

사람의 저밀도 지방단백질의 산화에 대한 생열귀나무 추출물의 항산화 효과

사재훈* · 이 완 · 신인철 · 정경진 · 심태흠 · 오홍석 · 김영진 · 정의호 · 김광기¹ · 최대성¹
강원도보건환경연구원, ¹정선군농업기술센터

Antioxidant Effect of *Rosa davurica* Pall Extract on Oxidation of Human Low Density Lipoprotein (LDL)

Jae-Hoon Sa*, Woan Lee, In-Cheol Shin, Kyung-Jin Jeong, Tae-Heum Shim, Heung-Seok Oh,
Yong-Jin Kim, Eui-Ho Cheung, Gwang Gee Kim¹, and Dae-Sung Choi¹

Gangwon Research Institute of Health and Environment
¹Jungsun Agriculture Technology Center

Antioxidant effects of *Rosa davurica* Pall extract on copper-mediated LDL oxidative modification were investigated. Oxidation products of LDL were determined based on TBA value, formation of conjugate diene, and apolipoprotein carbonyl value. As revealed through TBA values, ethyl acetate and butanol fractions of *R. davurica* Pall root showed strong antioxidant effect, with 85.3 and 93.2% inhibitions at 30 µg/ml each, respectively. Ethyl acetate and butanol fractions at 30 µg/mL inhibited LDL oxidation up to 8 hr. Conjugate diene formation by lipid oxidation with Cu²⁺ addition in ethyl acetate and butanol fractions decreased 2.2- and 5.6-fold, respectively, compared to control. Carbonyl value decreased in the presence of butanol and ethyl acetate fractions. Methanol and ethyl acetate extracts of *R. davurica* Pall root showed higher absorbancy at 285 nm. Ethanol extract of *R. davurica* Pall root and stem contained 10.6 g/100 g total phenolic compounds. Results reveal phenolic compound as major biological component in *R. davurica* Pall extracts. Ethyl acetate and butanol fraction showed strongest antioxidant effect on LDL oxidation.

Key words: low-density lipoprotein(LDL), antioxidants, *Rosa davurica* Pall, phenolic compounds

서 론

최근 생활수준의 향상에 의해 지방질의 과다섭취는 심장 및 혈관계 질환의 급격한 증가를 가져오게 되었고, 이로 인해 야기되는 고지혈증은 저밀도지방단백질(low density lipoprotein, LDL)의 이상대사로 일어나는 죽상변화와 관련이 높고, 특히 관상동맥증가로 인한 심장질환(coronary disease)의 발열에 중요한 위험인자로 우리나라 성인병 사망률의 수위를 차지하고 있다(1).

LDL은 plasma protein중 density 1.025에서 1.058에 해당하는 lipoprotein으로 hydrophobic한 triglyceride cholesteryl ester로 이루어져 있으며, 중심부는 극성인 phospholipid와 free cholesterol로 둘러싸여 있다. 외부는 apo B-100이라 불리는 특수단백질로 조성되어 있다. Apo B-100은 LDL에서 monomeric protein으로 존재하며 인체내 혈관에서 cholesterol의 조절 및 대사에 직접

관여한다. 이러한 apo B-100은 LDL-receptor에 결합할수 있는 ligand로 작용한다. 정상적인 LDL은 oxygen free radical에 의해 쉽게 산화되어 LDL수용체와 결합하지 못한다. LDL산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하며, 산화된 LDL이 정상적인 LDL보다 대식세포에 의해 쉽게 포획되어 거품세포(foam cell)를 형성하여 동맥경화를 유발한다(2-5).

이와같이 지질의 과산화 방지와 LDL의 산화를 방지하기 위하여, BHT와 BHA 등의 합성항산화제를 많이 사용하고 있으나, 이들이 암을 유발한다는 보고가 있으며, 인체에 독성을 나타내어 사용규제를 받고 있다. 반면에 천연항산화제로 이용되고 있는 α -tocopherol 및 비타민-C등은 그 항산화 효과가 낮고 가격이 상대적으로 비싼 성질이 있다. 이외에 β -carotene, α -carotene, lycopene, retinodes, 및 ubiquinol 등이 있는데, 이들은 대부분이 식물에 존재하는 것으로 알려져 있으며 polyphenol, flavonoid 및 그 유도체가 강한 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다(6-11). 그러므로 항산화능이 우수하며 인체에 무해한 천연항산화제를 식물자원으로부터 개발하려는 움직임이 활발하다. 지금까지 연구된 항산화제에 관한 보고로는 은행잎 추출물의 LDL에 대한 항산화효과(12), 곰취 추출물의 항산화효과(13), 갈근(14), 녹차의 항산화 활성(15), 민들레(16) 등이 있다.

*Corresponding author : Jae-Hoon Sa, Gangwon Research Institute of Health and Environment, Chuncheon, Gangwon 200-822, Korea
Tel: 82-33-645-0830
Fax: 82-33-645-0839
E-mail: jhoonsa@provin.gangwon.kr

생열귀나무(*Rosa davurica* Pall)는 장미과에 속하는 식물로서 소화불량, 위통, 월경불순 등의 치료에 쓰이는 약용식물이다. 특히 열매와 잎에 비타민 C가 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 중국 동북지방에 널리 분포되어 있는 것으로 알려져 있다(17,18). 앞선 연구에서 생열귀나무의 카테킨 함량 및 항산화효과에 관한 연구를 통하여 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물의 항산화효과가 탁월함을 밝힌바 있다(19). 본 연구에서는 인간 LDL산화에 대한 생열귀나무 추출물 및 생열귀나무 뿌리 분획물의 항산화효과에 관한 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

강원도 정선군 농업기술센터 및 정선생열귀영농조합법인에서 1999년도 9월에 생열귀나무의 열매, 잎, 줄기, 및 뿌리를 공급받아 잘게 채절후, 음건하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

시약

Agarose, ascorbate, bromophenol blue, butylated hydroxytoluene(BHT), coomassie brilliant blue R-250, cupric sulfate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,4-dinitrophenyl-hydrazine(DNPH), 1,1,3,3-tetra-ethoxypropane(MDA), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), low density lipoprotein(LDL), sodium dodecyl sulfate (SDS), thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, α -tocopherol, 등은 Sigma사 제품(St. Louis, MO, USA)을 구입하여 사용하였다. Disodium hydrogen phosphate, potassium chloride, potassium phosphate, sodium barbital, sodium chloride, sodium phosphate, 등은 Wako사 제품을 사용하였고, Ca, Cu, Fe, K, Mg, P, Zn 등의 표준품은 일본 Wako사의 제품을 사용하였으며, butanol, chloroform, cyclohexane, ethanol, ethyl acetate, heptane, hexane, hydrogen chloride, methanol 등의 유기용매 및 기타시약은 1급시약 혹은 이에 준하는 것을 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획

생열귀의 열매, 잎, 줄기, 및 뿌리를 잘게 세절한 뒤, 분쇄하여, 환류냉각기를 부착한 플라스크에 시료중량의 20배의 에탄올(ethanol, EtOH), 메탄올(methanol, MeOH), 클로로포름(chloroform, CHCl_3), 그리고 물(water)을 가하여 수용상에서 24시간 가온추출하였다. 불순물을 제거하기 위하여 Whatman No. 2 여과지로 여과한 다음, 감압농축하여, 각각의 추출물 시료로 사용하였다. 항산화 활성이 가장 높았던 생열귀 뿌리 메탄올 추출물의 경우에는, 활성성분 특성을 검토하기 위하여, 생열귀 뿌리 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 뒤, 헥산(*n*-hexane), 클로로포름(chloroform, CHCl_3), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc), 부탄올(*n*-butanol, *n*-BuOH) 순으로 극성차이에 따른 용매분획을 수행한 뒤, 여과한 다음, 감압농축하여, 얻은 각각의 분획물을 시료로 사용하였다.

항산화물질에 대한 흡광도 및 페놀성 화합물 함량

흡광도 측정: 부위별 생열귀나무의 추출물 및 뿌리 분획물에 대하여 항산화성 물질로 알려진 화합물들(protein, aromatic amine, 및 phenol 등)의 용출정도를 Hewlett Packard사(Palo Alto, CA, USA)의 HP 8452A diode array spectrophotometer를 사용하여

285 nm에서 흡광도로 측정하였다(20). 이때 시료는 0.1 mg/mL가 되게 추출물을 메탄올에 녹인후, 흡광도를 측정하였다.

카로테노이드 함량: Carotenoids함량은 추출물을 0.01%가 되도록 메탄올에 녹인후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 측정하였다(21).

갈색도: 부위별 생열귀나무 추출물 및 뿌리 분획물의 갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 490 nm에서의 흡광도를 자외선/가시광선 분광광도계(Hewlett Packard사의 HP 8452A diode array spectrophotometer)를 사용하여 흡광도를 측정하였다(20).

총페놀성 화합물 함량: 총페놀성 물질 함량은 Folin-Denis방법에 따라 분석하였다(22). 즉 추출물 혹은 분획물을 1.0 mg/mL가 되게 제조한 후, 75 mL의 증류수가 함유된 100 mL의 메스플라스크에 1 mL씩 넣고 잘 혼합하여 Folin-Denis 시액 5 mL와 탄산나트륨 포화용액 10 mL를 차례로 넣은 다음 증류수로 100 mL 용량으로 채운다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 30분 방치한 후 UV/VIS 분광광도계로 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질은 tannic acid를 이용하였다.

LDL의 산화에 대한 항산화 활성

LDL의 분리: 혈액에서 density 1.025-1.055 g/mL에 해당하는 lipoprotein을 얻기 위하여 신선한 human plasma에 0.1% EDTA와 0.02% NaN_3 를 가하고 교반한 후, $\text{KBr}(d = 1.006 - 1.025)$ 을 가하고 1차 원심분리(4,000 rpm, 5°C , 15 hr)한다. 이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 fraction을 취한 후, $\text{KBr}(d = 1.026 - 1.055)$ 을 가하여 2차 원심분리(40,000 rpm, 5°C , 24 hr)하여 LDL을 분리하였다(16). 분리한 LDL은 0.005 M Tris, 0.05 M NaCl, 0.02% EDTA buffer(pH 7.4)로 투석시키고 냉동 건조하여 사용하였다.

LDL의 산화: LDL($65 \mu\text{g}$ or $130 \mu\text{g}$)과 $\text{CuSO}_4(20 \mu\text{M})$ 에 전체부피가 1 mL가 되도록 phosphate buffer(pH 7.4)를 섞은 뒤, 37°C 에서 4시간 반응시킨 뒤, EDTA(1 mM)를 $20 \mu\text{L}$ 첨가하여 산화를 중지시켰다(12).

Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)의 측정:

LDL내의 산화지질량(MDA의 양)은 TBARS방법으로 측정하였다(12). 추출물 혹은 분획물의 농도변화에 따른 MDA의 함량변화를 측정하였고, 분획물의 일정농도($30 \mu\text{g/mL}$)에서 시간(0-8 hr)에 따른 TBARS의 함량변화를 측정하여 LDL산화에 미치는 생열귀나무 추출물 혹은 뿌리 분획물의 항산화 효과를 실험하였다. 즉, EDTA첨가로 산화가 중지된 LDL용액에 TCA-TBA-HCl 정지액(15% trichloroacetic acid: 0.375% thiobarbituric acid: 0.25 N HCl) 3 mL를 가한후, 95°C 에서 30분간 증탕후, 냉각시킨 뒤, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 생성된 MDA의 함량을 532 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

Conjugate diene 함량: 지방질 산화물의 측정을 위하여 지질 산화도를 conjugated dienes 방법을 이용하였다(12). LDL 산화 용액에 chloroform 2 mL와 methanol 1 mL를 섞은후, 5분간 1,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 아래층을 질

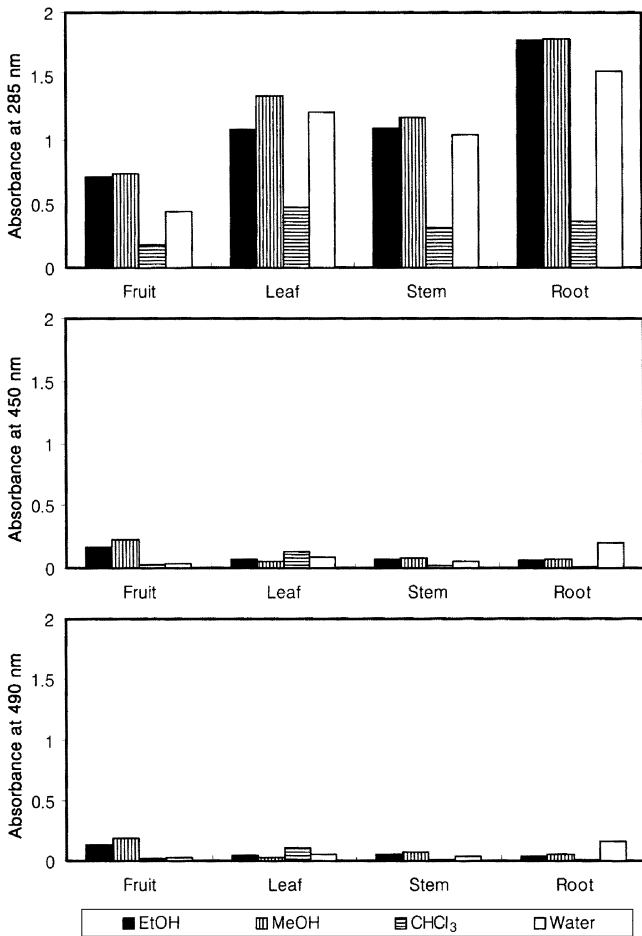


Fig. 1. Absorbance of *Rosa davurica* Pall extracts by using various solvents at 285, 450, and 490 nm.
The absorbance is measured with 0.01% solution in methanol over an optic path of 1 cm.

소개스를 이용하여 건조시킨 시료를 cyclohexane 3 mL에 녹여 분광광도계를 이용하여 234 nm에서 conjugated diene의 함량을 측정하였다.

Apolipoprotein carbonyl 함량: LDL 산화용액(1 mL)에 10 mM DNPH 200 μL를 섞은후, 상온에서 60분간 반응시킨 뒤, denaturing buffer(150 mM sodium phosphate, 3% SDS, pH 6.8) 0.6 mL를 첨가한 뒤, 혼합하였다. 1.8 mL reagent alcohol과 1.8 mL heptane을 첨가하여 섞은후, 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 protein pellet을 denaturing buffer 3 mL에 녹인 뒤, 320-410 nm에서 scan한 뒤, peak absorbance를 사용하여 protein carbonyls(extinction coefficient = 22,000 M⁻¹cm⁻¹) 함량을 계산하였다(12).

결과 및 고찰

앞선 연구에서 본 저자는 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물이 항산화 효과가 매우 탁월함을 밝힌바 있다(19). 본 연구에서는 생열귀나무(열매, 잎, 줄기, 및 뿌리) 추출물 및 생열귀 뿌리 분획물을 사용하여 LDL 산화에 대한 항산화 효과를 규명하고자 수행하였다.

Table 1. Contents of total phenolics in *Rosa davurica* Pall extracts

Extracts	Total phenolics (g/100 g)			
	Fruit	Leaf	Stem	Root
EtOH	10.1	9.5	10.6	10.6
MeOH	10.4	9.4	9.6	9.1
CHCl ₃	0.8	0.4	0.6	1.3
Water	8.8	8.4	8.3	9.5

Table 2. Absorbance of methanol extract and their solvent fractionations obtained from the roots of *Rosa davurica* Pall at 285 nm, 450nm, and 490 nm

Fractions	A ₂₈₅	A ₄₅₀	A ₄₈₀
MeOH ext.	1.790	0.071	0.051
n-Hexane fr.	0.290	0.028	0.023
CHCl ₃ fr.	0.377	0.016	0.011
EtOAc fr.	2.405	0.012	0.008
n-BuOH fr.	1.747	0.056	0.038
Aqueous fr.	0.222	0.010	0.007

부위별 생열귀나무 추출물의 항산화물질에 대한 흡광도 및 페놀성 화합물 함량

생열귀나무 추출물의 285 nm, 450 nm 및 490 nm에서의 항산화 물질에 대한 흡광도를 Fig. 1에 나타내었다. 항산화성 물질인 phenol계 화합물 등의 흡수가 일어나는 285 nm에서의 흡광도는 뿌리의 메탄올 및 에탄올 추출물이 가장 높았으며 뿌리 > 잎 > 줄기 > 열매 순으로 흡광도가 높았다. 용매별로는 메탄올 > 에탄올 > 물 > 클로르포름 순으로 흡광도가 높게 측정되었다. 대부분의 carotenoids는 450 nm에서 흡수하므로 그 흡광도로 그 함량을 추정할 수 있다. A₄₅₀의 값은 0.009-0.225로 매우 낮게 측정되었다. 생열귀나무 추출물의 490 nm에서 측정된 갈색도도 0.006-0.188로 매우 낮게 측정되었다. 위의 결과로 미루어 보아서 285 nm에서 흡수를 나타내는 물질이 다량 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 생열귀나무 추출물에서는 carotenoids나 갈색화 반응 생성물들이 항산화 활성에 미치는 영향이 적을 것으로 추정되었다.

생열귀나무의 총페놀성화합물 함량을 Folin-Denis방법에 따라 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 클로르포름 추출물을 제외하고 모든 부위의 추출물에서 100 g당 8.3-10.6 g으로 매우 높은 양을 함유하고 있었다. 특히, 생열귀나무 뿌리 및 줄기의 에탄올 추출물이 10.6 g/100 g으로 가장 높은 함량을 지니고 있었다. 이 결과는 위의 흡광도 결과와 일치하는 결과로서 285 nm에서 흡수하는 페놀성 화합물이 주된 생리활성물질일 것으로 추정되었다.

생열귀나무 뿌리 분획물의 항산화물질에 대한 흡광도

생열귀나무 뿌리 분획물의 항산화물질 용출정도를 흡광도를 측정하여 검토하였다. 그 결과를 Table 2에 요약하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, 카로테노이드계 화합물(A₄₅₀)과 갈변물질(A₄₉₀)의 경우에는 흡광도가 거의 나타나지 않는 것으로 미루어 보아서 생열귀나무 뿌리 분획물의 주된 활성물질이 아닌 것으로 판단되어진다. 그러나 페놀계화합물의 용출정도를 나타내는 285 nm에서의 흡광도는 에틸아세테이트 분획물이 2.405로 매우 높게 측정되는 것으로 보아서, 페놀계 화합물이 매우 많

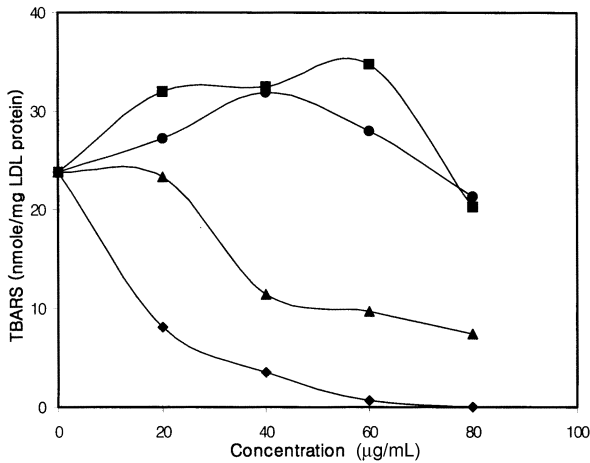


Fig. 2. Inhibitory effects of Cu²⁺-mediated LDL lipid peroxidation by increasing concentration of *Rosa davurica* Pall extracts as evaluated by TBARS assay.

LDL (equivalent to 65 µg protein) was incubated with 20 µM Cu²⁺ at 37°C under air for 8 h in the presence of varying concentrations of methanol extracts. The reaction mixture was stopped by adding 3 mL of TBA-TCA-HCl solution, and then the solution was heated at 95°C for 30 min. After centrifugation to clarify the solution, the peak absorbance at 532 nm was used to calculate TBARS using malonaldehyde bis (dimethylacetal) as standard. ●--●: Fruit, ■--■: Leaf, ▲--▲: Stem, ◆--◆: Root.

이 용출되어져 나오는 것을 확인하였다. 그 다음으로 부탄올 분획물에서 페놀성 화합물이 많이 용출되어져 나오는 것을 확인하였으며, 클로르포름, 헥산 및 물 분획물에서는 소량 용출 되는 것을 확인하였다.

LDL 산화에 대한 부위별 생열귀나무 추출물의 항산화 효과

앞선 연구에서, 주로 생열귀나무 메탄올 추출물에서 DPPH radical 소거활성이 나타남을 확인하였다(19). 본 실험에서는 LDL 산화에 대한 생열귀나무(열매, 잎, 줄기, 및 뿌리) 메탄올 추출물의 항산화 효과를 MDA값을 측정하여 검색하였다. 생열귀나무 메탄올 추출물을 20, 40, 60, 80 µg/mL의 농도로 첨가하였을 때의 MDA값을 Fig. 2에 나타내었다. 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물의 경우, 66.0, 85.3, 97.1, 100%의 MDA 생성 억제율을 보였고, 생열귀 줄기 메탄올 추출물의 경우에도 농도가 증가함에 따라 MDA생성을 억제함을 나타내었다. 그러나, 생열귀 열매 및 잎의 메탄올 추출물의 경우에는 MDA 생성을 억제하지 못하였다. 생열귀 뿌리 메탄올 추출물의 경우, LDL 산화에 대하여, 소량의 농도에서도 가장 좋은 항산화 효과를 나타내므로 이후의 실험에서는 생열귀 뿌리 메탄올 추출물로부터 용매 분획물을 제조한 후, 그 분획물을 사용하여 실험하였다.

LDL 산화에 대한 생열귀나무 뿌리 분획물의 항산화 효과

LDL 산화에 대한 가장 좋은 항산화 효과를 나타낸 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물을 유기용매에 따른 분획을 수행한 뒤, 각각의 분획물을 사용하여, MDA, conjugated diene, apolipoprotein carbonyl가 등을 분석하여, LDL에 대한 항산화 효과를 측정하였다.

생열귀나무 뿌리 분획물의 농도(0-40 µg/mL)에 따른 MDA값의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 헥산 분획물과 물 분획물을 제

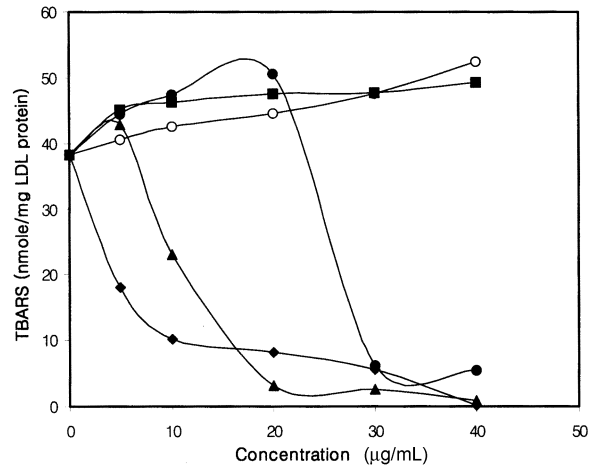


Fig. 3. Inhibitory effects of MDA formation on LDL by increasing concentration of each fraction from the methanol extract of roots of *Rosa davurica* Pall.

LDL(equivalent to 65 µg protein) was incubated with 20 µM Cu²⁺ at 37°C under air for 8 h in the presence of varying concentrations of methanol extracts. The reaction mixture was stopped by adding 3 mL of TBA-TCA-HCl solution, and then the solution was heated at 95°C for 30 min. After centrifugation to clarify the solution, the peak absorbance at 532 nm was used to calculate TBARS using malonaldehyde bid (dimethylacetal) as standard. ○--○: Hexane fr., ●--●: Chloroform fr., ◆--◆: Ethyl acetate fr., ▲--▲: Butanol fr., ■--■: Aqueous fr.

외한 EtOAc 분획물, BuOH 분획물, 그리고 CHCl₃ 분획물이 농도가 증가함에 따라 MDA 생성에 대한 높은 억제율을 나타내었다. 생열귀나무 뿌리 분획물 30 µg/mL의 농도에서 BuOH 분획물은 93.2%(2.6 nmol/mg), EtOAc 분획물은 85.3%(5.6 nmol/mg), 그리고 CHCl₃ 분획물은 84.0%(6.1 nmol/mg)의 산화억제율(MDA값)을 나타내었다. 30 µg/mL 정도의 소량의 분획물 농도에서도 LDL 산화에 대한 항산화 효과가 강하게 나타나므로 이후의 실험에서는 이 값을 실험농도로 정하여 수행하였다. 시간에 따른 생열귀나무 뿌리 분획물의 MDA값을 Fig. 4에 나타내었다. Hexane 분획물과 물 분획물은 control과 유사한 변화량을 나타내는 것으로 보아, 시간에 따른 LDL 산화억제능력이 미약한 것으로 나타났고, BuOH 분획물, EtOAc 분획물, 그리고 CHCl₃ 분획물은 8시간까지 LDL의 산화를 강력하게 억제함을 보여주었다. 이 결과로 미루어 볼 때, BuOH 분획물, EtOAc 분획물, 그리고 CHCl₃ 분획물의 내부에 천연 항산화제로서의 개발 가능성이 있는 물질이 존재하고 있음을 추측할 수 있었다. 분획물 30 µg/mL의 농도로 첨가하였을때의 conjugated diene 함량의 억제정도를 Fig. 5에 나타내었다. BuOH 분획물과 EtOAc 분획물이 5.6배 및 2.2배의 conjugated diene의 생성 감소를 나타내었고, 헥산 분획물은 거의 억제하지 못함을 보여주었다. 분획물 30 µg/mL의 농도 첨가시 apolipoprotein carbonyl 함량 억제정도를 Fig. 6에 나타내었다. BuOH 분획물이 3.4배의 감소량을 나타내었으며, EtOAc 분획물과 CHCl₃ 분획물이 1.5배 정도의 apolipoprotein carbonyl 함량 감소를 나타내었다. 헥산 분획물은 전혀 억제하지 못하였다. 이로 미루어 보아서 BuOH 분획물, EtOAc 분획물, 그리고 CHCl₃ 분획물에 사람의 저밀도 지방단백질의 산화를 억제할 수 있는 천연 항산화제가 다량 존재하고 있음을 확인하였다.

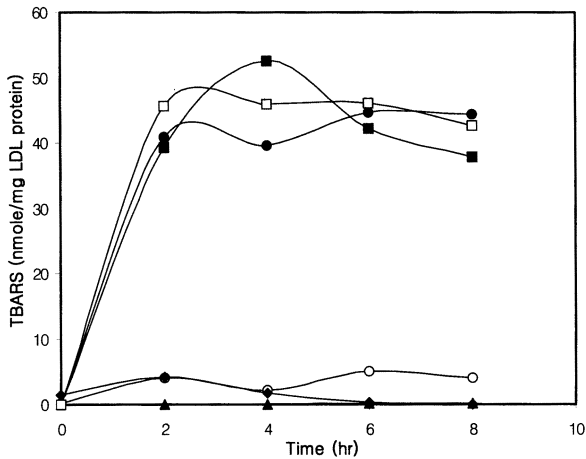


Fig. 4. Inhibitory effects of each fraction from the methanol extracts of roots of *Rosa davurica* Pall according to LDL oxidation time.

LDL (equivalent to 65 µg protein) was incubated with 20 µM Cu²⁺ at 37°C under air for 8 h in the presence of each fraction (30 µg/mL). The reaction mixture was stopped by adding 3 mL of TBA-TCA-HCl solution, and then the solution was heated at 95°C for 30 min. After centrifugation to clarify the solution, the peak absorbance at 532 nm was used to calculate TBARS using malonaldehyde bid (dimethylacetal) as standard. ■--■: Control, ●--●: Hexane fr., ○--○: Chloroform fr., ◆--◆: Ethyl acetate fr., ▲--▲: Butanol fr., □--□: Aqueous fr.

항산화물질에 대한 흡광도 및 항산화 효과와의 상관성

부위별 생열귀나무 추출물의 항산화물질에 대한 흡광도를 측정 한 결과, 일부 항산화성 물질인 phenolic 화합물 등의 흡수가 일어나는 285 nm에서의 흡광도가 가장 높았다. 그러나 카로테노이드계 화합물의 흡광이 일어나는 450 nm에서의 흡광도나 갈변물질의 흡광이 일어나는 490 nm에서의 흡광도는 매우 낮게 측정되는 것으로 보아서, 생열귀나무 추출물에서는 주로 285 nm에서 흡광을 나타내는 물질들이 항산화 활성을 나타낼 것으로 사료된다. 부위별로는 뿌리의 메탄올 추출물이 가장 높게 측정되었으며 잎 > 줄기 > 열매 순으로 285 nm에서의 흡광도가 높게 측정되었다. 또한 LDL 산화에 대한 부위별 생열귀나무 추출물의 항산화 효과를 측정 한 결과, 뿌리와 잎 메탄올 추출물에서 강력한 MDA 생성을 억제하였다. 생열귀나무 뿌리 분획물들에 대한 항산화물질에 대한 흡광도 측정 결과의 경우에도 주로 285 nm에서 흡수되는 페놀계 화합물들의 용출이 가장 높은 것으로 확인되었다. 특히 EtOAc 분획물 및 BuOH 분획물에서 높은 흡광을 나타내었으며, 이들 분획물들이 LDL 산화에 대한 강력한 항산화 효과를 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보아서, 부위별로는 생열귀나무 뿌리에 285 nm에서 흡광되는 페놀계 화합물들이 다량 함유되어 있으며, 이들 물질들이 주로 EtOAc 분획물 및 BuOH 분획물에 존재할 것으로 사료된다. 따라서 LDL 산화에 대한 생열귀나무 추출물의 항산화 효과는 이들 페놀계 화합물들에 의한 영향일 것으로 사료된다.

사람의 저밀도지방단백질의 산화에 대한 생열귀나무 추출물의 항산화 효과를 측정 한 결과, 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물이 MDA생성을 가장 강력하게 억제함을 보여주었다. 생열귀나무 추출물은 주로 285 nm에서 흡수를 나타내는 물질이 다량 함유되어 있으며, 페놀성화합물 함량을 측정 한 결과, 클로로포름 분획물을 제외한 모든 추출물에 다량 함유되어 있었다. 생

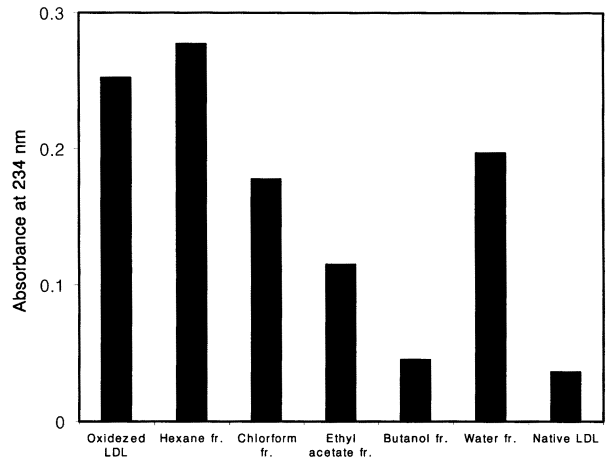


Fig. 5. Inhibitory effects of each fraction from the methanol extracts of root of *Rosa davurica* Pall on conjugate diene formation.

LDL (equivalent to 130 µg protein) in PBS pH 7.4 was incubated with 20 µM Cu²⁺ at 37°C under air for 8 h in the presence and absence of each fraction (30 µg/mL). Conjugate diene formation was measured by the method of Yan *et al.* (12)

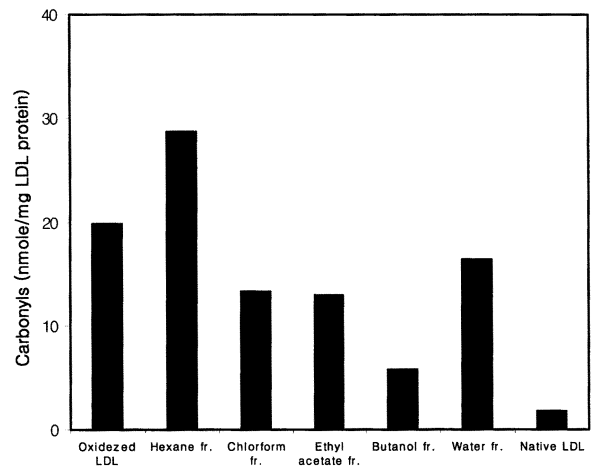


Fig. 6. Inhibitory effects of each fraction from the methanol extracts of root of *Rosa davurica* Pall on Cu²⁺-mediated apoB carbonylation.

LDL (equivalent to 65 µg protein) in PBS pH 7.4 was incubated with 20 µM Cu²⁺ at 37°C under air for 8h in the presence and absence of each fraction (30 µg/mL). Conjugate diene formation was measured by the method of Yan *et al.* (12)

열귀나무 뿌리 메탄올 추출물이 사람의 저밀도지방단백질 산화에 대한 항산화 효과가 가장 강력하게 나타났기 때문에, 뿌리 메탄올 추출물을 보다 더 정제하기 위하여 극성에 따른 용매분획물을 제조한후, 각각의 분획물을 대상으로 LDL 산화에 대한 항산화 효과를 측정하였다. 생열귀나무 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물이 MDA, conjugate diene, apolipoprotein carbonyl가 등의 분석결과 LDL 산화에 대한 항산화 효과가 매우 탁월함을 확인하였다. 또한 생열귀나무 뿌리의 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물은 285 nm에서 흡수되는 페놀성 화합물을 다량 함유하고 있음을 확인하였다. 또한 앞선 연구에서 이들 분획물에는 다량의 catechin이 함유되어 있음을 보고한 바 있다(19). 이상의 결과를 종합하면 생열귀나무 뿌리

의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 주된 활성물질은 catechin 등과 같은 플라보노이드계 화합물과 다량의 페놀성 화합물일 것으로 추정된다.

요 약

비타민-C를 다량 함유하고 있는 생열귀나무의 자원화를 위한 연구로서 페놀성 화합물의 함량 및 사람의 저밀도지방단백질의 산화에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 생열귀나무 추출물의 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과, 모든 부위에서 100 g 당 8.3-10.6 g으로 매우 높은 양을 함유하고 있었다. 또한, 생열귀나무 추출물 및 분획물에 대한 항산화 물질의 함량을 측정한 결과, 생열귀나무 뿌리 메탄올 추출물과 뿌리의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물이 285 nm에서 흡수를 나타내는 페놀성 화합물을 다량 함유하고 있음을 확인하였다. TBARS에 의한 LDL산화 억제효과 측정시, 생열귀나무 뿌리의 메탄올 추출물이 가장 좋은 효과를 나타내었다. 생열귀나무 뿌리의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 경우, 30 µg/mL 첨가시 85.3% 및 93.2%까지 LDL 산화를 억제함을 확인하였다. 또한 CHCl₃ 분획물, EtOAc 분획물, 그리고 BuOH 분획물은 30 µg/mL 분획물 첨가시 Cu²⁺에 의한 LDL 산화를 8시간까지 억제함을 확인하였다. Cu²⁺에 의한 apoB carbonylation과 conjugate diene형성 억제효과 측정시, EtOAc 분획물과 BuOH 분획물이 가장 탁월하게 억제함을 보여주었다. 생열귀나무는 다량의 페놀성 화합물을 함유하고 있으며 항산화 활성이 매우 탁월하므로 새로운 기능성식품 소재로의 활용이 기대되는 약용식물자원이다.

감사의 글

본 연구는 정선생열귀영농조합법인 및 정선군농업기술센터로부터 연구용역사업 지원(2000. 1.-2001. 12.)에 의해 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Plasma triglyceride and LDL metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* 22: 96-104 (1992)
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 3: 149-159 (1983)
- Morel DW, Docorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 4: 357-364 (1984)
- Bruckdorfer KR. Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1: 529-535 (1990)
- Steinbrecher U, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3883-3887 (1984)
- Esterbauer H, Striegel G, Puhl H, Oberreither S, Rotheneder M, El-Saadani M, Urgens G. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570: 254-267 (1989)
- Manigiapane H, Thomson J, Salter A, Brown S, Bell GD, White DA. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.* 43: 445-450 (1992)
- De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JRS, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1743-1750 (1990)
- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1: 441-445 (1987)
- Retsky KL, Frei B. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1257: 279-287 (1995)
- Noguchi N, Gotoh N, Niki E. Dynamics of the oxidation of low density lipoprotein induced by free radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1168: 348-357 (1993)
- Yan LJ, Dray-Lefaux MT, Packer L. *Ginkgo biloba* extract(EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 213: 360-366 (1995)
- Jeong J, Kim E, Hwangbo H, Ham S. Effects of *Ligularia fischeri* extracts on oxidation of low density lipoprotein. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1214-1221. (1998)
- Park CO, Kim KS, Ji YA, Ryu BH. Antioxidant activity of daidzin and puerarin toward oxidation of human low density lipoprotein. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 25-31 (1997)
- Park CO, Jin SH, Ryu BH. Antioxidant activity of green tea extracts toward human low density lipoprotein. *Korean J. Food Technol.* 28: 850-858 (1996)
- Yag KS, Jeon CM. Effect of *Taraxacum coreanum* Nakai on low density lipoprotein oxidation. *Korean J. Pharmacogn.* 27: 267-273 (1996)
- Shin KH, Chung HS, Cho SH. Vitamin contents in the fruits of *Rosa davurica* Pall. *J. Med. Crop Sci.* 3: 21-24 (1995)
- Shin KH, Lim SS, Lee SH, Seo JS, Yu SY, Park CH. Vitamin content in *Rosa davurica* Pall. *J. Medicinal Crop Sci.* 6: 6-10 (1998)
- Sa JH, Shin IC, Jeong KJ, Shim TH, Oh H, Park SK, Cheung E, Kim SN, Kim GG, Choi DS, Kwon YS, Kim CM. Catechin content and antioxidative effect from *Rosa davurica* Pall. *Korean J. Pharmacogn.* 33: 177-181 (2002)
- Kim JY, Maeng YS, Lee KY. Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 635-639 (1995)
- Seo YH, Kim IJ, Yie AS, Min HK. Electron donating ability and contents of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids in waxy corn (*Zea mays* L.). *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 581-585 (1999)
- AOAC. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1980)

(2003년 9월 3일 접수; 2004년 4월 13일 채택)