

Original Article

TOSC 방법을 이용한 참당귀 뿌리 용매분획(*Angelica gigas*)의 항산화 활성 평가

이숙영¹, 서영배^{2*}, 우원홍^{1*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

²대전대학교 한의과대학 한의학과

Evaluation of Antioxidant Activity of Solvent Fractions of *Angelica gigas* Root Using TOSC Assay

Sook-Young Lee¹, Young-Bae Seo^{2*}, Won-Hong Woo^{1*}

¹Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Department of Herbalogy, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, 300-716, Korea

Objectives: The aim of this study was to elucidate the antioxidant effect of solvent fractions of *Angelica gigas* root.

Methods: The ethanol extract of *Angelica gigas* root was suspended in water and then partitioned with dichloromethane (MC Fr.), ethyl acetate (EA Fr.) and butanol (BuOH Fr.), sequentially. The antioxidant activities of solvent fractions of *Angelica gigas* root were evaluated for radical scavenging activity against stable free radicals (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH, hydrogen peroxide and superoxide anion radicals. In addition the antioxidant activities of solvent fractions of *Angelica gigas* root against peroxy radicals, hydroxyl radicals and peroxynitrites were determined by the total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay.

Results: Among the solvent fractions of MC Fr., EA Fr., and BuOH Fr., BuOH Fr. was found to have stronger antioxidant activity with IC₅₀ values of 59.72, 14.36, 30.96 and 44.75 $\mu\text{g/ml}$ on the DPPH radical, nitrite, superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively, than BHA used as a positive control. Moreover, specific TOSC values (564.8, 276.4 and 405.5 TOSC/mM) of BuOH fr. against peroxy radicals, hydroxyl radical and peroxynitrite were 4 times higher than GSH (136.5, 67.4 102.6 TOSC/mM) used as a positive control.

Conclusions: These results suggest that the BuOH fr. of *Angelica gigas* root has a high antioxidant activity and can be useful to develop functional food against oxidative stress conditions.

Key Words : *Angelica gigas* root, BuOH Fr., antioxidant activity, specific TOSC

서론

당귀는 미나리과(Umbelliferae)의 식물로써 일본

은 왜당귀(*Angelica acutiloba*)¹⁾ 중국은 중국당귀(*Angelica sinensis*)²⁾ 한국은 참당귀(*Angelica gigas*)³⁾를 기원으로 하는데, 전통적으로 당귀는 어린순을

• Received : 13 December 2010 • Revised : 7 January 2011 • Accepted : 10 January 2011

• Correspondence to : 우원홍(Won-Hong Woo)

전라북도 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Tel : +82-63-850-6845, Fax : +82-63-850-5195, E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr

서영배(Young-Bae Seo)

대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 한의학과

Tel : +82-42-280-2625, Fax : +82-42-280-2644, E-mail : genin@dju.ac.kr

나물로 식용하고 뿌리를 약용으로 사용하였다. 최근에 당귀에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있어 진통효과, 신장독성 경감효과, 당뇨병 고혈압치료 등 여러 가지 생리활성이 있다고 알려져 있다^{4,6)}.

산소는 호흡을 통해 체내로 들어와 혈관을 타고 운반되며, 음식물 소화를 비롯한 대사에 관여하는 과정에서 불안정한 상태로 변하는데, 이런 산소를 활성산소라 한다. 일반적으로 호흡으로 들이마신 산소의 약 1-2%가 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의해서 활성산소로 변하며, 일부는 몸 속에서 저절로 없어지거나 각종 감염을 막는 면역기능도 하지만, 과잉 생산된 활성산소가 문제다.

이러한 과잉의 활성산소는 정상 세포막과 세포를 손상시키며, 피부를 구성하는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하고, DNA를 손상시켜 암을 유발하는가 하면 세포막의 불포화지방산을 산화작용을 통해 이 물질로 바뀌 동맥경화, 뇌졸중 등 여러 가지 질병을 야기한다고 알려져 있다⁷⁻⁹⁾.

따라서 항산화 물질은 여러 가지 질병 치료제뿐만 아니라 건강기능식품, 화장품 등의 소재로 광범위하게 연구되고 있다. 대표적인 항산화물질로는 비타민 A, C로서 독성 화학물질이나 흡연으로 인한 피해를 막아주며 면역력을 증진하고, 성인병을 예방해 준다. 또한 녹차의 카테킨 성분이 항산화 활성이 강하다고 알려져 있으며 이밖에 키위, 양배추, 오렌지, 브로콜리, 버섯, 당근 등이 대표적인 천연 항산화 식품들이다.

생체에서 발생하는 활성산소와 관련된 대표적인 산화성물질은 산소에서 유래된 singlet oxygen, superoxide radical, 과산화수소 (hydrogen peroxide), hydroxyl radical, peroxy radical, alkoxy radical과 질소에서 유래된 nitric oxide와 peroxy nitrite 그리고 myeloperoxidase에서 생성되는 hypochlorous acid 등이 있다¹⁰⁻¹²⁾. 이들 산화성물질 중에서 superoxide radical과 nitric oxide는 반응성이 낮아 생체의 거대 분자를 산화시키는 능력은 낮으나 두 물질이 반응하여 생성되는 peroxy nitrite는 매우 반응성이 강하여 세포에 독성을 유발한다¹³⁾. 과산화수소는 반응성이

낮아 mM 농도에서 독성을 유발하나 세포막을 투과할 수 있으며 최근 신호전달물질로 작용하는 것으로 제안되고 있다¹³⁾. Hydroxyl radical의 공격에 의해 산화된 carbon-centered radical이 산소와 반응하여 생성되는 peroxy radical은 반응성이 강하며 hydroxyl radical에 비하여 긴 반감기를 가진다.

일반적으로 항산화 활성을 평가하는 방법은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay가 대표적이다¹⁵⁾. DPPH assay 방법은 가장 광범위하게 사용되며 high-throughput system에 적용될 수 있어 시간과 경비를 절약할 수 있는 장점이 있다.

한편, Total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) 법은 DPPH assay 방법과는 달리 실제로 생체내에서 발생하는 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxy nitrite에 대한 개별적인 항산화 활성을 평가하는 방법으로 산화성물질이 alpha-keto-gamma-methylbutyric acid (KMBA)와 반응하여 생성되는 ethylene을 gas chromatography를 이용하여 검출한다^{16,17)}. 이 방법은 시간에 따른 ethylene gas의 농도를 측정하여 area under the curve (AUC)를 산출하고 이 값을 대조군에서의 AUC와 비교함으로써 TOSC 값을 계산한다. 또한 대표적인 항산화 물질인 trolox나 glutathione (GSH)를 표준물질로 사용함으로써 정량적으로 항산화 활성을 실험간에 비교할 수 있다. 따라서 이 방법은 실질적인 체내 산화성물질에 대한 항산화 활성을 정량적으로 측정할 수 있다. TOSC assay는 항산화 활성 외에도 조직액이나, 혈장, 혈청 등에서 항산화 활성을 측정하여 산화적 스트레스의 biomarker로 사용되고 있다¹⁸⁾.

강등¹⁹⁾은 이미 참당귀 열수 추출물이 DPPH free radical 소거활성이 보고 한 바 있다. 이에 본 연구는 보다 구체적으로 국산 당귀의 어느 물질이 항산화 활성을 나타내는지 관찰하고자 국산 당귀 뿌리 추출물을 용매 극성의 순서 즉, 디클로메탄 (dichloromethane), 에틸아세테이트 (ethylacetate) 및 부탄올 (butanol) 순으로 용매분획한 후 DPPH free radical 소거활성 이외에 여러 가지 방법을 이용하여 국산 당귀 뿌리 용매분획의 항산화활성을 측정하고자 하였다. 또한

TOSC 방법을 이용하여 실제적으로 생체내에서 발생하는 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite와 같은 여러 가지 oxy-radicals에 대한 항산화활성을 측정하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 재료 및 추출방법

시약으로 사용한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl (DPPH), GSH, ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ferrous ammonium sulfate, H₂O₂, 2,2'-azobisamidinopropane (ABAP), BHA(Butylated hydroxy-anisole), lpha-keto-gamma-methiobutyric acid (KMBA), tBHP, tetraethoxypropane (TEPP), diethylenetriaminopentacetic acid (DTNB), 2,6-ditert-butyl-4-methylphenol (BHT), NADPH, sodium nitrite, acetic acid, hydrochloric acid, sulfanilic acid, naphthylamine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, butylated hydroxy-anisole, nitro blue tetrazolium, xanthine, xanthine oxidase, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, PBS, peroxide 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, 에탄올은 (주)삼전에서 구입하였으며, 기기로 사용한 GC는 Shimadze사(Tokyo, Japan)의 GC-2010를 사용하였다.

또한 국산 당귀 (*Angelica gigas*, 국내산, 강원도)는 송학약초영농조합에서 구입하여 건조된 국산 당귀 뿌리 1 Kg을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 6리터 라운드 플라스크에 넣고 3리터의 70% 에탄올 수용액을 넣어 3시간 동안 환류 추출하였다. 같은 작업을 3회 반복 추출 후 여과한 뒤 감압농축하여 국산 당귀 추출물 420.1 g을 얻었다.

위에서 얻은 국산 당귀 뿌리 추출물 420.1 g을 2리터의 증류수로 현탁한 후 2리터의 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 각각 3회 추출하여 83.1 g의 디클로로메탄 추출물 (MC Fr.), 7.9 g의 에틸아세테이트 추출물 (EA Fr.) 및 36.13 g의 부탄올 뿌리 추출물 (BuOH Fr.)을 얻어 실험에 사용하

였다. 용매분획 추출방법은 Scheme 1에 나타내었다.

2. 총 폴리페놀의 정량

총 폴리페놀 화합물은 Folin-Denis 방법²⁰⁾으로 측정하였으며, 시료 (10%) 1 ml에 95% 에탄올 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어 주고, 5분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃ 1 ml를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡광도를 측정하여 gallic acid를 이용하여 미리 작성된 검량선으로부터 양을 환산하였다. 이 때 검량선은 탄닌산 표준품 10 mg을 에탄올 5 ml에 용해시켜 표준원액을 제조한 다음 적당히 희석하여 작성하였다.

3. DPPH 라디칼 소거능

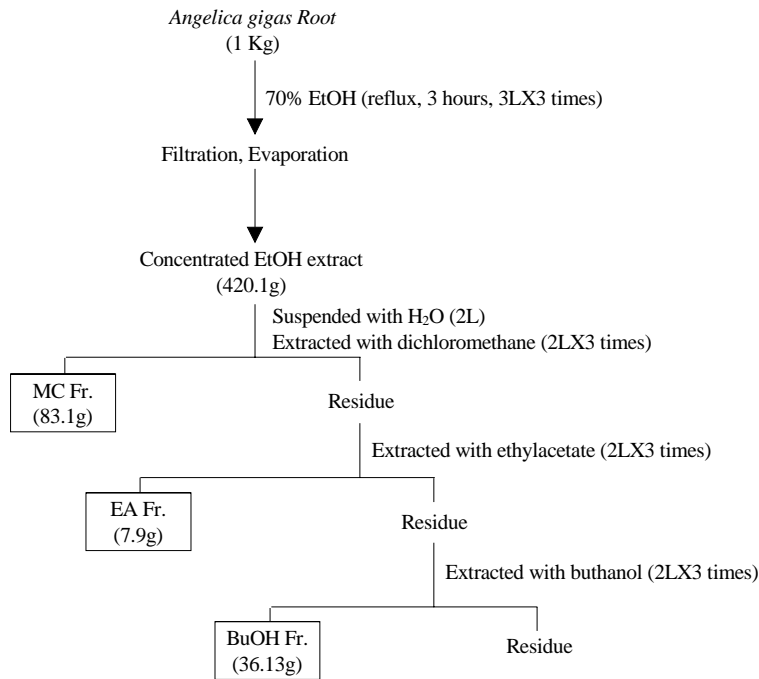
DPPH free radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법²¹⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20 μl에 0.1 mM DPPH 180 μl를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{[\text{대조군의 흡광도} - \text{반응군의 흡광도}]}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

4. 아질산염 소거 작용

아질산염 소거작용은 Kato 등²²⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM의 NaNO₂ 용액 30 μl에 시료추출물을 60 μl를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 용액 210 μl를 가하여 전체를 300 μl로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간동안 반응시켜 얻은 반응액을 40 μl씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200 μl를 첨가한 다음 Griess 시약 16 μl를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치시킨 후 흡수 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율로 나타내었다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였다.

$$\text{N(\%)} = \frac{[1 - (A - B)]}{(C - D)} \times 100$$



Scheme 1. Extraction and Solvent Fractionation of the Root of *Angelica gigas*

- N : 아질산 소거능(%)
- A : 시료의 흡광도
- B : 시료 대조군의 흡광도
- C : Control의 흡광도
- D : Control 대조군의 흡광도

5. Superoxide anion 소거능

Superoxide anion 소거활성은 Okamura 등²³⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 20 μ l, 2 mM xanthine과 0.1mM NBT 혼합액 160 μ l를 넣고 0.05 mM EDTA가 포함된 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 xanthine oxidase (0.5 unit/ml) 20 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 다음, 여기에 2.5N HCl 80 μ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 Park 등²⁴⁾의 방법

에 따라 96-well microplate에 phosphate buffered saline (PBS) 100 μ l, 분획물 20 μ l를 넣고 1 mM H₂O₂를 가하여 5분방치 한 다음, 1.25 mM ABTS 30 μ l와 PBS에 녹인 peroxidase (1unit/ml) 30 μ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. TOSC assay

TOSC assay는 Winston²⁵⁾에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 수정된 방법^{16,17)}을 사용하여 실시하였다. Peroxyl radical은 2,2'-azobisamidinopropane (ABAP)를 35°C에서 thermal homolysis시켜 발생시켰다¹⁷⁾. Hydroxyl radical은 Fe와 ascorbate를 이용한 Fenton reaction으로, peroxyxynitrite는 3-morpholinosydonimine (SIN-1)의 자발적인 붕괴를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 KMBA와 반응하여 ethylene을 발생하며 이때의 TOSC 값은 일정범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로

보고된 바 있다²⁵. 반응은 1 ml의 반응액을 고무마개로 밀폐된 15ml 용기에 넣어 진행시켰으며 생성된 ethylene은 반응용기의 head space 공기 0.4 ml을 취하여 GC (GC-2010, Shimadze, Tokyo, Japan)로 분석하여 검출하였다. Oven, injector와 flame ionization detector의 온도를 각각 60°C, 180°C로 설정하고 Supelco SPB-1 caillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)를 장착한 gas chromatograph 장치를 사용하였다. Carrier gas로는 helium을 사용하였으며 split ratio 30:1로 설정하였다. TOSC 값은 TOSC=100-(SA/CA×100)의 식으로 구했다²⁵. SA는 시간에 따른 sample의 적분 값이고, CA는 시간에 따른 control의 적분 값이다. Control로는 3차 증류수를 사용하였으며 시료로는 국산 당귀 추출물 외에 양성 대조군으로 GSH를 사용하였다. 따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의 $f_{SA}/f_{CA} = 1$ 이 되며 TOSC = 0의 값을 갖는다. 반대로 $f_{SA} \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시했으며 군간에서 통계적인 유의성은 GraphPad Prism program (version 4.0)을 이용하여 One-way ANOVA-test 후 Dunnett's Multiple Comparison Test 및 Newman-Keuls multiple range test로 확인하였다.

실험결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 함량

식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 콜레스테롤 저하작용, 정작작용 항암 및 항산화작용등의 다양한 항산화 생리활성을 나타내는 물질이다^{26,27}. 폴리페놀은 항산화작용과 관련하여 최근 생체 내에서의 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있으며 페놀성물질의 hydroxyl group이 주요한 역할을 한다고 알려져 있다.

본 실험에서 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 15-500 μg/ml농도 범위에서 표준곡선을 작성하여 이를 환산하여 정량하였다. 실험결과는 Fig. 1.에 나타내었다.

국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물 (MC Fr.)의 폴리페놀 함량은 98.05±2.16 mg/g, 에틸아세테이트 용매분획물 (EA Fr.)에서는 113.07±0.60 mg/g,

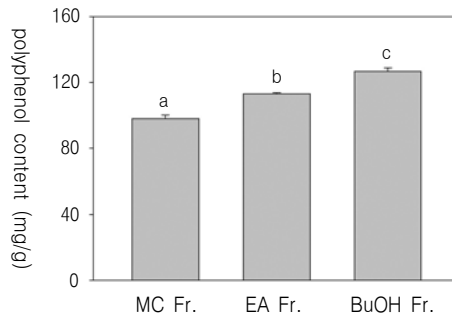


Fig. 1. Effect of Solvent Fractions of *Angelica gigas* Root on Total Polyphenol Content.

MC Fr.: Methylene fraction of *Angelica gigas* Root, EA Fr.: Ethylacetate fraction of *Angelica gigas* Root, BuOH Fr.: Butanol fraction of *Angelica gigas* Root. Data are means ± S.D. of 5 experiments. Values with different letters are significantly different from each other (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, P < 0.001).

부탄올 용매분획물 (Bu Fr.)에서는 126.67±2.17 mg/g 으로서 비교적 극성이 큰 부탄올과 같은 용매분획물 에서 가장 높게 나타났다. 즉, 국산 당귀 중에 분자 량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질 들의 폴리페놀 함량이 높다는 것을 알 수 있었다.

2. DPPH free radical 소거활성

Free radical로서 DPPH를 이용하여 국산 당귀 용 매분획물을 농도별로 free radical 소거활성을 측정 하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

국산 당귀 뿌리 용매분획물을 농도별로 0.1 mM DPPH용액에 첨가하여 free radical 소거활성을 측정 한 결과 양성대조군으로 사용한 합성 항산화제인 BHA (Butylated hydroxy-anisole)의 IC₅₀ 값은 64.70 ±0.88 µg/ml이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물 (MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸아세테이트 용매분획물 (EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물 (BuOH Fr.)의 DPPH free radical 소거 활성 IC₅₀ 값은 각각 481.16±0.99 µg/ml, 88.66±0.41 µg/ml 및 59.72±1.02 µg/ml로서 양성대조군으로 사 용한 합성 항산화제인 BHA에 비해서 강한 국산 당 귀 뿌리 부탄올 용매분획물 (BuOH Fr.)이 유의적으 로 가장 큰 DPPH free radical 소거활성을 나타내었 다(P<0.01). 즉, 국산 당귀 뿌리 중에 분자량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질들의 DPPH radical 소거활성이 높다는 것을 알 수 있었다.

3. 아질산염 소거 작용

아질산염은 니트로사민의 전구체인 nitrous anhydride (N₂O₃)와 같은 활성 니트로소화 물질을 생성하고, 이 nitrous anhydride가 2차 아민과 결합하여 N-nitrosamine 을 생성한다. 이에 따라 니트로사민 생성 억제 인자 에 대한 실험을 실시하였다. GR (Griess Romigin) 아질산 시약과 아질산염이 반응시 자적색을 띄고 이 를 이용하여 시료가 아질산염을 얼마나 소거하는지 측정하는 방법으로서 실험결과를 Table 1에 나타내었 다.

국산 당귀 뿌리 용매분획물을 농도별로 1 mM의 NaNO₂ 용액에 첨가하여 아질산염 소거활성을 측정 한 결과 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC₅₀ 값은 12.70±0.09 µg/ml이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로 로메탄 용매분획물 (MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸 아세테이트 용매분획물 (EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 아질산염 소거활성 IC₅₀ 값은 각각 250.87±32.26 µg/ml, 212.60±27.52 µg/ml 및 14.36±0.47 µg/ml로서 양성대조군으로 사 용한 합성 항산화제인 BHA와 거의 동등하게 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물 (BuOH Fr.)이 유의적 으로 가장 큰 아질산 소거활성을 나타내었다 (P<0.05). 즉, 국산 당귀 뿌리 중에 분자량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질들의 아질산 소거활성 이 강하다는 것을 알 수 있었다.

4. Superoxide anion 소거능

Table 1. Scavenging Activities of Solvent Fractions of *Angelica gigas* Root on DPPH Free Radical, Hydroxyl Peroxide, Nitrites and Superoxide anion

Sample	DPPH free radicals	Hydroxyl peroxide	Nitrites	Superoxide anion
	IC ₅₀ (µg/ml)			
BHA	64.70 ± 0.88	19.11 ± 0.39	12.70 ± 0.09	52.72 ± 0.63
MC Fr.	481.16 ± 0.99	78.62 ± 1.24	250.87 ± 32.26	546.03 ± 4.41
EA Fr.	88.66 ± 0.41**	74.24 ± 0.21	212.60 ± 27.52	68.57 ± 1.17
BuOH Fr.	59.72 ± 1.02**	44.75 ± 1.45**	14.36 ± 0.47*	30.96 ± 0.74**

MC Fr.: Methylene fraction of *Angelica gigas* Root, EA Fr.: Ethylacetate fraction of *Angelica gigas* Root, BuOH Fr.: Butanoafraction of *Angelica gigas* Root. Data are means ± S.D. of 5 experiments. **s <0.01 significantly different as compared to positive control(BHA)[One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test].

Superoxide anion은 활성 산소의 일종으로 O_2^- 로 표기한다. 분자상 산소(O_2)에 1개의 전자가 첨가된 것으로 정확히는 초과산화물 음이온라디칼(superoxide anion radical)이라고 한다. 생체내에서의 여러 가지 산화환원효소에 의한 반응결과로 생성되며 반응성이 아주 높고 많은 화합물을 산화시키는 매우 유해한 물질로서 실험결과를 Table 1에 나타내었다.

국산 당귀 뿌리 용매분획물의 superoxide anion 소거활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC_{50} 값은 $52.72 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ 이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물(MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸아세테이트 용매분획물(EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 superoxide anion 소거활성 IC_{50} 값은 각각 $546.03 \pm 4.41 \mu\text{g/ml}$, $68.57 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$ 및 $30.96 \pm 0.74 \mu\text{g/ml}$ 로서 양성대조군으로 사용한 합성 항산화제인 BHA와 거의 동등하게 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)이 유의적으로 가장 큰 superoxide anion 소거활성을 나타내었다($P < 0.05$). 즉, 국산 당귀 뿌리 중에 분자량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질들의 superoxide anion 소거활성이 강하다는 것을 알 수 있었다.

5. Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide(H_2O_2)는 산소분자의 2전자가 환원된 물질로서 생체 내에서는 superoxide anion의

불균등화반응 및 여러 가지 산화효소에 의해 생성되며, 산소독의 대표적 화합물이기도 하다. 생체 내에서는 과산화효소류와 카탈라아제에 의해 제거되며 실험결과를 Table 1에 나타내었다.

국산 당귀 뿌리 용매분획물의 hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC_{50} 값은 $19.11 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$ 이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물(MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸아세테이트 용매분획물(EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 hydrogen peroxide 소거활성 IC_{50} 값은 각각 $78.62 \pm 1.24 \mu\text{g/ml}$, $74.24 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ 및 $44.75 \pm 1.45 \mu\text{g/ml}$ 로서 양성대조군으로 사용한 합성 항산화제인 BHA에 비해서는 약하였지만 비교적 강하게 국산 당귀 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)이 유의적으로 가장 큰 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다($P < 0.01$). 즉, 국산 당귀 중에 분자량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질들의 hydrogen peroxide 소거활성이 강하다는 것을 알 수 있었다.

6. TOSC 방법에 의한 oxy-radical 소거능 평가

Peroxyl radical, hydroxyl radical 및 peroxyntirite에 대한 국산 당귀 뿌리 용매 추출물과 양성대조군으로 사용한 생체 내에서 강한 항산화활성을 나타내는 GSH의 소거능을 TOSC 법으로 평가하였으며 실험결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Specific TOSC Values of Solvent Fractions of *Angelica gigas* Root against Peroxyl Radicals, Hydroxyl Radicals and Peroxyntirites

Sample	Peroxyl radicals	Hydroxyl radicals	Peroxyntirites
	TOSC/mM		
GSH	136.5 ± 25.6	67.4 ± 10.1	102.6 ± 20.5
MC Fr.	67.4 ± 11.2	47.6 ± 10.3	85.4 ± 15.6
EA Fr.	165.9 ± 20.3	$105.8 \pm 17.3^{**}$	136.5 ± 15.6
BuOH Fr.	$564.8 \pm 20.6^{**}$	$276.4 \pm 15.1^{**}$	$405.5 \pm 45.7^{**}$

MC Fr.: Methylene fraction of *Angelica gigas* Root, EA Fr.: Ethylacetate fraction of *Angelica gigas* Root, BuOH Fr.: Butanol fraction of *Angelica gigas* Root. The results are expressed as the means \pm SD of 5 experiments. Linear regression was calculated using GraphPad Prism, version 4.0. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ significantly different as compared to positive control(GSH)[One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test].

국산 당귀 뿌리 용매분획물의 peroxy radical에 대한 소거능을 측정된 결과 양성대조군으로 사용한 GSH의 specific TOSC은 136.5 ± 25.6 TOSC/mM이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물(MC Fr.), 국산 당귀뿌리 에틸아세테이트 용매분획물(EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 specific TOSC은 각각 67.4 ± 11.2 TOSC/mM, 165.9 ± 20.3 TOSC/mM 및 564.8 ± 20.6 TOSC/mM로서 양성대조군으로 사용한 GSH에 비해서 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)은 유의적으로 4배 이상 강한 peroxy radical 소거능을 나타내었다($P < 0.01$). 국산 당귀 용매분획물의 hydroxyl radical 소거능을 측정된 결과 양성대조군으로 사용한 GSH의 specific TOSC은 $67.4 \pm 10xy$ TOSC/mM이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물(MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸아세테이트 용매분획물(EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 specific TOSC은 각각 47.6 ± 10.3 TOSC/mM, 105.8 ± 17.3 TOSC/mM 및 276.4 ± 15.1 TOSC/mM로서 양성대조군으로 사용한 GSH에 비해서 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)은 유의적으로 4배 이상 강한 hydroxyl radical 소거능을 나타내었다($P < 0.01$).

또한 국산 당귀 뿌리 용매분획물의 peroxy nitrite 소거능을 측정된 결과 양성대조군으로 사용한 GSH의 specific TOSC은 102.6 ± 20.5 TOSC/mM이었으며, 국산 당귀 뿌리 디클로로메탄 용매분획물(MC Fr.), 국산 당귀 뿌리 에틸아세테이트 용매분획물(EA Fr.) 및 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)의 specific TOSC은 각각 85.4 ± 15.6 TOSC/mM, 136.5 ± 15.6 TOSC/mM 및 405.5 ± 45.7 TOSC/mM로서 양성대조군으로 사용한 GSH에 비해서 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물(BuOH Fr.)은 유의적으로 4배 이상 강한 peroxy nitrite 소거능을 나타내었다($P < 0.01$).

즉, 전반적으로 국산 당귀 뿌리 중에 분자량이 작은 비극성물질 보다는 분자량이 큰 극성물질들의 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxy nitrite 소

거능이 강하다는 것을 알 수 있었다.

종합적으로 볼 때 여러 가지 방법을 통해서 국산 당귀의 항산화 활성을 관찰한 결과 극성이 낮은 용매보다는 극성이 높은 용매에 활성물질이 존재한다는 것을 관찰하였다. 강등¹⁹⁾은 참당귀의 열수추출물의 DPPH free radical 소거활성은 메탄올 추출물보다 높게 농도의존적으로 자유기를 소거한다는 것을 보고한 바 있다. 또한 참당귀 섭취에 의한 간과 혈장내 지질과산화물 농도, 간과 혈장내 단백질 산화물 농도 및 항산화 효소(SOD: superoxide dismutase) 활성도의 변화를 측정함으로써 참당귀의 항산화 활성을 평가하였다. 한편 Kim²⁸⁾등은 참당귀추출물이 단삼, 솔잎, 현미녹차, 홍차 등에 비해서 약한 자유기 소거활성을 나타낸다고 보고한 바 있다. 그러나 이러한 실험결과는 Scheme 1과 같은 용매분획물이 아닌 용매추출물의 결과로써 비교적 약한 항산화활성이 나타났다고 판단된다. 본 실험에서는 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물이 양성대조군으로 사용한 BHA보다 활성이 강한 것으로 보아 항산화 활성을 나타내는 물질들이 대부분 부탄올 층에 존재한다는 것을 의미하는 것으로서 이러한 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획물과 기존의 항산화 활성이 우수한 한약재들과의 활성비교 연구를 수행할 필요가 있다고 판단된다. 또한 향후 단순히 참당귀 뿌리 추출물보다는 부탄올 용매분획물을 이용한 여러 가지 항산화 관련 제품개발에도 관심을 가질 필요가 있다고 판단된다.

결론

국산 당귀 뿌리 에탄올 추출물을 용매의 극성 순으로 분획하여 MC Fr., EA Fr. 및 BuOH Fr.을 각각 얻은 후 국산 당귀 뿌리 용매분획물의 polyphenol 함량, DPPH free radical 소거활성, 아질산염 소거활성, superoxide anion 소거활성, hydrogen peroxide 소거활성 및 TOSC 방법에 의한 실제적으로 생체내에서 발생하는 여러 가지 oxy-radicals에 대한 소거활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

항산화 생리활성을 나타내는 polyphenol의 총 함량은 비교적 극성이 높은 국산 당귀 뿌리 MC Fr.<EA Fr.<BuOH Fr. 순으로 극성이 높은 용매분획물의 함량이 가장 높게 나타났다. DPPH radical 및 superoxide anion 소거활성 역시 MC Fr.<EA Fr.<BuOH Fr. 순이었으며 특히 BuOH Fr.은 양성대조군으로 사용한 합성 항산화제인 BHA보다 강한 활성을 나타내었다. 아질산염 소거활성의 경우 역시 MC Fr.<EA Fr.<BuOH Fr. 순이었으며 BHA와 거의 동등한 활성을 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성의 경우 MC Fr.<EA Fr.<BuOH Fr. 순으로 활성이 강하였으나 BHA에 비해서는 활성이 약하였다.

한편, 실제적으로 생체내에서 발생하는 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite와 같은 oxy-radicals에 대한 소거능을 TOSC 방법을 이용하여 측정한 결과 MC Fr.<EA Fr.<BuOH Fr. 순으로 활성이 강하였다. 특히, BuOH Fr.의 경우 모든 oxy-radicals에 대한 specific TOSC 값이 양성대조군으로 사용한 GSH에 비해서 4배 이상 높게 나타나 강력한 항산화활성을 나타냄을 알 수 있었다.

종합적으로 볼 때 국산 당귀뿌리에서 강력한 항산화활성을 나타내는 물질은 부탄올과 같은 비교적 극성이 큰 용매분획(BuOH Fr.)에 존재함을 알 수 있었으며, 이를 이용하여 항산화제로의 활용가능성이 매우 크다고 판단된다. 향 후 국산 당귀 뿌리 부탄올 용매분획(BuOH Fr.)으로부터 활성을 나타내는 순수물질을 분리하는 추가연구가 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. 國家藥典委員會. 中華人民共和國藥典一部. 北京, 中國醫藥科技出版社, 2010;124
2. 日本藥局方解説書編集委員會. 日本藥局方解説書 15改定. 東京: 廣川書店. 2005;1321
3. 대한약전 제9개정, 식품의약품안전청 고시 제 2010-10호, 의약품각조 2부, 916
4. Kang YG, Lee JH, Chae HJ, Kim DH, Lee SH, Park SY. HPLC analysis and extraction methods of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* roots. *Kor. J. Pharmacogn.* 2003;34(3): 201-205.
5. Chi HJ, Kim HS. Studies on the components of *Umbelliferae* Plants in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* 1970;1:25-32.
6. Bae EA, Han MJ, Kim NJ, Kim DH. *Anti-Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol Pharm Bull.* 1998;21:990-992.
7. Lee YY, Lee S, Jin JL, Yun-Choi HS. Platelet anti-aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Arch Pharm Res.* 2003;26:723-726.
8. Wen JJ, Gupta S, Guan Z, Dhiman M, Condon D, Lui C, et al. Phenyl-a -tert-butyl-nitrone and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic rats. *Journal of the American College of Cardiology.* 2010;55(22):2499-2508.
9. Arif IA, Khan Haseeb A. Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health.* 2010;26(2): 121-128.
10. Pellegrini M, Baldari CT. Apoptosis and oxidative stress -related diseases: the p66 Shc connection. *Current Molecular Medicine.* 2009; 9(3):392-398.
11. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* 2005;3:498-501.
12. Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1761:392-415.
13. Kamat JP. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J. Exp. Biol.* 2006;44: 436-447.
14. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang

- KS, Woo HA. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:183-189.
15. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int.* 1997;42:361-370.
16. Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marproach. M. Res.* 2002;54:419-423.
17. Regoli F, Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999;156:96-105.
18. Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* 2003;523-524:9-20.
19. Kang SA, Han JA, Jang KH, Choue RW. DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui(*Angelica gigas*). *Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004;33(7):1112-1118.
20. Folin AD, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *Biol. Chem.* 1995;22:305-308.
21. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-1200.
22. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. *Agric. Biol. Chem.* 1987;51:1333-1338.
23. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry.* 1993;33:557-561.
24. Park SW, Chung SK, Park JC. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O- β -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *Korean Soc Food Sci Nutr.* 2000;29:106-110.
25. Winston GW, Regoli F, Dugas AJ Jr, Fong JH, Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;24:480-493.
26. Oi N, Jeong CH, Nadas J, Cho YY, Pugliese A, Bode AM et al. Dong Z. Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene a4 hydrolase. *Cancer Res.* 2010;70(23):9755-64.
27. Shen JL, Man KM, Huang PH, Chen WC, Chen DC, Cheng YW, et al. Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders. *Molecules.* 2010;15(9):6452-65.
28. Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, et al. Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1998;27:399-405.