

원 저

桑葉 추출물의 항산화효과에 대한 연구

이지은, 송윤경, 임형호

경원대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Studies on the Antioxidant Effects of *Mori Folium* Extract

Ji-eun Lee, Yun-kyung Song, Hyung-ho Lim

Dept. of Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Won University

Objective : The objective of this study was to investigate the antioxidant effects of *Mori Folium* extract.

Methods : Total antioxidant status was examined by total antioxidant capacity(TAC) and total antioxidant response (TAR) against potent free radical reactions. The effect of *Mori Folium* extract was examined by measuring total phenolic content, concentration at which 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity was inhibited, inhibitory effect on lipid peroxidation, and the effect on reactive oxygen species(ROS) generation.

Results :

1. TAC and TAR of *Mori Folium* extract at the concentration of 5 mg/ml were 1.61 and 1.24 mM Trolox equivalents, respectively.
2. Total phenolic content of *Mori Folium* extract at the concentration of 5 mg/ml was 1.70 mM gallic acid equivalent.
3. Concentration of *Mori Folium* extract at which DPPH radical scavenging activity was inhibited by 50% was 2.29 mg/ml as compared to 100% by pyrogallol solution as a reference.
4. The inhibitory effect of the extract on lipid peroxidation was examined using rat liver mitochondria induced by FeSO₄/ascorbic acid. *Mori Folium* extract at the concentration of 10 mg/ml significantly decreased thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) concentration. The extract prevented lipid peroxidation in a dose-dependent manner.
5. The effect of *Mori Folium* extract on reactive oxygen species(ROS) generation was examined using a cell-free system induced by hydrogen peroxide/FeSO₄. Addition of 1 mg/ml of *Mori Folium* extract significantly reduced dichlorofluorescein(DCF) fluorescence. The extract caused concentration-dependent attenuation of the increase in DCF fluorescence, indicating that the extract significantly prevented ROS generation in vitro.

Conclusion : The antioxidant effects of *Mori Folium* extract seem to be due, at least in part, to the prevention of free radical-induced oxidation, followed by inhibition of lipid peroxidation.

Key Words : *Mori Folium*, antioxidant, free radical, lipid peroxidation, reactive oxygen species

서 론

최근 급속한 고령화에 따른 만성질환의 증가로 노화 및 각종 만성질환으로부터의 건강에 대한 관

심이 증가하고 있으며, 이러한 사회적 요구에 따라 천연물로부터의 생체조절기능에 대한 연구가 증가하고 있다.

그 중 free radical들은 생체막에 존재하는 불포화 지방산을 산화시켜 막의 유동성을 저해하고, 효소와 receptor의 활성을 손상시키며, 막 단백질에 손상을 입혀 결국 세포의 불활성화를 일으키는 작용을 통하여 노화 및 각종 질병발생에 기여하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 따라서 free radical의 발생을 억제

· 접수 : 2007년 2월 15일 · 논문심사 : 2007년 2월 15일
· 채택 : 2007년 2월 28일
· 교신저자 : 송윤경, 경기도 인천시 중구 용동 117번지
경원 인천 한방병원 한방재활의학과
(Tel : 032-770-1214, Fax : 032-772-9011
E-mail : oxygen@korea.com)

하고, 이들에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호하고 노화를 예방할 수 있는 저분자 천연 항산화제 개발에 대한 연구³⁾가 활발하게 이루어지고 있다.

한의학에서는 항산화와 관련되어 白僵蠶⁴⁾, 覆盆子⁵⁾, 免絲子⁶⁾, 補骨脂^{6,7)}, 黃芩⁸⁾, 葛根^{9,10)}, 山查¹¹⁾, 大黃¹²⁾ 등의 單味에 대한 연구가 있고, 處方으로는 瓊玉膏¹³⁾, 六味地黃湯^{14,15)}, 補中益氣湯^{14,16)}, 血腑逐瘀湯¹⁷⁾, 內消黃連湯¹⁸⁾ 등이 있으며, 芍藥藥鍼¹⁹⁾, 蜂毒藥鍼²⁰⁾, 胡桃藥鍼²¹⁾ 등의 藥鍼연구들이 항산화능, 노화^{5,11,13)}, 당뇨^{16,17)}, 지질과산화^{4,19)}, 간^{4,19)}, 남성생식⁷⁾, 신경세포^{10,12)}, 항암¹⁸⁾ 등과 관련되어 보고된 바 있다.

桑葉은 桑科에 속한 낙엽교목인 뽕나무 *Morus alba* L. 및 近緣식물의 잎을 건조한 것으로, 性味는 寒無毒 甘苦하고 肺 肝經에 歸經하며 發散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目的 효능으로 感冒風熱, 肺熱潤燥, 頭痛眩暈 및 目赤昏花등의 병증에 사용되고 있다²²⁻³⁾.

실험연구로는 桑葉이 염증반응에 미치는 영향²⁴⁾과 아토피 피부염에 대한 연구²⁵⁾ 및 면역 조절 작용에 대한 연구²⁶⁾ 등이 있으며, 桑葉의 혈당 강하 효과에 대한 연구²⁷⁻³⁰⁾와 桑葉 추출물이 세포독성, 카드뮴 독성에 미치는 영향³¹⁻³⁾을 살펴본 연구 등 다양한 영역에 걸쳐 진행되고 있으나 항산화능에 대한 연구는 桑寄生의 항산화작용에 관한 연구³⁴⁻⁵⁾이외 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 桑葉의 항산화효과를 검토하고자 총 항산화능, total phenolic content 함량, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성, 지질과산화 억제 효과, reactive oxygen species(ROS) 생성 억제 효과 등을 살펴보고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

연구 방법

1. 재료

1) 桑葉 추출물의 조제

桑葉(Mori Folium)은 정선된 제품을 경원대학교 부속한방병원에서 구입하여 본 연구의 시료로

사용하였다. 분쇄한 시료 61.78 g을 80% ethanol (HPLC-grade) 700 ml로 2번 추출한 뒤 evaporation 시켰다. 최종적으로 동결건조기에서 회수된 6.65 g의 ethanol 추출물을 얻었으며, 회수율은 10.8 %로 나타났다. 확보된 桑葉 추출물은 50 mg/ml의 농도로 dH₂O에 녹여 4°C에서 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 시약

2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate(DCFH-DA; Molecular Probes, USA), 96-well plate(Becton Dickinson, USA)를 사용하였으며, 생화학적 분석에 사용한 다른 모든 화학물과 용매들은 분석급 이상의 시약(Sigma Chemical, USA)을 사용하였다.

3) 실험동물

(주)대한바이오링크로부터 구입한 6주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 실험동물로 사용하였다. 사육실의 온도는 20-25 °C를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 조절되었다. 사료와 물은 무제한 공급하였고, 1주일의 적응기간을 거친 다음 간을 절제한 후 *Hovius* 등³⁶⁾의 방법에 따라 미토콘드리아를 분리하였다.

2. 방법

1) Total antioxidant capacity (TAC) 측정

Total antioxidant status (총항산화능)는 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 방법³⁷⁾을 수정한 Erel³⁸⁾의 방법에 따라 TAC를 측정하였다. 산성 pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS)는 H₂O₂에 의해 청록색의 ABTS.+로 산화되게 된다. 만일 추출물 내 항산화물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 ABTS.+는 탈색되며, 이러한 색 변화반응의 결과는 660 nm에서의 흡광도로 조사하였다. 시료 추출물의 TAC 측정을 위해 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5, 2.25 및 3 mM의 Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

Trolox는 총항산화능 측정에 광범위하게 사용 되는 전형적인 표준시약으로, TAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다.

2) Total antioxidant response(TAR) 측정

Free radical 반응에 대한 총항산화능은 ferric reducing/antioxidant power assay(FRAP) 방법³⁹⁾을 수정한 Erel⁴⁰⁾의 방법에 따라 TAR을 측정함으로써 결정하였다. 산성 pH에서 무색의 환원형 o-dianisidine은 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical(OH·)에 의해 황갈색의 dianisidyl radical로 변화하게 된다. 만일 추출물 내에 항산화물질이 존재하게 되면, 이들 농도에 비례하여 산화반응을 억제시켜 색 변화가 감소하게 된다. 이러한 반응은 444 nm에서의 흡광도로 조사하였다. 시료 추출물의 TAR 측정을 위해 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5, 2.25 및 3 mM의 Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다. TAR 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다.

3) Total phenolic content 측정

추출물 내 총페놀함량은 gallic acid를 표준시약으로 사용하여, Singleton과 Orthofer⁴¹⁾의 방법에 따라 760 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

시료 추출물의 총 phenolic 함량 측정을 위해 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.67 및 2.5 mM의 gallic acid를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

Gallic acid는 총페놀함량 측정에 가장 많이 사용되는 전형적인 표준시약으로 총페놀함량은 mM gallic acid equivalent로 표기하였다.

4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거 활성 측정

DPPH free radical 소거활성은 Malterud 등⁴²⁾의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 ug/ml methanol)을 추출물과 혼합한 다음 515 nm에서 흡광도의 감소를 30초 간격으로 5분간 측정하였다. Free radical 소거활성은 pyrogallol용액(125 ug/ml DMSO)의 흡광도 감소를 100 %로 기준하여

표기하였다.

5) 지질과산화 측정

추출물의 지질과산화 억제효과는 간 미토콘드리아 배양액의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 농도를 측정함으로써 결정하였다. 간 미토콘드리아(0.5 mg/ml)를 10 uM FeSO₄와 100 uM ascorbic acid와 함께 추출물 농도별로 37°C에서 60분간 배양하였다.

미토콘드리아 배양액의 지질과산화는 Stacey와 Klaassen⁴³⁾의 방법에 따라 excitation 파장 530 nm와 emission 파장 590 nm에서 형광도를 측정함으로써 결정하였다.

TBARS 농도 측정을 위해 0, 16.2, 8.1, 4.05, 2.025, 1.013 및 0.506 uM의 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

6) Reactive oxygen species (ROS) 측정

Sodium hydroxide(0.008 N) 처리에 의해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 DCFH로 탈에스테르화(deesterification)되며, 생성된 DCFH는 ROS에 의해 dichlorofluorescein(DCF)으로 산화하게 된다. Cell-free system에서 1 uM H₂O₂와 10 uM FeSO₄에 의해 ROS를 생성하였다. DCF형성에 따른 형광도 증가는 LeBel 등⁴⁴⁾의 방법에 따라 excitation 파장 488 nm와 emission 파장 525 nm에서 2분 간격으로 10분간 측정하였다.

형광도 감소는 추출물 내 항산화물질에 의한 ROS 생성 억제를 나타낸다.

7) 단백질 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시약으로 사용하여 Lowry 등⁴⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다.

3. 통계 분석

추출물 농도별 TBARS 농도와 DCF의 형광도는 일원분산분석(ANOVA)을 사용하여 조사하였으며, 농도별 평균값의 차이는 Duncan's multiple

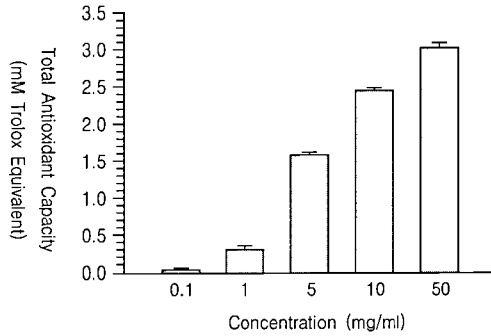


Fig. 1. Total antioxidant capacity of various concentrations of *Mori Folium* extract. Data results are expressed in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean \pm SEM of duplicate determinations.

range test를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 조사하였다.

결 과

1. Total antioxidant capacity(TAC)

Trolox 농도와 660 nm에서의 흡광도 간의 회귀 방정식은 $Y=1.403-0.321X$ (Y는 660 nm에서의 흡광도이며, X는 Trolox 농도)이었다. Trolox의 농도가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.989$) 660 nm에서의 흡광도가 감소하였다.

0.1 및 1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물의 TAC는 0.06, 0.34 mM Trolox equivalent였으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 5, 10 및 50 mg/ml 농도에서는 각각 1.61, 2.46 및

3.03 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 桑葉 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. Total antioxidant response(TAR)

Trolox 농도와 444 nm에서의 흡광도 간의 회귀 방정식은 $Y=1.076-0.174X$ (Y는 444 nm에서의 흡광도이며, X는 Trolox 농도)이었다. Trolox의 농도가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.987$) 444 nm에서의 흡광도가 감소하였다.

0.1 및 1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물의 TAR은 0.08 및 0.31 mM Trolox equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAR도 증가하여 5 및 10 mg/ml 농도에서는 각각 1.24 및 1.54 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 따라서 桑葉 추출물은

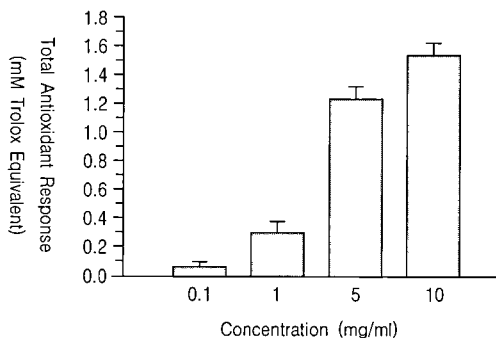


Fig. 2. Total antioxidant response of various concentrations of *Mori Folium* extract. Data results are expressed in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean \pm SEM of duplicate determinations.

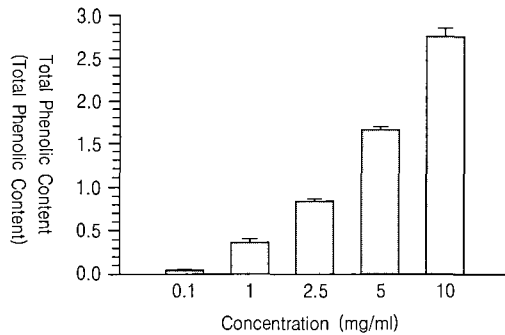


Fig. 3. Total phenolic content of various concentrations of *Mori Folium* extract. Data results are expressed in terms of mM gallic acid equivalent. Each bar represents the mean \pm SEM of duplicate determinations.

농도 의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. Total phenolic content

Gallic acid 농도와 760 nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식은 $Y=0.002+0.719X$ (Y 는 760 nm에서의 흡광도이며, X 는 gallic acid 농도)이었다. Gallic acid의 농도가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.998$) 760 nm에서의 흡광도도 증가하였다.

0.1 및 1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물의 총페놀함량은 0.04 및 0.38 mM gallic acid equivalent이며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총페놀함량도 비례적으로 증가하여 2.5, 5 및 10 mg/ml 농도에서는 각각 0.87, 1.70 및 2.78 mM gallic acid equivalent를

나타내었다(Fig. 3).

4. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성

DPPH radical은 짝을 이루지 못하는 전자쌍 때문에 진한 자색을 띠게 되며, 515 nm에서 45 ug/ml 농도의 DPPH의 흡광도는 약 1.2로 나타났다. DPPH 용액과 신속히 혼합한 시료의 흡광도 감소는 free radical 소거활성을 나타내며, 시료의 free radical 소거활성은 pyrogallol 용액의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표시하였다.

추출물 농도 0.1 mg/ml의 radical 소거활성은 11.6%이었고, 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여, 1 및 5, 10 mg/ml의 농도에서 radical 소거

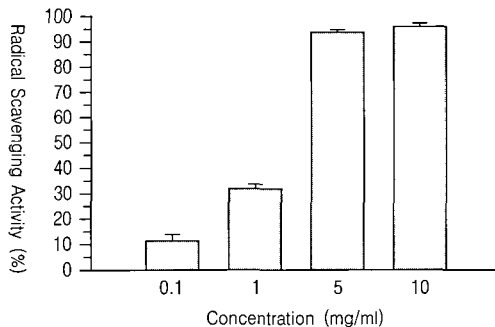


Fig. 4. DPPH free radical scavenging activities of various concentrations of *Mori Folium* extract. Data results are expressed as % radical scavenging activity relative to 100% radical scavenging activity of pyrogallol solution as a reference. Each bar represents the mean \pm SEM of duplicate determinations.

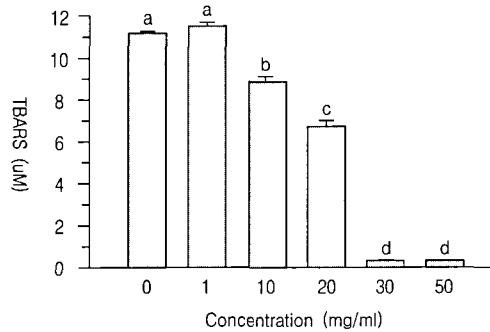


Fig. 5. The effect of *Mori Foliium* extract on lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Rat liver mitochondria were incubated with FeSO₄/ascorbic acid in the absence or presence of various concentrations of *Mori Foliium* extract. Lipid peroxidation was determined by measuring the release of TBARS. Each bar represents the mean \pm SEM of duplicate determinations.

a, b, c, d: significant differences as analyzed by ANOVA

활성은 각각 32.2 및 93.7, 94.6 %로 관찰되었다. 추출물 농도와 free radical 소거활성 간의 회귀분석 결과, 50 %의 radical 소거활성에 필요한 桑葉 추출물의 농도는 2.29 mg/ml로 나타났다(Fig. 4).

5. 지질과산화 억제

FeSO₄/ascorbic acid로 유발한 지질과산화는 TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였으며, TBARS가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.987$) 형광도가 증가한다. 추출물을 첨가하지 않았을 경우, 즉 0 mg/ml 농도에서 10 uM FeSO₄와 100 uM ascorbic acid에 의해 유도된 지질과산화는 TBARS 농도를 11.26 uM로 증가시켰다.

표준시약 농도와 excitation 파장 530 nm와 emission 파장 590 nm에서의 형광도 간의 회귀방정식은 $Y=5.957+26.673X$ (Y는 형광도이며, X는 TBARS 농도)이었다.

TBARS 농도가 증가함에 따라 유의적으로($r^2=0.987$) 형광도가 증가하였다.

1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 감소시키지 못하였으나, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가시 TBARS 농도는 8.92 uM로, 무첨가에 비해 지질과산화를 유의

적($p<0.05$)으로 억제하였다.

추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여, 30 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 TBARS 농도를 0.35 uM로 감소시켜, 지질과산화를 97% 정도 억제하였고, 50 mg/ml의 첨가에서는 0.29로 감소시켜 97.5% 억제하였으나 30 mg/ml의 첨가에 비해 유의한 억제는 아니었다(Fig. 5).

6. ROS 생성 억제효과

FeSO₄/H₂O₂에 의해 생성된 ROS에 의해 DCFH는 DCF로 산화되며 형광도가 증가하게 된다. 따라서 추출물 내의 항산화물질이 존재하는 경우 추출물 첨가에 의해 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다.

추출물을 첨가하지 않았을 경우 DCFH의 산화에 따른 DCF 형광도는 0 분에서 419, 10분 후에는 597.3이었다.

0.1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도는 0 및 10분에 각각 339.6 및 436.5로, 무첨가에 비해 DCF 형광도가 유의적($p<0.05$)으로 감소되었다.

추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하여 1 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무

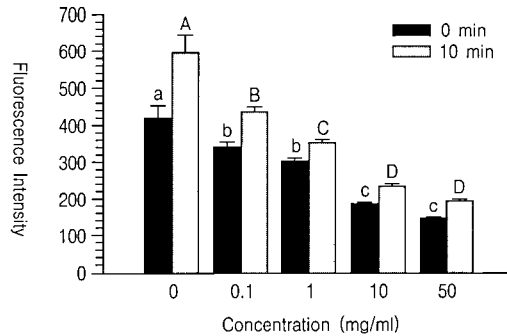


Fig. 6. The effect of *Mori Folium* extract on ROS generation. DCFH oxidation to DCF by FeSO₄/H₂O₂-induced ROS generation in the absence or presence of various concentrations of *Mori Folium* extract was measured for 10 min. Each bar represents the mean ± SEM of triplicate determinations. a, b, c, A, B, C, D: significant differences as analyzed by ANOVA

첨가에 비해 0 및 10분에 각각 302.7 및 351.6으로 감소되어 27.8 및 41.1 %의 ROS 생성 억제효과가 나타났고, 10 mg/ml 농도에서는 0 및 10분에 각각 188.4 및 234.5로 감소되어 55 및 60%의 ROS 생성 억제효과를 나타냈으며, 50 mg/ml에서는 0 및 10분에 각각 145.8 및 196.3으로 감소되었으나 10 mg/ml에 비해 유의한 억제는 아니었다 (Fig. 6).

고 찰

항산화제는 free radical 및 반응성 산소화합물 생성의 방지, 활성도 경감, 손상된 조직의 복원 혹은 다른 항산화제의 기능을 향상시키는 물질을 총칭하는 의미로 사용되며, 최근 노화 및 암, 염증, 동맥경화, 심장병, 치매 등 각종 질병과 free radical과의 관련성이 대두되며 항산화제(antioxidants)에 대한 연구가 활발하다⁴⁶⁾. 생체 조직들은 free radical과 반응하는 반응성 산소화합물의 독성에 대항하기 위한 방어기전을 가지고 있어, 그 효과를 반감시키거나 직접적으로 제거할 수 있으며, 비효소계 항산화제의 섭취가 그 농도를 낮추거나 반응을 지연시킬 수 있는 것으로 보고되는데⁴⁷⁾ 비효소계 항산화제(비타민 E, C, B6, β-carotene, selenium, N-

acetylcysteine)는 항산화 효소와는 달리 외부에서 섭취해야 하며, 항산화 효소와 함께 연쇄반응을 일으켜 그 효과를 증대시키는 것으로 알려진다⁴⁸⁾. 효소계 항산화제(SOD, catalase, glutathione system)는 미토콘드리아의 기질이나 각 조직에 존재하여 free radical 및 반응성 산소화합물의 독성을 제거함으로써 신체 항상성을 유지하는 역할을 한다⁴⁹⁾.

최근 국내에서도 항산화제에 개발에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데, 천연 항산화물질 탐색을 통한 항산화 건강음료의 개발⁵⁰⁻¹⁾, 운동으로 인한 산화 스트레스와 항산화 효소의 활성 및 항산화제의 섭취와의 관련성에 대한 연구⁵²⁾, 지질대사 및 adipocytokine과의 관련성에 대한 연구⁵³⁻⁴⁾ 등이 그것이다.

본 연구에서 선택한 桑葉은 최근 혈당강하에 대한 효과에 대한 연구^{28-30,55-6)}가 주목 받고 있으며, 당뇨병 유도 흰쥐에서 桑葉 추출물이 glutathione의 활용을 증진시켜 oxygen free radical에 의한 세포손상을 억제시킬 수 있으며, 췌장의 β-cell에도 영향을 미쳐 당뇨병 발현을 억제시킬 수 있을 것이라는 연구보고³⁵⁾가 있었다.

본 실험에서는 桑葉의 항산화효과를 알아보기 위해 TAC, TAR 측정, 총페놀함량 측정, DPPH 소거활성, 지질과산화 억제효과, ROS 생성 억제효

과 측정 등을 살펴보았다.

총항산화능은 TAC(Total antioxidant status)와 TAR(Total antioxidant response)을 측정하여 살펴 보았다.

TAC 측정결과 桑葉 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타냈다. 산성 pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS)는 H₂O₂에 의해 청록색의 ABTS.+로 산화되며, 추출물 내 항산화물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 ABTS.+는 탈색되는 변화가 나타나므로, 실험결과는 桑葉 추출물에 항산화물질이 존재하는 것을 의미한다.

TAR 측정결과 역시 桑葉 추출물이 농도 의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내었다. 산성 pH에서 무색의 환원형 o-dianisidine은 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical(OH.)에 의해 황갈색의 dianisidyl radical로 변화하게 되며, 추출물 내에 항산화물질이 존재하게 되면, 이들 농도에 비례하여 산화반응을 억제시켜 색 변화가 감소하게 된다. 따라서 상업추출물에 항산화물질이 존재하는 것을 알 수 있다.

총페놀함량은 Gallic acid를 표준시약으로 표기하는 것이 보통이며, 桑葉 추출물 농도에 따라 mM gallic acid equivalent가 증가하는 것은 추출물 농도가 증가함에 따라 총페놀함량이 증가하는 것을 의미한다.

DPPH radical의 짝을 이루지 못하는 전자쌍 때문에 나타나는 진한 자색에 의한 흡광도가 감소되는 것은 free radical 소거활성을 의미한다. 본 실험에서 桑葉 추출물을 혼합한 결과 추출물 농도가 증가할수록 radical 소거활성도 증가하여, 1 mg/ml 농도에서의 radical 소거활성은 32.2%였으나 5, 10 mg/ml의 농도에서는 각각 93.7, 94.6 %로 높게 나타났다.

桑葉 추출물의 지질과산화 억제효과는 간 미토콘드리아 배양액의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 농도를 측정함으로써 살펴보

았다. TBARS 농도가 증가함에 따라 증가된 형광도는 TBARS 농도의 감소에 따른 지질과산화 억제에 비례해서 형광도의 감소가 나타난다.

추출물을 첨가하지 않았을 경우, 즉 0 mg/ml 농도에서 TBARS 농도는 11.26 uM로 증가되었으며, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가시 TBARS 농도는 8.92 uM로, 무첨가에 비해 지질과산화를 유의적(p<0.05)으로 억제한 것으로 나타났다. 추출물 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도도 유의적으로 감소하여, 30 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 TBARS 농도를 0.35 uM로 감소시켜, 지질과산화를 97% 정도 억제하였고, 50 mg/ml의 첨가에서는 0.29로 감소시켜 97.5% 억제하였으나 30 mg/ml의 첨가에 비해 유의한 억제는 아니었다.

FeSO₄/H₂O₂에 의해 생성된 ROS에 의해 DCFH는 DCF로 산화되며 형광도가 증가하는데, 추출물 내의 항산화물질이 존재하는 경우 추출물 첨가에 의해 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다.

ROS 생성 억제효과를 측정하여 산화진행의 연쇄반복의 억제 여부를 관찰한 결과 0.1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물 첨가에 따른 DCF 형광도는 0 및 10분에 각각 339.6 및 436.5로, 무첨가에 비해 DCF 형광도가 유의적(p<0.05)으로 감소되었다. 추출물 첨가 농도가 증가함에 따라 DCF 형광도는 감소하여 1 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 무첨가에 비해 0 및 10분에 각각 302.7 및 351.6으로 감소되어 27.8 및 41.1%의 ROS 생성 억제효과를 나타냈으며, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가는 0 및 10분에 각각 188.4 및 234.5로 감소되어 55 및 60%의 ROS 생성 억제효과를 나타냈다. 50 mg/ml 첨가에서는 0 및 10분에 각각 145.8 및 196.3으로 감소되었으나 30 mg/ml에 비해 유의한 억제는 아니었다.

김 등³⁵⁾은 상업추출물이 oxyzen free radical의 생성과 소거에 관여하는 효소들의 반응 양상과 당뇨병 합병증에 영향을 미치는 당의 비정상적 대사

경로의 지표가 되는 효소의 활성변화에 의미있는 영향을 미침으로써 조직손상을 경감시켜 당뇨병의 발현을 억제시킬 수 있는 가능성이 있음을 보고한 바 있다. 본 연구의 결과 桑葉 추출물은 TAC측정, TAR측정, 총페놀함량 측정, DPPH radical 소거활성 측정, 지질과산화 억제효과, ROS 생성 억제효과 등 모든 실험에서 유의성이 있는 결과가 나타나 항산화효과가 있는 것으로 볼 수 있으며, 결과를 바탕으로 향후 oxidative stress로 인한 노화 및 각종 만성질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

桑葉의 항산화효과를 실험하기 위해 추출물을 이용하여 본 실험을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TAC 측정결과 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 桑葉 추출물은 농도 의존적으로 ABTS radical 소거활성을 나타내었다.
2. TAR 측정결과 추출물의 농도가 증가함에 따라 TAR 증가하여 桑葉 추출물은 농도 의존적으로 dianisidyl radical 소거활성을 나타내었다.
3. Total phenolic compound 측정결과 추출물 농도가 증가함에 따라 총 함량이 비례적 증가하였다.
4. DPPH 소거활성 측정 역시 桑葉 추출물의 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하였다.
5. 지질과산화 억제효과는 1 mg/ml 농도의 桑葉 추출물 첨가는 유도된 지질과산화의 TBARS 농도를 감소시키지 못하였으나, 10 mg/ml 농도의 추출물 첨가시 무첨가에 비해 지질과산화를 유의적(p<0.05)으로 억제하였다.
6. ROS 생성 억제효과는 0.1 mg/ml 농도의 첨가에서도 0분 및 10분에서 각각 유의한 억제가 나타났으며, 농도 의존적으로 생성억제가 나타났으나 50 mg/ml 농도의 첨가에서는 10 mg/ml와 비교

하였을 때 유의한 억제는 아니었다.

참고문헌

1. Dean RT, Giesege, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. Trends Biochem. Sci. 1993;18:437-41.
2. McCord, J. M., I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte-prein(hemocuprein). J. Biol. Chem. 1969;244:6049-55.
3. Hahm TS, King DL, Min DB. Food antioxidants. Food and Biotechnology. 1993;2:1-8.
4. 김희준, 윤철호, 정지천. 흰쥐의 뇌 astrocyte에서 amyloid-β25-35로 유발된 지질의 과산화와 항산화 효소계 및 NO생성에 미치는 白僵蠶의 효과. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):331-9.
5. 박성준, 이송실, 백진웅, 이상재, 김광호. 覆盆子가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 2004;8(1):75-87.
6. 오명숙, 김도림, 강지웅, 김산웅, 유태원, 박정열, 김동민, 박완수, 박성규, 장문석, 박수연. DPPH방법을 통한 免絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿의 항산화 활성에 대한 연구. 대한한의학방제학회지. 2005;13(2):101-10.
7. 오명숙, 김도림, 김소연, 장문석, 박성규. 補骨脂가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(1):81-6.
8. 조수인, 오원우. 黃芩의 항산화 효과. 대한본초학회지. 2005;20(3):67-74.
9. 임규, 박용기, 강병수. 칩의 부위별 항산화작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 2001;16(2):101-11.
10. 김상현, 김연섭. 葛根의 뇌해마 신경세포 손상 보호와 항산화 효능에 대한 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(2):416-25.
11. 김경호, 이송실, 백진웅, 이상재, 김광호. 山査가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 2004;8(2):65-80.

12. 명성하, 김연섭. 大黃의 항산화와 신경세포손상 보호효능에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2005;19(3):647-55.
13. 곽병준, 이승실, 백진웅, 이상재, 김광호. 瓊玉膏가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 대한예방의학학회지. 2003;7(2):85-96
14. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-91.
15. 문성식, 김병수, 강정수. 六味地黃湯의 항산화 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003; 17(2):436-42.
16. 박선동, 서효수, 박원환. 補中益氣湯과 소음인 補中益氣湯 및 그 구성약물군이 고혈당 백서의 항산화 효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(2):113-26.
17. 박선동, 주왕석, 고원도. 血腑逐瘀湯과 그 구성 약물군이 Alloxan당노 백서의 혈청 조성 및 항산화 효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2002;17(1):93-111.
18. 안봉진, 이창언, 손준호, 이진영, 박태순, 박정미, 배호정, 편정란. 內消黃蓮湯 및 구성약재의 항산화효과 검증과 항암 및 항균효과. 대한본초학회지. 2005;20(4):17-26.
19. 문진영. 芍藥藥鉞액이 tert-butyl hydroperoxide 로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과산화 반응 및 항산화효소 활성화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000;17(3):176-87.
20. 서정철, 임강현, 한상원. 蜂毒藥鉞액의 항산화 효능. 대한약침학회지. 2003;6(1):67-75.
21. 김영해, 김갑성. 胡桃藥鉞액의 항산화 효과에 대한 연구 II(oxidant에 의한 세포손상 방지기전). 대한침구학회지. 1996;13(2):54-66.
22. 진국환의과대학 본초학교수 공저. 본초학. 서울. 영림사. 1991:145-6.
23. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1986:477.
24. 조규석. 桑葉이 항알러지 염증반응에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2005;19(1):185-201.
25. 김기훈, 이진용, 김덕곤. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희의학. 2004;20(1):37-45.
26. 조주형, 김동희. 桑葉의 면역 조절 작용에 대한 실험적 연구. 대전대논문집. 2001;9(2):123-34.
27. 고영철, 송경희. 당노유발쥐에서 桑葉복합추출물 투여에 따른 혈중 과산화지질 및 간조직의 지질 조성 변화. 명지대 자연과학논문집. 2003;22:10-8.
28. 김철영, 강시현, 정기화, 정춘식, 김박광, 허훈. 혈당강하효과를 나타내는 桑葉의 당지질 성분. 생약학회지. 2000;31(1):95.
29. 조여원, 정성현, 김미선, 구성자. 고탄수화물 식이섭취 마우스에서 桑葉 및 누에 추출물의 혈당 강하 효과. 한국영양학회지. 1998;31(2):117-25.
30. 이광해, 정성현. streptozotocin 유도 당뇨마우스에서 桑葉의 항당뇨효과 및 기전. 경희약대는 논문집 2000;28:87-100.
31. 정재열, 송용선, 이기남. 桑葉 Ethyl Acetate 추출물이 카드뮴의 흡입독성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):700-10.
32. 안미영, 류강선, 김익수, 김선여, 이희삼, 김지원, 이용기. 桑葉, 桑枝 및 蠶糞 에탄올 추출물의 품종별 세포독성 효과. 한국잠사학회지. 2001;43(1):26-8.
33. 박재수, 정재열, 이택준, 강성호, 송용선, 이기남. 상업추출물이 흰쥐의 카드뮴 에어로졸 흡입 독성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(6):1243-52
34. 차은이, 김병수, 김동희, 이용구, 김연진, 강정수. 桑寄生의 항산화 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):939-45.
35. 김오곤. 고혈당 흰쥐에서 상업의 혈당조절과 항산화 작용에 관한 연구. 2003. 동국대학교 대학원.
36. Hovius, R., H. Lambrechts, K. Nocolay and B. de Kruijff. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. Biochim. Biophys. Acta. 1990;1021:217-26.

37. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26:1231-7.
38. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 2004a;37:277-85.
39. Benzie, I.F. and J.J. Strain. Ferric reducing/ antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant capacity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299: 15-27.
40. Erel, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.* 2004b;37:112-9.
41. Singleton, V.L., R. Orthofer. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999;299:152-78.
42. Malterud, K.E., T.L. Farbrot, A.E. Huse and R.B. Sund. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 1993;47:77-85.
43. Stacey, N.H., C.D. Klaassen. Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1981;58:8-18.
44. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, S.C. Bondy. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5:227-31.
45. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-75.
46. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90:7915-22.
47. Halliwell B, JMC Gutteridge. *Free radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press. 1989.
48. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol.* 1995;79(3):675-86.
49. Sen CK, O Hanninen. Physiological antioxidants. In exercise and oxygen toxicity, edited by Sen CK, L Paker, O Hanninen. Elsevier Science. 1994:89-126.
50. 김준한, 박준홍, 박소득, 최성용, 성종환, 문광덕. 홍화씨 추출분말 함유 건강음료의 제조와 항산화성. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.* 2002;34(4):617-24.
51. 김종덕, 김정환. 노화지연을 위한 항산화 차의 개발. *여수대학교 논문집.* 1999;14(2):401-9.
52. 진영수, 이왕록, 박준영. 최대운동시 항산화제 섭취가 골격근 항산화 효소의 활성에 미치는 영향. *대한스포츠학회지.* 2001;29(1):148-59.
53. 조성희, 박영이, 윤지영, 최상원, 하태열. 홍화씨 폴리페놀이 HMG-CoA reductase, LDL 산화 및 Apo A1 분비에 미치는 영향. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.* 2006;38(2):279-83.
54. 전태원, 신윤아, 김경배, 서동일, 김영경, 소성. 녹차섭취와 운동의 복합처치가 비만여성의 Adipocytokines 및 항산화 시스템에 미치는 영향. *운동과학.* 2006;15(2):137-46.
55. 구성자, 윤기주, 김근풍. 桑葉 추출물을 이용한 항당뇨 음료의 개발(I). *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 2002;12(5):364-9.
56. 구성자. Alloxan 유도 마우스에서 桑葉 및 桑白皮 활성물질의 혈당강하 활성 검색. *생활과학논문집.* 2000;4(1):31-8.