

쇠비름(*Portulaca oleracea*) 추출물의 DPPH radical 소거능과 *in vitro* 지질과산화 억제 효과와 그 활성성분

이 희 정, ¹이 범 중, ²이 동 석, ³서 영 완
한국해양대학교 해양과학기술연구소, ¹인제대학교 화학과, ²인제대학교 임상병리학과, ³한국해양대학교 해양과학부
(접수 : 2003. 2. 13., 게재승인 : 2003. 6. 19.)

DPPH Radical Scavenging Effect and *in vitro* Lipid Peroxidation Inhibition by *Portulaca oleracea*

Hee-Jung Lee, Burm-Jong Lee¹, Dong-Seok Lee² and Young-wan Seo^{3*}

Research Institute of Marine Science and Technology (RIMST), Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

¹Department of Chemistry, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

³Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

(Received : 2003. 2. 13., Accepted : 2003. 6. 19.)

The antioxidative activity of *Portulaca oleracea* was tested using *in vitro* experimental models. Antioxidative activities were determined by measuring DPPH radical scavenging activity and lipid peroxide using 2-thiobarbituric acid (TBA). The crude extract was sequentially partitioned with *n*-hexane, 15% aq. MeOH, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O. A remarkable antioxidative effect was observed in the EtOAc and *n*-BuOH fractions. The DPPH radical scavenging effect (IC₅₀= 17.90 µg/ml) of the *n*-BuOH soluble fraction was comparable with that of the natural antioxidant, α-tocopherol (IC₅₀= 6.99 µg/ml) and the inhibitory effect of lipid peroxidation in mouse liver homogenate was similar to that of the natural antioxidant, L-ascorbic acid at a concentration of 0.1 mg/ml to 5 mg/ml.

Key Words : *Portulaca oleracea*, inhibitory effect of lipid peroxidation, DPPH radical scavenging activity

서 론

쇠비름(*Portulaca oleracea* L. (family : Portulacaceae)은 1년생 식물로서 오행초(五行草), 장명채(長命采), 마치채(馬齒采) 등으로 불리기도 한다. 주로 길가, 텃밭 등에서 자생하며 줄기의 높이가 약 15~30 cm 내외로 털이 없으며 줄기의 직경은 2~3 mm이고, 갈색색이며 가지가 많이 갈라져서 땅위로 비스듬히 퍼지면서 자란다(1). 쇠비름은 양념 등으로 버무려서 먹기도 하고 약재로도 활용되어 왔으며 과거 선조들의 민간요법에서는 충독, 사독 등의 해독제로도 사용되었고(1), 또한 아라비아 반도에서는 방부제, 항피혈병제제, 진경제, 이뇨제, 구충제, 피부진정제로도 사용되었다(2). 그 외 근육이완 활성과 항암효과에 대한 연구도 보고되고 있다(2, 3). 이의 화학성분으로는 L-noradrenaline, dopamine, dopa와 칼륨, 여러 종류의 organic acid, glutamic acid, aspartic acid, alanine, 그리고 monoterpene 배당체인 portuloside A가 알려져 있다

(4-6). 또한 쇠비름의 잎이나 줄기 및 전초에서 어유에 풍부한 것으로 알려져 있는 γ-linolenic acid와 같은 ω-3 fatty acid의 함량이 높은 것으로 보고되었다(7, 8).

식용유지나 지방질 식품은 가공 및 저장 중에 여러 가지 원인에 의해 불쾌한 냄새나 맛을 내거나 또는 독성을 나타내기도 하는데 이런 유지의 변질은 주로 자동산화에 의해 일어나고 있다. 또한 생체 내에서 산화와 관련된 현상으로 인식되고 있는 노화의 원인 중에 하나로 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등을 포함한 활성산소의 역할이 대두되어 이들에 대한 관심이 현재 매우 높아지고 있다(9). 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성 산소종과 같은 free radical에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 free radical에 의한 과산화반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하여 발암과정에도 관여한다(10, 11).

따라서 과일과 채소에 많은 phenolic 화합물, flavone 유도체, 토코페롤, 아스코르브산, 셀레늄과 같은 항산화물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며 암, 심장혈관계 질환 등을 예방 지연시킴으로써 노화방지에도 중요한 역할을 한다

* Corresponding Author : Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea
Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-3538
E-mail: ywseo@hhu.ac.kr

(12, 13). 유지 또는 유지 함유 식품의 산패는 주로 공기 중의 산소와 결합에 의해 일어나는데 이를 방지하기 위해 많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나 그 효과와 경제성 때문에 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제로서 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole), PG (propylgallate) 등이 있다(14, 15). 그러나 합성 항산화제는 항산화력이 뛰어나 상업용 식품에 가장 많이 사용되고 있는데 이들은 식품에 사용시 안전성에 대한 우려로 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다. 토코페롤과 같은 천연물은 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다. 따라서 최근에는 각종 생약과 식용 식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 쇠비름의 조추출물과 이를 각종 용매로 추출한 분획물에 대해 DPPH radical 소거능과 mouse liver homogenate를 이용한 지질과산화 억제능에 대해 살펴봄으로써 쇠비름의 항산화 효과를 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 쇠비름은 거제도 대금리 인근의 농가지역에서 자생하는 것을 7월 ~ 8월 사이에 채집하였다.

쇠비름 추출물 및 각 분획물 제조

채집한 쇠비름은 37°C 건조기로 18시간 음건하였다. 추출에 적합하도록 세절한 후 추출관에 넣고 48시간 동안 CH₂Cl₂와 MeOH로 각각 추출하여 혼합하였다. 이 crude extract를 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 n-hexane fraction, 15% aq. MeOH fraction, EtOAc fraction, n-BuOH fraction,

H₂O fraction으로 분획하였다. 분리된 각각의 쇠비름 용매 분획을 회전 진공 농축기 (Eyela, N-N series)로 감압 농축시켜 용매를 제거하고 각각의 농축물을 얻었다(Fig. 1).

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)에 대한 radical scavenging effect 측정

DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹인 용액 1.2 ml에 다시 EtOH 3 ml과 DMSO 0.5 ml을 혼합한다(16). 그리고 각 농도별 시료(10 µg/ml~100 µg/ml) 50 µl와 제조한 DPPH 용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

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

Mouse liver homogenate의 조제

실험동물은 암수 구별 없이 체중 20~25 g의 ICR mouse로 온도 20±2°C, 습도 50±10%의 동물실에서 일주일간 고형시료(삼양유지(주))로 사육하였다. 이 실험동물을 ether로 마취 후 해부하여 간 문맥에 0.15M ice cold KCl 용액을 관류시켜 간 내 혈액 제거 후 적출하여 0.15M ice cold KCl 용액으로 세척한 후 신속히 간 무게의 10배량의 ice cold KCl를 가하여 간을 세절하고 약 5분간 ice bath 상에서 균질화하였다.

TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay

마우스 간 homogenate 0.3 ml에 8.1% SDS 0.3 ml과 증류수 0.1 ml 또는 시료 0.1 ml을 가하였다(17). 이것을 37°C에서 8시간 incubation하여 생성된 과산화지질을 20% acetic

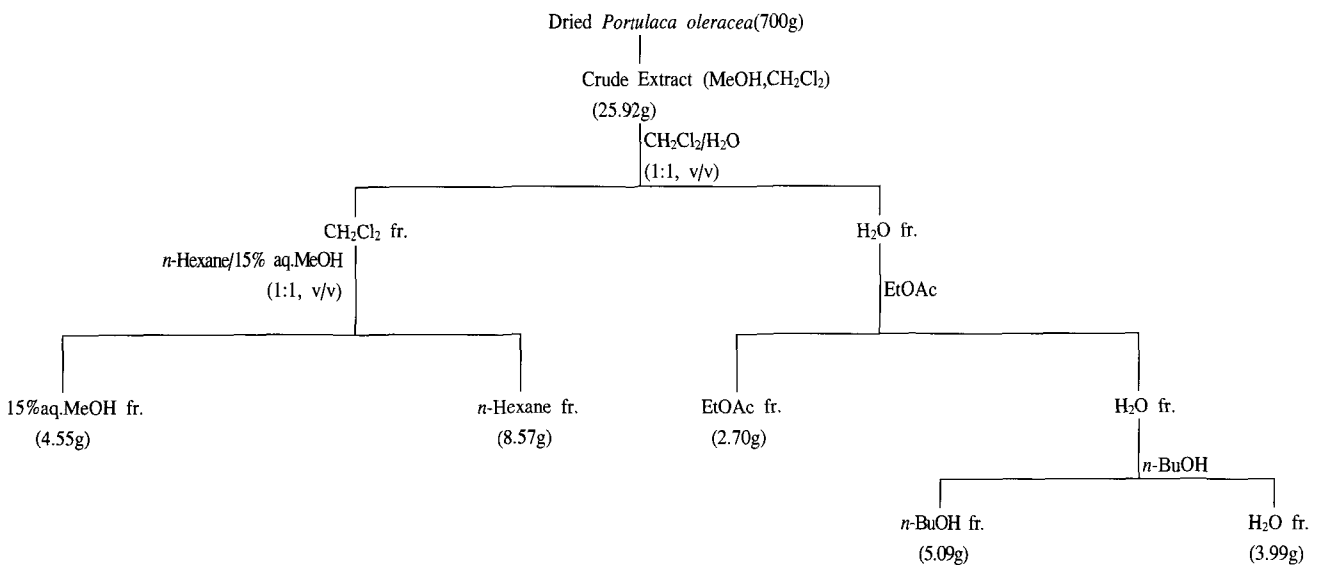


Figure 1. Extraction and fractionation of Portulaca oleracea.

acid 1.5 ml과 1.2% TBA 시약 1 ml을 첨가하였다. 반응 혼합액을 100°C에서 30분간 가열한 뒤 실온에서 냉각시켰다. 냉각 후 2000 rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 흡광도를 spectrophotometer (532 nm)로 측정하여 정량하였다. TBA 값은 532 nm에서의 흡광도가 0.1일 때를 1 unit으로 한 후, mouse 간 1 g에 대한 TBA 값을 환산하여 표시하였으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

쇠비름 추출물의 DPPH를 이용한 free radical scavenging 효과

쇠비름 조추출물 (crude extract)의 항산화능을 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA %)으로 측정하였고 각 분획물의 억제강도는 대조군에 비해 DPPH free radical을 50% 억제하는데 요구되는 농도 (IC₅₀)로써 비교하였다.

DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 없어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다.

쇠비름 조추출물 (crude extract)의 농도변화에 따른 전자공여능 (EDA(%))을 Fig. 2에 나타내었다.

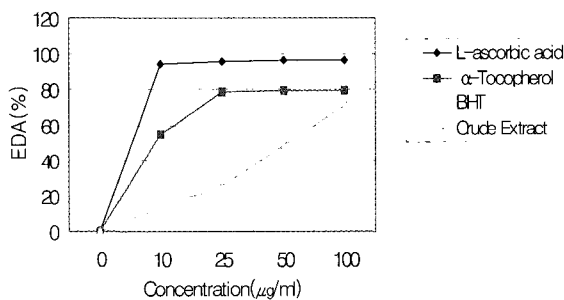


Figure 2. DPPH radical scavenging effect of the crude extract from *P. oleracea*.

농도별로 (10 μg/ml~100 μg/ml) free radical 소거 활성을 측정된 결과 10 μg/ml에서 13.43%의 소거율을 나타내었고 25 μg/ml과 50 μg/ml에서는 각각 25.91%, 48.47%, 그리고 100 μg/ml 농도에서는 71.45%의 소거율을 보여 농도 의존적인 효과가 있음을 알 수 있다.

천연항산화제로 널리 알려진 L-ascorbic acid와 α-tocopherol의 free radical 소거활성과 비교했을 때 쇠비름 조추출물의 free radical 소거활성은 비교적 약한 효과였다. 그러나 우수

한 합성항산화제로서 많이 사용되고 있는 BHT (butylated hydroxy toluene)에 소거능에 비해서는 비교적 뛰어난 활성을 나타내었다. 쇠비름 각 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The radical scavenging effect of various fractions from *P. oleracea* on DPPH

Fractions	IC ₅₀ (μg/ml) ^a
<i>n</i> -Hexane fr.	> 100.00
15% aq. MeOH fr.	170.16
EtOAc fr.	57.30
<i>n</i> -BuOH fr.	17.90
H ₂ O fr.	> 100.00
BHT	87.84
α-Tocopherol	6.99
L-ascorbic acid	1.25

^a Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

수층을 제외한 모든 층에서 농도 의존적으로 라디칼 소거 활성이 나타났으며 특히, *n*-BuOH 분획물에서의 효과가 다른 분획들보다 훨씬 높게 나타났다. 이들의 IC₅₀을 살펴보면 *n*-BuOH 분획물이 17.90 μg/ml으로써 가장 농도가 낮았으며 다음으로는 EtOAc 분획물이 57.3 μg/ml이었다. 이것은 L-ascorbic acid (1.25 μg/ml)나 α-tocopherol (6.99 μg/ml)의 free radical 소거효과와 거의 동등하였으며 BHT (87.84 μg/ml)보다는 월등히 뛰어난 것으로 나타났다. 그리고 15% aq. MeOH 분획물은 비교적 낮은 활성 (170.16 μg/ml)을 보였으며 *n*-hexane 분획물과 수층은 DPPH free radical 100 μg/ml 이상의 높은 농도에서도 소거능이 거의 없는 것으로 나타났다.

따라서 쇠비름 조추출물의 DPPH free radical 소거활성은 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 의한 것임을 알 수 있으며 그 활성성분들은 비교적 극성이 큰 화합물임을 추정할 수 있다.

쇠비름 추출물의 지질과산화 생성 억제 효과

정상적인 mouse의 liver homogenate를 사용하여 지질과산화에 대한 *in vitro*에서의 시료의 농도별 지질과산화 억제효과를 L-ascorbic acid를 표준물질로 비교 관찰하였다. 먼저 실험에 사용된 mouse liver homogenate의 반응시간에 따른 지질과산화반응을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

반응시간이 (2~8 hr) 경과함에 따라 mouse liver homogenate의 산화정도는 시간 의존적으로 증가하였으며 8시간 경과시 과산화지질의 양이 가장 많이 생성되었다. 따라서 이 mouse liver homogenate를 이용한 본 실험의 지질과산화 반응시간을 8시간으로 하여 실험을 행하였다.

쇠비름의 조추출물과 각 분획물들에 대한 mouse liver homogenate의 지질과산화 억제 효과를 표준 물질로서 사용된 L-ascorbic acid의 효과와 함께 Fig. 4에 나타내었다.

쇠비름의 조추출물과 각 분획물들은 반응 용액에 첨가된 시료의 농도 (0.1~5 mg/ml)에 따른 지질과산화 억제율이 농

도 의존적이었다. DPPH radical 억제 효과에서와 마찬가지로 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물의 지질과산화 저해 활성이 다른 분획물에 비해 명백히 뛰어난 것으로 나타났다. *n*-Hexane 분획물과 15% aq. MeOH 분획물의 효과는 아주 약한 활성을 나타내었으며 수층의 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다.

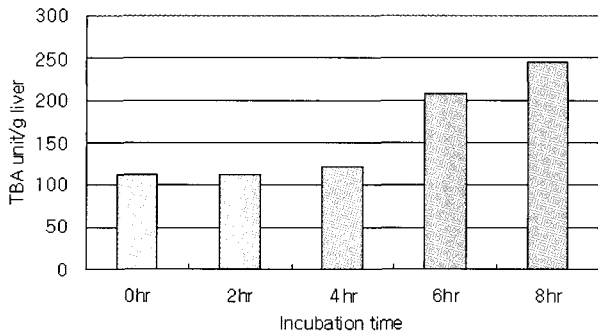


Figure 3. Autoxidation of lipid in mouse liver homogenate as a function of incubation time.

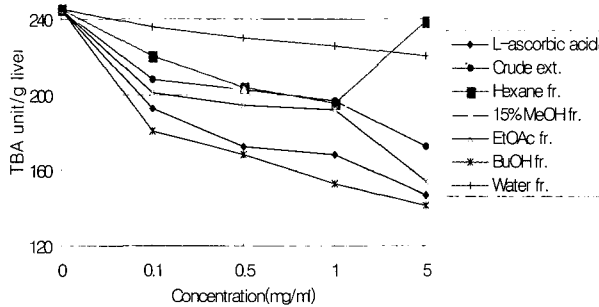


Figure 4. The antioxidative effect of the crude extract and several factors from *P. oleracea* on lipid peroxidation of liver homogenate.

한편, *n*-Hexane 분획물과 15% aq. MeOH 분획물의 경우 첨가된 시료의 농도가 5 mg/ml일 때의 TBA unit가 1 mg/ml를 첨가했을 때보다 훨씬 더 높게 나타났다. 이것은 5 mg/ml의 시료를 첨가했을 때 지질과산화 억제율이 낮아서라기보다는 쇠비름 분획물 즉, *n*-Hexane 분획물과 15% aq. MeOH 분획물의 시료자체의 색깔에 의해 UV 흡광도가 높아진 것으로 생각된다.

n-BuOH 분획물을 제외한 나머지 용매 분획물들과 쇠비름 조추출물의 지질과산화 저해활성은 천연 항산화제인 L-ascorbic acid의 활성과 비교했을 때 다소 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 *n*-BuOH 분획물의 경우 실험한 모든 농도에서 L-ascorbic acid의 효과와 거의 대등한 것으로 나타났다. *n*-BuOH 분획물 1 mg/ml를 첨가했을 때 37.66%, 5 mg/ml를 첨가했을 때 42.08% 지질과산화 억제율을 가지는 것에 반해, L-ascorbic acid는 1 mg/ml 첨가시 31.20%, 5 mg/ml 첨가시 39.97% 이었다.

이러한 결과로써 쇠비름의 항산화활성 성분은 아마도

EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 존재하며 쇠비름의 항산화효과는 강력한 라디칼 소거활성과 함께 지질과산화 억제 활성에 기인됨을 유추할 수 있다. 따라서 과산화지질의 생성은 병리현상이나 조직손상 정도를 나타내는 지표이기 때문에 쇠비름 추출물의 생리활성에 대한 더 많은 검토가 필요할 것으로 생각된다. 지금까지 보고된 쇠비름 추출물에 대한 생리활성으로는 간 해독, 이노, 항부종, 항염증효과와 담배의 니코틴 성분 제거효과가 있음이 알려져 있으나(18-20), 항산화 효과에 대한 보고는 이것이 처음이다.

요약

쇠비름 (*Portulaca oleracea*)의 항산화 효과를 탐색하기 위해 MeOH과 CH₂Cl₂를 이용해서 추출하여 crude extract를 조제하였다. 그리고 이 조추출물 (crude extract)에 대해 *n*-hexane, 15% aq. MeOH, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O로 순차적으로 용매분획하였다. 쇠비름의 조추출물과 각 분획물들에 대해 DPPH radical 소거능과 마우스 간 균질물 (homogenate)을 이용한 과산화지질 억제능을 측정하였다. 그 결과 쇠비름 조추출물이 DPPH 라디칼에 대한 강한 소거작용과 *in vitro* 과산화지질 억제효과가 있음이 확인되었다. 조추출물의 DPPH radical 소거효과에 대한 IC₅₀은 53.33 µg/ml로 천연 항산화제인 L-ascorbic acid (1.25 µg/ml)와 α-tocopherol (6.99 µg/ml)보다는 약하지만, 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHT (87.84 µg/ml)보다는 월등히 뛰어난 라디칼 소거능이 관찰되었다. 또한 각 분획물 중 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물의 DPPH 라디칼 소거효과가 가장 우수하였다. 마우스 간 균질물 (mouse liver homogenate)을 이용한 과산화지질 저해효과에 대해서도 쇠비름 조추출물의 농도의존적인 (0.1 mg/ml ~ 5 mg/ml) 상관성이 관찰되었으며, 특히 *n*-BuOH 분획물은 L-ascorbic acid의 효과와 거의 대등한 것을 나타냈다. 이것으로 쇠비름 조추출물이 항산화효과 (*in vitro*)가 있음이 증명되었으며, 이 항산화활성은 극성이 비교적 큰 화합물들에 의한 것임을 추정할 수 있다. 현재 쇠비름 추출물로부터 항산화 활성성분을 분리하기 위한 연구가 진행 중이다.

감사

이 논문은 2002년 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터를 통한 한국과학재단의 연구비(#R12-2001-006304-0)에 의해 수행되었으며 실험과정을 도운 김유아, 차효준에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee, T. B. (1999), *Illustrated Flora of Korea*, p324, Hyangmunsa.
- Habtemariam, S., A. L. Harvey, and P. G. Waterman (1993), The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions, *J. of Ethnopharmacology* 40, 195-200.
- Parry, O., J. A. Marks, and F. K. Okwuasaba (1993), The skeletal muscle relaxant action of *Portulaca oleracea* : role of potassium ions, *J. of Ethnopharmacology* 40, 187-194.

4. Peng, P. C., L. J. Haynes and K. E. Magnus (1961), High concentration of (-)-Noradrenaline in *Portulaca oleracea* L, *Nature* **191**, p1108.
5. Mohamed, A. I. and A. S. Hussein (1994), Chemical composition of purslane(*Portulaca oleracea*), *Plant Foods for Human Nutr.* **45**, 1-9.
6. Sakai, N., K. Inada, M. Okamoto, Y. Shizuri and Y. Fukuyama (1996), Portuloside A, A monoterpene glucoside, from *Portulaca oleracea*, *Phytochemistry* **42**, 1625-1628.
7. Omara-Alwala, T. R., T. Mebrahtu, D. E. Prior, and M. O. Ezekwe (1991), Omega-three fatty acids in Purslane(*Portulaca oleracea*) tissues, *JAOCs* **68**, 198-199.
8. Liu, L., P. Howe, Y. F. Zhou, Z. Q. Xu, and C. Hocart (2000), Fatty acids and β -carotene in Australian purslane(*Portulaca oleracea*) varieties, *J. Chromatogr.* **893**, 207-213.
9. Fridorich, L. (1978), The biology of oxygen radicals, *Science* **201**, 875-881.
10. Huang, M. T., T. Osawa, C. T. Ho, and R. T. Rosen (1994), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*, **50**, 57, 71-73. American Chemical Society, Washington.
11. Ho, C. T., T. Osawa, M. T. Huang, and R. T. Rosen (1994), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*, 20-31, **155**, 183-186, American Chemical Society, Washington.
12. Papadopoulos, G. and D. Boskou (1991), Antioxidant effect of natural phenols on olive oil, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **68**, 669-673.
13. Yang, P. F. and D. E. Pratt (1984), Antithiamin activity of polyphenolic antioxidants, *J. Food Sci.* **49**, 489-492.
14. Branen, A. L. (1975), Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **55**, 119-123.
15. Deman, J. M. (1990), *Lipids in Principles of Food Chemistry*, 2nd, Vol. **57**, pp507-512, Marcel Dekker, Inc., New York.
16. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
17. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yaki (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *J. Biol. Chem.* **95**, 351-358.
18. Bae, J. H. (1999), Effect of *Portulaca oleracea* extract on removing nicotine component of tobacco, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**(3), 607-612.
19. Lim, J. P. and E. S. Suh (2000), Hepatoprotective, diuretic and anti-inflammatory activities of the extract from *Portulaca oleracea* Linne, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **8**(3), 189-193.
20. Chan, K., M. W. Islam, M. Kamil, R. Radhakrishnan, M. N. M. Zakaria, M. Habibullah, and A. Attas (2000), The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. sativa(Haw.) Celak, *J. of Ethnopharmacology* **73**, 445-451.