

목통의 페놀성 화합물의 항산화 활성 및 HPLC-UV 동시 함량분석

경민지 · 전해진 · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학

(Received March 27, 2015; Revised May 22, 2015; Accepted June 4, 2015)

Anti-oxidant Activity of Phenolic Compounds and Simultaneous Contents Determination using HPLC-UV from the *Akebiae caulis*

Min-Ji Kyung, Hye-Jin Jeon and Wan-Kyun Whang[#]

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

Abstract — *Akebiae caulis* have been used in folk medicines for diuretic, menstrual pain, and diuretic pain. It has been also resolved nephritis and cystitis. In this study, we isolated three phenolic compounds from 70% methanol extract using the open column chromatography. These isolated compounds which were 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid, and syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside were determined by physico-chemical apparatus. Furthermore, we conducted DPPH and ABTS assay in order to screen the antioxidant activity of isolated three compounds. Also, we developed a rapidly HPLC-UV analysis method of two phenolic compounds (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid) for evaluating the *Akebiae Caulis* collected 30 samples from different regions. From the experiments, all three isolated compounds showed the significant antioxidant activity. We suggested that the content criteria of marker compounds were shown by a simple and rapid HPLC-UV method. The contents respectively were 0.009% (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside) and 0.036% (5-O-caffeoylquinic acid).

Keywords □ *Akebiae caulis*, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid, syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside, antioxidant activity, HPLC-UV

목통(木通, *Akebiae caulis*)은 으름덩굴과(Lardizabalaceae)에 속하는 으름덩굴 *Akebia quinata* Decaisne의 줄기로서 낙엽덩굴 성 목본이다. 줄기는 길이 30~70 cm, 지름 0.5~2 cm로 원기둥 모양이며 보통 비틀려 굽어 있고, 바깥쪽은 황백색~황갈색을 띠고, 세로로 난 골이 아주 많다. 목통의 동속식물로는 삼엽목통(*A. trifoliata*)과 백목통(*A. trifoliata* var. *australis*)이 있으며, 우리나라 전국 산이나 들에 자생하고 있다.¹⁾

목통의 전통의학적 약리작용은 이뇨작용으로서 부종, 신장염, 요도염에 사용하며 통경제로서 생리불순에 사용하며, 신경통, 진정작용, 해열작용, 항염증작용 등에 사용한다.^{2,3)} 현재 목통의 성분 연구는 saponin P₁과 mutongsaponin C의 동시분석,⁴⁾

calceolarioside B의 정량분석,⁵⁾ quinic acid와 akeboside St_c의 동시분석⁶⁾ 등의 보고되어 있으며, 활성으로는 목통 추출물의 항산화 작용 및 아질산염 소거작용,⁷⁾ 목통의 항균효과,⁸⁾ 목통의 항산화 및 항염작용,⁹⁾ 열처리와 추출방법에 따른 항산화 활성,¹⁰⁾ 목통약침자극이 통풍유발 흰쥐에 미치는 영향,¹¹⁾ 목통약침이 흰쥐의 급성 신장염에 미치는 영향,¹²⁾ 개에서 목통 추출물의 이뇨효과¹³⁾ 등의 보고가 있었다.

현재까지 삼엽목통의 경우 saponin 성분과 페놀성 성분에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 오엽목통의 경우 saponin 성분의 연구만 있을 뿐 페놀성 성분들에 관한 연구는 미비한 실정이다. 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 목통의 분획별 항산화활성을 비교하여 페놀성 성분들을 분리하고 기기분석을 통한 구조구명 및 항산화활성 확인실험을 진행하였다. 또한 주성분이며 항산화 활성이 있는 페놀성 성분에 대한 HPLC-UV 함량 분석법을 개발 및 검증 하였으며, 확립된 분석법을 기준으로 국내 약령시장에서 유통되고 있는 30품목에 대한 모니터링을 진행

[#]Corresponding Author

Wan-Kyun Whang
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
Tel.: 02-820-5611 Fax.: 02-852-5611
E-mail: love_u3u@naver.com

하여 목통의 함량분석 및 품질평가를 용이하게 할 수 있도록 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 목통(*Akebiae caulis*)은 경상북도 영천산 목통으로 중앙대학교 약품자원식물학실험실에서 식물의 기원 및 형태학적 감정을 거친 후 3 kg을 연구의 재료로 사용하였다. 또한 모니터링 및 함량분석을 실시하기 위해 국내에서 유통 중인 목통 29품목, 경상남도 진주에서 채집한 목통 1품목을 수집하여 감정을 통한 기원확인 후 분석에 사용하였다.

실험기기 및 시약

본 연구에 사용한 기기로는 Balance(Metter Toledo ML204, Switzerland), Shaking water bath(Daihan - Sci LSB-045S, Korea), Vortex mixer(Thermolyne type 37600 mixer, U.S.A.), UV/VIS spectrophotometer(Human TU-1800PC, Korea, Optizen 2120 UV, Korea), TLC Adsorbent(Kiesel gel60 F₂₅₄, Germany) 등이 있으며, 추출 및 분획과정에서 사용된 용매는 Methanol, Ethanol, Acetonitrile, Chloroform, Water, Formic acid, Acetic acid(J.T. Baker, HPLC grade, U.S.A.) 등을 사용하였다. Column Chromatography의 충전제로는 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co., Japan), Silica gel(70-230 mesh, Merck, Germany), Sephadex LH-20(25~100 µm, Pharmacia, Sweden), ODS gel(400~500 mesh, Waters, U.S.A.)을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 기기로는 YL9100 system, YL9101 Vacuum Degasser, YL9110 Quaternary Pump, YL9120UV/Vis Detector(Korea), ACE 5 C18(4.6×250 mm, 5 µm), Kromasil 100-5 C18(4.6×250 mm, 5 µm), Phenomenex C18(4.6×250 mm, 5 µm)을 사용하였고, 성분 규명 및 항산화활성 시약은 ¹H-NMR spectrometer (Varian Gemini 2000, 600 MHz, U.S.A.), ¹³C-NMR spectrometer (Varian Gemini 2000, 150 MHz, U.S.A.), FAB-MS spectrophotometer(VG 70-VSEQ), Source(ionized by 35 keV Cs⁺ ion beam), Matrix(glycerol, England), NMR Solvents(CD₃OD, internal standard, TMS), L-Ascorbic acid(Sigma Chemical Co., U.S.A.), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(Sigma Chemical Co., U.S.A.), ABTS(2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Potassium persulfate (Sigma Chemical Co., U.S.A.), Trolox(6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, 7%, Sigma Chemical Co., U.S.A.), Tecansunrise microplate reader(Switzerland), Tecan ELISA reader(Austria), Repeating Pipette(Capp Rhythm RP-50, Denmark)을 사용하여 측정하였다.

추출 및 분리

경상북도 영천 목통 3 kg을 분쇄기를 사용하여 분쇄하고 70% methanol 10 l를 넣고 24시간 추출하여 여과하였으며 이를 4회 반복 후 감압농축 하여 총 382 g의 추출물을 얻었다. 수층을 분취한 후 chloroform을 이용하여 진탕 반복추출을 하고, 분획하여 chloroform층 분획 13 g과 water 분획 368 g, precipitate 1 g을 얻었다. Diaion HP-20을 이용하여 open column chromatography를 실시하여 water 분획 208 g, 30% methanol 분획 29 g, 60% methanol 분획 91 g, methanol 분획 29 g을 각각 얻었다. 그 중 30% methanol 분획물을 대상으로 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid, syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside를 분리하였다. 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside는 ODS(이동상 20% methanol), silica gel(이동상 chloroform : methanol=4 : 1)를 이용해 분리하였다. 5-O-caffeoylquinic acid는 ODS(이동상 20% methanol), sephadex LH-20(이동상 20% methanol) sephadex LH-20(이동상 10% methanol)을 이용해 분리하였고, syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside는 ODS(이동상 20% methanol), sephadex LH-20(이동상 30% methanol), ODS(이동상 20% methanol)을 이용하여 분리하였다.

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside (C₁₄H₂₀O₈)

흰색 무정형

Positive FAB-MS: *m/z* 339[M+H]⁺

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 2.78(2H, m, H-7), 3.18(1H, dd, *J*=7.8, 11 Hz, H-4'), 3.31~3.34(2H, overlapped, H-2', H-3'), 3.68(1H, m, H-8), 3.65~3.71(2H, overlapped, H-5', H-6'), 3.86(1H, dd, *J*=1.8, 12 Hz, H-6'), 4.02(1H, m, H-8), 4.28(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 6.55(1H, dd, *J*=1.8, 7.8 Hz, H-6), 6.66(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-5), 6.69(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2).

¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD): δ 36.5(C-7), 62.7(C-6'), 71.5(C-4'), 72.0(C-8), 75.0(C-2'), 77.9(C-5'), 78.0(C-3'), 104.3(C-1'), 116.2(C-2), 117.0(C-5), 121.2(C-6), 131.4(C-1), 114.6(C-4), 146.0(C-3).

5-O-caffeoylquinicacid(C₁₆H₁₈O₉)

흰색의 분말

Positive FAB-MS: *m/z* 339[M+H]⁺

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 2.06~2.21(4H, m, H-2, H-6), 3.73(1H, dd, *J*=3, 8.4 Hz, H-4), 4.17(1H, dt, *J*=3, 5.1 Hz, H-3), 5.33(1H, ddd, *J*=4.2, 9, 9 Hz, H-5), 6.26(1H, d, *J*=16.2 Hz, H-8'), 6.78(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.95(1H, dd, *J*=1.8, 8.1 Hz, H-6'), 7.05(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 7.55(1H, d, *J*=

15.6 Hz, H-7).

¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD): δ 36.7(C-2), 37.3(C-6), 69.8(C-3), 70.5(C-5), 72.0(C-4), 74.7(C-1), 113.7(C-2), 113.8(C-8), 115.0(C-5'), 121.5(C-6'), 126.3(C-1'), 145.3(C-7'), 145.6(C-3'), 148.1(C-4'), 167.2(C-9), 175.5(COOH).

Syringoylglycerol-2-O-β-D-glucopyranoside(C₁₇H₂₆O₁₁)

미황색의 분말

Positive FAB-MS: m/z 339[M+H]⁺

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 3.22~3.34(4H, m, H-2', H-3', H-4', H-5'), 3.39(1H, dd, J=5.7, 11.7 Hz, H-9a), 3.55(1H, dd, J=3.6, 12 Hz, H-9b), 3.64(1H, dd, J=5.7, 12 Hz, H-6'), 3.82(1H, m, H-8), 3.84(3H, s, 3,5-OCH₃), 4.36(1H, d, J=7.8 Hz, H-1'), 4.68(1H, d, J=6.6 Hz, H-7), 6.69(1H, s, H-6).

¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD): δ 58.0(3,5-OCH₃), 64.2(C-6'), 64.8(C-9), 73.0(C-4'), 76.7(C-7), 77.1(C-2'), 79.5(C-5'), 79.7(C-3'), 88.0(C-8), 106.8(C-1'), 106.9(C-2,6), 134.4(C-1), 137.8(C-4), 150.8(C-3,5).

항산화 활성 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 free radical scavenging activity 측정 - DPPH assay는 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 흡광을 가지는 진한 자색 화합물로 free radical scavenging activity가 있는 물질의 항산화 활성을 측정할 수 있는 가장 쉬운 방법이다. 본 실험에서는 시료를 각 농도별로 조제한 용액 20 μl(control: 95.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% ethanol) 180 μl을 첨가하여, tecan austriagmbh(의료용 면역흡광 측정기, sunrise)로 10초 진탕하여 37°C에서 20분 동안 incubation시킨 후 tecan austria gmbh(ELISA reader, BIO-RAD, US)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다.^{14,15)} 양성 대조군으로서 L-ascorbic acid를 농도별로 조제하여 본 실험에 사용하였다. 각 시료의 항산화활성을 측정하기 위하여 산화를 억제할 정도를 free radical scavenging activity로서 표기하였고, 각 시료의 IC₅₀을 비교 검토하였다.

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 이용한 free radical scavenging activity 측정 - 본 연구에서 사용한 ABTS assay는 Arnao¹⁶⁾의 방법에 의거하여 ABTS가 potassium sulfate와 반응하여 생기는 ABTS. + 양이온에 radical scavenging activity를 이용하여 시료의 항산화 활성을 평가하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 12시간 차광 방치하였고. 본 실험에 사용하기 위하여 stock solution을 methanol로 희석하여 UV/Vis spectrophotometer 732 nm에서 흡광도가 1.2 이하가 되도록 맞춘 후 농도별 시료의 stock solution 50 μl와 희석 된 ABTS⁺ 양이온 radical solution

950 μl을 혼합하여 실온에서 20분 차광 방치 하였다. 최종적으로 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 732 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로서는 trolox를 이용하였고, 시료의 free radical scavenging activity를 비교 분석하였다. 각 시료의 IC₅₀을 비교 검토하였다.

HPLC 분석을 위한 전처리 및 분석조건

국내에 현재 유통되거나 자생하는 목통을 각 지역별로 30품목을 수집하였다(Table D). 수집한 샘플을 분쇄기로 균질하게 분쇄하여 50호 체로 친후 0.5 g을 정밀히 달아 70% methanol 50 ml을 가하였다. 60분간 초음파 추출한 후 원심분리기를 이용하여 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 여과한 여액을 membrane filter(0.45 μm)에 통과시켜 이중 10 μl를 HPLC system에 주입하여 분석하였다. 표준액으로는 목통 추출물에서 분리한 3종의 화합물 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinicacid, syringoylglycerol-2-O-β-D-glucoside을 사용하였으며, 각각 1.0 mg씩 정밀하게 취하여 메탄올 1 ml을 가한 후, 1 mg/ml의 standard stock solution을 만들어 4°C에 보관하고 단계별로 희석하여 사용하였다. 각각의 standard stock

Table I - Sample list for experiments the stems of *Akebia quinata*

| No. | Botanocal name | Contry | Obtained region |
|-----|-----------------------|--------|----------------------|
| 1 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeongchun |
| 2 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Chungbuk, Jecheon |
| 3 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Muju |
| 4 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongnam, Jinju |
| 5 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 6 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonnam, Damyang |
| 7 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Muju |
| 8 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Jinan |
| 9 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeongchun |
| 10 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Muju |
| 11 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 12 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 13 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonuk, Sunchang |
| 14 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Chungbuk, Jecheon |
| 15 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeongchun |
| 16 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Imsil |
| 17 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 18 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 19 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 20 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 21 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Chungbuk, Jecheon |
| 22 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeong |
| 23 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonbuk, Imsil |
| 24 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | - |
| 25 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeongchun |
| 26 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongnam, Sancheong |
| 27 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Chungbuk, Jecheon |
| 28 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongnam, Sancheong |
| 29 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Gyeongbuk, Yeongchun |
| 30 | <i>Akebia quinata</i> | Korea | Jeonuk, Sunchang |

Table II – Analysis condition of *A. quinata* extract

| | | | |
|------------------|--------------------------------------------------------|----|----|
| Column | Kromasil 100-5 C18 (4.6×250 mm, 5 μm particle size) | | |
| Mobile phase | A: 0.1% phosphoric acid in water B: Acetonitrile | | |
| Gradient profile | Time (min) | A | B |
| | 0 | 98 | 2 |
| | 10 | 90 | 10 |
| 25 | 80 | 20 | |
| Wavelength | 210 nm | | |
| Flow rate | 1.0 ml/min | | |
| Injection volume | 10 μl | | |

solution은 모두 메탄올로 희석하여 200, 100, 50, 25 μg/ml의 농도가 되도록 조제하였다. 각 표준물질 혼합용액은 연속희석법을 이용하여 희석하였으며, 준비된 각 표준액을 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다. 이를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선의 직선성은 상관계수(R²)를 구하여 확인하였다.

고정상은 Kromasil 100-5C18(4.6×250 mm, 5 μm particle size) 컬럼을 사용하였으며, 이동상은 0.1% phosphoric acid와 Acetonitrile을 사용하였다. 용리 조건은 이동상 조성을 시간에 따라 변화시키는 기울기 용리를 사용하였다(Table II). 검출과장은 210 nm를 선택하여 목통 추출물 및 표준품의 패턴 및 함량 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

목통(*Akebiae caulis*)를 70% methanol로 추출하여 chloroform으로 탈지한 후 precipitate(PPT)층과 water층을 얻었다. water층은 Diaion HP-20로 open column chromatography를 실시하여 water 분획, 30% methanol 분획, 60% methanol 분획, 100% methanol을 얻었다. DPPH, ABTS free radical scavenging을 통하여 각 분획물 중 가장 높은 항산화활성을 나타낸 30% methanol 분획을 ODS, sephadex LH-20, silica gel을 이용한 open column chromatography를 통하여 총 3개의 화합물을 분리하였다. 얻어진 화합물은 물리 화학적 성상과 문헌조사 및 각종 기기분석(¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass Spectrometer)을 통하여 2-(3,4-dihydroxy phenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid, syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside로 최종 구조 동정하였다(Fig. 1).

DPPH를 이용한 free radical scavenging activity 측정

목통의 70% methanol 추출물과 각 분획에 대하여 4가지의 농

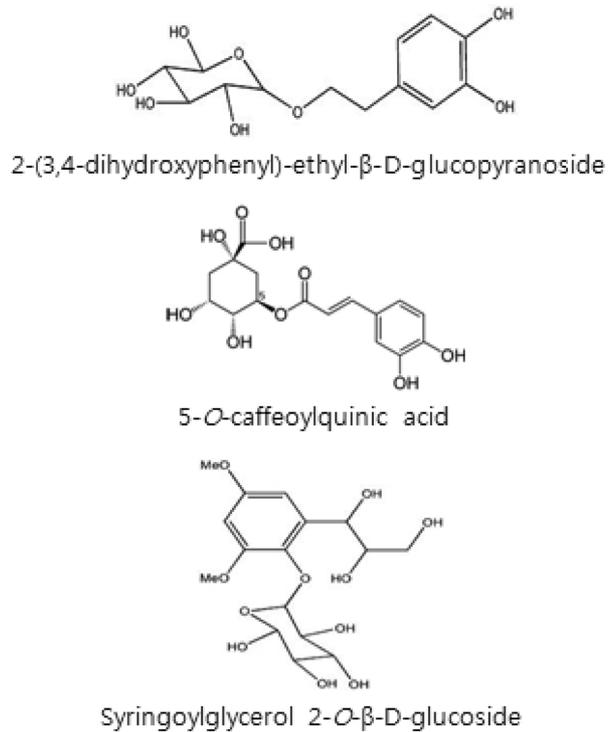


Fig. 1 – Structure of isolated compounds.

도(200, 100, 50, 25 μg/ml)로 조제하여 실험한 결과, 목통의 추출, 분획물에 대한 최고농도 200 μg/ml 농도에서 30% methanol 분획층이 81.9±0.1%로서 가장 큰 항산화 활성을 나타내었고, 60% methanol 분획>water 분획>extract>100% methanol 순으로 DPPH free radical scavenging activity(%)가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, IC₅₀(μg/ml)을 측정값 또한 양성 대조군인 ascorbic acid의 IC₅₀(13.9±0.1 μg/ml)과 비교하였을 때 각 분획물 중 30% methanol 분획(37.4±2.1 μg/ml)이 상대적으로 우수한 DPPH free radicals scavenging activity를 가지는 것을 확인하였다.

목통의 높은 항산화 활성을 가지는 30% methanol 분획에서 분리한 3종의 화합물에 대하여 농도별 시료를 조제한 후 최종농도 200, 100, 50, 25 μM로 하여 DPPH free radical scavenging activity를 측정된 결과 최고 농도 200 μM에서 양성 대조군인 ascorbic acid의 측정치(89.7±0.1%)와 비교적 흡사한 정도를 나타내었고, IC₅₀(μM)을 측정된 결과 5-O-caffeoylquinic acid>2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranosid>syringoylglycerol 2-O-β-D-glucoside 순으로 확인하였다(Table III).

ABTS를 이용한 free radical scavenging activity 측정

목통의 70% methanol 추출물과 분획에 대하여 4가지 농도(100, 50, 25, 12.5 μg/ml)로 조제하여 실험한 결과, 목통의 추출물 및 각 분획물의 최고농도 100 μg/ml 농도에서 30% methanol

Table III – DPPH free radical scavenging activity IC_{50} value of compounds from *A. quinata*, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside (AQ-I), 5-*O*-caffeoylquinic acid (AQ-II), syringoylglycerol 2-*O*- β -D-glucoside (AQ-III)

| Compound | IC_{50} (μ g/ml) |
|-----------------|-------------------------|
| AQ-I | 87.2 \pm 0.8 |
| AQ-II | 68.0 \pm 0.3 |
| AQ-III | 150.4 \pm 0.7 |
| L-ascrobic acid | 79.1 \pm 0.2 |

Each represent the mean \pm S.D (n=3).

Table IV – ABTS free radical scavenging activity IC_{50} value of compounds from *A. quinata*, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside (AQ-I), 5-*O*-caffeoylquinic acid (AQ-II), syringoylglycerol 2-*O*- β -D-glucoside (AQ-III)

| Compound | IC_{50} (μ g/ml) |
|----------|-------------------------|
| AQ-I | 57.1 \pm 0.5 |
| AQ-II | 50.1 \pm 0.1 |
| AQ-III | 38.4 \pm 0.2 |
| Trolox | 49.9 \pm 0.1 |

Each represent the mean \pm S.D (n=3).

분획층이 98.9 \pm 0.1%로서 가장 높은 항산화활성을 나타내었고, 60% methanol 분획>extract>water 분획>100% methanol 분획 순으로 ABTS free radical scavenging activity(%)가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, IC_{50} (μ g/ml)을 측정값 또한 양성 대조군인 trolox(99.0 \pm 0.1%)과 비교 하였을 때 30% methanol 분획층이 98.9 \pm 0.1%로서 높은 항산화활성을 나타내는 것을 확인 하였다.

목통의 높은 항산화활성을 나타낸 30% methanol 분획에서 분리한 3종의 화합물에 대하여 농도별 시료를 조제할 후 최종농도 100, 50, 25, 12.5 μ M로 하여 ABTS free radical scavenging activity를 측정된 결과 최고 농도 100 μ M에서 이 86.0 \pm 0.3%로서 양성 대조군인 trolox 의 측정치(99.7 \pm 0.1%)와 비교적 흡사

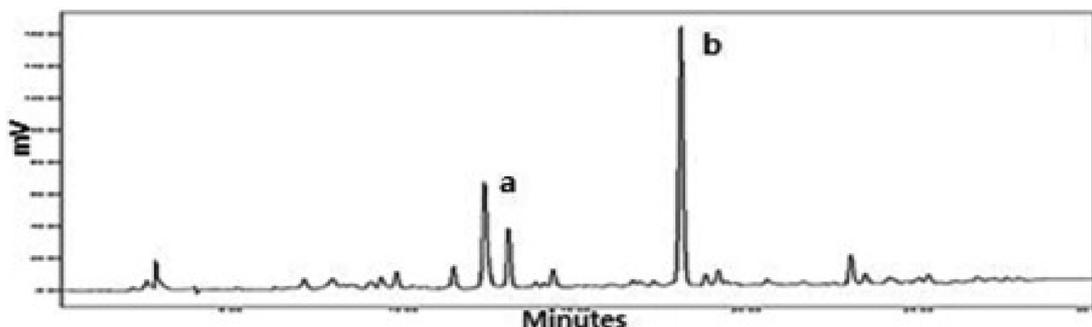


Fig. 2 – A representative chromatogram of *Akebiae caulis* extract. (a) 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside, (b) 5-*O*-caffeoylquinic acid.

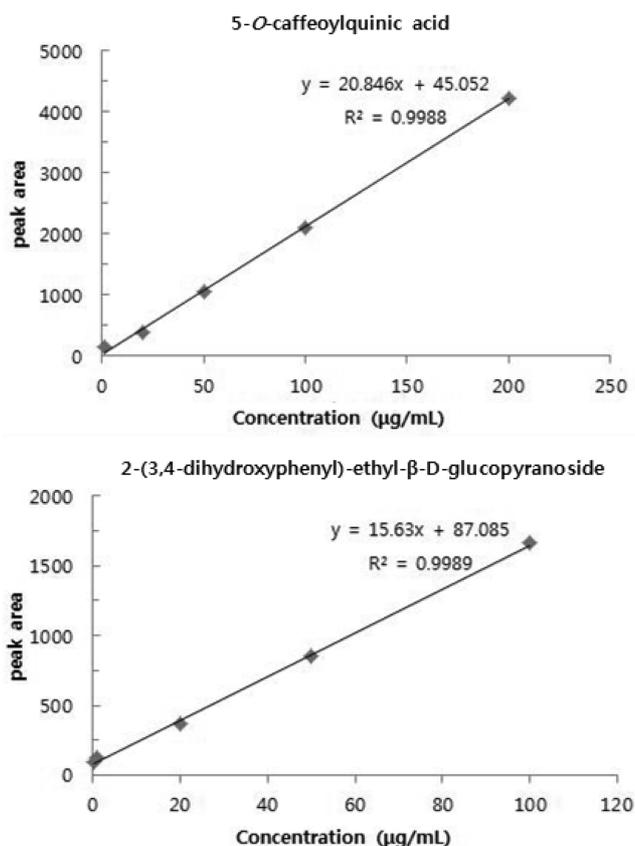


Fig. 3 – Calibration curves of standards.

한 정도를 나타내었고, IC_{50} (μ M)을 측정된 결과 syringoylglycerol 2-*O*- β -D-glucoside>5-*O*-caffeoylquinic acid>2-(3,4-dihydroxy phenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside 순으로 확인하였다(Table IV).

HPLC를 이용한 함량분석

충북, 전북, 경남, 경북 지역을 포함하여 목통시료 총 30개 추출물의 함량분석을 실시하였다(Fig. 2). 2가지 주요 페놀성 성분에 대하여 2-(3,4-dihydroxy phenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside

Table V – Contents of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside (AQ-I), 5-O-caffeoylquinic acid (AQ-II) in *A. quinata*

| Smample | Contents (w/w, %) | | | | |
|---------|-------------------|------|--------|------|--------|
| | AQ-I | | AQ-II | | Total |
| | Mean | RSD | Mean | RSD | Mean |
| 1 | 0.0316 | 3.99 | 0.0681 | 0.82 | 0.0997 |
| 2 | 0.0325 | 1.16 | 0.0859 | 0.49 | 0.1184 |
| 3 | 0.0180 | 0.55 | 0.0637 | 0.18 | 0.0817 |
| 4 | 0.0107 | 1.11 | 0.1061 | 1.62 | 0.1168 |
| 5 | 0.0220 | 2.76 | 0.0528 | 1.42 | 0.0748 |
| 6 | 0.0179 | 1.92 | 0.0530 | 0.47 | 0.0709 |
| 7 | 0.0149 | 4.17 | 0.0533 | 0.34 | 0.0682 |
| 8 | 0.0241 | 3.45 | 0.0589 | 2.34 | 0.0830 |
| 9 | 0.0247 | 0.56 | 0.0647 | 1.50 | 0.0894 |
| 10 | 0.0136 | 1.89 | 0.0731 | 0.06 | 0.0867 |
| 11 | 0.0060 | 0.39 | 0.0426 | 0.54 | 0.0486 |
| 12 | 0.0275 | 0.26 | 0.0611 | 1.06 | 0.0886 |
| 13 | 0.0170 | 2.05 | 0.0571 | 1.28 | 0.0741 |
| 14 | 0.0252 | 1.49 | 0.0844 | 0.26 | 0.1096 |
| 15 | 0.0293 | 2.24 | 0.0684 | 0.63 | 0.0977 |
| 16 | 0.0273 | 1.12 | 0.0593 | 0.32 | 0.0866 |
| 17 | 0.0349 | 1.13 | 0.0670 | 0.81 | 0.1019 |
| 18 | 0.0176 | 1.85 | 0.0632 | 2.73 | 0.0808 |
| 19 | 0.0176 | 2.46 | 0.0696 | 1.61 | 0.0872 |
| 20 | 0.0107 | 3.72 | 0.0655 | 1.96 | 0.0762 |
| 21 | 0.0242 | 1.95 | 0.0571 | 0.92 | 0.0813 |
| 22 | 0.0389 | 1.36 | 0.0529 | 1.12 | 0.0918 |
| 23 | 0.0074 | 4.75 | 0.0444 | 0.14 | 0.0518 |
| 24 | 0.0061 | 9.02 | 0.0207 | 0.94 | 0.0268 |
| 25 | 0.0117 | 6.74 | 0.0405 | 4.19 | 0.0522 |
| 26 | 0.0037 | 4.55 | 0.0114 | 6.75 | 0.0151 |
| 27 | 0.0105 | 2.20 | 0.0278 | 3.47 | 0.0383 |
| 28 | 0.0122 | 1.24 | 0.0427 | 1.60 | 0.0549 |
| 29 | 0.0044 | 2.68 | 0.0416 | 4.51 | 0.0460 |
| 30 | 0.0187 | 2.83 | 0.0560 | 2.58 | 0.0747 |
| Mean | 0.0187 | 2.52 | 0.0571 | 1.56 | 0.0758 |

Each represent the mean±S.D (n=3).

은 0.1~100 µg/ml, 5-O-caffeoylquinic acid는 2~200 µg/ml의 농도 범위에서 검량선을 작성한 결과, 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수(R²)가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내었다 (Fig. 3). 획득한 크로마토그램들로부터 각 성분들의 피크 면적을 구하고, 이를 미리 작성한 검량선에 대입하여 각 성분의 함량을 구하였다. 총 30품목의 목통 시료의 크로마토그램을 비교해본 결과 2가지 페놀성 성분이 지역별로 확연한 차이를 보이지는 않았으나, 충북지역 시료(2, 14, 21, 27)는 5-O-caffeoylquinic acid의 함량(w/w, %)이 각각 0.0859±0.49, 0.0844±0.26, 0.0571±0.92, 0.0278±3.47으로 높은 반면 경남지역 시료(4, 26, 28)는 2-(3,4-dihydroxy phenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside의 함량(w/w, %)이 0.0107±1.11, 0.0037±4.55, 0.0122±1.24로 낮았으며, 진주에서 채집한 시료 4번은 5-O-caffeoylquinic acid의 함량(w/w, %)이 0.1061±1.62로 다소 높은 것으로 나타났다(Table V).

결론

본 연구에서는 saponin의 활성 및 성분 구조규명에 관한 연구에만 국한되어 있는 목통에 대하여 항산화활성 및 phenolic 성분 분리를 실시 각종기기분석을 통하여 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside, 5-O-caffeoylquinic acid, syringoyl-glycerol 2-O-β-D-glucoside으로 동정하였다.

분리된 3종의 phenolic 성분을 대상으로 antioxidant assay인 DPPH, ABTS를 실시하였고, 양성 대조약물과 비교한 결과 3종의 화합물 모두 우수한 항산화활성을 보였으므로 이는 목통의 약효에 영향을 미칠 가능성이 있다고 판단하였다.

또한 HPLC-UV 분석법 개발을 통하여 25분이라는 빠른 시간 내에 2가지 페놀성 성분을 분석할 수 있도록 하였으며 그 결과 목통의 함량 및 대표 성분에 대한 fingerprint를 제시하였다. 확립된 HPLC-UV 분석법으로 현재 국내에서 유통되고 있는 30품목의 목통을 분석하여 2가지 페놀성 성분의 함량 분석을 수행한 결과, 지역별로 확연한 차이는 보이지 않았으나 충북지역 시료(2, 14, 21, 27)는 5-O-caffeoylquinic acid의 함량이 높은 것으로 나타났으며 경남지역 시료(4, 26, 28)는 2-(3,4-dihydroxy phenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside의 함량이 낮은 것으로 나타났다. 최종적으로 목통의 함량기준을 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-β-D-glucopyranoside은 0.009% 이상, 5-O-caffeoylquinic acid는 0.036% 이상으로 제안하였고, 이를 통해 목통의 품질관리를 위한 객관적이고 과학적인 근거를 제시하여 향후 국내에서 유통되는 목통의 품질을 평가하는 방향을 제시하는데 큰 의의를 가질 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(13172천원물407)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 1) 한국약용식물학연구회, 종합약용식물학, 학창사 (2006).
- 2) 생약학교재편찬위원회, 생약학, 동명사 (2008).
- 3) 식품의약품안전처, 대한약전외한약(생약)규격집 제10개정 (2011).
- 4) Gao, H. M. and Wang, Z. M. : Determination of triterpenoid saponins in *Caulis akebiae* by RP-HPLC. *Chin. Pharm. J.* **42**, 20 (2007).
- 5) Gao, H. M., Wang, Z. M., Qu, L., Fu, X. T. and Li, L. : Determination of calceolarioside B in *Caulis Akebiae* by RP-HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **32**, 476 (2007).
- 6) Liu, G. Y., Ma, S. C., Zheng, J., Yu, Z. X. and Lin, R. C. : Determination of components quinic acid and akeboside in

- commonly contained in mutong of Akebia. *Chin. J. Anal. Chem.* **36**, 683 (2008).
- 7) 박찬성 : 한약재 추출물의 항산화 작용 및 아질산염 소거작용, 한국식품저장유통학회 **12**, 631 (2006).
 - 8) 황현익, 이인순, 김지은, 문혜연 : 으름덩굴의 항균 성분 분리 및 함량분석. 한국생물공학회 **12**, 253 (2002).
 - 9) Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P. T., Shanmugam, K., Munch, G., Wu, M. J. and Satyanarayanan, M. : Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medical plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complement. Altern. Med.* **12**, 173 (2012).
 - 10) 장귀영, 김현영, 이상훈, 강유리, 황인국, 우관식, 강태수, 이준수, 정현상 : 열처리와 추출방법에 따른 몇 가지 약초의 항산화 활성. 한국식품영양과학회지 **41**, 914 (2012).
 - 11) 권도희, 최도영 : 목통약침자극이 통풍유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한침구학회지 **14**, 173 (1997).
 - 12) 조은, 강재희, 이현 : 음곡에 시술한 목통약침이 흰쥐의 급성신장염에 미치는 영향. 대한침구학회지 **29**, 41 (2012).
 - 13) 한숙희, 김예원, 현창백 : 개에서 목통 추출물의 이노효과 평가. 한국임상수의학회 **29**, 203 (2012).
 - 14) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
 - 15) Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. T. and Nishioka, I. : Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 213 (1998).
 - 16) Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. : The hydrophilic and lipophilic contribution of total antioxidant activity. *Food Chem.* **73**, 239 (2001).