

백두옹 분획층의 항산화 효과

조현진¹, 윤현정¹, 이효승¹, 박선동¹

1 : 동국대학교 한의과대학 방제학교실.

Anti-oxidative effects of fractionated *Pulsatilla koreana* NAKAI extracts

Hyun-Jin Cho¹, Hyun-Jeong Yun¹, Hyo-Seung Yi¹
and Sun-Dong Park^{1*}

1 : Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University.

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of anti-oxidation of fractionated *Pulsatilla koreana* NAKAI (PK) extracts. And we examined to determine that a certain fractionated extract has the best anti-oxidative effects between the fractionated PK extracts.

Methods : Anti-oxidative effects of fractionated PK extracts was measured by scavenging activities of DPPH, superoxide, nitric oxide (NO) and peroxy nitrite radicals. And also scavenging activities of anti-oxidation in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cell was measured. After these examination, we determined a fraction that has best anti-oxidative effects.

Results : Fractionated PK extracts inhibited radicals effectively. Also in RAW 264.7 cell, intracellular oxidation has inhibited by PK extracts. In these tests, ethyl acetate (EA) fraction has the best anti-oxidative effects among PK extracts.

Conclusions : This results demonstrate that PK extracts exhibit anti-oxidative effects. And EA fraction has the best inhibition effects among the six fractions of PK.

Key words : *Pulsatilla koreana* NAKAI, anti-oxidation, DPPH, superoxide, nitric oxide, Peroxy nitrite.

서론

白頭翁은 미나리아재비과 (Ranunculaceae)에 속한 다년생 草本인 할미꽃 (*Pulsatilla koreana* NAKAI ; PK) 및 同屬 近緣植物의 뿌리를 건조한 것이다. 性味가 苦寒하여 清熱解毒, 涼血止痢하는 효능이 있어 熱毒血痢, 陰瘡帶下나 아메바성 이질을 치료하는데 응용해 왔다¹⁾. 백두옹에 대한 실험연구로는 항진균 효과²⁾, 항균효과^{3,4)}, 소염진통효과^{5,6)}, 항염증효과⁷⁾ 등이 보고된 바 있으며, 백두옹 성분의 약리작용에 관한 연구로서는 항종양 효과⁸⁾, 신경보호 및 인지향상 효과⁹⁾

및 항여드름 효과¹⁰⁾ 등이 보고되어 있다. 그러나 백두옹의 분획층별 추출물을 이용한 항산화 활성에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

생명체는 생존하기 위하여 산소를 필수적으로 소비해야 한다. 하지만 세포로 흡수된 산소의 1~4%는 완전히 환원되지 못하고 free radical로 전이되어 세포독성을 나타내게 된다¹¹⁾. 산화적 세포손상에 관여하는 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 superoxide (O₂⁻), nitric oxide (NO), hydroxyl radical (·OH) 등의 free radical 들이 대표적인데

*교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· E-mail : sundong@dongguk.ac.kr · Tel : 054-770-2371
· 접수 : 2010년 5월 1일 · 수정 : 2010년 6월 3일 · 채택 : 2010년 6월 22일

이들의 조절이 산화적 세포손상을 억제하는데 필수적이다¹²⁾. 최근에는 합성 항산화제의 부작용을 극복하기 위하여 천연자원에서 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있으며¹³⁾, 한의학에서 오랜 기간 임상에 이용해 왔던 한약재들은 천연 항산화제 발견의 기반이 될 수 있다.

본 연구에서는 백두옹을 메탄올 추출하여 그 추출물을 Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Butanol의 네 가지 유기용매로 분획하여 각각의 추출물들의 *in vitro* 상에서 항산화 활성을 비교하였고, 마우스의 대식세포인 RAW 264,7을 이용하여 LPS로 ROS를 유도시킨 후 세포내의 ROS의 생산을 측정하였다. 이러한 실험의 결과를 바탕으로 항산화 효과가 가장 뛰어난 분획층을 선정하였다. 본 연구의 결과로 백두옹 분획층의 항산화 활성에 관하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용한 백두옹은 (주) 휴먼허브 (경북, 경산)에서 구입하여 사용하였으며, 백두옹 300g에 2000ml의 100% methanol을 가한 다음 70°C에서 24시간 추출하는 과정을 3번 실시하여 총 6000ml의 메탄올을 수득하였다. 수득한 메탄올을 여과하여 농축 및 동결건조하여 153.9g의 메탄올 추출물 (수득율 51.3%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 Fig. 1에서 도식한 바와 같이 유기용매인 hexane (H), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), butanol (B)로 분획하고, 분획 후 남은 aqueous extract (A)를 수득하였다.

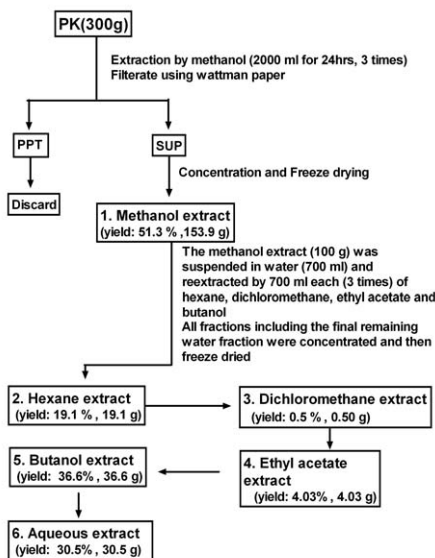


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of PK

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, hypoxanthine, nitro blue tetrazolium (NBT), xanthine oxidase, sodium nitroprusside (SNP), lipopolysaccharide (LPS), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Molecular Probes사 (Eugene, USA)에서 구입하였고, Peroxynitrite는 Cayman Chemical사 (Ann Arbor, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit, tris base는 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였다. 세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) Free radical 소거활성 측정

1-1) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등의 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다. 먼저 백두옹 분획 층별 시료 50 µl에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 µl를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 30분간 정치한 다음, microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 50%의 소거능을 보이는 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

1-2) Superoxide anions 소거활성 측정

Superoxide anions 소거활성은 Gotoh와 Niki의 방법¹⁵⁾을 일부 수정하여 측정하였다. 먼저 분획 층별 시료 30 µl에 30 mM EDTA (pH 7.4) 100 µl, 30 mM hypoxanthine 10 µl, 1.42 mM NBT 200 µl를 가한 다음 실온에서 3분 반응시킨 후에, 0.5 U/ml xanthine oxidase 100 µl를 첨가하고 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 총 용량을 3 ml로 맞췄다. 반응용액을 실온에서 20분간 배양시킨 후, 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 결과는 superoxide radical에 의한 NBT reduction의 IC₅₀ 값으로 환산하여 표시하였다.

1-3) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide의 소거활성은 Sutherland 등의 방법¹⁶⁾에 의하여 측정하였다. 먼저 1 mg의 DAF-2를 0.55 ml의 DMSO에 용해시키고, 이를 다시 50 mM phosphate buffer를 사용하여 400배 (v/v)로 희석해서 DAF-2 용액을 준비해 놓았다. 분획 층별 시료 10 μ l를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 μ l와 혼합한 다음, 40 mM SNP 10 μ l 및 DAF-2 용액 50 μ l를 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 10분간 배양한 다음, DAF-2와 NO의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광강도를 fluorescence microplate reader (SPECTRA MAX GEMINI EM, Molecular Devices Corp., USA)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

1-4) Peroxynitrite 소거활성 측정

백두옹의 Peroxynitrite 소거활성은 Kooy 등의 방법¹⁷⁾에 의하여 측정하였다. 분획 층별 시료 10 μ l를 4 μ l의 5 mM DTPA와 0.2 μ l의 5 mM DHR 123을 포함하고 있는 rhodamine buffer (50 mM sodium phosphate dibasic, 50 mM sodium phosphate monobasic, 90 mM sodium chloride and 5 mM potassium chloride)와 섞어준다. 반응은 10 μ M peroxynitrite를 10 μ l 넣으면서 시작되는데, 실온에서 10분간 배양한 다음, DHR 123과 peroxynitrite의 반응에 의해 생성되는 형광강도를 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 480 nm 및 emission 파장 530 nm에서 측정하였다.

2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) MTS assay

백두옹 분획층의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법¹⁸⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약재를 농도별 (0, 10, 30, 50, 70,

100 μ g/ml)로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20 μ l의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

4) DCF-DA assay

백두옹의 분획물이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다^{19,20)}. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고, 분획층별로 50 μ g/ml 을 처리하였다. 1시간 배양 후에, 100 ng/ml의 LPS를 가한 다음, 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 PBS로 1회 세척한 후, PBS buffer로 희석된 10 μ M DCFH-DA를 가하고, 45분간 배양하였다. 그 후 PBS buffer로 2회 washing한 다음 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가는 대조군과 비교해서 배수 (fold)로 계산하였다.

5) 통계처리

결과는 means \pm SEM으로 나타내었으며, 통계분석 방법은 GraphPad Prism 4.0을 이용하여 one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests를 실시한 후, P 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

1. 백두옹 분획층의 free radical 소거활성 측정

1-1) DPPH radical 소거활성 측정

백두옹 메탄을 추출물과 그 분획층별 추출물 간의 전자 공여능을 상호 비교하기 위하여 DPPH radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 본 실험의 결과, 백두옹 메탄을 추출물은 83.52 \pm 4.93 μ g/ml의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다. 분획층의 경우에는 hexane층은 94.39 \pm 2.61 μ g/ml, DCM 층은 59.61 \pm 0.25 μ g/ml, EA 층은 11.69 \pm 1.15 μ g

/ml, butanol 층은 $276.21 \pm 7.10 \mu\text{g/ml}$, aqueous 층은 $523.01 \pm 35.91 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다.

1-2) Superoxide anions 소거활성 측정

항산화능을 측정하기 위하여 널리 행해지는 Superoxide radical에 대한 소거활성의 경우에는, 백

두옹 메탄올 추출물의 경우 $483.9 \pm 38.84 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 소거활성을 나타내었고, 분획층의 경우에는 hexane층과 DCM 층은 50%의 소거활성을 계산할 수 없었고 EA 층은 $25.88 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$, butanol 층은 $211.4 \pm 3.77 \mu\text{g/ml}$, aqueous 층은 $235.0 \pm 4.79 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 superoxide anions 소거능을 나타내었다.

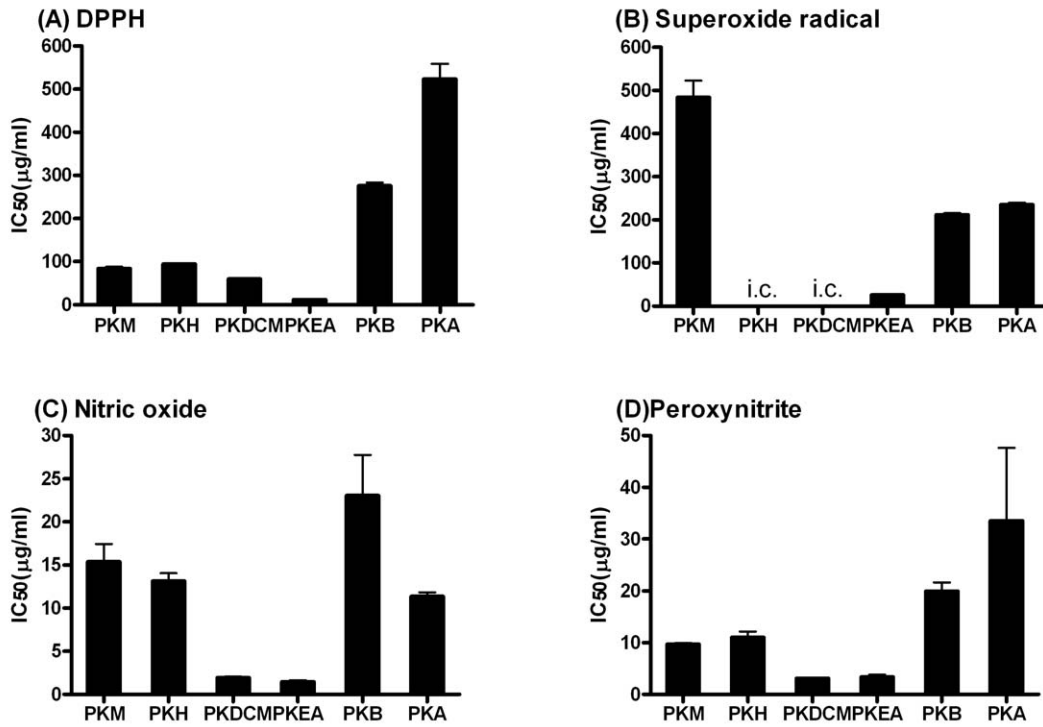


Fig. 2. Scavenging activities of fractionated PK extracts on various free radicals. The results are expressed as IC50 values, and data were chosen from three independent experiments. (A) Scavenging activity on DPPH radicals. (B) Scavenging activity on Superoxide anions. (C) Scavenging activity on Nitric oxide. (D) Scavenging activity on Peroxynitrite. Data were chosen from three independent experiments. ※ i.c. means incalculable.

1-3) Nitric oxide 소거활성 측정

산화적 스트레스에 중요한 역할을 담당하는 대표적인 활성질소종인 nitric oxide (NO)에 대한 소거능을 관찰하였다. 이를 위해 *in vitro*상에서 sodium nitroprusside (SNP)로 NO의 생성을 유도한 후, 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)을 이용하여 형광강도를 측정하였다. 본 실험의 결과, 백두옹 메탄올 추출물은 $15.38 \pm 2.06 \mu\text{g/ml}$ 에서 50%의 NO 소거능을 나타내었고, 분획층의 경우에는 hexane층은 $13.13 \pm 0.93 \mu\text{g/ml}$, DCM 층은 $1.95 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$, EA 층은 $1.44 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$, butanol 층은 $23.06 \pm 4.72 \mu\text{g/ml}$, aqueous 층은 $11.37 \pm 0.48 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 소거활성을

나타내었다.

1-4) Peroxynitrite 소거활성 측정

Peroxynitrite는 nitric oxide와 마찬가지로 RNS로 NO에 비하여 짧은 반감기를 가져 산화적 스트레스 (oxidative stress)의 강한 유도체로 알려져 있다. 이에 대한 소거활성을 측정하기 위해 *in vitro*상에서 peroxynitrite를 직접처리한 후 DHR123을 이용하여 형광강도를 측정하였다. 본 실험의 결과, 백두옹 메탄올 추출물은 $9.71 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$ 에서 50%의 소거능을 나타내었고, 분획층별로는 hexane 층은 $11.02 \pm 1.13 \mu\text{g/ml}$,

DCM 층은 $3.089 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$, EA 층은

3.36±0.47 $\mu\text{g/ml}$, butanol 층은 19.93±1.71 $\mu\text{g/ml}$, aqueous 층은 33.53±14.13 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 소거활성을 나타내었다.

2. 백두옹 EA 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

Mouse의 Macrophage인 RAW 264.7에 대한 백두옹 분획층의 세포독성을 측정하기 위해 MTS

assay를 실시하였다. 분획층을 농도별 (0, 10, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 18시간 처리한 결과, 모든 분획층에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에 75% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 백두옹의 분획층별 추출물이 RAW 264.7의 세포생존률에 영향을 주지 않는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 다음 실험을 실시하였다. 이는 백두옹 추출물의 항산화 작용이 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 약재의 고유한 효과임을 나타낸다.

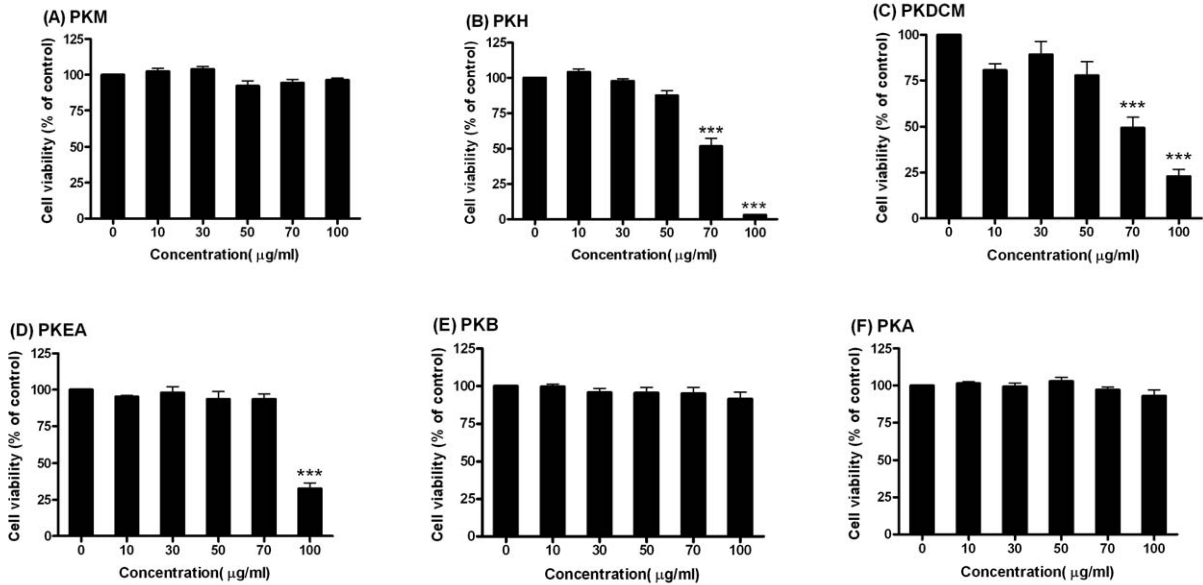


Fig. 3. Effect of fractionated PK extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 10, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g/ml}$) of fractionated PK extracts for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent experiments. ***P < 0.001 vs. control group.

3. 백두옹 분획층의 RAW 264.7 세포의 산화적 손상에 대한 보호효과 측정

백두옹 분획층이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화 손상을 보호하는 효과를 검토하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포에 각 분획층별로 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 전처리한 다음, LPS를 처리하여 세포의 산화적 손상을 유발한 후 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여, LPS 만을 처리한 실험군에서는 평균 3.53배 증가하여 유의할 만한 형광강도의 증가를 나타내었다. 이는 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포의 산화 손상을 효과적으로 유발하였음을 나타내는 결과이다. 각 분획층을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 methanol 층은 1.99배, hexane 층은 2.11배, DCM 층은 1.72배, EA 층은

1.49배, butanol 층은 1.67배, aqueous 층은 1.66배로 나타났다.

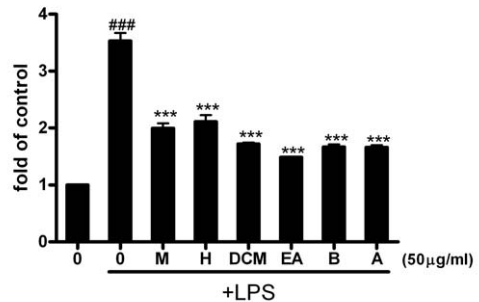


Fig. 4. Inhibitory effect of fractionated PK extracts on intracellular oxidation in RAW 264.7 induced by LPS. RAW 264.7 cells were preincubated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of fractionated PK extracts for 18 hr, 100 ng/ml of LPS were treated to induce intracellular oxidation. The increase of DCF fluorescence was calculated to increasing fold of control. Data are represented as means±SEM. ###P < 0.001 vs. control group, ***P < 0.001 vs. LPS alone group.

고찰

산소는 생명체가 생존하는데 필수적이지만, 산화에 의해 생성되는 각종 산화생성물은 DNA를 손상시키거나 암을 유발하며, 노화과정과도 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 사용되던 폐놀계 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxy anisol)와 BHT(butylated hydroxy toluene)는 과량 섭취시 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성 작용을 일으키는 것으로 알려졌다^{21,22)}. 이러한 부작용과 최근 대두되고 있는 합성 식품 첨가물의 기피 현상은 인체에 무해한 천연 항산화제의 수요를 발생시키고 있다. 따라서 인체에 무해한 천연 항산화제에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

백두옹은 서론에 언급한 바와 같이 淸熱解毒하는 효능이 있어 항염증 및 항균효과에 초점을 맞추어 연구가 진행되어 왔다. 염증을 일으키는 원인으로는 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines) 뿐만 아니라 ROS와 RNS가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 따라서 기존에 항염증 효능이 검증된 한약재는 항산화 효과를 나타낼 수 있는 가능성이 있다고 사료되었다. 송⁷⁾은 백두옹 추출물의 항염증 효과에 관하여 규명하면서 NO와 염증성 사이토카인의 생산을 조사하는 방법을 선택한 바 있으나 항산화 효능을 규명하기 위해서는 다양한 종류의 ROS와 RNS의 소거능을 측정하는 작업이 필요하였다. 하지만 기존에는 백두옹의 ROS와 RNS의 소거능에 관하여 총괄적으로 연구된 바가 없어 추가적인 연구가 필요하다고 판단하였다.

본 연구에서는 백두옹의 항산화 활성을 측정하고 메탄올 추출물을 분획하여 각 분획층 중에 어떤 분획층의 항산화 효능이 가장 뛰어난지를 검증하였다. 산화에 중요한 인자인 ROS와 RNS의 소거에 대한 백두옹 분획층의 효과를 측정하기 위하여 DPPH radical, superoxide radical, nitric oxide, peroxyntirite의 소거활성을 측정하였다. DPPH radical은 안정적인 free radical로 전자나 hydrogen radical을 받아서 안정적인 반자성(diamagnetic) 분자가 되는 특성이 있어 비교적 간편하면서도 재현성 있게 항산화력을 측정할 수 있다^{24,25)}. 실험결과 백두옹의 EA 분획층이 DPPH radical을 가장 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다(Fig. 2A). Superoxide radical은 산화적 인산화의 과정 중에 생성되며 다른 ROS로 전환되어 직접적 혹은 간접적으로 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 항산화 방어체계에 문제가 생겨 전환이 원활하지 못하면 산화스트레스의 중요한 요인이 된다²⁶⁾. Superoxide radical을 소거하는 효능 역시

백두옹의 EA 분획층이 가장 뛰어났다(Fig. 2B). NO는 자체로 산화반응에 관여할 뿐만 아니라 superoxide anion(O₂⁻)과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 좋고 독성이 강력한 산화제인 peroxyntirite(ONOO⁻)를 생성한다. Peroxyntirite는 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 또한 반응 속도는 H₂O₂의 수천 배에 이르며 신경세포에서 짧은 시간 동안 급속한 손상을 유발하는 것으로 보고되었다. 그러므로 과도한 NO의 생성을 저해하고, peroxyntirite를 소거하는 물질은 산화손상을 억제 하는데 유용할 것으로 기대된다²⁷⁾. NO를 소거하는 작용도 EA 분획층이 가장 강력하였으며, peroxyntirite의 경우에는 DCM과 EA 분획층이 가장 소거능력이 좋았다(Fig 2C, 2D). 이러한 실험결과를 종합하여 보면 백두옹의 분획층들 중에서 EA 분획층이 가장 좋은 수소공여능, ROS와 RNS 소거능을 가지고 있다고 판단되었다.

이러한 결과를 바탕으로 백두옹 분획층의 항산화 효과를 보다 명확히 분석하기 위하여 마우스의 대식세포인 RAW 264.7에서 intracellular ROS를 측정하였다. Intracellular ROS radical 소거능을 측정하기 위해서는 DCF-DA assay가 사용된다. DCF-DA assay는 다양한 세포에서 산화 스트레스를 재현할 수 있으며, *in vitro* 상에서 항산화 효과를 보다 민감하고 효과적으로 평가할 수 있는 방법이다²⁸⁾. 먼저 MTS assay를 실시하여 모든 층에서 세포 독성이 없는 농도인 50 µg/ml을 선정하였다(Fig. 3). 그 후 동일 농도로 분획층을 처리하였을 때의 결과를 비교하였다(Fig. 4). 그 결과 EA 분획층이 세포의 산화손상을 가장 효과적으로 보호하는 결과를 나타냈다. 이는 백두옹의 EA 분획층이 세포 내의 ROS를 효과적으로 억제하여 세포의 산화손상을 방지하는데 가장 좋은 효과가 있음이 증명된 것이다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, 백두옹에서 항산화 물질을 찾기 위한 추가적인 연구를 실시할 때는 백두옹의 EA 분획층을 우선시해야 할 것이다.

결론

백두옹 분획층의 항산화 효과를 검증하기 위하여 free radical의 소거능을 측정하고, 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 실험을 진행한 결과 백두옹은 free radical을 효과적으로 소거하고 마우스의 대식세포에서 산화 손상을 보호하는 효과가 있으며, 그 분획층 중에는 EA 분획층이 가장 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 이는 백두옹이 차후 천연 항산화

물질을 개발할 때 유효한 기반 한약재라는 것을 의미하며, 차후 심화 연구나 실용화 연구를 할 때 EA 분획층을 대상으로 하는 것이 가장 효율적일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 동국대학교 논문 게재 장려금 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. 강병수 외. 本草學. 서울 : 영림사. 2000 : 218-19.
2. 최인호, 김연희, 이동녕, 김형준. Candida albicans에 대한 계지(桂枝), 백두옹(白頭翁), 백선피(白鮮皮), 백작약(白芍藥), 빈랑, 인진(茵陳)의 항진균효과. 東醫生理病理學會誌. 2005 ; 19(3) : 690-95.
3. 정성화, 정진형, 임성빈. 백두옹 추출물의 치주 병인균에 대한 항균효과 백두옹 추출물의 치주 병인균에 대한 항균효과. 대한치주과학회지. 2000 ; 30(3) : 661-76.
4. 배지현. 백두옹 추출물의 식중독성 미생물에 대한 항균효과. 韓國營養學會誌. 2004 ; 37(8) : 655-61.
5. 천선아, 최병기, 김성연. 백두옹의 소염진통작용. The journal of applied pharmacology : the official journal of the Korean Society of Applied Pharmacology. 2000 ; 8(3) : 207-12.
6. 천선아, 최병기, 정춘식, 이대위, 이은방. 백두옹 엑스 분획물의 소염진통작용. 생약학회지. 2000 ; 31(2) : 174-84.
7. 박성주, 송호준. LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 백두옹 추출물의 항염증 효과. 大韓本草學會誌. 2007 ; 22(1) : 111-17.
8. Kim Y, Bang SC, Lee JH, Ahn BZ. Pulsatilla saponin D: the antitumor principle from Pulsatilla koreana. Arch Pharm Res. 2004 ; 27(9) : 915-18.
9. Han CK, Choi WR, Oh KB. Cognition-enhancing and neuroprotective effects of hederacolchiside-E from Pulsatilla koreana. Planta Med. 2007 ; 73(7) : 665-9.
10. Cho SC, Sultan MZ, Moon SS. Anti-acne activities of pulsaquinone, hydropulsaquinone, and structurally related 1, 4-quinone derivatives. Arch Pharm Res. 2009 ; 32(4) : 489-94.
11. Park SN. Skin aging and antioxidants. J Korean Soc Cosmetic Chem. 1997 ; 23 : 75-132.
12. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev. 1996 ; 76(3) : 839-85.
13. Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. Mol Pharmacol. 1997 ; 52(3) : 465-72.
14. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. Gen Pharmacol. 1999 ; 32 : 661-7.
15. Gotoh N, Niki E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. Biochim Biophys Acta. 1992 ; 1115 : 201-7.
16. Sutherland H, Khundkar R, Zolle O, McArdle A, Simpson AW, Jarvis JC, Salmons S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. Nitric Oxide. 2001 ; 5 : 475-81.
17. Kooy NW, Royall JA, Ischiropulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radical Biol Med. 1994 ; 16 : 149-56.
18. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. J Pharm Sci. 2008 ; 97(7) : 2745-56.
19. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radic Biol Med. 1999 ; 27 : 612-6.
20. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. Free Radic Biol Med.

- 1996 ; 20 : 121-7.
21. 정성제, 이진희, 송효남, 성낙술, 이승은, 백남인. 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색. 韓國農化學會誌. 2004 ; 47(1) : 135-40.
 22. Al-Reza SM, Rahman A, Sattar MA, Rahman MO, Fida HM. Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salib. Food Chem Toxicol. 2010 ; Articles in Press.
 23. Goyette J, Geczy CL. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. Amino Acids. 2010 ; Epub ahead of print.
 24. Jie Y, Seong-il H, Myeong-Hyeon W. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. Nutrition Research and Practice. 2008 ; 2(4) : 247-51.
 25. 김민산, 허중문, 박종철. 207종 한약과 활성 한약이 포함된 19종 한약 방제의 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl 라디칼 소거작용. 대한한의 학방제학회지. 2004 ; 12(1) : 159-75.
 26. Kim YD, Senevirathne M, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2009 ; 38(4) : 462-69.
 27. 김재연, 김지선, 정찬식, 진창배, 류재하. 들깨 잎 추출물의 Nitric Oxide Synthase저해활성 및 Peroxynitrite 소거활성. 생약학회지. 2007 ; 38(2) : 1-24.
 28. Tung NH, Song GY, Nhiem NX, Ding Y, Tai BH, Jin LG, Lim CM, Hyun JW, Park CJ, Kang HK, Kim YH. Dammarane-type saponins from the flower buds of Panax ginseng and their intracellular radical scavenging capacity. J Agric Food Chem. 2010 ; 58(2) : 868-74.