

녹차와 목단피의 항산화 성분

부용출 · 전체옥
태평양 중앙 연구소

초록 : 산화성 프리 라디칼과 반응함으로써 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 얻을 목적으로 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)을 프리 라디칼 모델로 사용하여 여러 식물 생약의 에탄올 추출물을 검색하고, 그 결과로 선별된 녹차와 목단피의 추출물에 대해서는 용매에 의한 분획과 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 각각의 유효 성분을 분리, 규명하고 그 항산화 효과를 평가하였다. 녹차의 경우 그 유효 성분이(-)-epigallocatechin(100 μ M DPPH의 50%를 환원시키는데 필요한 농도 즉, SC_{50} =3.2 μ g/ml)과 (-)-epigallocatechin gallate(SC_{50} =2.6 μ g/ml)로 나타났으며, 목단피의 경우는 gallic acid(SC_{50} =2.0 μ g/ml)가 유효 성분으로 동정되었다. 이들 화합물들은 Fe^{3+} -ADP/ascorbate계에 의한 microsome 분획에서의 지질 과산화 반응을 잘 억제하였으며, 그 항산화력은 (-)-epigallocatechin(1mg protein/ml의 microsome 분획에 대하여 지질 과산화를 50% 억제하는데 필요한 농도 즉, IC_{50} =0.2 μ g/ml)>(-)-epigallocatechin gallate(IC_{50} =2.5 μ g/ml) 순으로 나타났다. 본 연구의 결과로부터 강력한 항산화 물질들을 함유한 녹차와 목단피 등의 식물 생약이 각종 프리 라디칼 반응에 의한 생체 손상을 막아줄 수 있을 것으로 기대되었다(1993년 7월 22일 접수, 1993년 8월 16일 수리).

서 론

활성 산소(O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$ 및 1O_2)는 반응성이 매우 강하여 이들에 의하여 야기되는 프리 라디칼 반응은 지질을 포함한 세포의 주요 거대 분자에 파괴 효과를 나타낸다.¹⁾ 이들은 정상적인 대사과정,²⁾ 광증감 반응,³⁾ 약물 대사 과정⁴⁾ 및 기타 세포 대사의 이상을 초래하는 여러 요인에⁵⁾ 의해 그 생성이 증가하며 따라서 생체는 이들에 의하여 일어나는 프리 라디칼 반응의 유해 효과에 항상 노출되어 있다고 볼 수 있다. 특히 세포의 연령 증가에 따라 이들의 유해 효과가 점진적으로 축적되어 발암, 동맥 경화등 연령 증가와 관련된 질환은 물론 전 반적인 세포의 노화를 야기하는 것으로 제시되고 있다.⁶⁾ 따라서 반응성 산소 대사물에 의한 생체내 프리 라디칼 반응을 억제시키는 항산화 물질은 노화 관련 질환을 예방하는 일종의 약물이 될수 있을 것으로 기대되고 있다.

본 연구에서는 산화성 프리 라디칼과 반응함으로써 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 얻을 목적으로 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)을 프리 라디칼 모델로

사용하여 여러 식물 생약의 에탄올에 의한 추출물을 검색하고 그 과정에서 선별된 녹차 및 목단피의 추출물에 대해서는 유효 성분을 분리, 동정하였다. 그리고 이들 성분들의 항산화 효과를 흰쥐 간 microsome분획을 이용하여 시험관내 실험으로 평가하였다.

재료 및 방법

식물 생약 추출물 및 시약

녹차(Theae Folium)와 목단피(Moutan Cortex)를 비롯한 식물 생약 100g에 대하여 5~10 배량의 95% ethanol을 가하고 3시간 가열 추출하고 여과하였다. 그 여액을 감압 증발시켜 추출물을 얻었다. 특별히 언급하지 않은 경우 시판 일급 시약을 그대로 사용하였다.

프리 라디칼 소거 활성의 측정

프리 라디칼 소거 작용은 Fujita 등의 방법을 변형하여 측정하였다.⁷⁾ 1~500 g/ml의 시료와 100 μ M의 DPPH (Sigma)를 함유한 에탄올 용액을 37°C에서 30분간 반응시키고 516 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원

였다(Fig. 6). 그 용출액을 120 ml/단위로 분획하고 프리라디칼 소거력이 강력하게 나타난 5~7번 분획을 감압 증발시키고 물에서 재결정하여 gallic acid 0.3 g을 얻었다.

기기 분석

녹는점의 측정에는 Thomas Hoover capillary melting point apparatus를 이용하였고 FAB-MS 스펙트라는 Kratos Concept 1S로 측정하였다(측정조건, fast atom = Ar, energy = 6KeV, gun current = 0.03 mA, matrix = glycerol). ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트라는 tetramethylsilane을 내부 표준 물질로하여 Varian Unity 300로 측정하였다. UV, IR 스펙트럼의 측정에는 각각 CECIL CE-5500과 BIO-RAD FTS-40을 이용하였다.

흰쥐 간 microsome 분획의 지질과산화의 측정

Fe³⁺-ADP/ascorbate계에 의한 흰쥐 간 microsome 분획에서의 지질 과산화를 thiobarbituric acid(TBA)방법으로 측정하였다.⁸⁾

Male Sprague-Dawley rat(about 190 g)를 경부탈골시켜 치사시킨 후 즉시 간을 절제하여 간조직의 10배의 ice cold 150 mM KCl, 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4)를 가하고 Biohomogenizer(ESSE)를 사용하여 5초씩 3회 반복 균질화하였다. 그 조직 균질물을 12,000×g에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻고 이를 다시 120,000×g에서 60분간 초원심 분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 동일 조건에서 다시 한번 세척하고 microsome 분획으로 사용하였다.

시료 유무조건에서 1 mg protein/ml microsome, 80

μM-400 μM FeCl₃-ADP, 1.0 mM ascorbic acid, 150 mM KCl, 50 mM Tris-Cl(pH 7.4) 함유한 반응액 2 ml를 37°C에서 60분간 incubation한 후 3M trichloroacetic acid-2.5 N HCl 0.5 ml와 0.67% TBA(Sigma)수용액 1.0 ml를 각각 가하고 마개를 하여 100°C에서 10분간 가열 반응시켰다. 이후 실온으로 식히고 동 부피의 부탄올로 색소를 추출하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

많은 실험적 결과들에 의해 노화의 과정에서 지질 과산화 반응이 관여한다고 주장되어 왔다. 흰쥐를 대상으로한 연구에서 연령에 따라 혈장중의 TBA 반응물은 물론 동물의 호흡중 ethane, ethylene기체 발생량이 많아지고,⁹⁾ 또 뇌조직중의 TBA 반응물도 증가하였다고 보고된바 있다.¹⁰⁾ 그 외에 생쥐를 대상으로한 실험에서 연령에 따라 testis 추출물 중에 형광성 물질의 함량이 높아지고 α-tocopherol 등 항산화제 섭취에 의하여 그 증가가 억제되었다고 보고되었다.¹¹⁾ 그리고 Stege, 등은 항산화제가 결여된 음식을 섭취한 쥐의 간세포중 TBA 반응물을 조사하여, 지질 과산화의 정도가 보통의 음식을 섭취한 쥐에 비해 매우 높음을 보고하였다.¹²⁾ 이들은 노화의 과정과 지질과산화 반응이 밀접한 관련이 있음을 보여주고 있다 하겠다. 이상의 보고들에 비추어 불태 생체내 지질과산화를 막아 줄수 있는 물질에 대한 탐색은 흥미 있는 연구 과제가 아닐 수 없다.

지질 과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 프리라디칼과 반응함으로써 항산화제로 작용하는 물질은 프리라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 hydra-

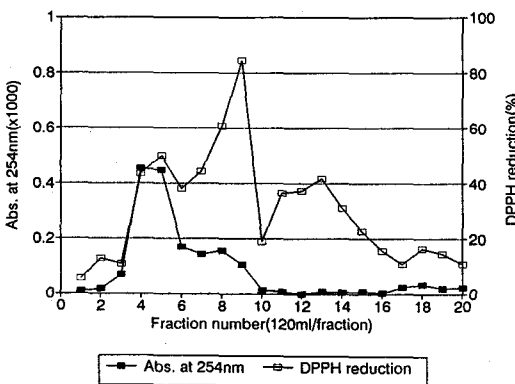


Fig. 5. A Sephadex LH-20 column chromatogram of Moutan Cortex extract [eluent, dichloromethane /methanol (1 : 1)], as compared with the activity profile for DPPH reduction.

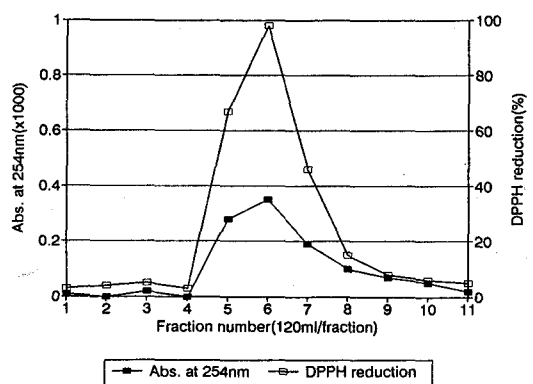


Fig. 6. A Lichrosorb RP-18 column chromatogram of active fraction (8~9) in Fig. 5. The eluent was 1% acetic acid in water. The activity profile for DPPH reduction is also shown.

zine 형태로 환원시키는 능력을 조사함으로써 검색할 수 있다.¹³⁾ 20종의 식물 생약의 에탄올에 의한 추출물의 이프리 라디칼에 대한 소거 작용을 검색한 결과, 녹차(100 µM DPPH의 50%를 환원시키는데 필요한 시료의 농도 즉, SC₅₀=11.5 µg/ml)와 목단피의 추출물(SC₅₀=16.7 µg/ml)이 높은 활성을 보임을 알 수 있었다(Table 1).

녹차가 동서양을 막론하고 영양 건강 음료로 애용되어 왔음은 주지의 사실이다.¹⁴⁾ 녹차의 에탄올 추출물을 Fig. 1에 도시한 방법에 따라 수용성 분획과 불용성 분획으로 나누고, 수용성 분획은 다시 물과 노르말 부탄올을 이용하여 분배함으로써 총 3분획으로 대별하여 프리 라디칼 소거력을 측정하였다. 부탄올 분획이 가장 높은 활성을 보였으며 이 분획에 대해서는 Sephadex LH-20 컬럼(Fig. 2), Lichrosorb RP-18 컬럼 크로마토그래피(Fig. 3)를 순차적으로 실시하여 유효 성분 2종을 분리하였다. 이 두 물질은 HPLC 분석을 통해 각각 (-)-epigallocatechin(녹느점, 215~216°C, decomposition)과 (-)-epigallocatechin gallate(녹느점, 207~208°C, decompo-

sition)로 동정되었다. 이들의 IR스펙트라는 각각의 순품의 그것들과 잘 일치하였다. 이들 물질들의 지질 자동산화에 대한 항산화 작용은 이미 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 한편 목단피는 모란과(Paeoniaceae) 식물 생약으로 동양에서 예로부터 진정, 소염성 정혈의 목적으로 이용되어 왔다.¹⁶⁾ 이 생약의 경우도 녹차와 같은 방법으로 프리 라디칼 소거력이 높은 부탄올 분획을 얻고(Fig. 4), 이에 대해 Sephadex LH-20 컬럼(Fig. 5), Lichrosorb RP-18 컬럼 크로마토그래피(Fig. 6)를 순차적으로 실시하여 그 유효

Table 1. DPPH free radical scavenging activity of the ethanolic extract from various plant drugs.

| plant drug | SC ₅₀ (µg/ml) |
|------------------------------|--------------------------|
| Theae Folium(녹차) | 11.5 |
| Moutan Cortex(목단피) | 16.7 |
| Sophorae Flos(괴화) | 23.3 |
| Scutellariae Radix(황금) | 58.4 |
| Anisi Stellati Fructus(대회향) | 109 |
| Puerariae Radix(갈근) | 123 |
| Glycyrrhiza Radix(감초) | 148 |
| Ligustri Fructus(여정실) | 213 |
| Cnidii Rhizoma(천궁) | 301 |
| Asiasari Radix(세신) | 316 |
| Alpiniae Fructus(익지인) | 316 |
| Mori Radicis Cortex(상백피) | 346 |
| Plantaginis Semen(차전자) | 402 |
| Achyranthis Radix(우슬) | >500 |
| Ponciri Fructus(지실) | >500 |
| Astragali Radix(황기) | >500 |
| Ginseng Radix(인삼) | >500 |
| Lycii Fructus(구기자) | >500 |
| Platycodi Radix(길경) | >500 |
| Angelicae Gigantis Radix(당귀) | >500 |

The reaction mixtures containing the extract and 100 µM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) were kept at 37°C for 30 min to measure the absorbance at 516 nm. SC₅₀ denotes the concentration of ethanolic extract which is required to scavenge 50% of 100 M DPPH radicals.

Table 2. DPPH free radical scavenging activity of the antioxidants from Theae Folium and Moutan Cortex.

| compound | SC ₅₀ (µg/ml) |
|------------------------------|--------------------------|
| gallic acid | 2.0 |
| (-)-epigallocatechin gallate | 2.6 |
| (-)-epigallocatechin | 3.2 |

SC₅₀ denotes the concentration of ethanolic extract which is required to scavenge 50% of 100 M DPPH radicals. See Table 1.

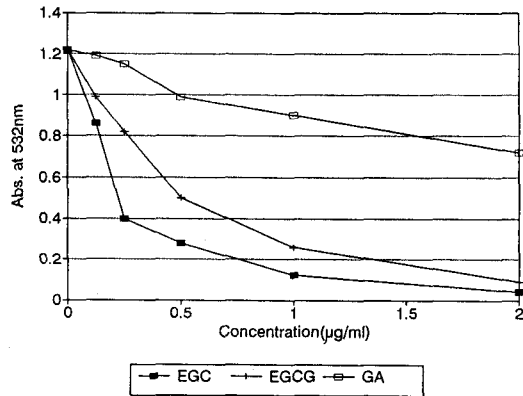


Fig. 7. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid (GA) on the Fe³⁺-ADP/ascorbate-induced lipid peroxidation in rat microsomal fraction.

The reaction mixture (2.0 ml) containing 1 mg protein/ml of microsome, 80 µM-400 µM FeCl₃-ADP, 1 mM ascorbic acid, 150 mM KCl and 50 mM Tris-Cl (pH 7.4) in the presence or the absence of each compound at various concentrations was incubated for 60 min at 37°C, admixed with 0.5 ml of 3 M trichloroacetic acid-2.5N HCl, and 1.0 ml of 0.67% thiobarbituric acid, and then heated in the boiling water bath for 10 min. After cooling, the chromogen was extracted with the same volume of n-butanol and the absorbance was measured at 532 nm.

성분을 분리하였다. 이 물질은 FAB-MS 스펙트럼에서 그 분자량이 170임을 알 수 있었다(m/z 171[M+1]⁺). 그리고 그 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼은 이 물질이 gallic acid임을 보여 주었으며 녹는점(237~240°C, decomposition)과 IR스펙트럼도 순품의 그것들과 잘 일치하였다.

녹차와 목단피에서 분리된 성분들의 DPPH 프리 라디칼 소거 활성은 gallic acid(SC₅₀=2.0 µg/ml)>(-)-epigallo catechin gallate(SC₅₀=2.6 µg/ml)>(-)-epigallocatechin(SC₅₀=3.2 g/ml)의 순이었다(Table 2). 그리고 이들 화합물들은 2 µg/ml 이하의 농도에서 흰쥐 간조직의 microsome분획에서 Fe³⁺-ADP/Ascorbate계로 유발시킨 지질 과산화물을 잘 억제하였다(Fig. 7). 산소 존재하에서 Fe³⁺와 ascorbate는 cyclic Fenton type 반응이 일어나면서 그 결과로 생긴 활성산소(hydroxyl radical ?)가 여러 산화 반응을 야기하는 것으로 보아지고 있으며¹⁷⁾ 따라서 위의 화합물들은 활성 산소를 소거함으로써 지질과산화 반응을 억제하는 것으로 사료된다. 물론 지질 과산화의 연쇄 반응에 관여하는 peroxy radical을 소거함에 의해서 항산화 작용을 보였을 수도 있다.¹⁸⁾

이들 화합물들의 지질 과산화 억제 효과는 (-)-epigallocatechin(IC₅₀=0.2 µg/ml, 지질 과산화를 50% 억제하는 농도)>(-)-epigallocatechin gallate(IC₅₀=0.4 µg/ml)>gallic acid(IC₅₀=2.5 g/ml) 순으로 높게 나타났다. DPPH 프리 라디칼 소거 활성과 지질 과산화 억제 효과가 서로 일치 하지 않고, 오히려 역비례하는 경향을 보이는 점, (-)-epigallocatechin과 gallic acid의 1 : 1 축합체인 (-)-epigallocatechin gallate가 DPPH 프리 라디칼 소거 작용과 지질 과산화 억제 작용 모두에 있어서 두 구성물의 중간 정도에 해당하는 활성을 보이는 점등이 주목할만 하였다.

본 연구의 결과로 여러 식물성 생약의 추출물 중 녹차와 목단피의 추출물이 프리 라디칼을 소거하는 작용이 강력하고 녹차의 경우는 (-)-epigallocatechin gallate와 (-)-epigallocatechin이, 목단피의 경우 gallic acid가 유효 성분임을 알 수 있었다. 아울러 이들 화합물들이 활성 산소에 의한 지질 과산화 반응에 대해 강력한 항산화 작용을 함을 알게 되었다. 강력한 항산화 성분을 함유한 녹차와 목단피가 프리 라디칼 반응에 의한 생체 손상을

막아주는 유익한 식물 생약으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L.: J. Biol. Chem., 262(17) : 8220(1987)
2. Fridovich, I.: Science, 201 : 875(1978)
3. Bodaness, R. S. and Chem, P. C.: J. Biol. Chem., 252 : 8554(1977)
4. Trush, M. A., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E.: Biochem. Pharmacol., 31 : 3335(1982)
5. Aust, S. D., Morehouse, L. A. and Thomas, C. E.: J. Free Radicals Biol. Med., 1 : 8(1985)
6. Harman, D.: In 'Free Radicals in Biology', W. A. Pryor(ed), vol. V, pp 255-275 Academic Press, New York(1982)
7. Fujita, Y., Uehara, I., Morimoto, Y., Nakashima, M., Hatano, T. and Okuda, T.: Yakugaku zasshi, 108(2) : 129(1988)
8. Bidlack, W. R. and Tappel, A. L.: Lipids, 8 : 177 (1983)
9. Sagai, M. and Ichinose, T.: Life Science, 27 : 731 (1980)
10. Yoshikawa, M. and Hirai, S.: J. Gerontology, 22 : 162(1967)
11. Tappel, A., Fletcher, B. and Deamer, D.: J. Gerontology, 28(4) : 415(1973)
12. Stege, T. E., Mischke, B. S. and Zipperer, W. C.: Experimental Gerontology, 17 : 273(1982)
13. Smith, R. C., Reeves, J. C., Dage, R. C. and Schnetler, R. A.: Biochem. Pharmacol., 36 : 1457(1987)
14. Stagg, G. V. and Millin, D. J.: J. Sci. Food Agric., 25 : 1015(1975)
15. Matsuzaki, T. and Hara, Y.: Nippon Nogeikagaku kaishi, 59 : 129(1985)
16. Yu, J., Elix, J. A. and Iskander, M. N.: Phytochemistry, 29(12) : 3859(1990)
17. Wong, S. F., Halliwell, B. and Richmond, R.: J. Inorg. Biochem., 14 : 127(1981)
18. Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P.: Phytochemistry, 25(2) : 383(1986)

Antioxidants of *Theae Folium* and *Moutan Cortex*

Yong Chool Boo and Che Ok Jeon, Pacific R & D Center, San# 1, Bora-ri, Kiheung-eup, Yongin-kun, Kyounggi-do, Korea 449-900

Abstract : Three antioxidants were isolated: (-)-epigallocatechin and (-)-epigallo catechin gallate from *Theae Folium* generally called green tea, and gallic acid from *Moutan Cortex*. They inhibited Fe^{3+} -ADP/ascorbate-induced lipid peroxidation in rat liver microsomal fraction, showing IC_{50} , the concentration of antioxidants which is required to inhibit 50% of the peroxidation for microsomal membranes at 1 mg protein/ml, to be 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml and 2.5 μ g/ml, respectively.