

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물이 활성산소종, 활성질소종 및 저밀도 지단백의 산화에 미치는 효과

문진영* · 박주연

동국대학교 한의과대학 한의학과

Effects of the Young Branch of *Prunus persica* Methanol Extracts and Solvent Fractions on ROS, RNS and Oxidized Low-Density Lipoprotein

Jin Young Moon*, Ju Yeon Park

College of Korean Medicine, Dongguk University

This study was designed to analyze the effects of methanol extracts and solvent fractions of the young branch of *Prunus persica* on scavenging activity of ROS, RNS and inhibiting activity of oxidative modification in human LDL induced by copper ion or free radical generator. The scavenging capacities of the fractions on DPPH radical, superoxide radical, nitric oxide and peroxyxynitrite were exhibited the highest in ethylacetate fraction, followed by butanol fraction. In the copper-induced LDL oxidative modification system, the highest antioxidant activity was revealed in ethylacetate fraction, and butanol fraction exhibited a similar activity. However, solvent fractions of the young branch of *Prunus persica* showed a relatively low antioxidant activity in the AAPH-mediated LDL oxidation. In addition, ethylacetate and butanol fractions also inhibited the copper-mediated LDL oxidation in the REM assay, which was comparable to that of the positive controls, including EDTA, ascorbic acid and BHT. Furthermore, a content of total phenolics in these two fractions was higher than that of the other fractions. These results indicated that ethylacetate and butanol fractions of the young branch of *Prunus persica* were useful for the prevention of the free radical- or metal ion-induced oxidative damages.

Key words : the young branch of *Prunus persica*, free radical, antioxidant activity, LDL oxidation

서 론

생체 내 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)과 활성 질소종(reactive nitrogen species : RNS)의 과다 생성으로 유발되는 산화적 스트레스는 세포막의 주요 구성 성분인 인지질, 특히 저밀도 지단백(low density lipoprotein : LDL)의 산화적 변형과 혈관내피세포의 손상을 일으키며, 산화된 지단백이 막수용체를 매개로 단구세포나 대식세포 내로 이입되면 거품세포(foam cell)가 형성됨으로써^{1,2)} 동맥경화³⁾, 고혈압⁴⁻⁶⁾, 심부전 및 당뇨병성 혈관 합병증^{7,8)} 등과 같은 심혈관질환의 발생과 진행에 결정적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 반면, 식품이나 식물 자원에서 유래된 천연 항산화제는 자유기에 의한 산화적 스트레스를 억제

함으로써 동맥경화와 심근경색의 위험으로부터 생체를 보호하는 유익한 작용을 하므로, 천연 항산화제의 개발에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있는 실정이다⁹⁻¹²⁾.

桃枝는 복숭아나무(*Prunus persica*)의 가지로서 술에 달여 복용하면 卒心痛¹³⁾ 및 갑작스런 心腹部의 통증¹⁴⁾을 치료하는데 효험이 크다고 알려져 있다. 한편 桃枝의 약리적 활성에 대한 연구로 Ferric-Thiocyanate법을 이용한 지질과산화 억제작용 및 Rancimat법에 따라 평가한 지질산패 억제효능이 보고된 바 있으나¹⁵⁾, 보다 심도 있는 연구를 접할 수 없었다.

따라서 저자 등은 이전의 연구¹⁶⁾에서 桃枝의心痛 치료 기전이 산화적 스트레스 억제와 관련이 있을 것이라는 가정 하에, 물 추출물과 에탄올 추출물을 조제하여 전자 공여능, 지질과산화 억제효과, ROS와 RNS에 대한 소거효과 및 금속 이온과 자유기로 유도된 인체 저밀도 지단백의 산화에 대한 저해효과를 실험적으로 비교 검토한 결과, 본 약물이 현저한 항산화 효능을 나타내었

* 교신저자 : 문진영, 고양시 일산동구 식사동 동국대학교 한의과대학

· E-mail : ampmoon@dongguk.ac.kr, · Tel : 031-961-5830

· 접수 : 2013/01/21 · 수정 : 2013/02/22 · 채택 : 2013/03/07

으므로, 향후 ROS나 RNS로 야기되는 산화적 질환의 예방과 치료에 유용할 것이라 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서는 桃枝의 성분 분석과 유효 성분 분리를 위한 전단계 실험을 진행하고자, 桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물을 대상으로 전자 공여능, ROS와 RNS에 대한 소거능, 지단백의 산화에 대한 억제효과를 평가하고, 분획별 폐놀성 화합물의 함유량을 비교 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA), a-tocopherol, ascorbic acid, hydroxytoluene (BHT), DL-penicillamine, hypoxanthine, nitro blue tetrazolium (NBT), xanthine oxidase, hydrogen peroxide (H_2O_2), 3-morpholinopyridone (SIN-1), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), copper(II) sulfate ($CuSO_4$), human LDL, gallic acid는 Sigma사 (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 그 외 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Molecular Probes사 (Eugene, USA)에서, Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Merck사 (Germany), 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)는 Wako 사 (Osaka, Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 약재와 추출

桃枝 (the young branch of *Prunus persica*)는 복숭아나무의 가지를 건조한 것으로 복숭아 産地로 알려진 경상북도 청도 지역에서 2월 중순경 수득하여 정선, 세척한 다음, 잔류농약 검사를 시행하여 안전성을 확인한 후, 실험에 사용하였다. 桃枝 600 g에 70% 메탄올 6 L를 가하여 70°C에서 48시간 추출하고 여과한 다음, 여과액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 상층액을 감압농축하고, 동결건조하여 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물 (100 g)을 증류수 (700 mL)에 현탁시킨 다음, 각각 헥산 (hexane), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트(ethylacetate), 부탄올(butanol) 700 mL을 가하여 3회씩 재추출하였다. 그 후, 물 분획물을 포함한 모든 용매별 분획물을 감압농축하고 동결건조하여 -70°C에 저장한 다음, 실험에 사용하였다. 각각의 추출단계에서 수거한 분획물의 수득율은 Table 1과 같다.

3. DPPH radical 소거능 측정

桃枝 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정하기 위해 본 실험에서는 농도별 桃枝 추출물과 잘 알려진 항산화제인 a-tocopherol 및 ascorbic acid를 양성대조군으로 하여 각각 50 mL씩의 시료를 0.1 mM DPPH ethanol 용액 1 mL에 가한 뒤, Tris-HCl buffer (50mM, pH 7.4) 450 μ L를 처리하였다. 이 혼합용액을 잘 혼합한 다음, 실온에서 1시간 반응시키고,

spectrophotometer (UltraSpec 6300 Pro, Amersham, UK)를 이용하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Superoxide radical 소거능 측정

桃枝 추출물의 superoxide radical (O_2^-)에 대한 소거능을 측정하기 위하여 본 실험에서는 농도별 桃枝 추출물과 양성대조물질을 각각 EDTA (30 mM, pH 7.4) 100 μ L, 50 mM의 NaOH에 용해시킨 30 mM hypoxanthine 10 μ L, 그리고 1.42 mM NBT 200 μ L와 혼합하였다. 실온에서 3분간 반응시킨 뒤, 이 혼합용액에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 μ L를 가하고, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 최종 volume을 3 mL이 되도록 조절하였다. 실온에서 20분간 반응시킨 다음, superoxide radical의 생성 저해효과는 560nm에서 흡광도를 측정하여 NBT의 감소 정도를 통해 확인하였다.

5. Hydroxyl radical 소거능 측정

桃枝 추출물의 hydroxyl radical ($\cdot OH$)에 대한 소거능을 검토하기 위하여 桃枝 추출물과 양성대조물질을 1.25 mM H_2O_2 와 0.2 mM $FeSO_4$ 혼합물에 첨가하였다. 37°C에서 5분간 배양한 뒤, esterase-treated 2 μ M H_2DCFDA 를 혼합물에 가하고, 최종 용량을 250 μ L/well이 되도록 조절하였다. 형광도의 변화를 측정하기 위하여 fluorescence microplate reader (GENios-basic, TECAN, Austria)를 사용하여 excitation 파장 (485 nm) 및 emission 파장 (528 nm)에서 30분 동안 형광 강도의 변화를 측정하였다.

6. Nitric oxide 소거능 측정

桃枝 추출물의 nitric oxide (NO) 소거능을 측정하기 위하여 DAF-2 용액을 준비하였다. 먼저 1 mg의 DAF-2를 DMSO 0.55 mL에 용해시킨 뒤, 50 mM phosphate buffer를 사용하여 400배 희석하였다. 다양한 농도의 桃枝 추출물과 양성대조물질 10 μ L씩을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 μ L과 혼합하고, 이어서 40 mM SIN-1 10 μ L와 DAF-2 용액 50 μ L를 가하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후, 형광 강도는 excitation 파장 (495 nm) 및 emission 파장(515 nm)에서 측정하였다.

7. Peroxynitrite 소거능 측정

桃枝 추출물의 peroxynitrite (ONOO-) 소거능을 측정하기 위하여 농도별 桃枝 추출물 또는 peroxynitrite 소거제로 잘 알려진 penicillamine을 양성대조물질로 사용하여 각각의 시료 10 μ L을 50 mM sodium phosphate dibasic, 50 mM sodium phosphate monobasic, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride가 포함된 rhodamine buffer (pH 7.4) 175.8 μ L와 혼합하였다. 5 mM DTPA 4 μ L와 5 mM DHR 123을 0.2 μ L 가한 뒤, 10 μ M peroxynitrite 10 μ L를 가함으로써 반응을 개시하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후, excitation (480 nm)과 emission (530 nm)의 파장에서 형광 강도를 측정함으로써 DHR 123 산화의 저해 정도를 계산하였다.

8. CuSO₄와 AAPH로 유도된 LDL의 산화반응에 대한 억제효과 측정

CuSO₄와 AAPH로 매개되는 LDL 산화에 대한 桃枝 추출물의 저해효과를 측정하였다. CuSO₄로 매개되는 LDL 산화의 측정을 위해 PBS (pH 7.4) 에 LDL (100 µg protein/mL)을 가하여 농도별 桃枝 추출물 (1~50 µg/mL) 혹은 양성대조물질과 혼합한 다음, 10 µM CuSO₄를 가하였다. 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 LDL 산화의 정도를 측정하였다. AAPH로 매개되는 LDL 산화를 측정하기 위해 PBS (pH 7.4)에 LDL (100 µg protein/mL)을 가하여 桃枝 추출물 또는 양성대조물질과 혼합하였다. 산화 반응을 유도하기 위하여 4 mM AAPH를 가하였으며, 37°C에서 4시간 동안 배양한 후, 1 mM EDTA를 가하여 반응을 종료하였다. CuSO₄ 및 AAPH로 유도된 LDL의 산화반응의 정도는 TBARS assay로 측정하였다.

9. Relative electrophoretic mobility (REM) assay

LDL (120 µg protein/mL)을 농도별 桃枝 분획물 (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL) 혹은 양성대조물질과 혼합한 다음, 10 µM CuSO₄를 가하고 이를 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양 시간이 종료된 시점에 약 3 µg의 LDL protein을 0.7% agarose gel에 loading하여 85V에서 1시간 동안 전기영동하였다. 그 후, gel을 실온에서 1시간 동안 건조시킨 다음, Coomassie brilliant blue R250를 사용하여 1시간 동안 염색반응을 유도하였다.

10. 총 페놀성 화합물의 함량 측정

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 total phenolics의 함량은 Folin-Ciocalteu reagent를 이용하여 측정하였다. 桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물 40 µL를 Folin-Ciocalteu reagent 200 µL과 혼합하고 1160 µL의 증류수를 가하였다. 혼합물을 실온에서 3분간 배양하였으며 20% sodium carbonate 600 µL를 첨가하였다. 2시간 후 파장 765 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 총 페놀성 화합물의 함량은 gallic acid를 이용한 표준곡선으로 계산하였다.

Table 1. Extraction yields and DPPH radical scavenging activity

Sample	Yields of extract	DPPH ^a (IC ₅₀ , µg/mL)
Methanol	199.2 g (33.2%)	11.29±0.39
Ethylacetate	17.7 g	6.28±0.09
Butanol	14.3 g	8.16±0.05
Hexane	26.5 g	24.45±0.16
Chloroform	18.4 g	40.51±1.48
Aqueous	23.1 g	
Ascorbic acid ^b		3.03±0.06
BHT ^b		5.43±0.19

^a Values are mean ± SD of three replicates. ^b Used as a positive control.

결 과

1. DPPH radical 소거능

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 DPPH radical 소거능을 측정함으로써 자유기 소거능에 대한 효과를 검토하였고 양

성대조군으로는 ascorbic acid와 BHT가 사용되었다. 본 실험의 결과를 DPPH radical을 50% 소거시키는 IC₅₀으로 환산하여 표기할 결과, 양성대조군인 ascorbic acid, BHT에서 높은 소거활성을 보였다. 한편 桃枝의 용매별 분획물 중 높은 소거능을 보인 것은 ethylacetate, butanol 분획물이었으며, 양성대조군과 비교하여 거의 유사한 수준의 소거능을 보였다(Table 1). 한편 각각의 시료를 모두 20 µg/mL의 동일한 농도 수준에서 자유기 소거능을 비교 관찰한 결과에서도 ethylacetate, butanol 추출물의 소거능이 양성대조군인 ascorbic acid 및 BHT와 유사하게 나타났다. 반면 hexane 및 chloroform 추출물의 자유기 소거능은 비교적 저조한 것으로 관찰되었다(Fig. 1).

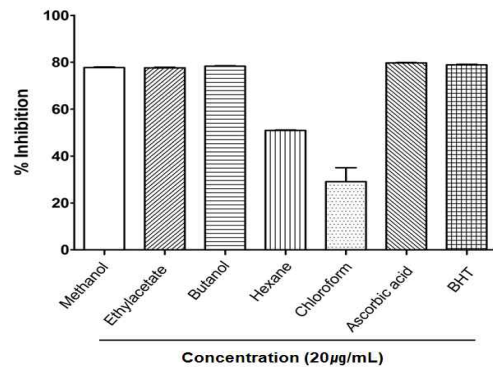


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity. The free radical scavenging activities of methanol extract and solvent fractions from the young branch of *Prunus persica* at the same concentration (20 µg/mL) were tested. The results are the means±SD of three separate experiments. Ascorbic acid and BHT (20 µg/mL) were used as a positive control.

2. Superoxide 및 hydroxyl radical에 대한 소거능

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 superoxide radical에 대한 소거능을 검토하기 위하여 hypoxanthine-xanthine oxidase 반응계를 이용하여 NBT의 수치가 감소하는 정도를 측정하였다. 그 결과, ethylacetate와 butanol 분획물 및 methanol 추출물에서 모두 양성대조물질로 사용된 caffeic acid 보다 현저하게 높은 소거활성을 보였다. 특히 ethylacetate 분획물에서 caffeic acid의 약 2배에 해당하는 강한 소거활성을 나타내었다. 반면, 桃枝의 hexane과 chloroform 분획물 및 양성대조물질로 사용된 ascorbic acid와 BHT는 superoxide radical에 대한 소거능이 각각 저조하거나 관찰되지 않았다. 한편 桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 hydroxyl radical에 대한 소거능을 비교 관찰하기 위하여 H₂O₂와 FeSO₄를 첨가한 뒤 생성되는 hydroxyl radical과 DCFA-DA이 형광물질인 DCF를 유도해내는 반응을 이용하여 측정하였다. H₂O₂와 FeSO₄가 반응하면 hydroxyl radical이 생성되는데, 이때 DCFH에 작용하여 형광물질인 DCF로 산화시킨다. 본 실험의 결과, ethylacetate 분획물에서 가장 뛰어난 소거능을 보였으며, 이어서 butanol 분획물과 methanol 추출물의 효능이 거의 유사한 수준으로 나타났고, 그 다음은 양성대조물질인 trolox와 ascorbic acid의 순으로 관찰되었다. 반면 hydroxyl radical에 대한 소거능 실험에서도 chloroform과 hexane 분획물은 저조한 결과를 보였다(Table 2).

Table 2. Scavenging effects on superoxide and hydroxyl radical

Sample	Superoxide radical ^a (IC ₅₀ , µg/mL)	Hydroxyl radical ^a (IC ₅₀ , µg/mL)
Methanol	10.55±0.06	20.42±0.14
Ethylacetate	7.64±0.07	8.78±0.16
Butanol	8.27±0.31	20.74±0.74
Hexane	NA	86.34±1.90
Chloroform	NA	58.73±0.87
Ascorbic acid ^b	>200	27.75±0.40
Caffeic acid ^b	13.46±1.71	NT
BHT ^b	NA	NT
Trolox ^b	NT	25.44±1.35

^a Results are expressed as IC₅₀ values, where each value represents the mean±SD of three replicates. ^b Used as a positive control. NA, not active. NT, not tested.

3. Nitric oxide 소거능과 peroxynitrite 소거능

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 활성질소종에 대한 소거효과를 관찰하기 위하여 nitric oxide와 peroxynitrite 반응계를 이용하여 검토하였다. 먼저 nitric oxide에 대한 소거능을 분석하기 위해 DAF-2와 NO 공여자인 SIN-1의 반응으로부터 생성되는 triazolofluorescein의 수치를 측정하였다. 그 결과, 양성대조물질인 caffeic acid와 ascorbic acid에서 nitric oxide에 대한 소거능이 가장 높게 나타났다. 그 다음으로 ethylacetate 분획물, butanol 분획물, methanol 추출물의 순으로 관찰되었다. 본 실험에서도 chloroform과 hexane 분획물은 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 한편 활성질소종인 peroxynitrite는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응에 의해 생성되는데 LDL의 산화를 일으키고 내피세포의 손상을 야기하여 동맥경화를 촉진한다. 본 실험에서는 peroxynitrite에 의한 DHR 123의 산화 정도를 측정함으로써 桃枝 추출물 및 분획물의 peroxynitrite에 대한 소거능을 측정하였다. 그 결과, 양성대조물질인 penicillamine이 가장 높은 소거활성을 보였고, 그 다음으로 ethylacetate 분획물, butanol 분획물, methanol 추출물의 순으로 높은 활성을 나타내었다. 반면 chloroform과 hexane 분획물은 상대적으로 저조한 소거활성을 보였다. 이상의 실험결과에서 桃枝 용매별 분획물 중, ethylacetate 와 butanol 분획물에서 활성산소종 및 활성질소종에 대한 소거효능이 강하게 나타남을 알 수 있었다(Table 3).

Table 3. Scavenging effects on nitric oxide and peroxynitrite

Sample	Nitric oxide ^a (IC ₅₀ , µg/mL)	Peroxyntitrite ^a (IC ₅₀ , µg/mL)
Methanol	2.25±0.15	2.20±0.01
Ethylacetate	1.29±0.08	1.27±0.02
Butanol	1.47±0.14	1.99±0.04
Hexane	9.83±0.37	7.66±0.23
Chloroform	8.87±0.21	5.64±0.11
Ascorbic acid ^b	0.50±0.01	NT
Caffeic acid ^b	0.46±0.01	NT
Penicillamine ^b	NT	0.47±0.03

^a Results are expressed as IC₅₀ values, where each value represents the mean±SD of three replicates. ^b Used as a positive control. NT, not tested.

4. CuSO₄ 및 AAPH에 의해 유도된 LDL 산화 억제효과

桃枝 용매별 분획물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 CuSO₄와 자유기 생성제인 AAPH로 유도되는 LDL 산화 반응 모델을 이용하여 항산화효과를 측정하였다. 활성산소종과 활성질

소종 소거능에 대한 이전의 실험결과에서 桃枝 용매별 분획물 중 ethylacetate와 butanol층에서 보다 강한 자유기 소거활성을 보였으므로, 본 실험에서는 이들 분획물을 대상으로 LDL 산화에 대한 억제효능을 관찰하였다. 먼저 CuSO₄로 유도되는 LDL의 산화에 대한 억제효과를 측정한 결과, 桃枝 ethylacetate 분획물에서 가장 강한 억제능을 보였으며, 그 다음으로 양성대조물질인 caffeic acid, 桃枝 butanol 분획물, 양성대조물질로 사용된 ascorbic acid의 순서로 산화억제 활성을 나타내었다. 한편, AAPH를 산화유도제로 처리한 경우, 양성대조물질인 caffeic acid는 현저한 산화억제 효능을 보인 반면, ascorbic acid는 산화억제 효능이 상대적으로 낮게 나타났다. 한편 ethylacetate와 butanol 분획물은 caffeic acid보다는 낮고 ascorbic acid보다는 높은 항산화능을 보였다. 그러나 AAPH를 산화유도제로 처리한 경우에는 CuSO₄로 유도된 LDL의 산화에 대한 桃枝 분획물의 억제효능 보다 상대적으로 저조함을 알 수 있었다. 이상의 실험결과에서 桃枝 분획물은 직접적으로 자유기를 소거하는 능력보다 금속이온을 킬레이트하는 효능을 통해 LDL의 산화를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다(Table 4).

Table 4. Inhibitory effects on LDL oxidation induced by CuSO₄ or AAPH

Sample	CuSO ₄ (IC ₅₀ , µg/mL)	AAPH (IC ₅₀ , µg/mL) ^a
Ethylacetate	2.41	35.46
Butanol	3.69	55.73
Ascorbic acid ^b	7.17	86.02
Caffeic acid ^b	2.86	6.77

^a The level of LDL oxidation was measured by TBARS assay and the results are expressed as mean of three separate experiments. ^b Used as a positive control.

5. REM assay를 이용한 산화 LDL에 대한 억제효과

이전의 실험에서 桃枝의 ethylacetate와 butanol 분획물이 CuSO₄로 유도된 LDL의 산화에 대하여 현저한 억제효과를 보였다. 이러한 효능을 보다 심도있게 규명하기 위하여 본 실험에서는 REM assay를 이용하여 CuSO₄로 유도된 LDL의 산화반응에 대한 억제효능을 전기영동을 통해 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2에서처럼, 정상 LDL은 (-)극에 머물고 있으나, CuSO₄만 처리하여 산화를 유도한 실험군에서는 (+)극 쪽으로 뚜렷한 이동이 발생함을 알 수 있었다. 한편, 이러한 CuSO₄로 유도된 산화반응에 의해 발생한 LDL의 이동은 금속이온을 킬레이팅하는 기능을 지닌 양성대조물질 EDTA (10 µM)의 처리로 인해 거의 정상군 수준으로 억제되었다. 한편, 桃枝 ethylacetate 분획물과 butanol 분획물에서도 산화 억제효과를 보였는데, 특히 Ehtylacetate 분획물을 5.0 µg/mL의 농도로 처리한 실험군에서는 양성대조물질로 사용된 EDTA의 효능 보다는 약간 낮은 수준이었으나, ascorbic acid (20 µg/mL) 및 BHT (10 µg/mL)와 비교했을 때 거의 유사한 수준의 산화 억제활성을 나타내었다. 또한 桃枝 ethylacetate 분획물은 butanol 분획물에 비하여 보다 강한 항산화효능이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

6. 총 페놀성 화합물의 함량

桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 total phenolic

compounds의 함량을 Folin-Ciocalteu assay 결과를 gallic acid equivalent (GAE, mg of gallic acid/g of sample)로 환산하여 나타냈다. 천연물의 항산화능의 정도는 그 물질이 포함하는 total phenolic contents와 관련이 있다. 본 실험에서 桃枝의 메탄올 추출물과 용매별 분획물은 최소 100.0 mg/g에서부터 최대 411.3 mg/g까지 고농도의 total phenolic compounds를 함유하고 있었다. 기대했던 대로 ethylacetate 분획물과 butanol 분획물에서 검출된 total phenolic compounds의 수치가 높게 나타났으며, 특히 ethylacetate 분획물에서 그 함량이 매우 높음을 알 수 있었다 (Table 5).

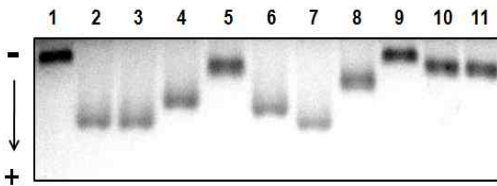


Fig. 2. Effect on the relative electrophoretic mobility of LDL. Human LDL (120 µg protein/mL) was added to ethylacetate and butanol extracts from the young branch of *Prunus persica*. The LDL oxidation was initiated by adding 10 µM CuSO₄ and was incubated for 12 h at 37 °C. And then, 3 µg of LDL protein was loaded on 0.7% agarose gel for 1 h, and was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane 1, native LDL; lane 2, oxidized LDL; lanes 3-5, ethylacetate fraction (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL, respectively); lanes 6-8, butanol fraction (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL, respectively); lane 9, EDTA (10 µM); lane 10, ascorbic acid (20 µg/mL); lane 11, BHT (10 µg/mL).

Table 5. Total phenolic contents of methanol extract and solvent fractions from the young branch of *Prunus persica*

Sample	Total phenolics ^a (mg/g)
Methanol	222.6
Ethylacetate	411.3
Butanol	265.2
Hexane	100.0
Chloroform	206.3

^a mg total phenolics/g fraction : gallic acid equivalent. Values are mean of three replicates.

고찰

본 연구는 저자 등이 보고한 이전의 연구결과¹⁶⁾에서 桃枝 추출물이 자유기에 대한 전자 공여능, 지질과산화 반응 억제효과, 활성산소종과 활성질소종에 대한 소거효과 및 인체 저밀도 지단백의 산화적 변형에 대한 저해효과를 검토하여 본 약물이 강한 항산화능을 실험적으로 확인한 바 있으므로, 이 결과를 바탕으로 보다 심도있는 연구를 진행하고자 桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물을 대상으로 항산화능 및 페놀성 화합물의 함량을 비교 검토 하였다. 먼저 桃枝 분획물의 자유기 소거능을 규명하기 위하여 DPPH radical scavenging assay를 이용하여 수소 공여능을 검토하였다. 그 결과, 桃枝 ethylacetate와 butanol 분획물에서 현저한 자유기 소거능이 관찰되었으므로 桃枝 분획물이 자유기에 대해 강한 수소 공여능이 있음을 알 수 있었다. 한편 활성산소종 중에서 superoxide radical은 superoxide dismutase와 상호 반응하여 hydrogen peroxide를 생성하며, hydrogen peroxide는 다시

Fenton 반응을 통해 보다 유해한 활성산소종인 hydroxyl radical의 생성을 야기할 수 있다¹⁷⁾. 또한 superoxide radical은 심혈관 세포의 산화적 손상을 일으켜 동맥경화 발생에 결정적 역할을 하는 것으로 알려졌다¹⁸⁾. 특히 xanthine oxidase가 hypoxanthine과 반응하면 hypoxanthine을 uric acid로 변환시키면서 superoxide radical이 생성되며, superoxide radical은 NBT를 diformazan 형태로 전환시킨다¹⁹⁾. 본 연구에서 桃枝 분획물의 superoxide radical 소거능을 관찰하고자 hypoxanthine-xanthine oxidase system을 이용하여 superoxide radical 발생을 유도하였으며, superoxide radical에 의해 생성된 NBT reduction의 정도를 측정하였다. 그 결과, 桃枝 ethylacetate와 butanol 분획물에서 높은 소거능이 관찰되었으므로, 桃枝가 superoxide radical에 의한 산화적 손상을 방어하는데 유용할 것으로 판단된다. 활성산소종에 대한 桃枝 분획물의 소거능을 보다 심도있게 규명하기 위하여 hydroxyl radical에 대한 작용을 검토하였다. 일반적으로 hydroxyl radical은 그 자체가 반응성이 가장 높은 자유기로 알려져 있으며, peroxy radical의 생성을 야기할 수 있으므로 세포막의 산화적 손상, 즉 지질과산화 반응을 유도하는 과정에 결정적인 역할을 한다고 보고된 바 있다^{20,21)}. 桃枝 분획물의 hydroxyl radical에 대한 소거능을 규명하기 위하여 본 연구에서는 hydrogen peroxide와 FeSO₄로 구성된 Fenton 반응 시스템을 이용하여 hydroxyl radical의 생성을 유도하였다. 그 결과, 桃枝 ethylacetate 분획물에서 가장 강한 소거능이 나타났으며, 그 다음으로 butanol 분획물과 메탄올 추출물이 거의 유사한 소거활성을 보였다. 이 결과에서 桃枝는 자유기 중에서도 가장 반응성이 강한 hydroxyl radical을 소거함으로써 산화적 손상을 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 桃枝 분획물은 superoxide radical 및 hydroxyl radical과 같은 활성산소종에 대해 효과적인 소거제로 작용할 수 있음을 알 수 있었다. 이에 nitric oxide와 peroxynitrite generating system을 각각 이용하여 활성질소종에 대한 소거능을 검토함으로써 본 약물의 항산화능을 보다 구체적으로 확인하고자 하였다. 桃枝 분획물의 nitric oxide 소거능을 규명하기 위하여 본 연구에서는 SIN-1을 이용하여 nitric oxide의 생성을 유도하였고, nitric oxide와 DAF-2를 반응시킴으로써 생성된 triazolofluorescein의 형광강도를 측정하였다. 그 결과, 양성대조군인 caffeic acid와 ascorbic acid에 비하여 약간 낮은 활성을 나타내었으나, 桃枝 분획물 중에서는 ethylacetate와 butanol 분획물에서 비교적 강한 소거능을 보였다. 한편 활성질소종인 peroxynitrite는 생체에서 superoxide radical과 nitric oxide의 반응에 의해 생성된다고 알려져 있으며 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 활성산소종에 비해서 훨씬 높은 반응성을 지니고 있을 뿐만 아니라, 생체내에는 이에 대한 방어기구가 결여되어 있으므로 산화적 손상을 초래하는 강력한 인자로 작용할 수 있다. 한편 peroxynitrite와 관련한 연구 보고에 의하면 생체내 혈관내피세포에서 superoxide radical과 nitric oxide, 둘 다 생성될 수 있으므로, 이들의 상호작용에 의하여 혈관벽내에 peroxynitrite가 생성되는 것으로 알려져 있다²²⁾. 또한 이 과정에서 생성된 peroxynitrite에 의해 산화적 변형을 일

오킨 LDL이 대식세포에 의한 탐식과정을 거쳐 결국 foam 세포가 형성되는데, 이러한 일련의 산화적 반응은 동맥경화의 진행과 전개에 결정적인 인자로 작용한다²³⁾. 본 연구에서는 peroxy-nitrite에 의해 산화된 DHR 123의 정도를 측정함으로써 桃枝 추출물 및 분획물의 peroxy-nitrite에 대한 소거능을 검토하였다. 그 결과, peroxy-nitrite 소거제로 알려져있는 penicillamine 보다는 약간 낮은 활성을 보였으나, 桃枝 분획물 중에서 ethylacetate에서 가장 강한 소거능을 보였고, 그 다음으로 butanol 분획물 순이었다.

이상의 실험결과에서 桃枝 용매별 분획물 중, ethylacetate와 butanol 분획물에서 활성산소종 및 활성질소종에 대한 현저한 소거능이 있었으므로, 이 2종의 분획물이 LDL의 산화적 변형을 차단하는데 유용할 것으로 판단되어, 구리이온(copper) 및 AAPH (peroxy radical generator) 에 의해 유도된 human LDL의 산화적 변형에 대한 억제효과를 검토하였다. 그 결과, 구리이온으로 유도된 LDL의 산화적 변형에 대한 억제효과는 桃枝 ethylacetate 분획물이 가장 높게 나타났으며, 이어서 양성대조물질인 caffeic acid, 그 다음으로 butanol 분획물 순이었다. 한편 자유기 생성을 유도하는 AAPH를 이용한 실험에서는 구리이온을 이용한 산화 시스템에 비하여 저조한 억제능을 보였다. 이 결과를 보다 심도있게 확인하기 위하여 REM assay를 이용하여 구리이온으로 LDL의 산화반응을 유도한 다음, 전기영동을 통해 검토하였다. 이 결과에서도 桃枝 ethylacetate 분획물은 butanol 분획물에 비해 보다 강한 항산화능을 보였으며, 양성대조물질인 ascorbic acid 및 BHT 등과 유사한 수준의 산화적 변형 억제활성을 나타내었다.

이상의 결과에서 桃枝 분획물, 특히 ethylacetate와 butanol 분획물이 현저한 항산화능을 보였으므로 각각의 분획물을 대상으로 페놀성 화합물의 함량을 비교 검토하였다. 이 결과에서도 ethylacetate와 butanol 분획물에서 페놀성 화합물의 함량이 높게 나타났다. 이상의 결과를 종합하면 桃枝 ethylacetate 및 butanol 분획물은 활성질소종 및 활성산소종에 대한 강한 소거제로 작용함과 동시에 금속이온으로 발생하는 LDL의 산화적 변형을 차단함으로써 향후 생체의 산화적 손상, 특히 동맥경화의 악성진행을 억제함에 유용할 것으로 판단된다. 따라서 향후 桃枝 ethylacetate 및 butanol 분획물에 대한 성분 분석 및 동맥경화 모델을 이용한 보다 다각적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

본 연구는 桃枝 메탄올 추출물과 용매별 분획물의 항산화능을 비교 검토하기 위하여 자유기에 대한 수소 공여능, 활성산소종 및 활성질소종에 대한 소거능, 인체 저밀도 지단백의 산화에 대한 억제효능과 더불어 각각의 분획물이 함유하는 페놀성 화합물의 함량을 살펴보았다. 그 결과, 桃枝 ethylacetate 분획물에서 가장 현저한 항산화능이 나타났고, 그 다음으로 butanol 분획물이었다. 페놀성 화합물의 함량 또한 위와 동일한 양상을 보였다. 특히 桃枝 ethylacetate 및 butanol 분획물은 인체 저밀도

지단백의 산화적 변형을 효과적으로 방어하였으므로, 본 약물의 동맥경화 억제효능에 대해 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Asmis, R., Begley, J.G., Jelk, J., Everson, W.V. Lipoprotein aggregation protects human monocyte-derived macrophages from OxLDL-induced cytotoxicity. *J Lipid Res.* 46: 1124-1132, 2005.
2. de Vries, H.E., Buchner, B., van Berkel, T.J., Kuiper, J. Specific interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophage-derived foam cells isolated from rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 9: 638-645, 1999.
3. Park, J.G., Oh, G.T. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *BMB Rep.* 44(8):497-505, 2011.
4. Saravanakumar, M., Raja, B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 671(1-3):87-94, 2011.
5. Klima, L., Stolarz Skrzypek, K., Olszanecki, R., Kawecka Jaszcz, K. The oxidative stress in pathogenesis of arterial hypertension - role of methylated arginines. *Kardiol Pol.* 69: 94-99, 2011.
6. Dorfmueller, P., Chaumais, M.C., Giannakouli, M., Durand-Gasselien, I., Raymond, N., Fadel, E., Mercier, O., Charlotte, F., Montani, D., Simonneau, G., Humbert, M., Perros, F. Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. *Respir Res.* 12: 119, 2011.
7. Eckers, A., Altschmied, J., Haendeler, J. Oxidative stress in endothelial cells and in diabetes type 2. *Z Gerontol Geriatr.* 45(2):90-94, 2012.
8. Aksakal, E., Akaras, N., Kurt, M., Tanboga, I.H., Halici, Z., Odabasoglu, F., Bakirci, E.M., Unal, B. The role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy: an experimental study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 15(11):1241-1246, 2012.
9. Abhilash, P.A., Nisha, P., Prathapan, A., Nampoothiri, S.V., Lijo Cherian, O., Sunitha, T.K., Raghu, K.G. Cardioprotective effects of aqueous extract of *Oxalis corniculata* in experimental myocardial infarction. *Exp Toxicol Pathol.* 63(6):535-540, 2011.
10. Jiang, F., Chang, C.W., Disting, G.J. Cytoprotection by natural and synthetic polyphenols in the heart: novel mechanisms and perspectives. *Curr Pharm Des.*

- 16(37):4103-4112, 2010.
11. Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacol Res.* 56(2):99-109, 2007.
 12. Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss.* 37(2):147-163, 1998.
 13. Hur, J. *Dong-eui-bo-gam*. Seoul:Bupin Publishing Co., Ltd. p 731, 2007.
 14. Ahn, D.K. *Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs*. Seoul:Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. p 568, 2006.
 15. Cha, B.C., Lee, E.H. Antioxidant and antiinflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. *Korean J of Medicinal Crop Science.* 12(4):289-294, 2004.
 16. Yi, H.S., Park, W.H., Lim, S.H., Moon, J.Y. Total Phenolic Contents, Radical Scavenging Capacities and Inhibitory Effects on Lipid Peroxidation and LDL Oxidation of *Prunus persica* Branch. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 22(5):1309-1314, 2008.
 17. Fukai, T., Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1583-1606, 2011.
 18. Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S. Oxidative stress and vascular Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 25: 29-38, 2005.
 19. Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., Runge, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombosis and Haemostasis.* 3: 254-267, 2004.
 20. Patro, B.S., Bauri, A.K., Mishra, S., Chattopadhyay, S. Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. *Journal of agricultural and food chemistry.* 53: 6912-6918, 2005.
 21. Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J., Jang, Y.S. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Journal of agricultural and food chemistry.* 50: 6490-6496, 2002.
 22. Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T., Moncada, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *The Biochemical journal.* 281: 419-424, 1992.
 23. Liu, S.X., Zhou, M., Chen, Y., Wen, W.Y., Sun, M.J. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis.* 121: 55-61, 1996.