

만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 추출물의 항산화 효과임태진\*, 최무영<sup>1</sup>상지대학교 동물생명자원학부 생명공학전공, <sup>1</sup>식품영양학과The Antioxidative Effects of *Rhododendron brachycarpum* ExtractsTae Jin Rhim\* and Moo Young Choi<sup>1</sup>

Department of Biotechnology in Division of Animal and Life Resources

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

**Abstract** - The objective of this study was to investigate the antioxidative capacity of *Rhododendron brachycarpum* 95% ethanol extracts. Total antioxidant status was examined by total antioxidant capacity against ABTS radical reactions. Total antioxidant capacities of *R. brachycarpum* extract at the concentrations of 0.2 and 1 mg/mL were 0.33 and 2.26 mM Trolox equivalents, respectively. Superoxide scavenging activities of *R. brachycarpum* extract at the concentrations of 0.2 and 1 mg/mL were 45.0 and 77.0%, respectively. Oxygen radical absorbance capacities of *R. brachycarpum* extract at the concentrations of 5 and 100 µg/mL were 40.88 and 131.00 µM Trolox equivalents, respectively. Total phenolic contents of *R. brachycarpum* extract at the concentrations of 0.2 and 1 mg/mL were 0.37 and 1.25 mM gallic acid equivalents, respectively. *R. brachycarpum* extract at the concentration of 0.1 mg/mL inhibited 0.2 mM and 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide induced cytotoxicity by 52.1 and 30.3%, respectively, in HepG2 cell culture system. Thus, strong antioxidant and cytotoxicity-inhibiting effects of *R. brachycarpum* extract seem to be due to, at least in part, the prevention from free radicals-induced oxidation as well as high levels in total phenolic contents.

**Key words** - *Rhododendron brachycarpum*, ABTS radical, Superoxide, ORAC, Cytotoxicity

## 서 언

Superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등의 반응산소종(reactive oxygen species, ROS)은 활성 산소라고도 불리우며, 호흡과정에서 체내에 유입된 산소가 산화과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소를 일컫는다. 암, 동맥경화증, 당뇨병 등 많은 질병들이 반응 산소종과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Halliwell *et al.*, 1992; Thannickal and Fanburg, 2000). 따라서, 최근에는 이러한 ROS를 제거해줌으로써 생체 내에서 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질들을 방어하는 항산화제의 활용이 증가하고 있고, 특히 식물계에 널리 분포되어 있는 천연 항산화제의 중요성과 이에 관한 연구가 증가하고 있다(Yang *et al.*, 2011).

만병초(*R. brachycarpum*)는 진달래과에 속하는 상록관목으로, 우리나라에서는 지리산, 울릉도, 강원도 이북 등 주로 고산지대의 숲속에서 자란다. 민간에서는 신경통, 고혈압, 강장제, 이뇨제 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ahn, 2000). 만병초 잎의 주요 성분에는 quercetin, avicularin, quercitrin, hyperin 등의 flavonoids(Choi *et al.*, 1986)와 ursolic acid를 포함한 7개의 triterpenoids(Youn and Cho, 1991)가 분리되어 보고된 바 있다. 그러나, 만병초 잎 추출물의 인간 유방암세포, 간암세포, 폐암세포 등에 대한 높은 생육 억제 활성과 B 세포 및 T 세포 등 면역세포의 생육 촉진 효과가 보고되고(Byun *et al.*, 2005) 있을 뿐, 만병초의 생리활성에 관한 연구 결과는 거의 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 만병초 추출물의 항산화 효능을 연구하기 위해 free radical(ROS) 소거 활성, 총페놀 함량 및 세포독성 억제 효과들을 조사하였다.

\*교신저자(E-mail) : tjrhim@sangji.ac.kr

## 재료 및 방법

### 시약

Dimethyl sulfoxide(DMSO)와 96-well microplate는 Cambrex 회사로부터 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 BioWhittaker 회사로부터 구입하였다. 항산화 활성 분석과 세포배양에 사용한 다른 모든 시약들은 분석급 이상으로 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하여 사용하였다.

### 만병초 추출물

만병초는 한국산으로 강원도 태백시 재배농가에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 건조된 시료 150 g을 마쇄하여, 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 round flask에 넣고 450 ml의 95% 에탄올을 첨가하여 혼합한 후, heating mantle로 80°C에서 4시간 강열 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액을 Whatman No.2 여과지로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 감압농축기를 사용하여 45°C에서 감압 농축시켰으며, 동결건조 후 24 g의 추출물을 회수하였다. 만병초 추출물은 분석시까지 -80°C에서 보관하였다.

### Total antioxidant capacity(TAC) 측정

총항산화능(total antioxidant status)은 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 방법을 수정한 Erel(2004)의 방법에 따라 TAC를 측정하였다. 추출물에 0.35 M acetate 완충용액과 0.89 mM 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액 및 0.44 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 등을 첨가하고 혼합한 뒤 5분 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였고, TAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 α-tocopherol을 사용하여 TAC를 비교 조사하였다.

### Superoxide 소거활성 측정

Superoxide 소거활성은 Liu *et al.*(1997)의 방법에 따라 측정하였다. 추출물에 62 μM nitro blue tetrazolium(NBT)과 98 μM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0)을 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액과 33 μM phenazine methosulfate(PMS)를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된

superoxide는 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시키며, 생성된 formazan을 측정하기 위해 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 추출물의 superoxide 소거활성(%)은  $[(\text{흡광도}_{\text{추출물무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{추출물}}) / \text{흡광도}_{\text{추출물무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 또한, 양성 대조군으로 α-tocopherol을 사용하여 superoxide 소거활성을 비교 조사하였다.

### Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) 측정

ORAC assay는 Huang *et al.*(2002)의 방법에 따라 추출물에  $6 \times 10^{-5}$  mM fluorescein 용액을 첨가하고 37°C에서 10분간 가열한 다음 19 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH) 용액을 첨가한 뒤, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 2분 간격으로 50분간 측정하였다. 표준시약으로 Trolox를 사용하였으며, 표준시약과 추출물의 area under the curve(AUC)를 측정하였다. ORAC는 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 μM Trolox equivalent로 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 ORAC를 비교 조사하였다.

### 총페놀 함량(total phenolic content) 측정

추출물내 총페놀 함량은 Singleton and Orthofer(1999)의 방법에 따라 추출물에 0.08 N Folin-Ciocalteu 시약을 첨가하고 실온에서 6분간 방치한 다음 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가하고 90분간 방치한 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 표준시약으로 gallic acid를 사용하여 표준곡선을 작성하였고, 총페놀 함량은 mM gallic acid equivalent로 표기하였다.

### Lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정

만병초 추출물의 세포독성 억제 효과를 조사하기 위해 tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)로 유도된 HepG2 세포배양실험에서 만병초 추출물 첨가에 의한 세포 생존율을 측정하였다. HepG2 세포(KCLB No. 88065)는 한국세포주은행으로부터 구입하였다. HepG2 세포를 10% FBS와 100 U/mL penicillin 및 100 ug/mL streptomycine이 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 24-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 100% confluent에 도달한 후 t-BHP(0.2 및 0.5 mM) 또는 만병초 추출물(0.1 mg/mL)이 포함된 배

지로 교체하고 4시간 동안 배양하였다. 세포배양액의 LDH 활성은 Tirmenstein *et al.* (2000)의 방법에 따라 세포배양액에 3.75 mM NAD<sup>+</sup>와 50 mM lactic acid가 포함된 용액을 첨가한 뒤, excitation 파장 360 nm와 emission 파장 460 nm에서 NADH 형성에 따른 형광도 증가를 측정하였다. 세포 생존율은 LDH 활성을 측정함으로써 결정하였다.

**통계 분석**

추출물 농도별 항산화 활성은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였고, 농도별 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test(Steel and Torrie, 1980)를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다. 또한, 추출물과 양성대조군의 항산화 효능 비교는 대응표본 T-검정을 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**TAC**

총항산화능은 Trolox를 표준물질로 사용하여 ABTS radical에 대한 소거활성을 흡광도로 측정하였으며, 만병초 추출물의 농도별 TAC는 Fig. 1에 나타나 있다. 만병초 추출물 0.1 mg/mL 농도의 TAC는 0.04 mM Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여 0.2, 0.5, 1 및 2 mg/mL 농도에서는

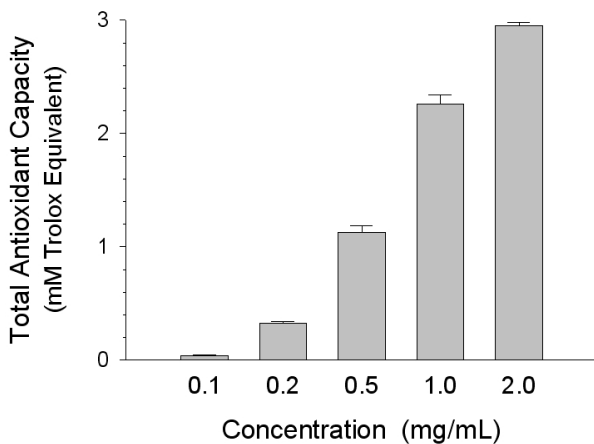


Fig. 1. Total antioxidant capacity of *R. brachycarpum* extracts. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations.

각각 0.33, 1.13, 2.26 및 2.95 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 양성 대조군으로 사용한 α-tocopherol 0.5 mg/mL 농도의 TAC는 1.02 mM Trolox equivalent로 나타나, 만병초의 총항산화능이 α-tocopherol과 유사하였다(p>0.05).

**Superoxide 소거활성**

Superoxide 소거활성은 추출물 무첨가군의 흡광도 변화를 100%로 기준하여 추출물 첨가군의 흡광도 변화를 superoxide 생성 억제율로 표시하였다. 만병초 추출물의 농도별 superoxide 소거활성은 Fig. 2에 나타나 있다. 만병초 추출물 0.1 mg/mL 농도의 superoxide 소거활성은 32.8%이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 소거활성도 증가하여, 0.2, 0.5, 1 및 2 mg/mL 농도의 만병초 추출물의 superoxide 소거활성은 각각 45.0, 66.0, 77.0 및 81.1%로 나타났다. 양성 대조군으로 사용한 α-tocopherol 0.5 mg/mL 농도의 superoxide 소거활성은 56.1%로 나타나, 만병초의 superoxide 소거활성이 α-tocopherol과 유사하였다(p>0.05). 또한, *R. yedoense* var. *Poukhanense*로부터 추출된 flavonoid 성분들을 이용한 연구(Jung *et al.*, 2007)에서도 본 연구에서 관찰된 만병초 추출물의 항산화 효과와 유사하게 탁월한 superoxide 및 DPPH 라디칼 소거활성이 보고된 바 있다.

**ORAC**

ORAC assay는 AUC를 측정함으로써, free radical 손

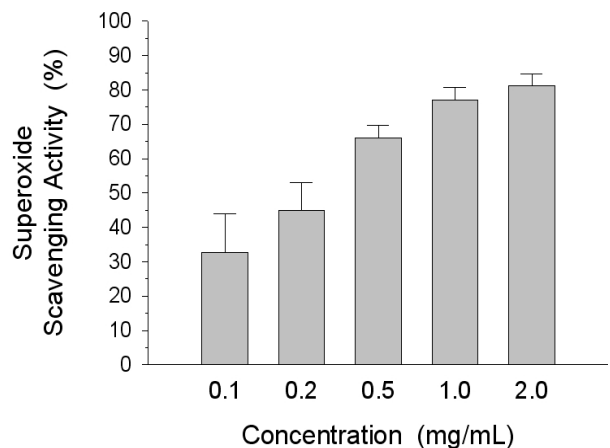


Fig. 2. Superoxide radical scavenging activities of *R. brachycarpum* extracts. Data results were expressed as % inhibition of the activity. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations.

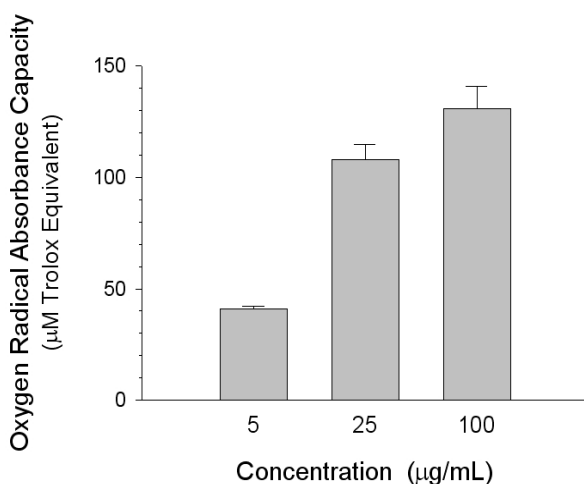


Fig. 3. Oxygen radical absorbance capacity of *R. brachycarpum* extracts. Data results were expressed as in terms of µM Trolox equivalent. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations.

상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 항산화능 측정 방법이다. Trolox를 표준물질로 사용하여 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical에 대한 소거활성을 형광도로 측정하였으며, 만병초 추출물의 농도별 ORAC는 Fig. 3에 나타나 있다. 만병초 추출물 5 µg/mL 농도의 ORAC는 40.88 µM Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 ORAC도 증가하여, 25 및 100 µg/mL 농도의 만병초 추출물의 ORAC는 각각 107.88 및 131.00 µM Trolox equivalent로 나타났다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid 100 µg/mL 농도의 ORAC는 33.6 µM Trolox equivalent로 나타나, 만병초의 peroxy radical 소거활성은 ascorbic acid에 비해 월등히( $p < 0.05$ ) 높았다.

### 총페놀 함량

만병초 추출물의 농도별 총페놀 함량은 Fig. 4에 나타나 있다. 만병초 추출물 0.1 mg/mL 농도의 총페놀 함량은 0.26 mM gallic acid equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총페놀 함량도 비례적으로 증가하여, 0.2, 0.5, 1 및 2 mg/mL 농도에서 각각 0.37, 0.71, 1.25 및 2.15 mM gallic acid equivalent로 나타나, 만병초 추출물의 총페놀 함량이 매우 높은 것으로 관찰되었다.

### 세포독성 억제 효과

만병초 추출물의 농도별 세포독성 억제 효과는 Fig. 5에

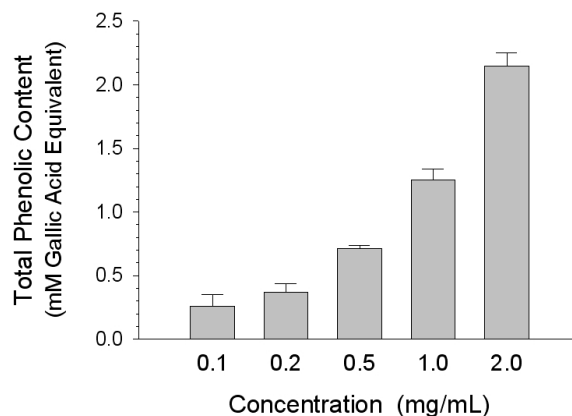


Fig. 4. Total phenolic content of *R. brachycarpum* extracts. Data results were expressed as in terms of mM gallic acid equivalent. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations.

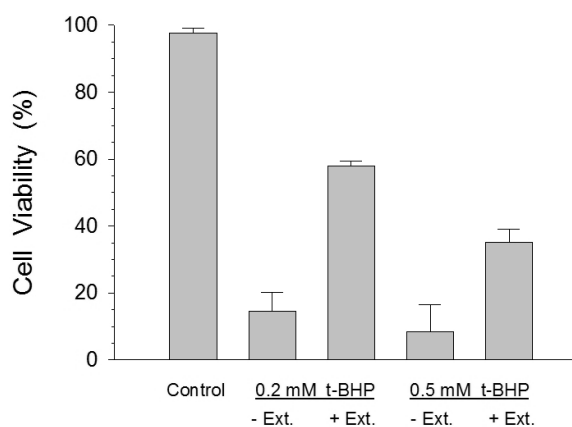


Fig. 5. The effect of the *R. brachycarpum* extracts on HepG2 cell viability. HepG2 cells were cultured for 4 h in the presence of t-BHP (0.2 or 0.5 mM) and/or 0.1 mg/mL of the *R. brachycarpum* extracts. Cell viability was determined using LDH method. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations.

나타나 있다. 세포 생존율은 총 LDH 활성에 대한 세포배양액의 LDH 활성을 측정함으로써 결정하였다. HepG2 세포에 0.2 및 0.5 mM 농도의 t-BHP를 첨가한 뒤 4시간 배양한 결과, 대조군(t-BHP 무첨가군), 0.2 및 0.5 mM 농도의 t-BHP 첨가군들의 생존율은 각각 97.6, 14.6 및 8.4%로 나타나, t-BHP가 HepG2 세포 독성을 유발하였음을 알 수 있었다. HepG2 세포배양에서 0.2 및 0.5 mM 농도의 t-BHP 존재하에 만병초 추출물 0.1 mg/mL 농도의 첨가는 각각 57.9 및 35.2%의 생존율을 나타내, 만병초 추출

물이 세포독성에 의한 손상을 각각 52.1 및 30.3% 유의적으로(p<0.05) 억제시켰다.

따라서, 본 연구 결과들은 만병초 추출물의 강력한 항산화 효과와 세포 독성 억제 효과를 나타내 보이고 있으며, 이러한 효능들은 적어도 자유라디칼의 산화 억제와 높은 총페놀 함량에 기인하는 것으로 사료된다. 또한, 향후 만병초 추출물의 항산화 성분 분석과 동정 및 항산화 기전 연구와 더불어 만병초 추출물의 천연 항산화제로의 개발 가능성을 시사하고 있다.

## 사 사

이 논문은 2010년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

## 적 요

본 연구에서는 만병초 95% 에탄올추출물의 항산화 효과를 조사하였다. 총항산화 활성은 ABTS 라디칼에 대한 항산화능으로 측정하였다. 만병초 추출물 0.2 및 1 mg/mL의 총항산화능은 각각 0.33 및 2.26 mM Trolox와 동등한 수준이었다. 만병초 추출물 0.2 및 1 mg/mL의 superoxide 소거능은 각각 45.0 및 77.0%이었다. 만병초 추출물 5 및 100 µg/mL의 산소라디칼 소거능은 각각 40.88 및 131.00 µM Trolox와 동등한 수준이었다. 만병초 추출물 0.2 및 1 mg/mL의 총페놀 함량은 각각 0.37 및 1.25 mM gallic acid와 동등한 수준이었다. 또한, HepG2 세포주를 이용한 세포배양에서 만병초 추출물 0.1 mg/mL 농도의 첨가는 0.2 및 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide로 유도된 세포독성을 각각 52.1 및 30.3% 감소시켰다. 따라서, 본 연구 결과들은 만병초 추출물의 강력한 항산화 효과와 세포독성 억제 효과를 나타내며, 이러한 효능은 적어도 자유라디칼의 산화 억제와 높은 총페놀 함량에 기인하는 것으로 사료된다.

## 인용문헌

Ahn, D.K. 2000. Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyohaksa. Seoul, Korea. p.751 (in Korean).  
 Byun, K.S., Y.W. Lee, H.J. Jin, M.K., Lee, H.Y. Lee, K.J. Lee, M.Y. H, C.Y. Yu and J.H. Lee. 2005. Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves.

Korean J. Medicinal Crop Sci. 13:199-205 (in Korean).  
 Choi, J.S., H.S. Young, J.C. Park, J.-H. Choi and W.S. Woo. 1986. Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*. Arch. Pharm. Res. 9:233-36.  
 Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin. Biochem. 37:277-285.  
 Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge and C.E. Cross. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J. Lab Clin. Med. 119:598-620.  
 Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J. Agric. Food Chem. 50:4437-4444.  
 Jung, S.J., D.-H. Kim, Y.-H. Hong, J.-H. Lee, H.-N. Song, Y.-D. Rho and N.-I. Baek. 2007. Flavonoids from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* and their antioxidant activities. Arch. Pharm. Res. 30:146-150.  
 Liu, F., V.E.C. Ooi and S.T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sci. 60:763-771.  
 Singleton, V.L. and R. Orthofer. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178.  
 Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, 2nd ed, McGraw-Hill, New York, pp. 186-187.  
 Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. American J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L1005-L1029.  
 Tirmenstein, M.A., F.A. Nicholls-Grzemeski, J.-G. Zhang and M.W. Fariss. 2000. Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. Chem. Biol. Interact. 127:201-217.  
 Yang Y.J., H.-J. Kim, S.-H. Kang and S.C. Kang. 2011. Screening of natural herb resources for anti-oxidative effects in Korea. Korean J. Plant Res. 24:1-9 (in Korean).  
 Youn, H. and J.-H. Cho. 1991. Isolation and structure elucidation of triterpenoidal constituents from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*. Korean J. Pharmacogn. 22:18-21.

(접수일 2011.5.6; 수정일 2011.5.10; 채택일 2011.7.21)