

Article

순비기나무(*Vitex rotundifolia*)로부터 분리한 플라보노이드
성분의 항산화 활성

김유아¹ · 이정임² · 홍주완² · 정명은² · 서영완^{2*}

¹(재)대구경북한방산업진흥원 천연물물질은행구축사업단
(712-260) 경상북도 경산시 감제동 440-22

²한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경·생명과학부
(606-791) 부산광역시 영도구 동삼동 1

Antioxidant Activity of Flavonoids Isolated from *Vitex rotundifolia*

You Ah Kim¹, Jung Im Lee², Joo Wan Hong², Myoung Eun Jung², and Youngwan Seo^{2*}

¹Natural Compounds Bank Establishment Department, DGOM
Gyeongbuk 712-260, Korea

²Division of Marine Environment & Bioscience, College of Ocean Science and Technology,
Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

Abstract : The aim of this investigation was to evaluate antioxidant activity of crude extracts from the halophyte *Vitex rotundifolia*, their solvent fractions, and isolated compounds (1-3). Antioxidant capacity was determined by measuring DPPH radical, and authentic ONOO⁻ and ONOO⁻ generated from 3-morpholinsynonimine (SIN-1) *in vitro* as well as degree of occurrence of intracellular ROS, NO and GSH in mouse macrophage Raw 264.7 cells. From comparative analysis, MeOH extract, *n*-BuOH, and 85% aq. MeOH solvent fractions showed significant antioxidant effect in DPPH radical and ONOO⁻ assay systems. Activity-guided purification of *n*-BuOH and 85% aq. MeOH fractions led to the isolation of flavonoids 1-3. Among them, compound 1 exhibited excellent antioxidant effect in all bioassay systems tested. On the other hand, compounds 2 and 3 revealed potent inhibitory effect against ONOO⁻ generated from SIN-1, comparable with the positive control penicillamine.

Key words : *Vitex rotundifolia*, luteolin, vitexicarpin, artemetin, antioxidant activity

1. 서 론

인체내의 과도한 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소종[alkoxyl(RO·), hydroperoxyl radical(HOO·), nitric oxide(NO·), peroxyxynitrite(ONOO⁻) 등]의 제거는 다양한 형태의 항산화 물질에 의해서 이루어지며, 만병의 근원이 되는 활성산소종을 제거하는 항산화제에 대한 탐색은 오

래전부터 행해져 왔다(Ames et al. 1993; Kirschvink et al. 2008; Liu et al. 2008). 그 결과, 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)나 butylated hydroxytoluene(BHT) 등이 개발되어 널리 사용되고 있으나, 과량 섭취 시 야기 되는 문제점으로 인하여 이를 대체할 수 있는 안전한 천연 항산화제의 발굴이 시급한 실정이다. 이러한 연구의 일환으로 허브와 같은 식물로부터 천연 항산화제를 개발하려는 많은 연구가 수행되었으며 그 결과 lignan, flavonoid 등 폴리페놀 계열의 많은 화합물이 높은 항산화 효과를

*Corresponding author. E-mail : ywseo@hhu.ac.kr

가지는 것으로 보고되었다(Cao et al. 1997; Peterson and Dwyer 1998; Di Carlo et al. 1999; Pietta 2000; Heim et al. 2002; Zhang et al. 2005; Joo et al. 2007; Kim 2009).

순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 한국, 일본 등의 바닷가 모래땅에 서식하는 사구성 염생식물의 일종으로 단엽 만형, 만형자나무, 풍나무라고도 한다. 열매는 핵과로 딱딱하고 둥글며 9-10월에 검은 자주색으로 익는데, 한방에서는 이를 만형자(蔓荊子)라고 하여 두통, 안질, 꺾병 등의 질병의 치료에 사용한다(Yeeh et al. 1996; Lee 2002; Kim et al. 2009). 다수의 연구에 의해 만형자로부터 flavonoid류 및 terpenoid류의 이차대사산물이 분리된 바 있으며, 이들은 다양한 암세포에 대하여 증식억제 효과를 가지며 그 이외에도 항염증, 항산화 효능이 있는 것으로 보고되어 있다(Kondo et al. 1986; Ono et al. 1997; You et al. 1998; Ono et al. 1998; Kawazoe et al. 1999; Ono et al. 1999; Ono et al. 2000; Shin et al. 2000; Ko et al. 2000; Ko et al. 2001; Ono et al. 2001a, 2001b; Ono et al. 2002; Wang et al. 2005; Kim et al. 2009).

염생식물 자원으로부터 생리활성물질을 탐색하는 과정에 순비기나무의 추출물과 용매 분획물이 높은 peroxynitrite 소거효과를 보여 주었다. 따라서 본 연구에서는 순비기나무로부터 추출물과 용매 분획물을 제조하고, 항산화 활성에 따른 분리정제 과정을 통해 항산화 물질을 분리 하였다. 또한 활성과 구조와의 상관관계를 파악하고, 더 나아가 생리활성물질 탐색을 위한 기초 연구자료로 활용하고자 하였다. 이러한 연구의 결과로 순비기나무의 추출물로부터 3종의 flavonoid 계열 화합물들을 분리하여 이들에 대한 항산화 효과(DPPH 라디칼 및 ONOO⁻ 소거능, 세포내 NO, ROS, GSH 함량 증감)를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 순비기나무(*V. rotundifolia*) (3 kg)는 2003년 7월 전라남도 무안군 현경면에서 직접 채집하여 응달에서 자연 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C에서 냉동 보관하였다.

기기 및 시약

화합물은 high performance liquid chromatography (HPLC)으로 Dionex P580 pump(USA)와 Varian 350 refractive index detector(USA)를 사용하여 분리·정제하였다. 단일 분리된 화합물의 구조 결정을 위해 Perkin Elmer polarimeter 341(USA)를 사용하여 비선광도를 측정하였으며, NMR 스펙트럼은 Varian Mercury 300(¹H-

NMR 300 MHz와 ¹³C-NMR 75 MHz)에서 CD₃OD(Merck, deuterium degree 99.95%) CDCl₃(Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%) 용액을 사용하여 기록하였으며 Mass 스펙트럼 데이터는 한국기초과학연구원에 의뢰하여 분석하였다. 사용된 모든 유기 용매는 사용하기 전 정제하여 실험에 사용하였으며, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH), L-ascorbic acid, DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid(DL-penicillamine) dihyrorodamine 123(DHR 123), 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)와 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Sigma사(St Louis, MO, USA)에서 그리고 peroxynitrite(ONOO⁻)는 Cayman(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

시료의 추출 및 제조

분쇄한 시료는 dichloromethane(CH₂Cl₂)을 사용하여 24시간 동안 실온에서 추출한 후 여과하는 과정을 2번 반복하여 얻어진 추출액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator로 농축함으로써 CH₂Cl₂ 추출물을 얻었다. 여과하고 남은 잔사에 동량의 methanol(MeOH) 용매를 사용하여 CH₂Cl₂와 동일한 과정을 통해 MeOH 추출물을 얻었다. 두 추출물을 혼합(145.3 g)한 후 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane(33.6 g), 85% aq. MeOH(21.0 g), *n*-BuOH(39.0 g) 그리고 H₂O(47.8 g) 분획층을 얻었다. 얻어진 추출물과 용매 분획층은 dimethylsulfoxide (DMSO)로 희석하여 실험에 사용하였다.

활성성분의 분리

85% aq. MeOH(21.0 g) 및 *n*-BuOH 분획층(15.0 g)에 대해 MeOH과 물의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며, 각각 50%(Rfc 1), 60%(Rfc 2), 70%(Rfc 3), 80%(Rfc 4), 90% aq. MeOH (Rfc 5)과 100% MeOH(Rfc 6), 그리고 100% EtOAc(Rfc 7)의 크로마토그래피 분획물을 얻었다. *n*-BuOH 분획층의 Rfc 3 분획물은 역상 HPLC(YMC ODS-A, 67% aq. MeOH, 10×250 mm, S-5 μm, 2 ml/min)를 실시하여 순수한 화합물 1(119.2 mg)을 얻었다. 85% aq. MeOH 분획층의 Rfc 4 분획물은 두 차례에 걸친 역상 HPLC(YMC ODS-A, 78% aq. MeOH 및 50% aq. CH₃CN, 10×250 mm, S-5 μm, 2 ml/min)를 실시하여 화합물 2(71.4 mg)와 3(24.8 mg)을 분리하였다.

Luteolin (1)

Yellow solid; [α]_D²⁰ - 22° (c 0.58, MeOH); EIMS *m/z* 286 [M]⁺; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.35 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-6'), 7.34 (1H, br s, H-2'), 6.88 (1H, d, *J* =

8.3 Hz, H-5'), 6.51 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, br s, H-8), 6.18 (1H, br s, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 183.6 (C, C-4), 166.1 (C, C-2), 165.8 (C, C-7), 163.0 (C, C-5), 159.2 (C, C-9), 150.8 (C, C-4'), 146.8 (C, C-3'), 123.5 (C, C-1'), 120.2 (CH, C-6'), 116.6 (CH, C-5'), 114.0 (CH, C-2'), 105.2 (C, C-10), 103.8 (CH, C-3), 100.0 (CH, C-6), 94.9 (CH, C-8).

Vitexicarpin (2)

Pale yellow solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 10^\circ$ (c 0.10, MeOH); EIMS m/z 374 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.67 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 7.65 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.47 (1H, s, H-8), 5.83 (1H, s, 3'-OH), 3.96 (3H, s, 4'-OMe), 3.93 (3H, s, 7-OMe), 3.90 (3H, s, 5-OMe), 3.84 (3H, s, 3-OMe); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.7 (C, C-4), 158.6 (C, C-7), 155.5 (C, C-2), 152.5 (C, C-5), 152.1 (C-9), 148.7 (C, C-4'), 145.4 (C, C-3'), 138.8 (C, C-3), 132.1 (C, C-6), 123.4 (C, C-1'), 121.4 (CH, C-6'), 114.2 (CH, C-2'), 110.3 (CH, C-5'), 106.5 (C, C-10), 90.3 (CH, C-8), 60.9 (CH_3 , 6-OMe), 60.1 (CH_3 , 3-OMe), 56.3 (CH_3 , 7-OMe), 56.0 (CH_3 , 4'-OMe).

Artemetin (3)

Pale yellow solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 13.3^\circ$ (c 0.15, MeOH); EIMS m/z 388 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.70 (1H, dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, H-6'), 7.65 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.97 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2'), 6.49 (1H, s, H-8), 3.97 (3H, s, 7-OMe), 3.96 (3H, s, 4'-OMe), 3.95 (3H, s, 3'-OMe), 3.91 (3H, s, 6-OMe), 3.86 (3H, s, 3-OMe); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.7 (C, C-4), 158.6 (C, C-7), 155.7 (C, C-2), 152.6 (C, C-9), 152.2 (C-5), 151.3 (C, C-4'), 148.7 (C, C-3'), 138.7 (C, C-3), 132.2 (C, C-6), 122.8 (C, C-1'), 122.1 (CH, C-6'), 111.2 (CH, C-5'), 110.8 (CH, C-2'), 106.5 (C, C-10), 90.3 (CH, C-8), 60.9 (CH_3 , 6-OMe), 60.2 (CH_3 , 3-OMe), 56.4 (CH_3 , 7-OMe), 56.1 (CH_3 , 4'-OMe), 56.0 (CH_3 , 3'-OMe).

DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능 측정

DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹인 용액 1.2 ml에 다시 EtOH 3 ml와 DMSO 0.5 ml를 혼합하였다. 준비된 각 sample 50 μl 와 제조한 DPPH 용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대

조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94-0.97이 되도록 조정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며 결과를 평균한 값으로 나타내었다(Blois 1998).

Peroxonitrite(ONOO⁻) 소거 활성 측정

ONOO⁻소거 활성은 Kooy 등 (1994)의 방법에 따라 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다. DHR 123은 최종 농도가 5 μM 이 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate(pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA) 100 μM (final concentration)을 혼합하여 조제하였다. Buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하여 측정하였으며, 3-morpholinopyridone(SIN-1)을 첨가할 경우, SIN-1이 DHR 123과 점진적인 산화를 일으키는 것을 고려하여 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. DHR 123 fluorescence intensity는 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 530 nm에서 측정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율(%)로 계산하였다.

세포 배양

마우스 대식세포 Raw 264.7는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Utah, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone, Utah, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator(Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 세포 배양은 2일 간격으로 배지를 교환하였으며, 6-7일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 생존율 측정

순비기나무 시료의 처리에 따른 세포의 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Hansen et al. 1989). 배양된 세포는 5×10^4 cells/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 새로운 배지에 일정농도의 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 1 mg/ml의 MTT가 포함된 배지를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 이때 생성된 formazan crystal은 DMSO에 녹여서 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT(Bio-Tek

instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율(%)을 구하였다.

NO(nitric oxide) 생성 억제능 측정

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 100 μ l씩 분주하여(5×10^4 cells/ml) 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle medium(MEM)으로 교체한 후 준비된 sample을 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 lipopolysaccharide(LPS, final concentration 1 μ g/ml)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine:1% sulfanilamide = 1:1)과 배양액을 1:1로 혼합하여 15분 동안 실온에 방치한 후, multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT(Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Green et al. 1982). 이 반응은 1-naphthylethylenediamine, sulfanilamide 그리고 NO₂가 반응하여 azo coupling을 이루는데 이 두 개의 고리 형태가 550 nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이 값을 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 측정할 수 있다.

ROS(reactive oxygen species) 소거능 측정

세포 내 자유라디칼 생성 정도는 DCFH-DA assay로 측정하였다(Okimoto et al. 2000). Raw 264.7 세포는 96 well plate에 5×10^4 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 희석한 20 μ M의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA, fluorescence probe)를 첨가하여 20분간 배양하였다. DCF-DA 처리 후 일정한 농도의 시료를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 씻은 후, 2시간 동안 500 μ M의 H₂O₂를 처리하여 세포 내 자유라디칼 생성 정도는 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 $\lambda_{excitation}$ 485 nm, $\lambda_{emission}$ 528 nm에서 DCF fluorescence intensity를 측정하였다.

GSH (glutathione) 함량 측정

세포내에 축적된 항산화 효소인 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 monobromobiman(mBBR)을 이용하여 측정하였다(Poot et al. 1986). 세포는 fluorescence microtiter 96-well plates에 well 당 5×10^4 cells/ml 이 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 μ M mBBR를

처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 $\lambda_{excitation}$ 360 nm, $\lambda_{emission}$ 465 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

순비기나무 추출물의 항산화 활성

DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능

순비기나무 추출물이 DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능을 Blois (1998)의 방법을 이용하여 검색하였다. DPPH radical을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolics 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용된다. DPPH radical 소거 활성은 시험군의 안정해진 분자의 흡광도를 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 측정함으로써 백분율(%)로 나타내었다.

순비기나무의 추출물과 분획물에 대한 DPPH 자유 라디칼의 소거 효과는 Fig. 1(a)에 나타낸 바와 같이, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid(83.3%)의 소거 효과보다는 다소 약한 것으로 확인되었다. 하지만 *n*-BuOH 분획층의 경우, 50 및 100 μ g/ml의 농도에서 각각 60.4%와 66.7%의 라디칼 소거 효과를 나타내어 DPPH 라디칼에 대한 항산화 성분이 *n*-BuOH 분획층으로 집중됨을 확인할 수 있었다.

Peroxynitrite(ONOO⁻) 소거 활성

순비기나무 추출물이 가지는 authentic ONOO⁻와 SIN-1의 소거 효과를 Kooy 등 (1994)의 방법을 이용하여 검색하였다. SIN-1은 NO와 O₂⁻·을 동시에 발생시켜서 신속하게 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로서 흔히 사용된다. ONOO⁻ 소거 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다(Fig. 1b). 순비기나무의 추출물 및 분획물에 대한 authentic ONOO⁻의 소거 효과를 확인한 결과, 10 μ g/ml의 농도에서 MeOH 추출물(79.8%), *n*-BuOH 분획층(96.8%) 및 85% aq. MeOH 분획층(73.9%)이 뛰어난 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 그리고 SIN-1에서 유도된 ONOO⁻에 대한 소거 효과는 동일 농도에서 각각 94.2%, 118.2% 그리고 88.3%의 높은 소거 양상을 보였으며, 특히 추출물에서는 MeOH 추출물이 소거 효과가 우수하였으며, 분획층에서는 *n*-BuOH 및 85% aq. MeOH 분획층이 L-ascorbic acid와 penicillamine에 상응하는 우수한 ONOO⁻ 소거 효과가 있음이 확인되었다.

플라보노이드계 화합물의 항산화 활성

순비기나무 분획층 가운데 뛰어난 라디칼 소거능을 보

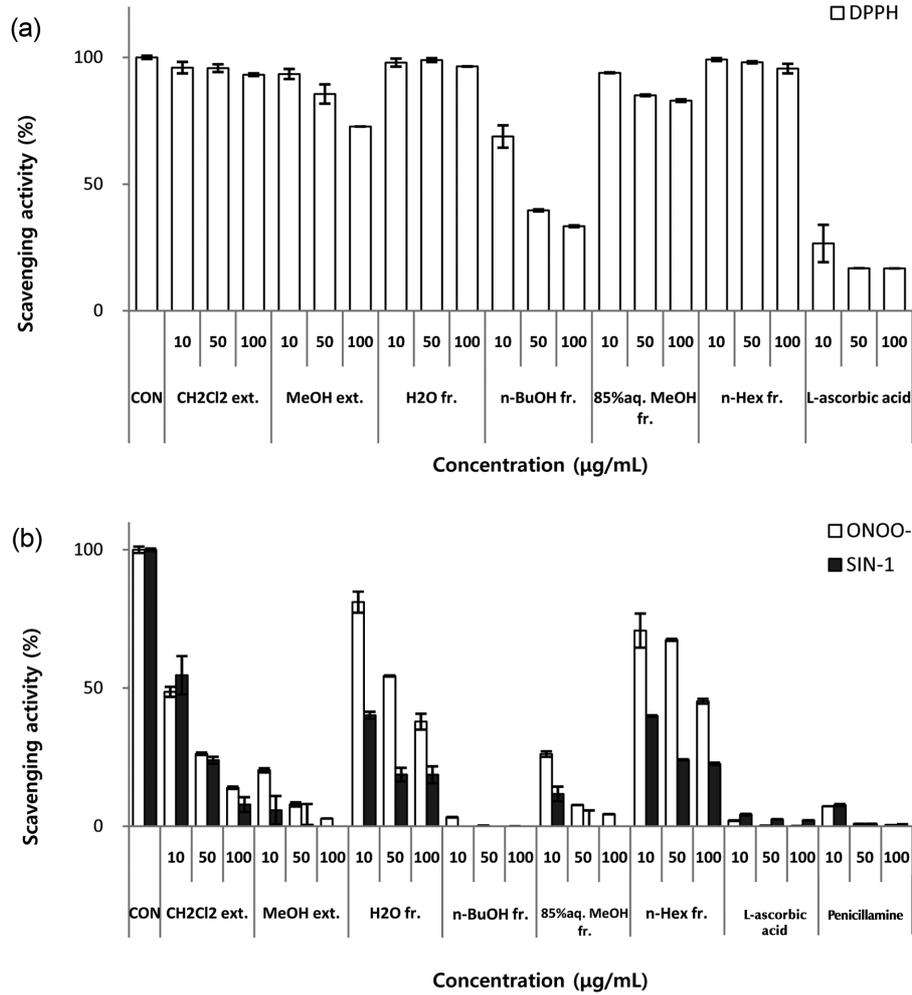
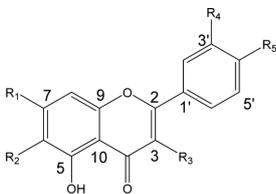


Fig. 1. Antioxidant effects of crude extracts and solvent fractions (10, 50 and 100 µg/ml) of *Vitex rotundifolia* by DPPH (a), ONOO⁻ (□) and SIN-1 (■) (b) scavenging activity. Each value represents the means±SD of three independent assays



1. R₁, R₄, R₅ = OH, R₂, R₃ = H
2. R₁ - R₃, R₅ = OMe, R₄ = OH
3. R₁ - R₅ = OMe

Fig. 2. Chemical structure of compounds 1-3 isolated from *Vitex rotundifolia*

이는 *n*-BuOH 분획층 및 85% aq. MeOH 분획층으로부터 3종의 순수한 플라보노이드계 화합물(1-3)을 분리하였으며, 이들의 구조는 NMR, IR, UV 등의 분광학적 분석과 문헌치와의 비교에 의해 차례로 luteolin(1), vitexicarpin(2) 및 artemetin(3)임을 확인하였다(Iinuma et al. 1980; Rahman et al. 1988; Ahmad et al. 1995; Yoshioka et al. 2004; Loizzo et al. 2007) (Fig. 2). 화합물 1-3은 순비기나

무의 대표적인 플라보노이드계 화합물로서 화합물 1의 항산화 효과 및 화합물 2와 3의 항암효과가 다수 보고된 바 있으나(Ko et al. 2000; Kim et al. 2009), 항산화 효과의 구조적 상관성을 확인하기 위하여 화합물 1-3의 항산화 효과를 다양한 방법으로 검토해 보았다.

DPPH 자유 라디칼 및 peroxynitrite(ONOO⁻) 소거 활성

Fig. 3에 순비기나무에서 분리된 화합물 1-3의 DPPH 자유 라디칼 및 peroxynitrite(ONOO⁻) 소거활성을 측정할 결과를 각각 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능의 경우, 화합물 1이 50 µM의 농도에서 76%의 뛰어난 라디칼 소거 효과를 보였으며, 이는 동일농도에서의 대조군인 L-ascorbic acid(83%)와도 필적하는 효과라 할 수 있겠다 (Fig. 3a). 화합물 1에 대한 뛰어난 DPPH 라디칼 소거활성은 이미 Jung et al. (2001)에 의해 확인된 바 있다. 이에

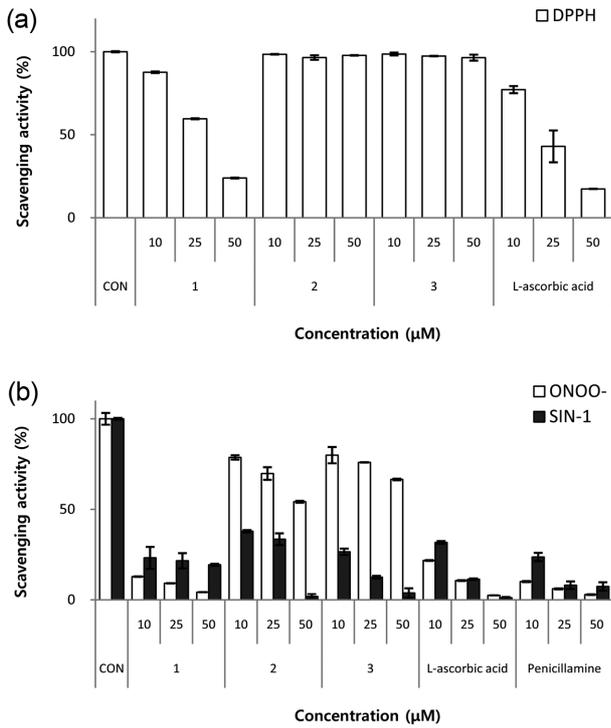


Fig. 3. Antioxidant effects of compounds 1-3 (10, 25 and 50 μM) isolated from *Vitex roundifolia* by DPPH (a), and ONOO⁻ (□) and SIN-1 (■) (b) scavenging activity. Each value represents the means±SD of three independent assays

반해, 화합물 2와 3은 DPPH 라디칼 소거에는 큰 효과를 나타내지 않는 것으로 확인되었다. ONOO⁻ 소거 활성은 화합물 1이 10 μM의 농도에서 87% 이상의 효과를 보여 대조군인 L-ascorbic acid(78%) 및 penicillamine(90%)에 상응하는 강력한 항산화능이 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 보고된 문헌과도 잘 일치하였다(Jung et al. 2001). 또한, 화합물 1의 결과에는 미치지 못하지만 화합물 2와 3이 50 μM의 농도에서 각각 46%와 34%의 소거능을 보여 항산화 소재로의 가능성을 보여주었다. 반면에 SIN-1에서 유도된 ONOO⁻에 대한 소거 효과는 10 μM의 농도에서 화합물 1-3이 차례로 77%, 62%, 73%를 기록하였으며, 농도의존적으로 효능이 증가하여 50μM의 농도에서는 각각 81%, 98%, 96%를 나타내어 대조군인 L-ascorbic acid (99%)와 penicillamine(93%)에 상응하는 뛰어난 소재가 될 수 있을 것으로 사료되었다(Fig. 3b). 특히, 화합물 2와 3의 ONOO⁻ 소거활성은 처음으로 보고되는 것으로, authentic ONOO⁻에서보다 SIN-1에 의해 생성되는 ONOO⁻를 소거하는 효과가 더 뛰어난 것으로 확인되었다. 이는 ONOO⁻를 직접적으로 소거하는 화합물 1과 달리 화합물 2와 3은 *in vitro* 상에서 SIN-1에 의해 생성되는 nitric oxide(NO·)와 superoxide anion(·O)를 효과적으로 소거

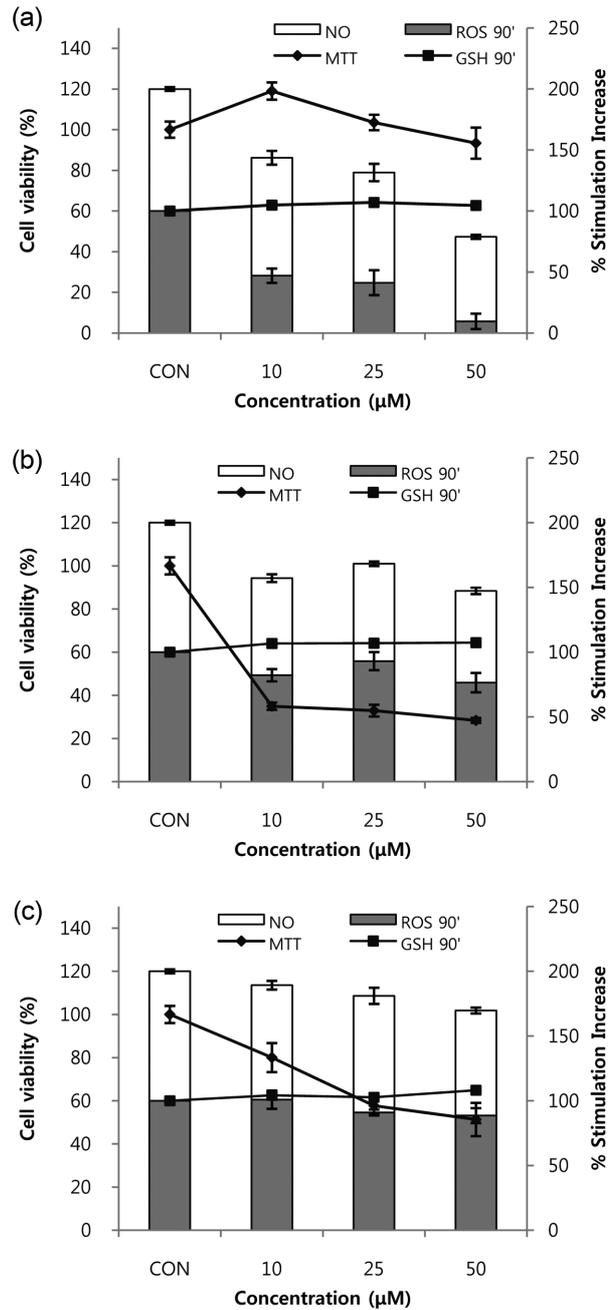


Fig. 4. Effects of compounds 1-3 (10, 25 and 50 μM) on cell viability (—◆—), increases of nitric oxide (□), intracellular ROS (■), and GSH (—■) level in Raw 264.7 cells: (a) compound 1; (b) compound 2; (c) compound 3. Each value represents the means±SD of three independent assays

하는데 더 탁월한 화합물이라고 할 수 있을 것이다.

NO(nitric oxide) 생성 억제능

순비기나무에서 분리한 화합물들의 생체 내 적용 가능

성을 가늠하기 위하여 화합물 1-3에 대한 세포 내 NO 생성 억제 효과를 마우스 대식세포 Raw 264.7을 사용하여 검토하였다. 시료 처리 후 LPS를 48시간 동안 처리하여 NO의 생성을 유도하였으며 시료를 처리하지 않고 LPS만 처리한 것을 대조군으로 하여 백분율(%)로 비교하여 나타내었다. Fig. 4와 같이 화합물 1-3의 NO 함량을 측정하기 위하여 MTT assay를 통한 각 화합물의 세포 독성을 측정 한 결과, 화합물 1을 제외한 화합물들이 10 μ M의 낮은 처리 농도에서도 강한 세포 독성이 있음이 확인되었다. 따라서, 화합물 1에 대한 세포내 항산화 활성 결과만이 유의성이 있다고 할 것이다.

화합물 1의 NO 생성 억제능을 대조군에 대한 백분율로 비교하여 확인해 본 결과(Fig. 4a), 50 μ M의 농도에서 31%로 문헌에 보고된 것과 유사하게 NO의 생성을 억제 하는 것으로 나타났으며, 이는 독성을 띄는 화합물 2와 3(29%과 19%) 보다도 억제 효과가 있다고 할 수 있겠다 (Park et al. 2010).

ROS(reactive oxygen species) 소거능

순비기나무의 세포 내 자유라디칼 소거 효과는 대식세포인 Raw 264.7을 사용하였으며, 형광염료인 DCFH-DA가 세포 내 생성된 자유라디칼과 반응하여 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 측정하였다. 세포 내 자유라디칼 생성은 H₂O₂를 이용하여 유도하였으며, 30분 간격으로 120분 동안 형광 정도를 측정하여 나타내었다. Fig. 4와 같이 화합물 1은 시료를 처리하지 않고 H₂O₂만을 처리한 control과 비교하여 농도 의존적으로 ROS를 소거하는 것으로 확인되었다. 특히, 50 μ M의 농도에서는 90% 이상의 ROS 소거능을 보여주었으며, 10 μ M의 농도에서도 53%의 뛰어난 효과를 보여주었다. 반면에, 세포독성을 보였던 화합물 2와 3은 50 μ M의 농도에서 각각 24%와 11%를 나타내어 화합물 1에 미치지 못하였다. 따라서, 이는 *n*-BuOH 분획층의 높은 항산화 활성에 화합물 1이 높은 기여를 하는 것으로 판단된다.

GSH(glutathione) 증가량

순비기나무의 플라보노이드계 화합물들에 의한 항산화 효소인 GSH 함량 증가 경향을 확인해 본 결과, 눈에 띄게 효소의 증가 효과를 나타내지는 않지만 농도의존적으로 5-10% 내외로 증가하는 것으로 확인되었다.

4. 결 론

이상과 같이 순비기나무의 추출물 및 용매 분획물들의 항산화 활성을 확인하였으며 항산화 활성이 우수한 용매 분획물로부터 3개의 flavonoid 계열의 화합물들이

luteolin(1), vitexicarpin(2), artemetin(3)을 분리하고 또한 이들 화합물들에 대해서도 항산화 활성을 측정하였다. 순비기 추출물들의 항산화 활성이 이미 이전에 보고되었으나 그 활성성분으로 보고된 화합물들 중에 여기에서 분리된 3개의 flavonoid 계열의 물질들은 포함되어 있지 않았다(Kim 2009). 여러 종류의 다른 식물시료에서 분리된 바 있는 luteolin(1)이 여러 종류의 활성산소종에 대해 가지는 항산화 활성은 이미 잘 알려져 있다. 하지만 vitexicarpin(2)과 artemetin(3)의 항산화 활성에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다. Vitexicarpin(2)과 artemetin(3)은 authentic peroxynitrite와 SIN-1에 대해서 농도의존적인 소거효과를 보였으며, 특히 2와 3번 화합물은 SIN-1에 의해 생성되는 ONOO⁻를 탁월하게 소거하여 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid와 penicillamine에 필적하는 결과를 나타내었다. 세포내 자유라디칼에 대한 항산화 활성은 측정농도에서 2와 3번 화합물이 세포독성을 나타내어 구조적 차이에 의한 항산화 효능을 비교하기가 어려웠다. 대식세포 Raw 264.7에서 순비기나무 추출물의 NO 생성 억제 효과는 이미 보고된 바 있지만 구체적인 활성성분에 대해서는 알려져 있지 않았다(Choi et al. 2010). 본 연구에 의해 수행된 결과에 의하면 luteolin(1)이 NO 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이 결과는 기존에 보고된 luteolin의 NO 생성억제 효과와 잘 일치하였다(Park et al. 2010). 화합물 1, 2, 3의 화학 구조적인 차이를 보면 1번, 2번, 3번 화합물이 OH기를 각각 4, 2, 1개를 가지고 있다. 이미 잘 알려져 있는 바와 같이 hydroxyl(OH)기를 가장 많이 가지고 있는 1번 화합물이 여러 종류의 항산화 활성검색에서 매우 좋은 소거효과를 보여 주었다(Choi et al. 2002). 하지만 50 μ M의 농도에서 SIN-1에 의해 생성되는 peroxynitrite의 소거효과에서는 오히려 methoxy(OMe)기가 훨씬 많은 2번과 3번 화합물이 더 좋은 소거효과를 보여 주었다. 그럼에도 불구하고 authentic peroxynitrite에 대한 소거 효과가 그렇게 뛰어나지 않은 것으로 보아 2번과 3번 화합물이 peroxynitrite 자체를 효과적으로 소거하기 보다는 SIN-1이 먼저 분해되면서 발생하는 NO와 \cdot O₂⁻로부터 peroxynitrite가 생성되는 과정을 효과적으로 억제하는 것으로 여겨진다. 하지만 이 과정에서 OH기와 OMe기가 구체적으로 어떤 역할을 하는지는 명확하지 않다.

사 사

본 연구는 본 연구는 2010년 농림수산식품부 수산기술 개발사업(No. 20100293) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 국토해양부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

참고문헌

- Ahmad VU, Khan MA, Baqai FT, Tareen RB (1995) Santoflavone, a 5-Deoxyflavonoid from *Achillea santolina*. *Phytochemistry* **38**:1305-1307
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* **90**:7915-7922
- Blois MS (1998) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**:1199-1200
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* **22**:749-760
- Choi JK, Cha DS, Lee YJ, Ko SH, Park HJ, Lee SY, Choi JH, Jeon H (2010) Effects of *Vitex rotundifolia* on radical scavenging and nitric oxide production. *Oriental Pharm Exp Med* **10**:51-58
- Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK, Jung HA (2002) The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother Res* **16**:232-235
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* **65**:337-353
- Green LC, Wagner DA, Logowski GJ, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**:131-138
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**:203-210
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* **13**:572-584
- Iinuma M, Matsuura S, Kusuda K (1980) ¹³C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectral studies on polysubstituted flavonoids. I. ¹³C-NMR spectra of flavones. *Chem Pharm Bull* **28**:708-716
- Joo EY, Lee YS, Kim NW (2007) Polyphenol compound contents and physiological activities in various extracts of the *Vitex rotundifolia* stems. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**:813-818
- Jung MJ, Chung HY, Choi JS (2001) Antioxidant activity of roasted defatted perilla seed. *Nat Prod Sci* **7**:72-75
- Kawazoe K, Yutani A, Takaishi Y (1999) Aryl naphthalenes norlignans from *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry* **52**:1657-1659
- Kim YA, Lee JI, Kim H, Kong CS, Nam TJ, Seo Y (2009) Antiproliferative effect of extracts, fractions and compound from *Vitex rotundifolia* on Human Cancer Cells. *J Appl Biol Chem* **52**:180-186
- Kim DW (2009) Antioxidative Constituents from the Twigs of *Vitex rotundifolia*. *Biomol Ther* **17**:412-417
- Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P (2008) The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* **177**:178-191
- Ko WG, Kang TH, Lee SJ, Kim NY, Kim YC, Sohn DH, Lee BH (2000) Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem Toxicol* **38**:861-865
- Ko WG, Kang TH, Lee SJ, Kim YC, Lee BH (2001) Rotundifuran, a labdane type diterpene from *Vitex rotundifolia*, induces apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytother Res* **15**:535-537
- Kondo Y, Sugiyama K, Nozoe S (1986) Studies on the constituents of *Vitex rotundifolia* L. fil. *Chem Pharm Bull* **34**:4829-4832
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **16**:149-156
- Lee YN (2002) In *Flora of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, 241 p
- Liu YH, Lin SY, Lee CC, Hou WC (2008) Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonyl hydroxamic acid. *Food Chem* **109**:159-166
- Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, Hufner A, Menichini F (2007) Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res* **21**:32-36
- Okimoto Y, Watanabe A, Niki E, Yamashita T, Noguchi N (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett* **474**:137-140
- Ono M, Ito Y, Kubo S, Nohara T (1997) Two new iridoids from *Vitex trifoliae* fructus (Fruit of *Vitex rotundifolia* L.). *Chem Pharm Bull* **45**:1094-1096
- Ono M, Ito Y, Nohara T (1998) A labdane diterpene glycoside from fruit of *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry* **48**:207-209
- Ono M, Yamamoto M, Masuoka C, Ito Y, Yamashita M, Nohara T (1999) Diterpenes from the Fruits of *Vitex rotundifolia*. *J Nat Prod* **62**:1532-1537
- Ono M, Sawamura H, Ito Y, Mizuki K, Nohara T (2000) Diterpenoids from the fruits of *Vitex trifolia*. *Phytochemistry* **55**:873-877
- Ono M, Ito Y, Nohara T (2001a) Four new halimane-type

- diterpenes, vitetrifolins D–G from the fruit of *Vitex trifolia*. Chem Pharm Bull **49**:1220-1222
- Ono M, Yamamoto M, Yanaka T, Ito Y, Nohara T (2001b) Ten new labdane-type diterpenes from the fruit of *Vitex rotundifolia*. Chem Pharm Bull **49**:82-86
- Ono M, Yanaka T, Yamamoto M, Ito Y, Nohara T (2002) New diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. J Nat Prod **65**:537-541
- Park CM, Park JY, Song YS (2010) Luteolin and chicoric acid, two major constituents of dandelion Leaf, inhibit nitric oxide and lipid peroxide formation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. J Food Sci Nutr **15**:92-97
- Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. Nutr Res **18**:1995-2018
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod **63**:1035-1042
- Poot M, Verkerk A, Koster JF, Jongkind JF (1986) De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. Biochim Biophys Acta **883**:580-584
- Rahman AU, Ahmed D, Choudhary MI, Turkoz S, Sener B (1988) Chemical constituents of *Buxus sempervirens*. Planta Med **54**:173-174
- Shin TY, Kim SH, Lim JP, Suh ES, Jeong HJ, Kim BD, Park EJ, Hwang WJ, Rye DG, Baek SH, An NH, Kim HM (2000) Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. J Ethnopharmacol **72**:443-450
- Wang HY, Cai B, Cui CB, Zhang DY, Yang BF (2005) Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. Yao Xue Xue Bao **40**:27-31
- Yeoh Y, Kang SS, Chung HG, Chung MS (1996) Genetic and clonal diversity in Korean populations of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae). J Plant Research **109**:161-168
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, Kimura Y. (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. Z Naturforsch **59**:509-514
- You KM, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1998) Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. Planta Med **64**:546-550
- Zhang S, Yang X, Coburn RA, Morris ME (2005) Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. Biochem Pharmacol **70**:627-639

Received Aug. 17, 2011

Revised Aug. 26, 2011

Accepted Sep. 7, 2011