

대황 (*Rheum undulatum* L.) 뿌리의 항산화 활성물질, Piceatannol

오성준 · 백남인 · 김해영*

경희대학교 생명공학원, 식물대사연구센터

(2001년 7월 11일 접수, 2001년 7월 26일 수리)

Key words: 대황, 항산화, Rhapontingenin, Piceatannol, DPPH radical 소거활성법, 지질과산화 억제활성

서 론

식품의 가공 및 저장 중에 지방질의 산화는 식품의 품질을 저하시키고 저장기간을 단축시킬 뿐만 아니라 최근 연구에 의하면 인체내에서 산화로 인해 생성된 활성산소 및 여러 종류의 과산화물이 질병을 일으키거나 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이와 같이 식품의 가공이나 저장 중의 산화를 방지하기 위하여 항산화제의 첨가방법이 널리 이용되어지고 있으나, 아직까지는 α -tocopherol 등 일부만 이용되고 있다.^{3,4)} 이에 저자 등은 300 여종의 천연식물의 methanol 추출물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였으며, 그 가운데 활성이 높고 한약재로 이용성이 높은 대황으로부터 항산화물질을 분리하고, 구조를 밝히고자 본 연구를 수행하였다.

대황 (*Rheum undulatum* L.)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 원줄기는 높이 1 m 정도로 자라며 굵은 황색 뿌리가 있다. 이 뿌리를 가을에 채취하여 건조시켜 약재로 사용한다. 일반적으로 토혈, 수종, 혈뇨를 치료하는데 사용되며 그 밖에 해열과 변비에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 대황의 주요성분으로는 수종의 glucoside화합물이 보고되었다.⁵⁾

재료 및 방법

시료, 시약 및 기기. 대황 뿌리를 2000년 경동시장내 국산 한약재 상설매장에서 구입하여, 건조 및 마쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 시약은 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

흡광도의 측정은 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)를 사용하였으며, 항산화 물질의 구조동정은 NMR(JEOL JNM-LA400)과 Mass spectrometer(JEOL JMS-AX505WA)를 사용하였다.

주요성분의 분리. 마쇄한 대황 뿌리 2 kg을 실온에서 2일간 80% methanol(MeOH) 수용액에 침지하여 진탕추출한 후 여과지로 여과하였다. 이 MeOH 추출물을 rotary vacuum

evaporator를 사용하여 농축한 후 동량의 H₂O와 ethyl acetate (EtOAc)를 가하여 분배 추출하였으며 H₂O층에 다시 *n*-butanol (BuOH)을 가하여 최종적으로 극성이 높은 H₂O 추출물로부터, BuOH 추출물, 극성이 낮은 EtOAc 추출물로 분획하였다. 각각의 분획물을 감압농축하여 항산화 활성을 측정하였으며, 이 중에서 활성이 높은 EtOAc 추출물을 선별하였다.

항산화활성물질 검색. EtOAc 추출물(20 g)을 silica gel column chromatography(Φ 6.5 cm \times 50 cm)를 하여 혼합용매 (*n*-Hexane-EtOAc = 10 : 1 \rightarrow 8 : 1 \rightarrow 6 : 1 \rightarrow 4 : 1)로 용출한 후 thin layer chromatography(TLC)로 분리하여 10개의 소분획물(R-E-1~10)을 얻었다. 이 분획물들의 항산화 활성을 검색하여 이 중에서 활성이 가장 높은 분획물을 선별한 다음 다시 silica gel column chromatography(Φ 3 cm \times 50 cm, CHCl₃ : MeOH = 8 : 1 \rightarrow 6 : 1)를 하여 5개의 소분획물(R-E-4-1~5)을 얻었으며 역시 항산화 활성을 검색하여 활성이 높은 두 개의 소분획물을 선별하였다. 이 가운데 한 소분획물은 TLC로 하나의 spot으로 확인되어 화합물 1로 하고, 다른 소분획물은 2개의 spot이 붙어 있어서 RP-18 column chromatography(Φ 3 cm \times 50 cm, H₂O : MeOH = 1 : 1)를 사용하여 3개의 소분획물을 얻었으며 이 중에서 활성이 강하게 나타난 화합물 2를 최종적으로 분리하였다.

화합물 1: brown powder, ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 6.90(1H, d, *J* = 2.0, H-2'), 6.84(1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.81(1H, d, *J* = 16.1 Hz, olefinic H) 6.78(1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 6.69(1H, d, *J* = 16.1 Hz, olefinic H), 6.35(2H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2,6), 6.06(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-4), 3.75(3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD), δ : 159.67 (C-3,5), 148.98(C-4'), 147.70(C-3'), 141.11(C-1), 132.21(C-1'), 129.35(C- β), 127.85(C- α), 120.03(C-6'), 113.56(C-2'), 112.69 (C-5'), 105.83 (C-2,6), 102.79(C-4), 56.39(OCH₃)

화합물 2: pale brown powder; EI/MS(*m/z*): 244(M⁺), 227, 197, 173, 169, 149, 122, 105, 77, 69, 57 ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD), δ : 6.96 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, olefinic H), 6.82 (1H, dd *J* = 1.9, 8.3 Hz, H-6'), 6.73(1H, d, *J* = 16.4 Hz, olefinic H), 6.72(1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.42(2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2,6), 6.15(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD), δ : 159.63 (C-3,5), 146.51(C-4'), 146.48(C-3'), 141.28(C-1), 131.05(C-1'), 129.68(C- β), 126.99(C- α), 120.18(C-6'), 116.41(C-2'), 113.81 (C-5'), 105.74 (C-2,6), 102.62(C-4)

DPPH를 이용한 전자공여능 측정. 용매분획 또는 column chromatography를 통해 얻어진 물질을 감압농축하고 vacuum oven에서 완전히 용매를 제거한 다음 450 μ g을 취하여 MeOH 1 ml에 용해시켰다. 이 용액 300 μ l을 시험관에 취하고 MeOH 수용액에 1.5 \times 10⁻⁴ M의 농도로 용해시킨 DPPH를 가하여 517 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 대조구는 각 시료용액 대신에 MeOH을 취하여 동일한 방법으로 실험하였으며 EDA (electron donating ability)는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소차이를 백분율로 나타내었다.

*연락처

Phone : 82-31-201-2660; Fax : 82-31-201-2157
E-mail: hykim@khu.ac.kr

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Ac-As}) \times 100 / \text{Ac}$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

지질과산화 억제활성 측정. 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.5 ml에 쥐의 간으로부터 추출한 5 mg/ml 단백질 농도의 microsome 0.5 ml, 5 mM FeSO₄ · 7H₂O 0.2 ml, 0.2 mM ascorbate 0.2 ml, 각 시료를 1.5 ppm의 농도로 하여 잘 혼합한 후 40°C shaking incubator에서 2시간 동안 과산화를 유도시켰다. 충분히 과산화를 유도시킨 후 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl을 1:1로 섞은 용액으로 과산화를 중지시킨 다음 4000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 1 ml를 취하였다. 이 상등액을 thiobarbituric acid(0.67%) 0.5 ml와 혼합하여 끓는 물에서 30분 동안 발색을 시켜 533 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 쥐 간의 microsome 분획은 Kamath⁶⁾의 방법에 준해서 조제하였으며 대조구는 시료를 첨가하지 않고 동일한 방법으로 측정하였다.

$$\text{지질과산화 억제활성}(\%) = (\text{Ac-As}) \times 100 / (\text{Ac-AB})$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

AB: 시료 및 FeSO₄ · 7H₂O를 첨가하지 않은 blank의 흡광도

결과 및 고찰

대황추출물 주요성분의 구조동정. 대황(2 kg)의 MeOH 추출물로부터 용매분획을 하여 얻은 EtOAc 추출물의 수율은 1.2%로 측정되었으며, 이 EtOAc 추출물로부터 분리한 화합물 1과 화합물 2의 수율은 각각 0.03%와 0.014%로 측정되었다.

화합물 1은 갈색분말상의 물질로 ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD)에서 모두 13개의 signal이 관측되었다. 저자장 영역에서는 oxygenated-olefine 4급탄소 signal(δ 159.82, 148.98, 147.70)이 3개, olefine 4급 탄소(δ 141.11, 132.21)가 2개, 그리고 7개의 olefine methine(δ 129.35, 127.85, 120.03, 113.56, 112.69, 105.83, 102.79)이 관측되었고 고자장 영역에서는 1개

의 methoxy(δ 56.39) signal이 관측되었다.

¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD)에서는 6.00 ppm에서 7.00 ppm 사이에서 9개의 olefine methine signal이 관측되었으며 3.75 ppm에서는 singlet methyl signal이 관측되었다. 이를 종합해 볼 때 이 화합물이 stilbene 화합물임을 알 수 있었고 문헌 값⁷⁾과 비교하여 rhapontingenin으로 결정하였다.

화합물 2는 옅은 갈색분말상의 물질로 화합물 1의 NMR data와 거의 유사하였다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD)의 경우 모두 12개의 signal이 관측되었으며 oxygenated-olefine 4급탄소(δ 159.63, 146.51, 146.48)가 3개, olefine 4급 탄소(δ 141.28, 131.05)가 2개, 그리고 7개의 olefine methine(δ 129.68, 126.98, 120.18, 116.41, 113.81, 105.74, 102.62) signal 이 관측되었다. 화합물 1에서 관측되었던 4'-탄소에 methoxy 대신에 hydroxy기가 있는 것으로 확인되었으며 EI/MS spectrum의 ion peak와 문헌값^{8,9)}을 비교하여 화합물 2는 piceatannol임을 동정하였다.

DPPH radical 소거활성법. 대황에서 분리한 항산화물질 rhapontingenin과 piceatannol을 상업적으로 널리 이용되어지고 있는 합성 항산화제인 BHA와 천연 항산화제인 α-tocopherol과 활성을 비교하여 본 바, Table 1에서와 같이 rhapontingenin의 경우 BHA보다는 항산화 활성이 다소 낮았고, α-tocopherol과는 유사하게 나타났다. 특히 piceatannol은 12 μg/ml의 농도로 DPPH에 첨가하였을 때 반응초기 30분 동안은 BHA보다도 활성이 높게 나타났다.

Microsome을 이용한 지질과산화 억제활성. 높은 Free radical 소거 활성을 보인 rhapontingenin과 piceatannol을 비교 소적 측정법인 Fe²⁺/ascorbate 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 쥐 간의 microsome은 Fe²⁺에 의하여 산화가 되어 과산화물인 malonaldehyde가 잘 생성되며 이 과산화물을 thiobarbituric acid와 반응시켜 흡광도를 측정하면 활성을 쉽게 알 수 있을 뿐 아니라 응용성에 있어서 다른 지질을 사용하는 것 보다 유리한 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ Microsome에 첨가한 각 시료는 1 ppm과 1.5 ppm의 농도로 첨가하였으며 양성 대조구로서 상용 항산화제인 BHA와 α-tocopherol을 사용하였다. Table 2에서와 같이 1 ppm에서는 BHA와 α-tocopherol의 경우 억제활성이 각각 73.6%와 55.2%로 나타났으며 역시 piceatannol은 72.6%의 억제활성을 보임으로서 BHA와 유사한 정도의 활성을 보였다. 하지만 rhapontingenin은 tocopherol보다는 높게 나타났지만 BHA보다는 억제활성이 떨어지는 것으로 확인되었다. 시료의 농도를 달리하여 1.5 ppm으로 높여서 측정을 해본 결과 전체적으로 억제활성이 높아졌으며 1 ppm의 농도로 측정했을 때와 같은 양상으로 BHA와 piceatannol이 가장

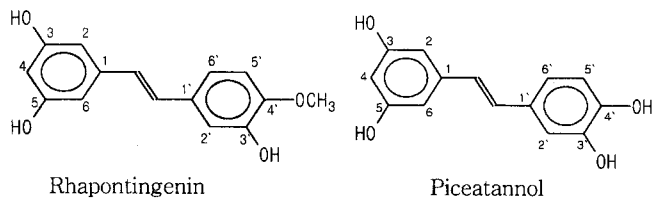


Fig. 1. The chemical structures of rhapontingenin and piceatannol isolated from the root of *Rheum undulatum* L.

Table 1. Electron donating ability of rhapontingenin and piceatannol isolated from the root of *Rheum undulatum* L.

sample	conc. (μg/ml)	Treatment time (hr)			
		0.5	1	2	3
BHA	12	79.6	86.6	95.2	96.1
α-Tocopherol	12	67.3	71.3	75.0	77.1
Rhapontingenin	12	63.0	67.1	69.2	72.5
Piceatannol	12	80.6	84.9	90.2	91.4

Table 2. Inhibition rate(%) of lipid peroxidation of rhapontingenin and piceatannol isolated from the root of *Rheum undulatum* L.

sample	Inhibition rate(%)	
	1 ppm	1.5 ppm
BHA	73.6	86.1
α -Tocopherol	55.2	57.1
Rhapontingenin	58.5	67.6
Piceatannol	72.6	80.2

높은 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

본 연구의 결과로 대항에서 free radical 소거작용 및 지질과산화 억제활성을 나타내는 항산화활성 물질은 rhapontingenin과 piceatannol인 것으로 규명되었으며, 이 물질들에 대한 식품적용 실험이 진행 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 BK21 사업(교육부) 및 한국과학재단 지정 식물대사연구센터에 의해 지원 받은 연구비로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- McCord, J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652-659.
- Packer, L. (1992) Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 271-276.
- Nishims, A. (1991) Antioxidant effects of tocopherols and L-ascorbic acid on ethyl eicosapentaenoate and methyl linolate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1665-1668.
- Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983) Antioxidative effect of the constituents of rosemary and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 521-524.
- Shah, C. S., Qadry, J. S. and Bhatt, J. G. (1972) Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivatives in Indian rhubarb. *Planta Med.* **22**, 103-108.
- Kamath, S. A. and Narayan, K. A. (1972) Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Anal. Biochem.* **48**, 53-61.
- Kashiwada Y., Nonaka, G and Nishioka, I. (1984) Studies on Rhubarb. VI. Isolation and characterization of Stilbenes. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3501-3517.
- Ko, S. K. (2000) A new stilbene diglycoside from *Rheum undulatum*. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 159-162.
- Nakajima, K., Taguchi, H., Endo, T. and Yosioka, I. (1978) The constituents of *Scirpus fluviatilis* (Torr.) A. Gray. I. The structures of two new hydroxystilbene dimers, scirpusin A and B. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3050-3057.
- Han, J. T., Oh, S. J., Kim H. Y., Park, Y. D. and Baek, N. I. (2000) Hyperin, Antioxidant compounds isolated from the branch of *Uncaria rhynchophylla* Miq. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 78-80.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (ed). (1989) Lipid peroxidation: a radical chain reaction, In *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. pp. 188-276.

Piceatannol, Antioxidant Compound Isolated from the Root of *Rheum undulatum* L.

Seong-Jun Oh, Nam-In Beak and Hae-Yeong Kim* (*Kyung Hee University, Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Suwon 449-701, Korea*)

Key words: *Rheum undulatum* L, antioxidation, DPPH radical scavenging activity, inhibition activity of lipid peroxidation, rhapontingenin, piceatannol

*Corresponding author