

쑥갓 스테롤배당체의 아질산염소거작용 및 SOD 유사활성

조민정 · 박미정¹ · 이흠숙*

서울산업대학교 식품공학과, ¹서울산업대학교 안경광학과

Nitrite Scavenging Ability and SOD-like Activity of a Sterol Glucoside from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*

Min Jung Cho, Mijung Park¹, and Heum Sook Lee*

Department of Food Science of Technology, Seoul National University of Technology

¹Department of Visual Optics, Seoul National University of Technology

Abstract From the total methanolic extract of *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum* (Compositae), nitrite scavenging ability and superoxide dismutase (SOD)-like activity were analyzed as antioxidative characteristics. After successive partitioning with chloroform, *n*-butanol, and water, the chloroform fraction showed the most significant nitrite scavenging ability with an IC₅₀ value of 39 ppm compared with the values of vitamin C and chlorogenic acid, 15 ppm and 36 ppm, respectively. The active fraction was subjected to silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography, and the compound was isolated and identified as β -sitosterol-*O*- β -D-glucoside using ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data. The glucoside was further hydrolyzed and confirmed as a glycosylated β -sitosterol. The compound and its aglycone, β -sitosterol, showed different nitrite scavenging and SOD-like activity. The IC₅₀ value of nitrite scavenging ability of the compound was 335 ppm at pH 1.5, while that of its aglycone was 41 ppm. As for the SOD-like activity, the EC₅₀ values of the sterol and the glucoside were 1,291 ppm and >2,000 ppm, respectively, compared with those of vitamin C and chlorogenic acid, 38 ppm and 449 ppm, respectively.

Key words: *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*, Compositae, β -sitosterol-*O*- β -D-glucoside, nitrite scavenging ability, SOD-like activity

서 론

최근 소득 증대로 인한 문화생활의 향상은 개인의 영양상태를 크게 호전시켰고 의료 기술의 발달은 평균 수명을 선진국 수준으로 높였으나 노령 인구와 생활 습관에서 오는 만성질환은 급속하게 증가하고 있다. 이에 따라 질병의 치료보다는 건전한 식생활에 의한 질병의 예방에 힘써야 한다는 생각이 여러 형태의 건강 기능성 식품에 대한 수요를 증가시키고 있는 추세이다(1). 근래에 극심하게 증가하여 그 위험성이 대두되고 있는 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 사실이 인정되어짐에 따라(2-5) 이를 조절할 수 있는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, 카로테노이드, glutathione 및 ubiquinone 등의 항산화성 물질들이 연구되어 왔으며(6) 이들이 생체 내에서 생성되거나 음식물에서의 섭취 등을 통해 생체를 보호하고 있다고 전해진다. 따라서 활성산소를 소거할 수 있으며 식품에 존재하는 항산화 물질들이 과산화물에 의해 야기되는 각종 노화성질환의 억제제 및

치료제로 개발될 수 있다고 기대되는 바이다.

식품 중의 nitrate는 그 자체는 해롭지 않으나 nitrate reductase에 의해 체내의 구강과 위 장관에서 아질산염으로 환원되면 독성을 가지게 되고(7), 일정농도 이상 섭취할 경우 식품내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하기도 하여 아질산염 소거작용의 측정은 발암 전단계의 억제작용을 측정할 수 있는 척도가 될 수 있다(8). 또한 SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide의 반응성을 억제하여 superoxide로부터 생체를 보호한다고 보고되어 있다. 따라서 SOD 유사활성을 갖는 물질을 섭취함은 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 노화 억제와 더불어 산화적 장해를 방어할 수 있는 방법이라 생각된다(9).

쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*)은 국화과(Compositae)에 속하는 지중해 연안산의 일년 내지 이년생 초본이며(10) 동호, 춘국, 호자간이라고 불리우기도 한다. 쑥갓과의 근연식물인 유럽원산의 *Chrysanthemum coronarium*의 화학적 성분에 대한 연구로는 flavonoid(11), acetylene계 화합물(12), sesquiterpene(13,14), quinic acid 등이 보고되고 있으나(15) 국내에서 일상적인 식품으로 빈번하게 이용되고 있는 쑥갓의 경우는 그 생리활성과 성분에 대한 연구가 미미한 실정이다. 생리활성에 대한 연구로는 동속식물인 *Chrysanthemum indicum*(감국)의 alcohol 추출물의 혈압저하작용과 항균성에 대한 보고가 있으며(16), 쑥갓의 간독성보호작용(17)에 대한 연구가 보고되어 있으나 쑥갓에서

*Corresponding author: Heum Sook Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6436
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: heum@snut.ac.kr
Received August 14, 2006; accepted February 6, 2007

생리활성을 나타내는 단일물질에 대한 연구는 좀 더 활발히 수행되어야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 쑥갓의 생리활성에 대한 후속 연구로 쑥갓의 총 메탄올 추출물이 아질산염 소거작용과 SOD 유사활성을 가짐을 확인하고 총 메탄올 추출액으로부터 각 유기용매의 분획을 제조하여 활성분획으로부터 그 활성성분을 분리하고 활성물질의 화학적 구조를 밝혀 기능성 식품으로서의 개발 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

자연 건조시킨 쑥갓은 1999년 2월에 서울대학교 약학대학 부속 약초원에서 공급받아 사용하였으며, 증거표본은 서울대학교 약학대학 부속 약초원에 보존하였다.

시약

컬럼크로마토그래피용 실리카 겔은 Silica gel 70-230 mesh (Sigma, St. Louis, MO, USA)를, Sephadex LH-20은 bead size 25-100 μm (Pharmacia, Sweden)의 것을, TLC(Thin layer chromatography)용으로는 precoated plates(UV indicator, Sigma, USA)를 사용하였으며, 항산화 활성 측정용 시약으로 pyrogallol, ascorbic acid, chlorogenic acid, naphthylamine, cacodylic acid, hydrochloric acid, sodium nitrite, citrate buffer, acetic acid, Tris-base는 특급 시약(Sigma)을 사용하였고 sulfanilic acid는 1급 시약(Kanto chemical, Japan)을 사용하였다. 쑥갓의 추출과 컬럼크로마토그래피용 용매는 1급 시약(Duksan, Korea)을 1차 증류하여 사용하였고, 그 외에는 분석용 1급 시약(Junsei Chemical, Japan)을 사용하였다. 또한 TLC 발색시약 anisaldehyde- H_2SO_4 spray reagent는 anisaldehyde 0.5 mL와 98% acetic acid 10 mL, 메탄올(methanol, MeOH) 85 mL의 혼합액을 H_2SO_4 5 mL와 혼합하여 제조하여 사용하였고, FeCl_3 reagent는 10% 수용액으로 만들어 사용하였다.

추출 및 분획

자연 건조시킨 쑥갓 3 kg을 잘게 절단하여 환류 냉각장치를 부착시킨 추출기에서 80% 메탄올로 60-70°C, 6시간씩 3회 추출한 후 여과하여 추출액을 모으고 그 여액을 rotary evaporator(Uni-trap UT-1000, EYELA, Japan)로 40°C에서 감압 농축하여 총 추출물 300 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 용매극성에 따라 순차적으로 추출하여 각 분획을 제조하여(17) 클로로포름(chloroform, CHCl_3) 분획물 71 g, 부탄올(*n*-butanol, *n*-BuOH) 분획물 28 g과 물(H_2O) 분획물 57 g을 얻어 이들 각 분획으로 아질산염 소거작용 및 SOD 유사활성 실험을 하였다.

아질산염 소거작용 측정

아질산염(nitrite) 소거작용은 Griess시약인 sulfanilamide와 *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride가 NO_2 와 반응하여 azo화합물을 형성하고 이 azo화합물의 흡광도가 520 nm에서 최대값을 나타내므로 이를 이용하여 측정할 수 있다. 각 시료의 아질산염 소거작용은 Kato(18) 등의 방법에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 1 mM NaNO_2 용액 2 mL에 시료 추출물 0.1 g을 가한 후 0.1 N HCl, 0.2 M 구연산 완충액을 이용하여 pH를 각각 1.5, 3.0, 4.5, 6.0으로 조절하여 반응용액을 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL와 Griess시약(30% HCl로 제조한 1% naphthylamine과 1% sulfanilic acid의 1:1 혼합액) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 후 실온

에서 15분간 방치시킨 후 생성되는 azo화합물의 흡광도를 520 nm에서 microplate reader(Thermomax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 잔존하는 아질산염량을 비교하였다. 대조구로는 Griess시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 위와 같은 방법으로 실시하였으며, 아질산염 소거작용은 화합물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 차이에 의한 백분율로 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 vitamin C는 여러 농도로 제조하여 아질산염의 소거작용을 구하였으며 또 다른 대조군으로 활성이 확인되어 있는 chlorogenic acid(19)도 같은 농도로 제조하여 그 소거작용을 구하였다.

아질산염 소거작용은 다음과 같이 구하였다.

$$\text{Nitrite scavenging ability(\%)} = [1 - \{(A - C)/B\}] \times 100$$

A: NaNO_2 용액에 시료와 Griess를 첨가한 흡광도

B: NaNO_2 용액에 Griess를 첨가한 흡광도

C: NaNO_2 용액에 시료와 증류수를 첨가한 흡광도

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성 반응에서 pyrogallol은 물에 존재하는 superoxide radical에 의해 자동 산화가 일어나 갈색물질을 형성하여 이를 분광광도계로 분석하고, superoxide 포착활성이 있는 물질이 존재시 pyrogallol의 산화속도가 낮아지는 원리를 이용하여 superoxide 포착활성을 간접적으로 측정할 수 있다(20,21). SOD 유사활성은 Marklund(22) 등의 방법에 따라 측정하였다. 추출한 시료 20 g에 50 mM Tris-cacodylic acid buffer(TCB, pH 8.2) 20 mL를 가한 후 2분간 균질화 한 다음 4°C에서 원심분리(12,000 \times g, 30 min) 하였다. 이 상등액의 pH를 8.2로 조정하고 TCB를 이용하여 50 mL로 정용한 것을 시료액으로 하였다. 시료액 0.95 mL를 취해 24 mM pyrogallol(10 mM HCl 포함) 50 μL 를 가한 후 420 nm에서 초기 2분간의 흡광도 차이를 UV spectrophotometer(UVPC-2101 UV-VIS, Shimadzu, Japan)로 측정하였다. SOD 유사활성은 TCB 0.95 mL를 취하여 동일한 방법으로 측정된 흡광도 값의 증가 정도를 대조구로 하여 아래 식에 따라 계산하였다. 양성대조군으로 vitamin C와 chlorogenic acid(23)를 같은 농도에서 제조하여 SOD 유사활성을 비교하고 낮은 농도에서도 제조하여 EC_{50} 값을 측정하였다.

SOD 유사활성은 다음과 같이 구하였다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = \{(A - B)/A\} \times 100$$

A: 시료액 대신 TCB를 이용하여 측정된 흡광도값의 변화

B: 시료 첨가시의 흡광도값의 변화

클로로포름 분획물로부터 활성성분 compound 의 분리

유의성 있는 활성을 나타내었던 쑥갓의 클로로포름 분획물 60 g을 클로로포름과 메탄올의 혼합용매를 사용하여 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 유출 용매는 클로로포름 : 메탄올(50 : 1)의 혼합용매를 시작으로 극성을 증가시키면서 순차적으로 용매를 유출시켜 12개의 분획을 얻었으며, 이렇게 얻은 소분획을 TLC로 확인하면서 같은 형광을 가지며 R_f 치가 같은 성분을 함유하는 분획들을 모았다. 이 중 활성이 있는 분획 XI, XII를 silica gel로 충전시킨 컬럼에서 클로로포름 : 메탄올(12 : 1) 용매계로 극성을 높여가면서 순차적으로 유출시켜 1-8의 소분획을 얻었다. 소분획들 중 5-8 분획의 주성분이 클로로포름 : 메탄올(7 : 1) 용매계에서 R_f 값 0.31로 anisaldehyde 발색시 짙은 보라색을 띄었으며 long wave에서 blue형광을 보였고, short wave에서 검게 보였다. 정제를 위

하여 sephadex 컬럼크로마토그래피를 행하고 분리된 시료를 핵산과 에틸 아세테이트의 혼합액으로 재결정을 반복하여 흰색의 결정성 분말 compound I을 얻었다. Compound I은 Mass spectrum (VG 70-VSEQ spectrometer, UK), ¹H-NMR과 ¹³C-NMR data (Bruker AMX 500 Spectrometer, Bruker, Germany)에 의하여 그 구조를 동정하였다.

Compound I의 산 가수분해

Compound I 100 mg에 10%의 염산(HCl)을 넣고 100°C 항온수조에서 6시간 동안 가수분해하여 실온에 방치한 후 1 N KOH용액으로 중화시키고 가수분해된 aglycone을 클로로포름으로 추출하여 농축시킨 후 가수분해하기 전의 compound I과 TLC로 비교하여 가수분해 되었음을 확인하였다. 위의 클로로포름 분획물을 농축시켜 컬럼크로마토그래피로 정제한 후 ¹H-NMR과 TLC로 비교하여 가수분해된 aglycone이 β-sitosterol임을 확인하였고 수층의 당은 표준품과 함께 부탄올 : 초산 : 에틸에테르 : 물(9 : 6 : 3 : 1)의 용매계에서 TLC로 비교하여 glucose임을 확인하였다.

통계처리

실험결과는 t-test에 의해 유의성을 검증하여 p < 0.05인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

각 분획물의 아질산염 소거작용

아질산염 소거작용 실험결과 pH가 낮을수록 아질산염 소거능력이 높게 나타났음을 알 수 있었고 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 소거작용이 증가함을 보였으며, pH 1.5에서는 가장

낮은 농도인 40 ppm에서도 높은 소거작용을 보였다(Table 1). 총 메탄올 추출물은 pH 1.5, 320 ppm에서 62.6%의 소거작용을 나타내었으며, IC₅₀값은 125 ppm이었다(Table 2). 클로로포름 분획물은 pH 1.5, 320 ppm에서 78.2%이었으며 그 IC₅₀값은 39 ppm으로 매우 높은 소거작용을 보였다(Table 1, 2). 부탄올 분획물도 pH 1.5, 320 ppm에서 59.5%의 높은 소거작용과 317 ppm의 IC₅₀값을 나타내었으며, 물 분획물은 pH 1.5, 320 ppm에서 31.2%의 소거작용을 보여 분획물 중 가장 소거작용이 낮게 나타났다(Table 2). 양성대조군으로 사용한 vitamin C(24)와 chlorogenic acid의 IC₅₀값은 각각 15 ppm과 36 ppm으로 각 분획물의 IC₅₀값과 비교한 결과 클로로포름 분획물은 양성대조군인 chlorogenic acid와 거의 동등한 소거작용을 보였다(Table 2).

각 분획물의 SOD 유사활성

일반적으로 총 메탄올 추출물을 비롯한 모든 분획물의 SOD 유사활성이 각 분획물의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 증가하였으며 클로로포름 분획물은 2,000 ppm에서 53.6%로 가장 활성이 높았다(Table 3). 1,000 ppm까지의 농도에서는 총 메탄올 분획물과 클로로포름 분획물의 활성이 큰 차이를 보이지 않았으나 2,000 ppm의 높은 농도에서는 클로로포름 분획물의 활성이 크게 나타나는 특징을 보였다. 양성대조군인 vitamin C와 chlorogenic acid의 EC₅₀값은 각각 38 ppm, 449 ppm으로 높은 활성을 나타내는 반면에 각 분획물에서는 대부분의 EC₅₀값이 2,000 ppm 이상을 나타내었고, 클로로포름 분획물만이 1,860 ppm으로 분획물 중에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 4).

Table 1. Nitrite scavenging abilities of various fractions from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatosum*.

Concentration (ppm)	pH	Nitrite scavenging abilities of various fractions (%)			
		Total MeOH extract	CHCl ₃ extract	BuOH extract	H ₂ O extract
40	1.5	14.8 ^{1)*}	52.8*	28.1*	18.5*
	3.0	10.6	6.2	15.0*	16.7*
	4.5	0.7	0	11.3	10.6
	6.0	0	0	9.0	3.1
80	1.5	43.6*	68.0*	33.0*	21.7*
	3.0	41.0*	27.2*	27.9*	19.0*
	4.5	28.6*	17.7*	21.2*	13.5
	6.0	10.1	14.4	20.7	10.0
160	1.5	59.0*	73.0*	39.9*	23.9*
	3.0	40.2*	32.5*	30.7*	20.7*
	4.5	32.8*	23.0*	33.4*	16.2*
	6.0	22.1*	17.6*	21.9*	15.8
320	1.5	62.6*	78.2*	59.5*	31.2*
	3.0	46.4*	54.5*	36.3*	24.0*
	4.5	38.0*	33.7*	35.3*	23.3*
	6.0	33.1*	20.6*	33.1*	21.7*

¹⁾The values represent the mean of triplicate experiments.
*Significantly different from the control values (p < 0.05).

Table 2. IC₅₀ values of various fractions, compound I and β-sitosterol from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatosum*, vitamin C and chlorogenic acid in nitrite scavenging abilities at pH 1.5

	IC ₅₀ (ppm)
Total MeOH extract	125 ¹⁾
CHCl ₃ fraction	39
BuOH fraction	317
H ₂ O fraction	>320
Compound I	335
β-Sitosterol	41
Vitamin C	15
Chlorogenic acid	36

¹⁾IC₅₀ values represent the concentration (ppm) required for 50% decrease of nitrite level.

Table 3. SOD-like activities of various fractions from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatosum*

Concentration (ppm)	SOD-like activities of various fractions (%)			
	Total MeOH extract	CHCl ₃ extract	BuOH extract	H ₂ O extract
100	15.1*	15.4*	5.6	5.1
200	16.9*	18.6*	11.2	8.5
500	17.6*	19.8*	16.4*	10.8
1,000	22.8*	26.1*	22.7*	15.3
2,000	35.2*	53.6*	31.8*	24.0*

¹⁾The values represent the mean of triplicate experiments.
*Significantly different from the control values (p < 0.05).

Table 4. EC₅₀ values of various fractions, compound I and β -sitosterol from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*, vitamin C and chlorogenic acid in SOD-like activities

	EC ₅₀ (ppm)
Total MeOH extract	>2,000 ¹⁾
CHCl ₃ extract	1,860
BuOH extract	>2,000
H ₂ O extract	>2,000
Compound I	>2,000
β -Sitosterol	1,291
Vitamin C	38
Chlorogenic acid	449

¹⁾EC₅₀ values represent the concentration (ppm) required for 50% inhibition of SOD-like activity.

Table 5. ¹H-NMR chemical shift values of compound I (pyridine-d₅, 300 MHz) from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*

Chemical shift	Assignment
δ 0.68	3H, s, 18-CH ₃
δ 0.83~0.90	9H, 26, 27, 29-CH ₃
δ 0.95	3H, s, 19-CH ₃
δ 1.00	3H, d, $J=6.5$ Hz, 21-CH ₃
δ 3.50	1H, m, H-3
δ 5.36	1H, br. d, $J=4.4$ Hz, H-6

Chemical shift values were determined by one instrumental analysis.

Compound I의 구조 동정

Compound I은 TLC의 발색양상으로 steroid 유도체임을 추측할 수 있었는데 Mass spectrum 결과, (M⁺-glucose)의 m/z 414의 peak가 관찰되었고, ¹H-NMR spectral data에서 $J=6.9$ Hz의 anomeric doublet이 δ 5.21에서 나타남으로서 sterol이 배당체 상태로 존재함을 알 수 있었다(Table 5). 또한, δ 0.67과 δ 0.95에서의 2개의 singlet angular methyl group, δ 0.86- δ 0.91 사이의 3개의 methyl group, δ 1.00에서의 $J=6.5$ Hz의 doublet methyl peak 들로 비당부가 β -sitosterol임을 알 수 있었고 가수분해하여 당부의 glucose와 alycone인 β -sitosterol을 확인하였다. ¹³C-NMR spectral data에서도 102.5 ppm의 anomeric carbon과 75.2, 78.0, 71.6, 78.4, 62.7 ppm 값으로 당부가 glucopyranoside 형태로 존재함을 알 수 있었으며 (Table 6) 그 외의 ¹³C-NMR data를 정밀 비교하여 분리한 화합물이 β -sitosterol-O- β -D-glucoside임을 동정하였다(25, 26).

Compound I 및 aglycone의 아질산염 소거작용

Compound I(β -sitosterol-O- β -D-glucoside)은 pH 1.5, 320 ppm의 농도에서 49.5%의 아질산염 소거작용을 나타냈으며 가수분해한 aglycone인 β -sitosterol은 80 ppm의 낮은 농도에서도 63.4%를 나타냄으로서 가수분해된 aglycone상태일 때 훨씬 소거작용이 높음을 알 수 있었다(Fig. 1). Compound I의 IC₅₀값은 335 ppm로 양성대조군으로 사용한 vitamin C와 chlorogenic acid의 IC₅₀값인 15 ppm과 36 ppm과 비교하였을 때 다소 높았으나, β -sitosterol의 IC₅₀값은 32 ppm으로 vitamin C보다는 2배정도 높았으며 chlorogenic acid보다는 오히려 더 낮은 IC₅₀값을 가졌다(Table 2). 식물 sterol은 식물계에 널리 분포되어 있으며 일상적인 식생활에서 빈번히 섭취되고 있으나 그 생리활성에 대한 연구는 최근까지도 계속 그

Table 6. ¹³C-NMR chemical shift values of compound I from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum* and standard β -sitosterol-O- β -D-glucoside

Carbon No.	Compound I	β -Sitosterol-O- β -D-glucoside	Carbon No.	Compound I	β -Sitosterol-O- β -D-glucoside
1	37.41	37.5	16	28.60	28.6
2	30.19	30.3	17	55.98	56.3
3	78.00	78.2	18	12.08	12.0
4	40.74	40.0	19	19.36	19.5
5	140.83	141.0	20	36.50	36.5
6	121.86	121.9	21	19.12	19.1
7	32.11	32.2	22	34.30	34.3
8	31.98	32.1	23	26.51	26.5
9	50.27	50.4	24	45.96	46.1
10	36.86	37.0	25	29.38	29.6
11	21.25	21.3	26	19.14	19.3
12	39.27	39.4	27	19.92	20.1
13	42.41	42.5	28	23.50	23.5
14	56.75	56.9	29	12.48	12.3
15	24.50	24.5			
Glucose					
1'	102.50	102.6			
2'	75.22	75.3			
3'	78.00	78.5			
4'	71.60	71.7			
5'	78.45	78.6			
6'	62.75	62.9			

Chemical shift values were determined by one instrumental analysis.

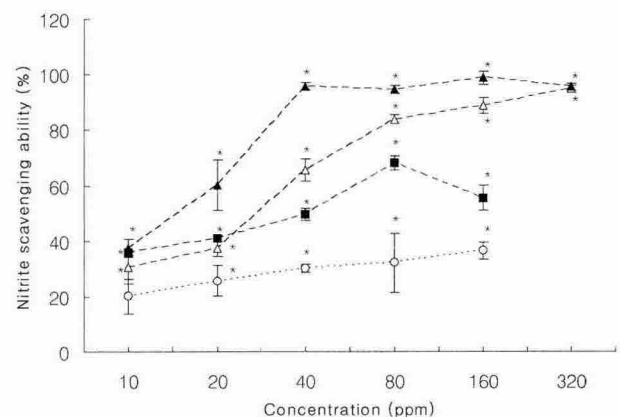


Fig. 1. Nitrite scavenging abilities of compound I and aglycone from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*, chlorogenic acid and vitamin C at pH 1.5. ○: compound I, ■: aglycone, △: chlorogenic acid, ▲: vitamin C. The values represent the mean \pm SD of triplicate experiments. *Significantly different from the control values ($p < 0.05$).

영역이 확대되어 ceramide metabolism의 촉진작용(27), RAW 264.7 macrophages에서의 항산화 효소계의 modulation(28) 및 DPPH와 ONOO⁻ 소거작용(29)에 관한 논문이 보고되고 있다. 본 논문에서의 β -sitosterol과 그 배당체의 우수한 아질산염 소거작용도 이러한 연구결과들과 같은 맥락에서 추가될 수 있는 생리활성이라고 사료된다.

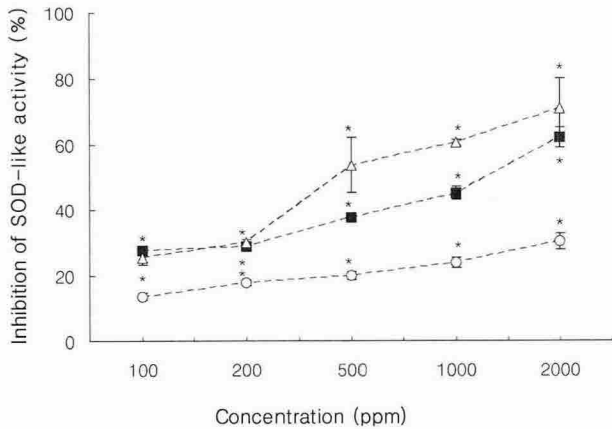


Fig. 2. SOD-like activities of compound I and aglycone from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatosum* and chlorogenic acid. ○: compound I, ■: aglycone, △: chlorogenic acid. The values represent the mean ± SD of triplicate experiments. *Significantly different from the control values ($p < 0.05$).

Compound I 및 aglycone의 SOD 유사활성

분리한 compound I과 가수분해한 aglycone의 SOD 유사활성을 측정하고 결과 두 물질 모두 활성이 확인되었는데 배당체 상태의 compound I은 활성이 낮아 2,000 ppm에서 30.2%의 활성을 보였으나 가수분해 된 β-sitosterol은 전체 분획물 중 가장 유사활성이 좋았던 클로로포름 분획물 2,000 ppm에서의 53.6%(Table 3) 보다 더 높은 62.1%를 나타내어 SOD 유사활성도 가수분해된 aglycone 상태의 sterol이 훨씬 활성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 2). 같은 실험에서 chlorogenic acid의 EC₅₀값은 449 ppm이었고 β-sitosterol의 EC₅₀값은 1,291 ppm, compound I의 EC₅₀값은 2,000 ppm 이상으로 양성대조군인 chlorogenic acid에 비해서는 활성이 떨어짐을 알 수 있었다(Table 4).

요 약

썩갓의 항산화 활성을 알아보기 위해 썩갓 총 메탄올추출물의 아질산염 소거작용과 SOD 유사활성을 측정하였다. 아질산염 소거작용과 SOD 유사활성을 가지고 있는 총 메탄올 추출물로부터 클로로포름, n-부탄올 및 물 분획물을 제조하여 각각의 활성을 측정하였다. pH가 1.5일 때의 클로로포름 분획물의 IC₅₀값은 39 ppm으로 가장 우수한 아질산염 소거작용을 보였으며, vitamin C와 chlorogenic acid의 IC₅₀값이 15 ppm과 36 ppm일 때 클로로포름 분획물은 양성대조군인 chlorogenic acid와 동등한 소거작용을 보였다. 아질산염 소거작용에 대하여 유의성 있게 높은 활성을 나타낸 클로로포름 분획물을 silica gel 컬럼크로마토그래피와 sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 이용하여 분획의 활성성분인 compound I을 분리하였다. 분리된 compound를 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectral data를 통하여 구조를 동정한 결과 compound I은 β-sitosterol-O-β-D-glucoside임을 확인하였다. Compound I과 그 aglycone인 β-sitosterol의 아질산염 소거작용과 SOD 유사활성은 다소 차이가 있었다. 양성대조군으로 사용한 vitamin C와 chlorogenic acid의 IC₅₀값이 pH 1.5에서 각각 15 ppm과 36 ppm일 때 compound I의 IC₅₀값이 335 ppm, β-sitosterol의 IC₅₀값이 41 ppm으로 가수분해된 aglycone이 아질산염 소거작용이 훨씬 높았다. SOD 유사활성의 경우 vitamin C와 chlorogenic acid의 EC₅₀ 값은 38 ppm, 449 ppm으로 이와 비교시 β-sitosterol과 배당체의 EC₅₀ 값

은 1,291 ppm과 2,000 ppm 이상으로 나타났다.

문 헌

- Mazza G, Oomah BD. Herbs, Botanicals and Teas. Technomic Publishing Co. Lancaster, UK. pp. 1-16 (2000)
- Cross EE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). Ann. Intren. Med. 107: 526-545 (1987)
- Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathway involving the lack of balance of reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med. 4: 317-330 (1988)
- Marnett LJ. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotiom. Carcinogenesis 8: 1365-1373 (1987)
- Patt J, Harken AH, Burton LK, Rodell TC, Piermateei D, Schorr WJ, Parker NB, Berger EM, Hosh IR, Terada LS, Linas SI, Cheronis JC, Repine JE. Xanthine oxidase derived hydrogen peroxide contributes to reperfusion induced edema in gebril brains. J. Clin. Invest. 81: 1556-1562 (1988)
- Mavelli I, Ciriolo MR, Rotilio G, De Sole P, Castorino M, Stabile A. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anaemia erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 106: 286-290 (1982)
- Walker R. Nitrates, nitrites and N-nitroscompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. Food Addit. Contam. 7: 717-768 (1990)
- Rorald W. Naturally occurring nitrite in food. J. Jpn. Soc. Food Agric. 26: 1735-1742 (1975)
- Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. Ann. N. Y. Acad Sci. 959: 295-307 (2002)
- Lee CB. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa, Seoul, Korea. p. 753 (1982)
- Harborne JB, Heywood VH, Saleh NAM. Chemosystematics of the Compositae: flavonoid patterns in the *Chrysanthemum* complex of the tribe Anthemideae. Phytochemistry 9: 2001-2017 (1970)
- Sanz JF, Falco E, Marco JA. New acetylenes from *Chrysanthemum coronarium* L. Liebigs. Ann. Chem. 303-305 (1989)
- Jang DS, Nam SH, Choi SU, Jang MS. Antibacterial activity of *Chrysanthemum* spp. Agr. Chem. Biotechnol. 39: 315-319 (1996)
- Jang DS, Park KH, Kim HM, Hong DH, Chun HK, Kho YH, Yang MS. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part I. Cytotoxicity against cancer cell lines. Korean J. Pharmacogn. 29: 243-247 (1998)
- Chuda Y, Suzuki M, Nagata T, Tsushida T. Contents and cooking loss of three quinic acid derivatives from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). J. Agr. Food Chem. 46: 1437-1439 (1998)
- Kee CH. The pharmacology of chinese herbs. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 74-98 (1993)
- Kang HJ, Lee EJ, Sung SH, Kim YC, Song ES, Park MJ, Lee HS. Anti-hepatotoxic activity of *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatosum* extract. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 138-143 (2003)
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agr. Biol. Chem. 51: 1333-1338 (1987)
- Peri L, Pietraforte D, Scorza G, Napolitano A, Fogliano V, Minetti M. Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: a new biological function for polyphenols with a catechol group? Free Radic. Biol. Med. 39: 668-681 (2005)
- Bae RN, Lee SK. Factors affecting browning and its control methods in chopped garlic. J. Korean Soc. Hort. Sci. 31: 213-218 (1990)
- Jo KS, Kim HK, Ha JH, Park MH, Shin HS. Flavor compounds and storage stability of essential oil from garlic distillation. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 50-55 (1990)
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for

- superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47: 469-474 (1974)
23. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica*). J. Agr. Food Chem. 48: 5512-5516 (2000)
 24. Kang BR, Park M, Lee HS. Germination dependency of antioxidative activities in brown rice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 389-394 (2006)
 25. Pouchert CJ, Behnke J. The Aldrich library of ^{13}C and ^1H -FT NMR spectra. Aldrich Chemical Company. Milwaukee, WI, USA. 3: 568-569 (1993)
 26. Do JC, Chai JY, Son JK. Studies on the constituents of *Lycopus lucidus* (II). Korean J. Pharmacogn. 22: 166-170 (1991).
 27. Awad AB, Fink CS, Trautwein EA, Ntanos FY. β -Sitosterol stimulates ceramide metabolism in differentiated CaCO_2 cells. J. Nutr. Biochem. 16: 650-655 (2005)
 28. Vivancos M, Moreno JJ. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. Free Radic. Biol. Med. 39: 91-97 (2005)
 29. Su BN, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn AD. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. J. Nat. Prod. 68: 592-595 (2005)