J Korean Soc Food Sci Nutr
37(8), 979~984(2008)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2008.37.8.979

머위(*Petasites japonicus*) 엽병으로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

김민영[1] · 이정현[1] · 황윤이[1] · 송경식[2] · 전미라[1†]

[1]동아대학교 식품과학부
[2]경북대학교 응용생명과학부

Isolation and Identification of Antioxidant Substances from the Stems of Butterbur (*Petasites japonicus*)

Min-Young Kim[1], Jung-Hyun Yi[1], Yunyi Hwang[1], Kyung-Sik Song[2], and Mira Jun[1†]

[1]Division of Food Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea
[2]Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

The stems of *Petasites japonicus* were extracted with ethanol and then partitioned with hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and water, successively. The antioxidant potency of five crude fractions were determined using (1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, (2) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay in the linoleic acid model system, and (3) lipoxygenase inhibition assay. Among the crude fractions, the ethyl acetate fraction exhibited the most potent antioxidant effect. By activity-guided fractionation, compound PJ-4 was isolated from the ethyl acetate fraction through the repeated silica gel open column chromatography. The chemical structure of the isolated compound was determined as kaempferol by ^{1}H- and ^{13}C-NMR analysis and its antioxidative capacity was further investigated. DPPH radical scavenging activity of the compound was 65.76% at the concentration of 100 μg/mL. The inhibitory activity of the compound against lipid peroxidation and lipoxygenase exhibited 43.47% and 58.60%, respectively at the concentration of 100 μg/mL. The result suggests that the compound may serve as a useful natural antioxidant and furthermore indicates the possibility of developing the stems of *Petasites japonicus* as a natural antioxidant source.

Key words: *Petasites japonicus*, kaempferol, antioxidant, TBARS, lipoxygenase

서 론

인체는 생명을 유지하기 위한 에너지를 공급하기 위해 산소를 필요로 하나, 호흡과정에서 체내로 공급된 산소 중 일부분은 활성산소라는 유해 작용을 가진 물질로 전환되면서 생체 내에서 세포막 분해, 단백질 분해, 지방 산화, DNA 합성 억제 등의 심각한 손상을 입히는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 활성산소의 작용은 체내 방어기구인 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase, glutathione 등과 같은 항산화성 효소와 vitamin C(ascorbic acid), vitamin E(tocopherol) 등의 항산화 물질에 의해서 최소화될 수 있다(2).

생체 내 free radical 생성을 방지하기 위한 항산화제는 식품의 자동산화 방지와 인간의 노화억제라는 측면에서 최근 건강에 대한 관심의 증대와 함께 많은 연구가 계속되고 있다. 항산화제는 반응 기작에 따라 butylated hydrxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), tert-butyl hydroquinone(TBHQ), propyl gallate(PG), tocopherol과 같은 free radical terminator, ascorbic acid, glucose oxidase, sulfites와 같은 reducing agents 또는 oxygen scavengers, citric acid, EDTA와 같은 chelating agent 등으로 분류한다(3). 일반적으로 BHA, BHT 및 TBHQ 등의 합성 항산화제는 천연 항산화제보다 그 항산화 능력이 우수하여 상업적으로 많이 사용되고 있지만, 이들 합성 항산화제의 경우 변이원성 및 독성이 지적되어 안전성의 문제가 대두되고 있다(4). 이에 따라 비교적 독성이 적고 안전성과 관능상의 문제가 되지 않는 식품이나 약용식물로부터 우수한 효과가 있는 천연 항산화제 개발을 위해 많은 연구가 시도되고 있다.

머위(*Petasites japonicus*)는 국화과에 속하는 다년생 초본 식물로 중국, 일본 및 우리나라에서 자생 또는 재배되고 있으며, 예로부터 어린잎은 채취하여 쌈과 생채로 이용하고 엽병은 나물로 이용하거나 말려서 탕의 원료로 이용하였다

†Corresponding author. E-mail: mjun@dau.ac.kr
Phone: 82-51-200-7323, Fax: 82-51-200-7535

(5). 또한 민간요법이나 한방에 따르면 새순은 건조한 후 달여서 마시거나 태워 연기를 쐬는 방법으로 기침과 천식의 치료에 이용하였고, 일부 지역에서는 엽병을 옻나무에 의한 알레르기 치료에 사용하여 온 것으로 알려져 있다(6).

머위의 주요성분으로는 뿌리와 줄기에서 분리된 sesquiterpenoid인 eremopetasidione과 phenolic compound인 petasiphenone과 eremophilenolide 등이 보고되었으며(7) 꽃으로부터 분리된 angelic acid, capronic acid, caprylic acid, procatechuic acid와 잎으로부터 분리된 petasin 등이 있다(8-10). 대부분의 머위 관련 연구는 추출물 상태의 해독작용, cholesterol 저해효과, 항알레르기능 및 항산화능 등이 보고된 바 있으며(11-14), 현재까지 머위 엽병을 이용한 활성 연구나 성분 연구는 미흡한 수준이다.

따라서 본 연구는 예로부터 약용 및 식용으로 사용되는 머위 중 잎에 비하여 효용가치가 다소 부족한 엽병의 항산화 활성을 탐색할 뿐만 아니라 activity-guided fractionation에 의해 활성 성분을 분리하고, ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR 분석을 통해 화학적 구조를 동정하고자 한다. 또한 머위 엽병 용매 분획물 및 순수 분리한 화합물의 항산화 효과를 검토함으로써, 미활용 식물자원인 머위 엽병의 기능성식품 소재 개발의 기초자료뿐만 아니라 실질적인 천연 항산화제로서의 이용가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 머위 줄기는 2006년 5월에 경상남도 밀양 얼음골 농가에서 구매하여 수세하고 음건한 다음 사용하였으며, 표본시료는(voucher No. NPC-PJ-06001) 경북대학교 전통기술첨단화 연구실에 보관되어 있다.

시약 및 기기

성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(No. 7734, 70-230 mesh, Merck, Germany)을 사용하였고, 성분 확인용 thin layer chromatography(TLC) plate는 silica gel 60 F_{254}(Merck, Germany)를 사용하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 용매는 모두 특급을 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)은 Aldrich사(Milwaukee, WI, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며 ascorbic acid, tert-butylated hydroxytoluene(BHT), nordihydroguaiaretic acid(NDGA), thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA), linoleic acid, lipoxygenase (Type V)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 흡광도는 UV/Vis spectrophotometer(Optizen 2120UV, Mecasys, Korea)를 사용하여 측정하였고, ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR은 Bruker Avance 300 spectrometer (Karsruche, Germany)를 이용하여 각각 300 MHz, 75 MHz

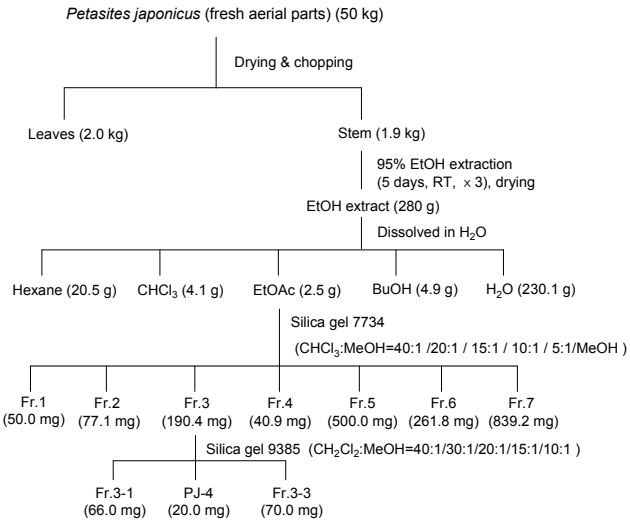

Fig. 1. Scheme of activity-guided fractionation of the stems of *Petasites japonicus*.

에서 측정하였으며 chemical shift는 내부 표준물질로서 tetramethylsilane(TMS)를 사용하여 ppm으로 나타내었다.

머위 엽병의 용매 추출 및 분획

머위 생체 50 kg을 건조하여 잎과 엽병을 구분하였다. 수세 후 음건한 머위 엽병 분말 1.9 kg을 95% 에탄올(10 L)에 5일간 실온에서 냉침한 후 추출하였다. 추출물은 여과하고 동일한 방법으로 총 3회 반복 추출하였으며, 얻어진 여액은 감압 농축하였다. 에탄올 추출물(280 g)은 증류수로 현탁한 후, hexane(500 mL×3), chloroform(500 mL×3), ethyl acetate(500 mL×3) 및 *n*-butanol(500 mL×3)로 순차적으로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 hexane 분획물(20.5 g), chloroform 분획물(4.2 g), ethyl acetate 분획물(2.5 g), *n*-butanol 분획물(4.9 g) 및 H_2O 분획물(230.1 g)을 얻었다(Fig. 1).

EtOAc 분획으로부터 항산화 물질의 분리

DPPH 라디칼 소거능, TBARS 측정을 통한 지질과산화 억제효과 및 lipoxygenase 저해능 평가를 통해 각 분획물의 항산화 활성을 확인한 결과, ethyl acetate 분획이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다. Ethyl acetate 가용성 분획물(2.5 g)을 silica gel column(2.4×40 cm) chromatography하여 $CHCl_3$-MeOH 혼합용매 40:1/20:1/15:1/10:1/5:1/MeOH 순으로 극성을 증가시키면서 용출하여 TLC 패턴에 따라 7개의 sub-fractions로 나누었다. TLC 패턴 확인을 위해 10% 황산을 사용하여 발색하였다. 이 중 소분획물의 DPPH 항산화 실험에서 가장 높은 활성을 보인 Fr. 3(Fig. 2)에 대하여 추가적으로 silica gel chromatography(1.5×38 cm)를 수행하였다. 이동상은 CH_2Cl_2-MeOH 혼합용매 40:1/30:1/20:1/15:1/10:1을 이용하였으며 최종적으로 PJ-4(20.0 mg)를 분리, 정제하였다.

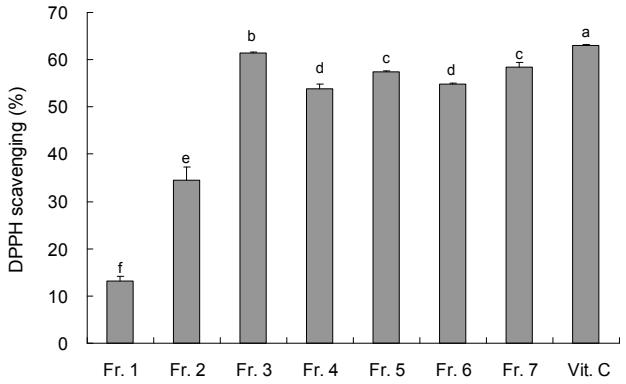

Fig. 2. DPPH radical scavenging activities[1)] of ethyl acetate sub-fractions from the stems of *Petasites japonicus*.
[1)]The activities (%) are mean±SE of three independent experiments. Different letters within a bar are significantly different ($p<0.01$).

머위 엽병 분획물 및 분리물질의 항산화 활성평가

전자공여능 측정: 머위 엽병의 분획물 및 화합물의 전자공여능 측정은 Blois(15)의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 일정농도의 시료 2 mL에 2×10^{-4} M DPPH용액 1 mL를 가한 후, vortex mixing하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였으며 계산식은 다음과 같다.

DPPH scavenging effect (%)=(A−B/A)×100
A: absorbance of control, B: absorbance of sample

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정: 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 첨가하여 최종농도가 0.03 M이 되도록 기질용액을 제조하였다. 기질용액 2.5 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 시료를 첨가하여 시료액을 제조한 후 시료액 2.0 mL를 분취하였다. 시료액 2 mL에 35% TCA 1 mL와 0.75% TBA 2 mL를 가한 후 10초간 vortex mixing하여 95°C 수욕 상에서 40분 동안 반응시켰다. 반응액을 실온에서 냉각시켜 acetic acid 1 mL와 chloroform 2 mL를 가하여 vortex mixing 한 후, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 하여 얻은 상징액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 TBA값을 산출하였다(16). 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였으며, 계산식은 다음과 같다.

Lipid peroxidation inhibition (%)=(A−B/A)×100
A: absorbance of control, B: absorbance of sample

Lipoxygenase 저해능 측정: Tris buffer(0.1 M, pH 8.5) 2 mL에 시료 20 μL를 첨가하고, soybean lipoxygenase (Type V, 500 UNIT/최종농도) 20 μL 용액을 가한 후, 5분간 실온에서 반응시킨다. 반응액에 기질인 linoeic acid(최종농도 110 μM) 50 μL를 첨가한 후, 5분간 반응시키고 234 nm에서 흡광도를 측정하였다(17). 양성 대조군으로 페놀계 식품 항산화제인 NDGA를 사용하였고 계산식은 다음과 같다.

Lipoxygenase inhibition (%)=(A−B/A)×100
A: absorbance of control, B: absorbance of sample

통계처리

각 실험은 독립적으로 3회 반복 실시하여 평균±표준편차로 나타내었다. 실험군 간의 유의성을 검정하기 위해서 SAS (Statistical Analysis System)를 사용하여 ANOVA test를 수행하였으며 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

머위 엽병 용매 분획물의 항산화 효과

전자공여능: 전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하면서 식품 중의 지방이 산화되는 것을 억제할 뿐만 아니라, 인체 내에서의 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용을 하기 위한 것으로도 이용되고 있다(18). 기존에 잘 알려진 천연 항산화제인 ascorbic acid를 양성대조군으로 하여 머위 엽병 에탄올 추출물을 유기 용매별로 분배 추출한 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 100 μg/mL 농도에서 ethyl acetate 분획물(65.41%)이 가장 높은 활성을 나타내었고, 다음으로 chloroform 분획물(40.26%), *n*-butanol 분획물(11.49%), hexane 분획물(6.68%), H_2O 분획물(2.83%) 순으로 나타났다. 각 분획물의 항산화 활성은 유의적인 차이를 보였으며, 특히 ethyl acetate 분획물은 ascorbic acid(63.11%)보다 더 우수한 항산화 효과를 보였다. 머위에는 petasiphenone, eremophilenolidephenol 등의 phenol성 화합물과 kaempferol 3-*O*-(6″-acetyl)-β-glucopyranoside와 quercetin 3-*O*-(6″-acetyl)-β-glucopyranoside 등의 flavonoid가 분리된 바 있으며(7,19) 머위 엽병에서도 역시 이와 유사한 물질들이 항산화 활성에 관여한 것으로 사료된다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

Table 1. Antioxidant activity[1)] of crude fractions from the stems of *Petasites japonicus* (%)

Sample (100 μg/mL)	DPPH radical scavenging	TBARS inhibition	Lipoxygenase inhibition
Hexane	6.68±3.37^{d}	27.09±6.03^{b}	27.19±5.40^{c}
Chloroform	40.26±1.68^{b}	35.57±4.57^{a}	38.43±2.13^{b}
Ethyl acetate	65.41±0.46^{a}	37.04±2.26^{a}	50.67±1.15^{a}
n-Butanol	11.49±1.45^{c}	25.84±4.14^{b}	16.16±2.31^{d}
Water	2.83±0.03^{e}	14.77±3.91^{c}	16.16±2.31^{d}
Ascorbic acid	63.11±0.13^{a}	-	-
BHT	-	53.60±2.00^{a}	-
NDGA	-	-	75.00±3.21^{a}

[1)]The activities (%) are mean±SE of three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p<0.01$).

측정: TBARS를 통한 지질과산화 억제효과의 측정은 불포화지방산을 함유한 지질이 산화되어 형성되는 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)와 thiobarbituric acid(TBA)가 반응하여 붉은색의 TBA를 형성하게 되는데, 이 발색의 정도를 비색 정량하여 항산화력을 측정하는 방법(20)이다. 과산화지질은 oxygen radical이 세포막의 불포화지방산에 작용하여 생성되고, 세포막의 손상이나 세포괴사 등의 독성을 일으키며, 성인병, 암, 염증 및 노화 등 여러 질병들의 원인이 될 수 있다(21). 따라서 본 실험은 머위 엽병의 분획물이 지질의 과산화를 억제시켜 과산화물을 감소시키는 정도를 측정함으로써 항산화 활성을 검증하였다(Table 1). DPPH 라디칼 소거능 실험에서와 마찬가지로 최종농도 100 μg/mL에서 ethyl acetate 분획물(37.04%)이 가장 높은 지질과산화 억제효과를 보였고, H_2O 분획물이 가장 낮은 활성을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물과 chloroform 분획물, hexane 분획물과 *n*-butanol 분획물 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p<0.01$). TBARS를 통한 지질과산화 억제효과의 경우, 각 용매 분획물은 DPPH 라디칼 소거능에 비해 전체적으로 낮은 항산화 효과를 보였다. 이는 DPPH법이 항산화 물질이 산화를 개시하는 DPPH radical을 hydrazine 형태로 환원시킴으로써 초기의 전자공여능을 확인할 수 있는 방법(15)인 반면, TBARS를 통한 지질과산화 억제효과는 linoleic acid 산화로 생성된 과산화지질의 분해 과정에서 생기는 peroxy radical의 소거를 통해 지질과산화의 이차분해산물인 malondialdehyde의 생성량을 측정하여 항산화능을 확인하는 방법(22)으로서, 이러한 각각의 작용기작에 있어서의 차이를 갖기 때문인 것으로 사료된다.

Lipoxygenase 저해능 측정: DPPH free radical 소거능과 TBA에 의한 지질과산화 억제능을 살펴봄으로써 *in vitro*에서 머위 엽병 분획물의 항산화력을 측정하였다. 본 실험에서는 *in vivo*에서의 머위 엽병의 항산화 가능성을 제시하기 위해 머위 엽병 용매 분획물의 *in vitro* lipoxygenase 저해효과를 측정하였다. Lipoxygenase는 체내에서 linoleic acid의 산화를 촉진시켜 leukotrien류 등의 유해산물을 다량 생성하여 천식, 관절염, 심근경색 등의 만성질환의 주요 원인이 된다(23). 이러한 유해 생성물을 줄이는 방법으로서 lipoxygenase 활성저해물질의 섭취가 중요하며, 머위 엽병에서 이의 가능성을 모색하고자 인체 내 효소와 가장 유사한 형태인 soybean lipoxygenase(Type V)를 이용하여 실험을 실시하였다. 그 결과, DPPH free radical 소거능과 TBA에 의한 지질과산화 억제능이 가장 높았던 ethyl acetate 분획물(50.67%)이 유의적으로 가장 높은 lipoxygenase 저해능을 보였다(Table 1, $p<0.01$). 양성 대조군인 NDGA의 항산화 활성에는 미치지 못했으나 분획물 수준에서 50% 이상의 lipoxygenase 저해효과를 나타낸 것으로 보아 머위 엽병 추출물이 *in vivo*에서도 역시 항산화 활성을 보여줄 것으로 기대되며 생체 내에서 산화적 스트레스로 인해 유발되는 손상과 질병을 예방할 수 있는 좋은 소재가 될 수 있을 것이라 사료된다.

머위 엽병 EtOAc 분획으로부터 활성추적을 통한 화합물 분리 및 구조 동정

머위 엽병 ethanol 추출물을 용매의 극성 차이에 따라 hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 및 H_2O로 순차 분배하고 감압 농축하여 5개의 용매 분획물을 얻었다. 3가지 다른 항산화 실험 결과에서 가장 우수한 효과를 나타낸 ethyl acetate 분획물에 대하여 활성 성분을 분리하기 위하여 silica gel open column chromatography에 의해 7개의 소분획으로 나누었다. 이 중, DPPH법에 의해 가장 우수한 free radical 소거 효과를 나타낸 sub-fraction 3(Fig. 2)으로부터 계속적인 silica gel open column chromatography를 수행하여 화합물 PJ-4를 분리, 정제하였으며, ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR data는 다음과 같다. ^{1}H-NMR(300MHz, δ, DMSO-d_6): 6.19(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.43(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.95(2H, d, *J*=8.3 Hz, H-3′,5′), 8.05(2H, d, *J*=8.3 Hz, H-2′,6′). ^{13}C-NMR (75MHz, δ, DMSO-d_6): 93.44(C-8), 98.16(C-6), 103.01(C-10), 115.40(C-3′,5′), 121.63(C-1′), 129.46(C-2′,6′), 135.61(C-3), 146.79(C-2), 156.15(C-9), 159.16(C-5), 160.68(C-4′), 163.85(C-7), 175.87(C-4).

화합물 PJ-4는 황색 분말로 $FeCl_3$ 반응에 양성을 나타내어 phenol성 화합물임을 예측할 수 있었고, 아니스알데히드-황산 시액에서 노란색을 나타내어 flavonoid계 물질로 추정되었으며, UV spectrum을 통하여 벤젠환의 존재를 확인하였다. ^{1}H-NMR spectrum에서 δ 6.19와 δ 6.43에서 관측되는 두 개의 doublet signal은 *J*값이 2 Hz로 두 수소가 meta coupling 상태임을 나타내어 각각 5,7-dioxygenated flavonoid A ring의 H-8과 H-6으로 추정하였다. δ 8.05와 δ 6.95에서 나타난 두 개의 doublet은 각각 flavonoid B-ring의 H-2′와 6′과 H-3′과 5′으로 추정하였다. ^{13}C-NMR spectrum에서는 전체 15개의 carbon signal을 관측하였으며, 각 탄소의 chemical shift를 문헌치(24)의 spectral data와 비교분석한 결과 화합물 PJ-4는 kaempferol로 동정하였다(Fig. 3). 본 연구에서 분리된 kaempferol은 좀갈매나무(25), 얼레지잎(26), 산마늘(27) 등의 식물체에서 분리된 바 있으며, 머

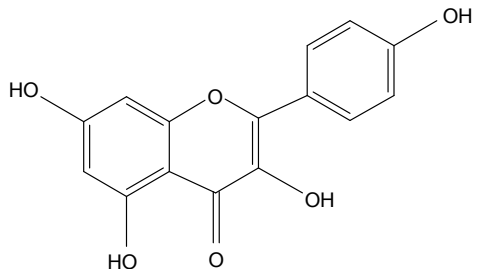

Fig. 3. Structure of PJ-4 isolated from ethyl acetate fraction of the stems of *Petasites japonicus*.

Table 2. Antioxidant activity[1)] of kaempferol isolated from the stems of *Petasites japonicus* (%)

Sample	Concentration (μg/mL)	DPPH radical scavenging	TBARS inhibition	Lipoxygenase inhibition
Kaempferol	25	17.52±1.96[d]	10.79±2.73[d]	9.42±4.56[d]
Kaempferol	50	32.96±0.34[c]	21.71±1.57[c]	27.06±3.46[c]
Kaempferol	100	65.76±0.63[a]	43.47±1.89[b]	58.60±4.20[b]
Ascorbic acid	10	63.24±0.62[b]	-	-
BHT	100	-	53.60±2.00[a]	-
NDGA	10	-		70.83±7.57[a]

[1)]The activities (%) are mean±SE of three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p<0.01$).

위에서는 kaempferol 3-*O*-(6″-acetyl)-β-glucopyranoside와 quercetin 3-*O*-(6″-acetyl)-β-glucopyranoside 등의 flavonoid 배당체가 존재하는 것으로 보고된 바 있으나(7,19) aglycone으로는 처음으로 분리되었다.

단리된 화합물의 항산화 활성

머위 엽병 ethyl acetate 분획물로부터 항산화 활성을 추적하여 분리된 kaempferol에 대하여 DPPH법, TBARS법 및 lipoxygenase법을 통한 항산화 실험을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 단리된 kaemperol은 25, 50 및 100 μg/mL 농도로 실험을 수행하였으며 세 가지 측정법에서 모두 kaempfrol의 농도가 증가함에 따라서 inhibition(%)의 수치가 유의적으로 증가하는 양상을 보여 농도 의존적인 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 100 μg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능 65.76%, TBARS에 의한 지질과산화 저해능 43.47%, lipoxygenase 저해도 58.60%의 활성을 나타내었다. 이미 Chang 등(28)과 Park 등(29)의 연구에서 kaempferol의 BHA와 BHT보다 높은 DPPH 라디칼 소거능에 대해 보고한 바 있어 Table 2의 결과를 뒷받침해준다. 플라보노이드는 환구조에 결합된 많은 페놀성 수산기에 의해 화합물의 항산화능이 결정되며 특히 kaempferol의 경우, 폴리페놀 구조($C_6C_3C_6$)와 4번 탄소의 카보닐기, 5번 탄소 또는 3번 탄소의 수산기로 인한 탁월한 항산화 효과가 증명된 바 있다(30). 항산화능 뿐만 아니라 이 화합물의 주요 활성으로 콜레스테롤 저해 활성(28,29) 및 세포 DNA 손상 보호 효과(31) 등이 보고되어 있다.

본 연구에서 분리 동정된 kaempferol은 DPPH법, TBARS법 및 lipoxygenase법을 통한 각각의 *in vitro* 항산화 실험에서 탁월한 효과를 나타내었으며, 이는 머위 엽병의 항산화능에 기여하는 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 잎에 비하여 효용가치가 다소 부족한 머위 엽병의 기능성식품 소재로서의 활용방안을 마련할 수 있으며 이로부터 분리된 항산화 화합물의 천연 항산화제로서의 가능성을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 머위 엽병의 에탄올 추출물을 용매 극성에 따라 hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butanol로 분배한 분획물에 대해 전자공여능, 지질과산화 억제능 및 lipoxygenase 저해효과 효과를 살펴봄으로써 항산화능을 측정하였다. 분획물 중 ethyl acetate 분획물의 경우 100 μg/mL 농도에서 전자공여능, 지질과산화 억제능 및 lipoxygenase 저해능에서 각각 65.41%, 37.04%, 50.67%로 가장 우수한 항산화능을 나타내었다. 이를 근거로 하여 ethyl acetate 분획물로부터 머위 엽병의 항산화 활성 성분을 규명하기 위하여 open column chromatography를 이용하여 화합물 PJ-4를 분리, 정제하였으며, ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR 분석을 통해 kaempferol로 동정하였다. 단리된 kaempferol의 항산화 활성을 확인하기 위하여 앞에서 언급한 세 가지 항산화 측정법을 통해 실험한 결과, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 양상을 보였다. 특히 100 μg/mL의 농도에서 전자공여능, TBARS에 의한 지질과산화 억제 및 lipoxygenase 저해실험에서 각각 65.76%, 43.47%, 58.60%로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 통해 kaempferol은 머위 엽병의 항산화 활성에 있어서 기여하는 물질일 것으로 보이며, 이로써 머위 엽병을 이용한 천연항산화제 개발 및 활용에 긍정적인 가능성을 제시할 것으로 사료된다.

문 헌

1. Hamilton-Koch W, Snyder RD, Lavelle JM. 1986. Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fiblasts and Chinese hamster ovary cell. *Chem Biol Interact* 59: 17-28.
2. Kim HJ, Jin CB, Lee YS. 2007. Antioxidative activities of phenolic compounds isolated from *Inonotus obliquus*. *Kor J Pharmacogn* 38: 1-16.
3. Kang JH, Cha JH, Han JH, Lee SW, Kim HJ, Kwon SH, Ham IH, Hwang BS, Whang WK. 2005. Isolation of antioxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. *Kor J Pharmacogn* 36: 121-128.
4. Kuk JH, Ma SJ, Moon JH, Park KH. 2003. Isolation and identification of lignans as antioxidant from leaves of *Catalpa ovata* G. Don. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 511-516.
5. Bang MH, Park JK, Song MC, Yang HJ, Yoo JS, Ahn EM, Kim DK, Baek NI. 2005. Development of biologically active compound from edible plant sources-XV. Isolation of triterpene glycosides from the leaf of *Petasites japonicus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 421-424.
6. Cho BS, Lee JJ, Lee MY. 2007. Effects of ethanol extracts

from *Petasites japonicus* Max of hepatic antioxidative systems in alcohol treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 298-304.
7. Kikuchi M. 1973. Studies on the constituents of the flower stalk of *Petasites japonicus* Maxim on the components of the volatile oil. *Yakugaku Xasshi* 93: 123-126.
8. Yaoita Y, Kikuchi M. 1994. Eremopetasidione a norsesquiterpenoid from the rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochem* 37: 1765-1766.
9. Yaoita Y, Kikuchi M. 1994. Petasiphenone a phenolic compound from rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochem* 37: 1773-1774.
10. Yaoita Y, Kikuchi M. 1994. Structures of six new eremophilenolides from the rhizomes of *Petasites japonicus*. *Chem Pharm Bull* 42: 1944-1947.
11. Park JY. 2007. The effect of *Petasites japonicus* extract on hepatotoxicity in rats. *Kor J Env Hlth* 33: 202-206.
12. Jee YH, Lee CS. 1996. Pathological changes on rats and mice fed with *Petasites japonicus* Maxim. *Korean J Vet Res* 36: 417-428.
13. Oh SH, Yang YH, Kwon OY, Kim MR. 2006. Effects of diet with added butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) of the plasma lipid profiles and antioxidant index of mice. *J East Asian Soc Dietary Life* 16: 399-407.
14. Choi OB. 2002. Anti-allergic effects of *Petasites japonicus*. *Korean J Food Nutr* 15: 382-385.
15. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1203.
16. Ottolenghi A. 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophy* 79: 355-461.
17. Block E, layer R, Grisoni S, Saha C, Belman S, Lossing FP. 1988. Lipoxygenase inhibitors from the essential oil of garlic. Markovnikov addition of the allyl dithiol radical to olefins. *J Am Chem Soc* 110: 7813-7827.
18. Lee KD, Chang HK, Kim HK. 1997. Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J Food Sci Technol* 29: 432-436.
19. Mizushina Y, Ishidoh T, Kamisuki S, Nakazawa S, Takemura M, Sugawara F, Yoshida H, Sakaguchi K. 2003. Flavonoid glycoside: a new inhibititor of eukaryotic DNA polymerase α and a new carrier for inhibitor-affinity chromatography. *Biochem Biophy Res Commun* 301: 480-487.
20. Ohakawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
21. Hur JM, Lee JH, Choi JW, Hwang GW, Chung SK, Kim MS, Park JC. 1998. Effect of methanol extract and kaempferol glycosides from *Armoracia rusticana* on the formation of lipid peroxide in bromobenxene-treated rats in vitro. *Kor J Pharmacogn* 29: 231-236.
22. Comporti M. 1987. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 45: 143-169.
23. Cho SY, You BJ, Lee SJ, Sung NJ. 1994. Screening for potato lipoxygenase-1 inhibitor in unused marine resources by the polarographic method. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 959-963.
24. Qu GZ, Si CL, Wang MH. 2006. Antioxidant constituents from *Leonurus japonicus*. *Natural Product Sciences* 12: 197-200.
25. Huong DTL, Dat NT, Cai XF, Shen G, Bae KH, Kim YH. 2004. Phenolic components from the leaves and twigs of *Phamnus taquetii*. *Kor J Pharmacogn* 35: 139-142.
26. Lee MS, Lim SK, Park HJ. 1994. Phthalate ester and flavonoids isolated from leaves of *Erythronium japonicum*. *Korean J Med Crop Sci* 2: 67-72.
27. Lee HJ, Lee SK, Choi YJ, Jo HJ. 2007. Extractives from the *Allium victorials*. *J Korean For Soc* 96: 620-624.
28. Chang BS, Kwon YS, Kim CM. 2004. The chemical structures and their antioxidant activity of the components isolated from the heartwood of *Hemiptelea davidii*. *Kor J Pharmacogn* 35: 80-87.
29. Park Y, Lee HJ, Lee SS, Choi DH. 2003. Studies on biological activity of wood extractives-chemical components and antioxidative activity of the leaves of *Sophora japonica*. *Modchae Konghak* 31: 43-48.
30. Rice-Evans DA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20: 933-956.
31. Park YK, Jeon EJ, Kang MH. 2003. Protective effect of flavonoids on lymphocyte DNA damage using comet assay. *Korean J Nut* 36: 125-132.

(2008년 7월 8일 접수; 2008년 7월 21일 채택)