

## 生藥의 抗酸化活性檢索 研究

韓秉勳 · 柳時容 · 朴明煥 · 李愷禎

서울대학교 生藥研究所

### Antioxidant Activity Screening on Crude Drugs

Byung Hoon HAN, Shi Yong Yoo, Myung Whan PARK, and Hye Jung LEE

Natural Products Research Institute, Seoul National University

In vivo antioxidant activities were screened over 30 kinds of crude drugs which are most frequently prescribed in oriental medicine.

Of these, only Ginseng Radix, Cimicifugae Rhizoma, Zingiberis Rhizoma (steam dried), Alismatis Rhizoma, and Liriopes Tuber were shown to be positive in the activity.

### 序 論

모든 組織細胞內에 存在하는 過酸化脂質과 抗酸化劑는 人體의 老化和 관련된 諸疾病들과 연관시켜 종종 論議되어 왔다.<sup>1-5)</sup> 즉 組織細胞中에 蓄積되는 過酸化脂質은 lipofuscin 色素의 先驅物質<sup>6-8)</sup>이고 이 色素는 細胞가 老化됨에 따라 비례적으로 증가하며<sup>2,6)</sup> 여러 抗酸化劑는 過酸化脂質의 組織細胞中에서의 生成과 蓄積을 抑制한다고 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

最近 生體內에서 이 脂質過酸化를 抑制하는 抗酸化劑에 대한 研究가 여러 老人病研究者들에 의하여 進行되어지고 있다.

그러나 이들 抗酸化劑에 對한 研究는 몇몇 알려진 抗酸化劑에 局限되어 있고 特히 生藥 自體에 對하여는 diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH)法에 依한 *in vitro* test만이 보고되었고<sup>9)</sup> 生藥內 試驗(*in vivo*)에 依한 過酸化反應抑制效果를 檢索한 例는 아직껏 報告된 바 없다.

本報에서는 ethanol投興에 의하여 過酸化脂質을 誘導하는 G.H. Kalish의 실험방법<sup>10)</sup>에 對하여 檢討함으로써 抗酸化活性에 대한 動物實驗法

을 部分的으로 改良하였으며 이 方法을 利用하여 30種 生藥에 對한 抗酸化作用을 檢索한 結果 人蔘, 乾薑, 澤瀉, 麥門冬, 升麻등이 뚜렷한 作用을 나타냈음을 알 수 있었다.

### 實 驗

#### 가) 試料의 調製

##### 1) 試料生藥의 選定

方藥合編 收載 處方箋에 出現하는 各 生藥들을 그 處方出現頻度數<sup>11)</sup>에 따라 上位로부터 30種을 選定하였다. 즉 甘草, 當歸, 茯苓, 陳皮, 人蔘, 白朮, 川芎, 半夏, 白芍藥, 黃芩, 熟地黃, 蒼朮, 厚朴, 防風, 肉桂, 香附子, 桔梗, 木香, 枳殼, 黃芪, 柴胡, 乾薑, 羌活, 升麻, 黃蓮, 白芷, 附子, 槐花, 澤瀉, 麥門冬이 選定되었고 이들은 市販生藥을 購入하였다.

##### 2) 試料의 調製

試料生藥을 粗切하고 適當량을 取하여 약 5倍 容量의 80% MeOH로 水浴上에서 5시간 還流시켜 抽出한후 溫時濾過하고 濾液을 減壓濃縮하여 各 生藥의 건조 MeOH엑기스를 만들었다.

건조 MeOH 엑기스를 2% Tween 80 溶液中에

녹이거나 헐탁시켜 이 용액 1ml는 乾燥生藥 100mg에 相當하는 MeOH엑키스분을 含有하게 하여 이를 high dose sample로 사용하였고 high dose sample을 2% Tween 80 溶液으로 10倍 희석하여 low dose sample로 使用하였다.

나) 實驗動物

種의 區別없이 17~23g 體重의 컷 생쥐를 使用하였으며, 飼料는 市販 固型飼料를 써서 飼育하였으며 各 群의 動物數는 4~6마리로 하였다.

다) 試料의 投與

前記한 바와 같이 調製한 試料를 1日 1回 2日 간 經口投與하였다. 1回 投與量은 各 試料를 0.3ml씩 投與하였으며 이 量은 各 生藥으로서 30mg(high dose; 100g/60kg.b.w) 및 3mg(low dose; 10g/60kg.b.w)에 해당된다. 對照群은 2% Tween 80 溶液 0.3ml를 投與하였고 實驗期間中 飼料와 물은 충분히 供給하였다.

라) 肝組織中에서의 過酸化脂質의 誘導와 定量

原則적으로 G.H. Kalish의 方法<sup>10)</sup>을 따랐으며 飼料供給時間과 fasting time을 調節하였다. (Fig. 1~3) 즉 2回 試料를 投與한 다음 飼料供給을 中斷하고 3시간 후에 20g 體重當 50% EtOH 0.3ml씩을 투여하였다.

對照群은 Saline溶液 0.3ml씩을 投與하였다.

EtOH 投與후 12시간 동안 飼料供給을 中斷한 후 즉시 동물을 脛髓切斷하여 죽인 다음 腹開하여 肝을 摘出하였다.

肝組織中의 過酸化脂質定量은 F. Masugi의 thiobarbituric acid (TBA)法<sup>12)</sup>의 變法<sup>13,14)</sup>을 使用하였다. 즉 同一群의 動物들의 肝을 습하여 saline溶液으로 씻어 신속히 秤量하고 肝重量의 5배 容量에 相當하는 M/20 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)를 가한 후 水浴中에서 3分間 homogenation 하였다.

Homogenate 0.5ml씩을 共栓試驗管에 取하여 0.4ml의 10% Sod. dodecylsulfate溶液을 가하고 37°C 恒溫槽에서 30分間 incubation하였다. 이 homogenate mixture에 2ml 0.1N HCl와 1ml 1.0% TBA 溶液을 가하고 95°C 水浴上에서 50分間加熱하여 赤色の TBA pigment를 얻었다.

흐르는 물로 냉각시킨 후 5ml BuOH로 抽出하고 3,000 r.p.m.에서 10分間 遠心分離하여 BuOH層을 取하여 535nm에서 吸光度를 測定하였다.

結果 및 考察

1) 肝組織中에서의 過酸化脂質生成量은 EtOH 投與 후 飼料供給의 여부에 따라 그림 1에서와 같은 變動을 나타내었다.

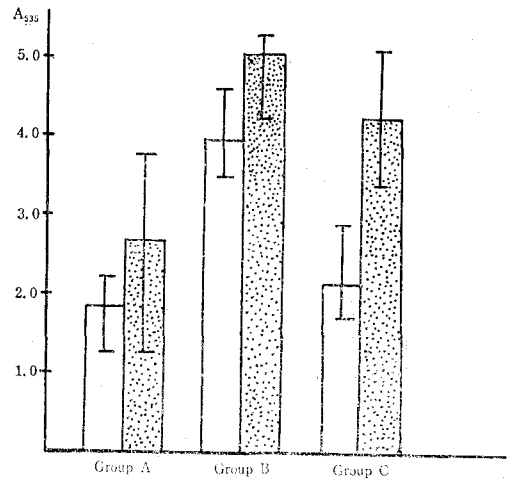


Fig. 1. Relation of lipid peroxide content with intoxication time and feeding.

□ : Blank

▨ : Ethanol intoxication

Group A; 24 hours ethanol intoxication with freely feeding.

Group B; 24 hours ethanol intoxication without feeding.

Group C; 12 hours ethanol intoxication without feeding.

즉 EtOH投與후 飼料供給을 자유롭게 하여준 Experiment No. 1 (G.H. Kalish Method)<sup>10)</sup>에서는 EtOH投與群의 個體差異가 심하게 나타났다.

이러한 個體差異는 各 動物이 EtOH投與후 혼수상태에서 깨어나 飼料를 먹기 시작하는 시간 이 서로 相異함으로써 일어났으리라 考 생각된 바 EtOH投與후 24시간 동안 飼料供給을 中斷시킨 experiment No. 2를 行하였다. 이때는 ethanol群의 개체차이가 감소된 반면 對照群의 過酸化脂質生成量이 뚜렷하게 증가되었다. 이는

사료공급 중단으로 말미암아 體內에 存在하는 NADPH, glutathione 등 生體內還元劑의 상대적 減少로 인한 結果<sup>15)</sup>로 생각된다.

2) 이와 같은 實驗法의 短點을 보완하고자 ethanol투여 이후 飼料供給을 중단시키고 過酸化脂質生成量의 變化를 經時的으로 測定하는 experiment No. 3을 行한 결과 (Fig. 2)에서와 같은 結果를 얻었다.

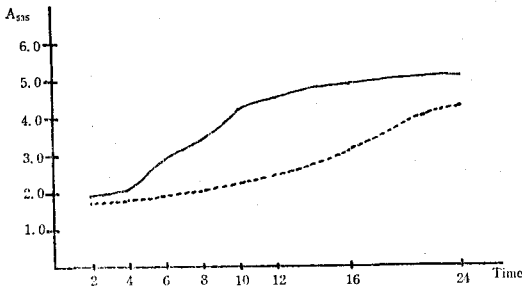


Fig. 2. Time course change in lipid peroxide content in mouse liver after ethanol intoxication  
— Ethanol intoxication group  
..... Blank group

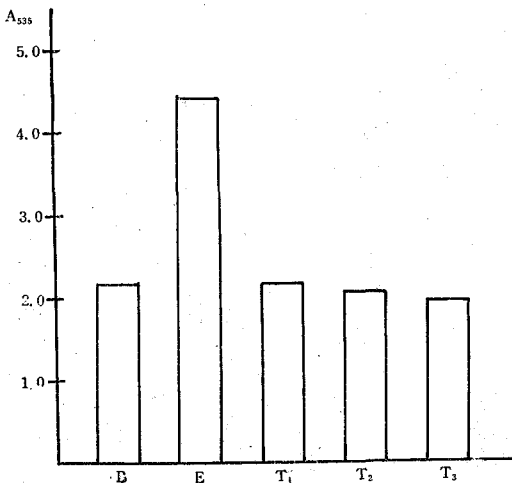


Fig. 3. Antioxidant effect of  $\alpha$ -Tocopherol  
B: Blank  
E: Ethanol control  
T<sub>1</sub>:  $\alpha$ -Tocopherol administered once  
T<sub>2</sub>:  $\alpha$ -Tocopherol administered twice  
T<sub>3</sub>:  $\alpha$ -Tocopherol administered for three times

EtOH투여 이후 12시간이 경과한 후에 EtOH투여群과 對照群의 過酸化脂質生成量은 가장 뚜렷

한 차이를 나타냈으므로 이후의 生藥抗酸化活性 평가실험에서는 EtOH投與후 12시간 후에 過酸化脂質生成量을 測定하는 變法을 採擇하였다.

3) 上記 方法에 따라 既知 抗酸化劑인  $\alpha$ -Tocopherol(Vitamin A)投與이후 脂質過酸化가 뚜렷하게 抑制되는 것을 확인하였다<sup>13, 15)</sup>.

4) 各 生藥試料投與 후 脂質過酸化를 抑制하는 效果를 各生藥의 抗酸化效果로 하여 다음 式에 準하여 各 生藥의 抗酸化效果值(Antioxidant effect value)를 算出하였다.

$$\text{Antioxidant effect value(A.E.)} = \frac{A_{535}S - A_{535}B}{A_{535}E - A_{535}B}$$

A<sub>535</sub>B: Blank群의 535nm에서의 흡광도

A<sub>535</sub>E: Ethanol群의 535nm에서의 흡광도

A<sub>535</sub>S: Sample群의 535nm에서의 흡광도

Table 1: Antioxidant effect value of herbs

Sample		AE
Glycyrrhizae Radix	L/H	0.66/1.18
Angelicae gigantis Radix	L/H	1.20/1.10
Hoelen	L/H	0.67/0.78
Aurantii Pericarpium	L/H	0.81/0.68
Ginseng Radix	L/H	0.55/0.45
Atractylodes Rhizoma alba	L/H	0.90/0.90
Cnidii Rhizoma	L/H	0.60/1.07
Pinelliae Tuber	L/H	0.81/0.51
Paeoniae Radix alba	L/H	0.73/0.93
Scutellariae Radix	L/H	1.23/0.71
Atractylodes Rhizoma	L/H	1.08/0.84
Magnoliae Cortex	L/H	1.11/1.06
Phellopteri Radix	L/H	1.79/1.52
Cinnamomi Cortex	L/H	0.58/1.00
Cyprei Rhizoma	L/H	1.00/1.03
Platycodi Radix	L/H	0.82/1.18
Helenii Radix	L/H	0.61/0.94
Ponciri Fructus	L/H	1.37/0.63
Astragali Radix	L/H	1.23/0.86
Bupleuri Radix	L/H	2.17/1.72
Zingiberis Rhizoma	L/H	0.55/0.45
Angelicae koreanae Radix	L/H	0.74/1.11
Cimicifugae Rhizoma	L/H	0.50/0.30
Coptidis Rhizoma	L/H	0.93/0.84
Angelicae davuricae Radix	L/H	1.10/0.85

Aconiti Tuber	L/H	1.81/0.92
Sophorae Flos	L/H	0.48/0.83
Alismatis Rhizoma	L/H	0.53/0.29
Liriopes Tuber	L/H	0.41/0.29

\* A.E(Antioxidant effect value) =  $\frac{A_{535}S - A_{535}B}{A_{535}E - A_{535}B}$   
 $A_{535}B$ : represents the optical density at 535nm of the blank group,  $A_{535}E$ : control group  
 $A_{535}S$ : sample treated group.

\* L: low doses  
 H: high doses

各生藥에 對한 抗酸化效果值(A.E)를 표 1에 열거하였다.

편의상 抗酸化效果值가 0.5이하에 해당하는生藥에 대하여 抗酸化活性 陽性으로 定하였고 dose dependency를 나타내지 않는生藥은 제외하였다

### 結 論

Ethanol投與에 依하여 induction된 過酸化脂質含量을 指標로 하여 藥物의 抗酸化活性을 평가하는 G.H. Kalish등의 動物實驗法에 對한 再檢討를 하여 改變하였으며 改變된 實驗法을 利用하여 脂質過酸化에 對한 抗酸化活性을 生藥30種에 對하여 檢索한 結果 人蔘·乾薑·澤瀉·麥門冬·升麻등의 生藥에서 뚜렷한 活性을 觀察할 수 있었다.

### 參 考 文 獻

1. Recknagel R.O., Ghoshal A.K.; *Lab. Invest.*,

15, 132 (1966)  
 2. 坂本信夫; 過酸化脂質の問題點 p.43 東京 田邊製藥 編  
 3. Aoyama S., Iwasaki M.; *Japan Heart J.*, 6, 128 (1968)  
 4. Iwagami M.; *Nagoya J. Med. Sci.* 28, 50 (1965)  
 5. Nishigaki I.; *Vitamins* (Kyoto), 37, 617 (1968)  
 6. Hirai S. and Yoshikawa M.; *Internat'l. Sym. on Vit. E.* (Hakone) p.228 (1969)  
 7. Yoshikawa M. and Hirai S.; *J. Gerontol.*, 22, 162(196)  
 8. 大澤仲昭, 井林博; *ホルモンと臨床*, 17, 42 (1969)  
 9. Han B.H., Han Y.N., Park M.H.; *Kor. J. Pharma. Soc.* 21(4), 223  
 10. Kalish G.H. and Lizio D.N.R.; *Science*, 152 1390, (1966)  
 11. 洪文和; *생약학회지* 3(2). 57-64 (1972)  
 12. Masugi F. and Nakamura T.; *Vitamins(Japans)*, 51(1), 21 (1977)  
 13. Han B.H., Park M.H., Woo L.K., Woo W.S., and Y.N.; *Pro. 2nd Internat'l. Ginseng Sym.*, p.13 (1978)  
 14. Han B.H., Park M.H.; *Kor. J. Pharmacog.*, 9 (4), 169-171 (1978)  
 15. Masugi F., Nakamura T.; *Internat'l. J. Vit. Nutr. Res.*, 46, 187 (1976)