

유용식물로부터 Human Low Density Lipoprotein (LDL)에 대한 항산화제의 탐색

임복규 · †류병호
경성대학교 식품공학과

Screening of Antioxidative Compounds toward Human Low Density Lipoprotein (LDL) from Useful Plants

Bok-Gyu Lim and † Beung-Ho Ryu

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University

Abstract

This study was designed to investigate antioxidative activity of substances isolated from 25 kinds of useful plants resources toward free radical and human low density lipoprotein(LDL). Methanol extracts of *Oenothera odorata* had the highest antioxidative activity similar with α -tocopherol.

Methanol extracts of *Oenothera odorata* was extracted again by the ethylacetate. The ethylacetate soluble acidic fraction obtained from methanol extract of *Oenothera odorata* showed highest activity toward human LDL .

Each fraction was purified through Sepadex LH-20 chromatography by elution of chloroform-methanol mixture (90:10 v/v). Fraction, F-2 obtained from *Oenothera odorata* showed at highest levels of electron donating activity. Fraction, F-2 was identified as 3,4-dihydroxybenzoic acid and 3-hydroxycinnamic acid.

Key words : *Oenothera odorata*, human low density lipoprotein(LDL), 3, 4-dihydroxybenzoic acid, 3-hydroxycinnamic acid

서론

순환기계 질환은 미국과 유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 큰 비중을 차지하고 있다. 우리나라도 생활수준의 향상과 식생활의 서구화로 동맥경화, 심장마비, 뇌졸중 등 심혈관계 질환이 날로 증가하고 있다.

혈관계 질환의 주요 원인은 음식물로 통하여 들어오는 지질 중 콜레스테롤과 low density lipoprotein (LDL)이 microphage에서 생성되는 활성산소, 유리기,

그리고 내피세포의 lipoxygenase, 과산화지질에 의하여 쉽게 산화되어 산화 LDL(oxidized LDL)로 된다¹⁾. 산화 LDL은 내피세포에 축적되어 거대 거품세포(foam cells)를 형성하며, 이 과정에서 일부 세포는 사멸되고 이 거대 거품 세포가 증가하면서 지방층(fatty steak)이 동맥벽에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다^{2~4)}. 산화 LDL은 aldehyde 등의 지질 과산화물로 생성되고, 세포 독성이 강하여 세포 조직에 확산되어 독성을 나타낸다. 산화 LDL은 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 칼슘의 침착으로 결국에는 동맥경화를 일으키게

† Corresponding author : Beung-Ho Ryu, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea.

Tel : 82-51-620-4712, E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

된다⁵⁻⁷). 이와 같이 LDL이 산화 LDL로 되어 동맥벽을 경화시키고 동맥경화의 병변의 형성과 진행에 주요한 역할을 하므로 동맥경화를 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 막아야 한다.

한편 식물의 각종 성분은 생존에 필수적인 것은 아니지만 살아가는데는 유익한 기능을 수행하는 2차 대사산물이 생리적으로 만들어진다. 이들 2차 대사산물은 포유류를 비롯한 동물에게도 강한 생리적 영향을 주고 있어 많은 주목을 받고 있다. 이러한 물질로 phenol성 화합물, terpenoid, alkaloid 등이 있다.

Phenol성 물질은 당과 결합하여 배당체로서 존재하는 경우가 많으며 보통 수용성으로 자연에 존재하는 phenol성 물질의 구조는 1,000 가지 이상이 밝혀졌으며 그 중 flavonoid가 대부분이다⁸).

Phenol성 물질은 야채 및 과일류에 풍부하게 들어 있어 심장질환, 암 및 각종 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 음식물로서 섭취되는 플라보노이드의 주요 공급원은 닌류(61%), 양파(29%), 야채류(13%), 과일류(10%) 및 적포도주(1%) 정도를 차지하고 있다⁹. 네덜란드의 역학조사에 의하면 플라보노이드를 많이 섭취하는 사람은 심장병의 발생률이 낮다고 하였다¹⁰. 심장병질환의 경우 플라보노이드를 적게 섭취하는 그룹보다 많이 섭취하는 그룹이 훨씬 발병률이 낮다는 보고가 있다¹⁰. 플라보노이드는 금속이온을 봉쇄시켜 LDL 산화를 억제하고, Fenton 반응에 의한 하이드록시기 형성을 감소시킨다. 플라보노이드는 플라보논이 가지고 있는 수소만으로는 LDL의 산화억제 효과가 미약하지만 -OH기가 많은 플라보노이드의 glycones는 LDL의 항산화 활성이 높다¹¹⁻¹⁵).

본 연구는 생체 산화로 인한 동맥경화 등 성인병의 원인이 되는 산화 LDL이 *in vivo*에서 cholesteryl ester로서 거품세포를 형성하여 동맥경화를 유발하므로 LDL의 산화를 억제하기 위하여 식물 자원에서 분리·정제한 항산화 물질을 사용하여 human low density lipoprotein(LDL)에 대한 항산화 효과를 조사한 후 그 구조를 규명하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서는 항산화 활성이 있다고 알려진 25 여종의 유용 식물을 경남 밀양시내 재래시장에서 구입하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 재료는 두릅나무, 머위, 도들빼기, 토란, 킴프리, 방아, 쑥부쟁이, 감나무, 개민트라미, 부추, 사철쑥, 썩비름, 엄나무, 우

영, 달맞이꽃, 다래, 양배추, 유채, 냉이, 고추, 어린호박, 산마늘, 파, 쫓갓, 미나리 등이 사용되었다(Table 1).

2. 실험방법

1) 시료의 추출 및 분리

각종 식물을 음건 후 세절하여 수욕상에서 환류 냉각하면서 MeOH로 3회 추출한 다음 용매를 감압 농축한 후 제거, MeOH 추출물을 사용하여 LDL에 대한 항산화능을 측정하였다. 유용식물 중 항산화활성이 제일 우수한 달맞이꽃의 메탄올 추출물을 10% MeOH에 현탁시킨 후 순차 용매법으로 계통 분획을 실시하여 chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), n-butyl alcohol(n-BuOH) 및 수층으로 분획하였다. 이중 EtOAc 분획을 더 분리정제하기 위하여 및 n-BuOH 분획을 활성화된 silica gel(0.063~0.1 mm, 70~270mesh, Merck Co.)을 chromatography용 column(column, 8 cm×100 cm)에 충전한 후 시료를 주입하고 chloroform : methanol(80 : 20 v/v), chloroform : methanol(50 : 50v/v), chloroform : methanol(80 : 20v/v) 및 methanol 등의 전개용매를 사용하여 단계별로 용출하였다. 이때 얻은 각 분획물을 감압 농축하고 각 분획에 대해 항산화 효과를 측정하였다. 추출 수율의 측정은 추출에 사용된 시료의 건물에 대한 추출물중 건물량을 백분율비로 하였다.

2) DPPH에 대한 Radical Scavenging Effect의 측정

각 시료의 MeOH 추출물을 drying oven(Cheil Co., Korea)에서 건조 후 99.5% methanol에 용해시켜 1, 10, 100배로 희석, 시료를 조제하였다. 각 시료 900 μL에 DPPH(1.5×10⁻⁴ M)용액 300 μL를 가한 후 vortex mixer(Hwa Shin Med Lab., Korea)로 10초간 진탕한 후, 37°C water bath(Buchi)에서 30분간 배양시킨다. 이 시료를 spectrophotometer(8452A Hewlett Packard, USA)로 520nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거효과(free radical scavenging effect)는 electron donating ability(EDA, %)로 나타내었다.

전자공여효과는 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도는 이용하여 백분율로 나타내었다¹⁶).

3) 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50 mL을 1 mg/mL EDTA를 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma를 상온에서 20분 동안 원심분리(2000×g)하여 얻은 다음 gentamicin sulfate(1 mg/25 mL)을 첨가하였다. LDL(d. 1.019~1.063 g/mL)

Table 1. Antioxidative activity of methanol extracts of edible plant on DPPH and TBARS of low density lipoprotein(LDL)

Scientific name	Common name	Part used	Extracts yield(%)	Extracts concentration (µg/mL)	EDA(%)	TBARS nmole MDA/mg, LDL for 18hr
<i>Aralia elata</i>	두릅나무	leaves	35.4	50	53.2	28.40±0.26
<i>Petasites japonicus</i>	머위	leaves	26.5	50	50.3	18.21±0.24
<i>Paraixeris deaticulata</i>	고들빼기	leaves & stems	33.2	50	47.6	34.03±0.51
<i>Colocasia antiquorum</i>	토란	leaves	30.6	50	46.8	30.26±0.41
<i>Symphytum peregrinum</i>	컴프리	leaves	30.6	50	53.3	26.75±0.35
<i>Agastache rugosa</i>	방아	leaves	32.8	50	47.3	29.02±0.53
<i>Aster scaber</i>	쑥부쟁이	leaves	34.0	50	47.4	28.40±0.51
<i>Diospyrus kaki</i>	감나무	leaves	26.4	50	50.6	30.70±0.24
<i>Celosia argentea</i>	개만드라미	leaves	30.1	50	50.7	32.40±0.16
<i>Allium tuberosum</i>	부추	leaves	36.7	50	54.7	30.40±0.24
<i>Artemisia capillaris</i>	사철쑥	leaves	33.4	50	54.7	24.80±0.21
<i>Portulaca oleracea</i>	쇠비름	leaves & stems	34.6	50	71.8	18.60±0.11
<i>Kalopanax pictus</i>	엄나무	leaves & stems	28.1	50	46.7	33.90±0.37
<i>Arctium lappa</i>	우엉	leaves & stems	30.4	50	45.3	34.00±0.13
<i>Oenothera odorata</i>	달맞이꽃	flowers	29.6	50	72.8	17.30±0.27
<i>Actinidia arguta</i>	다래	fruits	34.6	50	51.8	22.43±0.18
<i>Bassica oleracea</i>	양배추	leaves	33.0	50	44.5	35.06±0.47
<i>Bassica campestris</i>	유채	flower	30.4	50	42.6	30.79±0.26
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	냉이	leaves & stems	32.0	50	53.6	30.21±0.14
<i>Capsicum annuum</i>	고추	leaves	26.8	50	46.3	30.60±0.51
<i>Cucurbita pepo</i>	어린호박	fruit	36.4	50	42.8	34.16±0.37
<i>Allium victorialis</i>	산마늘	fruit	34.0	50	50.2	24.60±0.25
<i>Allium qistulosum</i>	파	leaves & stems	33.6	50	48.6	30.43±0.50
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	쑥갓	leaves	33.8	50	56.3	25.67±0.70
<i>Oenanthe javanaica</i>	미나리	leaves & stems	35.4	50	46.8	28.73±0.20
α -Tocopherol				50	88.5	11.90±0.27

은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 LDL을 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)로 16~20시간 투석하였다¹⁷⁾.

4) Cu²⁺ Mediated LDL에 대한 항산화 활성의 측정

Cu²⁺ mediated LDL 조제는 LDL(100 µg/ml)를 1~5 µm CuSO₄를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도를 첨가하여 5% CO₂ 존재 하에서 37°C에서 18시간 배양하여 LDL을 산화시켜 얻었다¹⁸⁾. 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였고, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 측정하였다.

5) Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)의 측정

LDL의 산화 정도는 TBARS로 측정하였다. 100 µg protein/mL LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 mL에 20% TCA 1.5 mL를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH에 0.67% TBA 1.5 mL를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 가열하였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광 광도를 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malondialdehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다¹⁹⁾.

6) 달맞이 꽃의 산가용성 활성물질의 추출 및 정제

달맞이 꽃(1kg)의 메탄올 추출물을 1 M HCl로 pH 3.0으로 조정된 다음, ethyl acetate(EtOAc)를 첨가한 후 추출한 다음 분배하여 수상획분(aqueous layer)과 ethyl acetate 가용 산성·중성획분(EtOAc-soluble acidic·neutral fraction)을 얻었다. Ethyl acetate 가용 산성·중성획분을 완충용액(5% NaHCO₃ pH 8.0)으로 분해하여 EtOAc 가용 중성획분(EtOAc-soluble neutral fraction)과 수상획분으로 분획하였다. 또한 얻어진 수상획분에 1M HCl을 가하여 pH 3.0으로 조정된 다음 ethyl acetate로 분해하여 EtOAc 가용 산성획분(EtOAc-soluble acidic fraction)을 얻었다.

EtOAc 가용 산성획분을 각각 silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제하였다.

Silica gel adsorption column chromatography는 silica gel(10g, 70~230 mesh, column chromatography-용, Merck사, Darmstadt, Germany)을 n-hexane/EtOAc/MeOH (8:6:1,

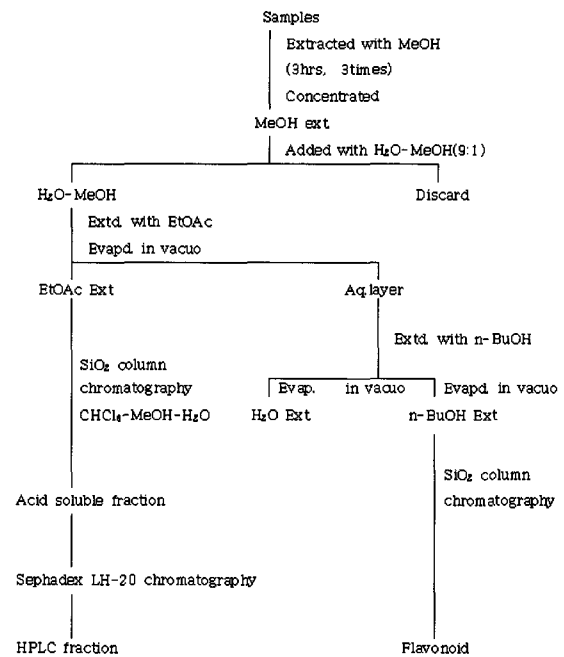


Fig. 1. Isolation of the antioxidative compounds from *Oenothera odorate*.

6:8:1, 4:10:1, 2:12:1, 0:14:1, 0:0:15(v/v, 단계별 100 mL씩)으로 극성을 증가시키는 stepwise 방법으로 용출·분획하였다. 이들 획분중 항산화 활성이 높은 획분을 감압 농축하여 다시 Sephadex LH-20으로 column(100×5 cm)에 충전한 후 chloroform : methanol (90:10 v/v) 용매로 단계별로 용출시켜 항산화 활성물질을 얻었다 (Fig. 1).

7) HPLC를 이용한 분리정제

Sephadex LH-20 column chromatography를 통해 분리되어진 분획물 중 항산화력이 가장 좋은 획분을 HPLC (Varian 2550)를 통해 분획하였다. 분획조작에 사용된 칼럼은 역상칼럼(C18)을 사용하였다. 각 피크별 분획물은 분취용 수집기를 이용하여 수집하여 용매를 감압 증류시킨 후 생리 활성물질의 구조확인을 위해 사용하였다.

8) GC-MS에 의한 물질의 동정

상기 방법에 의해 얻어진 달맞이 꽃의 methanol 추출물의 활성획분에 함유된 물질을 trimethylsilyl(TMS) 유도체화 한 후, gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) 분석에 의해 동정하였다. GC-MS 분석은 MS(Varian SATURN 3, Walnut Creek, CA, USA)에 GC(Varian STAR 3400CX, Walnut Creek, CA, USA)가 연결된 기기로 Rtx-1 capillary column(0.32 mm×30 m,

Varian instruments 2700, Walnut Creek, CA, USA)을 장착하였으며 온도는 100°C에서 3분간 유지한 후, 분당 5°C씩 240°C까지 증가시켰으며 240°C에서 5분간 유지시켰다. 또한 ion source 온도 200°C, ionizing voltage 80eV 조건으로 MS 분석을 하였다.

활성획분의 TMS 유도체화는 의해 활성획분의 일부 (10 µg)에 시약(무수 pyridine-N,O-bis(trimethylsilyl) acetamidetrimethylchlorosilane) 20µL를 가하여 혼합한 다음 60°C에서 30분간 반응시킨 후, GC-MS분석을 실시하였다.

9) ¹H- 및 ¹³C-NMR Spectrum

내부 신기능성 후보물질을 NMR용 용매 0.7 mL에 물질을 녹인 다음 pasteur pipette을 이용하여 여과하면서 NMR용 tube에 넣고 Varian UNITY300(300 MHz) 및 JEOL(α400 MHz, α600 MHz)을 이용하여 NMR Spectrum을 조사하였다. 물질을 acetylation시킨 후 NMR spectrum을 조사할 때에는, 정제한 물질 5 mg을 0.75 mL의 pyridine-d₅에 녹여서 NMR tube에 넣고 NMR Spectrum을 찍은 후 곧 바로 여기에 10 µL의 acetic anhydride를 가하여 acetylation 시킨 다음 NMR spectrum을 조사하였다.

10) 단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법에 따라 측정하였다²⁰⁾.

11) 통계처리

실험결과를 통계처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석하였다.

결과 및 고찰

1. 식물 추출물로부터 DPPH 시액을 이용한 Free Radical Scavenging 효과

두릅나무 등 식물 25여종의 항산화 활성을 검색하기 위하여 우선 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability; EDA, %)을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 항산화력이 높은 달맞이꽃잎의 경우 50 µg/mL 농도에서 EDA가 72.8%였고, 쇠비름이 71.8%, 쑥갓이 56.3%, 부추, 사철쑥이 각각 54.7%, 냉이에서는 53.6% 및 두릅나무는 53.2%의 순으로 나타내었다. 본 실험결과와 EDA(%)의 상대활성도를 비교하기 위하여 α-tocopherol을 표준품으로 동시에 조사한 결과 α-toco-

pherol은 50 µg/mL의 농도에서는 88.5%의 활성도를 나타내었다.

대부분의 식물 추출물들이 거의 항산화 효과를 나타내고 있어 각종 식물체는 그 양과 구조적 특성에 따라 차이가 있겠으나 항산화성 물질을 대부분 함유하고 있는 것으로 생각된다.

한편, 각종 식물 추출물의 수율을 보면 Table 1과 같이 부추가 36.7%로 가장 높았고, 다음이 어린호박이 36.4%였으며 감나무 잎은 26.4%로 가장 낮았다. DPPH 소거능에 의한 항산화활성이 제일 높은 달맞이꽃의 경우 29.6%로 나타났다.

Cho 등²¹⁾이 쑥갓의 잎과 줄기를 함께 실험한 결과 항산화 효과가 약하다는 보고와 차이가 있었으며, 유 등²²⁾이 보고한 고추잎에서 강한 유리 래디컬 소거능이 있다고 하였으나 본 시험에서는 그 효과가 미약하여 다소 차이가 있었다. 또 미나리의 잎과 줄기에서 항산화 효과가 높지 않은 것으로 보고되어 본 연구 결과와 비슷하였다.

2. Cu²⁺-Mediated LDL에 대한 항산화 활성

각종 식물을 메탄올로 추출한 후 농축한 다음 50 µg/mL의 농도로 조절한 후 5µM CuSO₄ 존재 하에서 사람 LDL에 대한 항산화 활성을 37°C에서 18시간 배양한 후 TBARS로 측정하였다. Table 1에서 나타낸 바와 같이 쇠비름 추출물을 50 µg/mL 농도로 첨가한 실험에서 LDL에 대한 TBARS값은 18.6±0.11 nmole MDA/mg LDL protein이었고, 달맞이꽃 메탄올 추출물의 농도를 각각 50 µg/mL 농도를 첨가하였을 때 LDL에 대한 TBARS 값은 17.30±0.27 및 nmole MDA/mg, LDL, protein이었다. 그 다음으로 항산화 활성이 강한 식물은 머위, 섬쑥부쟁이, 다래, 방아의 순이었다. 쑥갓의 경우 추출물을 50 µg/mL 농도로 첨가하였을 때 LDL에 대한 TBARS 값은 각각 25.67±0.70 nmole MDA/mg LDL protein이었고, 방아 추출물의 경우 50 µg/mL의 농도를 첨가하였을 때 LDL에 대한 TBARS 값은 29.02±0.53 nmole MDA/mg, LDL, protein으로 나타났다. 그 외 고들빼기, 고추, 어린 호박, 미나리, 유채, 컴프리 등도 LDL에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에 항산화제와 비교 검토하기 위하여 α-tocopherol에 대한 LDL의 산화 정도를 알아보기 위하여 50 µg/mL을 첨가한 후 TBARS값을 측정한 결과 11.90±0.27 nmole MDA/mg LDL, protein이었다. 이상의 결과에서 볼 수 있듯이 달맞이꽃, 쇠비름, 섬쑥부쟁이 등이 거의 비슷한 항산화 효과를 나타내었다.

본 연구에서는 LDL에 대한 항산화 활성을 측정할 때 LDL을 18시간으로 배양하여 측정하였다. LDL을 18시간으로 배양한 이유는 비타민 A 및 E와 같은 항산화제가 LDL의 획분에 미량 함유되어 있을 경우 항산화력을 있으나 반대로 담배를 피우는 사람은 혈액에서 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에 산화에 충분히 요구되는 18시간 동안 배양하였다¹⁸⁾.

3. 사람 LDL에 대한 유기용매 각 획분의 항산화 효과

Table 1에서 보는 바와 같이 유용식물 25가지를 EDA(%) 및 LDL에 대한 항산화효능을 측정한 결과 달맞이꽃의 항산화 활성이 가장 우수하였으므로 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 물층으로 구분하여 CuSO_4 로 LDL을 산화시키면서 LDL에 대한 항산화 활성을 TBARS로 측정하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Cu^{2+} 유도 매개한 LDL에 대한 산화 여부를 TBARS를 측정한 결과 native LDL은 $2.75 \pm 0.01 \text{ nmole MDA/mg, LDL, protein}$ 이었으나 butanol 획분율이 $4.05 \pm 0.02 \text{ nmole MDA/mg, LDL, protein}$ 이었으며 ethylacetate 획분이 $4.04 \pm 0.02 \text{ nmole MDA/mg, LDL, protein}$ 으로 거의 비슷하였고, chloroform 획분은 $7.63 \pm 0.02 \text{ nmole MDA/mg, LDL, protein}$ 의 순서였다. 달맞이꽃의 유기용매 획분중 butanol과 ethylacetate 획분이 Cu^{2+} 유도로서 LDL에 대한 항산화 활성이 강한 것으로 판명되었으므로 앞으로 ethylacetate 획분의 물

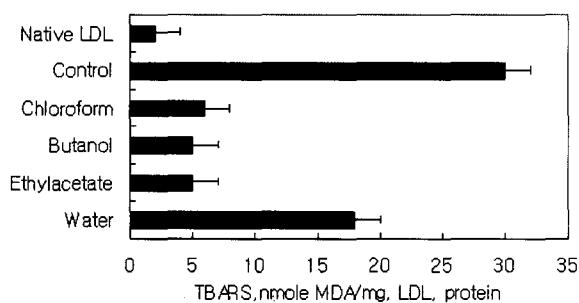


Fig. 2. Antioxidative activity of difference solvent fractions obtained from methanol extracts of *Oenothera odorate*. LDL($100 \mu\text{g}$, protein/mL) was incubated with $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 cells for 18h at 30°C in the presence of $50 \mu\text{g/mL}$ or absense of fractionation with various solvent. The medium was then removed and assayed for TBARS as described in methods. Results are expressed as means \pm SD of triplicate analyses. The significance of difference between solvent fraction treated values were calculated by unpaired *t*-test.

질의 구조를 확인하였다.

4. Ethylacetate 산가용성 항산화 물질의 분리 및 동정

달맞이꽃의 각종 유기용매 추출물중 항산화 활성을 조사한 결과 ethylacetate 획분에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 ethylacetate 획분으로부터 항산화 물질의 구조를 확인하기 위하여 ethylacetate 산가용성 획분을 얻었다. Ethylacetate 산 가용성 획분중 항산화 물질을 분리하기 위하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. Ethylacetate 획분을 slurry로 만들어 Sephadex LH-20을 column($100 \times 5 \text{ cm}$)에 충전시킨 다음 chloroform : methanol(90:10)의 분취용매로 1.5 mL/min 속도로 15 mL 씩 분취하여 동일하게 회색한 후 280 nm 과 340 nm 흡광도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 10번과 22번 획분 부근에서 높은 흡광도를 나타내었으나 340 nm 에서는 23번 부근에서만 강한 흡광도를 나타내고 있었다. 이들 획분중 DPPH radical 소거능을 조사한 결과는 280 nm 와 340 nm 에서 강한 흡수대를 보인 5~36번 획분이었으며 그 이후의 획분들은 비교적 낮은 전자공여능을 나타내었다.

이와 같이 DPPH 소거능이 확인된 획분의 흡광도와 항산화성 활성과 상관관계가 있는 것으로 판단되어 흡광도가 높고 DPPH 소거능이 높은 획분을 기준은 획분 No.1~6번을 F-1, 8~14번을 F-2로 15~18번을 F-3로 19~28번을 F-4로, 그리고 50~66번을 F-5로 5개의 획분으로 구분하여 감압농축하여 건조한 후 이들 획분에 대해 일정한 농도를 조절하여 DPPH 소거능을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 DPPH 소거능은 획분별 농도는 각각 $10 \mu\text{g/mL}$ 및 $20 \mu\text{g/mL}$ 농도로 조절하여 α -tocopherol과 비교한 결과 5개 획분 중 F-2가 가장 높았고, 그 다음이 F-3, F-4 및 F-1의 순서였다.

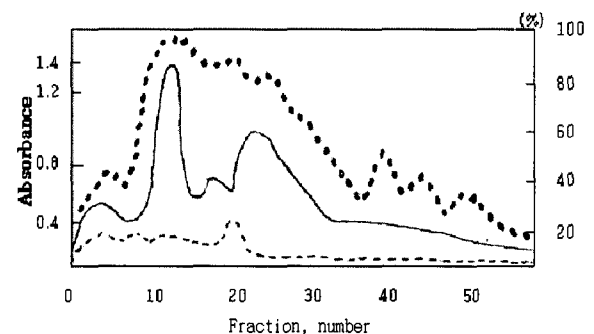


Fig. 3. Chromatogram of Sephadex LH-20 column of ethylacetate acid soluble fraction isolated from *Oenothera odorate*.

- , 280 nm ; - - , 340 nm ; • • , Electron donating activity.

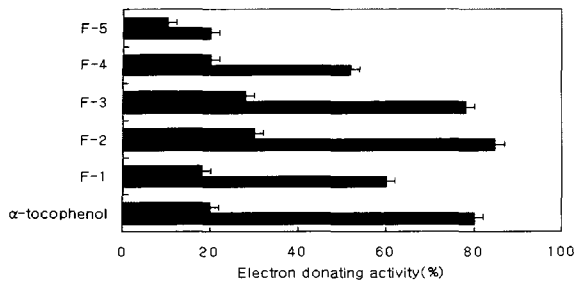


Fig. 4. Electron donating abilities of the ethylacetate acid soluble fraction by Sephadex LH-20 column chromatography.

Fraction concentration, □ ; 10 μ g/mL, ■ ; 20 μ g/mL

5. Ethylacetate 산가용성 향산화 물질의 분리 및 구조 확인

이들획분 중 DPPH 소거활성이 가장 높은 F-2 획분으로부터 향산화 물질을 분리하기 위하여 HPLC를 행한 결과 2개의 peak를 확인하였고 이중 주 peak인 compound 1 및 2를 prep-HPLC로 각각 분취하여 정제한 후 단일 peak임을 확인하고 구조를 분석하였다. 단일 성분으로 분리된 compound 1를 acetone- d_6 D $_2$ O(1:1)에 용해하여 1 H-NMR과 13 C-NMR로 측정된 결과 spectrum은 Fig. 5, 6에 나타내었으며 chemical shift 값은 Table 2와 같다. GC-MASS spectrum은 Fig. 7에 나타내었다. 1 H-NMR spectrum에서 2 ppm과 4.4 ppm 부근의 peak는 용매에서 나타내는 peak이며 7.52 ppm에서 2H에 해당하는 peak가 관찰되어 benzene 환의 H-2,6 유래 proton으로 assignment하였다. 그리고 13 C-NMR spectrum에서는 6개의 탄소 peak가 나타내었고, chemical shift 값 124.1 ppm을 C $_1$, 124.0 ppm을 C $_2$ 및 C $_6$, 149.7 ppm을 C $_3$ 및 C $_5$, 144.4 ppm을 C $_4$ 로 가장 저자장의 172.0 ppm을 carboxyl기의 peak로 assignment 하였다. 이러한 결과를 문헌과 비교한 결과 compound 1의 분자식은 C $_7$ H $_6$ O $_4$ 로 3,4-dihydroxy benzoic acid로 동정할 수 있었다. 그리고 Compound II를 acetone-db D $_2$ O(1:1)에 용해하여 1 H-NMR과 13 C-NMR로 측정된 결과 1 H-NMR spectrum에서 2ppm과 4, 5ppm 부근의 peak는 용매에서 나타난 peak이며 7.61ppm에서 2H에 해당하는 peak가 관찰되어 benzene의 H-2,6 유래의 proton으로 assignment 하였다(1 H-NMR spectrum 생략). 그리고 13 C-NMR spectrum에서는 6개의 탄소 peak가 나타났고 Chemical shift 값은 145.6을 C $_1$ 129.6을 C $_2$ 및 C $_6$, C $_1$ 을 157.2ppm으로 저자장의 170.0ppm을 carboxyl기의 peak로 assignment 하였다(13 C-NMR spectrum 생략). 이러한 결과를 문헌^{23,24)}과 비교한 결과 Compound II의 분자식은 C $_9$ H $_8$ O $_3$ 로 m-hydroxycinnamic acid로 동정할 수 있

Table. 2 1 H-NMR and 13 C-NMR spectra data of compound I and II obtained from Fraction 2 of *Oenothera odorata*

	Chemical shift	
	1 H-NMR	13 C-NMR
Compound I		C $_1$ 172.0
	H 7.52	C $_{3,4}$ 124.1
	7.43	C $_4$ 117.0
	6.77	C $_1$ 149.7
		C $_{2,6}$ 144.4
		C $_1$ 170.0
Compound II		C $_{3,4}$ 145.6
	7.04	C $_4$ 136.3
	6.77	C $_1$ 157.2
	6.61	C $_{2,6}$ 129.8

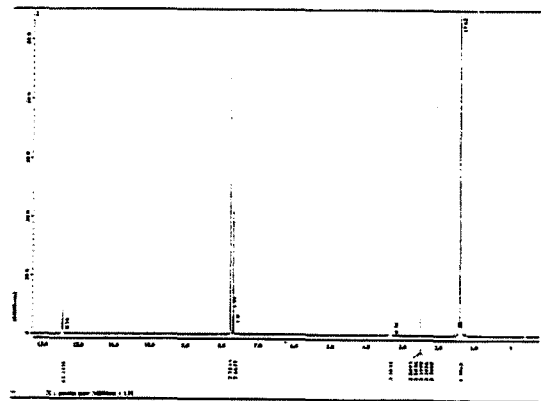


Fig. 5. 1 H-NMR spectrum of compound I isolated from *Oenothera odorata*.

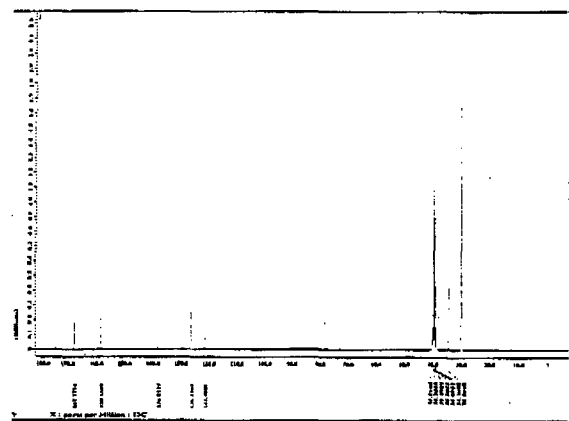


Fig. 6. 13 C-NMR spectrum of compound I isolated from *Oenothera odorata*.

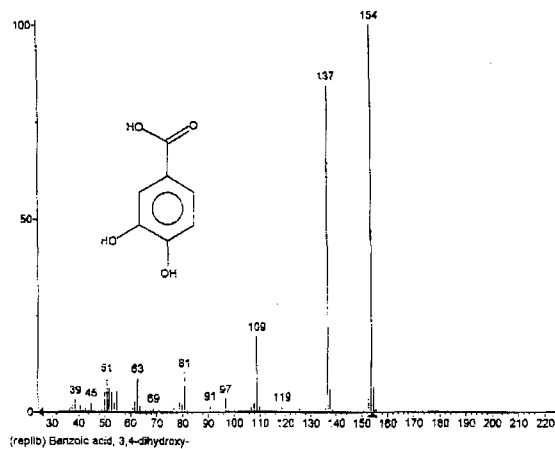


Fig. 7. GC MASS spectrum of compound I isolated from acidic soluble fraction of *Oenothera odorata*.

었다.

4-hydroxybenzoic acid는 땅콩껍질,²³⁾ 헛개나무²⁴⁾에서 4-hydroxy-benzoic acid는 땅콩껍질,²⁴⁾ 복분자²⁵⁾에서 동정된 바 있으나, 달맞이꽃에서는 처음으로 동정되었다.

요 약

본 연구는 유용식물로부터 DPPH free radical scavenger 및 사람의 low density lipoprotein(LDL)의 산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 25종의 식물로부터 메탄올로 추출하여 조사하였다.

각종 유용식물 중 항산화 활성은 우수한 달맞이꽃이 가장 높았으며 다시 메타놀로 추출하여 조사한 결과 α -tocopherol과 항산화능이 거의 비슷하였다. 메타놀 추출물을 ethylacetate로 추출한획분이 항산화 활성이 높았으며 ethylacetate 층 중 acidic soluble 획분을 다시 분리한 후 Sephadex LH-20 column chromatography로 추출한 결과 Fraction F-2가 전자공유능이 가장 높았다.

따라서 항산화 활성이 높은 Fraction, F-2의 구조를 동정한 결과 3,4-dihydroxybenzoic acid와 3-hydroxycinnamic acid로 확인되었다.

참고문헌

- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809. 1993
- Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE, Khoo, JC and Witztum, JL. Beyond cholesterol. Modifications

- of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320:915-924. 1989
- Jessup, W, Dean, RT, and Whallpt, CV. The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis IN: Emerit, I, Parker, L, Auclair, C, eds. *Antioxidants in Therapy and preventive Medicine*, New York, plenum, 139. 1990
- Bruckdorfer, KR. Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1:529-535 1990
- Roma, P, Catapano, AL, Bertulli, SM, Varesi, L, Fumagalli, R and Bernini, F. Oxidized LDL increase free cholesterol and fail to stimulate cholesterol esterification in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res.* 171:123-131. 1990
- Henriksen, T, Mafoney, EM and Steinberg, D. Enhanced macrophage degradation of biological modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 3:49-159. 1983
- Henriksen, T, Mahoney, E, and Steinberg, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells : Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:6499- 6503. 1981
- Harborne, JB, Mabry, TJ. and Mabry, H: *The flavonoids*. London: Chapman and Hall p.12-17. 1975
- Herrmann, K. Flavonols and flavones in plants, A review. *J. Food Technol.* 11:433-448. 1976
- Renaud, D and Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 239:1523-1525. 1993
- Kandaswami, C and Middleton, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 366:351-376. 1994
- Ratty, AK and Das, NP. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation, Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 39:69-79. 1988
- Hackett, AM. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structural Activity Relationships*. Alan R. Liss, New York, NY USA, p. 177-194. 1986
- Das, NP. Studies on flavonoid metabolism: Absorp-

- tion and metabolism of (+)-catechin in Man, *Biochem. Pharmacol.* 20:3235-3445. 1971
15. Pierpoint, WS. Flavonoids in the human diet. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships. Alan R. Liss, New York, NY USA, p.125- 140. 1986
 16. Blois, MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 4617:1198-1221. 1958
 17. Havel, RJ, Eder, HA and Bragdon, JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34:1345-1353. 1985
 18. Esterbauer, H, Striegl, G, Puhl, H and Rotheneder, M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* 6: 67-75. 1989
 19. Yagi, KA. Simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15:212-216. 1976
 20. Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL and Randell, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1951
 21. Choi, U, Shin, DH, Chang, YS and Shin, JI. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 24:142-148. 1992
 22. Yu, JH, Cho, CM and Oh, DH. Antioxidant properties of red pepper peel extract on margarine. *Korean. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 9:21-27. 1981
 23. Wee, JH and Park, KH. Isolation of 4-hydroxycinnamic acid, 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid, and 3,4-dihydroxybenzoic with antioxidative and antimicrobial activity from peanut (*Arachis hypogaea*) shell. *Food Sci. Biotechnol.* 10:551-556. 2001
 24. Cho, JY, Moon, JH. and Park, KH. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxy-cinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32:1403-1408. 2000
 25. Yoon, I, Cho, JY, Kuk, JH, Wee, JH, Jang, MY, Ahn, TH and Park, KH. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34:898-904. 2002

(2003년 12월 29일 접수)