

청미래덩굴 잎의 항산화 활성 성분

차배천* · 이은희

상지대학교 생명자원과학대학 동물생명자원학부

Antioxidant Activities of Flavonoids from the Leaves of *Smilax china* Linne

Bae Cheon Cha* and Eun Hee Lee

Division of Animal Science and Biotechnology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – In this study, we have investigated the antioxidant activities of the leaves of *Smilax china* Linne in order to find the antioxidant substances which has an scavenging effect of reactive oxygen species (ROS) from natural products. As a result, EtOAc and *n*-BuOH extracts of the leaves of *Smilax china* Linne exhibited potent antioxidant effect on various antioxidant experiment. The major components of antioxidant activity were isolated from EtOAc and *n*-BuOH extracts of the leaves of *Smilax china* Linne. Their structure of compounds were identified as kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside and kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside by spectroscopic evidence, respectively. Antioxidant activities were observed in kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside at 23 μ g and in kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside at 27 μ g as concentration of DPPH 50% reduction.

Key words – *Smilax china* Linne, reactive oxygen species (ROS), antioxidant, kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside

인체는 생명유지에 필요한 에너지를 만들기 위해 끊임없이 산소를 필요로 하며, 에너지를 만드는 과정에서 필수불가결한 분자이지만 호흡과정에서 흡입한 산소 중 일부분 (약 2-3%)은 활성산소라는 유독 작용을 하는 물질로 전환되어 생체에 큰 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 이러한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 체내 효소계, 환원대사, 물리적 또는 환경적 요인 등에 의해 끊임없이 생성되고 있는 일중항산소 (1O_2)나 superoxide (O_2^-), hydroxy radical ($\cdot OH$)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical과 과산화수소수 (H_2O_2) 등으로서 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포성분들을 공격하기 쉽게 되어 산화적 스트레스의 환경이 조성 된다.²⁾ 이들 활성산소는 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역체계의 인자를 손상시켜 질환을 일으키며,³⁾ 특히 문제가 되는 것은 활성산소종이 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내과산화 지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되고 동시에 노화 및 류머티스성 관절염, 심장병, 파킨슨씨병, 순환기장애, 간장질환, 암 등과

같은 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾

최근에 성인병 질환과 노화의 원인이 활성산소종에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 산소로부터 유래된 활성산소종을 조절하거나 제거할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 많은 항산화제의 개발 연구가 보고 되어져 있다.⁷⁻⁹⁾ 그러나 이들 항산화제 중 tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, BHA와 BHT 등의 합성 항산화제는 항산화력이 뛰어나 상업용 식품 및 의약품 등에 가장 많이 이용되고 있는 폐놀계 항산화제이나 이들은 변이원성 및 독성의 유해성이 지적되고 있어^{10,11)} 사용이 점차 감소하고 있는 추세이다. 따라서 오래 전부터 인간이 안전하게 먹어왔던 식품 자원인 천연물질이나 약용식물로부터 항산화 물질을 분리하여 합성 항산화제를 대체할 수 있는 항산화력이 우수한 새로운 천연 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.¹²⁻¹⁵⁾

본 연구는 기존에 연구 개발되어진 천연 항산화제보다 안전하고 우수한 활성을 나타내는 항산화제를 천연물로부터 개발하기 위한 연구의 일환으로 청미래덩굴 (*Smilax china* Linne) 잎에 대한 항산화 활성 연구를 수행하였다.

우리나라 전국 산야지에 분포하는 청미래덩굴은 한국을

*교신저자(E-mail): bccha@sangji.ac.kr
(FAX): 033-730-0503

비롯하여 중국, 일본에 널리 분포하며 백합과 (Liliaceae)의 덩굴성 낙엽관목으로서 명감나무 또는 망개나무라고 불리며 약명으로는 그의 근경을 지칭하는 생약인 토복령 (土茯苓)이다. 꽃의 개화기는 5-6월이며 9-10월에 적색의 열매를 맺고, 근경은 옆으로 뻗고 갈색이다. 잎은 호생하고 두껍고 넓은 타원형이며 끝이 뾰족해 지고 밑은 둥글고 가장자리가 밋밋하여 기부에서 5-7개의 맥이 나오며 다시 그물맥이 된다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 청미래덩굴 잎은 예로부터 민간에서 어린잎을 나물로 식용하거나 큰 잎은 여름철에 떡을 보존하는 천연식품보존제로 사용하였고,¹⁹⁾ 이에 근거한 청미래덩굴 잎의 항균 활성에 대한 연구 결과가 보고 되어져 있다.^{19,20)} 그 외 생리활성에 관한 연구로서는 전자공여능, 아질산염 소거능 등²¹⁾이 보고 되어져 있으나, 청미래덩굴 잎의 항산화 활성 성분에 대한 상세한 연구 결과는 보고 되어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 청미래덩굴 잎에 대한 항산화 활성 시험에 있어 free radical 소거효과는 DPPH법을, 지질 과산화 억제효과는 Ferric-Thiocyanate법 및 Rancimat법을 이용하여 항산화 효과를 검토하였고, 활성 주성분을 단리 후 화학적 구조 및 항산화 활성을 규명하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 - 본 실험에 사용한 청미래덩굴 잎은 경상북도 영주시 야산에서 채취한 후 음건하고 세절하여 실험 재료로 사용하였으며, 표본은 상지대학교 바이오산업공학과 응용천연물표본실에 보관중이다.

시약 및 기기 - 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, Lipophilic Sephadex-LH 20은 Sigma사, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (ART.5715, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 시약을 사용하였다. Free radical 소거효과 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며 지질과산화 억제효과 측정용 시약인 ammonium thiocyanate, Tween 20, HCl 및 EtOH 등은 모두 특급시약을 사용하였고, 식용유지 (soybean, corn, palm, lard)는 첨가제가 첨가되지 않은 식용 유지를 사용하여 측정하였다. 표준품인 α -tocopherol 및 BHA (butylated hydroxyanisole)는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였고, 기타 용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 흡광도는 Milton-Roy spectronic Genesis-5 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, 선광도는 Jasco DIP-4 polarimeter를 사용하였다. FT-NMR은 Varian Mercury 300 MHz를 사용하였으며, 용점은 Mettler FP-5 용점측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. 산화 안정도 측정기기로서는 Rancimat 679 METROHM을 사용하여 측정하였다.

추출 및 분리 - 음건한 청미래덩굴 잎 129 g에 MeOH 500 ml를 가하여 수욕 상에서 5시간씩 3회 환류 추출하여 여과 후 농축하여 청미래덩굴 잎 MeOH ext. (31 g)를 얻었다. 얻어진 MeOH ext.를 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH 순으로 분획 후 농축하여 각 분획물 *n*-hexane ext. (5.4 g), EtOAc ext. (3.1 g), *n*-BuOH ext. (5.4 g) 및 H₂O ext. (10.7 g)를 각각 얻었다. 분획물 중 가장 우수한 항산화 효과를 나타낸 EtOAc 분획물 (2 g)을 *n*-hexane : Acetone = 5 : 1의 용출 용매를 이용하여 silica column chromatography를 실시하여 4개의 소분획물인 fraction E-1 (45 mg), fraction E-2 (127 mg), fraction E-3 (34 mg) 및 fraction E-4 (785 mg)로 나누었다. 연속적인 항산화 실험에 의해 항산화 효과를 나타낸 fraction E-4로부터 활성 주성분을 규명하기 위하여 계속하여 CHCl₃ : MeOH = 20 : 1에서 7 : 1로 단계적으로 극성을 높인 용출 용매를 이용하여 silica gel column chromatography로 정제한 후 다시 MeOH : H₂O = 4 : 6에서 6 : 4로 극성을 높여가는 용매를 사용하여 Lipophilic Sephadex LH-20으로 정제하여 화합물 1 (27 mg)을 얻었다. 또한 EtOAc와 유사한 항산화 효과를 나타낸 *n*-BuOH 분획물에 대해서도 활성 주성분을 단리하기 위해 *n*-BuOH 분획물 (1 g)을 CHCl₃ : MeOH = 20 : 1에서 8 : 1로 단계적으로 극성을 높인 전개용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획물인 fraction B-1 (169 mg), fraction B-2 (98 mg), fraction B-3 (29 mg), fraction B-4 (101 mg) 및 fraction B-5 (550 mg)로 나누고, 이 중 항산화 효과를 나타낸 fraction B-4에 대하여 다시 MeOH : H₂O = 4 : 6에서 6 : 4의 전개용매를 사용한 Lipophilic Sephadex LH-20으로 정제하여 화합물 2 (36 mg)를 분리하였다.

화합물 1 - Yellow amorphous powder (EtOH); m.p. : 229-231°C; UV λ_{max} : 265, 324 (MeOH); $[\alpha]_D^{25} = -131.2^\circ$ (c 0.7, MeOH); ¹H-NMR(CD₃OD) δ : 1.26 (3H, d, *J*=6.0 Hz, 6"-CH₃), 3.31~4.02 (4H, m, H-2"~5"), 5.55 (1H, s, H-1"), 6.38 (1H, s, H-6), 6.70 (1H, s, H-8), 6.88 (2H, d, *J*=8.1 Hz, H-3',5'), 8.07 (2H, d, *J*=8.1 Hz, H-2',6'); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 176.3 (C-4), 162.0 (C-7), 161.1 (C-5), 159.5 (C-2,C-4'), 156.5 (C-9), 136.4 (C-3), 129.6 (C-2',C-6'), 122.3 (C-1'), 115.2 (C-3',C-5'), 105.0 (C-10), 98.7 (C-1'), 98.6 (C-6), 94.1 (C-8), 72.4 (C-4'), 70.9 (C-3"), 70.5 (C-2"), 70.0 (C-5"), 16.9 (C-6"); EI-MS m/z 432 [M]⁺.

화합물 2 - Yellow amorphous powder (EtOH); m.p. : 187-188°C; UV λ_{max} : 266, 323 (MeOH); $[\alpha]_D^{25} = -237.8^\circ$ (c 0.8, MeOH); ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 0.93 (3H, d, *J*=5.4 Hz, 6"-CH₃), 1.26 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 6"-CH₃), 3.51~4.90 (8H, m, H-2"~5", H-2'"~5"), 5.38 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-1"), 5.55 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-1"), 6.43 (1H, d, *J*=2.1 Hz,

H-6), 6.69 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.91 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2',6'), 6.92 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3',5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 178.5 (C-4), 162.3 (C-7), 160.6 (C-5), 158.6 (C-2, C-4'), 156.8 (C-9), 135.3 (C-3), 130.8 (C-2',C-6'), 121.2 (C-1'), 115.4 (C-3',C-5'), 106.3 (C-10), 102.3 (C-1''), 99.4 (C-1'''), 98.6 (C-6), 94.4 (C-8), 72.4 (C-4'''), 72.0 (C-4''), 70.9 (C-3'',C-3'''), 70.7 (C-2'',C-2'''), 70.5 (C-5''), 70.1 (C-5'''), 16.9 (C-6'''), 16.5 (C-6''); EI-MS m/z 578 $[\text{M}]^+$.

청미래덩굴 잎 분획물 및 항산화 활성 주성분의 DPPH 라디칼 소거작용의 측정 - Uchiyama 등²²⁾의 방법을 약간 변형시킨 Yoshikawa 등²³⁾의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M의 초산 완충액 (pH 5.5, 2.0 ml)에 시료의 EtOH 용액 (2.0 ml) 및 2×10^{-4} M DPPH EtOH 용액 (1.0 ml)을 가하여 전량을 5 ml로 하고 실온에 방치한 후, 30 분 후 517 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 (μg)을 α -tocopherol 및 BHA와 같은 기존의 항산화제를 대조군으로 하여 시험하였다.

청미래덩굴 잎 분획물의 Ferric-Thiocyanate 법에 의한 지질 과산화 억제활성 측정 - Ferric-Thiocyanate 법은 Inatani 등²⁴⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료의 EtOH 용액 (2.0 ml), linoleic acid EtOH 용액 [linoleic acid (2.51 g)의 EtOH (100 ml)용액] (2.0 ml), 0.05 M 인산완충액 (pH 7.0, 4.0 ml), 증류수 (1.9 ml) 및 10% Tween 20 (0.1 ml)을 20 ml의 시험관에 시료의 최종농도가 0.005%가 되도록 전량을 10 ml로 하여 40°C의 암소에 방치하였다. 이 시료 0.1 ml에 75% EtOH (9.7 ml) 및 30% ammonium thiocyanate (0.1 ml)를 가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 2×10^{-2} M 염화제일철의 3.5% 염산용액 (0.1 ml)을 가하고, 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

청미래덩굴 잎 분획물의 Rancimat법에 의한 지질 과산화 억제 활성 측정 - Rancimat 법은 Chen 등²⁵⁾과 Lim 등²⁶⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료와 유지 혼합물 2.5 g, 증류수 70 ml, flow rate 20 L/hr, 반응온도 120°C로 하여 산화 안정성을 비교하였다. Antioxidant index (AI)는 각 시료를 첨가한 실험군의 유도기간을 무첨가군의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다. 이때 시료의 첨가량은 각각 200, 400 및 600 ppm로 하여 3회 반복 측정하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다.

결과 및 고찰

청미래덩굴 잎 추출물의 항산화 효과 - 육류의 보존과 식품의 산패 방지를 위해 널리 사용되고 있는 합성 항산화제인 BHA와 BHT는 우수한 효과와 경제적 유효성 때문에 빈번하게 사용되어져 왔지만 합성 식품 첨가물의 일반적인 회

피 현상과 더불어 과량 섭취 시에는 간, 위장점막, 폐, 순환계 등에 심각한 독성 작용을 일으키는 것으로 보고²⁷⁾되어짐에 따라 안전하게 사용할 수 있는 천연 항산화제의 개발이 요구되어지고 있다. 따라서 인체에 무해하고 항산화력이 우수한 천연 항산화제 개발 연구의 일환으로 국내 산야에서 쉽게 찾아 볼 수 있는 천연자원인 청미래덩굴의 잎에 대하여 항산화 효과를 연구하였다. 기존에 널리 알려진 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA를 대조군으로 하여 청미래덩굴 잎의 추출 및 분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용시험을 실시한 결과, Table I에 나타낸 바와 같이 청미래덩굴 잎의 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에서 대조군인 α -tocopherol 보다는 강하고 BHA와는 유사한 강력한 free radical 소거효과를 나타내었다. 계속하여 보다 상세한 항산화 효과 시험을 위해 불포화지방산인 linoleic acid를 이용하여 불포화지방산의 과산화 정도를 장기보관에 따른 억제율로 항산화 활성을 측정하는 Ferric-Thiocyanate법에 의한 지질 과산화 억제 시험 결과 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 control 군이 12일, 천연 항

Table I. Radical scavenging effect of solvent extract and fractions obtained from the leaves of *Smilax china* Linne on DPPH method

Samples	50% reduction (μg) ^a
α -Tocopherol	22
BHA	15
MeOH ext.	27
<i>n</i> -Hexane ext.	48
EtOAc ext.	15
<i>n</i> -BuOH ext.	16
H ₂ O ext.	48

^aAmount required for 50% reduction of DPPH (2×10^{-7} ml, 0.079 mg) solution.

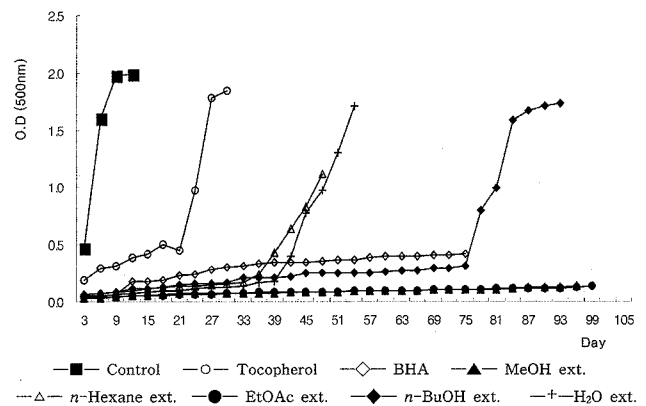


Fig. 1. Lipid peroxidation inhibitory effect of solvent extract and fractions obtained from the leaves of *Smilax china* Linne on Ferric-Thiocyanate method.

Table II. Lipid peroxidation inhibitory effect of solvent extract and fractions obtained from the leaves of *Smilax china* Linne on Rancimat method¹⁾

Samples	Soybean oil (ppm)			Corn oil (ppm)			Lard oil (ppm)			Palm oil (ppm)		
	200	400	600	200	400	600	200	400	600	200	400	600
α -Tocopherol	1.057	0.943	0.988	0.938	0.982	1.086	1.876	2.341	3.105	0.993	0.916	0.979
BHA	1.093	1.117	1.171	1.042	1.039	1.114	2.770	3.725	4.540	0.931	1.006	1.076
MeOH ext.	0.995	0.966	1.355	1.039	1.014	1.116	1.176	0.949	0.958	1.127	1.090	1.219
<i>n</i> -Hexane ext.	0.934	0.989	0.998	1.005	0.999	1.233	0.843	1.045	1.157	1.058	1.135	1.188
EtOAc ext.	1.051	1.124	1.115	1.003	1.040	1.042	1.152	1.505	1.405	1.233	1.385	1.432
<i>n</i> -BuOH ext.	1.000	1.039	0.952	0.949	1.020	0.954	1.008	1.110	1.000	0.983	1.058	1.085
H ₂ O ext.	1.024	0.965	0.916	0.968	0.944	0.980	0.861	1.052	1.020	1.026	1.029	1.034

¹⁾Antioxidative index (AI, induction time of oil containing of each extract/induction time of test oil).

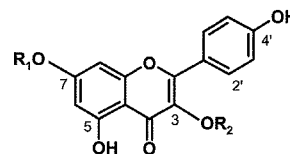
산화제 α -tocopherol을 첨가한 군은 30일 만에 거의 과산화가 일어남에 비하여 합성 항산화제인 BHA를 첨가한 군은 75일 만에 과산화가 일어났으며, 청미래덩굴 잎의 *n*-hexane과 H₂O 분획물을 첨가한 군은 48일 이상, 청미래덩굴 잎의 MeOH, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물을 첨가한 군에서는 75일 이상에서 과산화가 일어났다. 따라서 청미래덩굴 잎의 MeOH, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다는 월등히 우수하고, 합성 항산화제인 BHA와는 유사한 강력한 지질 과산화 억제 효과를 보였다. Rancimat법에 의한 지질 산패 억제실험 결과 또한 Table II에 나타낸 것과 같이 청미래덩굴 잎의 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물이 4종의 식용유지 (soybean, corn, lard, palm oil) 중에서 lard oil을 제외한 3종의 식용유지에서 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA와는 유사한 지질 산패 억제 효과를 보였다.

항산화 활성 주성분의 분리 - 항산화 실험 결과, 가장 우수한 효과를 나타낸 EtOAc 분획물에 대하여 활성 주성분을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography에 의해 소분획하고 얻어진 4종의 소분획물에 대해서 연속적인 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용을 실시한 결과 fraction E-4의 소분획물이 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 우수한 효과를 나타낸 fraction E-4 소분획물을 재차 silica gel column chromatography와 Lipophilic Sepadex LH-20에 의해 분리·정제하여 fraction E-4로부터 화합물 1을 얻었다. EtOAc 분획물 다음으로 우수한 항산화 효과를 나타낸 *n*-BuOH 분획물에 대해서도 활성 주성분을 분리하기 위하여 EtOAc 분획물과 유사한 방법으로 column chromatography를 실시하여 활성 소분획 fraction B-4로부터 화합물 2를 얻었다.

화합물의 구조 동정 - 얻어진 화합물 1은 황색 분말로 FeCl₃ 시험에서 녹색을, 아니스알데히드-황산시액에서 오렌지색을 나타내어 flavan계 물질로 추정되었고, UV에서 벤젠환의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 ¹H-NMR에서는 δ 1.26에서 그리고 ¹³C-NMR에서는 δ 16.9에서 rhamnose 유래의 methyl기 피크가 관측되고, ¹H-NMR의 δ 3.31~4.02에

서 4개의 rhamnose 유래의 methylene 피크가, ¹H-NMR의 δ 5.51에서 rhamnose의 1번 anomeric 수소가 single 피크로 관측되고 ¹³C-NMR에서 δ 98.7에서 anomeric 탄소가 관측됨에 따라 flavan계에 rhamnose가 α 형태로 결합된 flavonoid 배당체임을 추정할 수 있었다. 계속하여 ¹H-NMR에서 δ 6.88과 8.07은 4' 위치가 치환된 B-ring의 2'와 3' 및 5'와 6' proton간의 o-coupling에 기인한 것으로 δ 6.88의 3'와 5'의 proton으로 δ 8.07의 피크 2'와 6'의 proton으로 추정하였다. 그리고 δ 6.38과 6.70의 proton 피크는 5,7-dioxygenated A-ring에서 기인하는 proton 피크로 각각 A-ring의 6과 8 proton으로 추정할 수 있음에 의해 flavan계 화합물은 kaempferol로 추정할 수 있었다. 동시에 ¹³C-NMR에서 kaempferol의 7 위치의 탄소 피크가 고자장으로 이동함에 의해 kaempferol의 A-ring의 7번 위치에 rhamnose가 결합한 것으로 추정되었다. 이상의 자료와 화합물 1의 ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 문헌치²⁸⁻³⁰⁾의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 1의 구조는 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside로 동정하였다.

화합물 2는 물리, 화학적 spectral data가 화합물 1과 유사하였고, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR에서 화합물 1에서 보다는 rhamnose 유래의 피크가 1개씩 더 관측됨으로서 화합물 1에 rhamnose가 1개 더 결합한 flavonoid 배당체 화합물로



Compound 1 : R₁ = α -L-rhamnopyranose, R₂ = H

Compound 2 : R₁ = α -L-rhamnopyranose, R₂ = α -L-rhamnopyranose

Fig. 2. Structure of compound 1 and compound 2 isolated from EtOAc extract and *n*-BuOH extract of the leaves of *Smilax china* Linne.

Table III. Radical scavenging effect of kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside and kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside isolated from the leaves of *Smilax china* Linne on DPPH method

Samples	50% reduction (μg) ^a
α -Tocopherol	22
BHA	15
Kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside	23
Kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside	27

^aAmount required for 50% reduction of DPPH (2×10^{-7} ml, 0.079 mg) solution.

추정하였다. 그 결합 위치는 ¹³C-NMR에서 비당부인 kaempferol의 B-ring의 3위치의 탄소 피크가 고자장으로 이동함에 의해 또 하나의 rhamnose는 B-ring의 3 위치에 결합한 것으로 확인하였다. 이상의 자료와 화합물 2의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 문헌치³¹⁻³³의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 2의 구조는 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside로 동정하였다.

화합물의 항산화 활성 - 청미래덩굴 잎의 항산화 활성 주성분으로 분리한 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside와 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside에 대해서도 분획물과 같이 DPPH법을 이용한 항산화 실험을 실시한 결과, Table III에 나타낸 바와 같이 DPPH의 50% 억제농도로서 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside는 23 μg , kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside는 27 μg 에서 항산화 효과를 보였다. 이는 BHA (15 μg)보다는 약하고 α -tocopherol (22 μg)과는 거의 유사한 항산화 효과를 나타내었다. 이는 단리된 화합물이 항산화 활성 주성분이기는 하나 분획물에서는 다른 화합물과의 상승효과에 의해 우수한 항산화 효과를 발현한 것으로 사료된다.

결 론

노년층의 증가와 식생활 습관 및 환경의 급속한 변화에 따라 암, 당뇨 및 동맥경화화 같은 다양한 성인병들이 발생하고 있으며, 이들 성인병은 산화적 스트레스에 의해 발생하는 활성산소가 원인 물질임이 인정됨에 따라 활성산소를 제거 또는 약화시키는 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 지금까지 개발되어진 다양한 합성 항산화제들은 독성, 유해성 면에서 그리고 천연 항산화제는 약효면 등에서 한계를 나타내고 있다. 따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 천연물이나 약용식물로부터 새로운 항산화제를 개발하기 위한 연구의 하나로 청미래덩굴 잎에 대하여 항산화 효과 및 항산화 활성 주성분 규명 연구를

실시한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

청미래덩굴 잎의 용매별 분획물에 대하여 DPPH법, Ferric-Thiocyanate법 및 Rancimat법에 의해 항산화 활성을 측정 한 결과, EtOAc와 *n*-BuOH 분획물이 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 항산화 활성 주성분을 규명하기 위하여 우수한 항산화 효과를 나타낸 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에 대하여 항산화 활성을 검토하면서 소분획으로부터 주성분 단리를 실시한 결과, EtOAc 분획물은 fraction E-4로부터 화합물 1을 *n*-BuOH 분획물은 fraction B-4로부터 각각 화합물 2를 분리하였다. 분리된 화합물 1과 2의 기기 분석치를 문헌치의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 1은 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside로 화합물 2는 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside로 동정하였다. 단리된 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside와 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside의 항산화 활성을 DPPH법에 의해 실시한 결과 대조군인 천연항산화제 α -tocopherol과 유사한 항산화 효과를 보였다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2005년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Ahmad, S. (1995) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall, New York.
- Papa, S. and Skulachev, V. P. (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* **174**: 305-319.
- Fukuzawa, K. and Takaishi, Y. (1990) Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* **1**: 55-70.
- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs*, **42**: 569-605.
- Cerutti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet*. **344**: 862-863.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radical, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet*. **23**: 1396-1397.
- Corl, M. M. (1974) Antioxidant activity of tocopherol and ascorbylpalmitate and their mode of action. *JAOCs*. **51**: 321-325.
- Coleman, M. D., Fernandes, S. and Khanderia, L. A. (2003) A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamin E, C and α -lipoic acid) in diabetic volunteers using *in vitro* methaemoglobin formation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **14**: 69-75.
- Monsen, E. R. (2000) Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients : vitamin C, vitamin E, selenium, and car-

- otenoids. *J. Am. Diet. Assoc.* **100**: 637-640.
10. Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M. and Ogiso, T. (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole on F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**: 343-352.
 11. Branen, A. L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*. **52**: 59-63.
 12. Kolak, U., Ozturk, M., Ozigokce, F. and Ulubelen, A. (2006) Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity. *Phytochemistry*, **67**: 2170-2175.
 13. Chung, Y. C., Chien, C. T., Teng, K. Y. and Chou, S. T. (2006) Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & Zucc. *Food Chem.* **97**: 418-425.
 14. Lee, S. O., Kim, M. J., Kim, D. K. and Choi, H. J. (2005) Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 139-147.
 15. Yu, W., Zhao, Y. and Shu, B. (2004) The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids. *Food Chem.* **86**: 525-529.
 16. Kim, T. J. (1993) Alpine flowers of korea, 542. Kyo Hak Sa, Seoul.
 17. Park, J. H., Kim, J. M. and Do, W. I. (2002) Pharmacognostical study on the To Bog Ryung. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 169-172.
 18. Son, K. H., Seo, J. H., Lee, J. M., Kwon, S. J., Chang, S. Y. and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative determination of dioscin from *Smilacis Chinae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 153-156.
 19. Choi, H. Y. (2004) Antimicrobial effect of ethanol extract of *Smilax china* leaf. *Korean J. Sanitation*, **19**: 22-30.
 20. Song, J. H., Kim, H. S., Kim, Y. G., Son, B. G., Choi, Y. W. and Kang, J. S. (1999) Antimicrobial activity of extract from *Smilax china*. *J. Agrl. Tech. & Dev. Inst.* **3**: 1-6.
 21. Jin, T. Y., Park, J. R. and Kim, J. H. (2004) Electron donating abilities, nitrite scavenging effects and antimicrobial activities of *Smilax china* leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 621-625.
 22. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K. (1968) Biochemical studies of physiological function of tocopherone lactone.1. *Yakugaku Zasshi*, **88**: 678-683.
 23. Yoshikawa, M., Harada, E., Miki, A., Tsukamoto, K., Liang, S. Q., Yamahara, J. and Murakami, N. (1994) Antioxidant constituents from the fruit hulls of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in vietnam. *Yakugaku Zasshi*, **114**: 129-133.
 24. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983) Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosemaries officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 521-528.
 25. Chen, C. W. and Ho, C. T. (1995) Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *J. Food Lipids*, **2**: 35-46.
 26. Lim, D. K., Choi, U. and Shin, D. H. (1996) Antioxidative of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 77-82.
 27. Choe, S. Y. and Yang, K. H. (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**: 283-288.
 28. Sharaf, M., EL-Ansari, M. A. and Saleh, N. A. M. (1997) Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**: 161-166.
 29. Ozden, S., Durust, N., Toki, K., Saito, N. and Honda, T. (1998) Acylated kaempferol glycosides from the flowers of *Delphinium formosum*. *Phytochemistry*, **49**: 241-245.
 30. El-Sayed, N. H., Awaad, A. S., Hifnawy, M. S. and Mabry, T. J. (1999) A flavonol triglycoside from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*, **51**: 591-593.
 31. Iwashina, T., Matsumoto, S., Nishida, M. and Nakaike, T. (1995) New and rare flavonol glycosides from *Asplenium trichomanes-ramosum* as stable chemotaxonomic markers. *Biochem. Syst. Ecol.* **23**: 283-290.
 32. Perez-Castorena, A., Castro, A. and De Vivar, A. R. (1997) A dirhamnopyranoside from *Psacalium megaphyllum*. *Phytochemistry*, **46**: 1297-1299.
 33. Moreno, A., Martin-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F. and Toro, M. V. (2002) Flavonoids from *Dorycnium rectum*. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**: 73-74.

(2007년 1월 4일 접수)