한국산 겨우살이(*Viscum album* var. *coloratum*)로부터 분리한 homo-flavoyadorinin-B의 항산화 활성

최승영 · 정신교[1] · 김숙경[1] · 유영춘[2] · 이경복[2] · 김종배[3] · 김자영 · 송경식*

경북대학교 응용생물화학부, [1]식품공학과, [2]건양대학교 의과대학, [3]한동대학교 생명 식품공학부

(2003년 12월 29일 접수, 2004년 2월 25일 수리)

Key words: *Viscum album* var. *coloratum*, reactive oxygen species scavenger, antioxidant, homo-flavoyadorinin-B

서 론

겨우살이는 참나무, 팽나무, 오리나무 등에 기생하는 다년생 식물로 최근엔 그 추출물이 항암활성 및 면역증강 작용이 있는 것으로 알려져[1-3] 소위 mistletoe 요법이라는 이름으로 암환자들에게 투여되고 있다. 항암활성의 본체는 주로 당단백질인 lectin[4]이 가장 잘 알려져 있으며 그 작용 기작은 T-세포 활성화[5] 및 apoptosis[6] 등과 관련이 있는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 Ribereau-Gayon 등[7]과 Holtskog 등[8]은 겨우살이의 항암활성은 주로 lectin 분획에 존재하나 비단백질 분획에서도 많은 활성성분이 남아 있음을 보고하여, 겨우살이 중에는 lectin 이외에도 다수의 소수성 활성성분이 존재함을 시사하였다. 저분자 물질로는 viscotoxin,[9] flavonoid[10] 및 이의 배당체[11] 등이 알려져 있으나 한국산 겨우살이에 대한 저분자 화합물의 연구는 alkaloid에 관한 보고[12]가 있을 뿐이다. 또한 겨우살이의 항암활성은 매우 활발히 연구되고 있으나 겨우살이가 생산하는 저분자 항산화 활성물질에 대한 연구는 아직까지 없다.

한편 산소는 생명유지에 절대적으로 필요하지만 안정한 분자상태인 triplet oxygen($^3O_2$)이 각종 물리, 화학 및 환경적 요인 등에 의하여 hydroxyl radical(·OH), superoxide anion radical($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen($^1O_2$), 오존(O_3) 등과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되어 생체에 치명적인 산소독성을 일으킨다.[13,14] 현대인의 환경조건에서는 각종 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 체내에 축적 될 기회가 많고 효소적, 비효소적인 방어 시스템에 의하여 정상적으로 소거되지 않게 되면 이로인한 산화적 스트레스를 받게 된다. 따라서 ROS를 비롯한 free radical은 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌졸증, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 자가 면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.[15,16]

항산화제에 대한 연구는 SOD(superoxide dismutase)의 발견을 계기로 시작되었으며 각종 질병이나 노화가 ROS에 의하여 야기된다는 것이 밝혀지면서 노화억제제와 질병치료제의 연구대상으로서 항산화제에 초점이 맞춰졌다. 현재 개발되어 사용되고있는 butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisol(BHA) 등과 같은 합성 항산화제는 발암성 등의 보고[17]가 있어 보다 안전하고 강력한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다.

이와 같은 배경에 따라 한국산 겨우살이(*Viscum album* var. *coloratum*)의 메탄올 가용성 분획물로부터 항산화 물질을 추적하여 그 구조를 동정하고, 수 종의 ROS에 대한 소거활성을 측정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약. 겨우살이는 2000년 3월에서 8월 사이에 지리산 일대에서 채취하여 한동대학교에서 동정하였으며 표본은 한동대와 경북대학교에 보관하고 있다. 겨우살이는 세절 후 사용 전까지 −20°C에서 보관하였으며 사용 시 통풍이 잘 되는 곳에서 음건한 다음 추출하였다. 흡광도는 Bio-TEK ELx 808(VT, USA)로 측정하였으며 ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR spectra는 Bruker Avance Digital 400 spectrometer(Karlsruhe, Germany)로 400과 100 MHz에서 각각 측정하였다. Chemical shift는 TMS를 표준물질로 하여 δ(ppm)로 나타내었다. FAB-MS는 Micromass VK QUATTRO II(Hertsfordshire, UK)를 이용하였으며 matrix로는 glycerol을 사용하여 positive mode에서 측정하였다. TLC는 precoated silica gel plate(Kieselgel 60F254, Merck, NJ, USA)를 이용하였으며 silica gel column chromatography는 Kiegelgel 60(Art. 7734, 70-230 mesh, Merck, NJ, USA)을 사용하였다. Sephadex LH-20 및 기타 시약은 Sigma 사(MO, USA)로부터 구입하였다.

추출 및 정제. 한국산 겨우살이 전초 1 kg를 수욕 중 methanol(MeOH)로 환류 추출하여 메탄올 추출물(336 g)을 얻은 다음 dichloromethane, ethylacetate(EtOAc), *n*-butanol로 순차적으로 분획하였다. 이 중 ROS 소거능이 높은 EtOAc 가용성 분획(4.32 g)에 대하여 silica gel(3.6×50 cm, CH_2Cl_2-MeOH = 100 : 1 → 1 : 1) column chromatography를 행하여 fr. I~VII의 일곱 개 분획으로 나눈 다음, 이 중 활성이 높은 fr. VII(834 mg)에 대하여 Sephadex LH-20(2.5×36 cm, 40% → 100%

*연락저자
Phone: 82-53-950-5715; Fax: 82-53-956-5715
E-mail: kssong@knu.ac.kr

MeOH)을 이용하여 fr. VII-1부터 VII-3의 세 개의 분획으로 나누었다. 이 중 fr. VII-2(92 mg)에 대하여 semiprep.-HPLC (μBondapak C18, Waters, 7.8×300 mm, 1% HOAc in 50% MeOH, UV 254 nm, 2.0 m*l* min^{-1})를 실시한 결과 황색의 compound **1** 21 mg을 얻었다.

활성산소 소거능 측정. Hydrogen peroxide radical에 대한 소거활성은 Müller[18]의 방법에 따라 행하였으며 hydroxyl 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 각각 Chung 등[19] 및 Blois[20]의 방법에 준하여 행하였다. 또한 superoxide anion 소거능은 xanthine-xanthine oxidase system을 이용하여 Iio[21]의 방법에 준하여 실험하였다.

결과 및 고찰

한국산 겨우살이로부터 얻은 compound **1**은 $FeCl_3$에 양성반응을 나타내어 구조 중 phenol성 OH group을 함유하고 있는 것으로 판단되었다. FAB-MS 분석 결과, *m/z* 609에서 $[M+1]^+$ peak가 관측되었으며, *m/z* 315의 peak로 미루어 pentose와 hexose가 각각 한 분자씩 결합되어 있는 배당체의 일종으로 생각되었다. 또한 ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR의 결과와 FAB-MS에서의 결과로 미루어 compound **1**은 $C_{28}H_{32}O_{15}$의 분자식을 가질 것으로 예측되었다. ^{1}H-NMR에서 δ 6.38 및 6.83(각각 1H, *d*, *J* = 2.2 Hz)의 signal로부터 *meta*-coupling proton의 존재가 확인되었으며, δ 7.63(1H, *d*, *J* = 2.1 Hz), 7.23(1H, *d*, *J* = 8.7 Hz) 및 7.67(1H, *dd*, *J* = 2.1, 8.7 Hz)에서 전형적인 1,3,4-trisubstituted benzene ring의 resonance가 관측되었다. 이상의 결과와 δ 7.04 (1H)에 나타난 singlet, δ 12.9(1H)에서 나타난 intramolecular hydrogen bonded hydroxyl proton 등으로 미루어 compound **1**은 5위에 hydroxyl기가 치환된 flavone 계통의 화합물일 것으로 판단되었다. 그 이외에도 δ 3.88과 3.91(각 3H, s)에서 두 개의 methoxyl signal이 관측되었으며, δ 5.31(1H, *d*, *J* = 5.5 Hz)와 5.44(1H, s)에서 당의 anomeric proton이 관측되었다. 또한 ^{13}C-NMR에서는 모두 28개의 carbon signal이 관측되었으며 δ 181.9에서 α,β-unsaturated ketone 및 δ 163.3, 161.0, 165.1, 149.5, 149.0에서 oxygenated aromatic sp^2 탄소가 관측되었다. 또한 δ 97.8와 108.2에서는 당의 anomeric proton으로 생각되어지는 resonance가 관측되었다. 이상의 기기분석 data를 종합하여 볼 때 compound **1**은 flavone의 골격을 가지며 7, 3', 4' 위 중 두 곳에 methoxyl 치환기를 가지고 나머지 한 곳에 pentose와 hexose가 glycoside결합을 하고 있는 화합물로 판단되었다. 이와 유사한 화합물들의 NMR data를 문헌에서 검색해 본 결과 compound **1**은 homo-flavoyadorinin-B(3',7-dimethoxyluteolin-4'-*O*-[apiosyl (1→2) glucoside])와 그 기기분석 data가 정확히 일치하였다.[11] 이들의 NMR data는 Table 1에 요약하였으며 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

Homo-flavoyadorinin-B는 0.01 mM 농도에서 74.6%의 hydroxy radical을 저해하였으며, 30.6%의 superoxide anion radical 및 26.3%의 DPPH radical을 소거하였으나 같은 농도에서 hydrogen peroxide에 대하여는 활성을 나타내지 못하였다(Table 2). 한편, 0.1 mM 농도에서는 superoxide anion radical에 대하여는 양성대조군으로 사용한 BHA 및 α-tocopherol보다 약 2배 높은 활성을 나타내었으며, 그 이외의 radical 소거활성은 양성대조군과 거의 같은 활성을 나타내었다.

한국산 겨우살이에 대한 연구는 주로 lectin 및 항암활성에 집중되어 있어 저분자 활성 화합물 및 기타 생리 활성에 대한

Table 1. NMR data of compound 1 (homo-flavoyadorinin-B)

NO.	^{1}H[a]	^{13}C
2		163.3
3	7.04 (1H, s)	104.2
4		181.9
5		161.0
6	6.38 (1H, d, *J*=2.2 Hz)	98.0
7		165.1
8	6.83 (1H, d, *J*=2.2 Hz)	92.7
9		157.2
10		104.7
1'		123.8
2'	7.63 (1H, d, *J*=2.1 Hz)	109.9
3'		149.5
4'		149.0
5'	7.23 (1H, d, *J*=8.7 Hz)	114.7
6'	7.67 (1H, dd, *J*=2.1, 8.7 Hz)	119.7
7-OCH_3	3.88 (3H, s)	55.9
3'-OCH_3	3.91 (3H, s)	56.0
Glucose		
1	5.31 (1H, d, *J*=5.5 Hz)	97.8
2		76.9
3		74.6
4		69.8
5		77.6
6		60.4
Apiose		
1	5.44 (1H, s)	108.2
2		75.9
3		79.2
4		73.8
5		64.3

[a]Integral, multiplicity, and coupling constants in Hz. NMR spectra were measured in DMSO-d6.

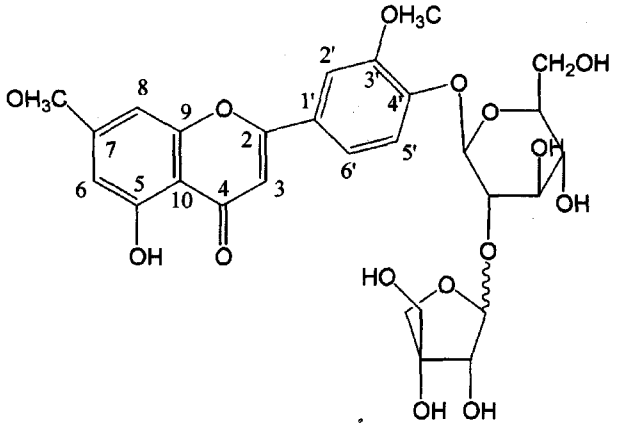

Fig. 1. The structure of homo-flavoyadorinin-B.

Table 2. Reactive oxygen species scavenging activitya of homo-flavoyadorinin-B

Compounds (mM)		Inhibition (%)			
		DPPH[b]	H_2O_2	HR[c]	SOA[d]
HFB[e]	0.01	26.3	3.6	74.6	30.6
	0.1	27.3	6.9	81.0	47.7
	1.0	-	89.2	-	-
BHA[f]	0.01	27.4	9.2	73.0	14.5
	0.1	30.7	9.0	79.4	22.0
	1.0	-	95.7	-	-
V-E[g]	0.01	26.5	6.9	75.6	22.1
	0.1	32.7	2.7	83.6	25.6

[a]Presented as an inhibition %. [b]α,α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl.
[c]Hydroxyl radical. [d]Superoxide anion. [e]Homo-flavoyadorinin-B [f]Butylated hydroxyl anisol. [g]α-Tocopherol.

연구는 거의 이루어져 있지 않다. 또한 본 연구에서 분리된 homo-flavoyadorinin-B는 겨우살이에서만 특이적으로 생합성되는 flavonoid로 식물화학적으로도 그 의미가 크다. 겨우살이로부터 항산화 성분이 분리, 동정된 것은 이번이 처음으로 본 연구 결과는 ROS의 생성에 의해 야기되는 노화, 치매, 순환기계 등, 퇴행성 질병의 예방과 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 과제는 한국 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발 사업 중 자생식물 이용기술개발 사업 연구비(PF002201)에 의하여 수행되었음을 감사 드립니다.

참고문헌

1. Kuttan, G. and Kuttan, R. (1992) Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract (NSC 635 089). *Immunol. Invest.* **21**, 285-296.
2. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K. Rordorf, C. Gabius and Hans, J. (1990) Increased secretion of tumor necrosis factor α, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* **50**, 3322-3326.
3. Bussing, A., Suzart, K. and Schweizer, K. (1997) Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anti-Cancer Drug.* **8**, Suppl 1, S9-14.
4. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Choi, O. B., Do, M. S., Kang, T. B., Lee, S. W., Azuma, I. and Kim, J. B. (1995) Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *Cancer Lett.* **97**, 83-91.
5. Fischer, S., Scheffler, A. and Kabelitz, D. (1997) Stimulation of the specific immune system by mistletoe extracts. *Anti-Cancer Drug* **8**, Suppl 1, S33-7.
6. Pae, H. O., Seo, W. G., Shin, M., Lee, H. S., Lee, H. S., Kim, S. B. and Chung, H. T. (2000) Heat shock treatment protects human HL-60 cells from apoptosis induced by lectin II isolated from Korean mistletoe, *Visum album* var. *coloratum*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**, 237-252.
7. Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L., Di Scala, D., and Beck, J. P. (1986) Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology* **43**, Suppl 1, 35-41.
8. Holtskog, R., Sandvig, K. and Olsnes, S. (1988) Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. *Oncology* **45**, 172-179.
9. Pfuller, U. (2000) Chemical constituents of European mistletoe (*Viscum album* L.). *Med. Aromatic Plants-Industrial Profiles* **16**, 101-122.
10. Ohta, N. and Tagishita, K. (1970) Isolation and structure of new flavonoids, flavoyadorinin A, flavoyadorinin B, and homoflavoyadorinin B, in the leaves of *Viscum album* var. *coloratum* epiphyting to *Pyrus communis*. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 900-907.
11. Fukunaga, T., Nishiya, K., Kajikawa, I., Takeya, K. and Itokawa, H. (1989) Studies on the constituents of Japanese mistletoes from different host trees, and their antimicrobial and hypotensive properties. *Chem. Pharm. Bul.* **37**, 1543-1546.
12. Khwaja, T. A., Varven, J. C., Pentecost, S. and Pande, H. (1980) Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album, coloratum*. *Experientia* **36**, 599-600.
13. Sawyer, D. T. and Valentine, J. S. (1981) How super is superoxide? *ACC. Chem. Res.* **14**, 393.
14. Fridorich, I. (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
15. Davies, K. J. A. (1995) In *Environment, Drugs and Food Additives*, Portland Press, Portland, pp. 1-31.
16. Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
17. Wuertzen, G. and Olsen, P. (1986) Chronic study on BHT in rats. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1121-1125.
18. Müller, H. E. (1985) Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobio. Hyg.* **259**, 151-158.
19. Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997) Hydroxyl radical-scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 118-

124.
20. Blois, M. S. (1985) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1201.
21. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumoto, M. (1985) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2173-2182.

An Antioxidant Homo-Flavoyadorinin-B from Korean Mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*)

Seung-Young Choi, Shin-Kyo Chung[1], Suk-Kyung Kim[1], Yung-Choon Yoo[2], Kyung-Bok Lee[2], Jong-Bae Kim[3], Ja-Young Kim and Kyung-Sik Song* (*Division of Applied Biology & Chemistry, Kyungpook National University; [1]Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, 1370, Sankyuk-Dong, Daegu 702-701, Korea; [2]School of Medicine, Konyang University, Nonsan City, Chungnam, Korea; [3]Department of Biotechnology & Food Science, Handong University, Pohang, Korea*)

Abstract: An antioxidant was isolated from Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) by consecutive purification using silica gel, Sephadex LH-20, and RP-HPLC. The active principle was identified as homo-flavoyadorinin-B (3',7-dimethoxyluteolin-4'-*O*-[apiosyl (1→2) glucoside]) by spectral analyses. It inhibited 74.6% of hydroxyl radical and 30.6% of superoxide anion radical at 0.01 mM; however, the compound did not show any scavenging activity against hydrogen peroxide radical. At 0.1 mM, above compound scavenged superoxide anion radical about twice as effective as positive controls, BHT and α-tocopherol. Radical scavenging activities of homo-flavoyadorinin-B on DPPH, hydroxyl, and hydrogen peroxide radicals were almost same with those of positive controls.

Key words: *Viscum album* var. *coloratum*, reactive oxygen species scavenger, antioxidant, homo-flavoyadorinin-B
*Corresponding author