

신선초에서 분리된 flavonoid glycosides의 생리활성

심재석 · 김승덕 · 김태석* · 김경남
(주)풀무원 기술연구소

Biological Activities of Flavonoid Glycosides Isolated from *Angelica keiskei*

Jae-Seok Shim, Seung-Deok Kim, Tae-Seok Kim*, and Kyung-Nam Kim
R&D Center for Food Technology, Pulmuone Co., Ltd.

Recently, much attention has been focused on plant antioxidants, because they are expected to protect against oxidative damage, possibly preserving biological functions of cells. Antioxidant compounds were isolated from *Angelica keiskei* through extraction with 80% EtOH, and fractionations were carried out sequentially with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, and water. Two active compounds were isolated from ethyl acetate fraction by silica gel column chromatography, and were identified as isoquercitrin (quercetin-3-O- β -D-glucose) and hyperoside (quercetin-3-O- β -D-galactose). Isoquercitrin and hyperoside showed strong antioxidative potency, as revealed by evaluation of their ABTS, DPPH, OH, and H₂O₂ radical-scavenging activities, and *ex vivo* DNA damage-protecting effects.

Key words: antioxidant activity, *Angelica keiskei*, isoquercitrin, hyperoside, DNA damage protection

서 론

최근 소득 증가로 인한 생활 수준의 향상으로 인해 식품의 영양학적 측면에서 생체방어, 질병의 방지 및 회복, 노화억제 등의 건강 기능성에 대한 관심이 증가되고 있다(1). 인간의 노화현상이나 암발생 등의 각종 질병은 생체 내에서 oxidative stress에 의해 끊임없이 생산되는 활성 산소종에 기인하는 것으로 알려져 있는데, superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxy, alkoxy, hydroperoxy 등과 같은 활성 산소종들은 인간의 대사과정 중에 끊임없이 발생되어 노화와 이와 관련된 질병의 주요 인자로 작용하고 있다(2).

이러한 활성 산소종들에 의한 oxidative stress의 증가는 세포 내 성분의 산화적 손상 및 DNA 변이 등을 통하여 세포 내 항상성의 파괴를 초래함으로써 여러 가지 퇴행성 질병을 일으키고 노화현상의 촉진과 깊은 연관성이 있는 것으로 알려지는 등 oxidative stress 이론에 대한 많은 연구가 있어 왔고, 이에 대응하여 예방 및 치료할 수 있는 항산화제의 개발이 진행되고 있다(3).

이러한 노화 및 각종 질병을 예방 및 치료하기 위한 목적으로 초기에 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제들이 갖고 있는 안

전성 등의 한계를 극복하여 최근에 각종 생약재나 과일, 채소와 같은 천연물 유래의 항산화제를 개발하여 이용하려는 경향으로 변화되고 있다(4). 대표적인 천연물 유래의 항산화제는 α -tocopherol, vitamin, carotenoids, flavonoids, tannins, pycnogenol, thiazine계 화합물 등이 보고되고 있으며, 기호 식품인 차류에 기인한 epigallocatechin gallate와 같은 물질의 항산화 활성이 알려져 있다(5-8).

또한 최근에는 녹즙 섭취가 질병이 있는 경우 뿐만 아니라 일반인에게도 영양의 불균형을 해소하고 건강에 도움이 되는 천연 성분들을 공급하여 질병을 예방하고 최적의 건강을 유지하는 것으로 소개되면서 채소 녹즙의 복용에 관한 관심이 크게 증가 되었다(9). 케일, 신선초, 셀러리, 돌미나리, 당근 등의 녹황색 채소는 비타민, 무기질 등을 함유하고 있고, 이중 특히 신선초는 flavonoids 등의 유용한 phytochemical들을 다량 함유하고 있어 이들의 기능성 규명과 효과에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다(10,11).

신선초(*Angelica keiskei*)는 아열대 지방에서 자생하는 미나리과의 대형 다년생 초목으로서 명일엽, 선삼초 또는 신티초라고 불리며(12), 생리활성을 나타내는 각종 유기산, flavonoids, coumarin, saponin 등과 각종 무기질 특히 유기 게르마늄이 들어 있다고 보고되어 있다(13). 신선초의 효능은 고혈압, 간장병, 신경통 등에 민간요법으로 사용되어 왔다고 전해지고 있고, 최근에는 고지혈증 개선 및 간독성 개선 등에 관한 생리활성이 보고되어 있으나(14,15) 다양한 생리적 효능에 대한 연구가 아직 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구에는 신선초의 생리활성을 규명하는 작업의

*Corresponding author: Tae-Seok Kim, R&D Center for Food Technology, Pulmuone Co., Ltd, Seodaemun Post Office P.O. Box 146, Seodaemun-Ku, Seoul 120-600, Korea
Tel: 82-2-3277-8580
Fax: 82-2-3277-8503
E-mail: tskim@pulmuone.co.kr

일환으로써 항산화 활성을 중심으로 항산화 지표 성분을 분리하였고, 이러한 지표성분의 항산화 활성 및 DNA 손상 억제 여부를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

실험 재료인 신선초는 (주)풀무원농업에서 유기농 원료로 공급 받아 사용하였고, 원료를 동결건조하여 분쇄한 후 분말을 냉동고에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

신선초의 추출 및 분획

믹서로 분쇄한 시료 100 g과 에탄올의 농도별 추출 시 수율이 비교적 높았던 80%(v/v) 에탄올 400 mL를 혼합하고, 상온에서 이틀동안 반복추출 하였다. 이렇게 추출된 시료를 Whatman filter paper(No.2)를 이용하여 여과하고, 이 추출액을 rotary vacuum evaporator(EYELA NE1001S, Japan)로 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 동결건조하여 에탄올 추출물(12.7 g)을 제조하였다.

추출액의 분획은 용매의 극성을 이용한 계통 분획을 이용하였다. 즉, 에탄올 추출물을 농축하여 용매를 제거한 물층에 약 2배의 *n*-hexane을 가하여 *n*-hexane 분획물(1.81 g)을 얻고, 동일한 방법으로 chloroform(2.45 g), ethyl acetate(1.23 g), *n*-butanol(3.12 g)을 가하여 각각의 분획물을 얻었으며 마지막으로 남은 물층(1.05 g)을 얻었다. 이때 각각의 분획은 2회 반복하였고, 각 분획물은 rotary vacuum evaporator로 용매를 완전히 제거한 후 10% 에탄올에 녹여 항산화 실험에 사용하였다.

항산화 물질의 분리 및 정제

분획별 항산화 활성 중에서 가장 활성이 높은 분획을 이용하여 silica gel column chromatography법으로 단일 물질을 분리하였다(Fig. 1). 활성 높은 분획을 silica gel(Merck, 70-230 mesh)이 chloroform : acetone : methanol : water(5 : 3 : 2 : 0.5)의 용매 조건으로 충전된 column에서 용출시켜 총 6개의 소분획물을 얻고, 이중 활성이 높은 분획을 다시 chloroform : acetone : methanol : water(6 : 3 : 2 : 0.5)의 조건에서 용출시켜 총 3개의 소분획물을 얻었다. 총 3개의 분획물에 대한 항산화 활성을 측정하여 다시 가장 활성이 높은 분획에 대해 acetylation(16) 반응을 진행시키고 이를 *n*-hexane : chloroform : methanol(6.5 : 3 : 1)의 용매 조건으로 용출한 후 deacetylation(16)을 진행하여 최종 두 개의 단일 화합물을 얻었다.

화합물 I: Mp 235°C; UVλ_{max}(MeOH) 206, 255, 357 nm; (+NaOH) 210, 270, 325, 411 nm; (+AlCl₃) 210, 267, 398 nm; (+NaOAc) 209, 270, 364 nm; (+NaOAc/H₃BO₃) 208, 261, 296, 375 nm; ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD) δ: 7.69(1H, d, J=2Hz, H-2'), 7.59(1H, dd, J=2.0Hz, J=8.5Hz, H-6'), 6.88(1H, d, J=8.5Hz, H-5'), 6.40(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.20(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.22(1H, d, J=7.5Hz, H-1''); ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD): 178.6(C-4), 165.7(C-7), 162.4(C-5), 158.3(C-9), 157.8(C-2), 149.2(C-3'), 145.2(C-4'), 134.9(C-3), 122.3(C-1'), 121.9(C-6'), 116.7(C-5'), 115.3(C-2'), 104.8(C-10), 103.1(C-1''), 99.3(C-6), 94.1(C-8), 77.4(C-5''), 76.8(C-3''), 74.5(C-2''), 70.3(C-4''), 61.5(C-6'').

화합물 II: Mp 230°C; UVλ_{max}(MeOH) 258, 271, 300, 359 nm; (+NaOH) 217, 272, 333, 411 nm; (+AlCl₃) 211, 275, 416 nm; (+NaOAc) 211, 261, 362 nm; (+NaOAc/H₃BO₃) 210, 263, 297, 380 nm; ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD) δ: 7.66(1H, dd, J=2Hz, J=8.5Hz, H-6'), 7.50(1H, d, J=2.0Hz, H-6'), 6.81(1H, d, J=8.5Hz, H-5'), 6.40(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.20(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.34(1H, d, J=8Hz, H-1''); ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD): 178.3(C-4), 165.4(C-7), 162.3(C-5), 157.1(C-9), 157.3(C-2), 149.2(C-3'), 145.9(C-4'), 134.5(C-3), 123.1(C-1'), 122.2(C-6'), 117.1(C-5'), 116.3(C-2'), 105.0(C-10), 102.9(C-1''), 99.8(C-6), 94.6(C-8), 76.0(C-5''), 73.8(C-3''), 72.1(C-2''), 68.7(C-4''), 61.2(C-6'').

기기분석

화합물의 분자 구조 해석을 위해 기기분석을 실시하였다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC 및 HMBC를 측정하였으며 사용 기기는 Bruker사의 Avance 500 모델을 이용하였다.

항산화 활성의 측정

DPPH radical 소거법: DPPH radical 소거활성은 에탄올에 녹여 농도별로 희석한 시료 10 μL에 200 μM DPPH/EtOH 190 μL를 가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 대신 에탄올을 가한 대조구에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도 감소 정도를 조사하였다(17).

ABTS radical 소거법: ABTS radical 소거 활성은 2 mM ABTS(2,2'-azino-bis-(3-ethyl benthiazoline-6-sulfonic acid), 15 μM H₂O₂ 그리고 0.25 μM HRP를 함유한 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.5) 1 mL을 25°C에서 5분간 정치시킨 다음 730 nm에서 흡광도가 일정하게 유지되면 에탄올에 용해시킨 시료 10 μL를 가하고 5분 후 730 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다(18).

Hydroxyl radical 소거법: Hydroxyl radical 소거 활성은 Fenton reaction에 의해 OH radical을 발생시켜 이에 대한 소거활성을 측정하였다. 2.8 mM deoxyribose, 25 μM FeCl₃, 100 μM EDTA, 2.8 mM H₂O₂를 포함한 10 mM KH₂PO₄/KOH buffer (pH 7.4)에 농도별로 제조된 시료 100 μL를 가하고 잘 혼합하여 reaction volume이 1.2 mL가 되게 하였다. 이후 reaction mixture의 ascorbate의 농도가 100 μM이 되도록 ascorbate를 첨가한 후 37°C에서 한시간 동안 200 rpm의 속도로 회전하는 shaking incubator에서 반응시킨 다음 1% TBA 1 mL과 2.8% TCA 1 mL을 가하여 OH와의 반응에 의해 생성된 deoxyribose의 malondialdehyde(MDA) 유사물질과의 반응을 위하여 80°C에서 20분간 가열시키고 상온으로 냉각시켰다. *n*-Butanol 3.2 mL을 가하여 30초간 강하게 흔들어서 잘 혼합한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켜 반응에 의해 생성된 색소물질을 분리하였으며 색소물질을 함유한 위층 200 μL를 취하여 532 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다(19).

Hydrogen peroxide 소거법: 2 mM H₂O₂를 함유한 phosphate buffer saline(pH 7.4) 600 μL에 일정농도의 시료 300 μL를 가하고 5분 후에 230 nm에서 흡광도를 측정하였다(20).

Table 1. Antioxidant activity of different solvent fractions of *Angelica keiskei* ethanol extract

Samples	Sample concentrations (%)		
	0.05	0.01	0.005
	Inhibition (%)		
EtOH extract	95	31	16
<i>n</i> -Hexane fraction	55	26	12
Chloroform fraction	83	29	15
Ethyl acetate fraction	97	95	51
BuOH fraction	92	83	50
Water fraction	90	54	5

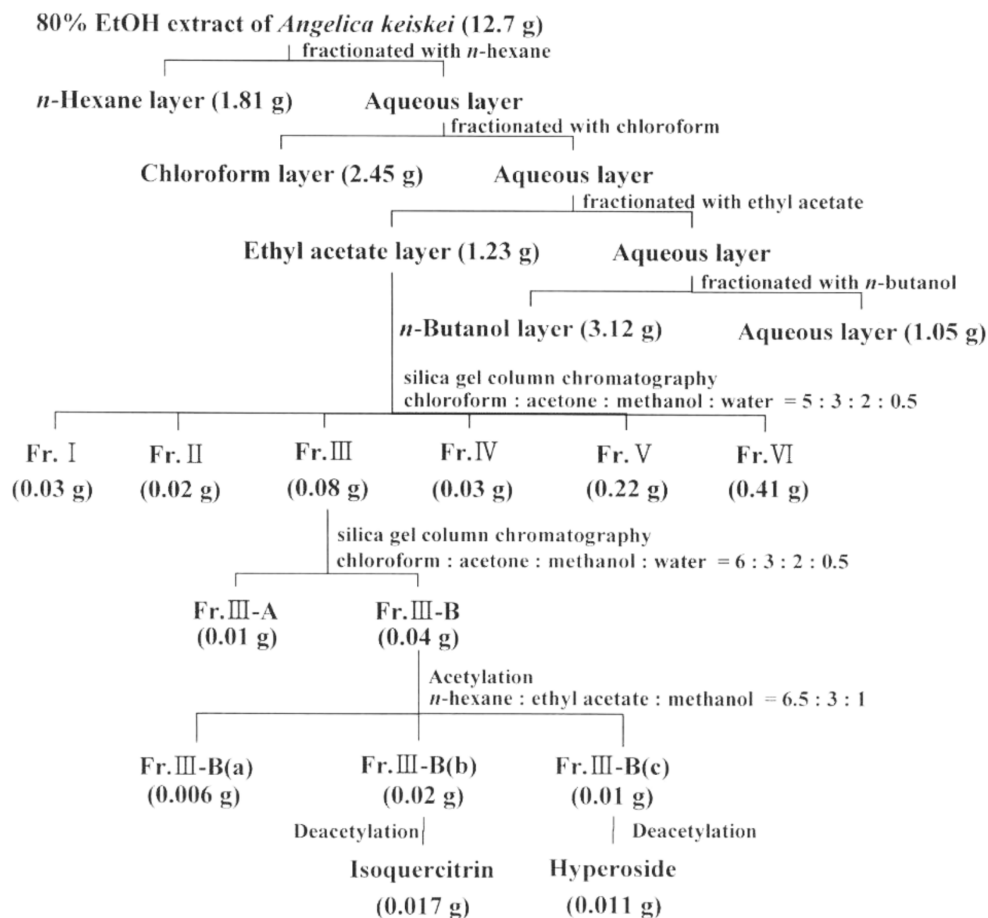
Ex vivo DNA 손상 감소 효과 측정

인체 임파구 세포는 채혈 전 최소 8시간 이상은 음식을 먹지 않은 건강한 대상자로부터 약 5 mL의 혈액을 heparinated sterile tube에 받아 전혈 100 μ L를 1 mL의 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640에 섞은 후 Histopaque 1077을 이용해 임파구만을 분리하였다. 인체 임파구 세포에 시료를 동결 건조한 후 PBS에 용해하여 10-1,000 μ g/mL사이의 농도로 cell에 처리하여 냉장고(30분, 4°C)에서 반응시키고 반응이 끝난 임파구 세포에 oxidative stress(100 μ M H₂O₂)를 4°C에서 5분 동안 가한 뒤 oxidative stress에 의한 DNA 손상을 유발시킨 후 comet assay를 실시하였다(21).

결과 및 고찰**항산화 물질의 분리 및 정제**

추출물에 대한 분획별 항산화 활성을 측정한 결과 ethyl acetate 분획이 시료 농도 0.01%에서 95% 이상의 높은 항산화 활성을 나타내고 0.005%의 저농도에서도 50% 이상의 항산화 활성을 나타내어(Table 1) silica gel column chromatography법을 이용하여 ethyl acetate 분획으로부터 항산화 물질을 분리하였다. 먼저 ethyl acetate 분획을 silica gel(Merck, 70-230 mesh)과 흡착시켜 용매를 완전히 제거한 후 silica gel이 chloroform : acetone : methanol : water(5 : 3 : 2 : 0.5)의 용매 조건으로 충전된 column(5 × 45 cm)에서 용출하여 TLC(thin layer chromatography, Merck, 60F254) plate 상에서 위치가 비슷한 화합물을 모아 총 6개의 분획(Fr.I-VI)을 얻었다. 6개의 분획물에 대한 항산화 활성 검증 결과 활성이 가장 높게 측정된 Fr.III를 다시 chloroform : acetone : methanol : water(6 : 3 : 2 : 0.5)의 용매 조건으로 용출하여 Fr.III-A와 Fr.III-B의 두개의 분획물을 얻었고 두개의 분획물 중 항산화 활성이 높은 Fr.III-B에 대한 분리 작업을 진행하였다.

Fr.III-B는 화합물들이 서로 근접하여 겹쳐있기 때문에 acetylation 반응을 실시하였다. 즉 Fr.III-B를 pyridine 5 mL에 녹인 후 acetic anhydride 5 mL를 빙냉하에서 적하하였다. 실온에서 15시간 이상 교반 시킨 후 반응액을 빙수와 ethyl acetate로 분배 추출하였다. Ethyl acetate 층을 5% HCl, 포화 NaHCO₃ 및 NaCl로 세척한 후, MgSO₄ anhydrous로 탈수 하고 여과 감압

**Fig. 1. Isolation of isoquercitrin and hyperoside.**

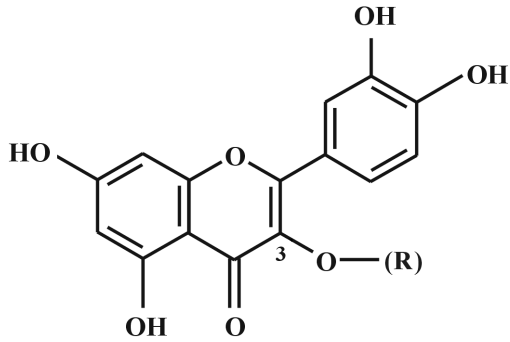


Fig. 2. Chemical structure of isoquercitrin and hyperoside.
(R)=Glucose: Isoquercitrin, (R)=Galactose: Hyperoside.

농축하였다. 얻어진 물질을 silica gel column chromatography를 실시하여 *n*-hexane : chloroform : methanol(6.5 : 3 : 1)의 용매 조건으로 충전된 column에서 용출시켜 acetylation된 3개의 단일 물질 Fr.III-B(a), Fr.III-B(b) 및 Fr.III-B(c)를 얻었고 acetylation된 3개의 분획물에 대한 항산화 활성 측정을 위해 다시 deacetylation 시켰다.

즉, 3개의 분획물을 각각 20 mL의 methanol에 녹이고 여기에 2 mL의 5% KOH를 넣어 교반하면서 2시간 이상 반응 시킨 후 일정량의 DOWEX 50WX4-400 양이온 교환수지를 넣어 중화시키고 여과 감압 농축하여 항산화 활성 검증 후 최종 정제된 단일 물질인 화합물 I과 화합물 II를 얻었다.

화합물 I은 황색 분말상으로 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ5.22(J=7.5Hz, d)에서의 anomeric proton과 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 δ103.1, 77.4, 76.8, 74.5, 70.3 및 61.5에서 glucose에 의한 탄소 피크를 관찰할 수 있었고, NaOH, AlCl₃, NaOAc 및 NaOAc/H₃BO₃ shift reagent 첨가시 UV 스펙트럼이 band I,II의 bathochromic shift하는 것으로 보아 flavonoid 골격의 C-5, C-7, C-3' 및 C-4'에 free 상태의 OH가 존재하는 화합물임을 알 수 있었다. 이상의 데이터와 문헌자료(22)의 비교를 통해서 화합물 I은 C₂₁H₂₀O₁₂의 분자식을 가지며 분자량 464.4인 isoquercitrin(queracetin-3-O-β-D-glucose)임을 최종 확인하였다(Fig. 2).

isoquercitrin은 일반적으로 천연물에 존재하는 flavonoids의 일종으로 여러 식물에서 분리되고 있지만 본 실험에서 사용된 재료인 신선초에서 isoquercitrin의 분리에 대한 보고는 현재 거의 알려져 있지 않은 상태이므로 생리활성에 관한 보충 연구가 필요할 것으로 생각된다.

화합물 II 역시 황색 분말상으로 UV, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼이 화합물 I과 매우 유사하였고, 차이점은 ¹H-NMR 스펙트럼에서 당의 δ5.34(J=8.0Hz, d)에서의 anomeric proton과 ¹³C-NMR 스펙트럼의 δ102.9, 76.0, 73.8, 72.1, 68.7 및 61.2으로 당부분이 galactose로 치환됨을 추정할 수 있었다. 이상의 데이터와 문헌자료(23)의 비교를 통해서 화합물 II는 C₂₁H₂₀O₁₂의 분자식을 가지며 분자량 464.4인 hyperoside(queracetin-3-O-β-D-galactose)임을 최종 확인하였다(Fig. 2).

Hyperoside는 이미 신선초에서 분리되었다는 보고(10)가 있지만 이 물질에 대한 항산화 활성 연구는 아직 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구를 계기로 하여 항산화와 관련된 생리활성에 관한 심도있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Isoquercitrin과 hyperoside의 항산화 활성

신선초로부터 분리된 isoquercitrin과 hyperoside에 대한 항산화 활성을 DPPH radical 소거법, ABTS radical 소거법, OH radical 소거법 및 H₂O₂ 소거법으로 측정하였다. 4가지 assay법에서 모두 isoquercitrin과 hyperoside에 대한 항산화 활성은 농도의존적으로 증가되는 경향을 보였고, 특히 저농도에서 90% 이상의 radical 소거 활성을 나타내어 강력한 항산화 활성을 보였다.

Isoquercitrin의 항산화 활성(Fig. 3)에서 DPPH radical 소거법은 5 μg/mL 농도에서 약 60% 정도의 높은 항산화 활성을 나타냈고, 또한 ABTS radical 소거법에서도 3 μg/mL 저농도에서 약 55% 정도의 높은 항산화 활성을 나타냈다. 그리고 OH radical 소거법과 H₂O₂ 소거법에서도 각각 25 μg/mL과 10 μg/mL의 농도에서 50% 이상의 항산화 활성을 나타냈다. 위의 결과에서 OH radical 소거법과 H₂O₂ 소거법의 경우에는 DPPH

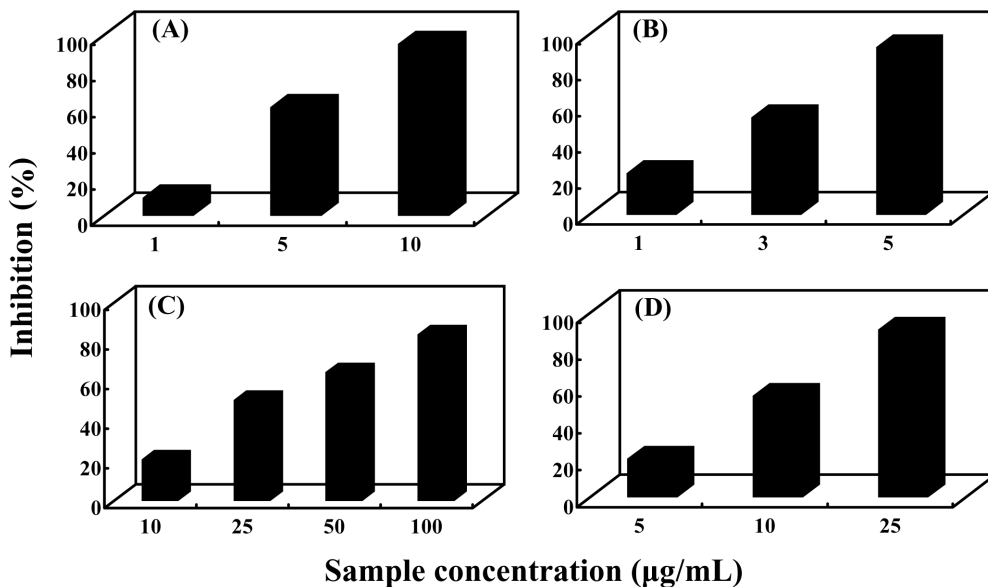


Fig. 3. Antioxidant activities of isoquercitrin.
(A): DPPH radical, (B): ABTS radical, (C): OH radical, (D): H₂O₂.

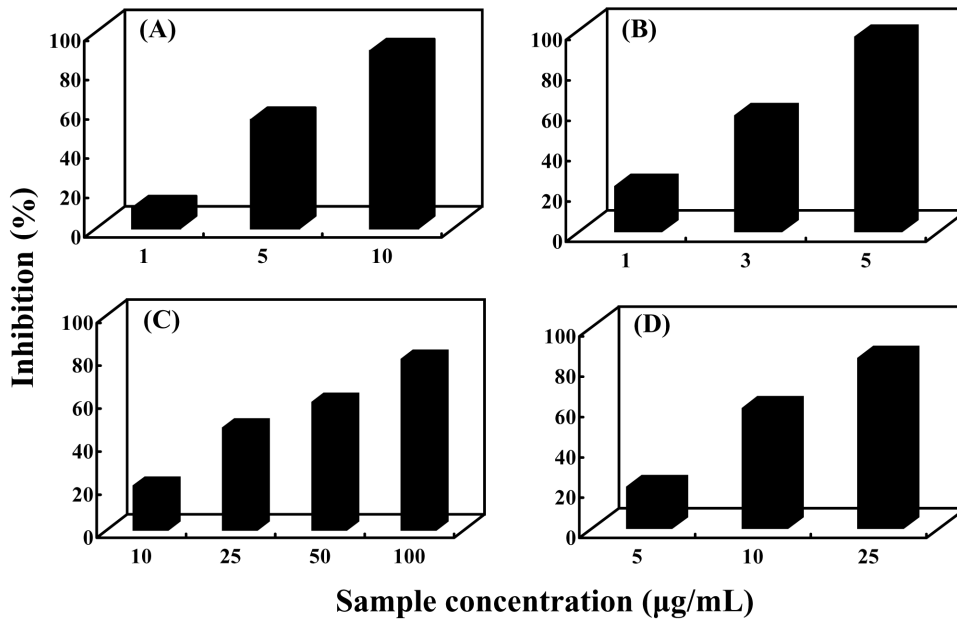


Fig. 4. Antioxidant activities of hyperoside.

(A): DPPH radical, (B): ABTS radical, (C): OH radical, (D): H₂O₂.

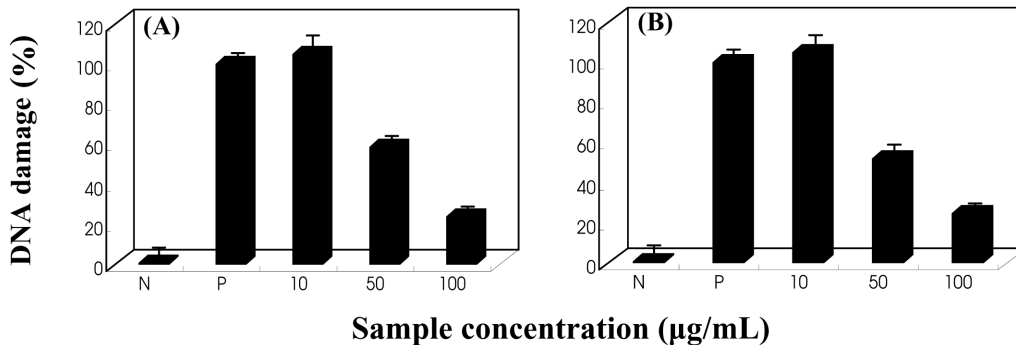


Fig. 5. Percentage inhibitory effect of isoquercitrin and hyperoside on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocyte cell. (A): DNA protecting effect of isoquercitrin, (B): DNA protecting effect of hyperoside, N: Negative control, P: Positive control.

radical 소거법과 ABTS radical 소거법에 비하여 약간 높은 농도에서 항산화 활성을 나타내는 경향이 있지만, OH radical과 H₂O₂가 실질적인 인체 내의 항산화 시스템에서 DNA와 같은 분자 레벨에서의 산화적 손상에 밀접한 관련이 있다는 보고(24, 25)를 고려한다면 비교적 저농도에서 OH radical과 H₂O₂에 대해서 항산화 활성을 나타낸다는 것은 중요한 의미를 내포한다고 볼 수 있다.

따라서 한가지 assay법에 의존하지 않고 DPPH radical 소거법과 ABTS radical 소거법과 같은 기초적인 활성 측정과 함께 DNA 손상과 같은 체내 분자레벨에서의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있는 OH radical과 H₂O₂ 소거 활성이 높다는 것으로 isoquercitrin을 비롯한 유사 flavonoids에 대한 심층 연구를 통해서 이러한 소재를 산업적으로 유용하게 적용할 수 있는 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

Hyperoside의 항산화 활성(Fig. 4)을 위의 4가지 assay법에 의해서 측정한 결과 isoquercitrin과 거의 동등한 항산화 활성을 나타냈다. 이와 같은 결과는 quercetin이나 quercetin 배당체의 경우 활성에 중요한 영향을 미치는 것이 hydroxyl group의 수나 위치에 의한 것이라는 보고(26)에 따라 hyperoside와 isoquercitrin의 분자 구조에서 당의 종류만 다를 뿐 똑같은 quercetin 골격을 가지고 있기 때문에 이러한 동일한 골격에 결합된 당의 종류는 항산화 활성에 큰 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 판단되어 진다.

citricin의 분자 구조에서 당의 종류만 다를 뿐 똑같은 quercetin 골격을 가지고 있기 때문에 이러한 동일한 골격에 결합된 당의 종류는 항산화 활성에 큰 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 판단되어 진다.

Isoquercitrin과 hyperoside의 DNA 손상 감소 효과 측정

Isoquercitrin과 hyperoside에 대한 DNA 손상 감소 효과를 측정한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 negative control(N)과 positive control(P)을 기준으로 isoquercitrin과 hyperoside는 농도별 산화적 손상을 입은 lymphocytes의 DNA 손상에 대한 보호 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. Isoquercitrin과 hyperoside의 농도별 활성을 살펴보면 100 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 DNA 손상 보호 효과가 나타남을 확인할 수 있는데, comet assay는 다른 분석 실험과 달리 수치로서 시료의 절대적인 값을 표현할 수 없고, 다만 농도 의존적으로 positive control에 비해 DNA 손상 보호 효과가 나타남을 표현할 수 있다.

이후 위의 실험에서 DNA 손상에 대한 보호 효과가 확인된 isoquercitrin과 hyperoside 이외에 유사한 구조를 가지고 있는 flavonoids의 활성을 서로 비교하여 구조의 차이에 따른 활성의

변화를 측정하여 구조와 활성간의 상관성을 조사하는 연구가 필요할 것으로 판단 된다.

요 약

신선초에서 항산화 활성 물질을 분리하기 위해 신선초를 80% 에탄올 추출하고 추출물에 대한 계통 분획을 실시하여 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 water의 총 5가지 분획으로 나누어 항산화 활성을 측정한 결과 ethyl acetate 분획의 활성이 가장 높아 ethyl acetate 분획물로부터 항산화 활성 물질을 분리 정제하였다. Silica gel column chromatography를 통하여 chloroform : acetone : methanol : water의 용매 조건을 점차적으로 변경하면서 소분획으로 나누고 항산화 활성이 가장 높은 소분획에 대해서 acetylation 반응을 실시하고 이를 n-hexane : ethyl acetate : methanol의 용매 조건으로 단일 물질로 분리 한 후 deacetylation 반응을 거쳐 최종 두개의 단일 화합물을 획득했다. 두개의 단일 화합물에 대한 구조 해석을 기기분석을 통해서 진행 한 결과 이 두 화합물을 각각 isoquercitrin과 hyperoside로 최종 동정하였다. Isoquercitrin과 hyperoside에 대한 항산화 활성을 DPPH radical 소거법, ABTS radical 소거법, OH radical 소거법 및 H₂O₂ 소거법으로 측정한 결과 4가지 assay법에 대해서 저농도에서 고른 항산화 활성을 나타냈고, 또한 DNA 손상에 대한 보호 효과를 측정한 결과 isoquercitrin과 hyperoside 모두 손상된 DNA에 대한 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 isoquercitrin과 hyperoside는 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능과 같은 기본적인 항산화 활성과 더불어 DNA 손상에 직접적인 영향을 미치는 OH radical과 H₂O₂에 대해서 높은 항산화 활성을 나타내면서 동시에 DNA 손상에 대한 보호 효과를 나타냄으로써 다양한 경로의 항산화 매커니즘에 작용한다는 사실을 유추해 볼 수 있으며 산업적으로 유용한 소재로서의 연구가 가능할 것으로 판단된다.

문 헌

1. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radical, antioxidant and nutrition. Nutrition 18: 872-879 (2002)
2. Freeman BA, Grapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47: 412-426 (1982)
3. Ames BN, Shigenaga MK, Hagwn TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7915-7922 (1993)
4. Masaki H, Skaki S, Atsumi T, Sakurai H. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. Bull. Pharm. Bull. 18: 162-166 (1995)
5. Hanato T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. Nat. Med. 49: 357-363 (1995)
6. Kim JH, Kang BH, Jeong JM. Antioxidant, antimutagenic and chemopreventive activities of a phyto-extract mixture derived from various vegetables, fruits and oriental herbs. Food Sci. Biotechnol. 12: 631-638 (2003)
7. Iagashi K, Takashi K, Makino M, Yasui T. Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild grapes. Nippon Shokukin Kogyo Gakkaishi 36: 852-860 (1989)
8. Yamane T, Naktani H, Kikuoka N, Matsumoto H, Iwata Y, Jitao

- K, Oya K, Tachahashi T. Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. Cancer 77: 1662-1667 (1996)
9. Yang HS. Effects of green juices. Food Hyg. 6: 62-67 (1993)
10. Park JC, Yu YB, Lee JH. Chemical components from the aerial parts of *Angelica Keiskei*. Korean. J. Pharmacogn. 27: 80-82 (1996)
11. Park JC, Hur JM, Park JG. Biological activities of Umbelliferae family plants and their bioactive flavonoids. Food Ind. Nutr. 7: 30-34 (2002)
12. Chun SS, Park JC, Kim SH, Lee DY, Choi HM, Hwang EY. Changes in biologically active component of *Angelica keiskei* by cooking methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 121-125 (1998)
13. Chung SY, Kim HW, Yoon S. Analysis of antioxidant nutrients in green yellow vegetable juice. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 880-886 (1999)
14. Jeon EJ, Kim JS, Park YK, Kim TS, Kang MH. Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in Chinese hamster lung cell using Comet assay. Korean J. Nutr. 36: 24-31 (2003)
15. Kim JS, Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. The effects of green vegetable juice (*Angelica Keiskei*) supplementation on plasma lipids and antioxidant status in smokers. Korean J. Nutr. 36: 933-941 (2003)
16. Bang MH, Song JC, Lee, SY, Park NG, Baek NI. Isolation of antioxidant compound from *Paeonia lactiflora* root. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42: 170-175 (1999)
17. Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chem. 79: 307-313 (2002)
18. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem. 73: 239-244 (2001)
19. Bhat VB, Sridhar GR, Madyastha KM. Efficient scavenging of hydroxyl radicals and inhibition of lipid peroxidation by novel analogues of 1,3,7-trimethyluric acid. Life Sci. 70: 381-393 (2001)
20. John ML, William SB, Gaoyao W, Song W, Scott D. Direct antioxidant properties of creatine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 47-52 (2002)
21. Welch RW, Turley E, Sweetman SF, Kennedy G, Collins AR, Dunne A, Livingstone MB, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ, Strain JJ. Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers. Nutr. Cancer 34: 167-172 (1999)
22. Kim HY, Moon BH, Lee HJ, Choi DH. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* with glycation inhibitory activity. J. Ethnopharm. 93: 227-230 (2004)
23. Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger K, Mabry TJ. Carbon 13 NMR study of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. Tetrahedron 34: 1389-1397 (1978)
24. Cohen AM, Aberdroth RE, Hochstein P. Inhibition of free radical-induced DNA damage by uric acid. FEBS. Lett. 174: 147-150 (1984)
25. Hu JJ, Kurland DD, Ma BL, Roush GC. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. Mutation Res. 336: 193-201 (1995)
26. Pratt DE. Role of flavones and related compounds in retarding lipid-oxidative flavor changes in food. p. 1. In: Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compounds in Food Flavors. American Chemical Society, Washington, DC, USA (1976)

(2004년 8월 16일 접수; 2004년 12월 22일 채택)