

柳樹奇生の 라디칼 소거활성 성분

이청학¹ · 안달래¹ · 최 훈¹ · 양재현² · 이은별¹ · 형명명¹ · 도 초¹ · 신태용¹
조종현³ · 이재혁⁴ · 박정숙⁵ · 김대근^{1*}

¹우석대학교 약학대학, ²전북대학교 헬스케어사업단, ³전북농업기술원,
⁴남부대학교 한방제약개발학과, ⁵남부대학교 대체의학과

Free Radical Scavengers of *Taxillus delavayi* (Van Tiegh.) Danser.

Chung Hak Lee¹, Dalrae Ahn¹, Xun Cui¹, Jae-Heon Yang², Eun Byeol Lee¹, Ming Ming Xing¹, Chao Tao¹,
Tae-Yong Shin¹, Chong Hyeon Cho³, Jae Hyeok Lee⁴, Jeong-Suk Park⁵ and Dae Keun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

²Center for Healthcare Technology Development, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Service, Iksan 570-704, Korea

⁴Dept. of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

⁵Dept. of Alternative Medicine, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract – In the course of screening for antioxidant compounds by measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), a total extract of the twigs of *Taxillus delavayi* (Loranthaceae) was found to show potent radical scavenging activity. Subsequent activity-guided fractionation of the methanolic extract led to the isolation of two phenolic compounds, catechin (**1**) and galloyl catechin (**2**), as active principles. Their structures were elucidated by spectroscopic studies. These two compounds showed the significant antioxidative effects on DPPH, and riboflavin- and xanthin-originated superoxide quenching activities. And these two compounds also showed strong nitric oxide radical scavenging effects. In riboflavin- and xanthin-originated superoxide quenching activities and nitric oxide radical scavenging effect, compound **2** showed better antioxidant activities than vitamin C.

Key words – *Taxillus delavayi*, Loranthaceae, DPPH, Superoxide quenching activity, Radical scavenging effect

인체내에서 산소는 대부분 에너지 대사과정에서 인산화를 통해서 정상적으로 환원되지만 그 중 일부와 스트레스, 화학약품, 방사선, 음주 및 흡연 등의 원인에 의해 발생하는 활성산소는 유리기를 형성하여 인체에 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 체내에 축적된 활성산소는 인체의 구성성분인 지질, 단백질 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴하여 노인성 질환을 비롯한 많은 노화와 관련된 질병의 주요 원인으로 보고되어 있다. 따라서 독성을 일으키지 않는 안전한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있으며, 활성 산소종이나 자유 라디칼을 제거하기 위한 많은 항산화제의 연구가 진행되고 있다.¹⁻⁵⁾

유수기생 *Taxillus delavayi* (Van Tiegh.) Danser.은 겨우살이과(Loranthaceae)에 속하는 관목의 형태로 자라며 활엽수

림의 나무에 기생한다. 중국에서는 줄기를 채취하여 이기지통(理氣止痛), 거풍제습(祛風除濕)의 효능이 있어 관절염, 위통 등에 사용하고 있다.⁶⁾ 그러나 유수기생에 대해서는 지금까지 항산화 물질로 lignan 성분인 pinoselin 성분⁷⁾이 밝혀져 있을 뿐 식물화학적 연구나 약리학적 연구가 자세히 보고된 바가 없어, 본 연구는 천연자원에서 항산화물질을 찾는 연구의 일환으로 본 식물의 methanol 추출물을 몇 가지 용매로 계통분획하여 얻은 분획물을 DPPH radical 소거 효과에 기인한 항산화활성을 확인하여 보았다. 그 결과 ethyl acetate 분획에서 가장 강한 활성이 확인되어 ethyl acetate 분획에서 항산화 물질을 분리하고 그 구조를 확인하여 유수기생의 천연 항산화제로서의 이용가능성을 알아보고자 하였다.

*교신저자(E-mail): dkkim@mail.woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1574

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 도수기생은 2011년 4월에 중국소수민족전통의약연구센터에서 기증받아, 정확히 감정한 후에 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관하고 있다 (WSU-11-038).

시약 및 기기 - 실험에 사용한 기기로는 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer (Japan)를 이용하여 확보하였다. 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 1급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Art. 1.07734, 230-400 mesh, Merck)이며, molecular sieve column chromatography용 packing material은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ precoated plate (Art. 1.07752, Merck)를 사용하였으며, HPLC용 column은 JAI GS-310 (JAI Co. Ltd.) column을 사용하였다. 발색시약으로는 10% H_2SO_4 (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV의 검색은 254, 365 nm에서 하였다.

추출 및 분리 - 도수기생을 세절한 다음 건조하여 얻은 시료 약 1.0 kg을 ethanol로 가끔 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스 약 230 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 *n*-hexane(2 g), methylene chloride(16 g), ethyl acetate(28 g) 및 *n*-butanol(50 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 이들 분획물에 대해 DPPH free radical 소거활성을 측정하여 가장 강한 소거효능을 보인 ethyl acetate분획에서 물질 분리를 시도하였다. Ethyl acetate분획 3 g을 Sephadex LH-20(MeOH) column chromatography를 실시한 후 TLC 양상에 따라 7개 분획(E1-E7)으로 나누었다. TLC 상에서 주요 반점을 나타낸 E5과 E6에서 물질 분리를 시도 하였다. E5를 JAI GS-310 column (MeOH)으로 정제하여 화합물 1 (60 mg)을 얻었다. E6을 CHCl_3 -MeOH- H_2O (20:10:1)을 유출용매로 silica gel column을 통과시키고 Sephadex LH-20(MeOH)으로 정제하여 화합물 2 (25 mg)을 얻었다.

(+)-Catechin (1) - FeCl_3 test: positive; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.83 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J=8.4$, H-5'), 6.71 (1H, dd, $J=8.4$, 2.0 Hz, H-6'), 5.93 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 5.85 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 4.56 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-2), 3.97 (1H, m, H-3), 2.84 (1H, dd, $J=16.0$, 5.6 Hz, H-4a), 2.50 (1H, dd, $J=16.0$, 8.4 Hz, H-4b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 157.8 (C-9), 157.5 (C-5), 156.9 (C-7), 146.2 (C-3', 4'), 132.2 (C-1'), 120.0 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.2 (C-2'), 100.8 (C-10), 96.3 (C-6), 95.5 (C-8), 82.8 (C-2), 68.8 (C-3), 28.4 (C-4).

7-O-Galloyl-(+)-catechin (2) - FeCl_3 test: positive; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.18 (2H, s, H-2", 5"), 6.82 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, $J=8.4$, H-5'), 6.70 (1H, dd, $J=8.4$, 1.6 Hz, H-6'), 6.25 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 6.21 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 4.63 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-2), 3.98 (1H, m, H-3), 2.73 (1H, dd, $J=16.0$, 5.6 Hz, H-4a), 2.48 (1H, dd, $J=16.0$, 8.4 Hz, H-4b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 166.5 (C=O), 158.1 (C-9), 157.0 (C-5), 151.7 (C-7), 146.7 (C-3", 5"), 146.4 (C-3'), 146.3 (C-4'), 140.6 (C-4"), 131.7 (C-1'), 120.3 (C-1"), 120.0 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.2 (C-2'), 110.6 (C-2", 6"), 106.5 (C-10), 103.5 (C-6), 101.6 (C-8), 83.0 (C-2), 68.2 (C-3), 28.6 (C-4).

DPPH free 라디칼 소거법에 의한 항산화활성⁸⁾ - 96 well plate에 시료를 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (EtOH)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid와 BHA (butylated hydroxy anisole)를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH 라디칼 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Riboflavin 유래 superoxide 억제 활성^{9,10)} - 시료의 superoxide 억제능력은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가 시스템을 이용하여 광화학 작용을 측정하는 것이다. 반응 혼합액은 2.6 μM riboflavin, 13 mM methionine, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA, PBS(pH 7.4) 및 여러 농도의 시료로 이루어졌다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 넣어두었다. light box 안의 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 blue formazan으로 환원되어지는데, 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다. Blue formazan 형성 억제가 superoxide 억제능력이 된다.

Xanthin 유래 superoxide 소거 활성¹¹⁾ - Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide 라디칼을 Thuong 등의 방법에 따라 측정한다. nitro blue tetrazolium (NBT, 0.48 mM), xanthine(1.6 mM)을 포함하는 phosphate buffer(pH 7.8, 20 mM)와 시료를 함께 혼합한다. 5분 후 xanthine oxidase(0.05 U/mL) 100 μL 를 넣고, 37°C에서 30분간 배양시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Superoxide 라디칼 소거 활성은 시료와 대조군의 NBT의 환원정도를 비교하여 나타낸다.

Nitrite oxide 라디칼 소거 활성¹²⁾ - Nitric oxide의 라디칼 소거 효과는 Maguire 등의 방법에 따라 측정한다. 튜브에 다양한 농도의 시료 5 μL 와 10 mM sodium nitroprusside 용액 495 μL 를 가하고, 2시간 동안 700 lux 광원에 노출시

킨다. 그 후, 이 혼합액 100 μL 에 Griess reagent (Naphthyl Ethylene Diamine Dihydrochloride 0.2%, 2% sulfanilamide, 5% phosphoric acid) 100 μL 를 넣고, 즉시 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도는 Griess reagent를 같은 방법으로 적용한 sodium nitrite의 표준곡선에 비교하여 측정된다.

결과 및 고찰

유수기생으로부터 얻은 methanol 엑스를 용매로 계통분획하여 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 *n*-butanol엑스를 제조하였다. 이 중 가장 강한 DPPH 라디칼 소거활성(Fig. 1)을 나타낸 ethyl acetate 분획물을 몇가지 column chromatography를 반복 실시하여 2종의 페놀성 물질을 분리하였다(Fig. 2).

화합물 1은 FeCl_3 시액에 양성으로 나타나 페놀성 화합물임을 알 수 있었으며, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 A ring의 H-6과 H-8으로 귀속되는 δ 5.93와 5.85 (each 1H, d, $J=2.4$

Hz)의 *m*-coupled doublet가 확인되었고, δ 4.56 (1H, d, $J=7.2$ Hz)에서 C ring의 H-2 signal이 관찰되었으며, 이는 δ 3.97 peak의 H-3과 trans coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. δ 3.97 (1H, m, H-3)과 2.84 (1H, dd, $J=16.0, 5.6$ Hz, H-4a)의 signal 양상으로 보아 화합물 1은 flavan-3-ol 계통의 화합물임을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 aromatic 영역에서 12개의 carbon peak와 aliphatic 영역에서 3개 등 총 15개의 carbon signal을 관찰할 수 있었으며, C-3에 귀속되는 δ 68.8의 hydroxyl carbon signal을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 검토한 결과 화합물 1은 (+)-catechin으로 추정하였으며, 기존 문헌 14,15 의 data와 비교하여 확인·동정하였다.

화합물 2는 FeCl_3 시액에 양성으로 나타나 페놀성 화합물임을 알 수 있었으며, NMR spectrum이 galloyl기로 추정되는 부분구조가 추가된 것 외에는 화합물 1과 매우 유사하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.18에서 2H에 해당하는 singlet peak가 관찰되었으며, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 carbonyl 영역의 δ 166.5에서 1개의 carbon peak가 나타났으며, aromatic 영역의 δ 146.7, 140.6, 120.3 및 110.6에서 4개의 peak가 관찰되어 전형적인 galloyl기의 peak 양상을 보여 주었다. 이상의 자료를 토대로 화합물 2는 1개의 galloyl기가 치환된 catechin 화합물로 추정하였으며 기존 문헌 16 의 data와 비교하여 화합물 2는 7-O-galloyl-(+)-catechin으로 확인·동정하였다.

이상과 같이 강황 지상부의 methanol 추출물 분획 중 DPPH free 라디칼 소거활성이 가장 좋은 ethyl acetate 분획으로부터 물질 2종을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 화합물 1과 2는 본 식물에서 처음 보고되는 화합물이며, 분리된 화합물의 DPPH free 라디칼 소거활성은 Fig. 3에 나타난 바

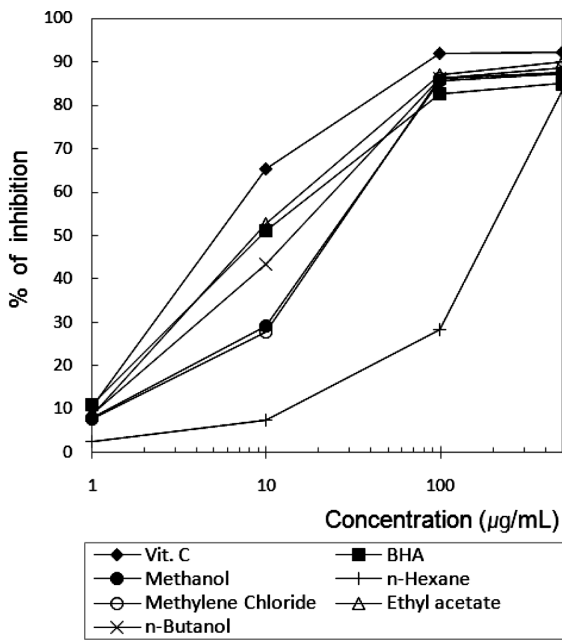


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions of *Taxillus delavayi*.

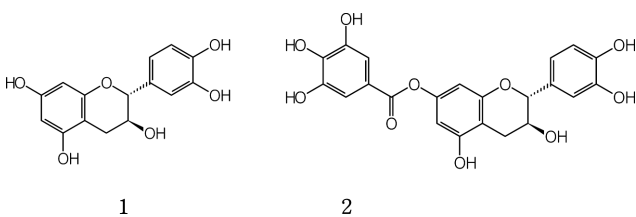


Fig. 2. Structures of compounds 1 and 2 isolated from *Taxillus delavayi*.

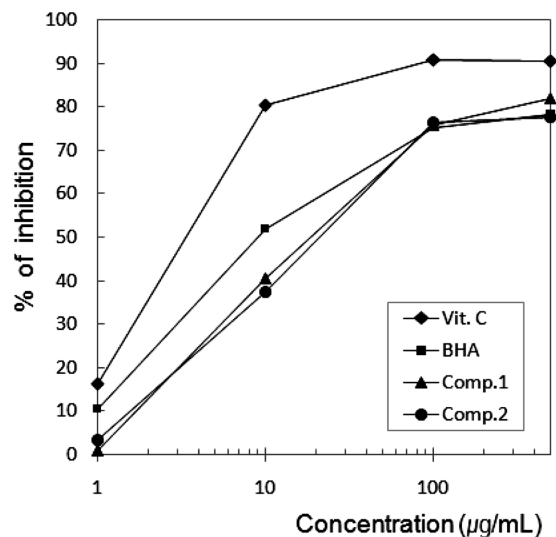


Fig. 3. Radical scavenging effects of compounds 1 and 2 on DPPH radicals.

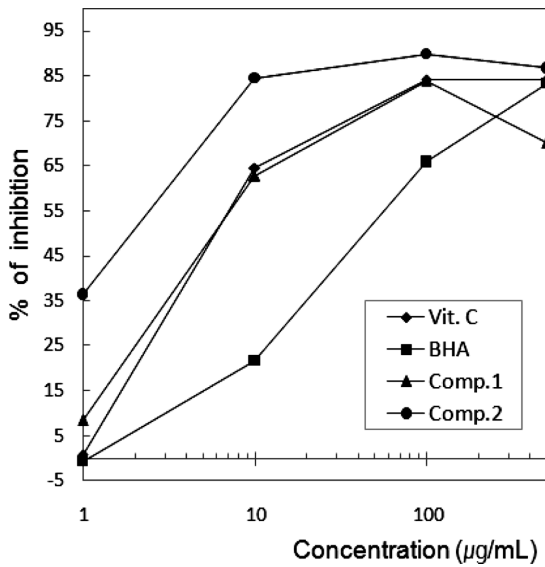


Fig. 4. Riboflavin originated superoxide quenching activities of compounds 1 and 2.

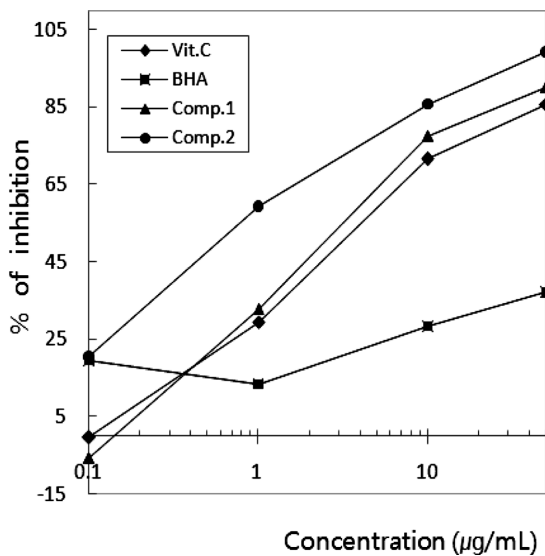


Fig. 5. Xanthine originated superoxide quenching activities of compounds 1 and 2.

와 같이 화합물 1(IC₅₀; 17.3 µg/ml)과 화합물 2(IC₅₀; 19.5 µg/ml)가 농도 의존적으로 유사한 DPPH free 라디칼 소거활성을 보여 주었으나, vitamine C(IC₅₀; 3.3 µg/ml) 보다 약한 효능을 보여 주었다. Riboflavin 유래 superoxide quenching 활성 또한 화합물 2(IC₅₀; 1.9 µg/ml)가 화합물 1(IC₅₀; 5.9 µg/ml) 보다 더 강한 superoxide 소거활성을 보여 주었으며, 화합물 2는 vitamine C(IC₅₀; 5.8 µg/ml)보다 더 강한 superoxide 소거효능을 보여 주었다(Fig. 4). Xanthine 유래 superoxide quenching 활성도 화합물 2(IC₅₀; 0.5 µg/ml)가 화합물 1(IC₅₀; 2.3 µg/ml) 보다 더 강한 superoxide 소거활

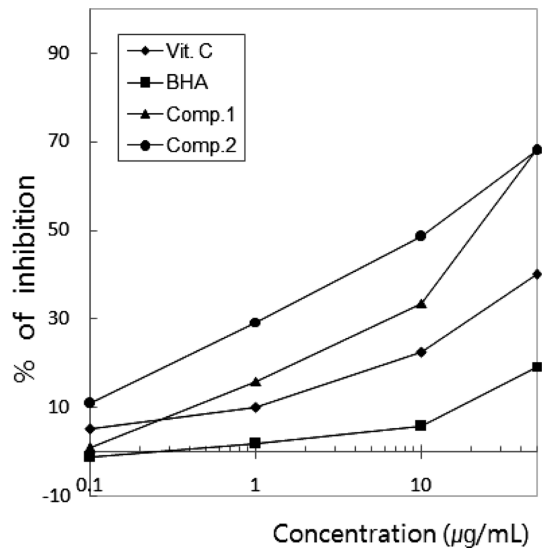


Fig. 6. Nitric oxide radical scavenging effects of compounds 1 and 2.

성을 보여 주었으며, 화합물 2는 vitamine C(IC₅₀; 3.1 µg/ml)보다 더 강한 superoxide 소거효능을 보여 주었다(Fig. 5). Nitric oxide의 라디칼 소거 효과는 화합물 2(IC₅₀; 11.2 µg/ml)가 화합물 1(IC₅₀; 21.4 µg/ml) 보다 더 강한 superoxide 소거활성을 보여 주었으며, 화합물 1, 2는 vitamine C(IC₅₀; >50 µg/ml)보다 더 강한 superoxide 소거효능을 보여 주었다(Fig. 6). 이상의 결과로 화합물 1과 2는 도수기생의 methanol 추출물이 갖고 있는 항산화활성을 나타내는 일부 구성 물질임을 알 수 있었으며, 도수기생은 항산화활성을 갖는 기능성 자원소재으로서의 이용가능성이 충분히 있을 것으로 사료된다.

결 론

유수기생의 methanol 추출물 중 ethyl acetate분획에서 항산화 활성을 갖는 2종의 화합물을 단리하였으며, 이들의 spectral data로부터 구조를 확인한 결과 (+)-catechin (1)과 7-O-galloyl-(+)-catechin (2)으로 각각 확인·동정하였다. 이 화합물 1, 2는 본 식물로부터 처음 분리·보고되는 화합물이며, 화합물 1, 2 모두 강한 DPPH 라디칼 소거 효능, riboflavin 및 xanthine 유래 superoxide quenching 활성과 nitric oxide 라디칼 소거활성을 보여 주었다.

사 사

이 논문은 전북테크노파크 2012년도 신성장산업 연구개발사업 지원비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Priyadarsini, K. I., Maity, D. K., Naik, G. H., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., Satav, J. G. and Mohan, H. (2003) Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 475-484.
2. Serbinova, E., Kagan, V., Han, D. and Packer, L. (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.* **10**: 263-275.
3. Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Dafererac, D., Sökmen, A., Demira, E. and Sahin, H. (2013) Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial crops and products* **43**: 427-433.
4. Yu, B. P. (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 651-668.
5. Heo, C., Chung, J. H., Jo, B. K., Kim, H. P. and Heo, M. Y. (2003) Antioxidative activities of 60 plant extracts. *The Journal of Applied Pharmacology* **11**: 196-199.
6. 蕭培根 (1994) 중국본초도감 제 2권, 2051, 여강출판사, 서울.
7. Piao, X. L., Deng, Z. Q., Chen, H. B. and Wang, J. (2012) Rapid analysis of antioxidant constituents from *Taxillus delavayi*, a Yi ethnomedicinal material. *Food Science* **33**: 16-19.
8. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V.- Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
9. Choi, D. S., Kim, S. J., and Jung, M. Y. (2001) Inhibitory activity of berberine on DNA strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 452-455.
10. Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**: 309-314.
11. Thuong, P. T., Su, N. D., Ngoc, T. M., Hung, T. M., Dang, N. H., Thuan, N. D., Bae, K. H. and Oh, W. K. (2009) Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*. *Food Chem.* **113**: 139-145.
12. Marcocci, L., Maguire, J. J., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 748-55.
13. Morimoto, S., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Ezaki, N., and Takizawa, N. (1985) Tannins and related compounds. XXIX. - Seven new methyl derivatives of flavan-3-ols and a 1,3-dia-rylpropan-2-ol from *Cinnamomum cassia*, *C. obusifolium* and *Lindera umbellata* var. *membranacea*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2281-2286.
14. Yeo, H. S., Park, J. C., and Choi, J. S. (1992) Phytochemical studies on the constituents of *Filipendula glaberrima*. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 121-125.
15. Young, H. S., Park, J. C. and Choi, J. S. (1987) Isolation of (+)-catechin from the roots of *Rosa rugosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**: 177-179.
16. Agrwal, P. K. (1989) Carbon-13 NMR of flavonoids, 466. Elsevier, New York.

(2012. 11. 16 접수; 2012. 12. 4 심사; 2012. 12. 7 게재확정)