

蒼耳子로부터 항산화 유효 성분의 분리

이윤미 · 강대길 · 김명규 · 최덕호 · 이호섭*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Isolation of Antioxidants from the Seeds of *Xanthium strumarium*

Yun Mi Lee, Dae Gill Kang, Myung Gyu Kim, Deok Ho Choi, Ho-Sub Lee*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

In the courses of *in vitro* screening for the antioxidant effect of the various extracts from medicinal plants, n-BuOH soluble extract of the seeds of *Xanthium strumarium* was found to exhibit distinctive antioxidant activity. Further purifications of this extract as guided by *in vitro* antioxidant assay afforded caffeic acid and 3,5-di-O-caffeoyl quinic acid, which scavenged 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical in a dose-dependent manner of which IC50 values were 23.4 µg/ml (132.9 µM) and 29.8 µg/ml (57.9 µM), respectively.

Key words : *Xanthium strumarium*, antioxidant, active components

서론

최근 한약을 비롯한 천연물 중심으로 한 학문이 크게 발전하고 천연물 성분 중에 함유된 생리 활성 물질에 관한 관심이 증대됨에 따라 천연물에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생리활성 물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가 가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며 새로운 물질들이 연구 개발되고 있다¹⁻³⁾. 인간을 포함한 모든 호기성 생물은 산소(O₂)를 이용하여 생체 내 미토콘드리아에서 에너지를 생산하여 생존하고 있다. 그러나 인체의 생명유지에 필수적인 산소는 각종 물리적, 화학적, 생물학적인 스트레스를 받으면 생체 내에서 활성화되어 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등과 같은 생체에 유해한 활성 산소종(reactive oxygen species)으로 변환한다.

이들 활성 산소종은 생체막의 지질을 과산화 시켜 생체막을 변질시킴으로써 인체에 치명적인 생리적인 장애를 일으키고, 노화 동맥경화 당뇨병 암등을 유발 한다^{4,6)}. 최근 노화와 성인병질환의 원인 중 하나가 활성 산소종에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 활성 산소종을 억제할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 BHT(butylated hydroxyl toluene), BHA(butylated hydroxylanisole), Trolox C 등 합성 항산화제가

많이 개발되어 의약품과 식품분야에서 이용되고 있다. 또한 천연물로부터 항산화제가 분리되었는데, 주요 천연 항산화제로서는 ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, maillard reaction products, amino acids, peptides, phospholipids 및 flavonoids 등이 알려져 있다⁷⁾. 한약재에도 다양한 항산화 成分을 포함하고 있는데, 葛根에는 daidzin 과 puerarin 등이 포함되어 있고⁸⁾, 淫羊藿에는 여러 종류의 tocopherol과 flavonoids 가 함유되어 있으며⁹⁾, 漆樹皮에는 gallic acid¹⁰⁾, 覆盆子에는 quercetin 등¹¹⁾의 항산화 활성 성분이 포함되어 있다.

蒼耳子是 菊花科의 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.) 또는 대꼬리의 열매이며 우리나라의 들판에 널리 분포하는 일년생 草本으로 日本, 滿洲, 中國, 臺灣, 필리핀 등 아시아, 유럽, 북아메리카에 분포 한다^{12,13)}. 韓方에서 蒼耳子는 惡性 腫瘍에 鎮痛劑로도 사용하고 蒼耳子 물 추출물은 慢性 鼻炎, 關節炎, 神經痛, 免疫 기능을 활성화하는 작용이 있다는 보고도 있다^{13,14)}. 우리는 최근에 韓藥材의 溶媒 추출물의 항산화 활성을 檢索한 바 있다. 그 결과 蒼耳子의 butanol 추출물이 superoxide radical 掃去能과 활성산소종에 의한 溶血과 過酸化 脂質의 생성을 억제하는 효과가 뛰어난 것으로 밝혀졌다¹⁵⁾. 하지만 蒼耳子의 항산화 活性을 나타내는 성분에 관한 연구는 현재까지 보고 된 바 없다.

이 연구에서는 蒼耳子의 항산화 활성을 관찰하기 위하여 추출법과 여러 가지 크로마토그래피에 의한 항산화 효과가 있는 유효 성분을 분리하고, 그 유효 성분의 항산화 활성 정도를 측정 한 후, 화학적 구조 분석을 하였다.

* 교신저자 : 이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학
· E-mail : host@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6841
· 접수 : 2004/03/12 · 수정 : 2004/04/06 · 채택 : 2004/05/07

재료 및 방법

1. 실험 재료

이 실험에 사용한 추출용 시료 조귀子는 전북 익산의 한약 건재상에서 건조된 것을 구입하여 미세하게 분쇄한 뒤 추출용 시료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

1) 추출

창이자 추출을 위해 사용된 용매로는 n-hexane, ethylacetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH), methanol (MeOH), 3차 증류수를 사용했으며, 여과를 위해 filter paper (Whatman No.4: 110 mm) 를 사용했다. 減壓濃縮을 위해 회전식 진공농축기(Eyela, Japan) 를 이용하였다.

2) 生理活性物質의 分離 및 동정

Thin layer chromatography (TLC)는 silica gel plate (0.25 mm, polygram sil N-HR/UV254E, Merck, Germany)를 사용하였으며, silica gel (Kiesel 60, 230-400 mesh)은 Merck제품을, sand는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 이용했고, glass column (3.5 cm x 25 cm, Korea)을 사용했다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC, CAVRO, model MSP 9000, USA)를 사용하였고, HPLC로 분리된 물질은 NMR Spectrophotometer (JEOL-ECP 500, Japan)를 사용하였으며, chemical shift는 ppm으로, 내부 標準物質은 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, 용매는 D₂O, acetone-d₆를 사용하였다.

3) DPPH법에 의한 항산화 활성의 檢索

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 ascorbic acid (Vitamin C), BHA는 Kanto제품(Japan)을 사용하였으며, ELISA Reader (Bio-tek instruments, Inc, USA)를이용하여 흡광도를 측정하였다.

3. 실험 방법

1) 추출

본 연구에서는 창이자 12 kg을 MeOH 3 L에 넣고 1주일 동안 상온에서 추출한 후 여과하고 농축하여 MeOH 추출물 57.4 g을 얻었다. 이를 탈 이온수에 현탁시켜 n-hexane으로 분획한 결과 n-hexane층 7.8 g을 얻었고 EtOAc를 넣고 분획하여 EtOAc층 2.7 g을 얻었으며, 수층에 다시 n-BuOH를 넣고 분획하여 n-BuOH층 9.6 g을 얻었다.

2) 생리 활성물질의 분리

n-BuOH 추출물 9.6 g을 100 ml 둥근 플라스크에 넣고, MeOH (20 ml)을 넣어 녹인 후, 실리카겔 4.0 g을 넣어 용매를 감압 증류시켜 silica gel에 loading 시켰다. loading된 n-BuOH 추출물을 다시 silica gel 60 g이 충전된 column에 넣어 MeOH 과 H₂O로 용리시켜 분획을 얻어 용매를 감압 농축 시켜, 분획 1 (4.358 g), 분획 2 (2.347 g), 분획 3 (300 mg), 분획 4 (144 mg), 분획 5 (373 mg), 분획 6 (584 mg), 분획 7(166 mg)을 얻었다. 이들 7개의 분획으로 항산화 활성 실험을 한 결과분획 2에서 활성

을 나타내었다. 활성이 나타난 분획 2의 2.347 g을 100 ml 둥근 플라스크에 넣고, MeOH(5 ml)을 넣어 녹인 후, C18 gel 1 g을 넣어 용매를 감압 증류시켜 C18 gel에 loading 시켰다. loading 시킨 분획 2를 다시 C18 gel 60 g이 충전된 Flash column에 넣어 MeOH과 H₂O로 용출시켜 분획 2-1 (20.1 mg), 분획 2-2 (24.9 mg), 분획 2-3 (120.8 mg), 분획 2-4 (129.3 mg), 분획 2-5 (312.2 mg), 분획 2-6 (141.7 mg), 분획 2-7 (98.3 mg), 분획 2-8 (69.9 mg), 분획 2-9 (39.9 mg), 분획 2-10 (30.1 mg), 분획 2-11 (50.7 mg), 분획 2-12 (123.6 mg), 분획 2-13 (203.6 mg)을 분리하였다 (Fig. 1). 위의 분리한 13개의 분획을 TLC로 확인하고 항산화 활성 실험을 한 결과, 활성이 나타난 분획 3과 분획 4를 합하여 HPLC로 분리하여 2개의 분획을 얻었고 각 분획에 대해 항산화 활성 실험을 하였다.

Thin layer chromatography 실험 : TLC는 methyle chloride 와 methanol 혼합 용매를 이용하여 전개시킨 후, TLC plate를 UV lamp와 iodide로 발색 시켜 확인하였다.

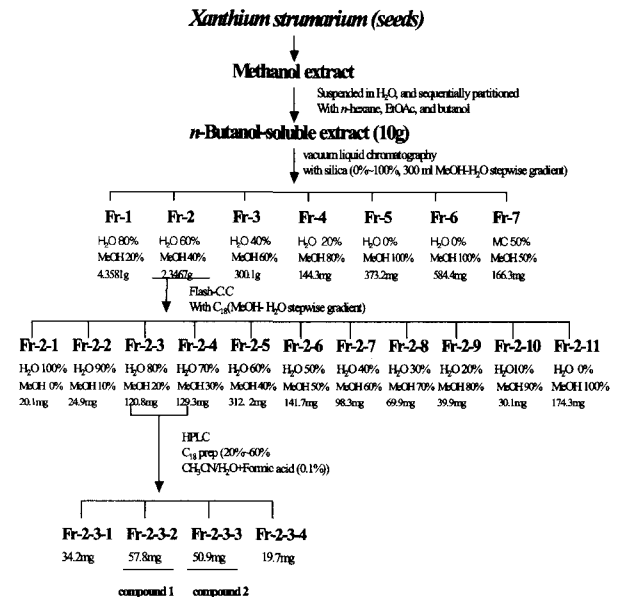


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures for antioxidant components from the seeds of *Xanthium strumarium*

3) DPPH법에 의한 항산화 활성의 檢索

창이자 추출물의 분획물을 10 mg/ml의 농도가 되도록 50% EtOH에 녹인 후의 농도 수준으로 시료를 준비하였으며 항산화 활성은 free radical인 DPPH를 이용하여 항산화 활성 검증 법으로 조사하였다. DPPH 용액은 MeOH에 0.1 mM의 농도로 준비하였다. 시료를 50% EtOH에 완전히 녹여 준비하고, 96 well plate에 시료 10 µl와 DPPH 용액 190 µl를 첨가하여 30분간 실온에 방치한 후 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 기존의 항산화제인 vitamin C 및 BHA로 창이자의 항산화 활성 측정값과 비교하였다.

% Scavenging activity

$$= A517 (\text{control}) - A517 (\text{sample}) / A517 (\text{control}) \times 100$$

결 과

1. 추출물의 항산화 효과

1) MeOH 추출물의 분획 별 항산화 활성

참이자를 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, 물로 분획 한 후 얻는 각각의 추출물을 가지고 항산화 활성을 측정하였다. Table 2와 같이 n-hexane, H₂O 추출물은 항산화 효과가 없었으며, EtOAc, n-BuOH 추출물은 항산화 효과가 나타났다 (Table 1).

Table 1. DPPH radical scavenging activities of solvent-partitioned fractions from MeOH extract of the seeds of *Xanthium strumarium*

Voucher specimens number	Partition solvents	Scavenging activity (%)*
DH58-1	n-Hexane	4.00
DH58-2	EtOAc	26.76
DH58-3	n-BuOH	60.72
DH58-4	H ₂ O	2.00

* 100 µg/ml 분석 (n=3)

Table 2. DPPH radical scavenging activities of fractions of silica gel chromatography

Fraction numbers	Scavenging activity (%)*
DH58-3-1	45.05
DH58-3-2	69.51
DH58-3-3	71.81
DH58-3-4	51.90
DH58-3-5	27.12
DH58-3-6	2.44
DH58-3-7	-1.52

* 100 µg/ml 분석 (n=3)

2) n-BuOH의 분획의 항산화 활성

참이자의 n-BuOH 추출물은 높은 수율과 항산화 활성을 나타내므로 silica gel column chromatography법으로 분리한 후 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성이 분획 2 (69.53%), 분획 3 (71.85%), 분획 4 (51.18%)에서 높게 나타났다 (Table 2).

3) DH583-2 분획의 항산화 활성 측정

위의 n-BuOH 추출물에서 좋은 항산화 효과를 보이고 높은 수율을 보이는 분획 2를 C18-flash column chromatography 법으로 분리하였고, Table 3의 13개 분획 중 분획 3, 분획 4에서 특히 높은 활성을 나타내었다.

Table 3. DPPH radical scavenging activities of fractions from C₁₈ column chromatography

Fraction numbers	Scavenging activity (%)*
DH58-3-2-1	20.80
DH58-3-2-2	33.61
DH58-3-2-3	72.56
DH58-3-2-4	76.97
DH58-3-2-5	49.06
DH58-3-2-6	32.62
DH58-3-2-7	36.31
DH58-3-2-8	33.06
DH58-3-2-9	22.81
DH58-3-2-10	12.07
DH58-3-2-11	3.80
DH58-3-2-12	-1.54
DH58-3-2-13	-4.79

* 100 µg/ml 분석 (n=3)

4) HPLC 분리 분획의 항산화 활성 측정

DH 58-3-2에서 분리한 여러 분획의 항산화 활성을 비교하여, 좋은 항산화 활성을 보이고 높은 수율을 보이는 분획 3을 reversed-phase HPLC를 이용하여(기울기가 20에서 60% CH₃CN 수용액, 50 min 간) 순수 화합물 1, 2를 얻었다(Table 3).

5) 분리된 순수 화합물 1, 2의 항산화 활성

HPLC를 이용하여 얻는 순수 화합물 1, 2의 항산화 활성을 비교한 결과 Fig. 2와 같이 측정 되었다.

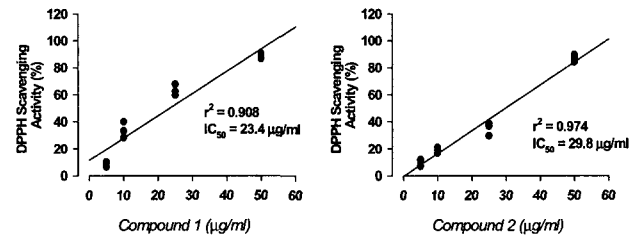


Fig. 2. Dose-dependent DPPH radical scavenging activities of active principles isolated from the seeds of *Xanthium strumarium*

2. 항산화 화합물의 구조분석

1) NMR spectrum 분석

여러 분리단계를 거친 후 순수하게 얻어진 참이자의 추출물의 화학 구조 동정에는 NMR을 사용하였다.

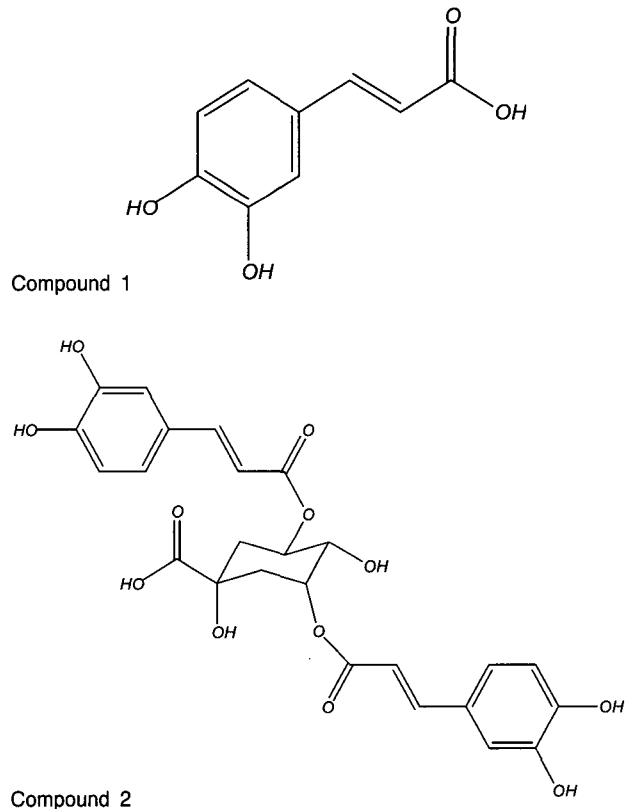


Fig. 3. Chemical structures of caffeic acid (compound 1) and 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (compound 2) isolated from the seeds of *Xanthium strumarium*

Compound 1.

¹H NMR (500 MHz, acetone-d₆): δ 6.33 (1H, d, J=15.55), δ 6.82 (1H, d, J=8.25), δ 6.97 (1H, dd, J=1.85, 1.85), δ 7.11 (1H, d, J=1.85), δ 7.56 (1H, d, J=16.05) ; ¹³C NMR: δ113.2, 114.3, 115.6, 122.1, 126.1, 145.6, 146.6, 148.5, 166.5

Compound 2.

¹H NMR (500 MHz, acetone-d₆): 2.18 (1H, m), 2.31 (1H, ddd, J=2.73), 3.62 (3H, m), 4.01 (1H, dd, J=4.8), 5.41 (2H, ddd, J=5.0), 6.20 (1H, d, J=14.0), 6.30 (1H, d, J=15.5), 6.87 (2H, dd, J=4.1), 7.01 (2H, dd, J=1.85), 7.13 (2H, dd, J=2.3), 7.52 (1H, d, J=18.3), 7.55 (1H, d, J=18.3) ¹³C NMR: 29.41, 34.62, 70.75, 71.16, 73.33, 113.77, 113.92, 114.25, 115.12, 121.64, 121.71, 126.47, 126.58, 145.46, 145.70, 145.93, 148.18, 148.27, 166.68, 167.70, 175.93.

이 결과는 문헌^{16,17}과 비교하여 이 화합물이 caffeic acid와 3,5-di-O-caffeoylquinic acid임을 확인하였다.

고찰 및 결론

인간을 비롯한 모든 生物體들은 산소를 이용하여 생명 유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 活性酸素(·O₂, H₂O₂·OH)들의 傷害에 대한 근본적인 자기 방어기구를 가지고 있다. 조직의 방어기구에서 해리 되지 못한 활성산소는 노화 등의 생리적 변화나 癌, 關節炎, 糖尿 등의 광범위한 生體 현상에 관여하여 직접 또는 간접적으로 생체의 障礙를 일으키는 원인으로 알려져 있다^{18,19}. 유해산소로 알려져 있는 活性酸素는 삼중항산소(3O₂)가 환원되면서 superoxide radical(O₂·), 과산화 수소(H₂O₂), hydroxyl radical (·OH) 등이 생성된다. 이러한 활성산소가 정상적으로 소거되지 않았을 때 free radical로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해져 老化나 癌 등의 여러 가지 成人病의 원인이 되고 있다²⁰. 또한 생체 내에서는 다량의 산소가 여러 활성산소의 생성 기회를 제공하여 세포의 생체막 구성 성분인 다가 不飽和脂肪酸를 공격하여 생성된 過酸化 脂質이나 酸化 分解物이 DNA나 RNA 蛋白質 막 조직에 작용하여 疾患을 유발한다고 알려져 있다²¹. 이를 老化나 성인병 등의 질환은 활성산소가 원인이 되며 조절 할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생체 내 효소계인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등과 천연 항산화제인 tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione 등은 활성 산소에 의한 지질의 산화를 억제하여 成人病을 豫防하고 나아가 發癌과 老化를 억제해준다^{22,23}.

참기름이라는 열매는 거풍, 解熱, 解毒, 殺蟲의 효능이 있어 풍한, 두통, 비염, 치통, 사지경련, 피부소양을 치료하는 효과가 있다는 보고가 있다^{14,16}. 이 연구는 천연 항산화제 개발 연구의 일환으로 활성산소로부터 야기되는 疾患의 치료에 이용되는 항산화 물질을 韓藥材로부터 개발하고자 이에 참기름의 MeOH 추출물과 분획 추출물에 대한 항산화 활성을 측정하여 다음의 결과를 얻었다. DPPH radical 소거를 통한 참이차 MeOH 추출물

을 각 극성 별로 분획하여 얻어진 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, H₂O 추출물에 대하여 측정한 결과 n-BuOH 추출물이 가장 강한 활성을 나타내었다. n-BuOH 추출물을 silica gel column chromatography을 거쳐 C₁₈ column chromatography로 분리한 분획들을 DPPH radical 소거법을 사용하여 측정한 결과 분획 2-3이 가장 강한 활성을 나타내었다. 분획 2-3을 HPLC 분리 후 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrophotometer 분석 결과 caffeic acid와 3,5-di-O-caffeoylquinic acid임을 알 수 있었다. 참이차로부터 분리한 caffeic acid와 3,5-di-O-caffeoylquinic acid의 DPPH radical 소거 능력인 IC₅₀은 각각 23.4 µg/ml (132.9 µM)와 29.8 µg/ml (57.9 µM)이었다.

이상의 결과로 참기름의 n-BuOH 추출물에서 순수 분리한 caffeic acid와 3,5-di-O-caffeoylquinic acid는 DPPH radical 掃去 능력이 높은 점으로 보아 참기름 抗氧化能에 대한 有效 成分일 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 두뇌한국 21(BK-21) 사업의 지원과 보건복지부의 뇌질환 한방연구센터 (03-PJ9-PG6-SO02-0001)의 연구비 지원에 의해 수행 되었습니다

참고문헌

1. 강삼식, 윤해숙, 장일무. 천연물 과학. 서울대학교 출판부, 서울, p. 71, 1988.
2. 우원식. 천연물 화학 연구법. 민음사, 서울, p. 73, 1986.
3. James Giese, Antioxidants; Tools for preventing Lipid Oxidation. Food Technol. 73, 1966.
4. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of Prunus domestica. Sci Food Agric, 1959.
5. Dimberg LH, Theander O. A group of phenolic antioxidants in oats. Cereal Chem, 70(6): 637-41, 1993.
6. Decker EA. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. Nutr Rev, 53(3): 49-58, 1995.
7. Hahn TS, King DL, Min DB. Food Antioxidants. Food Biotechnol. 2(1): 1-8, 1993.
8. 김성렬, 김진환, 김승겸. 음악과 추출물 중의 항산화 성분의 분리 및 성질. 한국식품과학회지 24(6), 535-540, 1992.
9. 박종욱, 김경순, 지영애, 류병호. rkfrmsdptj 분리한 daidzin 및 puerarin의 사람 low density lipoprotein에 대한 항산화 효과. 한국식품영양과학회지 26(1), 25-31, 1997.
10. Kim JB. Identification of antioxidative component from stem bark of Rhus verniciflua. Kor J Food & Nutr 16(1), 60-65, 2003.
11. 윤인, 위지향, 문제화, 안태희, 박근형. 복분자 열매에서 항산화 활성을 지닌 quercetin의 분리 및 동정. 한국식품과학회지

- 35(3), 499-502, 2003.
12. 안덕균. 한국 본초(1), 도감. 교학사, p. 19, 1998.
 13. 배기환. 한국의 약용식물. 교학사, p. 514, 1999.
 14. 최옥자. 약초의 성분과 이용. 과학·백과사전 출판사 엮음, 일월서각, pp. 634-35, 1994.
 15. Kang DG, Yun C, Lee HS. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J Ethnopharmacology* 87(2-3):231-6, 2003.
 16. Ma YT, Huang MC, Hsu FL, Chang HF. Thiazinedione from *Xanthium Strumarium*. *Phytochemistry*. 46(6): 1083-85, 1998.
 17. Oh H, Kang DG, Lee SY, Lee HS. Angiotensin converting enzyme inhibitors from *cuscuta japonica*. *J Ethnopharmacology*. 83: 105-08, 2002.
 18. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42: 569-605, 1991.
 19. Fukuzawa K, Takaishi Y. Antioxidants. *J Act Oxyg Free Rad*. 1: 55-70, 1990.
 20. Pryored WA. Free radicals in biology. Vol. VI 371, Academic press. 1984.
 21. 김삼인. 농산부산물에서 항산화 활성 물질의 검색. 단국대학교, 석사학위 논문, 1996.
 22. Von JH, Elbe SJ. Food Colorants. In "Colorants". Marcel Dekker Inc., London, p. 651, 1994.
 23. Salonen TT, Herttaala Y. Natural antioxidants & food quality in atherosclerosis and cancer prevention, in role of oxidative stress in atherosclerosis and cancers. *Royal Soc Chemistry*, London. p. 3, 1996.