

왕쥐똥나무잎 추출물의 항산화 활성

김연숙¹ · 이승재¹ · 황진우¹ · 김이화² · 박표집¹ · 정재현^{3*}

¹건국대학교 생명공학과

²세명대학교 한의과대학 경락경혈학교실

³충주대학교 식품공학과

Antioxidant Activities of Extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. Leaves

Yon-Suk Kim¹, Seung-Jae Lee¹, Jin-Woo Hwang¹, Ee-Hwa Kim²,
Pyo-Jam Park¹, and Jae-Hyun Jeong^{3*}

¹Dept. of Biotechnology, Konkuk University, Chungbuk 380-701, Korea

²Dept. of Acupoint and Meridian, College of Oriental Medicine, Semyung University, Chungbuk 390-711, Korea

³Dept. of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungbuk 380-702, Korea

Abstract

The free radical scavenging activities of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves (LOH) as well as various antioxidant activities such as ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition were evaluated by electron spin resonance (ESR). The total polyphenol and flavonoid contents of the water and ethanolic extracts from LOH were 105.5 ± 1.31 and 102.1 ± 1.82 mg gallic acid equivalent/g extract, respectively, and 84 ± 1.72 and 82.8 ± 1.65 mg catechin equivalent/g extract. In addition, IC₅₀ values for the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), alkyl, and hydroxyl radical scavenging activities of the water and ethanolic extracts were 0.021 ± 0.002 and 0.010 ± 0.003 mg/mL, 0.011 ± 0.003 and 0.012 ± 0.002 mg/mL, and 0.395 ± 0.002 and 0.443 ± 0.002 mg/mL, respectively. The ABTS radical scavenging activities of the water and ethanolic extracts from LOH and BHT were 0.073 ± 0.12 , 0.130 ± 0.06 and 1.461 ± 0.02 mM Trolox equivalent/mg extract, respectively. The FRAP values of the extracts from LOH were higher than those of BHT, which was used as a positive control. The LOH extracts showed strong inhibitory effects on lipid peroxidation as measured by ferric thiocyanate (FTC) and thiobarbituric acid (TBA) assay compared to that of α -tocopherol. Using MTT assay on human liver cells (Chang), extracts from LOH showed no toxicity at a concentration of 0.5 mg/mL. These results indicate that the LOH extracts possessed antioxidant activity.

Key words: antioxidant activity, *Ligustrum ovalifolium* H., free radical, ESR

서 론

프리 라디칼(free radical)의 사전적 의미는 '과격함, 급진적인'의 뜻으로 반응성이 강하다는 의미이다. 화학적으로 라디칼은 대부분 홀로 존재하는 것이 아니라 다른 짝을 가진다. 하지만 전자가 부족하면 짝을 이룰 수 없게 되는데 이 상태의 라디칼을 프리 라디칼이라고 한다. 따라서 프리 라디칼은 "쌍을 이루지 못한 전자를 하나 이상 가지고 있는 분자"라고 정의된다.

활성산소 및 프리 라디칼은 노화 촉진과도 관련성이 높아, 최근에는 생체 내 항산화 효소 체계를 증강시킬 수 있으면서 인체에 무해한 항산화제를 천연식물류로부터 얻고자 하는 시도가 여러 각도에서 수행되고 있다(1,2). 이미 알려져 있는 항산화성 물질에는 BHA나 BHT 등의 합성 항산화제와 폴

리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르브산, 토코페롤, 인지질 등의 천연 항산화제가 있으나(3) 보다 안전하고 생체 방어력을 증가시킬 수 있는 강한 항산화제에 대한 요구는 날로 증가되고 있는 경향이다(4). 천연 항산화제는 대부분 식물 기원의 항산화성 화합물로서 나무, 수피, 줄기, 잎, 과일, 뿌리, 꽃, 열매, 씨앗 등의 모든 부분에 존재하고 있으며, 이들은 주로 페놀화합물로서 프리 라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하여 항산화 물질로서의 역할을 한다(5-7).

본 연구에 사용된 왕쥐똥나무(*Ligustrum ovalifolium* H.)는 우리나라 각처에서 자라는 낙엽관목으로 물푸레나무과에 속하며 잎은 대란타원형(帶卵形) 또는 도란형(倒卵形)이며 양끝은 뾰족해서 쥐똥나무의 잎새와 구별이 된다. 잎은 전연(全緣)이고 다소 두터우며 후질(厚質)이고 활택(滑澤)

*Corresponding author. E-mail: jhjeong@cjnu.ac.kr
Phone: 82-43-820-5248, Fax: 82-43-820-5230

해서 역시 귀퉁나무의 잎과 비교가 된다. 꽃은 원추화서(圓錐花序)이며 흰색이고 6월에 개화한다. 11월에 과실은 검은색으로 익어가며 동그란 핵과이다. 최근까지의 왕귀퉁나무의 연구현황은 왕귀퉁나무 꽃에서 acrylated triterpenoids 분리와 종자에서 ursolic acid와 oleanolic acid 분리 정도일 뿐, 왕귀퉁나무잎 추출물을 이용한 연구는 매우 미흡한 실정이다(8). 따라서 본 연구에서는 왕귀퉁나무잎 추출물의 프리라디칼 소거능을 통한 항산화활성 및 정상 간세포(human liver, Chang cells)를 이용한 독성 평가를 하여 기능성 소재 개발을 위한 기초자료로 사용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 추출

본 실험에 사용한 왕귀퉁나무잎은 자양농장(충주, 한국)에서 기증받아 읍지에서 건조하여 마쇄 후 사용하였다. Folin-Ciocalteu's reagent, ferrous chloride(FeCl_2), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), potassium persulfate, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ), linoleic acid, (4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron(4-POBN)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 특급 및 일급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시료 추출을 위한 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 물 추출은 왕귀퉁나무잎 건조 분말 시료 10 g을 3차 증류수 500 mL을 첨가하여 95°C에서 150분 동안 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 41, Whatman, Maidstone, England)로 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조 하였다. 에탄올 추출은 왕귀퉁나무잎 건조 분말 시료 20 g에 에탄올 200 mL를 첨가하여 상온에서 120 rpm의 진탕기로 24시간씩 3회 추출한 후 농축하여 동결건조 하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(9)을 약간 변형하여, 추출물 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na_2CO_3 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 30분 정치한 후 분광광도계(SECOMAM, Ales, France)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents (mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Jia 등(10)의 방법에 따라 추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고

실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin(Sigma Chemical Co.)을 표준물질로 하여 0~1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

Electron spin resonance(ESR)를 이용한 DPPH 라디칼 소거능 측정

라디칼 소거능 측정은 Lee 등(11)의 방법에 따라 메탄올에 용해시킨 60 μM DPPH 60 μL 와 농도별로 준비한 시료 60 μL 를 섞은 후 10초간 강하게 교반하여 2분간 실온에서 방치한 후 capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer(Jeol Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였으며, 그 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 5 mW, gain: 6.3×10^5 , temperature: 298 K였다.

ESR을 이용한 alkyl 라디칼 소거능 측정

10 μL 의 PBS, 10 μL 의 농도별 시료, 10 μL 의 40 mM AAPH, 10 μL 의 40 mM 4-POBN을 차례로 첨가하여 10초간 강하게 교반한 후 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시킨 다음, capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer로 alkyl 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 10 mW, gain: 6.3×10^5 , temperature: 298 K였다.

ESR을 이용한 hydroxyl 라디칼 소거능 측정

농도별 시료 0.2 mL에 0.3 M의 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 0.2 mL, 10 mM의 FeSO_4 0.2 mL 및 10 mM의 H_2O_2 0.2 mL를 차례로 첨가한 후, 10초간 강하게 교반한 다음, 반응 혼합물을 capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer에서 hydroxyl 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 1 mW, gain: 6.3×10^5 , 온도: 298 K였다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Park과 Kim(12)의 방법에 따라 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 Trolox를 표준물질로 하여 mM Trolox equivalent/mg extract로 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power(FRAP)을 이용한 총 항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(13)의 방법을 사용하였다. 즉, 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 고정분 함유량이 1~5 mg 되도록 희석한 시료액 0.15 mL과 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 표준물질로 하여 mM FeSO_4 eq./mg extract로 표시하였다.

환원력 측정

왕귀뚜나나무잎 추출물의 환원력 측정은 Seo 등(14)의 방법에 따라 측정하였으며, 시료 1.0 mL에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1.0 mL씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 여기에 15% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 1.0 mL 가하고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상층액 1.0 mL에 증류수 및 ferric chloride 각 1.0 mL를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화 억제력 측정

Ferric thiocyanate(FTC) 방법에 의한 지질과산화 억제활성 측정: Ferric thiocyanate에 의한 지질과산화 측정은 Kikuzaki와 Nakatani(15)의 방법에 의해 측정하였다. 추출물 4.0 mL, 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 8.0 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에서 항온처리 하여 과산화를 유도시켰다. 이 혼합용액 0.1 mL, 75% ethanol 9.7 mL, 30%-ammonium thiocyanate 0.1 mL를 순서대로 첨가한 후 잘 섞어 주었다. 여기에 20 mM ferrous chloride(3.5% HCl에 녹인 것)를 0.1 mL 가한 후 잘 섞이도록 한 후 정확히 3분 후에 UV-VIS Spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 변화된 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로는 시료 대신 물과 에탄올을 사용하여 반응시켰고, 양성 대조군으로 vitamin C 및 α -tocopherol을 사용하였다.

Thiobarbituric acid(TBA) 방법에 의한 지질과산화 억제활성 측정: 추출물 4.0 mL에 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 8.0 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에 항온 처리하여 일정 간격으로 측정하였다. 먼저 각 시료용액 1.0 mL, 20% TCA 2.0 mL, 0.67% TBA 2.0 mL를 가하여 혼합한 후 열탕조에서 10분간 가열 처리하여 흐르는 물에 냉각시킨 후 5°C 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 상층액을 532 nm에서 측정하여 TBA값을 측정하였다.

세포 배양

정상 간세포(human liver cells, Chang)를 불활성화한 fetal bovine serum(FBS) 10%와 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

cin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

세포 독성 측정

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(16). Chang 세포를 24-well plates에 7×10^4 cells/mL 농도로 1.0 mL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어 지나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200 μL 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

각 군 간의 유의성의 검증은 Window용 SPSS 12.0 version을 이용하여 Student *t*-test 및 ANOVA 법으로 검증하여 *p*값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

왕귀뚜나나무잎의 용매별 수율을 분석한 결과, 물 추출물은 39.73%, 에탄올 추출물은 14.99%로 물 추출물이 더 높게 나타났다. 폴리페놀은 많은 식물에서 발견되고 있으며 항산화, 항균 효과 등 다양한 생리활성을 나타내기에 이에 관한 많은 연구들이 진행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 왕귀뚜나나무잎의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 조사하여 항산화 소재로서의 활용 가능성을 제시하였다. 왕귀뚜나나무잎의 에탄올 및 물 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 총 폴리페놀 함량은 물 추출물이 105.5 \pm 1.31 mg GAE eq./g extract로 에탄올 추출물 102.1 \pm 1.82 mg GAE eq./g extract보다 높았으며, 총 플라보노이드 함량 또한 물 추출물이 84 \pm 1.72 mg CE eq./g extract로 에탄올 추출물 82.8 \pm 1.65 mg CE eq./g extract보다 높았다. Kim 등(17)은 옥죽, 갈근, 산수유 등 20여종의 약용식물의 총 폴리페놀 함량을 보고하였으며, 총 폴리페놀 함량은 2.6(옥죽)~81.2 mg GAE eq./g extract(음양곽)

Table 1. Extraction yields, total polyphenol and total flavonoid contents of LOH extracts

Solvent	Extraction yields (% w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract)	Total flavonoid (mg CE/g extract)
Water	39.73	105.5 \pm 1.31 ¹⁾	84.0 \pm 1.72
Ethanol	14.99	102.1 \pm 1.82	82.8 \pm 1.65

GAE: gallic acid equivalents, CE: catechin equivalents.

¹⁾Values represent means \pm SD (*n*=3).

Table 2. DPPH, alkyl and hydroxyl radical scavenging activity of the LOH extracts measured by an ESR spectrophotometer

Extract	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Alkyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Hydroxyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)
Water	0.021±0.002 ¹⁾	0.011±0.003	0.395±0.002
Ethanol	0.010±0.003	0.012±0.002	0.443±0.002
Vitamin C	0.003±0.001	0.011±0.003	0.021±0.002

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

의 범위로 왕취뽕나무잎 추출물이 약용식물보다 총 폴리페놀 함량이 높은 것으로 나타났다.

ESR을 이용한 라디칼 소거 활성

DPPH는 보라색의 비교적 안정한 자유 라디칼로서 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 일반적으로 많이 이용되고 있다. 왕취뽕나무잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 농도에 비례하여 증가하였으며, 물 추출물과 에탄올 추출물은 1.0 mg/mL의 농도에서 각각, 90.65%, 90.56%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. Table 2와 같이 50% 라디칼 소거능 농도인 IC₅₀ 값은 물 추출물과 에탄올 추출물 각각 0.021±0.002 mg/mL, 0.010±0.003 mg/mL로 이는 양성대조군인 비타민 C(0.003±0.001 mg/mL)보다는 약간 낮은 활성을 보였지만, 향나무잎 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값이 153.8±0.49 µg/mL인 것과 비교해 보면 왕취뽕나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 훨씬 높음을 알 수 있었다(18). 왕취뽕나무잎 추출물의 alkyl 라디칼 소거능은 물 추출물의 경우 IC₅₀ 값이 0.011±0.003 mg/mL, 에탄올 추출물의 경우에는 0.012±0.002 mg/mL로 에탄올 추출물의 알킬라디칼 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 에탄올 추출물의 알킬라디칼 소거능은 양성대조군인 비타민 C와 같은 IC₅₀(0.011±0.003 mg/mL) 값을 나타내었으며, 이것은 왕취뽕나무잎이 천연 항산화제와 비슷한 항산화 효과를 가지고 있다고 사료된다.

Hydroxyl 라디칼의 측정 결과는 Table 2와 같이 왕취뽕나무잎의 물 추출물은 IC₅₀ 값이 0.395±0.002 mg/mL로 에탄올 추출물(0.443±0.002 mg/mL)보다 더 높은 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 보였으나, 대조군인 비타민 C(0.021±0.002 mg/mL)보다는 낮은 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 왕취뽕나무잎 추출물은 높은 DPPH, alkyl 및 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 나타내었으며, 특히 alkyl 라디칼 소거 활성은 천연 항산화제로 사용되고 있는 비타민 C와 비슷한 활성을 나타내어 천연항산화제로 사용이 가능할 것으로 판단된다. 이는 비타민 C의 경우는 순수 정제 품이고 왕취뽕나무잎 추출물은 1차 추출물 형태임을 감안하면 상당히 높은 라디칼 소거능을 가지고 있다고 판단된다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

Table 3은 왕취뽕나무잎의 추출용매에 따른 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과이다. 표준물질로 Trolox를 사용하여 총 항산화력을 TEAC(mM Trolox eq./mg extract) 값으로 나타내었다. 왕취뽕나무잎의 물 추출물과 에탄올 추출물

Table 3. ABTS radical scavenging and FRAP activity of LOH extracts

Sample	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)
Water	0.073±0.12 ¹⁾	1.393±0.05
Ethanol	0.130±0.06	1.252±0.19
BHT	1.461±0.02	1.284±0.16

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, FRAP: ferric reducing antioxidant power.

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

의 항산화력은 각각 0.073±0.12, 0.130±0.06 값을 나타내었으며 BHT는 1.461±0.02 값을 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 BHT와 비교하여 낮은 활성을 보였으나 실험군 모두 시료 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 나타났으며 (data now shown), 특히 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 5.0 mg/mL의 시료의 농도에서 각각 51.10%, 50.01%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었다. Kim 등(19)의 송이즙의 ABTS 소거능이 1 mg/mL의 농도에서 7.0%인 것과 비교해 왕취뽕나무잎의 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 14.25%로 송이즙보다 두 배 이상 높은 것으로 나타났다.

FRAP을 이용한 총 항산화력

FRAP법은 전자공여 능력을 통해 산화 활성을 검증하는 방법 중 하나로 즉 산화제로 작용하는 Fe³⁺와 항산화제와의 반응을 통해 생성된 Fe²⁺을 흡광도를 통해 정량할 수 있는 방법으로 본 연구에서는 항산화 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 그 결과 왕취뽕나무잎의 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 효과를 보였을 뿐만 아니라 양성 대조군인 BHT보다 높은 활성을 나타내었다(Table 3). 한편, Santas 등(20)은 높은 페놀 함량은 높은 항산화력과 관련이 있다고 보고하였는데, 왕취뽕나무잎 추출물 또한 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높았기 때문에 항산화 활성 또한 우수한 결과가 나타난 것으로 판단된다.

환원력

일반적으로 다른 물질에 대한 환원능력이 높을수록 항산화 활성이 높은 것으로 평가하고 있으며, 따라서 본 연구에서는 환원력을 측정하여 항산화 활성을 검증하는 수단으로 이용하였다(21). 왕취뽕나무잎 추출물의 Fe³⁺를 Fe²⁺로 환원시키는 환원력을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 왕취뽕나무잎 추출물의 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 농도 1.0 mg/mL에서 물 추출물은 1.156,

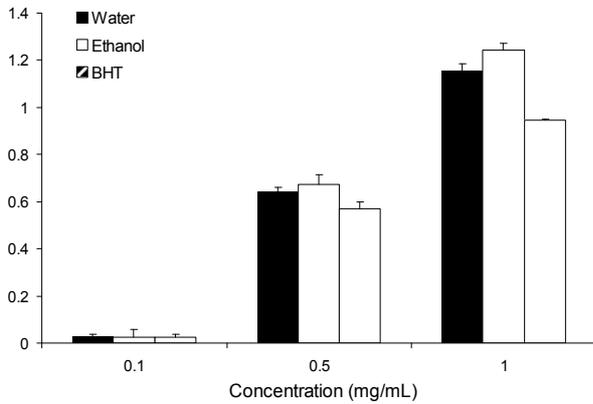


Fig. 1. Reducing power of water and ethanolic extracts from LOH at various concentrations.

에탄올 추출물은 1.243의 흡광도 값을 나타내어 같은 농도에서 대조구인 BHT의 0.939보다 높은 활성을 나타내었다.

지질과산화 억제 활성

왕귀퉁나무잎 추출물을 첨가하여 FTC와 TBA 방법으로 지질과산화 억제활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 왕귀퉁나무잎 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 과산화지질이 생성되어 흡광도가 점차적으로 증가하였으며 6일째의 최고치를 지나 8일째는 감소하는

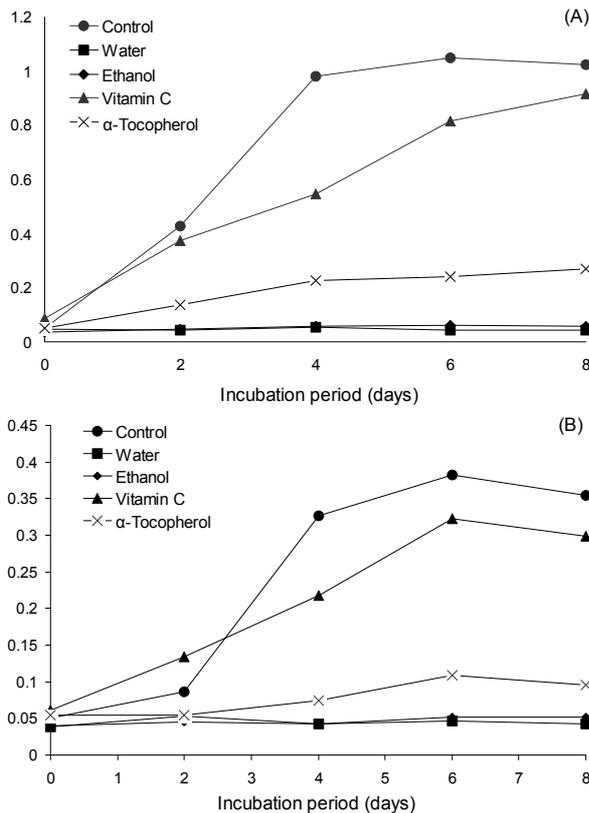


Fig. 2. Antioxidant activities of LOH extracts at 1.0 mg/mL in linoleic acid autooxidation system measured by the ferric thiocyanate method (A) and the thiobarbituric acid method (B).

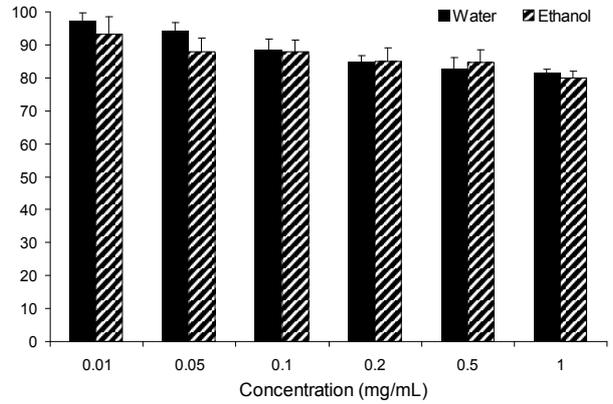


Fig. 3. Effect of LOH extracts on cytotoxicity in Chang cells. LOH extracts were treated with various concentrations in Chang cells for 24 hr. Values are expressed as the mean \pm SD of determinations made in triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

경향을 나타내었다. 그러나 왕귀퉁나무잎의 물 추출물과 에탄올 추출물을 첨가한 처리군 둘 다 FTC와 TBA 방법 모두 8일째까지 지질과산화가 일어나지 않았다. 또한 양성대조군으로 사용한 천연 항산화제인 비타민 C, α -토코페롤보다 뛰어난 지질과산화 억제 효능을 나타내었다. 따라서 왕귀퉁나무잎 추출물은 앞으로 항산화 효과가 높은 천연 자원으로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

독성 평가

정상 간세포(human liver, Chang cells)에 대한 왕귀퉁나무잎 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 왕귀퉁나무잎 추출물을 농도별로 처리한 결과 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 0.5 mg/mL 농도 이하에서는 간세포에서 전혀 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3). 따라서 향후 왕귀퉁나무잎은 천연 항산화제로서의 가능성이 높을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 왕귀퉁나무잎(*Ligustrum ovalifolium* H.) 추출물의 항산화 활성을 탐색하고자 물과 에탄올로 각각 추출하였다. 왕귀퉁나무잎에 포함된 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 물 추출물(105.5 \pm 1.31 mg GAE/g extract)과 에탄올 추출물(102.1 \pm 1.82 mg GAE/g extract)은 비슷한 총 폴리페놀 함량을 함유하고 있었으며, 총 플라보노이드 함량 또한 물 추출물(84 \pm 1.72 mg CE/g extract)과 에탄올 추출물(82.8 \pm 1.65 mg CE/g extract)이 비슷한 양을 함유하고 있었다. ESR을 이용한 라디칼 소거능을 측정된 결과, hydroxyl 라디칼을 제외한 DPPH, alkyl 라디칼 소거능은 물 추출물 및 에탄올 추출물 모두 높은 활성을 나타내었다. 특히 alkyl 라디칼 소거능은 비타민 C와 같은 활성을 나타내었다. ABTS를 이용한 라디칼 소거활성, FRAP을 이용한 총항산화능 측정 및 환원력을 통한 항산화 활성을 측정

한 결과에서도 왕귀퉁나무잎 추출물이 뛰어난 항산화효과를 가지고 있음이 확인되었다. 특히, FTC 및 TBA법을 이용한 지질과산화 억제 효능을 살펴본 결과, 왕귀퉁나무잎 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 지질과산화 억제효과가 높았으며 α -토코페롤보다 활성이 훨씬 우수하였다. 한편, 세포독성을 살펴보기 위하여 정상 간세포(human liver, Chang cells)를 이용하여 MTT assay를 통한 세포의 생존율을 살펴본 결과 물 추출물 및 에탄올 추출물 모두 0.5 mg/mL의 농도까지 전혀 독성을 나타내지 않았다. 따라서 이 연구를 바탕으로 앞으로 왕귀퉁나무잎을 이용한 천연 항산화제로서의 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 충주대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. 1999. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan-induced diabetic mice. *Korean J Pharmacogn* 30: 123-129.
- Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MU, Kwon OJ. 2008. Screening of biological activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 276-281.
- Huang MT, Ho CT, Lee CY. 1992. Phenolic compounds in food. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. Maple Press, New York, NY, USA. Vol 99, p 2-7.
- Lee SJ, Sung NJ, Jeong HG, Shin JH, Chung YC, Seo JK. 2008. Antioxidant activities of methanol extracts from *Prunella vulgaris*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1535-1541.
- Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camella japonica* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 93-100.
- Lee SM, Son ES, Oh SS, Han DS. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J Dietary Culture* 16: 504-514.
- Lee BB, Chun JH, Lee SH, Park HR, Kim JM, Park EJ, Lee SC. 2007. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1628-1632.
- Koichi M, Toshio Y, Yoshiko K, Masao K. 1997. Acylated triterpenoids from *Ligustrum ovalifolium*. *Phytochemistry* 46: 977-979.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
- Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
- Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK, Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of β -chitooligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 14: 24-28.
- Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
- Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 129-135.
- Kikuzaki H, Nakatani N. 1993. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J Food Sci* 58: 1407-1410.
- Je JY, Park PJ, Kim EK, Ahn CB. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusa caulis* in liquamen. *Food Chem* 113: 932-935.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
- Ryu MJ, Lee SY, Cho SH, Park Y. 2010. Antimicrobial activity and antioxidative effect of *Juniperus chinensis* and protective effects on human HaCaT keratinocyte. *J Korean Soc Aesth Cos* 8: 107-116.
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (pine mushroom). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 555-560.
- Santas J, Carbo R, Gordon MH, Almajano MP. 2008. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chem* 107: 1210-1216.
- Song HS, Kim DP, Jung YH, Lee MK. 2007. Antioxidant activities of red Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) against lipid peroxidation and the formation of radicals. *Korean J Food & Nutr* 20: 150-157.

(2011년 9월 15일 접수; 2011년 10월 19일 채택)