

芍藥(*Paeonia lactiflora*) 뿌리로부터 항산화활성 물질의 분리

방면호¹ · 송정춘 · 이상양 · 박남규 · 백남인^{1*}

농촌진흥청 작물시험장 품질이용과, 경희대학교 생명과학부 및 생명자원과학연구원¹

초 록: 국내 식물자원으로부터 천연 항산화물질을 탐색하기 위하여 항산화활성이 기대되는 38종의 식물을 MeOH 수용액으로 추출한 후, EtOAc와 물로 분배, 추출하였다. 각 추출물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 검정하였고, 이중에 작약을 포함한 13종의 식물에서 활성이 확인되었다. 작약뿌리로부터 항산화물질을 분리하기 위하여 80% MeOH 수용액으로 추출, 농축하였고, 이를 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 계통분획하였다. 활성이 확인된 *n*-BuOH과 EtOAc 층에 대하여 활성을 추적해가며 column chromatography를 반복하여 3종의 활성물질을 분리하였다. 이들의 화학구조를 NMR 등의 spectral data를 해석하여 (+)-catechin, 1,2,3,4-tetragalloyl- β -D-glucose 및 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -D-glucose로 동정하였다.(1999년 4월 8일 접수, 1999년 4월 28일 수리)

서 론

최근 천연물을 중심으로 한 학문이 발전하면서 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리 활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 생리 활성물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며, 또한 새로운 물질들이 연구 개발되고 있다. 특히 인공합성품중 일부가 안전성의 문제가 제기되면서 규제를 강화하고 있고, 소비자들의 안전과 건강에 대한 욕구증대에 따라 일반 기업에서도 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 천연물의 이용분야는 더욱 더 넓어질 것으로 생각된다.

식용유지나 지방질 식품은 가공 및 저장 중에 여러 가지 원인에 의하여 불쾌한 냄새나 맛을 내거나 독성을 나타내기도 한다. 이와 같은 유지의 변질은 주로 자동산화에 의하여 일어나고 있다. 또한, 생체내에서 산화와 관련된 현상으로 인식되고 있는 노화의 원인 중에 하나로 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등의 활성 산소의 역할이 대두되어 이들의 제거에 대한 관심이 높아지고 있다.¹⁾

본 실험에서는 항산화 활성이 기대되는 38종 국내산 식물의 MeOH 추출물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였고, 그 중에서 활성이 확인된 작약으로부터 활성 물질을 분리, 동정하고자 하였다.

芍藥은 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본으로 옛날부터 뿌리에는 鎮痛, 鎮痙, 頭痛, 腹痛, 止汗, 調經의 效能이 있는 것으로 알려져²⁾있다. 뿌리에는 paeoniflorin, paeonol, paeonin, 安息香酸, 精油, 脂肪油, 樹脂, tannin, 糖, 澱粉, 粘液質, β -sitosterol, triterpenoid가, 꽃에는 astragalol, kaempferol-3,7-diglucoside, 多量의 pyrogallol-tannin(10% 以上), pyrethrin,

찾는말 : 항산화물질, DPPH 라디칼 소거활성, 작약, (+)-catechin, 탄닌

*연락처자

13-methyl-tetradecan 酸, β -sitosterol, hexacosane 등이, 앞에는 tannin이 함유되어 있다.³⁾ 주성분인 paeoniflorin은 중추억제 작용, 혈관확장작용, 항염증 작용, 항allergy 작용 등을 나타내는 것으로 보고 되어 있다.³⁾

본 실험에서는 작약으로부터 항산화활성 물질을 분리하기 위하여 80% MeOH 수용액으로 추출하고, 추출물에 대하여 용매 분획, column chromatography, thin layer chromatography 등을 이용하여 활성물질을 추적하였다. 분리된 물질에 대하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 등의 각 자료를 해석하여 구조를 확인하였다.

재료 및 방법

식물시료

실험에 사용한 식물시료(Table 1)는 서울 경동시장에서 구입하여, 동정한 후, 풍건하고 분쇄하여, 저온에 저장하였다.

시약 및 기기

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma사 제품, TLC plate[silica gel 60 F₂₅₄ (두께0.2 mm)]와 silica gel 60(70~230 mesh)은 Merck 사 제품을, 그리고 용매 및 기타 시약은 특급 또는 1급품을 사용하였다.

UV흡수는 UV spectrophotometer (Varian Cary₁₃)으로 측정하였고, ¹H-NMR(400 MHz), ¹³C-NMR(100 MHz)은 ZEOL JNM-400으로 측정하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정용 식물체 추출물의 제조

각 한약재 30 g씩의 건조분말을 80% MeOH 수용액(500 ml×2)으로 실온에서 2일간 추출한 후, 여지로 여과하고 40°C이하에서 rotary evaporator를 사용하여 감압농축 하였다. 얻어진 MeOH 추출물을 분액깔때기에 넣은 후, EtOAc와 증류수를 동량 (150 ml)으로 섞고 분배, 추출하였다. 각 분획을 다시 감압농축시켜 EtOAc추출물과 H₂O추출물을

언어, 활성검정용 시료로 사용하였다.

DPPH를 이용한 전자공여능(Electron Donating Ability, EDA) 측정

각 식물체에서 얻어진 EtOAc추출물과 H₂O추출물을 vacuum oven에서 수분을 제거하고, 시험관에 각각 H₂O추출물은 10, 5, 2.5 mg 씩을, EtOAc추출물은 2, 1, 0.5 mg 씩을 취한 후, MeOH 1 ml로 용해하였다. Silica gel column chromatography를 이용하여 얻어진 분획은 1 mg 또는 0.5 mg씩을 취하여 MeOH 1 ml에 용해하였다. 그 중에서 80 µl씩을 각각 활성 측정용 시험관에 취한 후, 1.5 × 10⁻⁴ M DPPH 5 ml씩을 첨가하여 vortex mixer로 잘 섞었다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 탈색 정도를 517 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 대조용 실험은 각 시료 대신에 MeOH 80 µl를 취한 후 동일한 방법으로 실시하였다. EDA는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{실험구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

작약의 추출 및 용매분획

70°C에서 열풍건조한 작약(*Paeonia lactiflora*) 뿌리 5 kg을 분쇄기로 분쇄한 후, 80% MeOH 수용액(10 L × 2)으로 실온에서 하룻밤 추출하였다. 여과지로 여과한 후 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하였다. 물 3 L에 현탁시킨 후 EtOAc(3 L × 2)로 분배 추출하였다. 수층은 다시 *n*-BuOH(2.5 L × 2)로 분배추출하였고, 얻어진 각층을 감압농축하여, EtOAc분획물(PLR-E, 52 g), *n*-BuOH분획물(PLR-B, 104 g), 물분획물(PLR-W, 1.25 kg)을 얻어 활성검정 및 물질 분리용 시료로 사용하였다.

활성 물질의 분리

EtOAc 분획을 silica gel(500 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOH=10:1 → 5:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1)하여 50 ml씩 분취하였다. 분취액을 TLC로 확인하여 유사한 것끼리 합하고 농축하여 7개의 소분획(PLRE-1~PLRE-7)을 얻었다. 각각의 소분획에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였고, 그 중에서 활성이 있는 것으로 확인된 6번째 소분획(PLRE-6, 3.87 g)을 다시 silica gel(300 g, CHCl₃-EtOH=20:1 → 15:1 → 10:1 → 5:1) column chromatography 하고 동일한 과정에 의하여 10개의 소분획(PLRE 6-1~PLRE 6-10)을 얻었다. 그중 활성이 확인된 9번째 소분획(PLRE 6-9, 0.23 g)에 대하여 silica gel(250 g, CHCl₃-EtOH=20:1 → 7:1) column chromatography 하여 4개의 물질(PLRE 6-9-1~PLRE 6-9-4)을 분리하였다. 그중 4번째 물질(PLRE 6-9-4, 40 mg)에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 검색한 결과 항산화 활성이 있는 것으로 확인되었다.

화합물 1 {PLRE-6-9-4, (+)-catechin} Yellowish powder (MeOH), [α]_D+12.2° (c=0.9, MeOH), IR, (KBr, max) 3255,

2935, 1610 cm⁻¹, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.74 (1H, d, J=1.7 Hz, H-2'), 7.19 (1H, d, J=7.6 Hz, H-5'), 7.15 (1H, dd, J=7.6, 1.7 Hz, H-6'), 6.69 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 6.65 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 5.24 (1H, d, J=7.4 Hz, H-2), 4.68 (1H, m, H-3), 3.56 (1H, dd, J=16.0, 8.4 Hz, H-4_a), 3.42 (1H, dd, J=16.0, 5.4 Hz, H-4_b).

n-BuOH 분획을 silica gel(500 g) column chromatography 하였으며 용매의 극성을 높여가며 [CHCl₃-MeOH=10:1 → CHCl₃-MeOH-H₂O=7:3:1(아랫층) → 65:35:10(아랫층) → 6:4:1]용리하였고, 70 ml씩 분취하였다. 분취액을 TLC로 확인하여 6개(PLRB-1~PLRB-6)의 분획으로 나누었다. 그중 활성이 확인된 6번 분획 (PLRB-6, 1.72 g)을 silica gel column chromatography(CHCl₃:MeOH:H₂O=6:4:1)하여 4개의 소분획(PLRB-6-1~PLRB-6-4)을 얻었다. 그 중에서 활성이 있는 3번 분획(PLRB-6-3, 100 mg)에 대하여 acetylation 반응을 수행하였다. 즉, PLRB-6-3(95 mg)을 pyridine 5 ml에 녹인 후 acetic anhydride 5 ml를 병냉하에서 적하하였다. 실온에서 15시간 교반시킨 후 반응액을 빙수(100 ml)와 EtOAc(100 ml × 3)로 분배 추출하였다. EtOAc층을 5% HCl, 포화 NaHCO₃ 및 NaCl로 세척한 후, MgSO₄·anhydrous로 탈수하고 여과, 감압농축하였다. 얻어진 생성물을 silica gel(40 g) column chromatography(CHCl₃-MeOH=10:1)하여 2개의 활성물질 PLRB-6-3-Ac-2(화합물 2a, 7.8 mg), PLRB-6-Ac-3(화합물 3a, 31.8 mg)을 분리하였다.

화합물 2a(PLRB-6-3-Ac-2, peracetyl-1,2,3,4-tetragalloyl-β-D-galloyl-β-D-glucose) Brownish powder(CHCl₃-EtOH), [α]_D+25.2° (c=0.7, MeOH), IR, (KBr, max) 2950, 1720, 1605 cm⁻¹, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.76 (2H), 7.74 (1H), 7.68, 7.65, 7.56, 7.52 (each 2H), 7.43 (1H) (all s, H-galloyl), 5.62 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1), 5.38 (1H, dd, J=8.0, 8.0 Hz, H-3), 5.30 (1H, dd, J=8.0, 8.0 Hz, H-4), 5.25 (1H, dd, J=8.0, 7.2 Hz, H-2), 4.08-4.22 (3H, m, H-5,6), 1.85-2.08 (acetyl-methyl).

화합물 3a(PLRB-6-3-Ac-3, peracetyl-1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-D-glucose) Brownish powder(CHCl₃-EtOH), [α]_D+22.4° (c=0.7, MeOH), IR, (KBr, max) 2960, 1718, 1610 cm⁻¹, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.72, 7.71, 7.70, 7.62, 7.60 (each 2H, all s, H-galloyl), 5.68 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1), 5.42 (1H, dd, J=8.2, 8.1 Hz, H-3), 5.27 (1H, dd, J=8.2, 8.0 Hz, H-4), 5.22 (1H, dd, J=8.1, 7.2 Hz, H-2), 3.82-4.27 (3H,

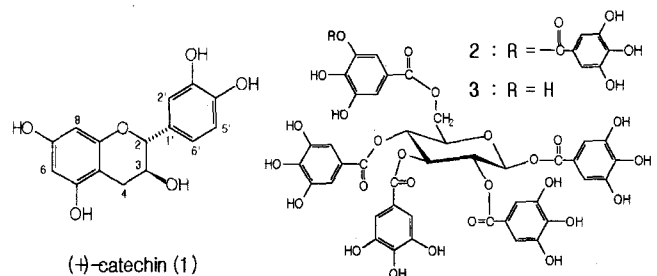


Fig. 1. Chemical structures of antioxidative compounds isolated from the root of *Paeonia lactiflora*.

m, H-5,6), 1.91-2.02 (acetyl-methyl).

화합물 2a 및 3a의 탈아세틸화

화합물 2a 및 3a를 각각 5 mg씩 취하여 MeOH 2 ml에 녹이고, 5% KOH 수용액 0.25 ml를 가하였다. 실온에서 30분간 교반한 후, Dowex 50 w x 8 (H⁺ form)을 적당량 가하여 중화하였다. 여지로 여과한 후 감압 농축하여 화합물 2 및 3을 2.1 및 2.3 mg 얻었다.

결과 및 고찰

전통의서, 민간구전, 학술지 등을 검색하여 항산화활성이 있을 것으로 기대되는 식물 중 국내에서 재배되고 있는 약용작물 38종을 천연항산화물질 개발을 위한 대상 시료로 선정

하였다(Table 1).⁴⁹⁾ 각 식물체로부터 활성물질만을 추출하기 위하여 대부분의 2차 대사산물이 추출되는 80% MeOH 수용액을 이용하여 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 극성에 따라 분획하기 위하여 EtOAc와 H₂O로 분배, 추출하여 활성검정용 시료로 사용하였다.

한편, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 비교적 안정한 radical을 갖는 물질로 항산화활성이 있는 물질과 만나면 radical이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화활성을 검정하게 된다.⁹⁾ DPPH MeOH 용액에 대하여 800~200 nm에서 흡광도를 측정하여 최대 흡수파장(517 nm)을 결정하였고, 이 파장에서 각 농도별로 흡광도를 측정하여 활성검정에 가장 적합한 농도(1.5×10^{-4} M)를 결정하였다.

DPPH radical 소거활성법을 이용하여 각 식물체의 EtOAc 및 H₂O 추출물의 항산화 활성을 검정한 결과(Table 1) 홍화씨

Table 1. Electron donating ability^a of the extracts obtained from several plants

(Unit: %)

Plnats Name	H ₂ O			EtOAc		
	10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	0.5 mg/ml
<i>Acanthopanax senticosus</i> .	45.8	24.1	12.9	37.0	26.4	14.7
<i>Achyranthes japonica</i>	1.1	0.5	0.5	5.2	3.5	1.7
<i>Agastache rugosa</i>	17.6	10.5	4.7	10.0	6.4	2.9
<i>Akebia quinata</i>	42.9	24.7	13.5	24.1	15.2	8.2
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	40.5	26.4	14.7	27.6	17.0	8.2
<i>Angelica dahurica</i>	22.9	12.3	10.0	29.4	25.2	15.8
<i>Angelica gigas</i>	21.7	14.1	10.0	29.4	18.8	13.5
<i>Asarum sieboldii</i>	27.6	17.0	10.0	4.1	1.76	0.0
<i>Astragalus membranaceus</i>	17.0	10.5	10.0	27.6	24.7	21.1
<i>Atractylodes japonica</i>	15.2	8.2	5.8	3.5	2.9	0.5
<i>Bupleurum falcatum</i> .	20.5	14.1	10.0	47.6	36.4	21.7
<i>Carthamus tinctorius</i> .	30.5	17.6	10.0	94.7	64.1	45.8
<i>Chrysanthemum sibiricum</i>	26.4	21.1	9.4	36.4	21.1	12.3
<i>Cnidium officinale</i>	27.0	12.3	9.41	58.2	44.7	27.0
<i>Codonopsis lanceolata</i>	10.5	7.6	5.8	10.0	5.8	3.5
<i>coix lachryma-jobi</i>	10.5	5.8	2.9	0.0	0.0	0.0
<i>Cornus officinalis Siebold</i>	40.0	28.2	13.5	94.1	80.0	64.7
<i>Crataegus pinnatifida</i>	40.0	25.8	15.2	64.1	38.8	22.9
<i>Eucommia ulmoides</i>	12.3	7.6	4.1	8.8	5.2	2.3
<i>Houttuynia cordata</i>	24.7	14.1	7.6	27.0	8.8	7.6
<i>Kalopanax pictum</i>	38.8	25.2	13.5	22.3	13.5	6.4
<i>Ledebouriella seseloides</i>	15.8	10.5	9.4	45.2	34.7	21.1
<i>Lycium chinensis</i>	17.6	12.9	7.0	8.2	4.7	2.3
<i>Morus alba</i> .	25.8	16.4	9.4	27.0	18.8	10.5
<i>Ostericum koreanum</i> .	17.6	11.7	6.4	14.1	8.2	2.9
<i>Paeonia lactiflora</i>	57.0	42.3	14.1	97.0	97.0	95.2
<i>Paeonia suffruticosa</i>	69.4	41.1	23.5	95.8	68.2	37.0
<i>Perilla frutescens</i>	40.5	22.3	11.1	12.3	6.4	4.1
<i>Phellodendron amurense</i>	47.0	30.0	16.4	8.2	5.2	2.3
<i>Polygonatum sibiricum</i>	4.1	3.5	0.5	2.94	1.1	0.0
<i>Polygonum multiflorum</i>	25.8	10.5	9.4	23.5	22.3	16.4
<i>Rehmannia glutinosa</i>	43.5	27.0	14.7	42.9	28.8	17.0
<i>Saururus chinensis</i>	92.3	52.3	31.1	12.3	10.5	5.2
<i>Schizandra chinensis</i>	18.2	10.5	0.0	10.0	5.8	4.1
<i>Scutellaria baicalensis</i>	43.5	31.1	12.9	89.4	61.7	45.2
<i>Sophora flavescens</i>	12.3	7.6	4.7	14.1	8.2	2.9
<i>Ulmus davidiana</i>	95.2	85.8	58.8	63.5	46.4	25.8
<i>Zingiber officinale</i>	80.0	58.8	37.0	50.0	35.2	20.0

^aElectron donating ability: (Absorbance of reference solution-Absorbance of sample solution)/(Absorbance of reference solution) × 100 (%).

(*Carthamus tinctorius* L.), 목단(*Paeonia suffruticosa* Andr), 황금(*Scutellaria baicalensis* George), 산수유(*Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini), 시호(*Bupleurum falcatum* L.), 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Cnidium officinale* Makino), 가시오가피(*Acanthopanax sessiliflorus* Seeman.), 건강(*Zingiber officinale* Rosc), 산사(*Crataegus pinnatifida* Bunge), 삼백초(*Saururus chinensis* Baill), 유근피(*Ulmus davidiana*), 구절초(*Chrysanthemum sibiricum* Tucz et DC)와 같이 13종의 식물에서 항산화활성이 있는 것으로 판명되었다. 이 중 국내에서의 생산성이 높으며, 항산화 활성에 대한 연구가 이루어진 바가 없는 작약으로부터 항산화물질을 분리하고자 하였다.

작약 뿌리로부터 얻어진 MeOH추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 순차 분획하고 감압농축기(45°C)를 사용하여 용매를 완전히 제거하여 3개의 분획물을 얻었다. 각 분획에 대하여 DPPH radical 소거법으로 전자공여능을 측정된 결과 EtOAc추출물과 *n*-BuOH추출물에서 농도가 4, 2, 1 mg/ml일 때 EDA값이 각각 75.2, 52.3, 27.0%와 60.0, 40.0, 12.3%로 효과가 확인되었고(Table 2), 농도가 증가함에 따라 그 효과도 비례적으로 상승하여 두 추출물로부터 활성물질을 분리하고자 하였다.

EtOAc 추출물을 silical gel column chromatography를 이용하여 몇 개의 분획으로 나누었으며, 각 분획에 대하여 DPPH radical 소거법을 이용하여 활성분획을 구명하였고, 활성분획을 다시 silical gel column chromatography를 반복하여 활성물질을 추적하였다. 이와 같은 과정에서 얻어진 각 분획에 대하여 항산화활성을 측정된 결과를 Table 3에

나타내었다. 처음 분획단계에서 얻어진 7개의 분획 중에서 6번 분획(PLR-E-6)에 활성이 집중되었고 (0.5 mg/ml일 때 EDA값이 95.2%), 2번째 분획단계에서 얻어진 10개의 분획 중에서는 5번(PLR-E-6-5, 52.3%), 6번(PLR-E-6-6, 67.6%), 7번(PLR-E-6-7, 59.4%) 분획에서도 활성이 나타났으나, 9번 분획 (PLR-E-6-9, 71.7%)에서 활성이 가장 높게 나타났다. 3번째 단계에서 분리한 4개의 물질중에서 4번 물질(PLR-E-6-9-4, 64.7%)에 활성이 집중되었고, 이 분획을 TLC로 확인한 결과 순수한 화합물임이 밝혀졌다.

화합물 1은 IR spectrum에서 수산기(3255 cm^{-1})와 benzene 고리(1610 cm^{-1})의 존재가 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) spectrum에서 4치환 벤젠고리의 meta-coupling하는 수소 signal {(δ 6.69 (1H, d, $J=2.0$ Hz), δ 6.65 (1H, d, $J=2.0$ Hz))과 1,3,4 치환 벤젠고리의 수소 signal { δ 7.74 (1H, d, $J=1.7$ Hz), δ 7.19 (1H, d, $J=7.6$ Hz), δ 7.15 (1H, dd, $J=7.6, 1.7$ Hz)} 이 관측되어 flavonoid 화합물임을 알 수 있었다. 또한 2개의 oxygenated-methine signal { δ 5.24 (1H, d, $J=7.4$ Hz), δ 4.68 (1H, m)}과 geminal coupling 하는 methylene signal { δ 3.56 (1H, dd, $J=16.0, 8.4$ Hz), δ 3.42 (1H, dd, $J=16.0, 5.4$ Hz)} 이 관측되어 catechin류의 화합물로 판명되었다. 비선광도 값 {[α] $_{\text{D}}^{25}$ }과 NMR data를 문헌²⁾과 비교하여 화합물 1을 (+)-catechin으로 동정하였다.

n-BuOH 추출물로부터 동일한 과정으로 분획을 제조하고 활성 물질을 추적하였다(Table 4). 첫단계 silica gel column chromatography에서 얻어진 6개의 분획(PLRB-1~PLRB-6) 중에서, 마지막분획(PLRB-6)에서 EDA값이 70.0%로 활성이 집중되었고, 2단계 분획에서 얻어진 4개의 분획(PLRB-6-1~PLRB-6-4) 중에서는 3번분획(PLRB-6-3, EDA=54.1%)에서 활성이 집중되었다. 한편, 활성이 확인된 PLR-B-6-3 분획의 경우 극성이 비교적 높기 때문에 silical gel column chromatography만으로는 분리가 용이하지 않아 아세틸화 하였다. 실온에서 pyridine용액중에 acetic anhydride를 이용하여 아세틸화 하였고, 얻어진 반응물질을 silical gel column chromatography하여 3개의 물질을 분리하였다. 각각에 대하여 NMR 등의 spectral data를 측정하였고, 일부를 취하여

Table 2. Electron donating ability of several fractions obtained through solvent fraction of *Paeonia lactiflora* MeOH extract (Unit : %)

Fraction	EDA (%)		
	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml
PLR-EtOAc	75.2	52.3	27.0
PLR-BuOH	60.0	40.0	12.3
PLR-H ₂ O	22.3	12.3	7.0

Table 3. Electron donating ability of several fractions obtained from EtOAc extract through silica gel column chromatography (Unit: %)

1st fractionation		2nd fractionation		3rd fractionation	
Fr. ^a	EDA (%)	Fr. ^a	EDA (%)	Fr. ^a	EDA (%)
PLR-E-1	0.0	PLR-E-6-1	4.1	PLR-E-6-9-1	9.4
PLR-E-2	0.0	PLR-E-6-2	4.7	PLR-E-6-9-2	1.7
PLR-E-3	0.0	PLR-E-6-3	2.9	PLR-E-6-9-3	1.7
PLR-E-4	0.0	PLR-E-6-4	5.8	PLR-E-6-9-4	64.7
PLR-E-5	1.7	PLR-E-6-5	52.3		
PLR-E-6	95.2	PLR-E-6-6	67.6		
PLR-E-7	38.8	PLR-E-6-7	59.4		
		PLR-E-6-8	40.0		
		PLR-E-6-9	71.7		
		PLR-E-6-10	42.3		

^aConcentration: 0.5 mg/ml

Table 4. Electron donating ability of several fractions obtained from *n*-BuOH extract through silica gel column chromatography (Unit: %)

1st fractionation		2nd fractionation		3rd fractionation	
Fr. ^a	EDA (%)	Fr. ^a	EDA (%)	Fr. ^a	EDA (%)
PLR-B-1	21.1	PLR-B-6-1	15.2	PLR-B-6-3-1	9.4
PLR-B-2	12.9	PLR-B-6-2	15.2	PLR-B-6-3-2	60.5
PLR-B-3	20.0	PLR-B-6-3	54.1	PLR-B-6-3-3	78.2
PLR-B-4	19.4	PLR-B-6-4	17.0		
PLR-B-5	17.0	PLR-B-6	70.0		

^aConcentration: 2 mg/ml.

KOH로 처리하여 탈아세틸화물을 얻었고, 활성을 측정하였다. 3개의 물질 중에서 2개의 물질 {PLRB-6-3-2(화합물 2), PLRB-6-3-3(화합물 3)}에서 활성이 확인되었다.

화합물 2a는 CHCl₃-EtOH로 재결정하였을 때 갈색 분말로 얻어졌으며, IR spectrum에서 carbonyl(1720 cm⁻¹)과 benzene 고리(1605 cm⁻¹)의 흡수 밴드가 관측되어 tannin 화합물로 추정되었다. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD)에서 galloyl 기에서 유래한 12개의 수소 signal이 δ7.76-7.43에서 관측되었는데, 이때 두 개의 수소 signal은 각각 다른 chemical shift (δ7.74와 δ7.43)에서 관측되어 4개의 galloyl기와 1개의 digalloyl기가 존재함을 알 수 있었다. 또한 δ5.62에서 β결합하고 있는 C1 conformation 당의 anomer 수소 signal(d, J=7.2 Hz)을 포함하여 δ5.38-4.08에서 당부 signal이 관측되었다. 따라서 화합물 2는 D-glucose에 hexagalloyl기를 갖는 tannin으로 판명되었으며, 문헌⁸⁹과 data를 비교하여 1,2,3,4-tetragalloyl-6-digalloyl-β-D-glucose로 구조를 동정하였다.

화합물 3a도 IR 및 ¹H-NMR data가 화합물 2a와 유사하였으며, 단지 ¹H-NMR spectrum에서 galloyl기 유래의 수소 signal이 10개만 관측된 점이 달랐기 때문에, pentagalloyl기를 갖는 tannin으로 추정하였다. 여러 가지 spectral data를 문헌⁸⁹과 비교하여 화합물 3의 화학구조를 1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-D-glucose로 동정하였다.

이번에 분리한 (+)-catechin과 2종의 gallotannin은 작약에서 이전에 분리, 보고된 물질이나, 작약의 항산화활성을 나타내는 본체로서는 이번에 처음 밝혀졌다. (+)-Catechin (1)의 경우 0.5 mg/ml 농도에서 EDA 값이 64.7%로 나타났고, gallotannin 화합물인 2와 3은 2.0 mg/ml 농도에서 60.5%와 78.2%로 나타나 매우 높은 활성을 보여 주었다. 이 화합물들의 항산화활성에 대하여 여러 가지 측정계를 이용하여 검토해 볼 필요가 있을 것으로 본다. 일반적으로 flavonoid나 tannin 화합물은 항산화활성을 나타내는 것으로 잘 알려져 있으며, 특히 화합물 2와 3은 작약에 0.1~0.6%가 함유되어 있는 주요 성분으로,¹⁰⁾ 작약에 3%가량 함유되어 있는 paeoniflorin¹¹⁾과 더불어 작약에 기능성을 부여하는 가장 중

요한 성분이라고 할 수 있다.

참고문헌

1. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-881.
2. Soka, T. (1985) Encyclopedia of Chinese Medicine, Vol. 3 2066-2070. Tokyo, Japan.
3. Kitagawa, I., Sankawa, O. M., Tomoda, M. and Nishioka, I. (1982) Pharmacognosy, 2nd Ed., 234-236. Tokyo, Japan.
4. Shin, M. K. (1986) Colour clinical herbalism. Namsandang. 150-201, Seoul, Korea.
5. Lim, D. K., Choi, U. and Shin, D. H. (1996) Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J. Food sci. Technol.* **28**(1), 83-89.
6. Blois, M. S. (1981) Antioxidative determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**, 1199-1205.
7. Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1983) 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanudin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **22**, 2575-2578.
8. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1983) Tannins and related compounds. Part 9. Isolation and characterization of polygalloylglucoses from turkish galls (*Quercus infectoria*). *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 961-965.
9. Tanaka, T., Orii, Y., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1993) Tannins and related compounds. CXXIII. Chromone, acetophenone and phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenyl esters from the leaves of *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1232-1237.
10. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1984) Quantitative determination of gallotannins in paeoniae radix. *Yakugaku Zasshi* **104**, 1244-1250.
11. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Horikoshi, T. and Honma, N. (1986) Chemical studies on paeoniae radix (Part 6) Monthly change in glucosides and gallotannin contents in paeoniae radix. *Shoyakugaku Zasshi* **40**, 423-426.

Isolation and Structure Determination of Antioxidants from the Root of *Paeonia lactiflora*

Myun-Ho Bang¹, Jung-Choon Song, Sang-Yang Lee, Nam-Kyu Park and Nam-In Baek^{1*}(*National Crop Experiment Station, RDA, Suwon; ¹Department of Life Science and Institute of Life Science & Resources, Kyunghee University, Suwon, Korea*)

Abstract : On the purpose of development of novel antioxidative compounds from natural sources, 38 plants expected to show antioxidant activity have been examined concerning DPPH radical scavenging activity. Among them, thirteen plants, including *Paeoniae radix*, the root of *Paeonia lactiflora*, exhibited the activity. In order to isolate active component, the root was extracted in 80% aqueous MeOH and solvent fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and water, successively. Silica gel column chromatographies of the EtOAc and *n*-BuOH fraction exhibiting antioxidant activity. were repeatedly carried out with monitoring by DPPH assay to afford three active compounds. On the basis of spectral data and the chemical characteristics, the structures of the compounds were determined as (+)-catechin, 1,2,3,4-tetragalloyl- β -D-glucose and 1,2,3,4,6-penta-galloyl- β -D-glucose.

Key words : antioxidant, DPPH radical scavenging activity, *Paeonia lactiflora*, (+)-catechin, gallotannin

*Corresponding author