

국산 산사나무 잎으로부터 항산화 활성성분의 분리

강인호 · 차자현 · 한정훈 · 이성완 · 김홍진 · 권석형 · 함인혜 · 황보식¹ · 황원균*

중앙대학교 약학대학, ¹(주) 렉스진바이오텍

Isolation of Anti-oxidant from Domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge Leaves

In-Ho Kang, Ja-Hyun Cha, Seong-Wan Lee, Hon-Jin Kim, Suck-Hyung Kwon,
In-Hye Ham, Bo-Sik Hwang¹, and Wan-Kyun Whang*

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

¹Recks-Jin Biotech., Emseong-gun, Chungbuk 369-831, Korea

Abstract – In order to find the antioxidative compounds, fractionation of the MeOH extract of the leaves of *Crataegus pinnatifida* guided by DPPH scavenging test furnished seven phenolic compounds, quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (1), myricetin-3-O-rhamnose (2), quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-galctopyranoside (3), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (4), quercetin (5), apigenin-8-C- β -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (2"-O-rhamnosylvitexin) (6) and (-)-epicatechin (7). All of isolated compounds showed the significant antioxidative effect on DPPH free radical scavenging test and TBARS assay.

Key words – *Crataegus pinnatifida*, Anti-oxidant, DPPH, LDL

최근 노화 및 노화에 관련된 각종 퇴행성 질환과 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병, 순화기 장애, 관절염, 암 등의 질병이 사회적 문제가 되고 있으며 그 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 산소 유해설이 점차 인정받고 있다.^{1,2)} 활성산소는 특히 세포 생체막의 인지질 중 불포화 지방산을 공격하여 과산화 지질을 생성하고 축적함으로써 생체 기능을 저하시키고 동시에 DNA를 손상시키거나 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화 및 성인병과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 따라서 활성산소를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되어 효소계열의 예방적 항산화제인 SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 등과 천연항산화제인 phenol성 화합물, flavone 유도체, tocopherols, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등이 있으며 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxy anisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate), TBHQ(t-butylhydroquinone) 등 많은 항산화제가 개발되어 있으며,⁵⁻⁸⁾ 천연항산화제 개발연구제로는 주로 방선균 등 미생물 대사산물^{9,10)}을 비롯하여 버섯류,¹¹⁾

조류, 식물, 동물, 식품 중 다류¹²⁾ 등 매우 다양하다. 항산화 활성 측정방법은 ESR(electro spin resonance) 기기를 사용하여 free radical을 직접 소거하는 활성을 측정할 수도 있으나, 주로 간접적인 방법으로 radical과 반응하여 그 성질이 변하는 DPPH radical 소거활성, superoxide radical 소거 활성 및 지질과산화 억제활성을 측정하여 항산화활성을 평가하고 있다.^{13,14)} 따라서 최근에는 각종 생약추출물 등에서 보다 안전하고 항산화효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾

본 연구는 *Crataegus* 속 식물의 민간적 응용을 비롯한 항산화작용^{19,20)}을 통한 생체보호효과 · 지질 및 체지방의 증가 억제²¹⁾ · 고지혈증의 개선²²⁾ · 항균효과^{23,24)} 등이 있는 것으로 생리활성 보고가 있음에 착안하여 산사나무의 잎으로부터 천연 항산화제 개발의 일환으로 실시하였으며, 산사나무 잎의 메탄올 엑스의 세부 분획을 activity guided fractionation 방법에 따라 DPPH radical에 대한 scavenging activity 측정과 LDL의 lipidperoxidation을 이용한 TBARS assay를 통해 항산화 효과를 평가하고, 활성분획으로부터 여러 가지 column chromatography를 실시하여 성분을 단리 규명하고, 항산화 효과를 통해 의약품 및 기능성 식품 자원으로서의

*교신저자(E-mail) : whang-wk@cau.ac.kr
(FAX) : 02-816-7338

개발을 목적으로 진행하였다.

재료 및 방법

재료의 채집 및 확인 - 본 실험에 사용한 산사나무 (*Crataegus pinnatifida*)의 잎은 서울 흑석동에서 채집하여 중앙대학교 약품자원식물학 교실에서 식물학적 감정을 거친 후 음건한 후 5 kg을 재료로 사용하였다.

시약 및 기기 - UV/VIS는 Human TU-1800PC(KOREA)를 Centrifuge는 Centrikon T-1180 (Italy)를 사용하였다. FAB-MS spectrometer측정에 사용된 것은 VG 70-VSEQ (England)이고 Source는 ionized by 35 keV Cs⁺ ion beam를 Matrix는 glycerol을 사용하였다. ¹H-NMR spectrometer는 Varian Gemini 2000, 300 MHz (USA)를 ¹³C-NMR spectrometer는 Varian Gemini 2000, 75 MHz (USA)를 사용하였다. TLC 확인시험에는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany)를 사용하여 이동상 CHCl₃ : MeOH : H₂O (70:30:4, 6:4:1, 80:20:2.5)와 EtOAc : EtOH : H₂O (8:2:1)의 조성을 이용하였고 detection으로는 Ethanolic-FeCl₃ solution와 10%-H₂SO₄ in EtOH (heating)에서 발색을 하였고 UV-lamp (254 nm)에서도 확인을 하였다. 컬럼은 Diaion HP-20 (Nippon Rensui Co., Japan), Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia, Sweden), MCI gel CHP20P (75~150 μm, Mitsubishi, Japan), ODS gel (400~500 mesh, Waters, USA)를 사용하였고 시약으로는 L-Ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ethylenediaminetetraacetic acid-2Na, human plasma LDL, potassium bromide sodium azide, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, trichloroacetic acid (Sigma Chemical Co., U.S.A.), thiobarbituric acid (Fluka Chemika, Germany)를 사용하였다.

시약의 제조 - 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 DPPH 39.4 mg을 ethanol에 용해시켜 1000 ml이 되도록 용시 조제한다. Phosphate buffered saline (PBS : pH 7.4)은 Na₂HPO₄ 3.58 g, NaCl 8.77 g, NaN₃ 0.20 g에 증류수를 가하여 1000 ml이 되도록 조제한다. 1 mM CuSO₄ 용액은 CuSO₄ 0.025 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다. 1 mM EDTA 용액은 EDTA-2Na 0.029 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제하고 1% TBA 시액은 thiobarbituric acid 1 g에 0.05 N NaOH를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다. 25% TCA 시액은 trichloroacetic acid 25.0 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제하며 10 nM 1,1,3,3-tetraethoxypropane 용액은 (TBARS 시험용 MDA 표준용액) 0.022 g을 PBS에 가해 10 ml이 되도록 한 후 이 용액의 0.1 ml를 취하여 PBS로 희석시켜 100 ml이 되도록 하며 용시 조제한다.

생약의 추출 및 엑스의 제조 - 음건한 산사나무 잎 5 kg

을 MeOH을 가하여 상온에서 1주일간 추출한 다음 저온 농축하여 엑스 502.5 g을 얻었으며 이 MeOH 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 CHCl₃를 가하여 진탕 반복추출하고, 분액깔때기에서 분획하여 CHCl₃층과 수층을 분취한 후 이를 감압농축하여 CHCl₃ 엑스 227.5 g을 얻었으며 남은 물층을 Diaion HP-20을 이용하여 column chromatography를 실시하여 물 분획물 160 g, 30% MeOH 분획 55 g, 60% MeOH 분획 39 g, 100% MeOH 분획 1.25 g을 각각 얻었다.

항산화작용측정 (DPPH법) - Hatano 등의 방법²⁵⁾에 의하여 각 부분별 농축 건조물을 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 ppm(99.5% ethanol)의 6가지 농도로 조제한 용액 0.1 ml(control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH용액(99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm(99.5% ethanol)의 6가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC₅₀치(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 μl 농도)로 나타내었다.²⁶⁾

$$EDA(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

TBARS assay를 이용한 LDL 지질과산화에 미치는 영향 - Human plasma LDL(400 μg 단백질), 1 mM CuSO₄ 16 μl, 농도별로 조제한 각 시료(25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm) 100 μl에 PBS(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 ml가 되도록 한다. Vortex mixer로 혼합하여 37°C 수욕 상에서 4시간 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μl를 첨가하여 산화를 중지시킨다. 산화된 LDL용액에 25% trichloroacetic acid 1 ml를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상등액에 1% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하여 95°C에서 발색시킨 후 냉각시킨다. 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정한다.²⁷⁻²⁹⁾

MDA 표준시료로는 10 nM 1,1,3,3-tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용한다.

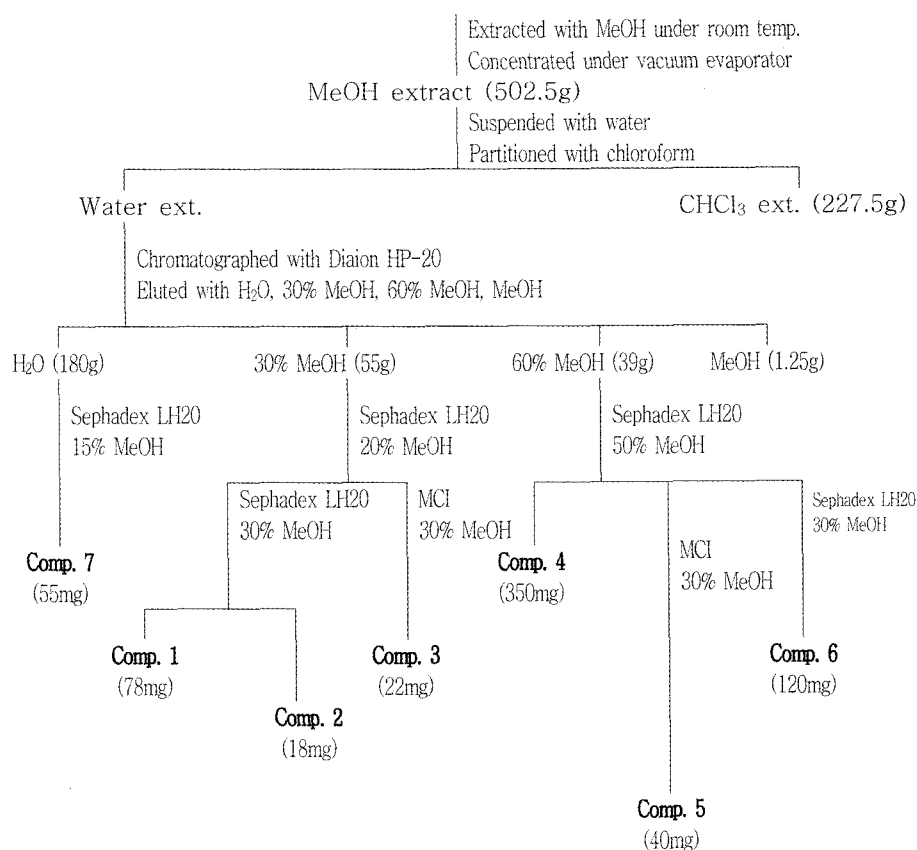
$$\text{MDA 농도 (nM/ml)} = (f/F) \times 10$$

F: 표준시료의 흡광도 (532 nm)

f: 검체의 흡광도 (532 nm)

각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해 Cu²⁺에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억

Leaves of *Crataegus pinnatifida*(5kg)



Scheme 1. Extraction and isolation of the compounds from the leaves of *Crataegus pinnatifida*.

제하는데 필요한 시료의 농도(IC_{50})을 측정한다.

Compound 1 – m.p. : 214–215°C. IR ν_{KBr}^{max} cm^{-1} : 3422 (OH), 2936 (CH), 1660 (C=O), 1507 (C=C), 1057 (glycosidic C-O). (–)FAB-MS(m/z) 609[M-H][–], 447[M-Glc-H][–], 301[M-Rha-Glc-H][–]. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 7.55 (1H, s, H-2'), 7.52 (1H, s, H-6'), 6.84 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.34 (1H, d, $J=6.6$ Hz, anomeric Glc H), 4.38 (1H, s, anomeric Rha H), 0.98 (3H, d, $J=6.3$ Hz, Rha CH₃) ¹³C-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

Compound 2 – m.p. : 199–200°C. IR ν_{KBr}^{max} cm^{-1} : 3268 (OH), 1665 (C=O), 1611, 1512 (anomeric C=C), 1201 (glycosidic OH), 977, 835 (anomeric ring C-H). (–) FAB-MS(m/z) : 467[M-H][–], 321[M-Rha-H][–]. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 6.90 (2H, s, H-2', 6'), 6.30 (1H, s, H-8), 6.14 (1H, s, H-6), 5.27 (1H, s, anomeric Rha-H), 0.91 (3H, d, $J=6.0$ Hz, Rha-CH₃). ¹³C-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

Compound 3 – m.p. : 186–188°C. IR ν_{KBr}^{max} cm^{-1} : 3399 (OH), 2915 (CH), 1671 (C=O), 1512 (C=C). (–)

FAB-MS(m/z) : 612[M-H][–], 465[M-Rha-H][–], 302[M-Rha-Gal][–]. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 7.86 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6), 5.06 (1H, d, $J=7.8$ Hz, Gal anomer H), 4.52 (1H, s, Rha anomer H), 1.18 (3H, d, $J=6.0$ Hz, Rha-CH₃). ¹³C-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

Compound 4 – mp : 225–227°C. IR ν_{KBr}^{max} cm^{-1} : 3298 (OH), 2908 (C-H), 1665 (C=O), 1607, 1512 (C=C), 1094 (glycosidic C-O). (–)FAB-MS(m/z) : 463[M-H][–], 301[M-Gal-H][–]. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 7.67 (1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8) 6.20 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.37 (1H, d, $J=8.1$ Hz, anomer H). ¹³C-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

Compound 5 – m.p. : 311–313°C. IR ν_{KBr}^{max} cm^{-1} : 3414 (OH), 2835 (C-H), 1671 (C=C), 1535 (aromatic C=C). (–)FAB-MS(m/z) : 301[M-H][–]. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 7.68 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d,

$J=2.1$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$:
DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

Compound **6** – m.p. : 224–226°C. IR $\nu_{\text{KBr}}^{\text{max}}$ cm^{-1} : 3393
(OH), 2917 (CH), 1664, 1572, 1452 (C=C), 1188 (C-O).
(–)FAB-MS(m/z) : 578[M-H] $^-$, 431[M-Rha-H] $^-$. $^1\text{H-NMR}$:

DMSO- d_6 , δ ppm : 8.06 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.93
(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, s, H-3), 6.26 (1H,
s, H-6), 4.98 (1H, s, Rha anomeric H), 4.77 (1H, d, $J=$
9.9 Hz, Glc anomeric H), 0.47 (3H, d, $J=6.3$ Hz, rhamnosyl
CH $_3$), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

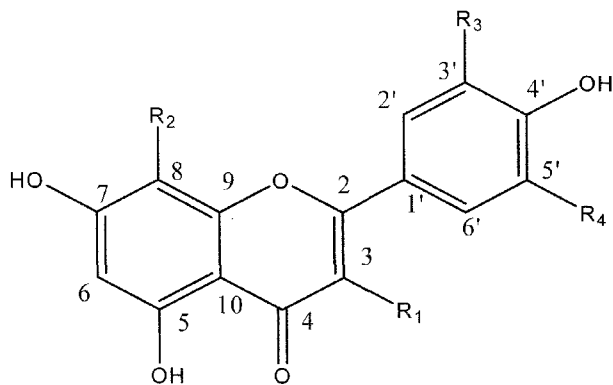
Table I. $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data of compounds 1~7 from the leaves of *Crataegus pinnatifida* in DMSO- d_6

Carbon No.	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5	Comp. 6	Comp. 7
C-2	156.7	158.7	158.7	156.6	146.5	163.1	80.0
C-3	133.5	136.5	136.1	133.7	135.4	102.3	67.6
C-4	177.7	179.9	179.7	177.8	175.6	182.1	29.3
C-5	161.5	163.4	163.1	161.5	160.5	160.7	157.9
C-6	98.9	100.0	100.2	98.9	97.8	98.2	96.6
C-7	164.4	166.1	159.2	164.6	163.7	162.5	157.6
C-8	93.7	94.9	95.1	93.7	93.0	104.4	96.1
C-9	156.9	159.7	158.7	156.5	155.9	155.8	158.2
C-10	104.1	106.0	106.2	104.0	102.6	104.0	100.3
C-1'	121.4	122.0	123.2	121.3	121.6	121.5	132.5
C-2'	115.4	109.8	116.3	115.4	114.6	129.0	115.5
C-3'	145.0	147.0	146.0	145.1	144.8	115.8	146.2
C-4'	148.7	138.1	150.2	148.7	147.4	161.2	146.0
C-5'	116.6	147.0	118.2	116.1	115.3	115.8	116.0
C-6'	121.7	109.8	123.0	122.2	121.6	129.0	119.5
Glc-1	101.0					71.5	
Glc-2	74.3					74.9	
Glc-3	76.3					79.7	
Glc-4	70.3					70.5	
Glc-5	76.3					81.7	
Glc-6	68.5					60.9	
Rha-1	101.1	103.8				100.2	
Rha-2	71.8	72.0				70.3	
Rha-3	70.6	72.0				71.3	
Rha-4	71.8	72.2				70.0	
Rha-5	68.5	72.0				68.1	
Rha-6	17.7	17.7				17.5	
Gal-1			105.7				
Gal-2			147.9				
Gal-3			74.0				
Gal-4			69.8				
Gal-5			75.3				
Gal-6			67.5				
Gal-1"				101.9			
Gal-2"				71.3			
Gal-3"				73.3			
Gal-4"				68.0			
Gal-5"				75.9			
Gal-6"				60.2			

Compound 7 – m.p. : 234~236°C. IR $\nu_{\text{KBr}}^{\text{max}}$ cm^{-1} : 3457 (OH), 1621 (C=C), 1527, 1470 (aromatic C=C), 805 (aromatic ring). (-)FAB-MS(m/z) : 291[M-H]⁻. ¹H-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : 6.97 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.80 (2H, m, H-5', 6'), 5.94 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 5.92 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 4.87 (1H, s, H-2), 4.17 (1H, s, H-3), 2.86 (1H, dd, $J=4.2, 17.0$ Hz, H-4), 2.73 (1H, dd, $J=2.7, 16.8$ Hz, H-4), ¹³C-NMR : DMSO- d_6 , δ ppm : Table I 참조.

결과 및 고찰

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – 산사나무 잎의 H₂O 분획물, 30% MeOH 분획물, 60% MeOH 분획물, MeOH 분획물을 농도별로 (50~2000 ppm) 조제하여 DPPH radical 소



Compound 1 : R₁, -O-Glc-Rha ; R₂, -H ; R₃, -OH ; R₄, -H
 Compound 2 : R₁, -O-Rha ; R₂, -H ; R₃, -OH ; R₄, -OH
 Compound 3 : R₁, -O-Gal-Rha ; R₂, -H ; R₃, -OH ; R₄, -H
 Compound 4 : R₁, -O-Gal ; R₂, -H ; R₃, -OH ; R₄, -OH
 Compound 5 : R₁, -OH ; R₂, -H ; R₃, -OH ; R₄, -H
 Compound 6 : R₁, -H ; R₂, -Glc-Rha ; R₃, -H ; R₄, -H

Fig. 1. Structure of compounds 1~6 isolated from the leaves of *Crataegus pinnatifida*.

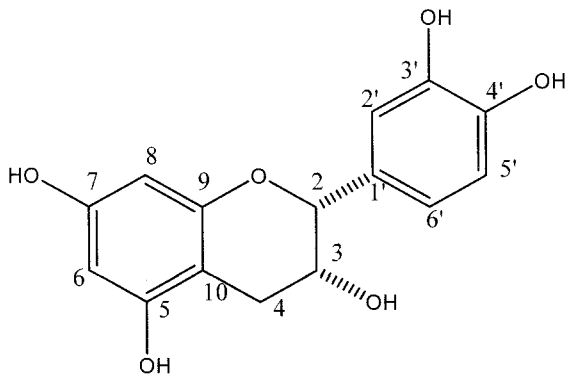


Fig. 2. Structure of compound 7 isolated from the leaves of *Crataegus pinnatifida*.

거활성을 측정 한 결과 산사나무 잎의 radical scavenging activity는 우수하였으며 대조약물인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 30% MeOH 분획, H₂O 분획, 60% MeOH 분획, MeOH 분획, CHCl₃ 분획순으로 활성이 나타났으며, 특히 30% MeOH 분획 및 H₂O 분획이 DPPH에 의한 radical scavenging activity가 우수하였으며 IC₅₀의 경우에도 30% MeOH 분획이 14.02 ± 6.66 µg/ml, H₂O 분획 역시 24.57 µg/ml로 우수한 radical scavenging activity를 나타내었고, 60% MeOH 분획은 31.68 ± 10.58 µg/ml, MeOH 분획은 38.62 ± 3.62 µg/ml로 우수한 활성을 나타내었다(Fig. 3).

LDL산화에 대한 억제효과 측정 – 산사나무 잎의 각 분획들을 50~1000 ppm의 5가지 농도에 대하여 LDL 지질과 산화에 대한 억제활성을 실험한 결과 대조약물인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 30% MeOH 분획, H₂O 분획, 60% MeOH 분획 및 100% MeOH 분획, CHCl₃ 분획 순으로 LDL에 대한 과산화지질 억제효과가 우수하였으며 DPPH를 이용한 항산화 활성 시험에서와 같이 30% MeOH 분획, H₂O 분획, 60% MeOH 분획에서 과산화지질억제 활성이 높게 나타났다. 또한 IC₅₀의 경우 30% MeOH 분획이 0.39 ± 0.50 µg/ml, H₂O 분획이 1.64 ± 0.36 µg/ml로 ascorbic acid 7.01 ± 0.22 µg/ml 보다 우수한 과산화지질 억제작용을 나타내었고, 60% MeOH 분획은 7.97 ± 0.72 µg/ml, MeOH 분획

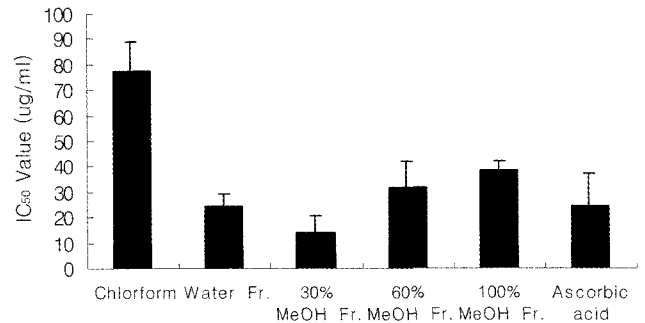


Fig. 3. IC₅₀ Values of *Crataegus pinnatifida* leaves on DPPH.

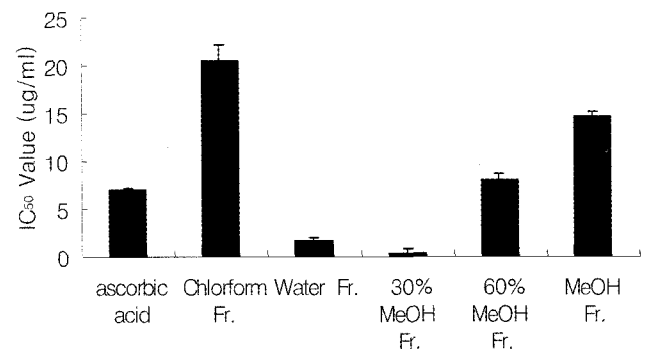


Fig. 4. IC₅₀ Value of fractions of *Crataegus pinnatifida* on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation.

은 $14.59 \pm 0.51 \mu\text{g}/\text{m}$ 로 우수한 활성을 나타내었다(Fig. 4).

분리된 성분의 항산화 활성

산사나무 잎 각각의 분획물에 대해 항산화 활성 실험 결과 우수한 활성을 보인 H_2O 분획, 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획에서 분리한 7개 compound의 항산화 활성 측정을 위해 DPPH법에 의한 각각의 radical scavenging

activity와 LDL의 지질과산화에 대한 억제 효과를 측정하였다.

DPPH를 이용한 항산화능 측정 - 각 compound를 농도별 (10~500 ppm)로 조제하여 DPPH radical에 대한 scavenging activity를 실험한 결과 대부분이 양성 대조약물로 사용한 L-ascorbic acid와 동등하거나 그 이상의 우수한 radical scavenging activity를 나타내었으며, [compound 6 < compound 1 (IC_{50} 8.31 $\mu\text{g}/\text{m}$) < compound 3 (IC_{50} 7.91 $\mu\text{g}/\text{m}$) <

Table II. The radical scavenging activities and IC_{50} values of compounds 1~7 on DPPH

Sample	EDA(%)		EDA(%)				IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{m}$)		
	Conc. (ppm)		10	20	50	100		200	500
Compound 1			9.58±0.26*	15.26±3.76	27.18±7.73	7.77±1.64**	84.50±24.13**	90.42±44.27**	8.31±0.21*
Compound 2			7.05±2.01	9.99±3.49**	29.16±16.04**	56.85±31.36**	89.73±49.23**	91.38±49.01**	7.87±0.05**
Compound 3			46.21±60.50	10.59±1.84*	23.93±2.79*	40.34±2.40*	75.42±21.74**	90.23±36.80**	7.91±1.34
Compound 4			9.67±0.00**	14.90±5.19	31.27±1.62*	58.92±1.85*	87.07±16.49**	89.28±114.90**	7.66±0.05**
Compound 5			9.16±2.92	17.19±0.00**	42.73±20.21**	77.39±43.80*	89.64±37.82**	90.14±26.49**	6.49±0.22*
Compound 6			4.17±6.10	3.48±3.95	2.56±1.38	5.22±2.64*	15.81±4.46	29.84±6.49*	41.15±4.97
Compound 7			23.24±0.52*	40.57±3.24*	67.87±39.63*	89.18±50.42*	90.42±42.70**	91.10±13.75**	3.69±0.32
L-Ascorbic acid			11.46±3.44	12.83±3.25	33.88±18.73**	66.07±34.35**	92.25±48.43**	93.67±50.76**	6.99±0.15*

Each value represents the mean±S.E. (n=2)

Significantly different from negative control : *p < 0.05, **p < 0.01

Table III. Effect of compounds 1~7 from *Crataegus pinnatifida* on Cu^{2+} -induced LDL lipid peroxidation

Sample	MDA		MDA(nmol/mg protein)				IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{m}$)		
	ppm		10	20	50	100		200	500
LDL						1.334±0.006**			
Ox-LDL						6.466±0.037			
L-Ascorbic acid			6.54±0.26*	6.64±1.71	6.59±0.41*	5.06±0.98	3.55±2.20	1.97±1.04	8.42±1.65
Compound 1			6.36±0.63*	3.63±0.14*	2.37±0.26	1.94±0.04**	1.38±0.40	1.03±0.15	2.58±0.66**
Compound 2			7.06±0.12**	6.60±0.10**	3.79±0.08*	2.08±0.18	1.60±0.08*	0.93±0.08	4.52±0.05
Compound 3			5.57±0.55*	4.42±0.48	2.44±1.01	1.74±0.16	1.59±0.31	1.38±0.34	2.42±0.50
Compound 4			5.02±0.10**	3.69±0.19*	2.44±0.27	1.65±0.31	1.48±0.31	1.23±0.12	1.12±0.01**
Compound 5			5.42±0.86	2.83±0.81	1.73±0.01**	1.56±0.15	1.30±0.18	1.19±0.26	1.52±0.90
Compound 6			7.66±0.89	8.11±1.11	5.86±0.11**	4.78±0.10**	3.34±0.44	2.28±0.16*	8.23±0.27*
Compound 7			4.79±0.19*	4.06±0.30*	2.71±0.52	1.85±0.53	1.44±0.01**	1.30±0.14	1.12±0.50

LDL : unoxidized LDL

Ox-LDL : Cu^{2+} -induced oxidized LDL

Each value represents the mean±S.E. (n=2)

Significantly different from negative control : *p < 0.05 **p < 0.01

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{[\text{Ox-LDL}] - [\text{Sample LDL}]}{[\text{Ox-LDL}] - [\text{LDL}]} \times 100$$

[Ox-LDL] : MDA of Cu^{2+} -induced oxidized LDL

[Sample LDL] : MDA of Sample added oxidized LDL

[LDL] : MDA of unoxidized LDL

IC_{50} : Required sample concentration($\mu\text{g}/\text{m}$) for 50% inhibition of Cu^{2+} -induced LDL lipid peroxidation

compound 2 (IC_{50} 7.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 4 (IC_{50} 7.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 5 (IC_{50} 6.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 7 (IC_{50} 3.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 순으로 우수한 radical scavenging activity를 나타내었다(Table II).

LDL 산화에 대한 억제효과 측정 - Water 분획물, 30% MeOH 분획물, 60% MeOH 분획물에서 분리한 각 화합물을 농도별로(10~500 ppm) LDL 지질과산화에 대한 억제활성을 실험한 결과 대조약물인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 [compound 6 < compound 2 < compound 4 (IC_{50} 2.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 3 (IC_{50} 2.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 5 (IC_{50} 1.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 4 (IC_{50} 1.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) = compound 7 (IC_{50} 1.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]로 양성대조약물로 사용한 L-ascorbic acid (IC_{50} 8.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 보다 우수한 과산화지질의 제효과를 보였다(Table III).

결 론

산사나무 잎의 MeOH Ex.를 activity guided fractionation 방법에 따라 H_2O , 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH 분획을 얻었고 이들 4가지 분획물과 CHCl_3 분획물에 대해서 DPPH radical에 대한 scavenging activity와 LDL의 lipid peroxidation을 이용한 TBARS assay로 항산화 활성을 실험하였다. 그 결과 대부분의 CHCl_3 분획을 제외한 모든 분획에서 항산화효과가 있었으며, 특히 30% MeOH 분획(IC_{50} 14.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 ascorbic acid(IC_{50} 24.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 보다 우수한 radical scavenging activity를 보였으며 [CHCl_3 분획 << 100%분획 < 60% 분획 < H_2O 분획 (IC_{50} 24.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < 30% 분획 (IC_{50} 14.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)] 또한 과산화지질 실험에 있어서도 L-ascorbic acid(IC_{50} 7.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 거의 동등한 수준의 활성 [CHCl_3 분획 < 100% 분획 < 60% 분획 (IC_{50} 7.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < H_2O 분획 (IC_{50} 1.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < 30% 분획 (IC_{50} 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]을 관찰할 수 있었다. 강한 항산화 활성이 관찰된 H_2O 분획, 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획을 gel column chromatography를 실시하여 7개의 phenolic compounds를 분리하였다. 항산화 작용이 관찰된 H_2O Fr.에서 Compound 7을, 30% MeOH Fr.에서 Compound 1, 2, 3을, 60% MeOH Fr.에서 Compound 4, 5, 6을 각각 분리하였으며 이들의 물리화학적 성상과 각종 기기분석(IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) 결과를 통해 compound 1을 quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside(rutin), compound 2는 myricetin-3-O-rhamnose, compound 3은 quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside, compound 4는 quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside(hyperoside), compound 5는 quercetin, compound 6은 apigenin-8-C- β -D-glucopyranoside(vitexin), compound 7은 (-)-epicatechin으로 확인 동정하였다. 각각의

성분에 대한 항산화 활성 실험 결과 일곱 개의 compound 모두에서 [compound 6 < compound 1 (IC_{50} 8.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 3 (IC_{50} 7.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 2 (IC_{50} 7.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 4 (IC_{50} 7.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 5 (IC_{50} 6.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 7 (IC_{50} 3.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]순으로 우수한 radical scavenging activity를 보였으며, 특히 compound 7은 ascorbic acid보다 약 2배의 강력한 활성을 보여주었다. 또한 과산화지질 실험에 있어서도 ascorbic acid(IC_{50} 8.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 거의 동등하거나 우수한 수준의 활성 [compound 6 < compound 2 < compound 4 (IC_{50} 2.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 3 (IC_{50} 2.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 5 (IC_{50} 1.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$) < compound 4 (IC_{50} 1.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) = compound 7 (IC_{50} 1.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]을 관찰할 수 있었다. 따라서 산사나무 잎으로부터 분리된 대부분의 성분들이 우수한 항산화 활성을 가지고 있고, 또한 분획 레벨에서의 활성이 성분 못지않게 우수하게 나타났으므로 앞으로 산사나무 잎의 성분과 엑스를 이용한 천연항산화물질의 의약자원으로 개발가능성이 높다고 사료된다.

인용문헌

- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effect. *Drugs*, **42**: 569.
- 木村善行, 奥田拓道 (1988) 抗酸化劑としての和漢薬, *日本臨床*, **46**: 2286.
- Fukujawa, K. and Takaishi, Y. (1990) Antioxidants, *J. Act. Oxyg. Free Rad.*, **1**: 55.
- 皆川信子 (1993) 活性酸素が關與する代表的疾患, *フアルマシア*, **29**: 1029.
- Branen, A. L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**: 59-63.
- Giese, J. (1996) Antioxidants. Tools for preventing lipid oxidation, *Food Tech.* **50**: 73.
- Hatano, T. (1995) Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols, *Natural Medicines* **49**: 357.
- Hahm, T. S., King, D. L. and Min, D. B. (1993) Food antioxidants, *Foods and Biotechnology* **2**: 1-8.
- Shin, Y., Tanaka, M., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. (1991) Structure of carquinstatin A, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomyces exofolitus*, *Tetrahedron Lett.* **34**: 4943-4944.
- Kim, W. G., Kim, J. P., Kim, C. J., Lee, K. H. and Yoo, I. D. (1996) Benzastatin A, B, C and D-New free radical scavengers from *Streptomyces nitrosforeus* 30643(I) Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties, *J. Antibiotics* **49**: 20-25.
- Lee, I. K., Yun, B. S., Cho, S. M., Kim, W. G., Kim, J. P., Ryoo, I. J. and Yoo, I. D. (1996) Betulinans A and B. two

- benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*, *J. Nat. Prod.* **59**: 1090-1092.
12. 여생규, 안철우, 이요우, 이태기, 박영호, 김선봉 (1995) 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화효과, *한국식품영양과학회지* **24**: 299-304.
 13. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **181**: 1199-1200.
 14. Pecker, L. (1990) Assay of enzymes or substances involved information to removal of oxygen radicals and derived products. Oxygen radicals in biological system. Part B. Oxygen radicals and antioxidants, *In Meth. Enzymol*, Vol **186**. Academic press, San Diego, 207-367.
 15. Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. (1995) Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 162.
 16. 최웅, 신동화, 장영상, 신재익 (1992) 식물성 천연 항산화 물질의 검색과 그 항산화력 비교, *한국식품과학회지* **24**: 142-148.
 17. 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용 (1995) 국내산 생약추출물의 항산화효과 및 생리활성, *한국식품과학회지* **27**: 80-85.
 18. 나민균, 안인파, 이상명, 홍남두, 유재국, 이찬복, 김진표, 배기환 (2001) 생약추출물의 항산화 활성 검색, *생약학회지* **32**: 108-115.
 19. 신흥목, 신동훈, 김길환 (2000) 위점막 보호효과에 대한 산사의 항산화작용과 SH기의 영향, *동의생리학회지* **15**: 127-135.
 20. 손창우, 채종구, 김길환, 신흥목 (2002) 산사의 혈관이완효능과 항산화작용, *동의생리병리학회지* **16**: 67-71.
 21. 고광재, 송용선 (1998) 산사추출액이 백서의 비만모형에 미치는 영향, *원광대논문집* **8**: 1-8.
 22. 이희자, 최명숙 (1999) 시험관법에 의한 식물 열수추출물의 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 및 acyl-CoA : cholesterol acyltransferase 활성 저해도 측정, *한국식품영양과학회지* **28**: 958-962.
 23. 최승만, 김민주, 최영호, 안호정, 윤여표 (1998) *Propionibacterium acnes*에 대한 항균효과 검색, *약학회지* **42**: 89-94.
 24. 오덕환, 함승시, 박부길, 안철, 유진영 (1998) 식품부패 및 병원미생물에 대한 천연약용식물추출물의 항균효과, *한국식품과학회지* **30**: 957-963.
 25. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., and Okuda, T. (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2016.
 26. Inkeda, N. and Fukuzume, K. (1977) Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* **26**: 343.
 27. Bash, G. T., Pearson, A. M. and Dugan, L. R. (1964) Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods: Formation of the TBA-Malonaldehyde complex without acid-heat treatment, *J. Sci. Fd. Agric.* **15**: 602-607.
 28. Domanska-Janik K. and Bourre J. M. (1990) Effect of lipid peroxidation on Na^+ , K^+ -ATPase, 5'-nucleotidase and CNPase in mouse brain myelin, *Biophys. Acta.* **1034**: 200-206.
 29. Hiroshi, O., Nobuko, O. and Kunio, Y. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.

(2005년 3월 29일 접수)