

환삼덩굴로부터 분리한 Luteolin-7-O-β-D-Glucoside의 활성산소 소거능

박승우 · 정신교[†] · 박종철*

경북대학교 식품공학과

*순천대학교 한약지원학과

Active Oxygen Scavenging Activity of Luteolin-7-O-β-D-Glucoside Isolated from *Humulus japonicus*

Seung-Woo Park, Shin-Kyo Chung[†] and Jong-Cheol Park*

Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

*Dept. of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

We investigated the active oxygen scavenging activity and active compound from *Humulus japonicus*. The ethyl acetate and butanol fraction exhibited strong scavenging effects on hydroxyl radical. Furthermore active compound was isolated and purified using Amberlite XAD-2 column chromatography and preparative HPLC from ethyl acetate fraction, and major compound was identified as a luteolin-7-O-β-D-glucoside by the MS, UV, ¹H-NMR and ¹³C-NMR analyses. Luteolin-7-O-β-D-glucoside exhibited strong scavenging effect on active oxygens such as superoxide radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide.

Key words: *Humulus japonicus*, active oxygen scavenging activity, luteolin-7-O-β-D-glucoside

서 론

안정한 분자상태의 기저 삼중항산소가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등 각종 물리적, 화학적 요인에 의하여 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlelet oxygen과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(1-3) 즉 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적 파괴작용을 함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병 및 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다(4-6).

관련 식품과 생체내에는 활성산소를 소거·포획하는 물질들이 존재하여 식품의 가공, 저장중의 산화를 방지하며, 생체를 산화적 손상으로부터 방어하여 노화나 질병으로부터 보호하고 있다. Free radical과 활성산소를 소거·포획하는 물질로는 SOD(superoxide dismutase), catalase, peroxidase와 같은 항산화효소와 tocopherol, gluta-

thione, ubiquinone, unc acid, polyphenol, carotenoid 등과 같은 저분자 항산화물질이 알려져 있다(7-11) 이들 성분은 free radical을 생성할 수 있는 precursor들을 분할·산화시켜 radical 생성을 감소시키거나, free radical을 직접 소거·포획함으로써 분자상 산소에 의한 free radical chain reaction을 억제하는 역할을 한다.

환삼덩굴(*Humulus japonicus*)은 삼과에 속하는 덩굴성 1년초로서 7~8월에 개화하는 자웅이주의 식물이며, 우리나라 전역과 동아시아 지역에 주로 분포하고 있다. 약리작용으로는 혈압강화작용, 이뇨작용, 항균작용 등이 알려져 있으며(12,13), 저자 등은 환삼덩굴의 항균성과 식용유지에 대한 항산화성(14) 및 항돌연변이 효과(15)에 대하여 보고한 바 있다. 환삼덩굴의 성분으로는 cosmosin, vitexin, humulone, lupulon 등이 알려져 있으나, 이 식물의 항산화 작용 등 생리활성에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

이에 본인 등은 식물자원으로 풍부하게 존재하고 있는 환삼덩굴을 메탄올로 추출하고 메탄올 추출물을 각종 용매로 분획하여 활성산소에 대한 소거활성을 측정하였으며, 소거활성이 우수하게 나타난 에칠아세테이트분획으

[†]To whom all correspondence should be addressed

로부터 활성산소 소거활성이 강한 luteolin-7-O-β-D-glucoside를 분리하고, 그 화학적 구조를 동정하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

환삼덩굴은 1997년 7월 경북 군위군 부계면에서 채취하여 음건한 후 분쇄하여 실험재료로 사용하였다.

추출 및 분리

시료 1 kg을 MeOH로 환류추출하여 MeOH 조추출물을 얻고, MeOH 조추출물을 10% MeOH에 녹인 후 순차 용매분획하여 n-hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 및 수층으로 분획하고, 감압농축하여 활성을 측정하였다. 활성산소 소거능이 우수하게 나타난 EtOAc 분획은 Amberlite XAD-2 column(5×45 cm)에 충전하고 water, 50% MeOH, MeOH, acetone 순으로 용출하였다. 50% MeOH fraction을 ODS HG-5 column(8×250 mm)으로 prep-HPLC (Waters 484, Waters Co, USA)를 실시하였다. 용매는 0.1% TFA에서 MeOH까지 60분 동안 gradient하면서 UV detector 365 nm에서 분리되는 성분을 분취하여, 분석용 column(μ-Bondapak C₁₈)으로 단일성분으로 분리되는 것을 확인한 후 구조분석을 실시하였다.

활성성분의 동정

분리한 성분의 자외선흡수 spectrum은 분리한 성분을 MeOH에 적당량 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (HP 8452A, Hewlett Packard Co, USA)를 이용하여 190~500 nm까지 scanning하였다. 또한 shift reagent에 의한 spectrum shift를 관찰하기 위하여 NaOMe, NaOAc, NaOAc/H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃/HCl 용액내에서 λ_{max}를 측정하였다. Mass spectrum은 LC-MS(VG platform, Fisons Co., Italy)를 이용하였고, 이온화 방식은 ES mode를 사용하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR(Bruker ARX 400, Bruker Co., Swiss)은 내부표준물질은 TMS를 사용하였고, 용매는 DMSO-d₆를 사용하였다.

Superoxide radical 소거활성 측정

Ito 등(16)의 방법을 다소 변형하여 xanthine-xanthine oxidase cytochrome c 환원법으로 측정하였다. UV cell에 시료 0.2 mL, 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) 1.2 mL, 1 mM xanthine 0.2 mL, 0.05 mM cytochrome c 0.2 mL 및 550 nm에서 분당 흡광도 변화가 0.02되도록 희석한 xanthine oxidase 0.2 mL를 가하여 혼합하고 즉시 550 nm에서 3분간 흡광도 변화를 측정하였다.

Hydroxyl radical 소거활성 측정

시료의 ·OH 소거활성은 2-deoxyribose oxidation method(17)로 측정하였다.

시험관에 0.1 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 시료액 0.2 mL와 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL를 가하고 37°C 수욕조에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 1.0% TBA(thioarbuturic acid)용액 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정했다.

Hydrogen peroxide 소거활성 측정

96 well micro plate에 PBS 100 μL, EtOH 또는 시료 20 μL를 가한 후 1.0 mM의 H₂O₂ 20 μL를 가하고 5분 방치 후, 1.25 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 30 μL와 1 U/mL peroxidase 30 μL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, ELISA reader (ELISA processor II, Behring Co, Germany)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(18).

결과 및 고찰

용매분획별 활성산소 소거능

활성산소종 중에서 반응성이 매우 강하여 생체산화에 중요한 역할을 하는 hydroxyl radical에 대한 소거효과를 조사하기 위하여, 환삼덩굴의 MeOH 추출물을 용매의 극성에 따라 분획하고 각 용매 분획물의 hydroxyl radical에 대한 소거활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 반응액내에 1 μg/mL의 농도로 가할 때, EtOAc 분획은 90.4%, BuOH 분획은 88.1% 소거활성을 나타내어 MeOH 조추출물이나 다른 분획에 비해 활성이 높게 나타났으며, 대조군으로 사용한 α-tocopherol보다는 높게 나타났고, BHA와는 대등한 활성을 나타내었다.

따라서 환삼덩굴의 EtOAc 분획과 BuOH 분획에 hy-

Table 1. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*

Samples ¹⁾	OH scavenging (%)
MeOH extract	82.3
Hexane fraction	41.0
CHCl ₃ fraction	54.1
EtOAc fraction	90.4
BuOH fraction	88.1
Water fraction	65.7
α-Tocopherol	68.6
BHA	87.5

¹⁾Each samples were added 1 μg/mL concentration in reaction mixture.

droxyl radical에 대하여 강한 소거작용을 나타내는 물질이 존재함을 알 수 있었다.

EtOAc 분획으로부터 활성성분의 분리

활성산소 소거작용이 가장 높게 나타난 EtOAc 분획으로부터 활성성분을 분리하기 위하여 Amberlite XAD-2 column chromatography를 실시하였다. EtOAc 분획 1,000 mg을 Amberlite XAD-2 column에 loading하고 용매의 비극성도를 높이면서 용출하여 water fraction 111 mg, 50% MeOH fraction 473 mg, MeOH fraction 149 mg, acetone fraction 31 mg을 얻었다. 각 fraction을 1 µg/mL의 농도로 가하여 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 50% MeOH fraction의 hydroxyl radical 소거활성이 가장 강하였으며, MeOH fraction도 비교적 강한 radical 소거능을 나타내었다.

활성산소 소거능이 가장 강하게 나타난 50% MeOH fraction으로부터 활성성분을 분리하기 위하여 50% MeOH fraction을 분취용 HPLC를 사용하여 주요 성분으로 추정되는 1종의 성분을 분취하였다. 분취한 성분은 분석용 column으로 정제도를 확인한 결과, 순수하게 분리된 것으로 판단되어 구조분석을 실시하였다.

활성성분의 구조동정

환삼덩굴의 EtOAc 분획으로부터 분리한 활성성분의

Table 2. Hydroxyl radical scavenging activities of each fraction by Amberlite XAD-2 column chromatography

Fractions ¹⁾	·OH scavenging (%)
Water fraction	53.5
50% MeOH fraction	90.7
MeOH fraction	89.5
Acetone fraction	49.5
α-Tocopherol	69.4
BHA	86.3

¹⁾Each samples were added 1 µg/mL concentration in reaction mixture.

Table 3. Spectral data of active compound isolated from *Humulus japonicus*

Items	Spectral data
MS, m/z	448
UV, λ max, nm	(MeOH) 255, 267s, 348; (NaOMe) 266, 403; (AlCl ₃) 274, 414; (AlCl ₃ /HCl) 272, 360, 387; (NaOAc) 256, 350; (NaOAc/H ₃ BO ₃) 259, 372
¹ H-NMR, DMSO-d ₆ , ppm	aglycone : δ 6.71(1H, s, H-3), 6.46(1H, d, H-6), 6.76(1H, d, H-8), 7.47(1H, d, H-2'), 6.95(1H, d, H-5'), 7.51(1H, dd, H-6') glycosyl : 5.07(1H, d, H-1), 3.34(1H, m, H-2), 3.46(1H, dd, H-3), 3.22(1H, dd, H-4), 3.51(1H, m, H-5), 3.64(2H, dd, H-6)
¹³ C-NMR, DMSO-d ₆ , ppm	aglycone : 164.45(C-2), 103.12(C-3), 181.85(C-4), 161.10(C-5), 99.51(C-6), 162.92(C-7), 94.72(C-8), 156.91(C-9), 105.31(C-10), 121.34(C-1'), 113.58(C-2'), 145.70(C-3'), 149.90(C-4'), 115.98(C-5'), 119.90(C-6') glycosyl : 99.89(C-1), 73.10(C-2), 76.38(C-3), 69.54(C-4), 77.14(C-5), 60.59(C-6)

기분분석 결과는 Table 3 및 Fig 1과 같다. UV spectrum을 관찰한 결과, (MeOH) 255, 267s, 348 nm, (NaOMe) 266, 403 nm, (AlCl₃) 274, 414 nm, (AlCl₃/HCl) 272, 360, 387 nm, (NaOAc) 256, 350 nm, (NaOAc/H₃BO₃) 259, 372 nm로 flavonoid 화합물의 flavone 구조로 추정되었으며(19), LC-MS로 분석한 결과, m/z가 447(M-1)이므로 분자량은 448이었다.

¹H-NMR spectrum에서 proton의 signal 6개가 6~8 ppm에서 나타났고 이 중 signal δ 6.76과 δ 6.46에서 나타나 m-coupled doublets인 H-8과 H-6 signal로 추정할 수 있었고, δ 6.71에서의 singlet peak는 H-3의 peak로 C-3위치에 치환기가 존재하지 않는 flavone으로 확인되었다. 또한 A환의 signal 보다 저자장에 3개의 peak가 나타나 B환에 2개의 치환기가 존재함을 알 수 있다. 당 유래의 peak는 3~4 ppm 사이에서 나타났는데 문헌과 비교하여 glucose임을 확인하였고(20), 당의 H-1은 δ 5.07에서 나타났다. ¹³C-NMR spectrum에서 signal이 90~185 ppm에서 flavonoid의 signal이 나타났다. Carbonyl(4-keto)기의 signal은 181.85 ppm에서 확인되었고, C-7의 signal이 162.92 ppm으로 치환기가 없는 C-7의 signal(164.7)보다 1.78 ppm 고자장으로 이동되어 O-glycosylation되었음을 알 수 있었고, 또한 당의 C-1이 δ 99.89에서 나타나 O-glycoside의 C-1 signal이 100 ppm 주위에 나타난다는 문헌(21)과 일치하므로, 이상의 결과를 종합하여 분리한 성분을 luteolin-7-O-β-D-glucoside로 동정하였다.

Luteolin-7-O-β-D-glucoside의 활성산소 소거능

환삼덩굴의 EtOAc 분획으로부터 분리한 luteolin-7-O-β-D-glucoside와 천연항산화제로 이용되고 있는 α-tocopherol의 활성산소 소거능을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Superoxide radical 소거활성을 반응액내에 0.5 µg/mL와 5 µg/mL의 농도로 가하여 xanthine-xanthine oxidase cytochrome c 환원법에 의하여 측정한 결과, luteolin-7-O-β-D-glucoside는 0.5 µg/mL의 농도에서 47.7%, 5 µg/

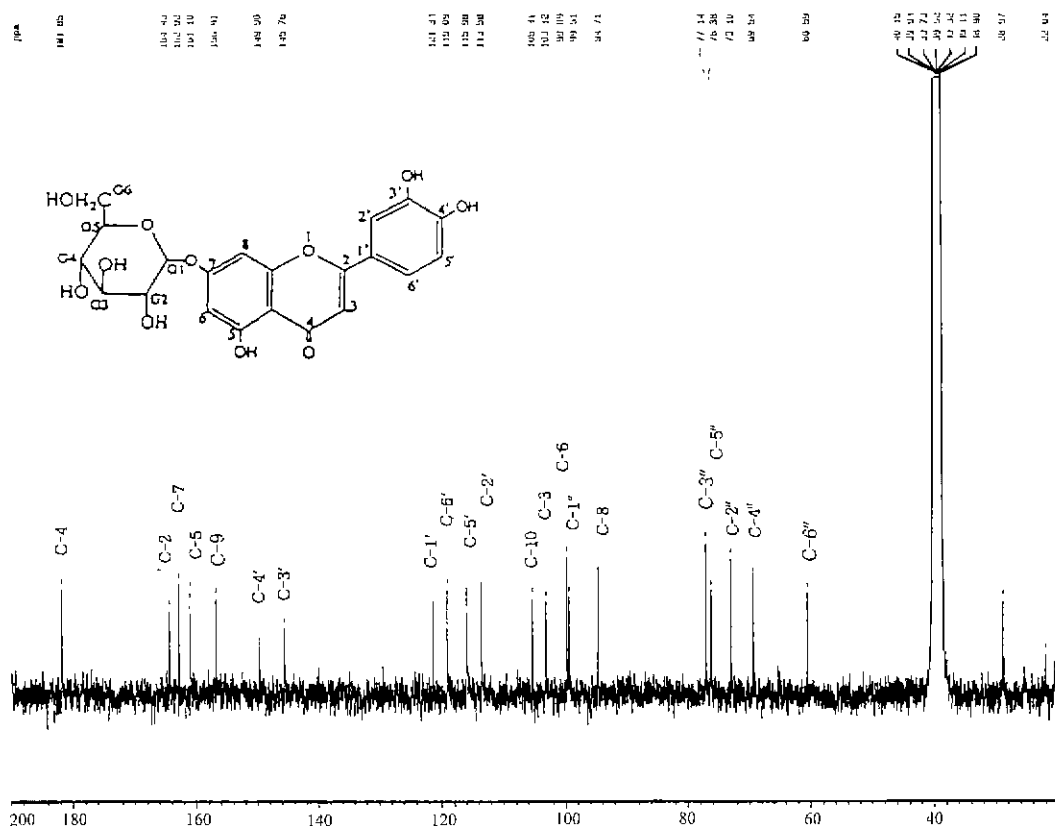


Fig 1. ¹³C-NMR spectrum of active compound isolated from *Humulus japonicus* (in DMSO-d₆, 100MHz).

Table 4. Scavenging effects on active oxygen species of luteolin-7-O-β-D-glucoside and α-tocopherol

Oxygen species	Concentration (μg/mL)	Scavenging activity (%)	
		L-7-O-G ¹⁾	α-Tocopherol
O ₂ ⁻	0.5	47.7	12.3
	5	89.2	17.4
OH	0.1	77.5	36.5
	1	99.1	72.3
H ₂ O ₂	50	62.4	58.4
	100	93.9	91.7

¹⁾L-7-O-G Luteolin-7-O-β-D-glucoside.

mL의 농도에서 89.2%의 소거활성을 나타내었으나, α-tocopherol은 거의 활성을 나타내지 않았다. Superoxide radical 소거작용이 어떤 물질에 의하여 반응제 자체가 억제될 경우, 즉 xanthine oxidase의 활성을 억제할 경우 그 물질의 radical 소거능이 실제보다 높은 활성을 나타내게 된다. 그러므로 luteolin-7-O-β-D-glucoside을 superoxide radical 소거활성 측정 시 실험한 농도로 첨가하여 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과, xanthine oxidase 저해활성을 나타내지 않았다(결과 미표시). 따라서 luteolin-7-O-β-D-glucoside의 superoxide radical 소거활성은 xanthine oxidase 저해에 의한 활성이 아니라,

radical 소거작용에 의해 나타나는 활성임을 알 수 있었다.

Hydroxyl radical 소거활성을 2-deoxyribose oxidation method에 의하여 측정 한 결과, luteolin-7-O-β-D-glucoside는 0.1 μg/mL의 농도에서 77.5%, 1 μg/mL의 농도에서 99.1% radical 소거활성을 나타내어 α-tocopherol보다 활성이 우수하였다.

Hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과에서도 50 μg/mL의 농도에서 62.4%, 100 μg/mL의 농도에서 93.9%의 소거활성을 나타내어 α-tocopherol보다 약간 높은 활성을 보여주었다.

Flavonoid 화합물의 항산화력은 B ring의 hydroxylation의 위치와 수에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 특히 3',4'-dihydroxyl group을 가질 때 항산화력이 높은 것으로 알려져 있다. 부가적으로 4위치에 carbonyl group을 가지고, 3 또는 5 위치에 free hydroxyl group을 가지며, 2와 3위치에 double bond를 가질 때 항산화력이 증가되는 것으로 보고되어 있다(22). 환삼덩굴에서 분리된 luteolin-7-O-β-D-glucoside는 구조적으로 위의 내용을 충족하는 구조로서, 5-hydroxy-4-carbonyl group에 의한 metal chelating 작용과 3',4'-ortho dihydroxyl group에 의한 radical scavenging 작용, benzene ring의

공명효과에 의한 stability 증가 등에 의하여 활성이 강하게 나타나는 것으로 판단된다.

Luteolin-7-O- β -D-glucoside는 신선초에서 분리된 바 있으며, 고지혈증 개선효과가 있는 것으로 보고되어 있고 (23), 이 물질의 aglycone인 luteolin은 항돌연변이 효과가 있는 것으로 알려져 있다(24) Luteolin-7-O- β -D-glucoside의 다른 생리활성 및 기능성과 환삼덩굴의 EtOAc 분획 중 다른 성분의 분리 및 구조분석이 현재 진행중에 있다.

요 약

천연 식물자원으로 풍부하게 존재하고 있는 환삼덩굴 (*Humulus japonicus*)의 이용성을 검토하기 위하여, 환삼덩굴의 용매분획별 활성산소 소거활성을 측정하고, 활성산소 소거작용이 강하게 나타난 EtOAc 분획으로부터 Amberlite XAD-2 column chromatography와 preparative HPLC를 통하여 활성성분을 분리하였다. MeOH 추출물을 용매의 극성에 따라 계층분획한 후 hydroxyl radical에 대한 소거활성을 측정한 결과, EtOAc분획의 활성이 가장 우수하였다. EtOAc분획으로부터 활성성분을 분리하기 위하여 Amerberlite XAD-2 column chromatography를 행하여 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과, 50% MeOH fraction의 활성이 가장 높았다. 그러므로 50% MeOH fraction을 preparative HPLC를 행하여 강한 활성산소 소거작용을 나타내는 성분을 분리하였다. 분리한 성분을 MS, UV, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 이용하여 flavone 배당체인 luteolin-7-O- β -D-glucoside로 동정하였다. Luteolin-7-O- β -D-glucoside은 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical에 대하여 α -tocopherol 이상으로 강한 소거작용을 나타내었다.

문 헌

1. Harman, D. : Aging; A theory based on free radical and radical chemistry *J. Gerontology*, **11**, 298-302 (1956)
2. Oyangui, Y. : SOD and active oxygen modulators Nihon Igakukan, Tokyo, p.17-18 (1989)
3. Fridovich, I. : Biologica effects of the superoxide radical *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-11 (1986)
4. Halliwell, B. : Oxidant and human disease. Some new concepts. *FASEB J.*, **1**, 358-364 (1987)
5. Kedziora, J. and Bartosz, G. : Down's syndrome a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species *Free Radical Biol. Med.*, **4**, 317-330 (1988)
6. McCord, J.M. : Oxygen derived radicals : A link between reperfusion injury and inflammation. *Food. Proc.*, **3**, 2402-2406 (1987)
7. Mavelli, I. : Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anaemia erythrocytes *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **106**, 286-290 (1982)
8. Halliwell, B. and Gutterge, J.M.C. : Protection against oxidants in biological system the superoxide theory of toxicity. In *Free Radicals in Biology and Medicine* 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, p.86-187 (1989)
9. Bendich, A., Machlin, J.L., Scadurra, O., Burton, G.W. and Wavner, D.D.M. : The antioxidant role of vitamin C *Adv. Free Radical Biol. Med.*, **2**, 419-444 (1986)
10. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.V., Barclay, L.R.C. and Locke, S.J. : The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma *Biochem. Biophys. Acta*, **924**, 408-419 (1987)
11. Frei, B., Stocker, R. and Ames, B.N. : Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 9748-9752 (1988)
12. 육창수. 원색한국약용식물도감. 아카데미서적, 서울, p.138 (1989)
13. 정보성, 신민교. 도해 한약(생약)대사전(식물편). 영림사, 서울, p.551 (1990)
14. Park, S.W., Woo, C.J., Chung, S.K. and Chung, K.T. : Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus* *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 464-470 (1994)
15. Park, S.W., Kim, S.H. and Chung, S.K. : Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus* *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **27**, 897-901 (1995)
16. Iio, M., Moriyama, Y., Matsumoto, N., Takai, N. and Fukumoto, M. : Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2173-2177 (1985)
17. Chung, S.K. : Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 118-123 (1997)
18. Muller, H.E. : Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS-peroxidase medium, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, **259**, 151-155 (1985)
19. Dey, P.M. and Harborne, J.B. : *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, London, p.209 (1989)
20. Harborne, J.B. : *The flavonoids*. Chapman and Hall, London, p.479 (1994)
21. Harborne, J.B. and Mabry, T.J. : *The flavonoids*. Chapman and Hall, London, p.52 (1982)
22. Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S. and Yoshikawa, T. : *Food factors for cancer prevention*. Springer, Tokyo, p.613-616 (1997)
23. Park, J.C., Cho, Y.S., Park, S.K., Park, J.R., Chun, S.S., Ok, K.D. and Choi, J.W. : Isolation of flavone-7-O-glycosides from the aerial parts of *Angelica keiskei* and anti-hyperlipidemic effect *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**, 337-343 (1995)
24. Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G. : Luteolin : A strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-p-2. in peppermint, sage, and thyme. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 410-414 (1995)