

백출 지상부의 항산화 성분

한정훈 · 김진효 · 김성건 · 정성희 · 김도훈 · 김기은 · 황완균*

중앙대학교 약학대학

(Received February 2, 2007; Revised April 12, 2007)

Anti-oxidative Compounds from The Aerial Parts of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi

Jung-Hoon Han, Jinhyo Kim, Sungun Kim, Sung-Hee Jung, Dohoon Kim, Gi-Eun Kim and Wan-Kyunn Whang*

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

Abstract — *Atractylodes macrocephala* has been used for renal anorexia, gastroenteritis, cold, dyspepsia in Korean folk medicine. Specially aerial parts has been eaten as edible mountain herbs. In order to investigate the efficacy of antioxidant activity, the activity guided fractionation and isolation of physiologically active substance were performed. For the investigation of the active components from *Atractylodes macrocephala* MeOH extracts of aerial parts of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi L. were suspended with H₂O, partitioned by CHCl₃. In order to investigate the efficacy of antioxidative activity, the activity guided fractionation and isolation of physiologically active substance were performed. CHCl₃, H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH fractions were examined antioxidative activity by DPPH method. It was revealed that 30% MeOH and 60% MeOH fractions have significantly antioxidant activity. From 30% MeOH and 60% MeOH fraction, six flavonoids (7-methoxy-pinoembrin-7-O-β-D-glucopyranoside, apigenin-8-C-β-D-glucopyranoside, 4'-caffeoyl-luteolin-6-glucopyranoside, luteolin-6-C-β-D-glucopyranoside, apigenin-6-C-β-D-glucopyranoside, luteolin) and four phenylpropanoids (3-feruloylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, feruloyl acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid) were isolated. To investigate the antioxidant activities of each compounds, we measured radical scavenging activity with DPPH method and anti-lipid peroxidative efficacy on low density lipoprotein (LDL) with TBARS assay. Six compounds (III, IV, V, VI, IX, X) which have antioxidant factor showed significant activities.

Keywords □ *Atractylodes macrocephala*, DPPH method, TBARS assay, anti-lipid peroxidation

백출(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로서 큰꽃삽주라는 이명으로도 불리며 주로 중국의 절강, 강서, 협서성등에서 재배되며 우리나라에서는 중국에서 종자를 도입하여 일부에서 재배하고 있다.¹⁾ 생약으로는 근경 또는 주피를 제거한 뿌리를 백출(白朮) *Atractylodes Rhizoma Alba*이라고하나 우리나라에서는 약용부위인 백출의 기원식물을 삽주 *A. japonica* Koidzumi와 백출 *A. macrocephala* Koidzumi로 규정하고 있고 중국에서는 *A. ovata*와 같은 기원인 백출 *A. macrocephala* Koidzumi로만 백출로 규정한다.^{2,3)}

백출은 창출과 더불어 우리나라에서 방향성 건위제로 한방에

서 비장(脾臟)을 보강하는 사군자탕(四君子湯), 이중탕(理中湯), 보중익기탕(補中益氣湯), 당귀산(當歸散), 곽향정기산(藿香正氣散), 오령산(五苓散), 위령산(胃苓散), 이출탕(二朮湯), 향사양위탕(香砂養胃湯) 등의 건비보비(健脾補脾) 처방에 빈용되며, 진정, 이노, 지한, 자양, 안태효과도 있다.^{4,5)}

한편 *Atractylodes* 속 식물에 대한 성분연구로는 Lim 등이 *A. japonica*의 rhizomes에서 hydroxyatractylon, 1,4-diacetoxytrideca-6,12-diene-8,10-di-yne 등을 분리 보고하였고,⁶⁾ Chen 등은 *A. macrocephala*의 근경에서 sitosterol, sitosterol-3-glucoside, scopoletin, atractylenolide I, II, III, 3β-acetoxy-atractylenolide III, 3β-acetoxy-atractylone, atractylenolactam, 8β-methoxy-atractylenolide I 등을 분리하였고,⁷⁾ Marion 등은 *A. lancea*의 근경에서 1-(2-furyl)-(E)-nonene-3,5-diyne-1,2-diacetate, erythro-(1,5E,11E)-tridecatriene-7,9-diyne-3,4-diacetate, threo-(1,5E,11E)-tridecatriene-7,9-diyne-3,4-diacetate, (3E,5E,11E)-tridecatriene-

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-825-5611
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

7,9-diyne-1,2-diacetate, (3Z,5E,11E)-tridecatriene-7,9-diyne-1,2-diacetate, (3E,5Z,11E)-tridecatriene-7,9-diyne-1,2-diacetate 등을 분리하였다.⁸⁾ 또한 Nakai 등은 *A. lancea*의 근경에서 hinesol, β -eudesmol, atractylodin, atractylodinol, 4,6,12-tetradecatriene-8,10-diyne-1,3,14-triol 등을 분리하여 보고하였다.⁹⁾

Atractylodes속 식물에 대한 활성연구를 보면 Ko 등이 *A. ovata*의 혈압강화작용에 대하여 보고하였고,¹⁰⁾ Taguchi 등은 *A. lancea*의 rhizome에서 분리된 장 면역체계를 조절하는 arabinogalactan의 oligosaccharide chain의 구조에 대하여 보고하였다.¹¹⁾ 또한 최근 Kim 등이 Atractylodes속 근경에서 분리한 selina-4(14),7(11)-diene-8-one의 멜라닌 생성 억제효과를 보고하였고,¹²⁾ Lee 등은 *A. japonia*의 근경 추출물의 암세포 증식 저해능에 대하여 보고하였다.¹³⁾ 또한 Huang 등이 human leukemia cell에서의 *A. macrocephala*로 유도된 apoptosis의 reactive oxygen mediation에 대하여 보고하였고¹⁴⁾ Hiroshi 등은 *A. lancea*에서 분리된 β -eudesmol의 antiangiogenic activity를 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 입증하였다.^{15,16)}

이상과 같이 백출은 근경에 대한 연구만 되어 있을 뿐 이른 봄에 나물로 먹는 지상부의 성분 및 활성연구는 없음에 착안하여 백출 지상부의 본초학적 고찰 그리고 최근 여러 문헌의 연구를 토대로 하여 백출의 항산화 및 지질과산화 억제작용에 대한 활성의 가능성 등에 착안하여 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 백출(*Atractylodes macrocephala*) 지상부는 2002년 8월에 화순에서 채취하여 중앙대학교 약학대학 약품자원 식물학실에서 식물학적 감정을 거친 후 음건한 2.16 kg을 재료로 사용하였다.

대조표본의 수와 보관장소

대조표본 : 경상북도 안동(재배품)

경상북도 울진(재배품)

강원도 정선(야생)

북한(수입-재배품)

보관장소 : 뿌리 생약으로 영양분이 많아 곤충이 기생할 가능성이 있으므로 음건 하여 수분을 최대한 제거한 후 냉암소에 보관하여야 하며 수분 및 산소제거제를 넣어서 밀폐 보관한다.

시약 및 기기

UV/VIS는 Human TU-1800PC(KOREA)를 사용하였고, Centrifuge는 Centrikon T-1180(Italy), Hanil Science Industrial

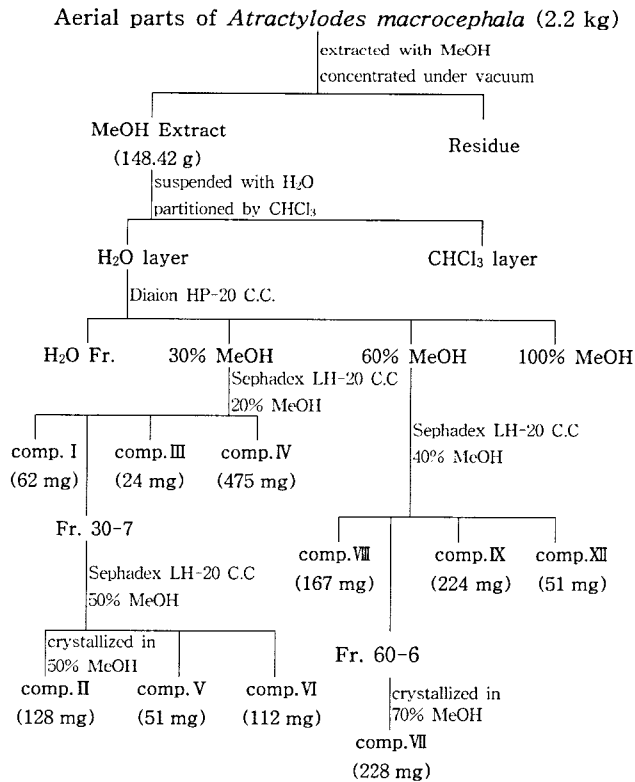
CO. Union 55R(Korea)를 사용하였다. FAB-MS spectrometer 측정에서 사용된 것은 VG 70-VSEQ(England)이고 Source는 이온화 된 35 keV Cs⁺ ion beam을, Matrix는 glycerol을 사용하였다. ¹H-NMR spectrometer는 Bruker, Avance-500, 500 MHz (USA)를, ¹³C-NMR spectrometer는 Bruker, Avance 500, 125 MHz(USA)를 사용하였다. TLC 확인시험에는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany)를 사용하여 이동상 CHCl₃:MeOH:H₂O (70:30:4), CHCl₃:MeOH:H₂O(90:20:2), Benzene:EtOAc:EtOH(2:1:1)와 Hexane:EtOAc(1:1, 2:1)의 조성을 이용하였고, 검출시약으로는 Ethanolic-FeCl₃ solution과 10%-H₂SO₄ in EtOH(heating)에서 발색을 하였고 UV-lamp(254 nm)에서도 확인을 하였다. Column Chromatography에 사용한 Gel은 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co. Japan), Sephadex LH-20(25~100 μ m, Pharmacia, Sweden)를 사용하였다. 시약으로는 L-Ascorbic acid, Human plasma LDL, 1,1,3,3-Tetraethoxypropane, Trichloroacetic acid(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Thiobarbituric acid(Fluka Chemika, Germany), Ethylenediaminetetraacetic acid-2Na, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl를 사용하였다.

시약의 제조

0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 DPPH 39.4 mg을 ethanol에 용해시켜 1000 ml이 되도록 용시 조제하였다. 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 조제하였다.

생약의 추출 및 엑스의 제조

음건한 백출 지상부 2.16 kg에 MeOH을 가하여 수욕상에서 3 회 열수 추출 후 여과하고, 감압농축하여 엑스 305.5 g을 얻었고 이 MeOH 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 CHCl₃를 가하여 진탕 반복추출하고, 분액깔때기에서 분획하여 CHCl₃층과 수층을 분취한 후 이를 감압농축하여 CHCl₃ 엑스 78.2 g과 물엑스 194.8 g을 얻었다. 물 엑스를 다공성 비이온상 교환수지인 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 물 분획물 148.4 g, 30% MeOH 분획 19.8 g, 60% MeOH 분획 14.0 g, MeOH 분획 1.7 g을 각각 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1 – Extraction and isolation of the constituents from the aerial parts of *Atractylodes macrocephala*.

<항산화능 실험>

항산화작용측정(DPPH법)

Hatano 등의 방법에 의하여¹⁷⁾ 각 fraction 및 단일 물질별 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 용시 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC₅₀치(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 농도)로 나타내었다.²¹⁾ 이후 효과가 좋은 fraction과 단일물질 등은 농도를 낮게(25, 50, 100, 200, 500 ppm) 하여 같은 방법으로 측정하였다.

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

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, Sigma), 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 하였다. Vortex mixer로 혼화하여 37°C 수욕 상에서 4시간 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 µl를 첨가하여 산화를 중지시켰다. 산화된 LDL용액에 25% trichloroacetic acid 1 ml를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상등액에 1% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하여 95°C에서 발색시킨 후 냉각시켰다. 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

MDA 표준시료로는 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용하였다.

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

F : 표준시료의 흡광도(532 nm)

f : 검체의 흡광도(532 nm)

각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu²⁺에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 측정하였다.

성분의 분리

강한 항산화 활성을 나타낸 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획을 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 반복 실시하여 다음의 10가지 compounds를 분리하였다(Scheme 1).

Compound I – 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며 이 중 fraction 1을 감압농축하여 황갈색 compound I(62 mg)을 얻었다.

Compound II – 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며 이 중 fraction 7을 다시 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 50% MeOH)를 실시하여 결정이 생성된 tubes를 50% 메탄올로 수 회 세척한 후 감압여과하고 감압농축하여 미황색 compound II(128 mg)를 얻었다.

Compound III – 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며 이 중 fraction 8를 감압농축하여 담황색 compound III(24 mg)을 얻었다.

Compound IV - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며 이 중 fraction 10를 감압농축하여 담황색 compound IV(24 mg)을 얻었다.

Compound V - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며, 이 중 fraction 7을 다시 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 50% MeOH)를 실시하여 다시 fraction 1~3을 얻었다. 이 중 fraction 1을 감압농축하여 황색 compound V(51 mg)를 얻었다.

Compound VI - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 30% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~13을 얻었으며, 이 중 fraction 7을 다시 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 50% MeOH)를 실시하여 다시 fraction 1~3을 얻었다. 이 중 fraction 3을 감압농축하여 황색 compound VI(112 mg)를 얻었다.

Compound VII - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 60% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~21을 얻었으며, 이 중 fraction 15의 결정이 생성된 tubes를 70% 메탄올로 수 회 세척한 후 감압과하고 감압농축하여 흰색 compound VII(228 mg)를 얻었다.

Compound VIII - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 60% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~21을 얻었으며, 이 중 fraction 9를 감압농축하여 진황색 compound VIII(167 mg)를 얻었다.

Compound IX - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 60% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~21을 얻었으며, 이 중 fraction 15를 감압농축하여 진황색 compound IX(224 mg)를 얻었다.

Compound X - 백출 지상부의 물가용부 엑스를 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 얻은 60% 엑스를 sephadex LH-20으로 column chromatography(이동상 : 20% MeOH)를 실시하여 fraction 1~21을 얻었으며, 이 중 fraction 19를 감압농축하여 황색 compound X(51 mg)를 얻었다.

성분의 구조 확인 및 물리화학적 성상

Compound I - 황갈색의 무정형으로 FeCl₃ 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(*m/z*): 367[M-H]⁺, ¹H-NMR : DMSO-*d*₆, δ ppm : 7.39(H, d, *J*=15.9 Hz, H-3'), 7.02(H, d, *J*=1.8 Hz, H-5'), 6.97(H, dd, *J*=6.2 Hz, *J*=1.8 Hz, H-9'), 6.77(H, d, *J*=8.1 Hz, H-8'), 6.12(H, d, *J*=15.9 Hz, H-2'), 5.01(H, dd, *J*=3.6 Hz, *J*=5.2 Hz, H-3), 3.74(H, ddd, *J*=8.1 Hz, *J*=1.9 Hz, *J*=8.2 Hz, H-5), 3.63(H, dd, *J*=3.1 Hz, *J*=5.9 Hz, H-4), 3.57(3H, s, H-10'), 2.10~1.99(2H, m, H-2), 1.94~1.76(2H, m, H-6), ¹³C-NMR : DMSO-*d*₆, δ ppm : Table II.

Compound II - 미황색의 무정형으로 H₂SO₄ 발색에서 황색을 보이며, FeCl₃ 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(*m/z*) : 431[M-H]⁺, ¹H-NMR : DMSO-*d*₆, δ ppm : 8.02(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.89(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', H-5'), 6.77(H, s, H-3), 6.27(H, s, H-6), 4.69(H, d, *J*=9.8 Hz, anomeric H Glc.), ¹³C-NMR : DMSO-*d*₆, δ ppm : Table I.

Compound III - 담황색의 무정형으로 FeCl₃ 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(*m/z*) : 609[M-H]⁺, 447[M-Glc-H]⁺, 285[M-Glc-caffeoyl acid-H]⁺, ¹H-NMR : DMSO-*d*₆, δ ppm : 7.43(H, d, *J*=15.9 Hz,

Table I - ¹³C-NMR spectral data of compound II, III, VI~VIII, X ppm (DMSO-*d*₆)

Carbon no.	II	VI	VII	VIII	X	Carbon no.	III
2	163.9	163.6	163.7	163.3	163.8	2	163.7
3	102.7	102.8	105.1	102.8	102.8	3	102.8
4	182.1	181.9	182.6	182.1	181.6	4	181.9
5	160.7	160.7	151.8	160.5	161.5	5	160.7
6	98.2	108.8	128.4	108.9	98.8	6	108.9
7	162.8	163.2	158.9	163.5	164.1	7	163.3
8	104.7	93.5	91.9	93.6	93.8	8	93.6
9	156.2	156.2	153.2	156.2	157.3	9	156.2
10	103.9	103.4	105.3	103.4	103.7	10	103.5
1'	121.6	121.5	130.7	121.4	121.5	1'	121.2
2'	128.9	113.3	126.6	128.7	113.3	2'	114.8
3'	119.4	145.7	129.4	115.5	145.7	3'	145.6
4'	161.2	149.7	132.3	161.2	149.7	4'	144.6
5'	119.4	116.1	129.4	115.5	116.0	5'	116.1
6'	128.9	118.9	126.6	128.7	118.9	6'	119.0
glc-1	73.4	73.1	102.3	73.4		1"	167.9
glc-2	70.8	70.6	77.5	70.8		2"	113.3
glc-3	78.9	78.9	76.7	78.9		3"	148.2
glc-4	70.2	70.2	74.4	70.2		4"	125.7
glc-5	81.8	81.6	70.1	81.6		5"	115.1
glc-6	61.7	61.5	61.1	61.5		6"	145.8
CH ₃			56.8			7"	149.7
						8"	115.7
						9"	121.5
						glc-1	73.1
						glc-2	70.7
						glc-3	78.9
						glc-4	70.3
						glc-5	81.6
						glc-6	61.5

H-3"), 7.39(H, d, $J=8.2$ Hz, H-6'), 7.02(H, d, $J=1.9$ Hz, H-5"), 6.90(H, d, $J=8.2$ Hz, H-8"), 6.76(H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=3.1$ Hz, H-9"), 6.74(H, dd, $J=8.1$ Hz, $J=1.9$ Hz, H-2'), 6.67(H, s, H-3), 6.49(H, s, H-8), 6.48(H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.18(H, d, $J=15.9$ Hz, H-2"), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I.

Compound IV – 담황색의 무정형으로 FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 515[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.48(H, d, $J=15.8$ Hz, H-3'), 7.48(H, d, $J=15.8$ Hz, H-3"), 7.04(H, s, H-5'), 7.04(H, s, H-5"), 7.00(H, d, $J=8.1$ Hz, H-9'), 7.00(H, d, $J=8.1$ Hz, H-9"), 6.78(H, d, $J=8.1$ Hz, H-8'), 6.78(H, d, $J=8.1$ Hz, H-8"), 6.22(H, d, $J=15.8$ Hz, H-2'), 6.22(H, d, $J=15.8$ Hz, H-2"), 5.23(H, ddd, $J=4.0$ Hz, $J=4.0$ Hz, $J=4.2$ Hz, H-3), 4.96(H, ddd, $J=4.1$ Hz, $J=4.1$ Hz, $J=4.2$ Hz, H-5), 3.62(H, dd, $J=5.7$ Hz, $J=5.2$ Hz, H-4), 2.36~2.32(2H, m, H-2), 2.30~2.26(2H, m, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table II.

Compound V – 황색의 무정형으로 FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 193[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.49(H, d, $J=15.9$ Hz, H- α), 7.27(H, s, H-2), 7.08(H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 6.80(H, d, $J=8.1$ Hz, H-6), 6.37(H, d, $J=15.9$ Hz, H- β), 3.81(H, s, $-\text{OCH}_3$), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table II.

Table II – $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data of compound I, IV, V, IX (DMSO- d_6)

Carbon no.	I	IV	IX	Carbon no.	V
1	73.1	79.2	73.5	γ	168.2
2	37.2	35.7	37.5	β	114.2
3	69.3	67.4	67.6	α	147.9
4	71.0	70.8	73.2	1	125.4
5	66.9	70.0	66.2	2	114.9
6	35.1	34.1	37.0	3	144.8
7	173.6	172.5	174.7	4	148.1
1'	165.8	166.0	166.0	5	115.5
2'	114.6	114.8	113.8	6	122.8
3'	144.9	145.5	145.6	CH_3	55.7
4'	125.6	125.6	125.5		
5'	115.9	115.9	114.8		
6'	145.6	145.6	145.5		
7'	148.5	148.5	148.5		
8'	113.9	114.3	115.8		
9'	121.4	121.4	121.5		
1"		165.3	165.5		
2"		114.2	113.6		
3"		145.2	145.6		
4"		125.5	125.5		
5"		115.8	114.8		
6"		145.6	145.5		
7"		148.4	148.5		
8"		114.3	115.7		
9"		121.4	121.5		
CH_3	51.8				

Compound VI – 황색의 무정형으로 H_2SO_4 발색에서 황색을 보이며, FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 447[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.41~7.43(2H, m, H-5', H-6'), 6.91(H, d, $J=8.2$ Hz, H-2'), 6.68(H, s, H-3), 6.49(H, s, H-8), 4.60(H, d, $J=9.8$ Hz, anomeric H Glc.), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I.

Compound VII – 흰색의 무정형으로 H_2SO_4 발색에서 황색을 보이며, FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 446[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 8.05(2H, dd, $J=6.1$ Hz, $J=1.0$ Hz, H-2', H-6'), 7.60(H, dd, $J=6.0$ Hz, $J=8.6$ Hz, H-4'), 7.56(2H, dd, $J=5.9$ Hz, $J=0.9$ Hz, H-3', H-5'), 6.94(H, s, H-3), 6.91(H, s, H-8), 5.05(H, d, $J=6.8$ Hz, anomeric H Glc.), 3.87(3H, s, $-\text{OCH}_3$), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I.

Compound VIII – 진황색의 무정형으로 H_2SO_4 발색에서 황색을 보이며, FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 432[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.93(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.93(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.78(H, s, H-3), 6.51(H, s, H-8), 4.60(H, d, $J=9.8$ Hz, anomeric H Glc.), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I.

Compound IX – 담황색의 무정형으로 FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 515[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.50(H, d, $J=15.8$ Hz, H-3'), 7.44(H, d, $J=15.8$ Hz, H-3"), 7.02(H, d, $J=1.9$ Hz, H-5'), 7.01(H, d, $J=1.9$ Hz, H-5"), 6.98(H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=6.4$ Hz, H-9'), 6.96(H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=6.4$ Hz, H-9"), 6.75(H, d, $J=8.2$ Hz, H-8'), 6.73(H, d, $J=8.2$ Hz, H-8"), 6.25(H, d, $J=15.8$ Hz, H-2'), 6.15(H, d, $J=15.8$ Hz, H-2"), 5.35(H, ddd, $J=4.2$ Hz, $J=4.2$ Hz, $J=4.1$ Hz, H-3), 4.97(H, dd, $J=3.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-4), 4.17(H, ddd, $J=4.2$ Hz, $J=5.9$ Hz, $J=4.1$ Hz, H-5), 2.17~2.13(2H, m, H-6), 2.04~1.90(2H, m, H-2), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table II.

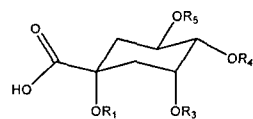
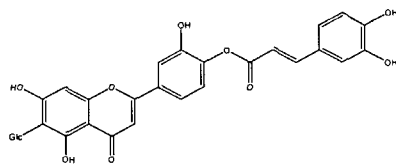
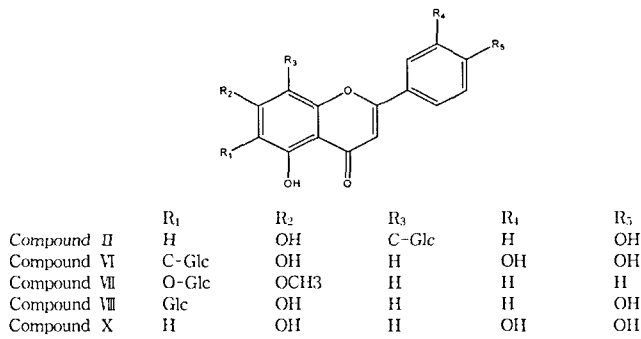
Compound X – 황색의 무정형으로 H_2SO_4 발색에서 황색을 보이며, FeCl_3 반응에 강한 양성을 나타냄.

FAB-MS(m/z) : 285[M-H], $^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : 7.42~7.40(2H, m, H-5', H-6'), 6.90(H, d, $J=8.3$ Hz, H-2'), 6.67(H, s, H-3), 6.45(H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 6.20(H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm : Table I.

결 과

분획별 활성 실험의 결과

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – 백출 지상부의 MeOH 추출물중 수용성 분획을 Diaion HP-20에 흡착시킨 후 H_2O , 30%



Compound I	R ₁ : H	R ₃ : F	R ₄ : H	R ₅ : H
Compound IV	R ₁ : H	R ₃ : H	R ₄ : C	R ₅ : C
Compound IX	R ₁ : H	R ₃ : C	R ₄ : H	R ₅ : C

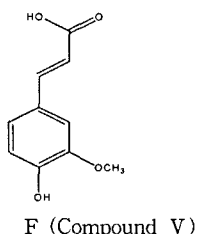
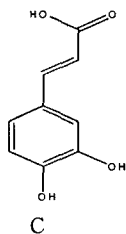


Fig. 1 - Structure of compound I~X.

Table III - IC₅₀ values of fractions against the DPPH radical

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)
H ₂ O Fr.	355.59±160.32
30% MeOH Fr.	19.05±0.76*
60% MeOH Fr.	18.86±0.82*
100% MeOH Fr.	54.58±4.96
CHCl ₃ Fr.	113.42±19.16
L-Ascorbic acid	2.96±0.46

MeOH, 60% MeOH, MeOH을 사용 분획한 분획물을 농도별로 (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 ppm) 조제하여 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획의 radical scavenging activity는 우수하였으며 60% MeOH 분획 > 30% MeOH 분획 > 100% MeOH 분획 > CHCl₃ 분획 > H₂O 분획 순으로 농도 의존적으로 radical scavenging activity가 증가하였다. 30% MeOH 분획, 60% MeOH 분획이 각각 IC₅₀

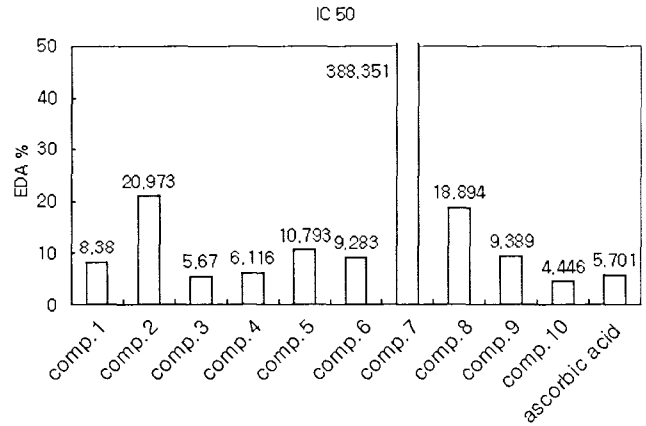


Fig. 2 - IC₅₀ Values of compound I~X against the DPPH radical.

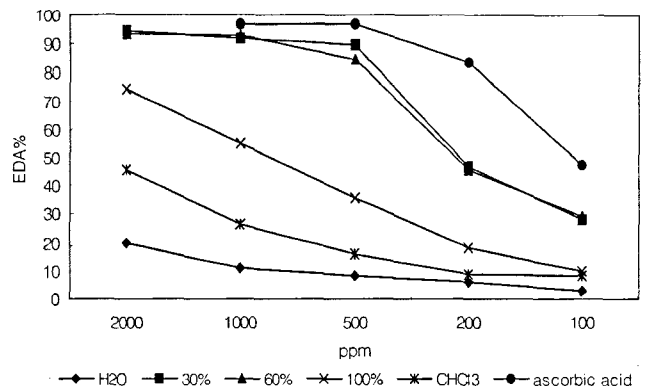


Fig. 3 - The radical scavenging activities of the aerial parts of *Atractylodes macrocephala* on DPPH.

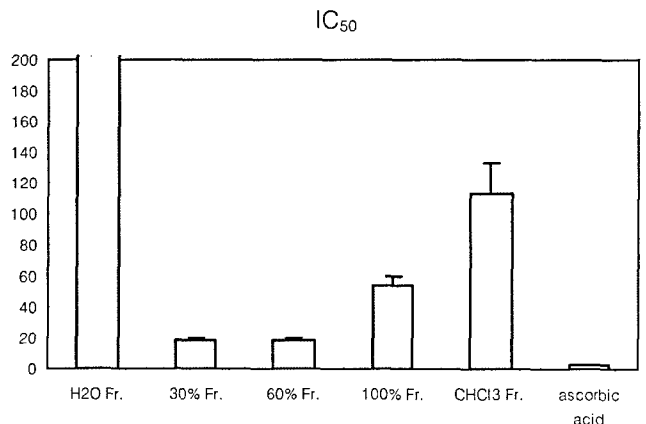


Fig. 4 - IC₅₀ values of the aerial parts of *Atractylodes macrocephala* on DPPH.

19.05 μg/ml, IC₅₀ 18.85 μg/ml로 우수한 radical scavenging activity를 나타내었다 (Table III, Fig. 3, 4).

LDL 산화에 대한 억제효과 측정 - 각각의 분획물을 6가지 농도에 대하여 LDL 지질과산화에 대한 억제활성을 실험한 결과

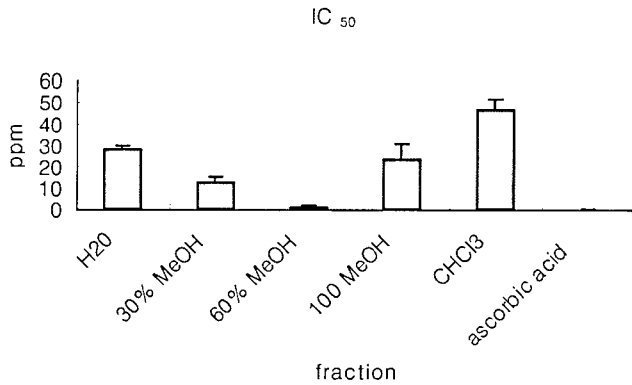


Fig. 5 - IC₅₀ Values of from the aerial parts of *Atractylodes macrocephala* on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation.

대조약물인 ascorbic acid와 비교하였을 때 백출 지상부의 지질 과산화에 대한 억제활성은 우수하였으며, 특히 60% MeOH 분획이 IC₅₀ 1.3 µg/m로 강한 활성을 나타내었다(Fig. 5).

화합물의 활성 실험 결과

분리된 성분의 항산화 활성 - 백출 지상부 각각의 분획에 대한 항산화 활성 실험 결과 활성을 보인 30% MeOH, 60% MeOH 분획에서 분리한 10개 화합물의 항산화 활성 측정을 위해 DPPH 법에 의한 각각의 radical scavenging activity와 LDL의 지질과 산화에 대한 억제 효과를 측정하였다.

DPPH를 이용한 항산화능 측정 - 각 화합물을 농도별 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm으로 조제하여 각각의 compound의 DPPH radical에 대한 scavenging activity를 실험한 결과 compound III, IV, X번은 positive control인 L-ascorbic acid와 비교하여 우수한 radical scavenging activity를 나타내었다(Fig. 2).

LDL 산화에 대한 억제효과 측정 - 30% MeOH 분획 및 60% MeOH 분획에서 분리한 각 화합물을 농도별로(25~1000 ppm)

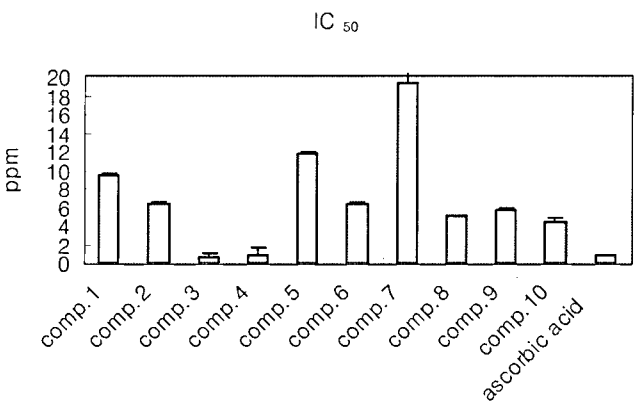


Fig. 6 - IC₅₀ values of compound I~X on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation.

LDL 지질과산화에 대한 억제활성을 실험한 결과 compound III, IV에서 양성대조약물로 사용한 L-ascorbic acid(IC₅₀ 1.361 µg/ml) 보다 우수하거나 유사한 억제효과를 보였다(Fig. 6).

결 론

백출 지상부의 MeOH 엑스의 물가용부를 Diaion HP-20에 흡착시킨 후 H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH로 용출시켜 각각의 분획물을 얻었고 이들 4가지 분획물에 대해서 DPPH radical에 대한 scavenging activity로 activity guided fractionation을 하였다. 그 결과 30% MeOH 및 60% MeOH 분획에서 효과가 우수한 radical scavenging activity를 보이는 것을 관찰할 수 있었다(60%분획>30%분획>100%분획>CHCl₃분획>H₂O분획).

또한 이들 4가지 분획물에 대하여 TBARS assay를 이용한 Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation에 대한 억제 효과를 실험하였다. 그 결과 60% MeOH, 30% MeOH분획에서 효과를 관찰할 수 있었다(60% MeOH분획>30% MeOH분획>100% MeOH-분획>H₂O분획>CHCl₃분획).

강한 활성을 나타내는 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획을 각 중 gel column chromatography를 실시하여 10개의 phenolic compound들을 분리하였으며 이들의 물리화학적 성상과 각종 기기분석(MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR) 결과를 통해 compound I을 3-feruloylquinic acid,^{18,23} compound II를 apigenin-8-C-β-D-glucopyranoside,^{21,24,26} compound III를 4-caffeoyl-luteolin-6-C-β-D-glucopyranoside,^{19,26} compound IV를 4,5-di-O-caffeoylquinic acid,^{18,23} compound V를 ferulic acid,^{19,20} compound VI를 luteolin-6-C-β-D-glucopyranoside,^{22,24,26} compound VII를 7-methoxy-pinocembrin-7-O-β-D-glucopyranoside,^{21,24,26} compound VIII를 apigenin-6-C-β-D-glucopyranoside,^{21,24,26} compound IX를 3,5-di-O-caffeoylquinic acid,^{18,23} compound X를 luteolin^{24,26}로 확인, 동정하였다.

각각의 성분에 대한 항산화 활성 실험 결과 compound VII이 다른 화합물보다 활성이 낮음을 알 수 있었고 이는 flavonoid B-ring의 -OH기가 항산화 활성에 positive factor 임을 나타내는 증거라 할 수 있다. 또한 플라보노이드 구조인 화합물은 DPPH를 이용한 radical scavenging activity가 phenylpropanoids 구조인 다른 화합물에 비해 우수한 반면 LDL을 이용한 과산화지질 억제효과는 caffeoyl기나 quinic acid의 -OH에 좀더 기인하는 것으로 사료된다. 이는 compound X의 luteolin의 경우 B-ring에 2개의 -OH를 가지며 분리된 compounds 중 radical scavenging activity가 가장 우수하였으나 과산화지질 억제효과는 luteolin에 비하여 compound III이나 compound IV가 현저하게 우수한 효과를 보였다. 또한 caffeoyl기가 quinic acid에 결합하는 위치도 항산화 효과를 결정하는 요소가 되는데 quinic acid의 3, 4번 탄

소에 caffeoyl기가 결합한 compound IV가 4, 5번 탄소에 caffeoyl기가 결합한 compound IX보다 우수한 효과를 보이는데, 이는 quinic acid의 각 탄소에 결합한 -OH기 중 4번 -OH가 항산화효과를 결정하는 factor임의 반증이 된다.

이 실험 결과를 통해 산채로 사용되거나 버려지는 백출지상부가 기능성 식품 및 산채로서 천연항산화제의 개발가능성이 높다고 사료되며 특히 지상부의 성분과 엑스를 이용한 천연항산화제의 개발가능성이 높다고 사료된다.

참고문헌

- 1) 육창수 : 원색한국약용식물도감, 경원출판사, p531 (1997).
- 2) 한국한의학회연구원 : 대한약전 재8개정 대한약전외한약(생약규격집 194, 453 (2004).
- 3) Pharmacopoeia of the people' republic of China. *Chem. Ind. (london)* 1, 183 (1997).
- 4) 韓國生藥學教授協議會 : 本草學, 사단법인 대한약학회 797 (1995).
- 5) 堀田滿 : 世界有用植物事典(植物編) 平凡社 839 (1989).
- 6) 임동술, 유승조, 지형준 : 한국산 창출의 성분연구. *생약학회지* 19, 228 (1988).
- 7) Zhong-liang, C., Wen-yi C., Guo-xin, Z. and Max, W. : A sesquiterpene lactam from *Atractylodes macrocephala*. *Phytochemistry* 45, 765 (1997).
- 8) Marion, S. L., Alios, S. and Rudolf, B. : Diacetoxy-substituted polyacetylenes from *Atractylodes lancea*. *Phytochemistry* 46, 1023 (1997).
- 9) Yoishiro, N., Yoshitaka, K., Kazunori, H., Yoshio, K., Iwao, S., Masami, H. and Hirishi, S. : Effect of the rhizomes of *Atractylodes lancea* and its constituents on the delay of gastric emptying, *J. Ethnopharmacol.* 84, 51 (2003).
- 10) 고석태, 서세민 : 白朮 Extract의 血壓降下作用. *약제학회지* 6, 101 (1976).
- 11) Ikue, T., Hiroaki, K., Tsukasa, M. and Haruki, Y. : Structure of oligosaccharide side chains of an intestinal immune system modulating arabinogalatan isolated from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Carbohydr. Res.* 339, 763 (2004).
- 12) 김창택, 정민환, 문철순, 임영희, 강상진, 조완구 : 백출의 멜라닌 생성 억제 물질. *생약학회지* 36, 60 (2005).
- 13) 이성욱, 서지희, 이정원, 유미영, 권지용, 최상운, 강종성, 권대영, 김영균, 김영섭, 유시용 : 백출 추출물의 암세포증식 저해 효과. *생약학회지* 36, 201 (2005).
- 14) Huey-lan, H., Chien-Chih, C., Chin-yi, Y. and Ray-ling, H. : Reactive oxygen species mediation of Baizhu-induced apoptosis in human leukemia cells. *J. Ethnopharmacol.* 97, 21 (2005).
- 15) Hiroshi, T., En-long, M., Shinjiro, K., Naoto, S., Kouji, M., Toshiyasu, S., Min-wei, W. and Ikuko, K. : Antiangiogenic activity of β -eudesmol *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 512(2), 105 (2005).
- 16) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., and Okuda, T. : 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 (1989).
- 17) Inkeda, N. and Fukuzume, K. : Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* 26, 343 (1977).
- 18) Hideko, M., Hideo, I., Noriko, O. and Ryo, K. : Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acid by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 315, 253 (1984).
- 19) Micheal, N., C., Weiguo, W. and Nikolai, K. : The chlorogenic acids of *Hemerocallis*. *Food Chemistry* 95, 574 (2006).
- 20) Inaki, B., Jose, I. S., Gloria, C., Jose, I. M. and Jesus, M. A. : Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ^1H NMR spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 486, 269 (2003).
- 21) Byung, H. U., Merve, P., Annelise, L., Bernard, W., Raul, A., Lieve, D. and Robert, A. : A new dicaffeoylquinic acid butyl ester from *Isertia pittieri*. *Fitoterapia* 73, 550 (2002).
- 22) Heilman, J., Muller, E. and Merfort, I. : Flavonoid glucosides and dicaffeoylquinic acids from flowerheads of *Buphthalmum salicifolium*. *Phytochemistry* 51, 713 (1999).
- 23) Jaromir, B. and Lutoslaw, S. : Phenylpropanoid esters from *Lamium Album* Flowers. *Phytochemistry* 38, 1995 (1984).
- 24) Agrawal, P. K. : carbon-13 NMR of Flavonoids, Chapman and Hall, 256 (1989).
- 25) Harbone, J. B. and Marby, T. J. : *The Flavonoids: Advanced in Reserch*, Chapman and Hall, 52 (1982).
- 26) Harbone, J. B. : *The Flavonoids: Advanced in Reserch*. Chapman and Hall. 82 (1993).