

간염 치료제인 민간제제에서 항산화 물질의 분리 및 확인

김승호* · 이종우 · 함경수

한국과학기술연구원 유전공학연구소 단백질화학연구소

Isolation and Identification of Antioxidant from Oriental Therapeutic Drug for Hepatitis B

Kim, Seung-Ho*, Jong-Woo Lee and Kyung-Soo Hahm

Protein Chemistry Lab., Genetic Engineering Research Institute,
KIST, P.O. Box 17, Taeduck Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — The antioxidant in the oriental drug, NP-S, traditionally used as a therapeutic agent for Hepatitis B was identified. The NP-S was divided into two fractions at molecular weight cut-off of 1000 by ultrafiltration and the fraction having molecular weight less than 1000 was named as NP-S(*l*)10. Both NP-S and NP-S(*l*)10 had antioxidant activity. An antioxidant that was extracted by chloroform from water-insoluble fraction in lyophilized NP-S(*l*)10 had a little smaller activity than NP-S(*l*)10 and identified as cyclooctasulfur(S₈) by mass spectrum. Water-soluble fraction in lyophilized NP-S(*l*)10 had no antioxidant activity and did not include S₈. The S₈ band separated from NP-S(*l*)10 by TLC was disappeared on illuminating UV light after mixing with egg PC liposome. These results indicated that major antioxidant of NP-S is S₈. In addition, another antioxidant was detected in HPLC pattern of the mixture of NP-S(*l*)10 and H₂O₂.

생물의 산소호흡에 의해 형성되는 활성산소는 산소 분자에 비하여 상대적으로 높은 반응성을 지니고 있어서 생체물질들을 보다 쉽게 산화시킬 수 있다. 이러한 활성산소는 생리적으로 이용되기도 하지만(1, 2), 대부분의 경우 지질의 과산화, 단백질의 변성, DNA 염기서열의 절단과 같은 생체물질의 산화를 야기시켜 노화를 비롯한 간염, 암, 동맥경화, 신경질환등 관련되는 질병의 발생과 진행에 관여하고 있다고 보고되었다(3-6). 따라서, 어떤 원인으로 활성산소의 생성이 증가할 경우, 이의 제거를 위해 항산화활성이 얼마나 빨리 유도될 수 있는지가 노화와 질병을 억제하는데 중요하다고 볼 수 있다. 생체 내에 존재하는 항산화 물질에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소들과 α -tocopherol (vitamine E), ascorbate(vitamine C), carotenoid, glutathione 등이 있으며, 이들은 활성산소의 발생을 미

연에 방지하거나 생성된 활성산소를 포착하여 제거하는 방법으로 항산화 작용을 한다.

최근, 김 등은 사람의 모발을 전처리하여 얻은 간염치료제인 NP-S가 항균활성 및 항산화활성을 가지고 있다고 보고하였다(7, 8). 또한, 간염에 의해 생체 내에서 활성산소의 생성이 촉진되고 간염환자의 혈액 내에서 SOD의 양이 증가되었다는 보고에 따라(9, 10) NP-S의 간염 치료효과와 항산화 효과가 서로 관련되어 있을 것으로 생각되어, 본 연구에서는 간염 치료제인 NP-S에 포함되어 있는 항산화 물질의 분리 정제를 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

간염 치료제로서 사용해 온 민간제제인 NP-S는 사람의 모발을 밀폐된 용기에서 고열로 가열하여 얻은 추출물로서, 부산의 동화 의원으로부터 공급받았다. 이 NP-S를 분자량 1000의 막으로 한외여과하여 그

Keywords: Hepatitis B, antioxidant, cyclooctasulfur
*Corresponding author

여과물을 NP-S(*l*)10으로 명명하였다. 이것을 동결건조하고 증류수에 용해시키는 과정을 4번 반복하여 얻은 수용액을 LNP-S(*l*)10으로, 불용성 물질을 WI-S(*l*)10으로 명명하였다.

시약 및 기기

Egg phosphatidylcholine(PC)과 thiobarbituric acid는 Sigma사에서, 한외여과막(ultrafiltration membrane, YM2)은 Amicon사에서, silica gel TLC plate는 Merck사에서 구입하였다. 기타 여러 유기 용매들은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

사용한 기기는 Hewlett-Packard사의 HP1090L liquid chromatograph와 MS-Engine 5989A mass spectrometer와 Particle Beam LC-MS interface, Carlo Erba Instrument사의 EA1108 elemental analyzer, Hitachi사의 655A-12 liquid chromatograph를 사용하였다.

리포좀의 제조

리포좀은 다음과 같이 초음파법으로 제조하였다. chloroform에 녹아있는 30 mg의 egg PC를 vial에 담고 질소 가스를 불어넣어 얇은 막을 형성시킨 다음 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4, 0.1 M NaCl) 3 ml를 첨가하고 vortex한 후 10분간 초음파 처리하여 제조하였다.

황 분자를 함유하는 리포좀은 chloroform에 녹아 있는 egg PC와 황 분자를 54 : 1의 무게비로 섞은 후 앞에서와 같은 초음파법으로 제조하였다. 이때, 리포좀의 이중막에 삽입된 황 분자의 양은 리포좀에 NP-S를 5%(v/v) 첨가했을 때의 황 분자의 양과 거의 동일하다. 즉, NP-S의 건조량이 37.2 mg/ml이고 원소 S의 함량이 10%(w/w)이므로(8) NP-S에 존재하는 원소 S가 모두 황 분자로부터 유래된 것이라고 가정하면 NP-S에 존재하는 황 분자는 3.72 mg/ml이 되고, 사용한 리포좀의 농도는 10 mg/ml이므로 이것의 5%(v/v)에 해당하는 NP-S에 존재하는 황 분자의 양은 0.185 mg/ml이 된다. 따라서, egg PC와 황 분자의 무게비를 54 : 1로하여 리포좀을 제조하였다.

항산화활성 측정법

각 시료의 항산화활성은 thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)법으로 측정하였다(11). 10 mg/ml의 리포좀 용액을 수정 시험관(quartz tube)에 담고 5%(v/v)의 시료를 첨가한 후 고무마개로 시험

관의 입구를 막은 다음, 254 nm의 자외선(57.43 mW/cm²)을 조사하여 지질의 과산화물을 유발시켰다. 황 분자를 함유한 리포좀의 경우는 시료의 첨가없이 자외선을 조사하였다. 시간의 경과에 따라 0.2 ml의 반응액을 취하여 3 ml의 20% trichloroacetic acid와 1 ml의 1% TBA/10% perchloric acid를 혼합하고 끓는 물에서 25분간 반응시킨 후 500×g에서 10분간 원심분리한 다음 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

Thin layer chromatography(TLC)

LNP-S(*l*)10와 NP-S(*l*)10은 2 μl를 전개하였으며, 리포좀에 5%(v/v)의 NP-S(*l*)10을 첨가한 시료와 이 시료를 5시간 동안 자외선을 조사한 시료는 40 μl씩을 전개하였다. 전개용매로서 chloroform을 사용하였으며, 표준물질로서 황 분자를 전개하여 비교하였다.

High pressure liquid chromatography(HPLC)

H₂O₂와 NP-S(*l*)10과의 반응 혼합물 및 NP-S(*l*)10의 HPLC 양상을 C₁₈ reverse phase column(Beckman, ultrasphere, ODS, 5 μ, 4.6×250 mm)으로 조사하였다. 증류수인 A용액으로 평형화시켜준 컬럼에 4 μl의 시료를 넣어준 다음, 2분 동안 A용액을 흘려주고 나서 20분 동안에 B용액(80% acetonitrile)이 100% 되도록 linear gradient를 걸어주었다. 용액의 용출속도는 0.5 ml/min이고, 검출기의 파장은 230 nm를 사용하였다.

결과 및 고찰

항산화활성과 황 분자

NP-S와 NP-S(*l*)10이 항산화활성을 가지고 있다는 보고에 따라(7, 8), NP-S(*l*)10으로부터 항산화 물질을 분리하기 위하여 동결건조한 NP-S(*l*)10을 증류수로 용해시켜 수용성 물질(LNP-S(*l*)10)과 불용성 물질(WI-S(*l*)10)로 분리한 후 각각의 항산화활성을 TBARS법으로 분석하였다. Fig. 1을 보면 LNP-S(*l*)10은 항산화활성을 보여주지 않았는데, 이러한 결과는 NP-S(*l*)10에 존재하는 항산화 물질이 동결건조시에 제거될 수 있는 물질이거나 혹은 WI-S(*l*)10에 포함되어 있는 물질임을 시사하고 있다.

NP-S(*l*)10을 동결건조할 때에 제거될 수 있는 물질 중에서 확인된 물질은 NH₃이었고(8), WI-S(*l*)10의 주 구성물질은 mass spectrum에 의해 황 분자(cyclooctasulfur, S₈)로 확인되었다(Fig. 2). 0.1 M의 NH₃는

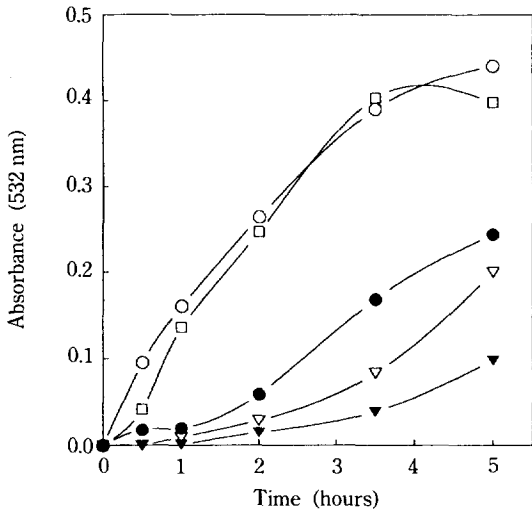


Fig. 1. Inhibition of UV-induced TBARS production in PC liposomes by cyclooctasulfur (S₈).
 -●-: S₈ embedded in PC liposome, -▼-: S₈ dissolved in NP-S(I)10, -□-: LNP-S(I)10, -▽-: NP-S(I)10, -○-: only PC liposome.

항산화활성을 보여주지 않았지만(결과 제출치 없음), NP-S(I)10에 황 분자를 녹인 용액(3.72 mg/ml)이 증가된 항산화활성을 보여주었으며 황 분자 자체(실험 방법 참고)도 NP-S(I)10보다는 조금 약하지만 2시간의 lag period를 갖는 항산화활성을 보여주었다(Fig. 1). 이러한 결과는 NP-S의 항산화활성이 대부분 황 분자에 의해 나타나는 것임을 시사하고 있다. Fig. 1에서 나타난 NP-S(I)10의 항산화활성을 살펴보면, 지질과 산화가 매우 낮은 속도로 진행되다가 다시 정상 속도로 진행되는 일반적인 항산화제의 작용과 유사하다. 즉, 항산화제의 활성은 불포화지질의 농도에 대한 항산화제의 농도에 비례하고 항산화제의 약 90%가 파괴될 때까지 lag period를 갖는다는 것이다.

Table 1에 나타난 LNP-S(I)10과 WI-S(I)10의 원소 분석 결과에 따르면, LNP-S(I)10은 원소 S를 포함하고 있지 않은 반면에 WI-S(I)10은 높은 함량의 원소 S를 포함하고 있다. 이것은 NP-S(I)10에 존재하는 원소 S가 모두 WI-S(I)10에 존재하고, WI-S(I)10에 존재하는 원소 S는 대부분 황 분자를 구성하고 있음을 의미한다. 황 분자는 물에는 용해되지 않으나 chloroform에 대한 용해도가 약 1.5%이므로, chloroform을 전개용매로 사용하여 WI-S(I)10의 TLC 양상을 조사해보면 WI-S(I)10의 대부분은 chloroform에 잘 용해되는 물질이었고, 이 물질이 mass spectrum에 의해 황

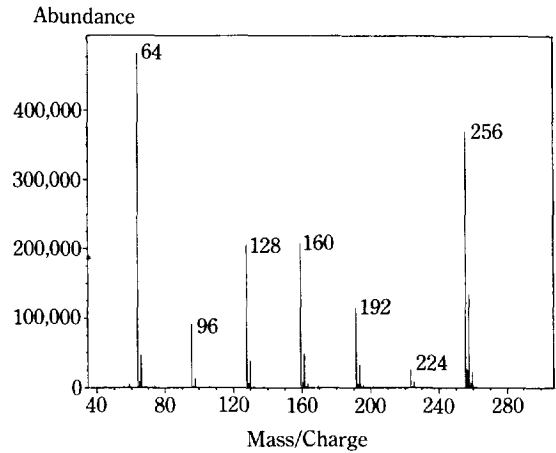


Fig. 2. Mass spectrum of WI-S(I)10.

Table 1. Elemental analysis of LNP-S(I)10 and WI-S(I)10*.

	C %	H %	N %	S %
LNP-S(I)10	15.80	4.24	14.06	0
WI-S(I)10	5.72	1.02	0	77.94

*Percent of each element is weight percent.

분자임이 확인되었다(결과 제출치 없음).

항산화활성이 있는 NP-S(I)10이 TLC상에서 전개되어 나타난 band는 mass spectrum에 의해 황 분자임이 확인되었다(결과 제출치 없음). 그러나, 이러한 황 분자의 band는 항산화활성이 없는 LNP-S(I)10에서는 나타나지 않았다(Fig. 3-A). 또한, 리포솜과 NP-S(I)10의 혼합물에 자외선(254 nm)을 5시간 동안 조사하여 지질과 산화를 일으키면, 존재하던 황 분자의 band가 사라졌다(Fig. 3-B). 이러한 결과는 항산화활성이 황 분자와 관련되어 있음을 의미하며, 이것은 TBARS법에 의한 결과와 일치한다.

NP-S의 항산화활성은 주로 황 분자에 의해 나타나며, 이러한 항산화활성이 간염치료와 관련성을 갖기 위해서는 황 분자가 체내에 흡수되어 간으로 이동되어야 한다. 동물체에 고체황을 경구투여했을 경우 고체황은 체내로 흡수되어 간으로 이동되어진 후 황산으로 산화되어 혈액을 통해 연골이나 다른 조직으로 운반되어지고 다시 무코다당류로 편입되는 것이 보고되어졌다(12). 이러한 보고에 의하면 황 분자가 간에서 항산화활성을 나타낼 가능성이 있으나, NP-S에 포함된 황 분자는 고체상이 아니라 용액 상태로 존재하고 있으므로 체내에서의 대사가 고체황의 경우

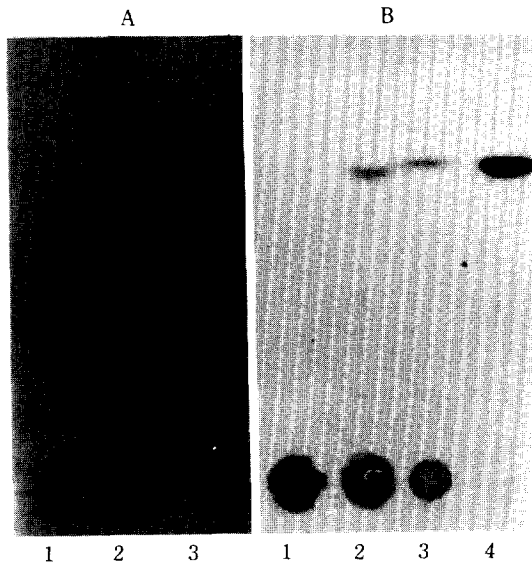


Fig. 3. Detection of S₈ in NP-S(l)10 by TLC.
 (A) lane 1, water-soluble fraction of lyophilized NP-S(l)10; lane 2, NP-S(l)10; lane 3, S₈ as standard. (B) lane 1, UV-illumination to the mixture of NP-S(l)10 and PC liposome for 5 hrs; lane 2, the mixture of NP-S(l)10 and PC liposome; lane 3, NP-S(l)10; lane 4, S₈ as standard.

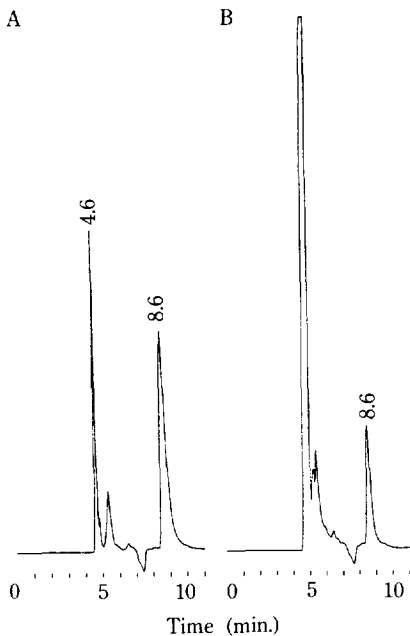


Fig. 4. HPLC pattern of the mixture of NP-S(l)10 and H₂O₂.
 A, only NP-S(l)10; B, NP-S(l)10 reacted with 0.69% H₂O₂ for 1 min.

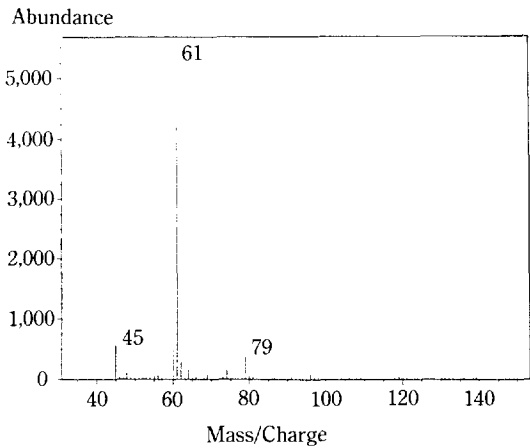


Fig. 5. LC-MS of NP-S(l)10.
 The eluted peak at 8.6 min. in Fig. 4-A was analyzed by mass spectrometer.

와는 다르리라 여겨진다. NP-S에는 황 분자를 용해시킬 수 있는 용매가 함유되어 있는 것으로 보이며, 이 용매의 확인은 용액 상태로 존재하는 황 분자의 대사연구에 중요하리라 생각된다.

황분자 이외의 항산화 물질

Hydrogen peroxide(H₂O₂)는 hydroxyl radical을 빠른 속도로 형성하여 항산화 물질과 쉽게 반응하므로, 항산화활성을 갖는 NP-S(l)10에 일정량의 H₂O₂를 첨가하고 1분간 실온에서 방치한 후 반응물의 HPLC 양상을 조사하여 황 분자 이외의 항산화 물질을 조사하였다. NP-S(l)10의 HPLC 양상에서 8.6분의 peak가 H₂O₂의 첨가에 의해 감소되었을 뿐만 아니라(Fig. 4), 항산화활성이 없는 LNP-S(l)10에서는 이 8.6분의 peak가 용출되지 않았다(결과 제출치 없음). 따라서, 이 8.6분의 peak가 항산화활성에 관여하고 있을 것으로 생각되며, LC-MS에 의하면 이것은 황 분자와는 다른 물질이었다(Fig. 5).

요 약

간염치료제로 사용해진 민간제제인 NP-S에 함유된 항산화제의 분리 정제를 시도하였다. NP-S를 분자량 1,000으로 한외여과한 여과물인 NP-S(l)10를 동결건조하고 증류수로 추출하여 얻어진 불용성 물질을 chloroform으로 다시 추출한 물질이 NP-S(l)10보다는 조금 약하지만 항산화활성을 가지고 있었으며, 이

항산화 물질은 황 분자(cyclooctasulfur, S₈)의 mass spectrum과 일치하였다. NP-S(l)10을 동결건조한 후 증류수로 추출한 수용성 물질은 항산화활성을 가지고 있지 않았을 뿐만 아니라 황 분자를 함유하고 있지 않았다. NP-S(l)10과 리포솜을 혼합한 후 자외선을 조사하면 NP-S(l)10에 함유된 황 분자가 사라짐이 TLC에 의해 확인되었다. 이러한 결과들은 NP-S(l)10의 주요 항산화활성이 황 분자에 의한 것임을 의미한다. 또한, NP-S(l)10의 HPLC pattern에서 H₂O₂와의 반응시에 감소되는 peak도 항산화활성을 가지고 있을 가능성이 있으며, 이것은 mass spectrum으로부터 황 분자와는 다른 물질인 것으로 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 특정연구개발사업(G70490)에 의해 수행되었으며, 본 실험에 도움을 주신 김환목 박사와 질량 분석기의 사용에 도움을 주신 박규환씨에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1985. Oxygen radicals and the nervous system. *Molec. Aspects Med.* **8**: 89.
2. Badwey, J.A. and M.L. Karnovsky. 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 695.
3. Chu, B.C.F. and L.E. Orgel. 1985. Nonenzymic sequence-specific cleavage of single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 963.
4. Dizdaroglu, M. and D.S. Bergtold. 1986. Characterization of free radical-induced base damage in

- DNA at biologically relevant levels. *Anal. Biochem.* **156**: 182.
5. Wickens, D.G., A.G. Norden, J. Lunec and T.L. Dormandy. 1983. Fluorescence changes in human gamma-globulin induced by free-radical activity. *Biochim. Biophys. Acta* **742**: 607.
6. Hammond, B., H.A. Kontos and M.L. Hess. 1985. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**: 173.
7. Kim, S.H., H.J. Yeom, H.M. Kim, H.S. Lee and K.S. Hahm. 1992. Isolation of antioxidant compound from therapeutic agent for Hepatitis B viral infection. *Kor. Biochem. J.* **25**: 676.
8. Kim, S.H., J.W. Lee, H.S. Lee and K.S. Hahm. 1992. Characterization and bioactivity of oriental agent (NP-S) to Hepatitis B. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 699.
9. 山中恒夫, 井戸健一, 木村 健, 櫻林郁之介, 河合 忠. 1981. 各種肝疾患における過酸化脂質および superoxide dismutase 活性の動態. *肝臓* **22**: 123.
10. 沢木俣二, 稻垣孝雄, 加藤勝久, 伊藤良一, 小池正人, 瀧谷 敏, 松浦 衛, 伊藤吉將, 平野和行. 1982. 種種の肝疾患における血清 superoxide dismutase의 生物學的活性値と免疫學的活性値. *醫學のおゆみ* **122**: 1136.
11. Pelle, E., D. Maes, G.A. Padulo, E.K. Kim and W.P. Smith. 1990. An *in vitro* model to test relative antioxidant potential: Ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 234.
12. Joo, C.N., Y.W. Lee and S.Y. Lee. 1988. Sulfur metabolism in animal body. *Kor. Biochem. J.* **21**: 82.

(Received January 26, 1993)