· Tel : 063-220-3124 · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr  
#제1저자 : 강현주, 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200, 전주대학교 대체의학대학  
· Tel : 063-220-3124 · E-mail : dkgk0608@naver.com  
· 접수 : 2013년 4월 11일 · 수정 : 2013년 5월 6일 · 채택 : 2013년 5월 7일

비가역적인 파괴 작용<sup>3,4)</sup>을 함으로써 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병 및 노화의 주원인이 된다고 알려져 있다<sup>2,5)</sup>. ROS는 베타지중해빈혈 ( $\beta$ -thalassemia), 겸상 적혈구 빈혈증 (sickle cell anemia), glucose-6-phosphate dehydrogenase 결핍 및 이상 혈액색증 (hemoglobinopathy)을 가진 환자에서 적혈구에 치명적인 손상을 야기한다<sup>6-9)</sup>. 적혈구는 세포막에 불포화 지방산이 다량 포함되어 있고, 세포질에 높은 농도의 산소와 헤모글로빈이 함유되어 있어 매우 민감하게 산화적 손상을 받게 된다<sup>9,10)</sup>. 산화적 스트레스의 결과물 중 하나인 지질 과산화 (lipid peroxidation)는 세포손상과 사멸에 대한 일반적인 기전으로 알려져 있는데, 지질 과산화의 최종산물인 malondialdehyde (MDA)가 적혈구에 일시에 노출될 경우 세포 구성물과 반응성이 높아 적혈구에 치명적 손상을 주게 된다<sup>10)</sup>.

이와 같이 대사과정에서 생성된 유해 활성 산소는 생체에서 스스로 제거할 수 있는 물질을 보유하는데, 이른바 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소와 glutathione, 비타민 E 등과 같은 항산화 물질이 존재하여 산화적 스트레스로부터 우리 몸을 보호한다. 그러나 염증과 관련된 인체질환의 경우 활성 산소류가 대량 생산되기 때문에 생체에 존재하는 항산화 물질이 고갈될 수 있어 외부로부터 항산화제를 섭취할 필요가 있다<sup>1,2)</sup>.

국화과 (Compositae)는 현화식물 중 세계에서 가장 넓게 분포하고 쌍자엽 식물 중에서 가장 진화된 식물분류군이며, 전통적으로 약용식물로 사용되어 왔고, 우리나라에는 약 300여종이 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. 학슬 (Carpesii Fructus)과 관동화 (Farfarae Flos)는 국화과에 속하는 식물인데, 학슬은 한방에서 타박상과 살충제로 사용되어 왔고 최근에는 항암 작용에 대한 보고가 있으며<sup>12)</sup>, 관동화는 혈소판 응집억제<sup>13)</sup>, 항염증<sup>14)</sup> 및 항산화<sup>15)</sup> 등의 약리작용이 보고되었다. 그러나 학슬과 관동화에 대한 항염증 효과에 대한 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 학슬과 관동화의 지상부위를 대상으로 에탄올로 추출물을 얻고, DPPH와 ABTS에 의해 유도된 라디칼 소거활성 및 reducing power 등 항산화 활성을 조사하였고, 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)로 유도된 적혈구 용혈에 대한 보호 효과를 조사하여 혈행 개선제 개발의 기초자료를 얻기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), iron (II) chloride ( $FeCl_2$ ), potassium ferricyanide, potassium persulphate, heparin, trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), drabkin's reagent, meta-phosphoric acid, ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA), sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic ( $Na_2HPO_4$ ) 및 기타 시

약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich사 (MO, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 에탄올 추출

실험에 사용한 학슬 (Carpesii Fructus, *Carpesium abrotanoides* L.)과 관동화 (Farfarae Flos, *Tussilago farfara* L.)는 광명당 (울산, 대한민국)에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 학슬 및 관동화는 지상부위로 잘 건조된 각각의 시료를 세절하여 시료 당 200 g을 정량한 후 에탄올 (2,000 mL)에 7일간 방치하여 추출하였다. 7일간 방치한 후 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심침전 시키고 상층액만 취하여 0.45 $\mu$ m 필터를 사용하여 여과한 후 회전진공농축기 (Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조기 (Model, EYELA FDU-2100, Japan)를 사용하여 건조시켰다. 각 추출물의 최종 건조량은 18.5-21.3 g으로 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois의 방법<sup>16)</sup>으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 62.5-1,000  $\mu$ g/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100  $\mu$ L를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100  $\mu$ L를 넣어 총량이 200  $\mu$ L가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성 (\%)} = \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

### 2) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등<sup>17)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 혼합한 다음 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가  $0.70 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  SD)이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 추출물 (1 mg/mL) 50 $\mu$ L에 준비된 ABTS 용액 950  $\mu$ L를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거 활성 (\%)} = \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

### 3) Reducing power 측정

Reducing power는 Oyaizu의 방법<sup>18)</sup>을 변형하여 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 62.5-1,000  $\mu$ g/mL이 되도록 정량하여 0.2M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 500  $\mu$ L, 1% potassium ferricyanide 500  $\mu$ L를 각각 혼합하여 50 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 650 rpm에서 10분간

원심분리하여 상층액 500  $\mu$ L에 증류수 500  $\mu$ L, 1% ferricchloride 100  $\mu$ L를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

4) 적혈구 부유액의 제조

건강한 수컷 Sprague Dawley 랫트는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 전주대학교 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험에 사용하였다. 랫트는 에테르로 마취시켜 간문맥으로부터 헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 채혈하였다. 혈액 (blood)은 10분간 1,500 $\times$ g로 원심분리한 후 인산완충액 (phosphate buffered saline, pH 7.2)으로 3회 세척하고 인산완충액에 hematocrit가 5% 유지되도록 다시 부유하였다. 적혈구 부유액은 여러 가지 농도 (12.5-100  $\mu$ g/mL)의 각 추출물을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 전 처리한 후 적혈구의 자유유리기 사슬 산화를 유도하기 위해서 AAPH (최종 농도; 50 mM)를 주입하고 0-6시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 대조군은 인산완충액으로 적정된 적혈구 부유액을 온도와 시간을 같은 조건으로 방치하고 실험하였다.

5) 적혈구 용혈측정

대조군과 각 실험군의 반응액은 2분간 3,000 $\times$ g로 원심하여 상층액을 얻은 후 Hseu 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 적혈구 용혈에 대한 참고 값 (100% 용혈)은 AAPH (50 mM)의 흡광도를 기준으로 하여 정하였다.

6) 혈장의 지질 과산화 측정

헤파린이 처리된 랫트 혈액을 1,500 $\times$ g 10분간 원심분리하여 혈장 (plasma)을 얻었고, 혈장의 지질과산화의 지표물질로 알려진 TBARS (주로 MDA)는 Hseu 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 간단히 요약하면, 반응액 1mL에 250  $\mu$ L TBA (0.67%)와 100  $\mu$ L H3PO4 (0.44 M)를 첨가하여 1시간 동안 95 $^{\circ}$ C에 방치한 다음 150  $\mu$ L TCA (20%)를 주입하였다. 원심 분리 (12,000 $\times$ g, 10분) 후 상층액의 지질 과산화물의 양은 MDA의 몰 흡광계수 (OD535)를 이용하여 결정하였다.

7) 적혈구의 glutathione 측정

제시된 시간에서 2 mL의 반응액을 원심침전시킨 후 적혈구를 용해하기 위해서 0.6 mL 증류수를 가했다. 세포용해물의 glutathione (GSH)은 Hseu 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 DTNB로 적정하여 412 nm에서 측정하였다.

5) 통계처리

모든 실험값은 평균 $\pm$ 표준오차 (mean  $\pm$  SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student' s t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성에 미치는 학슬과 관동화 추출물의 영향

본 연구는 학슬과 관동화 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH 와 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 학슬과 관동화의 DPPH 라디칼 소거 활성 RC50은 각각 312.3  $\mu$ g/mL와 715.5  $\mu$ g/mL로 나타나 합성 항산화제로 알려진 BHT (180.5  $\mu$ g/mL)보다 낮았지만, 각 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가 되었다. 특히 학슬은 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거 활성이 약 73%로 BHT의 활성과 유사하였다 (Fig. 1A). 또한 학슬과 관동화의 ABTS 라디칼 소거 활성 RC50은 각각 185.3  $\mu$ g/mL와 390.5  $\mu$ g/mL로 나타나 합성 항산화제로 알려진 BHT (63.2  $\mu$ g/mL)보다 낮았지만, 각 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거 활성이 증가 되었다 (Fig. 1B). 특히 학슬은 500  $\mu$ g/mL 농도에서 ABTS 라디칼 활성이 약 80%로 나타나 BHT (90%)와 유사하였다. 더불어 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서는 학슬 및 관동화의 ABTS 라디칼 소거 활성은 약 93-97%로 증가되어 BHT와 같았다.

2. Reducing power에 미치는 학슬과 관동화 추출물의 영향

다음은 학슬 및 관동화 추출물의 reducing power를 알아 보았다. 그 결과 Fig. 2와 같이 학슬과 관동화의 reducing power는 농도에 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2). 관동화의 reducing power는 모든 농도에서 BHT보다 낮았다. 그러나 학슬은 500  $\mu$ g/mL 농도에서는 BHT와 유사하였고, 1,000 $\mu$ g/mL 농도에서는 BHT 보다 그 활성이 높았다.

3. 항용혈 작용에 미치는 학슬과 관동화 추출물의 영향

먼저 AAPH가 적혈구 용혈을 최대로 유발할 수 있는 시간을 정하기 위하여 2시간 간격으로 6시간까지 처리하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 정상 대조군의 적혈구는 6시간 까지 변화가 없었지만, AAPH를 처리한 적혈구는 시간에 의존적으로 용혈률이 높아졌으며, 4시간에는 약 80%가 용혈되었고, 6시간에는 100% 용혈되었다. 학슬과 관동화 추출물 처리에 의한 적혈구 용혈 억제 효과를 알아보기 위하여 4시간에 용혈률을 알아보았다. 그 결과 Fig. 4와 같이 학슬과 관동화 추출물의 농도에 의존적으로 용혈률이 낮았다. 학슬은 50  $\mu$ g/mL와 100  $\mu$ g/mL 처리군은 AAPH 처리군에 비해 각각 90%와 95% 용혈이 억제되어 비타민 C 처리군과 유사하였고, 관동화 보다 모든 농도에서 항용혈 효과가 우수하였다.

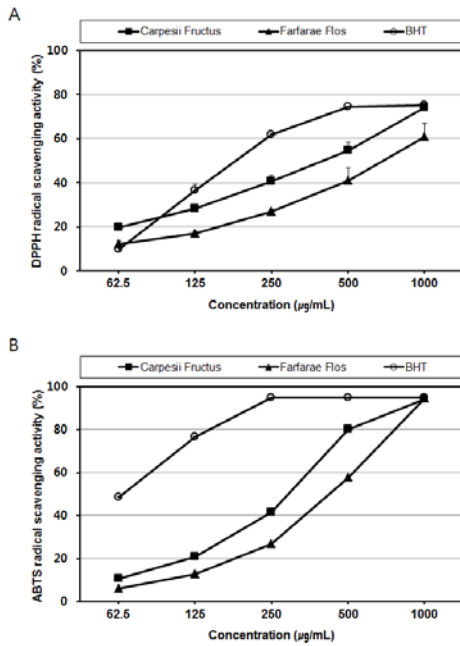


Fig. 1. Effects of Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts on DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity. Values are shown as mean ± SD of 3 replicates.

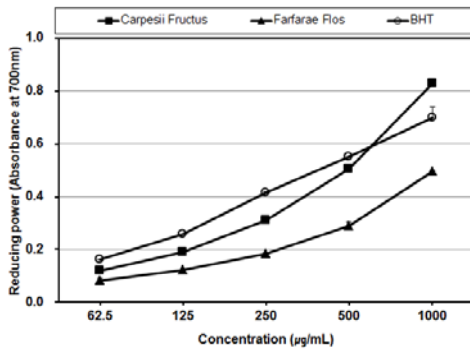


Fig. 2. Effects of Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts on reducing power. Values are shown as mean ± SD of 3 replicates.

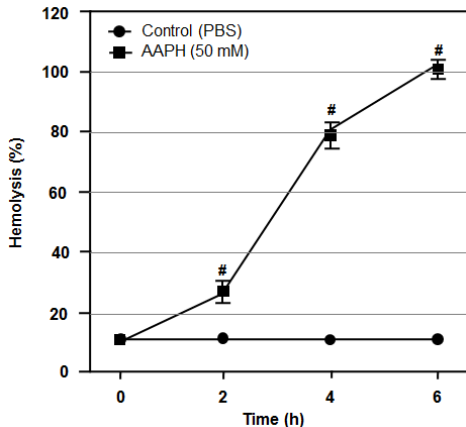


Fig. 3. Kinetic of AAPH-induced hemolysis in rat red blood cells (RBC). RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 6 h at 37. Values are means ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group.

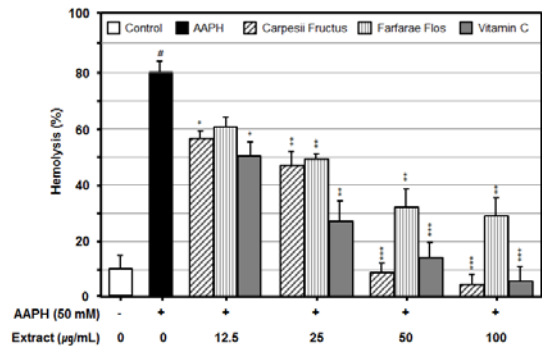


Fig. 4. Effects of Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts and Vitamin C (Vit. C) on AAPH-induced hemolysis in RBC. RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS (control), or preincubated with the different concentration (25–100 µg/mL) of Carpesii Fructus, Farfarae Flos or Vitamin C for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37°C. Values are means ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus AAPH-treated group.

#### 4. APPH 유도 지질 과산화 (MDA)에 대한 학슬과 관동화 추출물의 영향

마지막으로 본 연구는 혈장의 APPH 유도 지질산화 (MDA)에 대한 학슬과 관동화 추출물의 억제 효과를 알아보기 위하여 비타민 C와 비교 조사하였다. 그 결과 Fig. 5과 같이 AAPH를 2시간 처리하였을 때 1 L 당 혈장의 MDA가  $35.6 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 로 높게 형성된 반면, 학슬 추출물과 비타민 C를 처리한 실험군은 농도에 의존적으로 MDA 생성이 현저히 억제되었다. 흥미롭게도 GSH 생성에 우수한 관동화 추출물은 모든 농도에서 유의하게 MDA 생성이 억제되었지만 ( $p < 0.05$ – $p < 0.001$ ), 농도별로 큰 차이는 없었다. 그러나 학슬의 경우 비타민 C 보다 MDA 생성 억제가 약간 낮았지만, 관동화 보다 우수하였다.

#### 5. AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량에 미치는 학슬과 관동화 추출물의 영향

한편 학슬 및 관동화 추출물이 AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 비타민 C와 비교 조사하였다. AAPH를 4시간 처리하였을 때 1 L 당 적혈구의 GSH는  $19.1 \pm 6.9 \mu\text{M}$ 로 나타나 정상 대조군 ( $96.2 \pm 10.3 \mu\text{M}$ )에 비해 약 80%가 감소된 반면, 학슬과 관동화 추출물 또는 비타민 C를 처리한 실험군은 농도에 의존적으로 AAPH에 의해 고갈된 GSH 함량이 현저히 증가되었다 (Fig. 6). 학슬과 관동화 추출물은 25 µg/mL 처리군에서 비타민 C 보다 GSH 함량이 낮았지만, 12.5 µg/mL과 50 µg/mL 처리군에서 비타민 C와 유사하게 GSH 함량이 증가되었다. 학슬 추출물은 50 µg/mL과 100 µg/mL 처리군에서 정상대조군의 GSH 함량과 유사하였다. 그러나 관동화 추출물은 50 µg/mL 처리군에서 정상대조군과 유사하였지만 100 µg/mL 처리군에서는  $132.8 \pm 7.2 \mu\text{M}$ 로 비타민 C ( $135.5 \pm 4.8 \mu\text{M}$ )와 유사하였고, 정상대조군 보다 약 38%가 증가되었으며 학슬보다 우수한 GSH 생성 효과가 있었다.

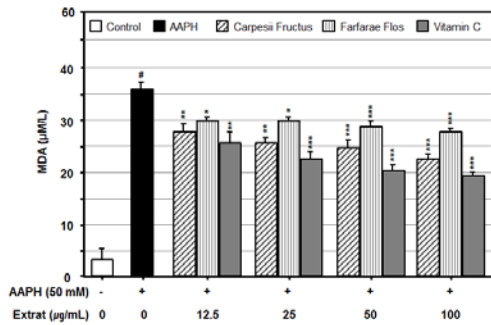


Fig. 5. Effects of Effects of Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts and Vit. C on AAPH-induced MDA in plasma. Plasma (1:50 v/v in PBS) was incubated with PBS (control), or preincubated with the different concentration (25–100 µg/mL) of Carpesii Fructus, Farfarae Flos or Vitamin C for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 2 h at 37°C. Values are means ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus AAPH-treated group.

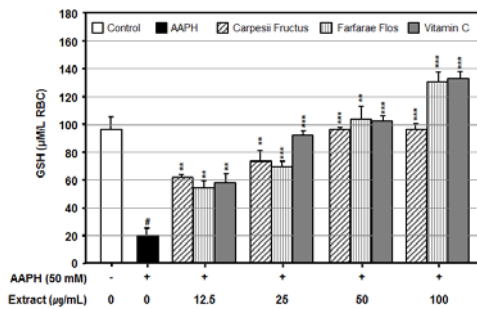


Fig. 6. Effects of Carpesii Fructus and Farfarae Flos extracts and Vit. C on AAPH-induced glutathione (GSH) in RBC. RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS (control), or preincubated with the different concentration (25–100 µg/mL) of Carpesii Fructus, Farfarae Flos or Vitamin C for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37°C. Values are means ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus AAPH-treated group.

## 고찰

생체에서 산화적 스트레스는 산화촉진제 (prooxidant)와 항산화제 (antioxidant)의 불균형을 유발하여 각종 질환을 일으키는 것으로 알려졌다<sup>1)</sup>. 특히 노화 또는 심혈관계 만성질환을 앓고 있는 환자의 경우 대량의 활성 산소가 생산되어 세포나 조직에 치명적 손상을 주게 된다<sup>20,21)</sup>. 그러므로 만성 및 염증성 질환을 예방하거나 치료하기 위해서는 생체에 존재하는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소의 활성유지는 물론 비타민 C와 E, 셀레늄을 비롯한 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 외부 천연물질을 적당하게 섭취하는 것이 매우 중요하다<sup>1,2)</sup>. 그러므로 본 연구는 국화과에 속하는 학술과 관동화의 항산화 효과를 알아본 결과 DPPH와 ABTS 라디칼의 소거 활성은 이들 추출물의 농도에 의존적으로 높았으며, 고 농도 (1,000 µg/mL) 처리군에서는 합성항산화제로 알려진 BHT와 유사하였고, 모든 농도에서 학술이 관동화 보다 항산화 효과가 우수함을 알 수 있었다. 또한 reducing power는 학술과 관동화 추출물의 농도에 의존

적으로 증가하였다. 모든 농도에서 학술은 관동화보다 reducing power가 우수하였고, 500 µg/mL 이하의 농도에서는 비타민 C 보다 낮았지만 1,000 µg/mL 처리군에서는 비타민 C 보다 우수하였다.

적혈구는 세포막에 다량의 불포화 지방산이 함유되어 있고, 세포질에 높은 농도의 산소와 헤모글로빈이 함유되어 있어 매우 민감하게 산화적 손상을 받게 된다<sup>7-10)</sup>. 특히 지질 과산화 (lipid peroxidation)는 세포손상과 세포사멸을 유도하는 것으로 알려졌는데, 지질 과산화의 최종산물인 MDA가 적혈구에 일시에 노출될 경우 세포 구성물과 반응성이 높아 적혈구에 치명적 손상을 주게 된다. 또한 적혈구의 지질산화적 스트레스는 적혈구 막을 변형시켜 적혈구의 모양이나 미세순환 환경을 변화시켜 적혈구의 기능을 저하시키기 때문에 혈색소증과 각종 빈혈을 야기한다<sup>22-23)</sup>. 따라서 본 연구는 수용성 자유유리기 유도생성물질로 잘 알려진 AAPH<sup>19)</sup>를 사용하여 적혈구의 용혈, 혈장의 지질 과산화물질인 MDA와 적혈구의 GSH 고갈을 유도하였다. 그 결과 항산화 효과가 우수한 학술은 모든 농도에서 관동화보다 항용혈 효과가 우수하였으며, 50 µg/mL 이상 처리군에서는 AAPH 처리군에 비해 90% 이상 용혈이 억제되어 비타민 C 처리군과 유사한 효능을 보였다. 또한 혈장의 지질 과산화 생성억제에 대한 학술의 효과는 비타민 C 보다 모든 농도에서 낮았지만 관동화보다 우수하였다.

한편, GSH는 모든 생체 내에 존재하는 결정성 폴리펩티드로 생체 내의 산화환원기능에 관여하는데, 카텝신, 파파인, 숙신산탈수소효소와 같은 SH효소의 SH기를 보호하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 메틸글리옥살에서 젯산을 만드는 락토일글루타티온분해효소에 대해서는 필수적인 보조기질로 작용한다. 그러므로 세포에서 GSH 항산화 기능에 매우 중요한 역할을 하는데, AAPH는 적혈구내 GSH를 고갈시켜 적혈구의 기능에 치명적 손상을 준다<sup>22,24)</sup>. 그러므로 본 연구는 AAPH에 의해 고갈된 GSH를 생성시키는데 학술과 관동화 추출물의 효과를 알아보았다. 학술과 관동화 추출물을 농도별로 처리한 결과 농도에 의존적으로 GSH 생성이 유도되었고, 50 µg/mL 처리군에서는 학술과 관동화의 GSH 생성력은 비타민 C와 유사하였고 정상대조군의 GSH 함량과 비슷하였다. 흥미롭게도 고농도 관동화 추출물 (100 µg/mL) 처리군은 비타민 C와 유사하였으며, 정상대조군 보다 약 38%가 증가되어 학술보다 우수한 GSH 생성 효과가 있었으며, 이러한 결과는 본 연구에 의해서 처음으로 조사되었다.

이상의 결과를 종합해볼 때 학술과 관동화 추출물은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성과 reducing power가 우수함은 물론 AAPH가 유도하는 적혈구 용혈과 혈장의 지질 과산화물질의 최종 산물인 MDA의 생성을 최소화시킬 수 있는 항산화 소재임을 증명하였다. 학술과 관동화 추출물은 GSH 산화에 대한 스트레스를 억제할 수 있는 우수한 소재임을 확인할 수 있었다. 따라서 학술과 관동화 추출물은 활성 산소와 관련된 인체질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

## 결론

본 연구는 학술과 관동화 추출물의 항산화 및 적혈구의 항

용혈 효과를 조사하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 학슬과 관동화 추출물은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성 및 reducing power가 우수하였다.
2. 학슬과 관동화 추출물은 AAPH에 의해 유도되는 적혈구 용혈과 혈장의 지질 과산화물질의 최종 산물인 MDA의 생성 억제에 우수하였다.
3. 학슬과 관동화 추출물은 GSH 산화에 대한 스트레스를 억제할 수 있는 우수한 소재임을 확인하였다.

따라서 학슬과 관동화 추출물은 활성 산소와 관련된 인체 질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2011년도 지역산업기술개발사업(#A000200136)으로 한국산업기술진흥원의 지원을 받아 연구되었다.

## References

1. Wiseman H. Dietary influences on membrane function: impotent in protection against oxidative damage and disease. *Nutr Biochem*. 1996 ; 7 : 2-6.
2. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 ; 3 : 228-37.
3. Kawashima S. The possible role of lipoperoxide in aging. *Nagoya J Med Sci*. 1969 ; 32 : 303-26.
4. Dicker EA, Crum AD, Calvert JT. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J Agric Food Chem*. 1992 ; 40 : 756-9.
5. Halliwell BH, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990 ; 186 : 1-85.
6. Edgington, SM. As we live and breathe: free radicals and aging. Correlative evidence from a number of fields suggests they may be key. *Bio/Technology*. 1994 ; 12 : 37-40.
7. Vives Corrons JL, Miguel-Garcia A, Pujades MA, Miguel-Sosa A, Cambiazzo S, Linares M, Dibarrart MT, Calvo MA. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur J Haematol*. 1995 ; 55 : 327-31.
8. Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E. Sick cell membranes and oxidative damage. *Biochem J*. 1986 ; 237 : 265-9.
9. Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem*. 1984 ; 259 : 14354-6.
10. Clemens MR, Ruess M, Bursa Z, Waller HD. The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. *Free Radical Res Commun*. 1987 ; 3 : 265-7.
11. Lee CB. Coloured flora of Korea. 1st ed. Seoul : Hyangmoonsa. 2003 : 270-403.
12. Taira J, Nanbu H, Ueda K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264. 7 macrophages. *Food Chem*. 2009 ; 115 : 1221-7.
13. Lee JS, Min BS, Lee SM, Na MK, Kwon BM, Lee CO, Kim YH, Bae KH. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Carpesium abrotanoides*. *Planta Med*. 2002 ; 68 : 745-7.
14. Hwang SB, Chang MN, Garcia ML, Han QQ, Huang L, King VF, Kaczorowski GJ, Winquist RJ. L-652,469--a dual receptor antagonist of platelet activating factor and dihydropyridines from *Tussilago farfara* L. *Eur J Pharmacol*. 1987 ; 141 : 269-81.
15. Hwangbo C, Lee HS, Park J, Choe J, Lee JH. The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2009 ; 9 : 1578-84.
16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199-200.
17. Re R, Pelligrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*. 1999 ; 26 : 1231-7.
18. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. 1986 ; 44 : 307-15.
19. Hseu YC, Chang WC, Hseu YT, Lee CY, Yech YJ, Chen PC, Chen JY, Yang HL. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata mycelia* in normal human erythrocytes. *Life Sci*. 2002 ; 71 : 469-82.
20. Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Kitamura. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2003 ; 11 : 53-61.
21. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009 ; 6 : 532-8.
22. Ko FN, Hsiao G, Kuo YH. Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and

- beta-thalassemic red blood cells. *Free Radical Biol Med*, 1997 ; 22 : 215-22.
23. Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp*, 2009 ; 24 : 273-81.
24. Yamamoto Y, Niki E, Eguchi J, Kamiya Y, Shimasaki H. Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochim Biophys Acta*, 1985 ; 819 : 29-36.