

## 백작약 열수추출물의 산화적 스트레스 억제효과 및 유효성분 동정

정일윤 · 이주상 · 오 현 · 정우희 · 박혜란 · 조성기<sup>†</sup>

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술 개발팀

### Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Paeonia japonica* on Oxidative Stress and Identification of Its Active Components

Ill-Yun Jeong, Joo-Sang Lee, Heon Oh, Uhee Jung, Hae-Ran Park and Sung-Kee Jo<sup>†</sup>

Radiation Food Technology and Bioscience Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

#### Abstract

This study was carried out to investigate the antioxidative activity and to identify the active components of hot-water extract of *Paeonia japonica* (PJ), which was a main ingredient of a herb mixture preparation recently established as a potent candidate of radioprotector in our laboratory. The water extract was fractionated with  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc and *n*-BuOH. The extract and its fractions showed very low activity in hydroxyl radical scavenging test. In lipid peroxidation test, the extract, EtOAc and water fractions showed moderate inhibition with the ratio above 50%. In DPPH radical scavenging test, the extract, EtOAc and water fraction showed high activity with the ratio above 80%, especially. EtOAc fraction scavenged the radicals as much as synthetic antioxidant (BHA), even at low concentration. It is suggested that major partition for antioxidative activity of *Paeonia japonica* was EtOAc fraction. Subsequently, two active compounds (PJE021-1 and JE024-1) from EtOAc fraction were isolated by using MCI gel and silica gel column chromatography. The two compounds inhibited remarkably the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes, measured by single-cell gel electrophoresis (SCGE). PJE021-1 protected the cells to almost negative control level, dose-dependently. PJE024-1 exhibited a potent inhibition with the ratio of 71% at even low concentration (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Finally, their chemical structures were identified as gallic acid (PJE021-1) and (+)-catechin (PJE024-1), respectively, on the basis of the speculation of spectral and physical data.

**Key words:** *Paeonia japonica*, gallic acid, (+)-catechin, antioxidative activity, SCGE

#### 서 론

1960년대 후반 superoxide radical(SOR)의 제거 효소인 SOD(superoxide dismutase)가 발견됨에 따라 생체 내에 SOR 및 다른 ROS(reactive oxygen species, 반응성 산소물 또는 유해산소)의 존재 가능성이 시사되었다. 이 ROS들은 생체 내에서 에너지 공급을 위해 생화학적 반응이 지속적으로 일어나는 과정에서 발생하며, 항산화 효소계 등 자기 방어 기구의 제거 기작에 의해 소멸되어 평형이 유지되는 것으로 알려졌다. 그러나 어떤 특수한 상황(redox-cycling 약물대사, 각종 화합물과 만성적 산화적 스트레스)에서 급격하게 형성된 유해산소는 암, 심장계 질환, 뇌 질환 및 노화와 같은 각종 성인병 질환의 원인으로 지목되고 있다(1-6). 특히 방사선, 자외선 및 각종 화합물들에 의해 생성되는 유해 산소의 DNA 파괴에 따른 발암 작용은 유해 산소가 생체에 미치는 손상에 대한 유력한 증거로서 상기 내용을 뒷받침해 주었다(7,8).

최근 노화와 성인병에 대한 관심이 고조되면서 생체 내에서 과도하게 생성된 유해 산소를 소거시킴으로써 질병을 예방하고자 하는 연구들이 수행되어 왔다. 즉, 유해 산소를 안정화시킬 수 있는 효소계 [SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase] 및 생체내 중간산물의 유해 산소 소거작용 기작에 많은 연구가 수행되었다. 한편으로는 천연물(tocopherol, carotenoid, catechins, flavonoids) 및 합성물(BHT, BHA 등)로부터 항산화제를 개발하여 이용하려는 다양한 연구가 진행되었으며, 그 일환으로 생약재를 이용한 항산화제의 개발도 활발히 추진되고 있는 실정이다(9-12). 최근 Na 등(13)은 생약재 130여종에 대한 항산화 활성 검색 연구에서 가자, 단삼, 마황, 목단피, 복분자, 산초, 소목, 양강, 작약 등 14종의 생약추출물이 80% 이상의 강한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며 지질과산화 억제활성 실험에서는 가자, 단삼, 지골피, 초두구 등이 80% 이상의 강한 억제능을 가진다고 보고하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: skjo@kaeri.re.kr  
Phone: 82-42-868-8063, Fax: 82-42-868-8043

본 연구실에서는 산화적 스트레스에 대한 방어와 예방에 관련된 지속적인 연구의 일환으로 DNA의 산화적 손상에 대한 백작약 열수 추출물의 방어 효과를 보고한 바가 있다(14). 최근에는 방사선에 대한 재생 조직 및 면역 조절계의 방호와 회복 촉진을 위해 생약복합조성물(PHM-1)을 개발하였다. 본 연구에서는 구성 원료의 하나인 백작약(*Paeonia japonica*)의 열수 추출물 및 그의 용매별 분획에 대해 항산화 활성을 측정하여 가장 높은 활성을 보인 분획층으로부터 항산화 활성 주성분을 분리하고자 하였으며 이 생약조성물의 산화적 스트레스에 대한 방어 효과 입증과 그 주성분의 구조를 결정하고 라디칼 소거효과와 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 백작약(*Paeonia japonica*)은 2002년 6월 경 서울 경동 시장에서 구입한 전남 보성 품종으로 실온에 보관하면서 시료로 사용하였다. Ferric chloride, ammonium thiocyanate, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 2-deoxyribose, DPPH(α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl), linoleic acid, BHA(butyl-hydroxy anisole), Silica gel은 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였고 MCI gel은 Mitsubishi Co.의 제품을 사용하였으며, 기타 용매 및 시약류는 특급 제품을 사용하였다.

### 추출물의 조제 및 용매분획

건조 세절한 백작약(1.2 kg)에 10배 가량의 증류수를 가하여 3시간씩 2회 열수추출한 다음 여과 후 감압 농축하여 추출물(182.5 g)을 얻었다. 추출물을 물에 해리시킨 후 분액여두를 이용하여 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, water 순으로 순차 분액하여 얻은 분획물을 농축하여 -70°C에서 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

### 유효성분 분리 및 구조분석

각 용매 분획물 중 EtOAc 분획물로부터 유효 성분을 분리하였다(Fig. 1). 유효성분의 분리를 위해 칼럼 크로마토그래피는 충전제로서 MCI gel(역상, Mitsubishi사) 및 silica gel(순상, 230~400 mesh, Merk사)을 사용하여 분리하였다. 즉, 백작약의 EtOAc fraction을 Fig. 1과 같이 MCI gel column chromatography를 이용하여 MeOH-H<sub>2</sub>O 용매계로 methanol 농도를 20, 30, 50, 70%까지 step-wise 방법으로 용출분획하고 TLC로 각 분획물을 전개시켜 7개의 fraction을 얻었다. 각각의 fraction에 대한 항산화 실험에서 PJE021과 PJE-024이 높은 활성을 보여서 재차 silica gel column chromatography에서 CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-MeOH(9:1:1 또는 10:1:1) 용매계를 사용하여 각각 순수 단일 물질인 PJE021-1과 PJE-024-1을 얻었다. 두 화합물의 구조분석을 위해 <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR은 CDCl<sub>3</sub> 및 acetone-*d*<sub>6</sub> 용매내의 TMS를 내부 기

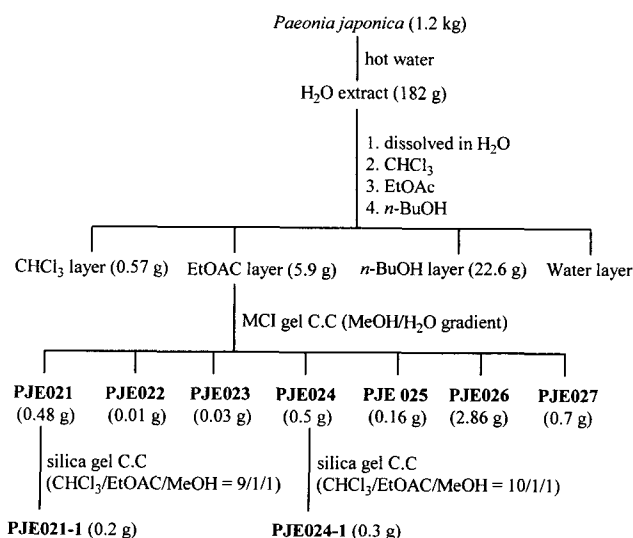


Fig.1. Bioassay-guided fractionation processes and isolation of antioxidative components from *Paeonia japonica*.

준물질로 하여 Bruker AW-500 spectrophotometer를 사용하였다. 질량 분석은 JEOLJMS-700 mass spectrometer를 이용하였고 고유광 회전도는 JASCO DIP-1000 polarimeter로 측정하였다.

### Hydroxyl 라디칼 소거 시험

Fenton 반응으로 생성된 hydroxyl 라디칼에 의한 2-deoxyribose의 산화 정도를 Gutteridge(15)의 방법에 따라 측정하였다. 시험관에 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose(0.2 mL)에 각각 250, 500 µg/mL 농도의 시료액 0.2 mL씩, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL을 가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1 mL을 가하여 반응을 종료 시켰다. 1% TBA(thiobarbituric acid)용액 1 mL를 가하여 95°C에서 10분간 중탕한 후 냉각한 다음 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 hydroxyl 라디칼 소거활성은 아래 식에 따라 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Abs}-\text{Abo}}{\text{Abc}-\text{Abo}}\right) \times 100$$

Abo(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 첨가): Absorbance of no treatment at 532 nm

Abc(용매 물만 첨가): Absorbance of control treatment at 532 nm

Abs(시료 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 첨가): Absorbance of sample treatment at 532 nm

### Ferric thiocyanate (TCA)법에 의한 지질과산화 시험

Nakatani와 Kikuzaki(16)의 방법에 따라 linoleic acid를 기질로 하여 과산화물 생성 정도를 측정하였다. 80% ethanol에 각각 10, 50 µg/mL 농도로 녹인 시료액 120 µL를 2.51%

linoleic acid 2.88 mL, 40 mM phosphate buffer(pH 7.0) 9 mL와 혼합한 후 37°C에서 24시간 반응시켰다. 반응액 100 µL를 75% ethanol 9.7 mL에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate 용액 100 µL와 20 mM FeCl<sub>2</sub>/3.5% HCl 혼합용액을 100 µL 가한 후, 3분 동안 진탕 시킨 다음 분광 광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 과산화물 생성 억제능은 아래 식에 따라 계산하였다.

Lipid peroxidation inhibitory activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Abs}}{\text{Abc}}\right) \times 100$$

Abc(에탄올 용매 + 기질): Absorbance of control treatment at 500 nm

Abs(시료 + 기질 + 에탄올): Absorbance of sample treatment at 500 nm

#### DPPH 라디칼 소거 시험

각종 화합물이 DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) radical에 전자를 공여(donating)함으로써 라디칼을 소거하는 효과를 측정하는 Blois(17)의 방법에 따라 시료의 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 시료 용액(0.2 mL)에  $4 \times 10^{-4}$  M DPPH/MeOH 1.8 mL을 가한 후 10초간 강하게 진탕한 다음 30분간 방치 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 전자공여능은 아래 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA} (\%) = \left(1 - \frac{\text{Abs}}{\text{Abc}}\right) \times 100$$

Abc: Absorbance of control treatment at 517 nm

Abs: Absorbance of sample treatment at 517 nm

#### Lymphocyte의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 시료 처리

정상인(남자)의 말초혈액을 채취하여 Ficoll-Histopaque gradient 방법으로 림프구(세포)를 분리하여 HBSS에 수세한 후 10% fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시켰다. 림프구 배양 시험관에 PJE021-1과 PJE04-1을 각각 최고 농도 50, 5 µg/mL로 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음, 산화적 스트레스를 부가하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 200 µM 농도로 첨가하여 30분간 배양시켰다. 림프구를 회수하여 수세한 다음 전기 영동을 시행하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

#### Single cell 전기영동

Singh 등(18)의 방법에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 혈액 림프구(세포)의 DNA 손상 정도를 측정하였다.

**슬라이드 제조**: Frosted slide에 0.6% agarose 수용액 130 µL를 처리한 후 cover glass로 덮고 4°C에서 10분간 방치하여 agarose를 굳힌 후 cover glass를 제거하였다. 세포를 0.5% low melting agarose 75 µL와 혼합하고 이를 slide에 점적

후 cover glass로 덮고 4°C에서 10분간 굳힌 다음, lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10)에서 4°C로 1시간 동안 용해시켰다.

**전기영동**: Electrophoretic buffer(300 mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfoxide, 10 mM Na<sub>4</sub>-EDTA, pH>12.3)를 이용하여 22V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 이후 Tris buffer(0.4 M, Tris, pH 7.4)로 10분씩 3회 세척하여 슬라이드를 중화시키고 DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 ethanol에 1시간 이상 침적하였다.

**염색 및 관찰**: 슬라이드를 건조시킨 후 60 µL의 ethidium bromide(20 µg/mL)로 염색하였다. 형광 현미경 하에서 이미징 분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic Imaging, Ltd., Great Britain)을 사용해 60개의 세포를 선택하여 분석하였다. DNA 손상 정도는 [tail moment = (tail mean - head mean) × tail %DNA/100]으로 정의되는 tail moment로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 열수추출물 및 용매 분획물의 항산화 효과

백작약의 열수추출물 및 각 용매 분획물의 항산화 효과를 알아보기 위해, 시험관 내에서 Fenton 반응으로 생성되는 hydroxyl 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다. 열수추출물은 250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 28% 및 47%의 hydroxyl 라디칼 소거 효과를 보였다(Table 1). 열수추출물 및 각 용매 분획물은 25, 50 µg/mL의 농도에서 전반적으로 낮은 활성을 보였으나, 그 중 EtOAc 분획물이 다소의 활성을 보이는 것으로 나타났다. 이는 각 분획물의 성분이 알칼리 조건에서 불안정하고 hydroxyl 라디칼과 친화성이 작기 때문인 것으로 생각된다.

시험관 내에서 linoleic acid의 과산화에 대한 백작약의 열수추출물 및 용매 분획물의 억제 효과 측정 결과를 Table 2에 나타냈다. 50 µg/mL 농도에서 열수추출물은 62%의 억제 활성을 보였으며, EtOAc 및 물 분획물은 linoleic acid 기질과의 친화력에 부응하여 hydroxyl 라디칼 소거 시험에서보다 높은 58% 및 65%의 과산화물 생성 억제 효과를 각각 나타냈다.

한편, 시험관 내의 DPPH 라디칼 소거 시험에서 열수추출물은 100 µg/mL 농도에서 89%의 소거 활성을 보였고 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 100 µg/mL 농도에서 각각 92% 및 83%의 높은 소거 활성을 나타냈다. 특히, EtOAc 분획물은 50 µg/mL의 농도에서 92%의 높은 활성을 보여 BHA(90%)와 거의 동등한 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다(Table 3).

이상의 결과로 보아 백작약 열수추출물이 나타내는 산화적 손상 억제 효과의 유효 성분은 EtOAc 분획물 내의 물질인 것으로 판단되었다.

### 유효 성분의 분리 및 구조동정

EtOAc 분획물(5.9 g)을 MCI gel column에 loading한 후

**Table 1. Hydroxyl radical scavenging activity of solvent fractions from *Paeonia japonica***

Solvent fractions (μg/mL)	Scavenging activity (%)
BHA (0.5, 50)	20, 78
Crude (250, 500)	28, 47
EtOAc (25, 50)	8, 12
<i>n</i> -BuOH (25, 50)	1, 6
Water (25, 50)	0.1, 7

**Table 2. Lipid peroxidation inhibitory activity of solvent fractions from *Paeonia japonica***

Solvent fractions (μg/mL)	Inhibitory activity (%)
BHA (10, 50)	73, 72
Crude (10, 50)	31, 62
EtOAc (10, 50)	34, 58
<i>n</i> -BuOH (10, 50)	15, 36
Water (10, 50)	10, 65

**Table 3. DPPH radical scavenging activity of solvent fractions from *Paeonia japonica***

Solvent fractions (μg/mL)	EDA <sup>1)</sup> (%)
BHA (50, 100)	90, 91
Crude (50, 100)	82, 89
EtOAc (50, 100)	92, 92
<i>n</i> -BuOH (50, 100)	69, 83
Water (50, 100)	22, 41

<sup>1)</sup>Electron donating ability (EDA) to DPPH radical.

TLC로 monitoring을 병행하면서 10~50% MeOH의 순으로 용출시켜 PJE021~PJE027의 분획물로 구분하였다. 이 분획물 중에서 PJE021과 PJE024의 분획이 가장 강한 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였으며(Table 5), silica gel 칼럼 크로마토

그래피에 의한 재 정제에 의해 PJE021-1과 PJE024-1의 단일물질로 각각 분리되었다.

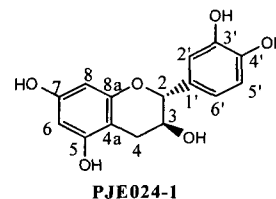
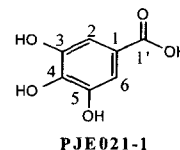
구조 분석은 분광학적 기기 및 참고문헌의 data와 비교하여 동정하였다(Table 4). PJE021-1의 <sup>1</sup>H NMR 분석에서 벤젠환의 2H로 보이는 단일 peak가 7.01 ppm에서 나타났으며 <sup>13</sup>C NMR에서는 170.39 ppm에서 carbonyl기의 특징적인 peak가 관찰되었다. 이 결과를 바탕으로 PJE021-1은 gallic acid로 동정되었으며 질량 및 녹는점은 문헌치(19-21)와 거의 일치하였다. PJE024-1의 <sup>1</sup>H NMR 분석 결과, 2.56과 2.93 ppm에서 C환(benzyl기)의 2H에 해당되는 peak가 나타났으며 4.0과 4.57 ppm에서 C환의 각각 1H에 해당하는 methine 기가 multiplet 및 doublet의 peak로 관찰되었다. 또한 D<sub>2</sub>O 처리에 의해 3.89 ppm에서 1개의 hydroxyl기와 7.85~8.19 ppm의 영역에서 4개의 hydroxyl기가 존재함을 확인하였다. <sup>13</sup>C NMR에서 C환에 해당되는 두 개의 methine 탄소는 68.29와 82.65 ppm에서 한 개의 methylene은 28.74 ppm에서 각각 확인되었고 A와 B환의 methine 및 quaternary 탄소가 각각의 화학적 이동값을 나타내었다. 이 결과는 전형적인 catechin 골격과 일치하였으며 광학 회전도 값에 의해 (+)-catechin으로 동정하였다. 부가적인 질량 및 녹는점은 문헌치(22,23)와 일치하였다.

#### 유효 성분의 DPPH 라디칼 소거 활성

단일 물질로 분리된 PJE021-1과 PJE024-1은 10 μg/mL의 농도에서 각각 91%와 65%의 강한 DPPH 소거 활성을 보였으며, PJE021과 PJE024 분획물의 소거능과 유사한 EDA 값을 나타내었다(Table 5). 따라서, 이 2종의 단일 물질을 유

**Table 4. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral (δvalue) and physical data of compounds PJE021-1 (CDCl<sub>3</sub>) and PJE024-1 (acetone-*d*<sub>6</sub>)**

Compds.	<sup>1</sup> H NMR <sup>1)</sup>	<sup>13</sup> C NMR <sup>2)</sup>	mp (°C)	[α] <sub>D</sub> <sup>3)</sup>	Mass
PJE 021-1	H-2, 6 7.01 (s, 2H)	C-1' 170.39 C-3, 5 146.37 C-4 139.58 C-1 121.95 C-2, 6 110.31	252 (dec.)		m/z=170(M+)
PJE 024-1	H-4β 2.56 (dd, <i>J</i> =16.0, 8.4 Hz, 1H) H-4α 2.93 (dd, <i>J</i> =16.0, 5.3 Hz, 1H) OH-3 3.86 (s) H-3 4.0 (m, 1H) H-2 4.57 (d, <i>J</i> =7.6 Hz, 1H) H-6 5.89 (d, <i>J</i> =1.7 Hz, 1H) H-8 6.03 (d, <i>J</i> =1.7 Hz, 1H) H-6' 6.78 (dd, <i>J</i> =8.0, 1.5 Hz, 1H) H-5' 6.90 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H) H-2' 7.05 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H) 7.85 (s, OH) 7.90 (s, OH) 8.0 (s, OH) 8.19 (s, OH)	C-4 28.74 C-3 68.29 C-2 82.65 C-8 95.41 C-6 96.08 C-4a 100.60 C-2' 115.19 C-5' 115.88 C-6' 120.02 C-1' 132.15 C-3' 145.58 C-4' 145.64 C-8a 156.87 C-5 157.15 C-7 157.67	173-174	+11°(c=0.1, MeOH)	m/z=290(M+)



<sup>1),2)</sup><sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 500.14 and 125.77 Hz, respectively.

<sup>3)</sup>[α]<sub>D</sub> value is given in units of 10<sup>-1</sup> deg cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

**Table 5. DPPH radical scavenging activity of the ethylacetate fractions and isolated components from *Paeonia japonica***

Ethylacetate fractions (µg/mL)	EDA <sup>1)</sup> (%)
BHA (1, 10)	6, 59
PJE021 (1, 10)	21, 95
PJE022 (1, 10)	4, 40
PJE023 (1, 10)	1, 26
PJE024 (1, 10)	8, 74
PJE025 (1, 10)	5, 59
PJE026 (1, 10)	3, 42
PJE027 (1, 10)	2, 37
Isolated components (µg/mL)	EDA (%)
PJE021-1 (1, 10)	23, 91
PJE024-1 (1, 10)	6, 65

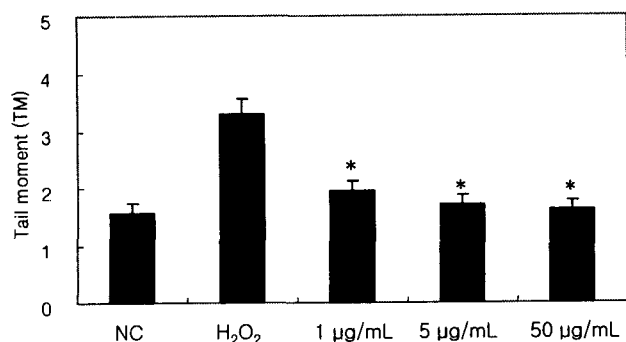
<sup>1)</sup>Electron donating ability (EDA) to DPPH radical.

효 성분으로 간주하였으며, 세포내에서 산화적 스트레스에 의한 DNA의 손상에 대한 경감 효과를 검토하였다.

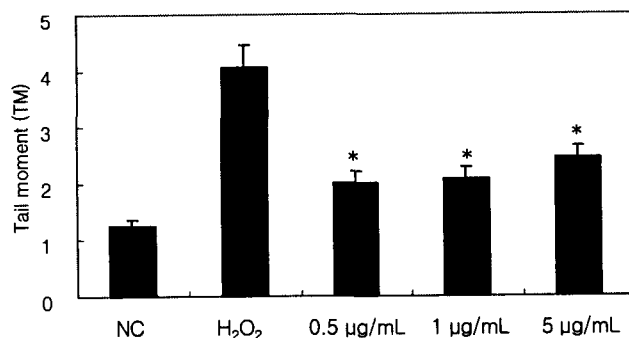
단세포 전기영동 분석법에서 DNA의 산화적 손상에 대한 유효 성분의 억제 효과

단세포 전기영동 분석법, 일명 Comet assay[alkaline single-cell gel electrophoresis(SCGE) assay]는 *in vivo*와 *in vitro*에서 화학적 및 생물학적 요인에 의한 DNA의 손상을 측정하는 방법이며, 특히 알칼리 조건 하에서 시행할 경우 세포의 DNA 단일 가닥 절단을 평가하는 유용한 방법의 하나이다. 이때 원형의 모양을 보이는 정상 세포와는 달리, DNA가 손상된 세포에서는 절단된 DNA 절편이 전기 영동상의 (+)극으로 이동함으로써 head와 tail의 형태를 띠는 혜성(comet) 모양으로 관찰된다.

사람 림프구에서 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 PJE021-1과 PJE024-1의 경감 효과를 측정하였다. PJE021-1은 모든 농도(1, 5, 50 µg/mL)에서 80% 이상의 DNA의 산화적 손상 경감 효과를 보였으며(p<0.001), 특히 50 µg/mL의 농도에서는 98%의 경감 효과를 나타냈다. 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 비처리군(TM: 1.58)와 거의 동등한 tail moment(TM: 1.62)값에 해당되었다(Fig. 2). PJE024-1은 0.5 µg/mL의 낮은 농도에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군(TM: 4.1)에 비해 약 73%



**Fig. 2. Inhibitory activity of PJE021-1 against DNA damage derived from hydrogen peroxide.** NC: Normal control. \*p<0.001 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Fig. 3. Inhibitory activity of PJE024-1 against DNA damage derived from hydrogen peroxide.**

NC: Normal control. \*p<0.001 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(TM 2.0)의 높은 DNA의 산화적 경감 효과(p<0.001)를 보였으며(Fig. 3), 두 화합물(PJE021-1, PJE024-1)의 농도 증가에 따른 효과의 증감은 통계학적으로 유의성(p>0.05)이 없었다.

### 요 약

백작약(*Paeonia japonica*)의 열수추출물로부터 산화적 스트레스에 대한 억제 효과를 나타내는 유효 성분을 규명하고자 하였다. 열수추출물은 용매의 극성도에 따라 4종의 분획물(CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, water)로 구분하였다. 항산화 활성 시험 중 hydroxyl 라디칼 소거 시험에서는 열수추출물 및 각 용매 분획물은 모두 아주 낮은 활성을 보였다. 지질 과산화 시험에서는 열수추출물과 EtOAc 및 물 층 분획물이 50%(50 µg/mL 농도에서) 이상의 억제 활성을 보였다. DPPH 라디칼 소거 시험에서는 열수추출물과 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 80% 이상의 높은 활성을 보였으며, 특히 EtOAc 분획물은 50과 100 µg/mL의 농도에서 BHA와 거의 동등한 전자 공여능(EDA값)을 나타내었다. 따라서, EtOAc 분획물에서 2종의 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일 물질인 PJE021-1과 PJE024-1은 10 µg/mL의 농도에서 BHA보다 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. PJE021-1은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA의 산화적 손상에 대해 최고 농도 50 µg/mL에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에 비해 93%의 경감 효과를 나타냈고, PJE024-1은 0.5 µg/mL의 낮은 농도에서 71%의 경감 효과를 나타냈다. 이상의 결과로부터 이 2종의 단일 물질이 산화적 스트레스 억제 유효 성분임을 확인하였다. 이 단일 물질은 분광학적 기기 분석과 물리적 특성을 분석한 결과 gallic acid(PJE021-1)와 (+)-catechin(PJE024-1)으로 동정되었다. 상기의 결과로부터 백작약은 산화적 스트레스에 대한 경감제로서의 가능성이 시사되었다.

### 감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Fridovich I. 1974. Superoxide radical and the bacterial action of phagocytes. *J Med* 290: 624-625.
2. McCord JM. 1974. Free radical and inflammation. Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531.
3. Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
4. Lynch RE, Fridovich I. 1978. Effect of superoxide on erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253: 1838-1845.
5. Freeman BA, Grapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
6. Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
7. Ames BN. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 221: 1256-1264.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J Biochem* 219: 1-14.
9. Kitahara K, Matsumoto Y, Ueda H, Ueoka R. 1992. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of irradiated methyl linolate. *Chem Pharm Bull* 40: 2208-2209.
10. Hanato T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* 49: 357-363.
11. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Bull Pharm Bull* 18: 162-166.
12. Cha BH, Lee SB, Rhim TJ, Lee KH. 2000. Constituents of antioxidative activity and free radical scavenging effect from Galla Rhois (*Rhus javanica* Linne). *Kor J Pharmacogn* 31: 185-189.
13. Na MK, An RB, Lee SM, Hong ND, Yoo JK, Lee CB, Kim JP, Bae KH. 2001. Screening of crude drugs for antioxidative activity. *Kor J Pharmacogn* 32: 108-115.
14. Oh H, Park HR, Jeong IY, Kim SH, Jo SK. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J Korean Association for Radiation Protection* 27: 181-188.
15. Gutteridge JM. 1984. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem J* 224: 761-767.
16. Nakatani N, Kikuzaki H. 1987. A new antioxidative glucoside isolated oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem* 51: 2727-2734.
17. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
18. Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of  $\gamma$ -ray. *J Radiat Biol* 66: 563-569.
19. Ahn JS, Kwon YS, Kim CM. 1999. Anti-inflammatory constituents of *Polygonum bistorta*. *Kor J Pharmacogn* 30: 345-349.
20. Kwon EJ, Kim YC, Kwon MS, Kim CS, Kang WW, Lee JB, Chung SK. 2001. Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidative compound from chestnut husk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 726-731.
21. Kim YI, Lee SH, Cho TS. 1996. Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. *Kor J Pharmacogn* 27: 238-245.
22. Yinrong Y, Yeap F. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 65: 1-8.
23. Kwon MN, Choi JS, Byun DS. 1993. Effect of flavonoid (+)-catechin as stabilizer in rat fed fresh and peroxidized fish oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 22: 381-391.

(2003년 4월 4일 접수; 2003년 7월 4일 채택)