

황금으로부터 항산화 활성 성분의 분리

김석창*[†] · 안건석** · 박채규* · 전병선* · 이종태* · 박원종***

*KT&G중앙연구원, **한국유나이티드제약(주), ***공주대학교 식품공학과

Isolation of Antioxidative Compound from *Scutellaria baicalensis* G.

Seok Chang Kim*[†], Kun Seok Ahn**[†], Chae Kyu Park*, Byeong Seon Jeon*
Jong Tae Lee*, and Won Jong Park***

*KT&G Central Research Institute, Deajeon 305-805, Korea.

**Korea United Pharm Inc., Yeongi 339-841, Korea.

***Dept. of Food Engineering, Kongju Natl. Univ. Yesan 340-702, Korea.

ABSTRACT : Root of *Scutellaria baicalensis* G. was extracted with methanol and water to give the yield of 30.0% in order to find the antioxidant substance. The extract was fractionated with diethyl ether, n-butanol and water to test the inhibitive activity against xanthine oxidase. Three fractions inhibited the activities of xanthine oxidase by 48.2%, 10.2% and 2.8%, respectively, at the amount of 0.1 μ g. A component that exhibited strong inhibition of xanthine oxidase was isolated from diethyl ether fraction (SE Fr.) by silica gel column chromatography and HPLC, and then identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS spectrophotometry. EDA (Electron Donating ability) of the compound was 28.5% at the concentration 100 μ g/3 ml. That was identified to be 3,5,7-trihydroxy-2'-methoxyflavanone by spectrophotometric analysis using ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Mass spectrophotometry.

Key Words : *Scutellaria baicalensis* G, xanthine oxidase, 3,5,7-trihydroxy-2'-methoxyflavanone

서 언

일반적으로 산소를 호흡하면, 활성산소인 singlet oxygen (¹O₂)이나 superoxide (O²⁻)라는 free radical이 생성되어 생체 내의 단백질, 세포막, 지방, 효소등을 산화시킴으로써 암 (Simic *et al.*, 1980), 관절염 (Simic *et al.*, 1980), 당뇨병, 동맥경화 등 각종 질병을 일으킬 뿐만 아니라 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 생체내 free radical의 생성을 억제하는 것이 각종 질병의 예방을 위하여 매우 중요한 문제로 대두되면서 이에 대한 연구가 활발해지고 있다 (Simic *et al.*, 1980). 특히 노화의 억제 또는 지연에 대한 연구는 삶의 질과 장수를 추구하는 현대인들의 욕구에 부응하여 많은 과학자들의 흥미를 유발하여 왔다. 이러한 추세에 따라 생체내 free radical의 생성을 억제하는 항산화 활성물질에 대한 많은 연구가 수행되어 각종 식물로부터 분리된 수 많은 물질들이 보고되었다 (Simic *et al.*, 1980).

황금 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 다년생 속근초로 꿀꿀과에 속하며 중국이 원산지로서 (손, 1976; 상해과학기술

출판사, 1985), 한국 전역과 양자강 이북의 중국 및 시베리아 등, 동북아시아에 자생 또는 재배되고 있다 (한, 1985). 특히 중국에서는 중북부에서 동북부에 걸쳐 다양한 *Scutellaria*속 식물이 분포되어 자생하고 있다.

황금의 약리작용으로는 항 histamine 효과 (Middleton *et al.*, 1985), 항간장독 (Wagner, 1986), 항균작용 (Middleton, 1988), 항암작용 (Middleton, 1986), 항박테리아 활성 (Kubo *et al.*, 1981), 항염증효과 (Kubo *et al.*, 1984; Yun *et al.*, 1992) 등이 알려져 있는데, 그의 주요 활성물질은 대부분 flavonoid 화합물로 밝혀져 있으며 flavonoid 화합물은 화학구조에 있어서 phenol기를 함유하고 있기 때문에 많은 flavonoid 화합물들이 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 황금에서 xanthine oxidase 억제 효과를 가진 flavonoids 물질을 추출하여 그추출물의 xanthine oxidase 저해작용, DPPH (α, α -Diphenyl- β -picryl hydrazyl)의 radical에 대한 소거작용 측정을 통하여 항산화 능력을 측정하고, HPLC를 사용하여 분리 정제한 후 NMR, MS를 통하여 flavonoids의 구조특성을 확인하였다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-42-866-5325 (E-mail) ginsapo@ktng.com

Received February 21, 2006 / Accepted July 28, 2006

재료 및 방법

1. 시험재료

황금 (*Scutellaria baicalensis* Gorgi)은 2001년 금산 약재시장에서 2년근 황금을 구입한 후 열풍건조하여 사용하였다.

2. Xanthine oxidase 억제 효과 측정

항산화 활성의 측정은 Packer 등의 방법 (Packer, 1994)에 따라 xanthine을 기질로 하여 생성된 urate를 spectrophotometry법으로 측정하였다.

즉, 0.1 mM phosphate buffer (pH7.4)을 조제하여 750 μ l 을 첨가한 후 여기에 기질인 1 mM xanthine 150 μ l 을 혼합한 다음 ethanol에 일정농도로 용해한 시료를 혼합하여 250 mU/ml로 조제한 효소액 (xanthine oxidase)을 첨가한 후 실온에서 UV 295 nm에서 흡광도를 측정하였다. control구는 시료대신 ethanol을 첨가 후 상기 동일한 조건에서 실시하였고, blank는 control구에서 xanthine oxidase를 제거한 것을 사용하여 상기와 동일하게 행하였다.

아래와 같은 식으로 xanthine oxidase inhibition을 계산하였다.

$$\text{Xanthine oxidase inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : Absorbance of sample, B : Absorbance of control

3. DPPH에 의한 전자공여능 (Electron Donating Ability) 측정

전자공여작용은 Blois의 방법(Blois, 1958)을 변형하여 최종 compound가 α, α -Diphenyl- β -picryl hydrazyl (DPPH) radical에 대한 전자공여효과로서 화합물의 환원력을 측정하였다.

즉, 최종 compound 500 μ g에 2.5 mM DPPH 용액 (99% ethanol에 용해) 2.4 ml를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 20분 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 효과는 시료첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도값의 차이를 이용하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{Electron Donating Ability (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : Absorbance of the sample with final compounds at 517 nm

B : Absorbance of the sample with ethanol at 517

4. 황금성분의 추출 및 용매에 의한 분획분리

황금의 용매에 의한 분획의 xanthine oxidase 억제효과를 조사하기 위하여 건조된 분말시료 500 g을 Fig. 1과 같이 methanol 3 L로 환류냉각 하에 4시간 추출한 다음, 물 3 L로 추출하여 농축하였다. 이 농축물을 물 1 L에 용해하여 분획

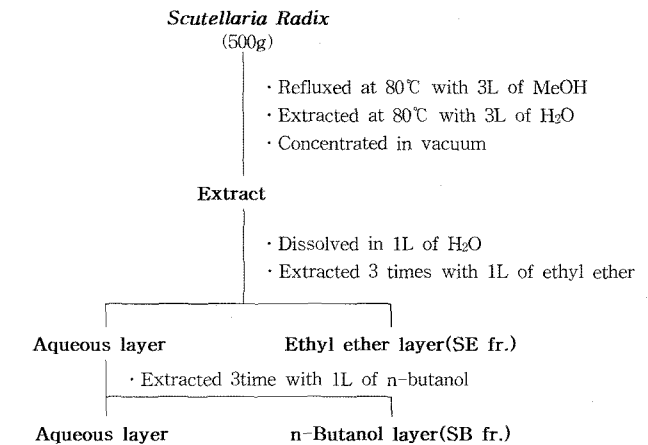


Fig. 1. Separation of the solvent fractions from the root of *Scutellaria baicalensis* by Liquid-Liquid Partitioning.

Table 1. HPLC operating conditions for isolation of the compound I.

Instrument	: Gilson 305, 306
Column	: Econosphere NH ₂ (10 mm I.D×250 mm, 10 μ m)
Mobile phase	: Acetonitrile/Water (= 75/25)
Flow rate	: 2 ml/min
Detector	: UV 280 nm
Sensitivity	: 0.10AUFS
Injection volume	: 200 μ l (= 10 mg/ml)

두에 넣고 ethyl ether 1 L로 3회 추출 분획한 후 다시 aqueous layer를 n-butanol 1 L로 3회 추출 분획하였다 (Fig. 1).

5. Xanthine oxidase 억제 활성성분의 분리

황금으로부터 분획된 ethyl ether 분획 (SE 분획)을 가지고 column chromatography 및 HPLC에 의해 xanthine oxidase 억제효과를 가진 성분을 분리하였다.

즉, Fig. 2와 같이, 황금으로부터 얻어진 SE 분획을 감압농축하고 용출 용매에 용해한 후, 김 (1995)과 우 (1984) 등의 방법을 변형하여 silica gel (63~200 μ m, Merck Co.) 600 g을 ID 45×700 mm 크기의 glass column에 충전하고 CHCl₃:CH₃OH (100:0~0:100)을 용출시켜 7개의 분획을 얻었다. 이 중 Fr. 으로부터 prep-HPLC를 이용하여 Xanthine oxidase 억제활성을 가진 물질을 분리하였다. 이 때 사용한 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

1. 황금성분의 추출 및 분획분리

건조된 분말시료 황금 500 g을 methanol 3 L로 환류냉각 하에 4시간 추출하고 다시 물 3 L로 추출하여 150 g의 MeOH 추출물 (SM)을 얻었으며, 이것을 물에 용해한 후 다시

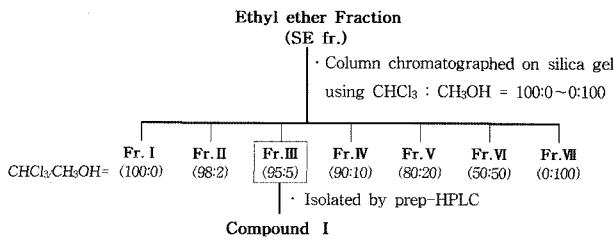


Fig. 2. Isolation of an active compound from ethyl ether fraction of the root of *Scutellaria baicalensis* by column chromatography and HPLC.

Table 2. Yields of the solvent fractions from 500 g of the root of *Scutellaria baicalensis*.

Solvent	Extract (SM)	Solvent fractions		
		Ether Fr. (SE)	n-BuOH Fr. (SB)	Water Fr. (SW)
Yield (g)	150.0	13.2	10.3	126.5

ethyl ether, n-butanol로 추출 분획하여 황색의 분말 (SE) 13.2 g, 갈색의 분말 (SB) 10.3 g 및 황색의 분말 (SW) 126.5 g 을 얻었다 (Table 2).

김 (1995)에 따르면, 황금에서 분리한 flavonoids와 그의 항산화활성 실험에서 MeOH 추출물이 500 g당 167 g과 Ether 및 n-BuOH 분획의 각각 14.2 g과 11.6 g으로서 추출조건의 차이에도 불구하고 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

2. 용매추출 분획의 xanthine oxidase 억제효과

황금에서 추출한 용매추출 분획들의 xanthine oxidase 억제 효과 측정 결과는 Table 3과 같다.

각 분획에서 농도에 따른 xanthine oxidase 저해작용을 살펴본 결과, 각 분획은 모두 농도가 감소할수록 xanthine oxidase 저해작용이 낮게 나타났다. Table 3과 같이, 각 분획 중 xanthine oxidase 저해작용이 가장 높은 분획은 Ethyl ether 분획으로서 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml의 농도에서 각각 100%, 87.7%, 48.2%의 xanthine oxidase 억제활성을 나타내었다. water 분획은 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml의 농도에서 각각 35.3%, 8.7%, 2.8%로 3개의 분획중 가장 낮게 나타났다며 n-BuOH 분획은 농도가 줄어들수록 다른 분획보다 현저히 낮아지는 결과를 보였다.

김 (1995)의 황금에서 분리한 flavonoids와 그의 항산화 활성 실험에서는 phosphatidylcholine으로 조제한 liposome에 대한 용매 추출물의 항산화 활성에서 phosphatidylcholine 과산화물의 생성은 대조군에 비해 SB 분획은 13.6~23.7%, SE 분획은 19.14~30.8% 만큼 낮게 나타남으로써 이들 분획이 항산화 작용을 가지고 있음을 보여주었고, 또한 SB 분획에 비해 SE 분획의 항산화 활성이 높게 나타내어 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 3. Inhibitive activities of xanthine oxidase by solvent fractions from *Scutellaria baicalensis*.

Amount (µg)	Fraction		
	H ₂ O	Ethyl ether	n-Butanol
10	35.3	100	100
1	8.7	87.7	53.4
0.1	2.8	48.2	10.8

Table 4. Inhibitive activities of xanthine oxidase of the fractions by HPLC.

Injection volume (µl)	Fraction							
	1	2	3	4	5	6	7	8
100	28.24	27.79	-	-	-	36.30	-	-
10	13.39	7.14	-	-	-	5.30	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-

* The samples were taken from the solution dissolved with 200 µl of methanol after being concentrated to dryness.

또한 김 (1995)의 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성 실험에서 황금의 용매별 추출물을 POV법으로 항산화 효과를 측정시 유도기간을 POV가 80 meq/kg oil에 도달하는 시간으로 하였을 때 대조구의 유도기간이 5.3일이었고, hexane은 7.1일, benzene은 13일, chloroform은 27.5일, methanol은 21일, ethyl ether는 38일로 다른 용매추출보다 훨씬 강한 항산화 효과를 나타내어 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

3. Xanthine oxidase 활성 억제물질의 분리

Column chromatography에 의해 분획한 fraction중 xanthine oxidase 억제작용이 가장 크게 나타났던 fraction III을 가지고 Table 1의 조건으로 Prep-LC를 이용하여 분획함으로써 8개의 분획을 얻었다. 각 분획에서 농도에 따른 xanthine oxidase 저해작용을 살펴본 결과, fraction 6에서 xanthine oxidase 억제 활성이 100 µl에서 36.3%로 가장 높게 나타났으며 이 fraction 을 compound으로 하였다.

4. DPPH에 의한 전자공여 작용(Electron Donating Ability)

황금으로부터 분리한 compound I의 DPPH (α,α-Diphenyl-β-picryl hydrazyl)의 radical에 대한 소거능을 조사하였다 (Table 5).

Compound I의 전자공여 작용은 100 µg에서 28.5%, 50 µg의 농도에서는 12.5%의 DPPH radical 소거효과를 나타냄으로써 본 방법에 의한 항산화 활성의 세기는 그다지 높지 않은 것으로 판단된다.

적 요

Table 5. Electron Donating Ability of Compound by DPPH. (Unit : %)

Sample amount (μg)	Activity (%)
50	12.5
100	28.5

Table 6. Spectral data of compound.

MS	302 (M ⁺), 284, 273, 195, 167, 133, 107			
	3.86		-OCH ₃	
	4.62	s	1H	
	4.65	s	1H	
¹ H-NMR	5.48	s	1H	
(δ = ppm)	5.52	s	1H	
	6.01, 6.13	each d	1H	
	7.21, 7.45	each d	1H	
	6.91	d	2H	
	-OCH ₃	55.27		
	C2	72.52	C1'	123.42
	C3	78.16	C2'	163.18
	C4	192.01	C3'	115.74
¹³ C-NMR	C5	156.20	C4'	129.83
(δ = ppm)	C6	96.01	C5'	119.58
	C7	166.34	C6'	128.55
	C8	93.30		
	C9	165.44		
	C10	102.72		

5. 황금으로부터 분리된 Compound 의 구조 확인

SE 분획을 column chromatography를 수행한 후 HPLC를 사용하여 황색의 결정을 얻었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 16개의 탄소를 확인할 수 있었는데, 55.27 ppm에서 -OCH₃에 해당하는 탄소 signal을 확인하였고, 192.01 ppm에서 C-4 위치의 C=O에 해당하는 탄소 signal이 확인되었으며, 156.20 ppm, 163.18 ppm, 165.44 ppm 및 166.34 ppm에서 산소와 결합을 이루고 있는 4개의 signal이 나타났다. 또한 115.74-129.83 ppm에서 나타난 6개의 탄소 signal은 B 고리의 phenyl기에 기인하는 signal로 확인되었다.

¹H-NMR spectrum은 3.86 ppm에서 1개의 -OCH₃를 나타내는 수소 signal이 보였고, 4.62 ppm과 4.65 ppm에서 각각 1H의 singlet signal이 확인되었으며, 5.48 ppm과 5.52 ppm에서 1H의 singlet signal이 확인되었다. 6.01 ppm과 6.13 ppm에서 1H의 doublet signal이 확인되었고, 6.91 ppm과 7.21 ppm, 7.45 ppm에서 각각 2H, 1H, 1H의 doublet signal이 확인되었다.

Mass spectrum에서는 M⁺가 m/z 302로 나타나 분자량이 302임을 알 수 있었다.

이상의 spectral data를 종합해 볼 때, 이 화합물의 구조식은 3,5,7-trihydroxy-2'-methoxyflavanone으로 논문에 발표되지 않은 물질로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다 (Table 6).

황금 (*Scutellaria baicalensis* Gergi)에 함유된 항산화 억제 활성 물질을 분리하고 항산화 효과에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 황금 500 g을 100% MeOH로 추출하여 150 g의 수율을 얻었으며, 다시 분획하여 Ethyl ether 13.2 g과 n-BuOH 10.3 g, Water 126.5 g을 얻었다.

2. Ethyl ether 분획을 Column chromatography, TLC 및 HPLC를 이용하여 xanthine oxidase 억제활성을 가진 compound I을 분리하였다.

3. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS spectrometer등 분광학적 방법을 이용하여 Compound I의 구조를 규명한 결과, flavonoid 물질로서 compound I은 구조식이 3,5,7-trihydroxy-2'-methoxyflavanone로 확인되었다.

LITERATURE CITED

Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199.

Bohm BA (1988) The Flavonoids, *Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall, 339-379.

Kubo M, Kimura Y, Odani T, Tani T, Namba K (1981) Studies on *Scutellaria radix*. II., The antibacterial substance. *Planta Med.*, 43:194-201.

Kubo M, Batsuda H, Tanaka M, Kimura Y, Okuda H, Higashino M, Tani T, Namba K (1984) Studies on *Scutellaria Radix*. VII, anti-arthritis and Anti-inflammatory Actions of Methanolic Extract and Flavonoid Components from *Scutellaria radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, 32(7):2724-2729.

Lester Packer (1994) *Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press. New York, 234:469.

Middleton Jr. E, Drzewiecki V (1985) Naturally occurring flavonoids and human basophil histamine release. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 77:155-157.

Middleton Jr. E, Harborne JB and Beretz (des.) A (1988) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II*, Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. Alan R. Liss, New York, 61-65.

Middleton Jr. E, Harborne(des.) JB (1986) *Plant flavonoids in Biology and Medicine*, Biochemical, Pharmacological, Structure-Activity Relationship. Alan R. Liss, New York, 429-440.

Simic MG, Karel M (1980) *Autooxidation in Food and Biological Systems, Is Peroxidation Important in the Cancer Process*. Plenum Press, New York, 639-649.

Simic MG, Karel M (1980) *Autooxidation in Food and Biological Systems, Possible Role of Oxidized Lipids in Atherosclerosis*. Plenum Press, New York, 599-611.

Simic MG, Karel M (1980) *Autooxidation in Food and Biological Systems, Biological effects of some products of cholesterol autooxidation*. Plenum Press, New York, 589-597.

Simic MG, Karel M (1980) *Autooxidation in Food and Biological Systems, Natural antioxidants*. Plenum Press, New York, 261-282.

- Wagner H** (1986) Antihepatotoxic flavonoids, In Cody, Middleton Jr. E, Harborne (des.) JB, Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. Alan R. Liss, New York, 545-558.
- Yun HS, Yoo KS, Chung SH, Yang HS, Choi JJ, Kim YJ** (1992) Flavonoids with Bradykinin Antagonistic Effects from *Scutellaria Radix*. Kor. J. Pharmacogn., **23**(4):234-239.
- 김석창** (1995) 황芩 (*Scutellaria baicalensis* G.)에서 분리한 Flavonoids와 그의 항산화활성. 건국대학교 박사학위논문.
- 김현구, 김연연, 도경룡, 이영철, 이부용** (1995) 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성. Kor. J. Food Sci. Technol. **27**(1):80-85.
- 우원식** (1984) 천연물화학연구법, 민음사, 45-121.
- 손성연** (1976) 神農本草經, 서울, 醫道韓國史影印, 第二卷, 12-13.
- 上海科學技術出版社** (1985) 中藥大辭典, 濟一卷, 小學館, 132-137.
- 한덕룡** (1985) 현대생약학, 학습교재사, 서울, 334-335.