

복분자딸기에서 분리한 탄닌화합물의 항산화작용

김광호 · 이연아 · 김준식 · 이도익 · 최영욱 · 김하형 · 이민원[#]

중앙대학교 약학대학

(Received May 24, 2000)

Antioxidative Activity of Tannins from *Rubus coreanum*

Kwang-Ho Kim, Yeon-Ah Lee, Jun-Sik Kim, Do-Ik Lee, Young-Wook Choi,
Ha-Hyoung Kim and Min-Won Lee[#]

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

Abstract — Two ellagitannins, pedunculagin and 2,3-(S)-Hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-D-glucose and three condensed tannins, (+)-catechin, (-)-epicatechin and procyanidin B-4 which were isolated from *Rubus coreanum* were evaluated for their antioxidative effects with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and lipid peroxidation generation system mediated by addition of H₂O₂ to rat liver homogenate (TBARS). The ellagitannins, 2,3-(S)-HHDP-D-glucose and pedunculagin, showed more potent antioxidative activities by DPPH and TBARS than condensed tannins.

Keywords □ *Rubus coreanum*, antioxidative effect, tannins, DPPH, lipid peroxidation inhibition.

복분자 딸기(*Rubus coreanum*)는 우리나라 남부에서 야생하는 과일 생약으로, 민간과 한방에서 陽痿, 早泄, 遺精, 遺尿, 및 頻尿의 치료에 사용되어 왔다.¹⁻⁴⁾

이 식물의 페놀성화합물에 대하여 줄기로 부터 2종의 flavon-3-ol, 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin이 보고되고, 잎으로부터 6종의 flavonoids, ellagic acid 및 5종의 ellagitannin을 분리하여 보고한 바 있다.⁵⁻⁷⁾ 식물의 polyphenol화합물은 여러 의약학적인 효능이 알려져 있다. 특히 탄닌과 같은 화합물은 BUN치의 저하작용,⁸⁾ 항정신작용,⁹⁾ 뇌졸중 예방효과,¹⁰⁾ 항궤양,¹¹⁾ 항알레르기,¹²⁾ ACE활성억제,¹³⁻¹⁴⁾ 항암¹⁵⁻¹⁶⁾ 및 항AIDS바이러스 작용¹⁷⁻¹⁸⁾ 등이 보고되어 있으며 이들의 약효가 단순한 비특이적 저해가 아닌 구조상관적인 특이적 저해로 알려지고 있어서 여러 종류의 자원식물로부터 다양한 구조의 탄닌의 분리와 그 활성에 대한 해명이 요구된다.

본 연구에서는 본 식물의 줄기와 잎으로부터 분리한 바 있는 2개의 ellagitannin인 2,3-(S)-HHDP-D-glucose 및 pedunculagin과 3개의 condensed tannin인 (+)-catechin, (-)-epicatechin 및 procyanidin B-4의 항산화작용과 과산화물 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

화합물

본 실험에 사용한 화합물은 복분자 딸기(*Rubus coreanum*)의 줄기와 잎으로부터 분리한 바 있는 2종의 ellagitannin인 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (1) 및 pedunculagin (2)과 3개의 condensed tannin인 (+)-catechin (3), (-)-epicatechin (4) 및 procyanidin B-4 (5)⁵⁻⁷⁾를 사용하였다.

시약 및 기기

항산화효력 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-56020 (팩스) 02-822-9778

picrylhydrazyl), L-ascorbic acid, 2-thiobarbituric acid는 Sigma에서 구입하였고, 99.5% ethanol은 Merck, trichloroacetic acid는 ACROS에서 구입하여 사용하였다.

기타용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 흡광도는 Opron-3000PC UV/Vis spectrophotometer(Hanson)를 사용하여 측정하였고, 저온고속원심분리기는 Union 32R(Hamil)을 사용하였다.

항산화작용측정

래디칼 소거작용의 측정 - Hatano 등의 방법에 의하여¹⁹⁾ 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 μ l (control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액 (99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. 각 시료는 7가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 7가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC₅₀치(DPPH 래디칼 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 μ 농도)로 나타내었다.

Liver homogenate의 조제 - 흰쥐를 ether로 가볍게 마취시키고 해부하여 간문맥을 통하여 ice-cold KCl 0.15M 용액을 관류시켜 간내의 혈액을 제거하고 간을 적출하였다. 간 무게를 재고 ice-cold 0.9% NaCl로 용액을 세척한 후 신속히 간무게의 9배량의 ice-cold 0.9% NaCl을 가하여 간을 세절한 후 glass homogenizer를 이용하여 homogenization 하여 사용하였다.²⁰⁾

과산화지질억제 활성의 측정 - Thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)의 정량은 Buege와 Aust의 방법을 약간 변형한 방법을 이용하였다.²¹⁾ 반응액은 phosphate buffer(50 mM, pH 7.4) 0.8 ml에 liver homogenate 0.5 ml(단백질 15 mg과 동량), H₂O₂(30 mM), 시료의 ethanol 용액을 각 농도별로 가한 후 위의 혼합액을 cap test tube에서 20분간 incubation 시키고, stop solution으로 TBA/trichloroacetic acid(0.375% TBA, 15% TCA, 0.25N HCl)을 각 tube에 가하고 100°C에서 15분간 가열하였다. Ice-water에 10분간 냉각시킨 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 항산화활성을

log-dose inhibition curve를 작성하여 IC₅₀를 구하여 활성을 비교하였다.

실험결과 및 고찰

래디칼 소거에 미치는 영향 - Table I에 나타난 것처럼 모든 탄닌화합물이 DPPH radical에 대하여 강한 억제 활성을 나타내었다. 가장 억제 활성이 큰 것은 pedunculagin(2)으로 IC₅₀가 51.5 μ g/ml였으며, 1(65.3 μ g/ml), 4(76.1 μ g/ml), 3(93.5 μ g/ml) 및 5(93.6 μ g/ml)의 순으로 활성이 높은 것으로 나타났다. 이중 1, 2 및 4는 L-ascorbic acid(81.8 μ g/ml) 보다 높은 항산화활성을 나타내었다.

지질과산화에 대한 억제효과

H₂O₂에 의해 유도된 지질과산화에 대한 억제효과 - Table II에 나타난 것처럼 5종의 모든 탄닌화합물이 강력한 지질과산화 억제 활성을 나타내었다. 특히 ellagitannin인 pedunculagin(2)과 2,3-(S)-HHDP-D-glucose(1)는 각각 IC₅₀ 4.2, 11.3 μ g/ml로 강한 억제 활성을 보였으며 condensed tannin인 3, 4 및 5는 각각 IC₅₀ 68.8, 125.9, 108.9 μ g/ml로 앞의 두종의 ellagitannin에 비해서는 억제활성이 낮은 것으로 나타났다.

Table I - IC₅₀ values of tannins against the DPPH radical

Compound	IC ₅₀ (μ g/ml)
2,3-(S)-HHDP-D-glucose (1)	65.3
Pedunculagin (2)	51.5
(+)-Catechin (3)	93.5
(-)-Epicatechin (4)	76.1
Procyanidin B-4 (5)	93.6
L-Ascorbic acid	81.8

Table II - IC₅₀ (μ g/ml) values of tannins tested in superoxidation reactions

Compound	H ₂ O ₂ treatment	
2,3-(S)-HHDP-D-glucose (1)	42.6	11.3
Pedunculagin (2)	23.0	4.2
(+)-Catechin (3)	365.0	68.8
(-)-Epicatechin (4)	358.6	125.9
Procyanidin B-4 (5)	125.4	108.9

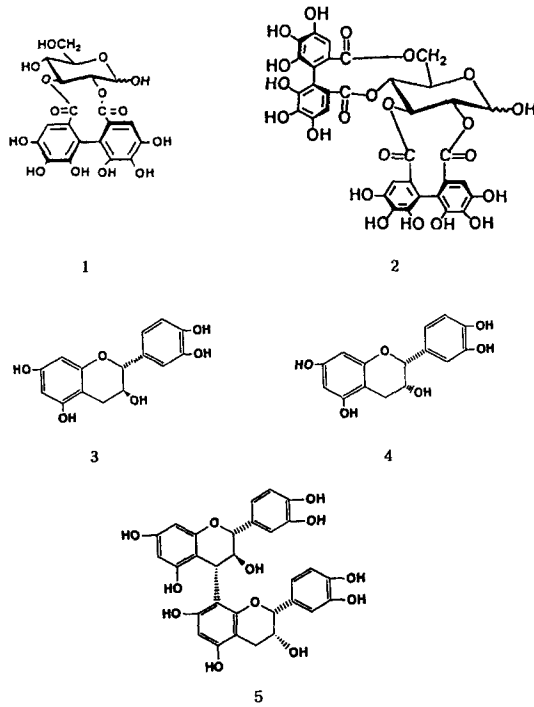


Fig. 1 - Structure of compounds 1-5.

결론

국내에 자생하는 약용자원식물의 하나인 복분자 딸기에서 분리한 5종의 탄닌화합물의 DPPH radical scavenging activity로 항산화작용을 평가하였을 때, 실험한 5종의 탄닌화합물이 모두 강력한 free-radical scavenger 인 것으로 나타났다. 특히, ellagitannin 인 pedunculagin (2)과 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (1) 및 procyanidin B-4 (5)는 L-ascorbic acid 보다 강력한 항산화작용을 나타내었다.

Rat liver homogenate에 H_2O_2 를 가하여 산화를 유도하여 실험한 lipid peroxidation generation system 에서도 모든 탄닌화합물이 과산화지질 억제 활성을 나타내었다. 특히 ellagitannin인 pedunculagin (2)과 2,3-(S)-HHDP-D-glucose (1)은 각각 IC_{50} 4.2, 11.3 $\mu g/ml$ 로 condensed tannin인 3, 4 및 5의 IC_{50} 치 68.8, 125.9, 108.9 $\mu g/ml$ 보다 높은 억제 활성을 보였다.

이상의 결과로 복분자 딸기에서 분리한 5종의 탄닌화합물은 강력한 항산화제이며 지질과산화 억제제로 작용함을 알 수 있었으며 특히 ellagitannin의 항산화효력이

condensed tannin보다 강한 것으로 평가되었다.

감사의 말씀

이 논문의 일부는 보건의료기술개발사업 (HMP-98-D-1-0016)에 의해 수행된 연구결과이며 이에 감사 드립니다.

문헌

- 1) 정태현 : 한국식물도감(木本部). 서울 이문사, p. 182 (1974).
- 2) 本草綱目草部 第 18卷 覆盆子, 本草綱目通釋, 學苑出版社, p.1030 (1992).
- 3) Namba, T. : The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Pictures, HOIKUSHA, 1, 327 (1993).
- 4) Perry, L. M. : Medicinal Plants of East and Southeast Asia Attributed Properties and Uses, The MIT Press, Cambridge, p.346 (1980).
- 5) Lee, Y. A. and Lee, M. W. : Tannins from *Rubus coreanum*, *Kor. J. Pharmacogn.* 26, 27 (1995).
- 6) Lee, M. W. : Phenolic Compounds from the leaves of *Rubus coreanum*, *Yakhak Hoeji.* 39, 200 (1995).
- 7) Kim, M. S., Pang, G. C. and Lee, M. W. : Tannins from the leaves of *Rubus coreanum*, *Yakhak Hoeji.* 40, 666 (1996).
- 8) Shibutani, S., Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Mechanism of the Blood Urea Nitrogen-decreasing Activity of Rhatannin from *Rhei Rhizoma* in the Rat. I, *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2378 (1983).
- 9) Ueki, S., Fugiwara, M., Nishioka, I. and Nonaka, G. : Psychotropic effects of Rhubarb, *Gendaitoyoigaku*, 7, 98 (1986).
- 10) Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M. : Prolongation of Life Span of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHIRSP) Ingesting Persimmon Tannin, *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1049 (1990).
- 11) Ezaki, N., Kato, M., Takizawa, N., Morimoto, S., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Pharmacological Studies on *Lindera Umbellatae Ramus*, IV. Effect of Condensed Tannins and Related Compounds on Peptic

- Activity and Stress-Induced Gastric Lesions in Mices, *Planta Med.*, 34 (1985).
- 12) Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Inhibitory Effect of Tannins on Hyaluronidase Activation and on the Degranulation from Rat Mesentery Mast Cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 5079 (1985).
- 13) Inokuchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme in Crude Drug II, *Chem. Pharm. Bull.* 33, 264 (1985).
- 14) Uchida, S., Ikari, N., Ohta, H., Niwa, M., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M. : Inhibitory effects of condensed Tannins on Angiotensin converting Enzyme, *Japan J. Pharmacol.*, 43, 242 (1987).
- 15) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J.-J. and Lee, K.-H. : Antitumor Agents, 129. Tannins and Related Compounds as Selective Cytotoxic Agents, *J. Natr. Prod.*, 55, 1033 (1992).
- 16) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzeng, W. P. and Lee, K.-H. : Tannins as Selective Inhibitors of Protein Kinase C, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2, 239 (1992).
- 17) Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bonder, A. J., Kilkuskie R. E., Cheng, Y.-C. and Lee, K.-H. : Anti-AIDS Agents, 2 : Inhibitory Effects of Tannins on HIV Reverse Transcriptase and HIV Replication In H₉ Lymphocyte Cells, *J. Natr. Prod.*, 53, 587 (1990).
- 18) Lee, K.-H., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Bonder, A. J., Kilkuskie, R. E. and Cheng, Y.-C. : Tannin and Related Compounds as Anti-HIV Agents, *Natr. Prod. as Anti-Viral Agents*, Plenus press, New York, p.69-90 (1992).
- 19) 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).
- 20) Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351 (1979).
- 21) Yokozawa, T., Dong, E., Liu, Z. W. and Oura, H. : Antiperoxidation Activity of Traditional Chinese Prescriptions and their Main Crude Drugs *In vitro*, *Natural Medicines*, 51, 92 (1997).