

DPPH법에 의한 항산화활성 평가

이동진[†] · 이지영

단국대학교

I. 서 언

오존층의 파괴로 인한 환경 변화에 의해서, 지표에 도달하는 자외선의 양은 점점 증가하고 있다. 피부는 신체의 제일 바깥층에 위치하기 때문에 이 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다. 피부에 대한 자외선의 작용으로 피부에서는 free radical인 활성산소종이 생성된다. 피부가 계속적으로 자외선에 노출되게 되면 과잉의 활성산소가 생성되고 이들 활성산소종들은 피부 항산화방어계를 붕괴시키고 이어서 피부 세포 및 조직 손상 그리고 세포 사멸을 초래, 피부 광노화가 촉진되어 색소 침착, 즉 기미 등이 생성되기도 한다.

또한 최근 노화와 성인병 질환의 원인이 생체 내에서 발생하는 하이드록실라디칼($\cdot OH$), 슈퍼옥사이드라디칼($\cdot O_2^-$), 과산화수소(H_2O_2)등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 산화적 대사 부산물이 중요한 원인이 된다는 학설이 있으며(Wiseman, 1996), 또한 활성 산소종이 당백질, 생체막, DNA등에 유해한 작용을 하게 됨에 따라 활성 산소종을 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Chang et al., 1977). 활성산소종을 제거하는 생체내 항산화 물질로는 superoxide dismutase, peroxidase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소와 tocopherol, ascorvate, carotenoid, flavonoid 등의 많은 종류의 저분자 항산화물질이 있으며 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며(Hammerschmidt & Pratt, 1977; Kitahara et al., 1992a) BHT, BHA, Troxol C 등의 합성 항산화제도 많이 개발되어 의약품과 식품분야 등에서 이용되고 있다.

항산화 효과가 있는 물질은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성의 물질들이다(Shin, 1997). 탁월한 항산화 효능과 경제성 때문에 인공합성 항산화제가 많이 이용되어 왔으나 안전성에 대한 논란뿐만 아니라(Ito et al., 1983) 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항산화제가 대량으로 투여된 동식물 실험에서 발·암성이 보고 되고 있어(Frankel, 1996) 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다. 이로 인하여 효력이 탁월하고 보다 안전한 새로운 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-550-3622 (E-mail) dongjlee@dankook.ac.kr

II. 분석방법

1. 시약 및 기구

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical): Sigma. Cat. # D-9132
 Standard substance: Tocopherol(vitamin E) 또는 Ascorbic acid: Sigma. Cat #
 Mecoroplate Reader: 96-well microplate reader or Spectrophotometer
 Vacuum pump & speed vac (=centra vac)
 96 well microplate 또는 시험관
 MeOH (EtOH): 국산 solvent 또는 A.C.S. grade solvent
 Micro pipette (200 μ L) or (1 mL, 5 mL)
 Multichannel pipette (50-200 μ L)
 Yellow tip (50-200 μ L) or blue tip (1 mL) & 5 mL tip

2. 분석

1) 시료추출

시료는 시료의 상태에 따라 80% MeOH(또는 EtOH) 또는 100% MeOH(또는 EtOH)에서 약 1주일 간 추출한다. 시료 추출 시 간혹 추출액으로 사용하는 용매로 다른 용매를 첨가하여 추출하는 경우도 있다.

[실험의 종류에 따라 추출하는 방법도 약간씩 달라지는데 동종의 시료들을 가지고 실험을 할 경우]

- ① 추출액만으로 시료들의 활성도 차이를 알려할 때 : 정확히 동일하게 시료의 무게를 재고, 이 시료들에 넣어주는 solvent의 양도 동일해야 한다. 마찬가지로 이들의 추출 시간도 동일하게 해 준다.
 - ② IC50 값을 구하기 위하여 정량실험을 할 경우 : 시료 (약 2-5 g정도)와 solvent를 작은 vial에 담아 일주일 간 추출한다. 추출하는 solvent의 양은 보통 시료가 잠길 정도가 적당하다. 일주일 후 추출액 약 500 μ L 정도를 e-tube에 취해 Vacuum pump와 speed vac을 이용하여 완전히 건조시킨다.
- ※ 시료 추출액을 취하기 전에는 반드시 e-tube의 무게를 측정하여야 한다. (시료가 완전히 건조된 후 e-tube의 무게를 측정하면, 건조된 시료의 실제 무게를 알 수 있다)

2) DPPH 용액 제조 및 약물(실험 ②의 경우) 제조

DPPH(FW : 394.3) 용액 제조 : DPPH 용액은 MeOH 또는 EtOH로 만든다.

	150 μ M DPPH 용액	300 μ M DPPH 용액
DPPH :	59.145 mg	118.29 mg
MeOH :	1000 mL	1000 mL

약물제조:

300 µg/mL 농도의 항산화활성을 알고 싶을 때

- i) 96 well microplate로 실험 할 경우 (total volum 250 µl)
sample stock 농도 : 750 µg/mL=0.75 mg/mL
- ii) 5 mL tube에 실험 할 경우 (total volum 3.5 mL or 2.5 mL)
sample stock 농도 : 420 µg/mL=0.42 mg/mL or 750 µg/mL=0.75 mg/mL

500 µg/mL 농도의 항산화활성을 알고 싶을 때

- i) 96 well microplate로 실험 할 경우 (total volum 250 µl)
sample stock 농도: 1250 µg/mL=1.25 mg/mL
- ii) 5 mL tube에 실험 할 경우 (total volum 3.5 mL)
sample stock 농도 n: 700 µg/mL=0.70 mg/mL

3) 항산화성 검정

- ① 추출액만으로 시료들의 활성도 차이를 알려할 때
 - i) 96 well microplate로 실험 할 경우
- ② 동일한 조건에서 추출한 추출액을 1번 (negative control)과 2번 line의 각 well에 100 µL 씩 넣어준다.
- ③ 1번과 3번, 5, 7, 9, 11번 line에 MeOH 150 µL를 넣어준다. - blank well
- ④ G11번과 G12번 well에는 추출액 대신 Ascorbic acid (standard substance) 100 µL를, H1, H12 well에는 추출액 대신 MeOH 100 µL를 넣어준다. - control line (예비실험을 통해 control 값이 line 과 관계없이 일정하면 2차 실험부터는 Positive control line

**96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	drug 1 B.	drug 1	drug 9 B.	drug9	drug17 B.	drug 17
B	drug 2 B.	drug 2
C	drug 3 B.	drug 3
D	drug 4 B.	drug 4
E	drug 5 B.	drug 5
F	drug 6 B.	drug 6	drug 41B	drug 41
G	drug 7 B.	drug 7	p-cont. B	p-cont.
H	cont. B.	control	cont. B.	control	cont. B.	control	cont. B.	control	cont. B.	control	cont. B.	control

약물 B. : drug blank=drug 100 µL+MeOH 150 µL

약물=drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. : Standard substance (Positive Control)=Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. B. : positive control blank=Ascorbic acid solution 100 µL+MeOH 150 µL

Control=MeOH 100 µL+DPPH solution 150 µL

cont. B. : Control blank=MeOH 250 µL

과 마찬가지로 H11과 H12 well에만 넣어준다)

④ 2번 line과 4번, 6, 8, 10, 12번 line에 150 μM DPPH solution 150 μL 를 넣어주고 30분간 37°C에서 반응시킨다.

⑤ 마지막으로 518 nm에서 흡광도를 측정한다.

ii) 5 mL tube에 실험 할 경우

i)의 방법과 마찬가지로 시료에 대한 blank와 control 그리고 positive control을 준비 하되, 그 양만 다르게 한다. 즉 총량을 3 mL로 할 경우 시료의 양을 2.5 mL을 넣어 주고, 300 μM DPPH 용액의 양을 1 mL을 넣어주어 37°C에서 30분간 반응시킨다. 마지막으로 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 150 μM DPPH 용액으로 실험 할 경우에는 시료의 양을 1 mL, DPPH 용액의 양을 1.5 mL로 하여 실험한다.

※ 만약 시료의 추출액 농도가 진할 경우에는 후자의 방법을, 시료의 추출액 농도가 흐릴 경우에는 전자의 방법을 택하는 것이 적합하다. 또한 시료의 종류에 따라 실험 전 여과를 한 후 여과액만을 가지고 실험을 하는 경우도 있다(추출액 중에 분말 등의 다른 물질들이 있을 경우).

② IC₅₀ 값을 구하기 위하여 정량실험을 할 경우

i) 96well microplate로 실험 할 경우(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 시작으로 1/3씩 3번 희석하여 실험 할 경우)

[시료의 색이 거의 투명한 경우]

① 1의 ②에서 준비한 시료들을 MeOH를 이용하여 각 시료들에 대한 0.75 mg/mL 농도의 stock solution을 만든다.

② 각 시료의 stock solution을 각각 1/3씩 희석하여 약물(약물 번호 b)을 만들고, 다시 이것들을 1/3로 희석한 약물들(약물 번호 c)을 만든다.

③ 모든 약물의 준비가 끝난 뒤 96 well plate의 1번과 5번, 그리고 9번 line에 MeOH을 150 μL 씩 넣어준다.

④ H1~12 well에 MeOH 100 μL 를 넣어준다. -control line

⑤ A1 well에는 ①에서 준비한 0.75 mg/mL의 약물 1a를 100 μL 넣어주고, B1 well에는 동일한 농도의 약물 2a를 100 μL 넣어준다. 마찬가지로 약물 3~20번 까지 1, 5, 9번 line의 well에 각각 100 μL 씩 넣어준다. -약물의 blank line

※ G9번 well에는 약물 대신 standard substance인 Ascorbic acid의 stock solution을 100 μL 넣어준다. 이때, Ascorbic acid의 stock solution 농도는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 적당하다 (Ascorbic acid의 IC₅₀값이 10 이하이므로..).

⑥ 2번 line의 well에도 ⑤에서와 동일한 시료 100 μL 씩을 각각의 well에 넣어주고, 3번과 4번 line의 well에는 ②에서 준비한 약물 번호 b와 약물번호 c를 각각 100 μL 씩 넣어준다.

※ G10~12번 well 역시 약물 대신 standard substance인 Ascorbic acid를 위와 같이 넣어준다.

⑦ 마지막으로 2-4번, 6-8번, 10-12번 line에 150 μM DPPH solution 150 μL 를 넣어주고 30분간 37°C에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다.

DPPH법에 의한 항산화활성 평가

**96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	drug 1 B. drug 1a	drug 1b	drug 1c	drug 8 B	drug 8a	drug 8b	drug 8c	?	?	?	?	?
B	drug 2 B. drug 2a	drug 2b	drug 2c	?	?	?	?	?	?	?	?	?
C	drug 3 B. drug 3a	drug 3b	drug 3c	?	?	?	?	?	?	?	?	?
D	drug 4 B. drug 4a	drug 4b	drug 4c	?	?	?	?	?	?	?	?	?
E	drug 5 B. drug 5a	drug 5b	drug 5c	?	?	?	?	?	?	?	?	?
F	drug 6 B. drug 6a	drug 6b	drug 6c	?	?	?	?	drug 20 B	drug 20a	drug 20b	drug 20c	
G	drug 7 B. drug 7a	drug 7b	drug 7c	?	?	?	?	p-cont. B	p-cont. a	p-cont. b	p-cont. c	
H	cont. B. control a	control b	control c	cont. B. control a	control b	control c	cont. B. control a	control b	control c			

약물 B. : drug blank=750 µg/mL drug 100 µL+MeOH 150 µL

약물번호 a=750 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

약물번호 b=250 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

약물번호 c=81 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. B. : positive control blank=25 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+MeOH 150 µL

p-cont. a. : positive control blank=25 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. b. : positive control blank=8.1 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. c. : positive control blank=2.7 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

cont. B. : Control blank=MeOH 250 µL

control=MeOH 100 µL+DPPH solution 150 µL

[시료의 색이 짙은 경우]

: 모든 과정을 위의 과정과 마찬가지로 실험하되, 시료 희석액 (b, c)에 대한 blank도 각 well에 넣어주어 실험한다(색이 진한 시료일수록 시료자체의 파장이 높아 항산화활성이 본래 값보다 더 낮게 나올 수 있으므로, 계산상의 오차를 줄이기 위함).

ii) 5 mL tube에 실험 할 경우 (300 µg/mL 농도를 시작으로 1/3씩 3번 희석하여, total volum 3.5 mL로 실험 할 경우)

① i)의 방법과 마찬가지로 시료에 대한 stock solution과 blank, 그리고 positive control의 stock solution과 positive control의 blank를 준비한다. 단, 이때 시료의 stock 용액은 420 µg/mL이 어야 하며, DPPH 용액은 300 µM이어야 한다(만약, 150 µM의 DPPH 용액으로 실험할 경우에는 총량을 2.5 mL로 하며, 시료의 stock 농도 역시 750 µg/mL이 되어야 한다).

② i)의 ①와 마찬가지로 ①에서 준비한 각 시료의 stock solution을 각각 1/3씩 희석하여 약물(약물번호b)을 만들고, 다시 이것들을 1/3로 희석한 약물들(약물 c)을 만든다.

③ 모든 약물의 준비가 끝난 뒤 각각의 tube에 위에서 제조한 약물을 2.5 mL씩 넣어준다. i)에서와 마찬가지로 control로 쓰일 tube에는 MeOH 2.5 mL을 넣어준다.

④ 약물 blank tube와 positive control의 blank tube, 그리고 control blank tube에 MeOH 1 mL을 넣어준다.

⑤ 약물 blank tube와 positive control의 blank tube, 그리고 control blank tube만 제외하고, 모든 tube에 300 µM DPPH solution을 1 mL 씩 넣어주어 37°C 혹은 실온에서

DPPH법에 의한 항산화활성 평가

**96 well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	drug 1 B.	drug 1a	drug 1b B.	drug 1b	drug 1c B.	drug 1c	drug 8 B	drug 8a	drug 8b B.	drug 8b	drug 8c B.	drug 8c
B	drug 2 B.	drug 2a	drug 2b B.	drug 2b	drug 2c B.	drug 2c
C	drug 3 B.	drug 3a	drug 3b B.	drug 3b	drug 3c B.	drug 3c
D	drug 4 B.	drug 4a	drug 4b B.	drug 4b	drug 4c B.	drug 4c
E	drug 5 B.	drug 5a	drug 5b B.	drug 5b	drug 5c B.	drug 5c
F	drug 6 B.	drug 6a	drug 6b B.	drug 6b	drug 6c B.	drug 6c
G	drug 7 B.	drug 7a	drug 7b B.	drug 7b	drug 7c B.	drug 7c	p-cont. B	p-cont. a	p-cont. b B.	p-cont. b	p-cont. c B.	p-cont. c
H	cont. B.	cont a	cont b B.	cont b	cont c B.	cont c	cont. B.	cont a	cont b B.	cont b	cont c B.	cont c

약물번호 B. : drug blank=750 µg/mL drug 100 µL+MeOH 150 µL

약물번호c B. : drug blank=250 µg/mL drug 100 µL+MeOH 150 µL

약물번호d B. : drug blank=81 µg/mL drug 100 µL+MeOH 150 µL

약물번호a=750 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

약물번호b=250 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

약물번호c=81 µg/mL drug 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. B. : positive control blank=25 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+MeOH 150 µL

p-cont. a. : positive control blank=25 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. b. : positive control blank=8.1 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

p-cont. c. : positive control blank=2.7 µg/mL Ascorbic acid solution 100 µL+DPPH solution 150 µL

cont. B. : Control blank=MeOH 250 µL

control=MeOH 100 µL+DPPH solution 150 µL

30분 간 반응시킨다.

① 마지막으로 518 nm에서 흡광도를 측정한다.

③ 항산화활성 계산

$$AA\% = 1 - (\text{Abs sample} - \text{Abs blank}) / (\text{Abs control} - \text{Absc} - \text{blank}) \times 100$$

Abs sample : 약물+DPPH 용액이 들어있는 well의 흡광도

Abs blank : 약물+MeOH이 들어있는 well의 흡광도

Abs control : control+DPPH 용액이 들어있는 well의 흡광도

Absc-blank : control+MeOH이 들어있는 well의 흡광도

III. 분석결과

1. 약용식물의 항산화활성

학 명	항산화활성 (IC50)	학 명	항산화활성 (IC50)
Santalum album	92.3	Aster himalaicus	54.0
Punica grantum	381.0	Ixeris gracilis	218.5
Oxytropis reniformis	524.0	Acorus gramineus	695.2
Dracocephalum tanguricum	254.7	Rebus niveus	24.9
Hypocoum leptocarpum	845.5	Nardorstachy grandflora	212.3
Onosma nookeri	17.7	Aristolochia griffithii	303.7
Carthamus tinctorius	727.9	Embelica laeta	15.4
Myristica fragrans	215.1	Gentiana straminea	24.5
Strychnos nux-vomical	342.6	Tinospora sinensis	519.6
Cynanchum vince toxicum	76.4	Piper longum	881.6
Aconitum tanguricum	450.2	Chrysoplenium carnosum	414.3
Inula racemosa	943.6		

* Ascorbic acid : 2.94

참고문헌

- Bang, Y. H., S. K. Hang, H. L. Jeong, S. H. Young, S. R. Jai, S. L. Kyong, and J. L. Jung. 2001. Antioxidant benzoylated flavan-3-ol glycoside from *Celastrus orbiculatus*. Journal of Natural Products. 64 : 82-84.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Scater. 1993. Free radical in medicine. British Medical Bulletin. Churchill Livingstone, London, 49 : 479-724.
- Mensor, L. L., F. S. Menezes, G. G. Leitao, A. S. Reis, T. C. dos-Santos, C. S. Coube, and S. G. Leitao. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, Phytother. Res. 15 : 127-130.
- Xiong, Q., S. Kadota, T. Tadota, and T. Namba. 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. Biol. Pharm. Bull. 19 : 1580-1585.
- Frankel, E. N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. Food Chemistry. 57 : 51-54.
- Ito, N. S., A. Fukushima, M. Hasegawa, Shibata, and O. T. Ogis. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy antisoole in F344 rats. J. Nat. Cancer Inst. 70 : 343-347.
- Shin, D. H. 1997. The study course and movement of natural antioxidants. Kor. Food Sci & Tech. 30 : 14-18.

8. Chang, S. S., B. Ostric-Matijasevice, A. I. Hsieholiver, and C. L. Hyung. 1977. Natural antioxidants from rosmary and sage. J. Food Sci. 42 : 1102-1110.
9. Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt. 1977. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 43 : 556-561.
10. Wiseman, H. 1996. Dietary influences on membrane function; imporment in protection against oxidative damage and disease. Nutritional Biochemistry. 7 : 2-6.

Antioxidant Activity by DPPH Assay

Dong Jin Lee[†] and Ji-young Lee
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
+82-41-550-3622, dongjlee@dankook.ac.kr