

택사 메탄올 추출물과 주성분의 항산화작용

김세은 · 류동영¹ · Takako Yokozawa² · 박종철*

순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소, ¹목포대학교 생명과학부 생약자원전공, ²일본 도야마대학 종합화한약연구소

Antioxidant Effect of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and Its Main Component

Se Eun Kim, Dong Young Rhyu¹, Takako Yokozawa², and Jong Cheol Park*

Department of Oriental Medicine Resources and Research Institute of Korean Oriental Medicine,
Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹Division of Bioscience, Mokpo National University, Mu-an 534-729, Korea

²Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Abstract – Reactive oxygen species(ROS) or free radicals are produced in the pathogenesis of human diseases including atherosclerosis, diabetes, cancer, and aging. Antioxidants are associated with the prevention of ROS-induced tissue and cellular damage in the various diseases. This study investigated the antioxidative activities of the methanol extract of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and its main component under conditions of radical generation using allophycocyanin and ferric-thiocyanate assay. Alisol B 23-acetate as a main component was isolated from the methanol extract of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale*. In results, the extract of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* showed inhibitory activity on AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride]-induced protein oxidation. Also, the extract of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and alisol B 23-acetate inhibited lipid peroxidation. These results indicate that *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and alisol B 23-acetate show promise as therapeutic agents for various damages involving free radical reactions.

Key words – reactive oxygen species, free radical, *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale*, alisol B 23-acetate, antioxidant

택사는 택사과(Alismataceae)에 속한 다년생 소택식물(沼澤植物)인 질경이택사(*Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* S_{AMUELS})와 택사(*Alisma canaliculatum* A_{LL.} B_{R.} et B_{OUCHÉ})의 괴경으로 2종류가 기록되어 있으나 한방에서는 주로 질경이택사를 사용한다.¹⁾ 택사는 중국, 일본, 사할린, 몽고 등의 늪이나 물속에서 야생하거나 재배되며 우리나라에서는 전남지역이 전국 생산량의 90%를 재배 생산하고 있다.²⁾ 택사는 신농본초경 상품에 수재되어 있는 한약재로서 동의보감에서는 성질은 차며 맛이 달고 짜며 독성이 없으며, 방광에 몰린 오줌을 잘 나가게 하며 방광의 열을 없애는 것으로 수재되어 있다.^{3,4)} 한의약학적으로 택사는 우리 몸의 불필요한 수분을 제거하여 부종을 없애주고 이뇨와 소염작용이 뛰어난 생약으로서 alisol 유도체와 alismol, alismoxide가 함유되어 있다.⁵⁾ 택사에 대한 생리활성 연구로

는 CCl₄로 유발시킨 간독성에 유효한 간보호작용,⁶⁾ 고지혈증 개선효과,⁷⁾ 항보체작용,⁸⁾ 항알러지작용,⁹⁾ 당뇨 흰쥐의 혈당강하와 중성지방 감소효과,¹⁰⁾ 지방세포 분화 억제효과¹¹⁾ 등이 보고되어져 있다.

생체내에서 자유라디칼 반응에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 DNA 분절과 단백질의 불활성화 및 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화 반응을 일으켜 생체기능을 저하시킴으로서 노화를 유발할 뿐만 아니라 류마티스성 관절염, 당뇨병, 심장병, 동맥경화, 암 등과 같은 여러 질환의 원인으로 잘 알려져 있다.¹²⁾ 따라서 생체내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 활성산소종을 조절할 수 있는 합성 또는 천연 항산화제 개발연구가 활발히 진행되고 있다.¹³⁾ 그러나 합성 항산화제의 변이원성 및 독성으로 인하여 보다 안전하고 우수한 효능을 지닌 천연 항산화제 개발이 요구되면서 천연자원 또는 약용식물로부터 유래하는 특정 성분의 항산화 활성에 대한 연구들이 진행되고 있다.¹⁴⁾

*교신저자 (E-mail): jcpark@suncheon.ac.kr
(FAX): 061-750-3608

본 연구에서는 allophycocyanin 형광단백질이 자유라디칼에 의해 형광도의 반감기가 급속하게 감소되는 특성을 이용한 실험법과 ferric-thiocyanate법을 이용하여 택사와 그 주성분의 항산화 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 본 실험에 사용한 질경이택사(*Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* S_{AMULES})는 순천시 해룡면 구상마을(2004. 4. 12)과 선월마을 (2004. 4. 13) 농가에서 구입하여 재료로 사용하였다.

기기 및 시약 - 성분 분리를 위한 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 mesh, No. 7734, Merck, Germany)과 Sephadex LH-20을 사용하였다. Thin layer chromatography용 precoated plates는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(No. 5735, Merck, Germany), 확인은 UV(254 nm)와 50% H₂SO₄를 사용하였으며, NMR spectrum은 Avance 400 spectrometer(Bruker, Germany)를 이용하였다. 항산화 활성 측정용 시약인 allophycocyanin (Molecular Probes), AAPH[2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride], K₂HPO₄, KH₂PO₄, linoleic acid, FeCl₂, BHT, ammonium thiocyanate 등은 WAKO사(Osaka, Japan) 제품을 구입하여 사용하였다.

추출 및 분리 - 세절한 택사 7.76 kg을 MeOH로 환류냉각하에서 4시간, 3회 반복 추출하여 1.3 kg의 추출물을 얻었다. MeOH 추출물을 10% MeOH에 현탁한 후 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH로 분획하여 CH₂Cl₂, 중간층(H₂O와 CH₂Cl₂의 사이의 불용물), EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O의 분획물을 각각 436 g, 66 g, 3 g, 61 g, 689 g을 얻었다. CH₂Cl₂ 분획물 20 g을 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매로 점차 극성을 증가시키며 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획물(subfraction)로 나누었다. 이 중 subfraction A를 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: MeOH)를 이용하여 재결림을 실시하여 화합물 **1**을 순수하게 분리하였다.

화합물 1 - ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.90, 0.94, 0.96, 0.97, 1.08, 1.24, 1.26, (3H each, s), 0.99 (3H, *d*, *J*=6.36 Hz), 1.64 (1H, *d*, *J*=10.70 Hz, H-9), 2.00 (3H, s, OAc), 2.49 (1H, *dd*, *J*=5.69, 13.20 Hz, Ha-12), 2.66 (1H, *d*, *J*=8.52 Hz, H-24), 3.74 (1H, *ddd*, *J*=5.73, 10.72, 10.73 Hz, H-11), 4.54 (1H, *ddd*, *J*=2.71, 8.53, 10.64 Hz, H-23); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) *d*: 18.38 (C-26), 19.02 (C-29), 19.06 (C-6), 19.09 (C-21), 20.18 (OCOCH₃), 22.15 (C-18), 22.83 (C-30), 23.68 (C-27), 24.64 (C-19), 26.83 (C-20), 28.15 (C-16), 28.54 (C-28), 29.65 (C-15), 29.94 (C-1), 32.72 (C-22), 33.18 (C-7), 33.50 (C-12), 35.76 (C-

2), 35.93 (C-10), 39.72 (C-8), 45.94 (C-4), 47.48 (C-5), 48.98 (C-9), 56.03 (C-14), 57.45 (C-25), 64.07 (C-24), 69.21 (C-11), 70.52 (C-23), 133.16 (C-17), 137.12 (C-13), 169.03 (OCOCH₃), 219.13 (C-3)

Allophycocyanin assay에 의한 항산화 효과 측정 - Allophycocyanin 37.5 nM과 3 mM AAPH를 함유한 반응액에 75 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 녹인 시료를 첨가하여 37에서 반응시킨다. 그 반응액을 0, 5, 10, 20, 30분마다 75 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 희석시켜서 excitation 598 nm, emission 651 nm 조건에서 형광분광계로 형광도를 측정하였다.¹⁵⁾

Ferric-Thiocyanate법에 의한 지질과산화 억제효과 측정 - Linoleic acid model system을 이용한 지질과산화 억제효과는 2.5% linoleic acid 2 ml, 50 mM phosphate buffer(pH 7.4) 4 ml, 시료 (50, 10 µg/ml) 100 µl를 함유한 반응액을 40에서 incubation 시켰다. 일정한 시간이 지난 후에 지질과산화 정도를 ferric-thiocyanate법에 의해서 다음과 같이 측정하였다.¹⁶⁾ 반응액 100 µl에 75% EtOH 4.7 ml, 30% NH₄SCN 100 µl을 가한 다음 20 mM FeCl₂ 100 µl로 발색시켜 반응에서 나타난 발색 정도를 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물질로는 합성 항산화제인 BHT를 이용하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치±표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 Dunnett's test를 이용하여 각각 **p*<0.05인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

택사의 MeOH 추출물에서 분리한 화합물 **1**의 ¹H-NMR spectrum에서 δ 2.00(3H, s, OAc)와 ¹³C-NMR에서 20.18(OCOCH₃), 169.03(OCOCH₃)에서 1몰의 acetyl기를 확인하였다. ¹H-NMR data에서 δ 0.90, 0.94, 0.96, 0.97, 0.99, 1.08, 1.24, 1.26에서 8개의 methyl기 signal을 관찰하였다. ¹³C-NMR에서는 δ 219.13(C-3)에서 ketone기, δ 133.16(C-17), 137.12(C-13)에서 C=C 존재를 알 수 있었다. 또한 δ 69.21(C-11)에서 hydroxyl기 그리고 δ 57.45(C-25)와 64.07(C-24)에서는 epoxy결합의 존재를 알 수 있었다. 이상의 ¹H-NMR와 ¹³C-NMR spectrum 결과에 의해 화합물 **1**은 alisol B 23-acetate로 결정하였으며, 문헌치와 비교하여 그 화학구조(Fig. 1)를 동정하였다.⁵⁾

Allophycocyanin assay에 의한 항산화 효과를 관찰했다. 본 실험은 형광을 띠는 allophycocyanin 단백질이 free radical에 의해 산화되는 정도에 따라 형광감도 반감기가 급속하게 감소되어지는 특성을 이용하여 시료에 대한 free radical의 소거능을 측정하는 실험방법이다.¹⁷⁾ Allophycocy-

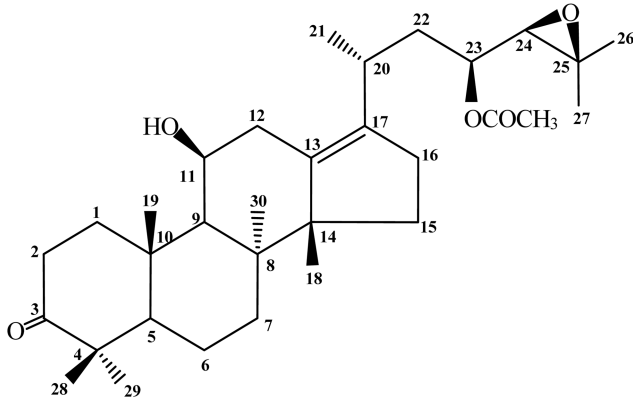


Fig. 1. The structure of compound 1 isolated from the rhizome of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale*

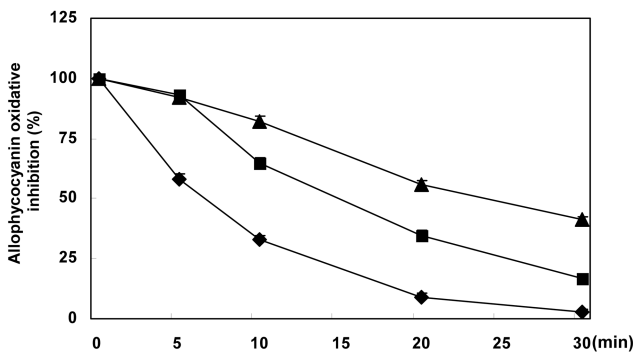


Fig. 2. Effect of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* MeOH extract on allophycocyanin assay. ◆, control; ■, *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* MeOH extract 10 µg/ml; ▲, *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* MeOH extract 50 µg/ml. Values are mean ± S.E.

anin assay에서 free radical 유도물질로 이용되는 azo 화합물인 AAPH는 수용성 물질로서 한 분자가 분해되어 두 분자의 radical이 발생하고 한 분자의 질소를 유리시킨다. 안정적으로 지속적인 산화적 스트레스를 가할 수 있다는 장점 때문에 peroxy radical의 역학 조사에 많이 이용되고 있다. Allophycocyanin assay의 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 택사 MeOH 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 allophycocyanin 단백질의 형광강도가 AAPH에 의해 30분부터 거의 형광을 나타내지 않을 정도로 감소되었다. 즉 AAPH로 인하여 free radical이 생성되었음을 간접적으로 말해주고 있다. 택사 MeOH 추출물에 대한 항산화 효과는 AAPH 첨가로 인하여 5분후 대조군의 allophycocyanin 단백질의 형광강도가 58%로 감소하는 반면에 택사 MeOH 추출물 10 또는 50 µg/ml 첨가군에서는 각각 93%와 98%로 대조군에 비하여 낮은 감소를 나타냈다. 20분후에는 대조군의 형광강도가 10% 이하로 감소되지만 택사 추출물 10 또는 50 µg/ml을 첨가한 경우에는 각각 35%와 56%의 형광

Table I. A halflife of fluorescence controlled by *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* extract

Material	t _{1/2} (min)
10 µg/ml	13.64 ± 0.88
50 µg/ml	23.58 ± 1.06
Control	6.14 ± 0.31

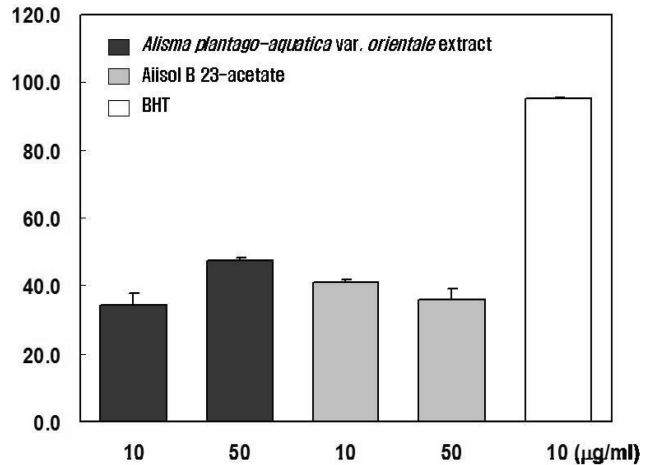


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory effect of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* MeOH extract and alisol B 23-acetate. BHT is a positive control. Values are mean ± S.E.

강도를 나타냈다. 또한 30분 후 추출물은 대조군에 비교하여 약 6배 또는 13배 정도 allophycocyanin 단백질 형광강도의 감소를 억제시켰다(Fig. 2). 더불어 allophycocyanin 단백질의 형광강도 반감기를 측정된 결과(Table I), 대조군에서는 AAPH로부터 유리된 free radical의 영향으로 인하여 형광강도의 반감기가 6분으로 감소하였으나, 택사 MeOH 추출물 10 또는 50 µg/ml 첨가군에서는 14분(약 2배)과 24분(약 4배)으로 형광강도의 반감기가 대조군에 비하여 추출물의 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 실험결과는 택사 추출물이 free radical의 생성을 억제시킬 수 있는 항산화작용 및 이에 따른 생리활성 물질을 함유하고 있음을 시사하고 있다. Ferric-Thiocyanate법에 의한 지질과산화 억제효과를 관찰했다. Ferric-Thiocyanate법은 지방산 linoleic acid의 산화에 의해 생성되어지는 지질과산화 물질인 peroxide 생성량을 측정하는 실험 방법이다. 이렇게 free radical 또는 ROS에 의해 생성되는 지질과산화 물질은 세포나 조직의 기능에 손상을 일으키거나 생체막의 변성에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ Fig. 3의 결과를 보면, 대조군은 시간의 경과에 따라 지질과산화 정도가 급속히 진행되지만 택사 추출물과 alisol B 23-acetate 성분의 첨가군에서는 대조군에 비하여 지질과산화 생성 물질이 감소되었다. 택사 MeOH 추출물 10 또는 50 µg/ml 첨가군에서는 대조군에 비하여 각각 34.4%와 47.5%로 지질과산화 정도가 억제되었으며, 택사 성분의 첨가군에서는 10 또는 50 µg/ml 농도에서 각각

41.2%와 35.9%로 지질과산화 물질의 생성을 억제시켰다. 반면에 양성 대조물로 사용한 합성 항산화제인 BHT 성분은 10 µg/ml 농도에서 택사 추출물과 성분의 지질과산화 생성보다 약 2배정도 뚜렷하게 억제효과를 나타냈다. 이상의 항산화 실험 결과, 택사 MeOH 추출물과 주성분인 alisol B 23-acetate 성분이 합성 항산화제 BHT보다 지질과산화와 free radical 소거능은 낮게 나타났지만 택사의 소염작용에 기인한 염증성 신호 전달에 관련된 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)에 대한 억제효과뿐만 아니라 택사의 생체내 항산화 활성을 평가하는데 기초적인 자료로 이용될 수 있을 것을 사료된다.

결 론

노화를 비롯한 다양한 성인병의 발생과 진행기전에 직간접적인 영향을 미치는 활성산소를 제거 또는 저해시키는 천연 항산화 소재를 개발하기 위한 연구의 일환으로 택사와 그 주성분의 항산화 활성을 평가하였다. 즉 택사 MeOH 추출물의 CH₂Cl₂ 분획물을 silica gel과 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 alisol B 23-acetate를 분리하였다. 택사 MeOH 추출물과 주성분 alisol B 23-acetate 화합물의 항산화 활성은 allophycocyanin assay와 ferric-thiocyanate법을 이용하여 라디칼 소거능과 지질과산화 억제 효과로 평가하였다. Allophycocyanin assay 결과, 택사 추출물 10 또는 50 µg/ml를 첨가한 그룹에서는 대조군에 비해 free radical에 의한 allophycocyanin 단백질의 형광강도가 약 2배 또는 4배 정도 억제되었다. 지질과산화 물질인 peroxide 생성량을 측정된 결과에서도 추출물과 성분은 10 또는 50 µg/ml 농도에서 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 peroxide 생성량을 감소시키나 양성 대조물인 BHT 보다는 낮은 수치를 나타냈다.

사 사

본 연구는 2005년도 순천대학교 대학자체 일반연구사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 이창복 (1985) 대한식물도감, 75. 향문사, 서울.
2. 박희진, 정병관, 임준택, 권병선 (1993) 승주지역의 택사 재배현황. 한국약용작물학회지 1: 202-204.
3. 허준 (1994) 동의보감 5(탕액, 침구편), 2727. 여강출판사, 서울.
4. 안덕균 (2003) 한국본초도감, 415. 교학사, 서울.
5. Nakajima, Y., Satoh, Y., Katsumata, M., Tsujiyama, K., Ida, Y. and Shoji, J. (1994) Terpenoids of *Alisma orientale* Rhizoma and the crude drug *Alismatis Rhizoma*. *Phytochemistry* 36: 119-127.
6. 장일무, 김영주, 윤혜숙, 김선옥 (1982) 택사로부터 분리한 alisol 성분의 간 보호작용. 생약학회지 13: 112-115.
7. 최장선 (1998) 택사가 백서의 고지혈증에 미치는 영향에 관한 연구. 경산대학교대학원 박사학위논문.
8. Lee, S. M., Kim, J. H., Zhang, Y., An, R. B., Min, B. S., Joung, H. and Lee, H. Y. (2003) Anti-complementary activity of protostane-type triterpenes from *Alismatis rhizoma*. *Arch. Pharm. Res.* 26: 463-465.
9. Kubo, M., Matsuda, H., Tomohiro, N. and Yoshikawa, M. (1997) Studies on *Alismatis rhizoma* I anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biol. Pharm. Bull.* 20: 511-516.
10. 임숙자, 김승희 (2001) 택사 분획물의 투여가 streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 혈당수준과 지질대사에 미치는 영향. 한국영양학회지 34: 619-625.
11. 은재순, 홍중성, 소준노 (1993) 3T3-L1 세포의 증식 및 분화에 미치는 백복령, 택사 및 창출의 영향. 생약학회지 24: 131-139.
12. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
13. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.
14. Branen, A. L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63.
15. Courderot-Masuyer, C., Dalloz, F., Maupoil, V. and Rochette, L. (1999) Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13: 535-540.
16. Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 735-739.
17. Nakagawa, T., Yokozawa T., Terasawa, K., Shu, S. and Juneja L. R. (2002) Protective activity green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2418-2422.
18. Simon, R. H., Scogging, C. M. and Patterson, D. (1981) Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 256: 7181-7186.

(2007년 11월 15일 접수)