

*Rumex crispus*의 에칠아세테이트 추출물의 항산화 성분에 관한 연구

†신 춘 혜

안동과학대학 간호학과

(접수 : 2001. 11. 9., 게재승인 : 2001. 12. 21.)

Studies on the Antioxidative Character in the Ethyl Acetate Extractions of *Rumex crispus*.

Shin Choon-Hea†

Department of Nursing, Andong Science College

(Received : 2001. 11. 9., Accepted : 2001. 12. 21.)

This study was undertaken to investigate the antioxidative substance and activity of ethyl acetate extracted from *Rumex crispus*. Sample extracted follow in proper course of a solvent. Material refinement was carried out using silicagel column and Sephadex LH-20 column chromatography. Material sorting was carried by Gas Chromatography(GC/MS). 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl(DPPH) free radical scavenging and enzyme activity were measured for antioxidative activity. as result of testing by DPPH free radical scavenging activity, Antioxidative activity was shown as the highest in the root, then leaf and stem in order. Ethyl acetate extraction of root part were 50% inhibitory concentration (IC50) *Rumex crispus*(6.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Rumex nipponicus*(9.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Rumex acetosae*(31.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in leaf part. The highest antioxidative activity of sample refined through silicagel column chromatography of *Rumex crispus* was appeared Fraction 5(IC50;8.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in root and Fraction 6(IC50;85.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in leaf. Fraction 5 in root & Fraction 6 in leaf were refined using Sephadex LH-20 column chromatography. The highest antioxidative activity were appeared Fraction 4 (IC50;3.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Fraction 4 (IC50;18.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in leaf. As for main phenol compounds 2,6-Dichloro-4-nitrophenol and 2-Isopropyl-5-methyl phenol were identified in root and leaf, while 4-Vinyl-2-methoxy-phenol and 2,3-Dihydro-benzofuran were identified only in leaf. Enzyme activity was shown low both in peroxidase(POD) Non-activate(IU/mg protein) and in Superoxide dismutase(SOD) non-activate(IU/mg protein). 2,6-Dichloro-4-nitrophenol, 2-Isopropyl-5-methyl phenol, 4-Vinyl-2-methoxy-phenol were obtained in this experiment and these compounds are phenolic compounds which have OH group in the structure. With the result of this study these phenolic compounds which are extracted from *Rumex crispus* have high antioxidative effect. This antioxidative effect of *Rumex crispus* can be applied for chemo-preventive and antioxidative supplements which can be used for anti-allergy, anti-tumor, aging and other oxidative disease for health promotion.

Key Words : *Rumex crispus*, antioxidative activity, free radical

서 론

산소는 생명유지를 위한 여러 대사반응에 필수요소이고, 인체 내 독극물질 해독을 위해서도 필요하지만 산소가 인체에 유익한 것만은 아니어서 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 광화학반응 등 각종 공해물질, 물리 화학적, 환경적 요인 등에 의해 슈퍼옥사이드 라디칼(super oxide radical, O_2^-), 하

이드록시 라디칼(hydroxy radical, $\text{HO}\cdot$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)와 같은 반응성이 매우 큰 프리 라디칼로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성이 있다. 산소는 환원과정에서 세포성분과 세포의 기질에 손상을 주는 인자인 $\text{HO}\cdot$ 와 $^1\text{O}_2$ 를 계속 생성하여(Haber, 1984)(1) 생체막의 필수 구성분인 불포화지방산의 탄소사슬을 공격하여 미크로솜(microsome), 미토콘드리아(mitochondria), 리조솜(lysosome) 막을 손상시키고, 과산화물은 DNA와 RNA에 작용하여 생화학적 변화를 초래해서 질병과 노화 촉진 및 발암물질로 작용한다(Cavaliere, et al., 1988(2), Halliwell, et al., 1995³). $\text{HO}\cdot$ 가 세포손상에 관계되는 반응성 산소종(reactive oxygen species ; ROS) 중에

†Corresponding Author : Department of Nursing, Andong Science College, Korea.

Tel : +82-54-851-3546, Fax: +82-54-852-9901

E-mail : s3534@andong-c.ac.kr

가장 중요한 라디칼로 알려지며, 비록 다른 물질반응에 관련되어 있어도 보통 HO·에 영향을 받는 것으로 인식된다(Wink, et al., 1994)(4). 이들 반응성 산소 종(ROS)의 생산은 우리가 호흡하는 산소의 2~5% 정도가 프리 라디칼로 전환되며, 그 중에서도 O₂·, HO·은 우리 몸을 끊임없이 공격하는 대표적인 것으로 반응성이 아주 강하고 그 수명이 정상 산소가 체내 머무는 시간이 100초 이상인데 반해 이들은 1백만~10억분의 1초의 아주 짧은 기간 생성소멸된다(Freeman & Crapo, 1982)(5). 프리라디칼에 의해 불포화지방산의 이중결합의 파손은 脂質 過酸化와 그 분해산물이 더 먼 곳까지 연쇄과산화 반응을 나타낼 뿐 아니라(Ames, 1983)(6)), 단백질과도 반응하여 過酸化 蛋白質을 생성하여 카르보닐기를 크게 증가시키고(Smith, 1991)(7), 핵산과 반응하여 세포 내 분자들의 손상으로 여러가지 물리 화학적 정상변화로 효소활성의 감소, 아미노산의 소실, 펩타이드사슬의 절단(fragmentation), 중합체 형성, 카르보닐 유도체 생성, 전하의 변화, 친수성의 증가, 열 안정성의 감소, 단백질 분해 효소에 대한 민감성 등의 변화(Davies, et al., 1987)(8)로 저하된 세포기능은 조직의 병변을 초래하게 된다.

생체내에는 이들에 대한 방어기구인 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), peroxidase(POD) 등의 항산화효소가 있고, 우리가 일상적으로 먹는 음식물 중에도 항산화 작용이 있는 비타민 E와 C, 글루타치온, 유비키논 등 생체 보호기능이 있는 물질들이(Alscher and Hess, 1993)(9); Halliwell, 1985(10); Diplock, 1994)(11) 들어 있어 건강상태에서는 자체 제거가 가능하지만, 생체방어기에 이상이 초래되거나 각종 물리화학적 요인들에 의해 프리라디칼 생성이 생체 방어계의 용량을 초과하면 산화 자극이 증가되어 신체 내 많은 영향을 미치게 된다. 프리라디칼에 의한 손상에 생체가 가지고 있는 방어능력이 100% 완전하지 않아 일부 프리라디칼에 의해 유해작용을 받게 되는데, 이 유해작용은 경우에 따라서 수년 내지 일생을 통하여 만성적이 되고, 누적되어 세포나 조직의 기능을 저하시켜 곧 질병 및 노화의 원인이 되므로 항산화 성분을 보충하는 것이 생체막 및 체내 지방의 산화를 방지하여 세포기능 저하 및 노화를 억제할 수 있다(Cort, 1984)(12).

항산화제에 대한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich(13)가 슈퍼 옥사이드 라디칼을 소거하는 효소인 SOD를 발견하게 된 것을 계기로 생체내의 프리 라디칼의 발생, 生物 毒性 및 防禦 消去機構에 관하여 관심을 갖게 되면서 본격적으로 진행되어 최근에는 많은 천연자원들을 이용하는 생체내 반응에 대한 프리라디칼의 작용과 그의 消去作用에 관여하는 효소계의 연구 및 생체에 미치는 영향, 산화자극의 원인이 되는 프리라디칼 자체를 소거하는 항산화제(free radical scavengers), 과산화물 생성 抑制物質과 또는 프리 라디칼 및 프리 라디칼 생성반응 자체를 억제하는 豫防的 항산화물질(xanthine oxidase 저해제 등)들의 동정과 확인, 응용으로 확대되고 있으며, SOD와 같은 고분자 물질과 합성 항산화제에서 실용성이 크고 안전한 저분자 천연 항산화제로 초점이 맞추어지고 있다. 한방 및 민간요법에서 경험적으로 얻은 생약제들의 藥理 活性을 과학적으로 闡明하려는 연구와 일반 채소를 포함한 식용과 약용으로 쓰이는 야생자원들에 대한 활성 성분의 검

출과 함께 항종양물질(Attway,1994)(14), 항미생물질(Beek, 1985)(15) 및 생리 활성 물질에 대한 연구가 진행 중이다.

합성 항산화제로는 페놀계 항산화제인 BHA(Butylated Hydroxy Anisol), BHT(Butylated Hydroxy Toluene), TBHQ(Tertiary Butylhydroquinone) 등이 있으나 臭, 고온에서의 불안정성과 다량 투여시 기형 발생인자 및 발암물질이 된다는 보고가 있다(Branen, 1975)(16); Ito et al., 1983)(17). 천연 항산화제 중에는 지질과산화로부터 막 보호 작용이 있는 토코페롤(Yu, 1994)(18); Palamanda, et al., 1993)(19); Packer, et al., 1991)(20), 알파 토코페롤 재생기능과 알파 토코페롤의 세포막의 구성분인 다불포화지방산에서 프리라디칼 생성의 연쇄반응을 종결 혹은 세포막의 안정성과 강직성 기능을 부여하는 글루타치온(Cestagliola, et al., 1989)(21), 간의 미크로솜에서 연쇄반응 파괴작용이 알파 토코페롤을 증가하는 플라보노이드가 보고되었다(van Acker, et al., 2000)(22). Tocopherol 이 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄반응 저지능력이 낮고 가격이 비싼 단점이(Cort, 1984) 있고, 비타민 C, E와 베타 카로틴 등 항산화제는 인체 내에서 생산되지 않으므로 음식이나 약물을 통해 섭취해야 한다. 최근에 항신료나 약초의 추출물, 기타 식물성 항산화물질이 항돌연변이, 항암, 항균, 항노화 효과가 있다는 것이 보고되었으며(Tai, et al., 1995)(23); M.S. Kwon, et al., 1998)(24); Kanayama, et al., 1983)(25), 식물에서부터 분리한 천연 항산화제는 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 이용되고 있다(Kim, et al., 1995)(26). 부작용이 큰 합성 항산화제 대신 천연자원에서 쉽게 얻을 수 있고, 인체에 안전하고, 가격이 저렴하면서 많은 양을 얻을 수 있는 식물 탐색이 요구된다.

소리쟁이는 마디풀과(polygonaceae)에 속하며, 번식력과 생력이 강하며, 이른 봄 어린잎을 나물로 식용하며, 한방과 민간요법에서 대황의 대응으로 殺蟲, 설사, 해열, 瘀血, 健胃, 각기병, 부종, 황달, 변비, 통경, 산후통, 피부병 등의 치료약제로 이용되고 있으나 아직은 확실한 藥理作用에 대한 정확한 성분 분석된 것을 찾아 볼 수 없었으며, 이에 대한 논문으로는 한국산 소리쟁이(*Rumex coreanus* NAKAI; K. H. Lee (1995)(27), 일본산 소리쟁이(*Rumex japonicus* HOUTTA ; Aritomi, 1965)(28); Nishina, 1991)(29)와 Kenya의 소리쟁이 뿌리의 색소성분 분포에 관한 (Midwo, et al., 1985)(30) 것이 있었으나 추출방법과 사용된 용매에 차이가 있었다. 도로변이나 발딱 논둑에 무성한 잡초로서 활용성이 적어 버려지는 소리쟁이에 대한 연구는 풍부한 자원을 유용하게 활용하기 위한 일환으로서도 좋을 뿐 아니라, 민간요법이나 한방에서 과학적인 성분 분석없이 사용되고 있는 소리쟁이 추출물의 정확한 성분 분석을 통하여 안전하고 효과적인 치료제 개발과 항산화활성 물질을 탐색하여 새로운 천연 항산화제 개발을 통한 항암 예방제나 식품 보존 첨가제, 항산화 보조식품 개발을 위한 기초자료 마련에 도움이 되고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 소리쟁이(*Rumex crispus*), 수명(*Rumex*

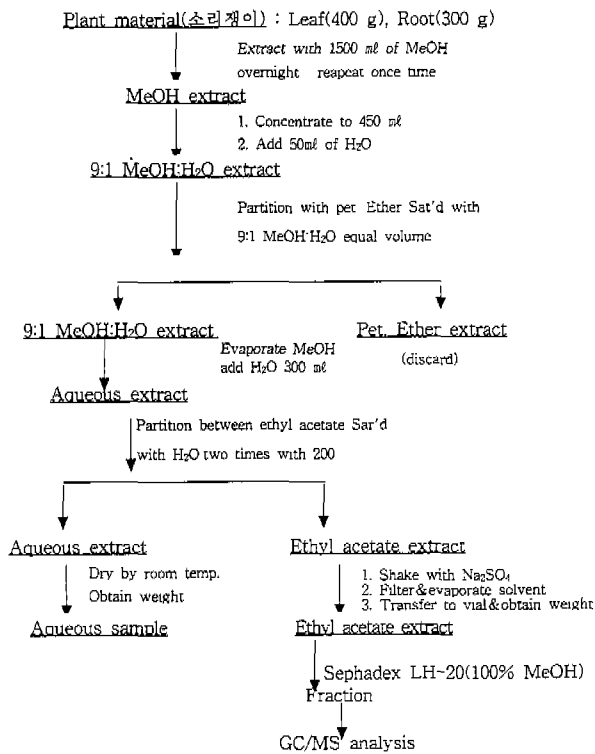


Figure 1. Flow chart for fractionation of *Rumex crispus*.

Table 1. Sample of ethylacetate extraction obtained from *Rumex crispus*.

Plant classification	Part	Sample Wt. (g)
<i>Rumex crispus</i>	Root	8.1993 / 300
	Leaf	6.4892 / 400
<i>Rumex acetosa</i>	Root	0.9378 / 300
	Leaf	0.2952 / 400
<i>Rumex Nipponicus</i>	Root	2.0046 / 300
	Leaf	7.5944 / 400

acetosae), 좁 소리쟁이(*Rumex nipponicus*)는 1999년 6월과 7월초와 11월에 안동시 용상동과 안동시 도산면 도로변에서 직접 채취하여 부분별(뿌리, 줄기, 잎, 꽃과 열매)로 잘라서 바람이 잘 통하는 그늘에서 1주일 이상 건조하여 마쇄기로 곱게 분쇄하여 사용하였다. 사용한 시약은 메칠 알코올, 에칠 알코올, 에칠 아세테이트, 페트로리움 이더(petroleum ether), 헬륨 가스, 황산 나트륨(Na₂SO₄) 등 일급 시약을 사용하였고, 배지는 Difco의 것을 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 1,1-Diphenyl-2-Picryl hydrazyl(DPPH)는 Sigma 것을 사용하였다.

시료의 추출 방법

각 시료 추출방법은 Lee (1999(31))의 방법에 따라서 Figure 1과 같이 분획 추출하였다. 음지에서 건조하여 곱게 분쇄 한 후 잎 부분은 400 g, 뿌리 부분은 300 g을 삼각 플라스크에 넣고, 메탄올(CH₃OH = 32.04 ; MeOH) 1500 mL를 첨가하여 24시간 이상 침지한 후 여과, 간압 농축하였다.

농축액을 다시 시료에 부은 다음 메탄올을 적당량 첨가하여 48시간 지난 후 분리액을 취하여 2차로 반복 추출하여

Wattman No. 2 filter로 여과한 이 메탄올 추출물을 분액 여두에 넣고 10 mL의 증류수를 첨가한 후 페트로리움 이더(ether) 100 mL를 가하여 추출하였다. 상층의 이더 층은 버리고 하층의 MeOH(메탄올) 수용액을 감압 농축한 후, 증류수에 녹여 EtOAc(에칠 아세테이트)를 용매로 분획 하였으며, Na₂SO₄ 탈수 후 감압 농축하였다. 소리쟁이로부터 추출된 량은 Table 1과 같으며, 시료는 냉동실에 보관하였고, 항산화 활성 효과를 위한 시료로 사용하였다.

항산화 활성 측정

1) DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging activity) 법에 의한 항산화 효과측정

DPPH측정은 hydrazyl에 불안정한 상태로 있는 질소원자가 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로서 자체의 정색성을 소실하는 성질을 이용한 Yoshida(32) 등의 방법으로 에칠 아세테이트 추출물 시료 4 mg을 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 mL(원액 시료 0.004 g /DMSO 1 mL)에 녹였다. 반응은 원액과 1/5, 1/25, 1/125, 1/625로 희석한 희석액 50 µL와 300 mM DPPH에 에탄올을 9~10배인 99.9% EtOH에 희석한 DPPH액 950 µL를 vortex로 균일하게 혼합한 다음 37°C 배양기에서 30분간 반응시킨 후 Spectrophotometer로 515 nm에서 소리쟁이 속의 항산화능을 전자 공여능(electron donating ability : EDA%)으로 자외선 흡광도(UV absorption)를 측정하였고, UV측정 시 대조구는 시료 대신 50 µL의 DMSO를 넣고 반응시켜 흡광도가 1.0 부근이 되도록 DPPH용액을 희석하여 조정하였다. 시료처리에 의한 억제율은 DMSO가 처리된 대조구와 비교하여 측정하였고, IC₅₀ 값은 50% DPPH 프리라디칼을 소거시키는 시료 농도로 계산하였다.

2) 효소활성 측정

식물체 내의 항산화 활성을 가지는 효소반응 측정을 위한 캘러스(callus) 배양은 치상을 70% 에탄올에 數秒, 차아염소산에 10분간 세척한 후 agar 배지에 pH 5.4인 것을 20개, pH 5.0인 것을 20개로 하여 MS 1D배지에서 배양하였고, 캘러스(callus)와 생체에 항산화효소 활성을 측정하였다.

3) Silica gel column chromatography에 의한 시료의 정제

에칠 아세테이트 추출물의 DPPH 측정 결과 항산화성이 우수하게 나타난 시료에 대한 항산화성분을 분리, 정제하기 위하여 용매 조건을 다음과 같이 하였다.

- Fr. 1 n-hexane : acetone = 10 : 1
- Fr. 2 n-hexane : acetone = 5 : 1
- Fr. 3 n-hexane : acetone = 3 : 1
- Fr. 4 n-hexane : acetone = 2 : 1
- Fr. 5 n-hexane : acetone = 1 : 1
- Fr. 6 MeOH

위와 같은 용매 조건하에 단계적 용출법으로 Silica gel column Chromatography를 행하여 잎과 뿌리부분에서 각각 6개씩의 분획을 분리, 동결 건조하여 각각의 무게를 측정한 후 냉장 보관하면서 항산화 활성 측정과 Gas Chromatography

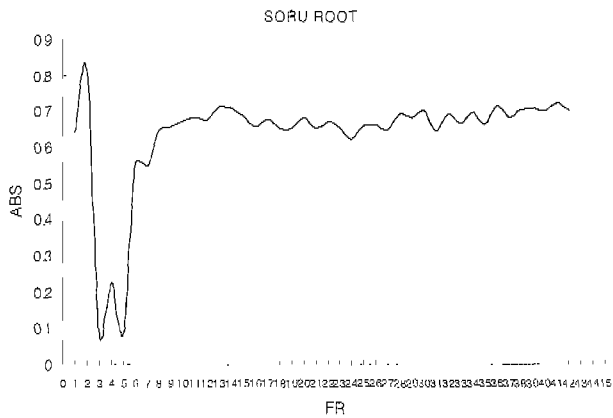


Figure 2 Antioxidative activity of root fraction in *Rumex crispus* after Sephadex LH-20 column chromatography.

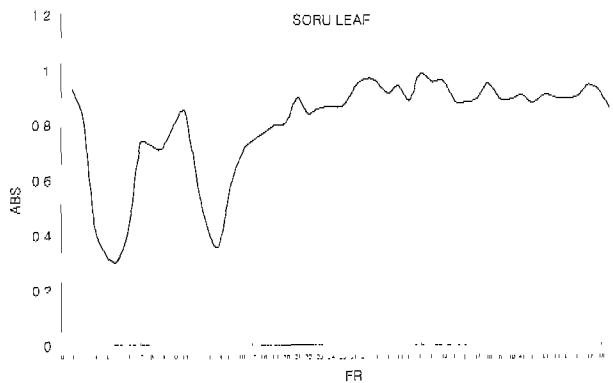


Figure 3. Antioxidative activity of Leaf fraction in *Rumex crispus* after Sephadex LH-20 column chromatography.

Table 2. Obtained sample wt. from Fr. 6 in root and Fr. 6 in leaf after Sephadex LH-20 column chromatography. (단위 : g)

Portinal	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6
Root (Fr. 5)	0.0030	0.0031	0.0661	0.0064	0.0196	0.2841
Leaf (Fr. 6)	0.0070	0.0109	0.2753	0.3994	0.0336	

(GC/MS) 분석용 시료로 사용하였다.

4) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 시료의 정제

정제된 항산화 성분을 분리하기 위해 Silica gel column Chromatography로 분획한 각 분획 중 DPPH측정에서 항산화성이 우수하게 나타난 소리쟁이 뿌리의 분획 5 (IC₅₀:8.7 µg/mL)와 잎 부분의 분획 6 (IC₅₀:85.9 µg/mL)에 대해 단일 물질분리를 위해 Sephadex LH-20(25 g)column Chromatography 방법으로 정제하였다. 전개 용매는 MeOH, 유속은 2.5 mL/min로 하였으며, 뿌리부분은 Figure 2에서 보는 바와 같이 총 42개의 분획을 분리하여, 자외선 가시상(UV visible spectra)에 나타난 흡광도 값이 유사한 분획 1과 2→ 분획 1, 분획 3→ 분획 2, 분획 4→ 분획 3, 분획 5→ 분획 4, 분획 5는 분획 6-42 → 분획 5, MeOH 분획→분획 6으로 하여 6개로 분획하였고, 잎 부분에서도 Figure 3과 같이 총 42개의 분획을 분

Table 3. Antioxidative activity of EtOAc extraction obtained from *Rumex*.

Plant	Portion	IC ₅₀ [µg/mL]
<i>Rumex crispus</i> L.	Leaf	68.8
	Root	6.1
<i>Rumex acetosae</i> L.	Leaf	31.5
	Root	25.3
<i>Rumex nipponicus</i> FR.	Leaf	59.1
	Root	9.8

리하여, UV 가시상에 나타난 흡광도 값이 유사한 분획 1, 2, 3 4, 5, 6→ 분획 1, 분획 7, 8, 9, 10, 11→ 분획 2, 분획 13, 14→ 분획 3, 분획 18~ 42→분획 4, MeOH 분획 > 분획 5로 5개로 분획하였다. 잎과 뿌리 모두 각 분획별로 동결 건조하여 얻은 시료부게는 Table 2와 같으며, 분획 각각에 대한 항산화능은 DPPH로 측정하였다.

5) GC/MS 분석에 의한 각 분획별 항산화 물질 동정

GC/MS모델은 Hewlett Pakard 6890/5973을 사용했으며, 분석 Oven 조건은 80℃에서 시작, 분당 3℃씩 250℃까지 승온하여 250℃에서 5분간 유지하였고, 운반체 ; He가스, 유속 ; 0.8 mL/min, column Ultra 2(crossed linked 5% PH ME Siloxane)을 사용하여 분석했다. 추출물에 기준물질의 peak 위치를 표준으로 하여 同定, 확인하고, 분리된 물질의 구조적 특성확인을 위해 얻어진 scanned peak를 각 유도체의 total ion chromatogram ; TIC으로 확인한 후 여러 파라미터를 적용해 각각의 질량상에서 얻은 결과로 분자량과 화합물의 특성을 확인했다.

결과 및 고찰

DPPH법에 의한 *Rumex crispus*의 항산화 효과측정

소리쟁이(*Rumex crispus*), 수영(*Rumex acetosae*)과 쯤소리쟁이(*Rumex nipponicus*)등 3종류의 *Rumex屬*으로 부터 항산화물 측정과 GC/MS의 재료로 사용하기 위해 추출한 에칠 아세테이트 추출물량은 Table 1과 같다. 에칠 아세테이트 추출물의 회수율이 동일한 시료량에서 4.66 g이라는 Lee (1995(27))의 회수율에 비해 본 실험에서 뿌리 ; 8.1993 g/300 g, 잎 ; 6.4892 g /400 g은 회수율이 훨씬 높았다. DPPH법에 의해 측정된 *Rumex* 속의 뿌리와 잎부분의 항산화력은 Table 3에 나타난 것과 같다. 3종류 모두 낮은 농도에서 50% 항산화 억제효과(IC₅₀ Value)를 나타냈으며, 특히 소리쟁이(*Rumex crispus*)와 쯤소리쟁이(*Rumex nipponicus*)의 뿌리부분의 IC₅₀ 값은 각각 6.1 µg/mL와 9.8 µg/mL로 유사하게 좋은 활성을 나타내어, 뿌리 부분에 항산화 물질이 높게 함유된 것으로 생각되며, 잎 부분에서는 *Rumex acetosae*가 31.5 µg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈다. *Rumex*속의 항산화 활성은 이미 천연 항산화제의 일종으로 알려져 있는 비타민 C(21.8 µg/mL), 합성 항산화제인 BHT (100 µg/mL), BHA(20.6 µg/mL)(Sang-Kook Lee, 1997(32))의 IC₅₀값 보다는 훨씬 높은 것을 알 수 있으며, Lee의(1995) 소리쟁이의 n-hexane추출물에 항산화 활성이 합성 항산화제인 BHA보다 높다는 보고와도 일치하는 결과 이다.

Table 4. Obtained antioxidation compounds from EtOAc extraction in *Rumex crispus*(leaf) through GC/MS.

Part	RT	area(%)	Compounds
Root	12.38	5.75	2,3-Dihydro-benzofuran
	16.31	6.39	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
	31.31	10.65	2-(4-Methoxyphenyl)-N,N,2-trimethyl-1-pyrrolamine
	39.88	6.25	Methyl hexadecanoate
	40.76	8.04	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone
	45.68	16.96	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester
	46.06	22.40	Phytol
Leaf	31.32	9.34	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
	40.76	10.90	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone
	41.46	69.67	4-Benzylidene-2-tert-butyl-3,3,5-trimethyl-1,2-diaza-3-sila-5-cyclopentene

Table 5. Obtained sample weight from in Root and in leaf of each fraction after silicagel column chromatography.

Portion	Part	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6
Leaf	Sample Wt.	0.5228	0.1205	0.3673	0.1704	0.1778	1.5606
Root	Sample Wt.	0.0828	0.1110	0.0713	0.0368	0.0918	2.0632

EtOAc 추출물의 DPPH 측정 결과, 항산화 활성이 높게 나타난 *Rumex crispus*의 物質分析과 동정을 위해 GC/MS로 분석한 결과 잎과 뿌리 부분에서 얻어진 화합물들이다(Table 4). 잎 부분의 EtOAc추출물에서 68종의 동정된 화합물 중 1% 이상 범위를 차지하는 화합물은 Table 4에 나타난 것과 같이 식물 성장 호르몬의 일종인 Phytol ; 22.40%, 9,12,15-Octadecatrienoic acid ; 16.96%의 순으로 많았고, 그 외는 거의 미량이 었다. 뿌리부분의 GC/MS결과는 37종의 확인된 화합물 중 1%이상의 범위에 속하는 화합물들은 Table 4와 같다. 4-Benzylidene-2-tert-butyl-3,3,5-trimethyl-1,2-diaza-3-sila-5-cyclopentene ; 69.67%, 2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone ; 10.90%의 순으로 많았으며, 그 외는 미량 화합물이었다. Gas Chromatography에 의해 분리된 각 Chromatogram에 나타난 성분은 표준 물질 머무름 시간(RT) 및 GC/MS분석 결과로 얻은 질량상 자료(mass spectra data)와 비교 확인하였으며, 뿌리와 잎 부분 모두에 함유된 2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone 화합물은 뿌리 부분에 함량이 더 많았으며, 잎에서 분리된 4-Vinyl-2-methoxy-phenol은 과일에 방향성 물질인 isothiocyanate와 유사한 식물에 함유된 방향성 물질의 일종으로 등굴레차 성분 중에도 함유되었다는 보고(Sung-hee Choi, 1999)(33)가 있다. 방향성 물질들은 화학적 발암 차단제(Wattenberg, 1981; Wattenberg et al., 1983)(34,35) 역할을 하며, 방향성 물질 중 솔잎에 함유되어 있는 테르펜류는 항균, 살충, 타감 작용(Allelopathy)(Bailey, 1982)(36), 복령에 함유된 triterpene성분은 항 구토, 항염증, 항피부암 등의 효과(Nukaya, et al., 1996)(37), epigallocatechin gallate ;EGCG, Fujiki, et al., 1986)(38)와 감잎에 kaempferol과 quercetin과 vitamin C (송 등, 1998)(39) 등 플라보노이드 성분과 자소자에 함유된 페놀성 물질(Yong-Jae Kim, et al., 1997)(40), 소목의 정유(Dae-Kwan Lim, et al., 1996)(41)) 성분 등이 항산화 효과가 있으며, 다른 물질의 작용을 상승시키는 효과도 있어, 이들 물질을 이용한 발암의 화학 豫防濟는 이들 물질들이 중요한 표적 부위에 있는 발암성 요인을 방해하는 역할을 한다(S. K Lee, 1997)(32). 이러한 발암 억제화합물인 차단제들을 탐색

하여 활용하는데 있어 화합물의 내량성과 다양성에 따라 천연 항산화제와 합성 항산화제 모두 이용되고 있으며, 이들 모두에 속하는 억제제로 페놀류, 인돌, 방향성 아이소티오 사이아네이트, 쿠마린, 플라본, 디티오레티온, 디티오카르바메이트, 페노티아진, 바르비츠크레이트, 트리스틸퀴논(tristhylquinones)등이 있다(Lesca, 1983; Mukhtar, et al., 1984; Rao, et al., 1984).(42-44) 이들 천연 항산화 활성을 갖는 화합물들은 이중 결합과 페놀구조, -SH기를 갖는 화합물, 알카로이드류, 유기산 등의 특성을 가지며, 식물성 성분인 플라보노이드는 폴리페놀 화합물로 야채류, 과일류, 종실류에 들어 있으며, flavan 핵 구조를 가진 저분자량의 폴리페놀화합물로 페놀이 3개의 A, B 및 C(또는 pyrane)환의 기본 구조로 되어 있는 디페닐프로판(diphenylpropane ; C₆C₃C₆)의 골격을 지니는(Harborne, et al., 1975 ; Herrmann, 1976)(45,46). 다양한 구조적 특성을 가지는데, 벤젠환의 탄소에 -OH기가 탄소의 2와 3의 위치에 2중 결합을 가지며, 탄소 4번 위치에 카르보닐기와 A환 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화작용을 가진다(Cody, 1988)(47).

Silicagel column chromatography에 의한 시료의 정제

위의 3종류의 *Rumex*속 중에서 추출물의 회수량이 가장 많고 항산화 활성이 우수한 *Rumex crispus*의 잎과 뿌리 부분의 추출액을 더 정제하기 위해 *Rumex crispus*의 잎(IC₅₀=68.8 µg/mL)과 뿌리부분(IC₅₀=6.1 µg/mL)을 Silica gel column Chromatography 방법으로 분리, 정제하여 각각 6개의 분획 중(Table 5) 잎의 분획 6(1.5606 g)과 분획 1(0.5228 g), 뿌리의 분획 6(2.0632 g)과 분획 2(0.1110 g)에서 회수율이 높았다. 정제된 각 분획을 DPPH법을 이용해서 항산화력을 측정된 결과 잎과 뿌리 모두 분획 1, 2, 3, 4에서는 비활성을 나타냈고, 잎 부분의 분획 5(IC₅₀:195.6 µg/mL)와 6(85.9 µg/mL)이 낮은 항산화력을 나타낸 반면 뿌리는 분획 5(IC₅₀ 8.7 µg/mL)와 6(9.1 µg/mL)이 높은 항산화력을 나타내었다(Table 6)

항산화력이 높은 물질과 비활성 물질들을 비교하기 위해 각 분획 별 GC/MS로 분석한 결과, 잎의 분획 1에서 분리된

Table 6. Antioxidative activity after Sephadex LH 20 column chromatography.

Sample	Fr.	1/625	1/125	1/25	1/5	Stock sol.	IC ₅₀ [μ g/mL]	
<i>Rumex crispus</i>	1	0.945	0.842	0.833	0.801	0.795	>200	
	2	0.949	0.911	0.905	0.901	0.793	>200	
	L	3	0.939	0.935	0.933	0.931	0.929	>200
		4	0.920	0.919	0.915	0.857	0.628	>200
	5	0.980	0.941	0.916	0.775	0.491	195.6	
Leaf	6	0.968	0.900	0.848	0.444	0.432	85.9	
Root	1	0.968	0.945	0.941	0.938	0.926	>200	
	2	0.939	0.937	0.906	0.906	0.860	>200	
	3	0.944	0.941	0.916	0.847	0.571	>200	
	4	0.937	0.934	0.931	0.928	0.808	>200	
	5	0.960	0.890	0.558	0.122	0.120	8.7	
	6	0.930	0.834	0.486	0.258	0.161	9.1	

화합물 13종은 거의 미량 함유되었고, 3,7,11, 15- Tetra methyl 2-hexadecen-1-ol이 62.67%, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester 화합물이 14.20%로 많았다(Table 7). 분획 2는 분리된 화합물 22종 중 페놀성 물질과 1% 이상의 범위를 차지하는 화합물은 12종이며(Table 7), 30.14%의 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester가 가장 높은 함량을 나타냈으며, 항산화 활성은 나타나지 않았는데 이는 성분 비율에서 주로 알칼류와 醜類 함량이 많기 때문인 것으로 생각된다. 분획 3은 33 종류의 분리 화합물 중 Table 7과 같이 1% 이상이 9종이며, 대부분 함량이 낮으나 그 중 Neophytadiene이 22.23%, 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol이 14.21%로 가장 함량이 많았고, Neophytadiene은 차의 향미 성분의 일종으로 알려져 있다(최, 1999). 분획 4는 39종류의 화합물 중 4-Vinyl-2-methoxy-phenol과 2,3-Dihydro-benzo furan이 전체 면적 중 1/4을 차지하였고(Table 7), 역시 차 향과 관련된 물질로 알려져 있으나 항산화활성은 없는 것으로 나타났는데, 이는 함유된 다른 화합물과의 성분 비율에 의한 상호작용이 영향을 미친 것으로 생각된다. 잎의 분획 5는 20종의 화합물 중 1% 이상 범위를 차지하는 화합물은 Table 7과 같이 5종이고, 2,3-dihydro-bezofuran이 35.34%, 4-Vinyl-2-methoxy-phenol이 17.98%로 항산화활성을 가지는 Furan계와 페놀계 화합물의 함량이 50% 이상 함유되었고, 활성이 있는 것으로 나타났다. 2,3-dihydro-bezofuran은 식물이 분비하는 항균성 방어 물질인 phytoalexin 효과를 가지는 물질이며(Kokubu, et al., 1995)(48), 분획 6은 63종의 화합물 중 1% 이상 함량을 갖는 화합물은 Table 7과 같이 18종이었다. 페놀계 화합물로 알려진 4-Vinyl-2-methoxy-phenol이 분획5 보다는 약간 적게 함유되었으나 활성은 더 높게 나타나 혼합된 다른 화합물과 상호 작용의 영향일 것으로 사료된다.

Silica gel column Chromatography법에 의해 정제된 뿌리 추출물의 분획 1, 2, 3, 4에 GC/MS 결과는 1% 이상의 범위를 차지하는 화합물은 Table 8에서 볼 수 있는 것과 같이 대부분의 화합물 중 많은 함량을 차지하는 화합물이 醜류이며, 항산화활성은 모두 나타나지 않았다. 정제된 뿌리 분획 5의 GC/MS결과는 1% 이상 함유된 화합물은 Table 18과 같이 6종으로 강한 항산화 활성을 나타냈고, 분획 6은 18종의 화합물 중 1% 이상 범위를 차지하는 화합물은 Table 8과 같이 3

종이 주 물질들이며, 2-Hydroxy-2- phenyl-1-acenaphthenone은 분획 5에서 16.43%, 분획 6에서는 31.16% 함유되었으며, 항산화활성이 있는 것으로 나타났다(Table 6).

Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 시료의 정제

정제된 물질의 동정을 위해 Sephadex LH-20 column Chromatography법을 이용하여 얻어진 잎의 5개 분획과 뿌리 성분의 DPPH 측정 결과 Table 12에 나타난 것과 같다. 잎의 분획 1, 3, 5와 뿌리의 분획 1에서는 항산화 활성이 없었다. 잎의 분획 2에서는 미량의 화합물이 30종 함유되었고, 1% 이상의 화합물은 Table 9에 나타난 것과 같이 4종의 화합물이며, Methane, -sulfinylbis-methane 81.80%로 주물질이고, 그 외는 미량 함유되었으나 항산화활성은 높게 나타났다. 잎의 분획 4에서는 61종의 동정된 화합물 중 Table 9에 나타난 것과 같이 10종이 1% 이상이며, 향미 성분으로 보고된 4-Vinyl-2-methoxy-phenol 화합물이 31.46%의 높은 비율로 함유되었고, 높은 항산화 활성을 보였다. Sephadex LH-20 Column Chromatography법으로 정제된 뿌리의 분획 1은 11종의 화합물이 동정되었는데, 그 중 5종(Table 10)만이 1% 이상이고, 그 외는 미량복합물이고, 비활성으로 나타났다. 분획 2에서는 37종의 동정된 화합물 중 Table 10에 나타난 것과 같이 페놀성 화합물인 4-vinyl-2-methoxy-phenol, 4-hydroxy-3-methylacetophenone과 2-nitro-4,6-dichlorophenol 등이 미량 함유되었으나, 항산화 활성은 높게 나타났다. 분획 3에서는 27종의 동정된 화합물 중 1% 이상의 범위를 차지하는 화합물은 8종으로 Table 10과 같고, 비교적 높은 활성을 나타내었다. 분획 4에서는 38종의 동정된 화합물 중 1% 이상의 범위를 차지하는 화합물은 11종으로 Table 10과 같다. 4-vinyl-2-methoxy-phenol이 31.46% 함유되었고 다른 물질은 소량이나 활성이 높게 나타났으며(Table 12), 분획 5에서는 16종의 동정된 화합물 중 1% 이상의 범위를 차지하는 화합물은 Table 10과 같이 7종이며, 5-Methoxy -2,8,8-trimethyl-4h, 8h-benzol [1,2-b:3.4-b'] dipyran-4- one이 35.75%로 함유되었으나 높은 활성은 나타나지 않았다. 분획 6에서 동정된 화합물은 8종이며, 그 중 1% 이상의 화합물은 4종이다(Table 10). 39.39% 범위를 나타낸 5-Methoxy-]2,8,8-trimethyl -4h, 8h-benzol[1,2-b:3. 4-b'] dipyran-

Table 7. Antioxidant compounds of each fraction in Leaf through GC/MS after Silicagel column chromatography

RT	area(%)	Compounds
36.85	2.86	Neophytadiene
39.87	5.12	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.17	3.64	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester
45.46	4.16	9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester
45.67	14.20	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester
46.08	62.67	3,7,11,15-Tetramethyl 2-Hexadecen-1-ol
20.86	0.45	4-Methoxymethylphenol
31.37	13.65	Benzenethiol, 4-methyl-
39.87	7.00	Hexadecanoic acid, methyl ester
40.76	0.95	3-Methoxy-11h-benzo[b]fluorene-11-one
41.18	7.02	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
45.67	30.14	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester
46.06	2.44	Phytol
34.35	7.90	(-)-Loliolide
36.86	22.23	Neophytadiene
37.73	4.35	4-1-Isopropyl-4-methyl-7-oxaspiro
38.36	6.60	1-Methyl-4-1-methyle-cyclohexane
41.18	6.65	2-Benzene dicarboxylic acid
45.67	4.35	Ethyl linoleolate
46.05	14.21	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
7.89	2.52	Aziridi-(E)-1-propenylaziridine
10.57	1.08	4,5-Dihydrooxazole-5-one, 4-chloro
12.36	24.53	2,3-Dihydro benzofuran
12.82	6.96	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl-ester
15.49	8.84	1H-Indole (1-benzazole)
23.93	1.53	1,1,1,3,5,7,9,9-Nonamethylpentas
39.87	3.23	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.17	16.55	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
45.67	5.81	9,12,15-Octadecatrienoic acid methyl-ester
46.05	1.78	Phytol
12.35	35.34	2,3-Dihydro-benzofuran
12.61	1.12	4-Vinylphenol
12.81	2.92	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester
16.29	17.98	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
41.18	4.02	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl-ester
5.02	4.24	Sulfide, sec-butyl isopropyl
7.43	11.48	Levophacetoperane
7.88	2.34	4-hydroxy dimethyl furanone
8.81	2.92	4-Piperidinone, 2,2,6,6-tetramethyl-
12.39	4.79	4-Vinylphenol
16.31	16.65	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
17.84	1.22	Phenol, 2,6-dimethoxy-
22.88	2.70	1,6-anhydro-beta-d-glucopyranose
39.87	2.72	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.19	2.46	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl phthalate
45.69	2.46	Methyl(Z)-5, 11, 14, 17, eicosatetrae

Table 8. Antioxidant compounds of each fraction in root through GC/MS after Silicagel column chromatography.

RT	area(%)	Compounds
39.89	9.83	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.19	26.48	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
45.48	34.04	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)
45.67	20.60	9-Octadecenoic acid, methyl ester

RT	area(%)	Compounds
12.82	4.27	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester
39.89	2.59	Methyl 10-ethyltetradecanoate
41.19	39.04	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
12.84	2.50	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester
39.88	8.31	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.20	34.43	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
45.48	28.18	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)
45.67	17.36	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl-ester
7.44	0.86	Levophacetoperane
12.82	0.99	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester
31.36	2.29	2-Trimethyl-2-(4-Methoxyphenyl)-n,n, 2-trimethyl-1-pyrrolamine
41.24	91.19	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl ester
41.47	2.13	1H-Cycloprop[α]gurjuncene
12.83	20.60	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester
16.35	1.22	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
31.35	18.20	2-Trimethyl-2-(4-methoxyphenyl)-n, n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
40.78	16.43	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone
41.19	4.15	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
41.46	23.62	4-Benzylidene-2-tert-butyl-3,3,5-trimethyl-1, 2-diazi-3-sila-5-cyclopentene
31.35	25.60	1,1',2'1''-Terphenyl
40.78	31.16	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthenone
41.45	32.41	5-Methoxy-2,8,8-trimethyl-4h,8h-benzo [1,2-b,3,4-b']dipyran-4-one

Table 9. Antioxidative compounds of each Fraction in leaf through GC/MS after Sephadex LH-20 column chromatography

RT	area(%)	Compounds
2.87	78.81	Dimethyl sulfoxide
36.85	6.50	D-Citronellol
38.39	1.59	2-Methyl-2-methyl-7-octadecyne
39.89	4.73	Methyl hezadecanoate
45.67	3.98	11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester
46.07	6.64	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*(E)]]-
49.11	19.24	Benzeneethanol, .alpha.-[2-(dimethylamino)-1-methylethyl]-
49.91	1.44	2-(Acetomethyl)-3-(methoxycarbon)
2.87	81.80	Methane, sulfinylbis-methane
6.62	1.77	3-Fluoro-2,5-dimethyl-2,4-hexadien
16.30	1.01	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
22.92	7.37	1,6-Anhydro-β-d-glucopyranose
5.03	4.34	Propionic acid, 2-mercapto-,1-methyl-
8.83	6.1	4-Piperidinone, 2,2,6,6-tetramethyl
16.33	2.49	2-Methoxy-5-vinylphenol
39.88	12.16	Hexadecanoic acid, methyl ester
41.18	2.85	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester
45.47	2.87	11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester
45.68	33.42	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester
46.06	1.60	Eicosane, 9-n-octyl-
RT	area(%)	Compounds
4.77	7.27	Tetrahydro-1,3-oxazine-2-thione
5.04	4.74	Urea n,n'-bis(2-hydroxyethyl)
7.89	3.36	3,4,5,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl
12.40	5.32	2,3-Dihydro-benzofuran
16.33	31.46	4-Vinyl-2-methoxy-phenol

16.80	1.13	4-(p-Chlorophenyl)-2,6-diphenylpyr
23.94	1.68	3',4'-diazadispiro[2.2.2.2]deca-6
39.88	1.52	2,4-Bis(Methylthio)-6-chloro-1,3,5-triazine
23.94	2.96	1,1,1,3,5,7,9,9,9-Nonamethylpentas
39.87	7.66	Hexadecanoic acid, methyl ester
45.45	1.99	1,4-Cyclohexanedimethanamine
45.67	3.91	Methyl-11,14,17-eicosatrienoic acid
46.80	7.60	Bistrimethyln-acetyl eicosasphinga-4,11-dicline
49.88	4.04	Bis-cyclopentadienyl chlorophenyl

Table 10. Antioxidative compounds of each Fraction in root through GC/MS after Sephadex LH-20 column chromatography

RT	area(%)	Compounds
2.87	78.81	Dimethyl, sulfoxide
20.37	3.44	1,3-Disilacyclobutane, 1,1,3,3-tetramethyl
40.77	5.96	3-Methoxy-11h-benzo[b]fluorene-11-one
41.45	1.49	5-Methoxy-2,8,8-trimethyl-4h,8h-benzo [1,2-b:3,4-b']dipyran-4-one
6.17	0.16	Phenol, 2,6-dichloro-4-nitro-
16.36	2.73	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
16.53	0.15	4-Hydroxy-3-methylacetophenone
17.63	0.16	2-Nitro-4,6-dichlorophenol
31.34	7.83	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
40.76	24.06	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthone
41.19	8.05	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester
41.45	12.38	5-Methoxy-2,8,8-trimethyl-4h,8h-benzo [1,2-b:3,4-b']dipyran-4-one
12.83	1.52	10-Bromo-7hydroxy-11-Iodolaurenc
16.36	2.88	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
30.69	1.74	1.3.5.7.9-Pentaethylbicyclo[5.3.1]hexane
31.33	8.25	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
39.88	2.04	Hexadecanoic acid, methyl ester
40.77	25.35	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthone
41.18	8.48	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl ester
12.81	2.79	2-Propenoic acid, 6-methylheptyl-ester (6-methylheptyl acrylate)
16.33	0.56	5-Methyl-2-(1-methylethyl)-phenol
31.33	8.43	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
39.88	1.48	1,3-Methyl-pentadecanoic acid
40.77	23.13	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthone
41.18	12.30	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl ester
41.45	18.16	4-Benzylidene-2-tert-butyl-3,3,5-trimethyl-1,2-diaza-3-sila-5-cyclopenten
46.83	1.31	Deca-6-3',4'-diazadispiro[2.2.2.2]

RT	area(%)	Compounds
16.32	1.96	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
17.86	0.45	2,6-Dimethoxy-phenol
23.00	3.95	1,6-Anhydro-beta-d-glucopyranose
31.34	19.93	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
40.77	30.81	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthone
41.45	35.75	5-Methoxy-2,8,8-trimethyl-4h,8h-benzol [1,2-b:3,4-b'] dipyran-4-one
7.45	0.68	1-Acetyl-2-pipecoline
31.33	26.48	2-(4-Methoxyphenyl)-n,n,2-trimethyl-1-pyrrolamine
40.77	28.79	2-Hydroxy-2-phenyl-1-acenaphthone
41.45	39.39	5-Methoxy-2,8,8-trimethyl-4h,8h-benzol [1,2-b:3,4-b']dipyran-4-one

Table 11. Obtained sample wt. from Fr. 6 in root and Fr. 6 in leaf after Sephadex LH-20 column chromatography. (단위 : g)

Portinal	Weight	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6
Root (Fr. 5)	Sample	0.0030	0.0031	0.0661	0.0064	0.0196	0.2841
Leaf (Fr. 6)	Sample	0.0070	0.0109	0.2753	0.3994	0.0336	

Table 12. Antioxidative activity after Sephadex LH 20 column chromatography.

Sample	Fr.	1/625	1/125	1/25	1/5	Stock sol.	IC ₅₀ [μ g/mL]
<i>Rumex crispus</i>	1	0.937	0.933	0.930	0.889	0.728	>200
	2	0.941	0.932	0.761	0.310	0.303	18.29
	3	0.965	0.956	0.911	0.877	0.512	>200
Leaf	4	0.925	0.920	0.763	0.348	0.328	18.41
	5	0.951	0.932	0.880	0.686	0.685	>200
Root	1	0.964	0.894	0.888	0.886	0.795	>200
	2	0.966	0.888	0.630	0.140	0.138	30.01
	3	0.914	0.813	0.499	0.135	0.129	38.07
	4	0.905	0.776	0.298	0.171	0.135	3.57
	5	0.963	0.892	0.794	0.575	0.177	166.63
	6	0.964	0.879	0.634	0.166	0.162	28.85

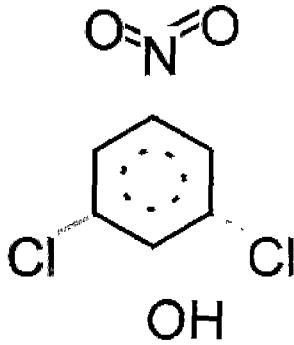
Table 13. A part of enzyme activity in *Rumex crispus*.

Part	Peroxidase activity		Superoxide dismutase activity	
	unit/g Fr wt	unit/mg protein	unit/g Fr wt	unit/mg protein
Callus	0.27	0.01	8.4	3.2
Leaf	0.14	0.02	31.4	3.1
Stem	0.12	0.44	19.5	24.4
Root	0.12	0.05	32.2	9.5

4-one은 분획 5와 유사 함량이나 항산화력이 더 높게 나타난것은(Table12) 혼합된 물질간의 결합상태나 혼합 비율에 의한 상호작용에 기인된 것으로 사료된다.

등정된 항산화물

GC/MS결과 얻어진 항산화물질 중 뿌리 추출물에서 2,6-Dichloro-4-nitrophenol, 2-Iso propyl-5-methyl phenol, 4-Vinyl-2-methoxy-phenol 등 페놀계 물질과 2,3-Dihydro-benzofuran과 같은 furan계 항산화 물질들이 등정되었고 그 특수 구조는 Figure 4, 5와 Figure 6에서 보여 준다. 페놀계 화합물은 발암 억제 물질로 알려져 있는데, 발암 해독체제를 증진시키는 차단 약제의 일반적인 2가지 범주는 단일 기능 유도제 A형(monofunctional inducers)에 페놀류와 페닐엔디아민류가 포함되고, 이중 기능 유도제 B형(bifunctional inducers)에는 글루타치온 S 트랜스퍼라제, UDP-글루크로실 트랜스퍼라제, NADPH-퀴논 리덕타제와 에폭시디하이드로라제들이 있다(Wattenberg, 1985)(49). 페놀류에 비타민 C, 알파 토크페롤,



1) Identification compounds in root.

Figure 4. Structure of 2,6-Dichloro-4-nitrophenol.

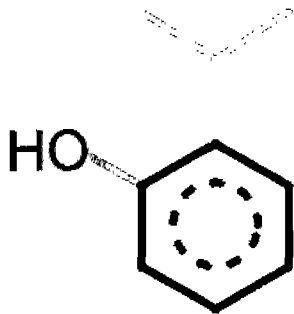
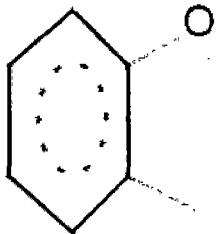
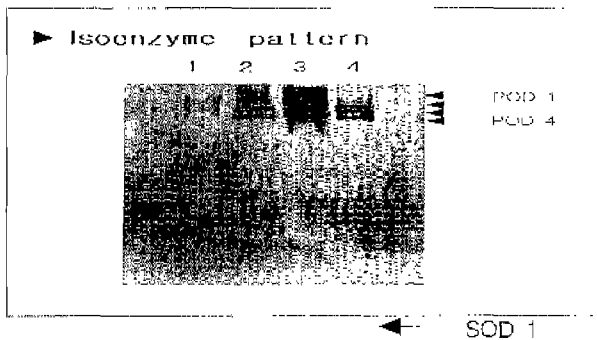


Figure 5. Structure of 2-Isopropyl-5-methylphenol.



2) Identification compounds in leaf.

Figure 6. Structure of 2,3-Dihydro-benzofuran.



1. callus 2. leaf 3. stem 4. root

Figure 7. POD isoenzyme pattern of callus and live-plant.

카복시산, 갈릭산 등은 아미드로 부터 질소성 발암형성을 예방하여 암이 발생되기 전에 발암성 물질 형성을 억제하는 화



1. callus 2. leaf 3. stem 4. root

Figure 8. SOD isoenzyme pattern of callus and live-plant.

학에 방제로 보고되었는데(Mirvish, 1981)(50), 2,6-Dichloro-4-nitrophenol과 2-isopropyl-5-methyl phenol을 GC/MS로 분석하여 얻은 질량 상은 두 물질 모두 m/z 207을 base peak로 가지고 있으며, 1개씩의 OH기를 가지고 있다. 잎 추출물에서 계속 분리, 농정되는 2,3-Dihydro-benzofuran은 Silica gel column Chromatography 후에 34.24%의 가장 많은 함량을 보였고, Sephadex LH 20-column Chromatography로 정제한 후에도 다소 양은 감소했으나 23.65%의 추출량을 보였다. 동일 식물속이라 할지라도 식물종류, 식물 채취 기간, 부위, 추출방법, 사용 용매의 차이에 따라 물질의 회수율, 성분, 성분별 작용에 차이가 있을 것이므로 앞으로 소리쟁이에 대한 더 많은 실험을 거쳐야 할 것으로 사료된다.

효소활성 측정

소리쟁이의 캘러스(callus)와 부위별 POD와 SOD활성을 전기영동법(electrophoresis)을 이용하여 측정한 결과 POD비활성(Unit/mg protein)은 줄기부분이 0.44 IU/mg protein, SOD비활성(Unit/mg protein)도 줄기가 24.4 IU/mg protein으로 뿌리와 잎보다 높았다. 소리쟁이의 캘러스와 생체 부위별 POD isoenzyme pattern을 분석한 결과 뿌리와 캘러스는 3개의 isoenzyme, 잎과 줄기부분은 2개의 isoenzyme이 존재하는 것으로 나타났다. 전기영동법 에서 적게 이동한 isoenzyme 순으로 POD1 에서 4로 명명하였고(Figure 7), 소리쟁이의 callus와 부위별 SOD isoenzyme 양상의 분석결과는 뿌리와 캘러스는 1개의 isoenzyme이 나타났으나 잎과 줄기는 양상이 나타나지 않았다. 전기영동법 에서 적게 이동한 isoenzyme순으로 SOD 1로 명명하였다(Figure 8). 항 산화 활성 검사에서는 줄기 부분이 활성이 가장 낮았으나, 효소활성 검사에서는 줄기 부분이 활성이 높은 것으로 나타났으며, 부위에 따라 항 산화 활성의 특성의 차이 즉, 비 효소성 물질의 함량이나, 용매 물질에 따른 것으로 생각해 볼 수 있다. 인체 내에서 SOD들은 슈퍼옥사이드 안이온을(O₂⁻) 수소원자와 반응시켜 과산화수소(H₂O₂)와 산소분자(O₂)를 만드는 작용을 통해 항산화 작용을 하는 물질로 체내 산화적 지표로 중요한 물질이다(Misura,H.P ct, al., 1972)(51). SOD의 항 산화 작용은 철이나 구리 아연 같은 금속 이온의 존재 하에 활성적이며, 어떤 금속 이온과 결합하는가에 따라 작용장소가 달라지며, 활성 산소 소거 인자로 중요한 효소이다.

요약

오래 전부터 성분에 대한 확실한 분석은 없었으나 식용과 약용으로 이용되어 온 소리쟁이(*Rumex crispus*)의 항산화 물질 및 활성에 대해 시험하였다. 항산화 활성 측정은 DPPH 법과 효소 활성 검사법을 이용하였고, *Rumex crispus*, *Rumex acetosae*와 *Rumex nipponicus*의 항산화력을 DPPH 법에 의해 측정된 결과 3종류 모두 항산화력이 뿌리 > 잎 > 줄기의 순으로 높게 나타났다. 뿌리 추출물에 항산화력은 50% 억제율이 *Rumex crispus* ; 6.1 µg/mL, *Rumex nipponicus* ; 9.8 µg/mL, *Rumex acetosae* ; 25.3 µg/mL의 순으로 활성이 높게 나타났다. 잎 추출물 대한 IC₅₀값이 *Rumex acetosae* ; 31.5 µg/mL, *Rumex nipponicus* ; 59.1 µg/mL, *Rumex crispus* ; 68.8 µg/mL의 순으로 항산화활성이 높게 나타났다. *Rumex crispus*에서 분리 동정된 주요 페놀성 항산화물질은 2,6-Dichloro-4-nitrophenol, 2-Isopropyl-5-methylphenol은 잎과 뿌리 추출물 모두에서 확인되었고, 4-Vinyl-2-methoxy-phenol과 2,3-Dihydro-benzofuran 2종은 잎 추출물에서만 동정되었다. 동정된 각 물질의 분자량은 2,6-Dichloro-4-nitrophenol ; 206.95, 2-Isopropyl-5-methylphenol ; 150.10, 4-Vinyl-2-methoxy-phenol ; 150.07, 2,3-Dihydro-benzofuran ; 120.06이 모두 120~206 범위 안에 속하는 低分子化合物였었다. *Rumex crispus*의 callus와 생체식물의 효소활성 측정 결과 POD 비활성(IU/mg protein)은 줄기가 0.44 IU/mg protein으로 높은 활성을 나타내었으나 callus와 잎 부분의 활성은 모두 낮았고, SOD비활성(IU/mg protein)은 줄기부분이 24.4 IU/mg protein으로 가장 높았다. POD isoenzyme pattern을 분석한 결과 뿌리와 callus에 3개의 isoenzyme, 잎과 줄기 부분에는 2개의 isoenzyme이 발견되었다. *Rumex* SOD isoenzyme pattern 분석결과는 뿌리와 Callus에서만 1개의 Isoenzyme 이 나타났다.

REFERENCES

- Haber, F. and Weiss, J. (1984). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by salt, Proc. Roy. Soc. Ser. A. 147, 332~351.
- Cavaliere, L., Rogan, G., Cremonesi, P. and Devanesan, D. (1988). Radical cations as precursors in metabolic formation of quinones from benzopyrene and 6-fluorobenzopyrene. Biochem. Pharmacol., 37: 2173.
- Halliwell B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O. A. (1995). free radicals and antioxidants in food and in vivo; what they do and how they work, Critical Rev. in food science and nutrition. 35(1&2): 7~20.
- Winkl and Hofer-Roob, B. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis ; the concept of an oxidant-antioxidant imbalance. Acta pediatr. Suppl. 395, 49~57.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab. Invest., 47, 421~426.
- Ames, B. N.(1983), Dietary carcinogens and anticarcinogens ; Oxygen radicals and degenerative, diseases, Science, 221, 1256-1264.
- Smith, C. D.,Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Markesbery, W. R., (1991), proc natl Acad Sci USA 88, 10540
- Davies, ct al., 1987
- Alscher, R. G. and Hess, J. L. (1993). Antioxidant in higher plants, CRC Press, Boca Raton, 1-17.
- Halliwell B., John, M. C.(1985). Free radicals in Biology and medicine, Clarendon press, Oxford, pp 279~313.
- Diplock, A. T. (1994). Antioxidants and disease prevention Mol.Aspects Med. 15, 293~376.
- Cort, W. M., (1984), Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. J. Am. Oil Chem. Soc., 51, 321.
- McCord, J. M., and Fridovich, L. (1969). Superoxide dismutase. J. Biol.Chem., 244, 6049~ 6055.
- Attaway, J. A. (1994). Citrus juice flavonoids with anticarcinogenic and antitumor properties. In : Food Phytochemicals for Cancer Prevention.1. Fruits and vegetables(Huang, M.T., Osawa, T., Ho, C.T. and Rosen, R. T., Eds), American Chemical Society, Washington, DC, American Chemical Society. Symposium Series No. 546, 240~248.
- Beek, T. A., Verpoorte, R., Svensen, A. B. (1985). Antimicrobially active alkaloids from *Taberna emontana chipii*. J. Natural Products, 48, 400.
- Branen, A. L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole anbutylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52, 59.
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso T. (1983). carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. J. Natl. cancer inst., 70, 343.
- Yu, K. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Biol. Rev., 74, 139-167
- Palamanda, J. R., Kehrer, J. P. (1993), Involvement of vitamin E and protein thiol in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathion, lipid, vol. 28, 427-431
- Packer, L. (1991). protective role of vitamin E in biological systems. Am. J. Clin. Nutr. 53, 1050S~1051S.
- Cestagliola, C., Rinaldi, E. (1989), Vitamin E and red blood cell glutathione,hand book of free radicals and antioxidants in biomedicine, 1,2, 145~152.
- van Acker, F. A., Schouten, O., Haene, G. R., vander Vijgh, W. J., Bast, A., (2000), Flavonoids can replace alpha tocopherol as an antioxidant ; FEBS Lett 12;473(2), 145-8.
- Tai, T., Akita, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K. and Watanabe, K. (1995). Antiemetic principles of *Poria cocos*, Plant Medica, 61, 527.
- Mi-Sun Kwon, Shin-Kyo Chung, Jong-Uck Choi, Kyung-Sik Song and Woo-Won Kang. (1998). Quality and Functional Characteristics of Cultivated Hoelen (*Poria cocos* Wolf) under the Picking Date, J.Kor.Soc.Food Sci.Nutr. 27(6), 1034~1040.
- Kanayama, H., Adachi, N and Togami, M. (1983). A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. Chem. Pharm. Bull., 31, 1115.
- Kim, H. K., Kim, Y. E., Do, J. R., Lee, Y. C. and Lee, B. Y. (1995). Antioxitative activity and Physiological activity of some Korean medicinal plants. Korean J. Food, Sci. Technol., 27: 80~85.
- Kyung-Ho Lee. (1995). Antioxidative effect and constituents from *Rumex coreanus* NAKAI and *Rhus Javanica* L. ; Dept. Food Sci. Technol. Kyungpook National University Taegu, Korea .
- Aritomi, M., Kiyota, I., Mazaki, T. (1965). Flavonoid

- constituents in leaves of *Rumex acetosa* Linnaeus and *R. japonicus* Houttuyn. Chem Pharm Bull(Tokyo). 13(12), 1470~1965.
29. Nishina, A., Kuboda, K., Kameoka, H., and Oswa, T. (1991). Antioxidizing component, musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 735.
 30. Midiwo, J. O., and Rukungu, J. M. (1985). Distribution of anthraquinone pigments in *Rumex* species of Kenya. Phytochemistry, 24, 1390.
 31. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989). Studies on inhibition mechanism of antioxidation by tannins and flavonoids. radical-scavenging effect of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm.Bull, 37(7), 1919~1921
 32. Sang-Kook Lee. (1997). Evaluation of cancer Chemopreventive Activity Mediated by Antioxidants and Modulators of Tumor Promotion, Submitted as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Pharmacognosy in the Graduate College of the University of Illinois at Chicago.
 33. Sung-Hee Choi. (1999). Flavor enhancement of Dongguleje (*Malva Verticillata*) Tea by addition of Okjook tea, J. Kor. Tea soc. 5(2), 67~75.
 34. Wattenberg, L. W. (1981). Inhibitors of chemical carcinogens. In : Cancer : Achievements, challenges and prospects for the 1980's eds.Grunt and Stratton, New York. J. H. Burchenal, pp.517~539.
 35. Wattenberg, L. W., and Lam, L. K. T. (1983). Phenolic antioxidants as protective agents in chemical anticarcinogens. In;Radioprotectors and anticarcinogens. eds. O. F. Nagaard and M. G. Siming, Academic press, Inc., pp.461~469. New York.
 36. Bailey, J. A., and J. W. Mansfield. (1982), Phytoalexins. Blackie and Son, London. pp 83~85, 94~95, 134, 162.
 37. Nukaya, H., Yamashiro, H., Fukazawa, H., Ishida, H., and Tsuji, K. (1996). Isolation of inhibitors of TPA-induced mouse ear edema from *Holelen*, *Poria cocos*. Chem. Pharm. Bull 44, 847
 38. Fujiki, H., Horiuchi, T., Yamashita, K., Hakii, H., Suganuma, H., Nishino, H., Washima, A., Hirata, Y., and Sugimura, T. (1986). Inhibition of Tumor promotion by flavonoids. Prog. Clin. Biol. Res., 213, 429~440
 39. Ji-Hyun Kim and Sang-Won Choi, (1998) Antioxidative Substances and Activities in the Leaves of Persimmon(*Diospyros kaki*). Cultivars, Dept. of Food Sci. and Nutr., Catholic University of Taegu-Hyosung, Hayang 712-702, Korea
 40. Yong-Jae Kim, Choog-Ki Kim and Yong-Ju Kwon. (1997). Isolation of Antioxidative Components of Perillae semen, Korean J. Food Sci. Technol. 29(1), 38~43.
 41. Dae-Kwan Lim, Ung Choi and Dong-Hwa Shin, (1996). Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. Korean J. food Sci. techno. 29(1), 72~82.
 42. Lesca, P. (1983). protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene induced neoplasia in mice carcinogenesis, 4, 1651~1653.
 43. Mukhtar, H., Tito, B. J. D., Marcelo, C. L., Das, M., and Bickers, D. R. (1984). Ellagic acid a potent naturally occurring inhibitor of benzo[a]pyrene metabolism and its subsequent glucuronidation, sulfation and covalent binding to DNA in cultured BALB/C mouse, keratinocyte ; Carcinogenesis, 5, 1565~1671.
 44. Rao, M. S., Lalwani, N. O., Watanabe, T. K., and Reddy, T. K. (1984). Inhibitory effect of antioxidants ethoxyquin and 2(3)-tert-butyl-4-hydroxy anisol on hepatic tumorigenesis in rats fed ciprofibrate, a peroxisome proliferator. cancer, Res., 44, 1072~1076.
 45. Harborne, J. B., Mabry, T. J., and Mabry, H. (1975). The Flavonoids. London ; Chapman and hall.
 46. Herrmann, K. (1976). Flavonoid and flavones in plants, A review. J. Food Technol, 11, 433.
 47. Cody, V. (1988). Crystal and molecular structure of flavonoids .In plant Flavonoids in Biology and medicine II. Biochemical, cellular, and medical properties, p.29 Alan R. Liss, New York, NY USA.
 48. Kokubu, T., Harborne, J. B., Eagles, J., and Waterman, P. G. (1985) Dibenzofuran phytoalexins from the sapwood of *Cotoneaster acutifolius* and five related species. Phytochemistry, 38, 57.
 49. Wattenberg, L. W., and Lam, L. K. T. (1985). Chemo prevention of cancer, Cancer Res., 45, 1-8.
 50. Mirvish, S. S. (1981). Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food, and biological system. In: Inhibition of Tumor Induction and Development (Zedeck, M. S. and Lipkin, M., Eds.) pp.101-126, New York, Plenum.
 51. Misura, H.P., Fridovich, I., (1972), The Role of Superoxide anion in the Autoxidation of epinephrine and a Sample assay for Superoxide dismutase. J. Biolog. Chem., 247(10), 3170-3175.