

쇠비름(*Portulaca oleracea*) 추출물의 DPPH radical 소거능과 *in vitro* 지질과산화 억제 효과와 활성성분

이희정, 이범종¹, 이동석², 서영완^{3*}
한국해양대학교 해양과학기술연구소
¹인제대학교 화학과
²인제대학교 임상병리학과
³한국해양대학교 해양과학부

DPPH Radical Scavenging Effect and *in vitro* Lipid Peroxidation Inhibition Activity of *Portulaca oleracea* and Its Active Principles

Hee Jung Lee, Bum-Jong Lee¹, Dong Seok Lee² and Youngwan Seo^{3*}
*Research Institute of Marine Science and Technology(RIMST), Korea Maritime University,
Busan, 606-791, Korea*

¹*Department of Chemistry, Inje University, Gimhae, 621-749, Korea*

²*Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae, 621-749, Korea*

³*Devision of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan, 606-791, Korea*

Abstract

An antioxidative activity of *Portulaca oleracea* was tested by *in vitro* experimental models. The antioxidative activities were determined by evaluation the DPPH radical scavenging activity and by measuring lipid peroxide using 2-thiobarbituric acid (TBA). The crude extract was sequentially partitioned with *n*-hexane, 15% aq. MeOH, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O. Among them, a remarkable antioxidative effect was observed in the fractions of EtOAc and *n*-BuOH. The DPPH radical scavenging effect (IC₅₀=17.90 μ g/ml) of the *n*-BuOH soluble fraction was comparable with that of natural antioxidant, α -tocopherol(IC₅₀= 6.99 μ g/ml) and the inhibitory effect of lipid peroxidation in mouse liver homogenate was similar to that of natural antioxidant, L-ascorbic acid at a concentration of 0.1mg/ml to 5mg/ml. From the BuOH soluble fraction yielded two biophenolic glycosides,

3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)phenyl-4-O- β -D-glucopyranoside(1) and 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl-O- β -D-glucopyranoside(2) using column chromatography and reversed-phase HPLC. In particular, the DPPH radical scavenging activity of 2 was comparable to that of tocopherol($IC_{50}=6.59\mu\text{g/ml}$).

1. 서 론

쇠비름(*Portulaca oleracea* L. (family : Portulacaceae)은 1년생 식물로서 오행초(五行草), 장명채(長命采), 마치채(馬齒采)등으로 불리기도 한다. 쇠비름은 양념 등으로 버무려서 먹기도 하고 약재로도 활용되어 왔으며 과거 선조들의 민간요법에서는 충독, 사독 등의 해독제로도 사용되었고¹, 또한 아라비아 반도에서는 방부제, 향피혈병제제, 진경제, 이노제, 구충제, 피부진정제로도 사용되었다². 그 외 근육이완 활성과 항암효과에 대한 연구도 보고되고 있다³⁻⁵. 이의 화학성분으로는 L-noradrenaline, dopamine, dopa와 칼륨, 여러 종류의 organic acid, glutamic acid, aspartic acid, alanine, 그리고 monoterpene 배당체인 portuloside A가 알려져 있다⁶⁻⁸. 천연물로부터 항산화 활성 성분을 분리 동정 개발하려는 연구들은 활성 산소종과 같은 반응성이 강한 유리기들에 의한 산화적 손상을 방지하기 위해서이다. 산화적 손상은 신체의 노화나 성인병과 관련한 각종 질환에 생체내에서 생성된 유리 라디칼이 생체내 고분자 화합물들을 변화시켜 관여한다⁹. 이렇게 생성된 유리 라디칼은 세포막내의 불포화지방산, nucleotides, sulfhydryl bonds와 반응함으로써 세포의 생화학적인 특성변화를 포함한 조직의 손상을 초래할 수 있다¹⁰. 따라서 각종 생약과 식용 식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 쇠비름의 조추출물과 이를 각종 용매로 추출한 분획물에 대해 DPPH radical 소거능과 mouse liver homogenate를 이용한 지질과산화 억제능을 측정하여 항산화 활성성분을 규명하고자 하였다. 그리고 항산화 효과가 뛰어난 것으로 나타난 쇠비름 BuOH 분획물로부터 2종의 항산화활성성분을 분리하여 그 구조보고하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재 료

본 실험에 사용한 쇠비름은 거제도 대금리 인근의 농가지역에서 자생하는 것을 7

월 ~8월 사이에 채집하였다.

2.2 쇠비름 추출 및 항산화 활성성분 분리 및 동정

채집한 쇠비름은 37°C 건조기로 18시간 음건하였다. 추출에 적합하도록 세절한 후 추출관에 넣고 48시간 동안 CH₂Cl₂와 MeOH로 각각 추출하여 혼합하였다. 이 crude extract를 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane fraction, 15% aq. MeOH fraction, EtOAc fraction, *n*-BuOH fraction, H₂O fraction으로 분획하였다. 분리된 각각의 쇠비름 용매 분획을 회전 진공 농축기(EYELA, N-N series)로 감압 농축시켜 용매를 제거하고 각각의 농축물을 얻었다. *n*-BuOH 분획물(12.121g)을 MeOH과 H₂O의 혼합용매를(50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100% MeOH) 사용하여 C18 reversed-phase vacuum flash chromatography 하였다. 그리고는 50% aq. MeOH subfraction을 HP20 gel chromatography와 semi-preparative C18 HPLC를 하여 화합물(1)과 화합물(2)를 분리·정제하였다. 그리고 이 화합물들에 대한 ¹H, ¹³C-NMR, NOESY, HMQC, HMBC를 측정하여 다음 문헌치¹¹⁻¹²와 비교하여 구조결정하였다.

2.3 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical scavenging effect 측정¹³

DPPH 시약 2mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15ml에 녹인 용액 1.2ml에 다시 EtOH 3ml과 DMSO 0.5ml을 혼합한다. 그리고 각 농도별 시료(10µg/ml~100µg/ml) 50µl와 제조한 DPPH용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\text{electron donating ability}) (\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{실험구 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.4 Mouse liver homogenate의 조제

실험동물은 암수 구별없이 체중 20~25g의 ICR mouse로 온도 20±2°C, 습도50±10%의 동물실에서 일주일간 고형시료(삼양유지(주))로 사육하였다. 이 실험동물을 ether로 마취후 해부하여 간 문맥에 0.15M ice cold KCl 용액을 관류시켜 간 내 혈액 제거 후 적출하여 0.15M ice cold KCl 용액으로 세척한 후 신속히 간 무게의 10배량의 ice cold KCl를 가하여 간을 세절하고 약 5분간 ice bath상에서 균질화하였다.

2.5 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)assay¹⁴

마우스 간 homogenate 0.3ml에 8.1% SDS 0.3ml과 증류수 0.1ml 또는 시료 0.1ml을

가하였다. 이것을 37°C에서 8시간 incubation하여 생성된 과산화지질을 20% acetic acid 1.5ml과 1.2% TBA 시약 1ml을 첨가하였다. 반응 혼합액을 100°C에서 30분간 가열한 뒤 실온에서 냉각시켰다. 냉각 후 2000rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 흡광도를 spectrophotometer(532nm)로 측정하여 정량하였다. TBA 값은 532nm에서의 흡광도가 0.1일 때를 1 unit으로 한 후, mouse 간 1g에 대한 TBA값을 환산하여 표시하였으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 쇠비름 추출물의 DPPH를 이용한 free radical scavenging 효과

쇠비름 추출물을 농도별로(10 μ g/ml~100 μ g/ml) free radical 소거 활성을 측정한 결과 10 μ g/ml에서 13.43%의 소거율을 나타내었고 25 μ g/ml과 50 μ g/ml에서는 각각 25.91%, 48.47%, 그리고 100 μ g/ml 농도에서는 71.45%의 소거율을 보여 농도의존적인 효과가 있음을 알 수 있다. 천연항산화제로 널리 알려진 L-ascorbic acid와 α -tocopherol의 free radical 소거활성에 비해서는 비교적 약한 효과였다. 그러나 합성항산화제인 BHT(butylated hydroxy toluene)보다는 뛰어난 활성을 나타내었다.

수층을 제외한 모든 층에서 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 나타났으며 특히, *n*-BuOH 분획물에서의 효과가 다른 분획들 보다 훨씬 높게 나타났다. 이들의 IC₅₀을 살펴보면 *n*-BuOH 분획물이 17.90 μ g/ml으로써 가장 농도가 낮았으며 다음으로는 EtOAc 분획물이 57.3 μ g/ml이었다. 이것은 L-ascorbic acid(1.25 μ g/ml)나 α -tocopherol(6.99 μ g/ml)의 free radical 소거효과와 거의 동등하였으며 BHT(87.84 μ g/ml)보다는 월등히 뛰어난 것으로 나타났다. 따라서 쇠비름 조추출물의 DPPH free radical 소거활성은 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 의한 것임을 알 수 있으며 그 활성성분들은 비교적 극성이 큰 화합물임을 추정할 수 있다.

3.2 쇠비름 추출물의 지질과산화 생성 억제 효과

쇠비름의 조추출물과 각 분획물들은 반응 용액에 첨가된 시료의 농도(0.1~5mg/ml)에 따른 지질과산화 억제율이 농도의존적이었다. DPPH radical 억제 효과에서와 마찬가지로 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물의 지질과산화 저해 활성이 다른 분획들에 비해 명백히 뛰어난 것으로 나타났다. *n*-Hexane 분획물과 15% aq. MeOH 분획물의 효과는 아주 약한 활성을 나타내었으며 수층의 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다.

3.3 쇠비름으로부터 분리한 화합물(1, 2)의 DPPH radical 소거 효과

쇠비름 *n*-BuOH 분획물에서 분리한 2개의 화합물(3-hydroxy-1- (2-hydroxyethyl) phenyl-4-O- β -D-glucopyranoside(1), 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl- O- β -D-glucopyranoside(2))

에 대한 DPPH radical 소거활성을 측정하였다.

화합물 2의 free radical 소거 활성은 $IC_{50}=15.96\mu g/ml$ 으로서 tocopherol($IC_{50}=6.59\mu g/ml$) 보다는 약하지만 BHT($IC_{50}=42.48\mu g/ml$)보다는 우수한 라디칼 소거효과를 나타내었다. 따라서 쇠비름의 항산화 효과는 부분적으로는 이 두 화합물에 의해 기인됨을 추측할 수 있다.

참고 문헌

1. 이창복, 대한식물도감, 향문사 p324
2. K. P. Choi, S. W. Jung, E. J. Kim and S. S. Ham(1997), *Journal of the East Asian of Dietary Life* 7, p527
3. S. Habtemariam, A. L. Harvey and P. G. Waterman(1993), *Journal of Ethanopharmacology*, 40, 195-200
4. O. Parry, J. A. Marks and F. K. Okwuasaba(1993), *Journal of Ethanopharmacology*, 40, 187-194
5. J. W. Yoon, S. S. Ham and H. S. Jun, U. S. Pat. 5869060, (1999)
6. P. C. Peng, L. J. Haynes and K. E. Magnus(1961), *Nature*, 191, p.1108
7. A. I. Mohamed, and A. S. Hussein(1994), *Plant Foods for Human Nutr.* 45, 1-9
8. N. Sakai, K. Inada, M. Okamoto, Y. Shizuri and Y. Fukuyama(1996), *phytochemistry*, 42. 1625-1628
9. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) : Free radicals in biology and medicine. Clarendon press, Oxford, 10
10. Asada, K.(1988) : Damage of protein by active oxygen. *Nippon Nokeikagaku Kaishi*, 62, 1100-1103
11. Bianco, A., Malzzei, R. A., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M. L., Soriero, A., Uccella, Nocola(1998), *Food Chemistry*, 63, 461
12. (a)Shimomoura, H., Sashida, Y., Adachi, T.(1987), *Phytochemistry*, 26, 249 (b)Kunz, S., Becker, H.,(1992), *Phytochemistry*, 31, 3981
13. M. S. Blois(1958), *Nature*, 26, 1199-1200
14. H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yaki(1979), *J. Biol. Chem.* 95, 351-358