

수치에 의한 생약의 항산화 활성 및 성분 변화

차배천* · 전경수

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

Changes of Antioxidant Activity and Ingredient in Medicinal Plants by Processing

Bae Cheon Cha* and Kyung Su Jun

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

Abstract – This study was conducted to investigate the change of antioxidant activity and ingredient in 4 species medicinal plant by processing. As a result, EtOAc extract and *n*-BuOH extract obtained from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma and processed *Cistanche deserticola* Y. C. Ma showed difference on the experiment of antioxidant activity by DPPH method. Change of ingredient also was confirmed by TLC and HPLC analyses. Two main compounds of antioxidant activity change were isolated by column chromatography from the EtOAc extract and *n*-BuOH extract of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. The chemical structure of the compound **1** isolated from EtOAc extract of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma was elucidated as 2'-acetylacteoside by means of IR and NMR analyses. Also, the chemical structure of the compound **2** isolated from *n*-BuOH extract of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma was confirmed as acteoside. The antioxidant activity of processed *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. was declined by 3 time decrements of 2'-acetylacteoside such as 1.89 mg/g to 0.62 mg/g and 2 time decrements of acteoside such as 5.81 mg/g to 2.67 mg/g by processing.

Key words – Processing, Change, Antioxidant activity, DPPH, HPLC, *Cistanche deserticola*, 2'-Acetylacteoside, Acteoside

생약은 천연물을 기원하고 있기 때문에 그대로 이용하기 보다는 사용에 필요한 형태로 가공을 거치며 이러한 공정을 수치 또는 한방에서는 포제라 한다. 수치는 가공 처리에 의해 생약의 부작용이나 독성의 경감, 약성의 완화, 효능의 변화 및 보관 저장에 용이하도록 변형시키는 약물 제조 기술로 오늘날에도 임상에서 활용되는 전통적인 방법이다. 불을 이용하거나 물과 불을 같이 사용하여 증기로 찌거나 또는 꿀, 식초, 소금, 쌀뜨물 등을 이용하여 약재를 가공한다.^{1,2)} 수치에 관한 연구로서는 부자와 같이 독성이 강한 한약재의 수치에 의한 독성의 경감,^{3,4)} 지황의 수치에 의한 약성의 변화,^{5,6)} 감초의 새로운 약리효과⁷⁾ 및 치차의 수치에 의한 성분변화 및 생리활성⁸⁾에 관한 연구결과가 보고되어져 있다. 그 결과 수치 유·무에 따라 생약의 효능 및 성분에 대한 차이가 있다는 것이 확인되었으며,⁹⁾ 보다 더 많은 약재들에 대한 조사가 필요하다는 것을 인식 시켜주었다.

따라서 본 연구는 수치가 생약의 효능과 성분 변화에 미

치는 영향을 알아보고자 백출과 백출을 가열에 의해 볶아서 수치한 청초 백출과 쌀뜨물로 수치한 미감침 백출, 지모와 지모를 술과 소금물로 수치한 주구 지모와 염수 지모, 보골지와 보골지를 소금물을 이용하여 수치한 염초 보골지 및 육종용과 육종용을 술로 수치한 주구 육종용의 생약에 대하여 수치 전후에 따른 항산화 활성의 변화를 DPPH법을 이용하여 연구하고자 하였으며, TLC와 HPLC를 이용하여 성분의 패턴 변화 및 함량 변화를 확인하고자 하였다.

지금까지 이들 생약 4종에 대하여서는 수치에 따른 성분의 변화와 항산화 활성 변화에 대한 연구는 보고되어져 있지 않다. 따라서 생약 4종에 대하여 수치 전후의 성분 변화와 이에 따른 항산화 활성 변화를 확인하기 위하여, 먼저 TLC를 이용하여 성분의 패턴 변화를 비교 확인함과 동시에 DPPH법에 의해 항산화 활성 변화가 나타나는지를 연구하였다. 또한 백출, 지모, 보골지, 육종용의 4종 생약 중에서 항산화 활성 및 성분의 패턴 변화가 나타난 생약에 대해서는 변화를 나타낸 항산화 활성 주성분을 분리하기 위하여 column chromatography를 이용하여 활성 주성분을 분리하

*교신저자(E-mail): bccha@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0554

고, 분리된 화합물의 구조 결정을 위하여 IR 및 NMR 등의 기기분석을 이용하여 화합물의 구조를 결정하고자 하였다. 또한 이들 화합물들에 대하여 수치 전후 생약에 있어서 함량 변화를 실험하기 위한 지표성분으로의 선정과 함께 지표성분의 HPLC 조건을 검토하여 정량분석법을 확립하고자 하였다. 확립된 정량분석법을 통하여 수치 전후 생약에 있어 지표성분의 함량을 분석함과 동시에 항산화 활성을 측정하여, 활성 성분의 함량변화에 따른 항산화 활성 변화의 상관관계를 규명하고자 하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 백출(*Atractylodes japonica* Koidzumi), 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge), 보골지(*Psoralea corylifolia* Linne) 및 육종용(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)의 원생약과 수치 생약은 수치(법제) 한약재 전문 생산 한약제약사인 새롬제약과 중경제약으로부터 구입한 후 세절하여 사용하였다. 이 식물들의 표본은 상지대학교 제약공학과 의약화학실험실에 보관 중이다.

기기 및 시약 - 실험에 사용된 HPLC는 Varian Prostar Workstation System (USA)을 사용하였으며, column은 Shiseido (japan)사의 Capcell Pak C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm, UG 80)을 사용하였다. FT-NMR은 Varian Mercury 300 MHz(USA)를 이용하여 TMS를 내부 표준물질로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ unit로 나타내었다. 용점은 Mettler FR-5 용점 측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. FT-IR은 Nicolet Impact 420을 사용하여 KBr법으로 측정하였고, UV는 Milton-Roy Spectronic Genesys-5 분광계를 사용하였다. 성분 분리를 위한 순상 column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60 (particle size 70-230 mesh. ASTM. Merck)을 사용하였고, Lipophilic Sephadex-LH 20은 Sigma사, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (ART. 5715, Merck)를 사용하였다. HPLC 용매인 acetonitrile은 HPLC용인 J. T. Baker사 제품을 사용하였고, 증류수는 3차 증류수를 여과하여 사용하였으며, 그 외에 시료 추출을 위한 용매는 1급 또는 특급 시약을 사용하였다. Free radical 소거효과 측정용 시약인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며, 항산화 효과 대조군인 α-tocopherol, BHA(butylated hydroxyanisole)은 Sigma사 제품을 사용하였다.

추출, 분획 및 성분 분리 - 세절한 4종의 원생약 및 수치 생약 각 100 g에 MeOH 500 ml를 가하여 수욕상에서 3시간 동안 환류 냉각하면서 3회 추출하여 얻어진 MeOH 용액을 농축하여 MeOH 엑스(16.1~45.1 g)를 얻었다. 얻어진 4종 원생약과 수치 생약의 MeOH 엑스의 일부분을 *n*-hexane

과 H₂O 1:1로 분배하여 얻어지는 *n*-hexane 용액을 농축하여 *n*-hexane 엑스(0.7~4.8 g)를 얻고, 계속하여 잔여 H₂O 층에 EtOAc 용액을 H₂O 층과 1:1이 되게 가한 후 분배하여 얻어지는 EtOAc 용액을 농축하여 EtOAc 엑스(0.4~6.7 g)를 얻고, 잔여의 H₂O 층에 *n*-BuOH을 H₂O 층과 1:1이 되도록 가한 후 분배시켜 얻어지는 *n*-BuOH 용액과 H₂O 층을 농축하여 *n*-BuOH 엑스(0.7~12.1 g)와 H₂O 엑스(3.7~27.5 g)를 각각 얻었다. 분획물 중 활성 변화를 크게 나타낸 육종용 EtOAc 분획물 중 일부(5 g)를 CHCl₃과 MeOH 용매계에서 단계적으로 극성을 높인 전개 용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 소분획인 fraction E-1 (0.95 g), fraction E-2 (0.64 g), fraction E-3 (0.22 g) 및 fraction E-4 (2.35 g)로 나누었다. Fraction E-3으로부터 활성의 차이를 나타낸 주성분을 규명하기 위하여 H₂O와 MeOH 용매계에서 단계적으로 극성을 낮춘 전개용매를 이용하여 Lipophilic Sephadex-LH 20을 사용하여 column chromatography로 정제하여 fraction E-3-2로부터 화합물 **1**(6.3 mg)을 얻었다. 계속하여 분획물 중 활성의 차이를 가장 많이 나타낸 육종용 *n*-BuOH 분획물 중 일부(5 g)를 CHCl₃과 MeOH 용매계에서 단계적으로 극성을 높인 전개 용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 6개의 소분획인 fraction B-1 (0.09 g), fraction B-2 (0.26 g), fraction B-3 (0.10 g), fraction B-4 (0.13 g), fraction B-5 (0.31 g), fraction B-6 (2.80 g)으로 나누었다. Fraction B-4로부터 활성 변화를 나타낸 주성분을 규명하기 위하여 H₂O와 MeOH 용매계에서 단계적으로 극성을 낮춘 전개 용매를 이용하여 Lipophilic Sephadex-LH 20 column chromatography로 정제하여 fraction B-4-2로부터 화합물 **2**(7.8 mg)를 얻었다.

화합물 1 - Amorphous powder; m.p : 140-141°C; UV λ_{max}(MeOH) : 206, 287, 335; IR (KBr, cm⁻¹) 3450 (OH), 1705 (C=O), 1535 (aromatic C=C), 1100 (C-O); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.60 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-6') 6.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.45 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, H-6), 6.27 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8'), 4.99 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-1'''), 4.52 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-1''), 2.69 (2H, m, H-7), 1.98 (3H, s, OAc), 1.06 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'''); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 170.3 (OCOCH₃), 167.1 (C-9'), 148.7 (C-4'), 147.6 (C-7'), 145.7 (C-3'), 144.8 (C-3), 143.4 (C-4), 130.6 (C-1), 126.4 (C-1'), 122.1 (C-6'), 120.1 (C-6), 116.0 (C-2), 115.4 (C-5'), 115.3 (C-5), 115.1 (C-2'), 114.0 (C-8'), 102.7 (C-1'''), 100.8 (C-1''), 79.4 (C-3''), 74.9 (C-5''), 72.4 (C-2''), 71.4 (C-4''), 71.2 (C-8), 70.7 (C-2''), 70.7 (C-3''), 69.6

(C-4"), 69.4 (C-5"), 61.9 (C-6"), 34.6 (C-7), 19.7 (OCOCH₃), 17.3 (C-6").

화합물 2 – Amorphous powder; m.p : 140-142°C; UV λ_{max} : 206, 287, 335 (MeOH); IR (KBr)cm⁻¹ : 3400 (OH), 1701 (C=O), 1520 (aromatic C=C), 1100 (C-O); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.59 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.06 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, J = 8.1, 1.8 Hz, H-6') 6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.63 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.56 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 6.28 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8'), 5.18 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-1"), 4.37 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1"), 2.79 (2H, m, H-7), 1.08 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-6"); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 167.1 (C-9), 148.6 (C-4'), 146.9 (C-7'), 145.7 (C-3'), 144.9 (C-3), 143.5 (C-4), 130.3(C-1), 126.5 (C-1'), 122.1 (C-6'), 120.1 (C-6), 116.0 (C-2), 115.4 (C-5'), 115.3 (C-5), 115.1 (C-2'), 114.0 (C-8'), 103.0 (C-1"), 101.9 (C-1"), 80.5 (C-3"), 74.9 (C-5"), 72.6 (C-2"), 71.2 (C-4"), 71.2 (C-8), 70.7 (C-2"), 70.7 (C-3"), 69.3 (C-4"), 69.2 (C-5"), 61.9 (C-6"), 35.4 (C-7), 17.3 (C-6").

DPPH 라디칼 소거작용의 측정 – Uchiyama 등¹⁰⁾의 방법을 약간 변형시킨 Choi¹¹⁾와 Yoshikawa 등¹²⁾의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M의 초산 완충액(pH 5.5, 2.0 ml)에 생약의 MeOH 추출물, 분획물 및 화합물들의 용액(2.0 ml) 및 2×10⁻⁴ M DPPH EtOH 용액(1.0 ml)을 가하여 전량을 5 ml로 하고 실온에 방치한 후, 30분 후 517 nm에서의 흡광도 감소를 3회 반복하여 측정하였다. 시료 무침 가군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(mg)을 tocopherol 및 BHA와 같은 기존의 항산화제를 대조군으로 하여 시험하였다.

HPLC 분석을 위한 검액 및 표준액의 제조 – 검체는 육종용 MeOH 추출물 4 mg을 50% MeOH 1 ml로 녹이고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다. 표준 용액은 EtOAc 분획물에서 분리한 화합물 1과 *n*-BuOH 분획물에서 분리한 화합물 2를 1 mg/1 ml로 만든 후, 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 각각 25, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml가 되도록 시료를 만들어 15초간 vortexing 한 후 0.45 μ m membrane filter로 여과 하여 검량선 작성에 사용 하였다.

HPLC 분석 조건 – 육종용으로부터 분리한 화합물 1과 2의 지표물질을 각각 Li 등¹³⁾의 HPLC 분석 방법을 기초로 하여 분석조건을 검토 하였다. 칼럼은 Capcell Pak C18 (4.6 × 250 mm, 5 μ m, Shiseido)을 사용하였고, 칼럼의 온도는 35°C, 검출기는 UV 320 nm, 이동상으로는 아세트나이트릴과 2% 초산용액을, 유속은 1 ml/min을 사용하여 실험하였다.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase	
			A (AcCN)	B (2% AcOH)
	0:00	1.0	0	100
	10:00	1.0	30	70
	20:00	1.0	40	60
	30:00	1.0	0	100

검량선 작성 및 육종용과 수치 육종용에 함유된 화합물 1과 2의 정량 – 각 표준액에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의하여 5개의 농도 (25, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml)별로 피크 면적비를 구하여, 표준품 농도(x축)와 피크면적비(y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관 계수를 구하였다. 계속하여 육종용과 수치 육종용에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의해 검액을 3회씩 분석한 후 검량선에 대비하여 화합물 1과 2의 각각의 함량을 산출하였다.

결과 및 고찰

생약 4종 및 수치 생약의 항산화 활성비교 – 4종의 생약에 대한 원생약과 수치에 따른 생약들의 항산화 활성 변화를 비교하기 위하여 4종 생약의 원생약과 수치 생약에 대해 분획별 추출물을 제조한 후 기존에 널리 알려진 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA를 대조군으로 하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용 실험을 실시한 결과, Table I에 나타낸 바와 같이 육종용과 수치 육종용의 EtOAc 분획물에서는 0.018 mg 그리고 *n*-BuOH 분획물에서는 0.025 mg으로 가장 큰 항산화 활성의 차이를 나타내었다. 다른 3종의 생약에서도 적게는 0 mg로 전혀 항산화 활성의 차이를 보이지 않는 생약과 많게는 0.013 mg과 같이 항산화 활성의 차이를 보이는 분획물도 있었으나 육종용과 수치 육종용 만큼 분획물 별로 다양하게 큰 변화를 보이지는 않았다.

육종용(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)은 열당과(Orobanchaceae)에 속한 다년생 초본으로 한방에서는 전통적으로 신장 기능 개선 등을 위한 자양강장제로 오늘날의 기능성 식품 또는 식품첨가제와 같은 개념으로 널리 이용되어져왔다.^{14,15)} 육종용의 생물 활성을 나타내는 주요 성분으로는 cistanoside, acteoside, isoacteoside, 2'-acetylacteoside, echinacoside와 같은 phenylethanoid 배당체류 등이 보고되어져 있다.^{16,17)} 육종용의 약리작용으로는 간보호 작용, 항산화작용, 진정작용 및 성기능 개선 작용 등이 보고되어 있고,¹⁸⁻²¹⁾ 육종용의 수치 생약에는 술을 이용한 주구 육종용 등이 있다.

육종용의 EtOAc과 *n*-BuOH 분획물로부터 항산화 활성 주성분 분리 – 항산화 활성 비교 실험 결과, 큰 항산화 활성 변화를 보인 육종용과 수치 육종용으로부터 활성 주성

Table I. Radical scavenging effect of the obtained extracts from 4 species medicinal plant and processed medicinal plants on DPPH method

Sample	50% Reduction(mg) ^a
Tocopherol	0.022
BHA	0.015
<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi (Backchul)	
MeOH	0.076
<i>n</i> -Hexane	0.078
EtOAc	0.073
<i>n</i> -BuOH	0.082
H ₂ O	0.081
Processed <i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi (1) (Cheongcho Backchul)	
MeOH	0.074
<i>n</i> -Hexane	0.076
EtOAc	0.068
<i>n</i> -BuOH	0.074
H ₂ O	0.080
Processed <i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi (2) (Migamchim Backchul)	
MeOH	0.076
<i>n</i> -Hexane	0.075
EtOAc	0.080
<i>n</i> -BuOH	0.069
H ₂ O	0.080
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (Jimo)	
MeOH	0.070
<i>n</i> -Hexane	0.076
EtOAc	0.042
<i>n</i> -BuOH	0.072
H ₂ O	0.079
Processed <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (1) (Jugu Jimo)	
MeOH	0.072
<i>n</i> -Hexane	0.078
EtOAc	0.045
<i>n</i> -BuOH	0.063
H ₂ O	0.086
Processed <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (2) (Yeomcho Jimo)	
MeOH	0.073
<i>n</i> -Hexane	0.082
EtOAc	0.045
<i>n</i> -BuOH	0.071
H ₂ O	0.079
<i>Psoralea corylifolia</i> Linne (Bogolji)	
MeOH	0.072
<i>n</i> -Hexane	0.073
EtOAc	0.073
<i>n</i> -BuOH	0.073
H ₂ O	0.086
Processed <i>Psoralea corylifolia</i> Linne (Yeomcho Bogolji)	
MeOH	0.071
<i>n</i> -Hexane	0.075
EtOAc	0.068
<i>n</i> -BuOH	0.071
H ₂ O	0.088

Table I. Continued

Sample	50% Reduction(mg) ^a
Tocopherol	0.022
BHA	0.015
<i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma (Yookjongyoung)	
MeOH	0.075
<i>n</i> -Hexane	0.085
EtOAc	0.030
<i>n</i> -BuOH	0.025
H ₂ O	0.094
Processed <i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma (Jugu Yookjongyoung)	
MeOH	0.081
<i>n</i> -Hexane	0.072
EtOAc	0.048
<i>n</i> -BuOH	0.050
H ₂ O	0.078

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} mM, 0.079 mg) solution.

분을 분리하기 위하여 육종용의 EtOAc 분획물을 소분획하여 얻어진 4종의 소분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용을 실시한 결과 fraction E-3의 소분획물이 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA와는 유사한 항산화효과를 나타내었다. 우수한 항산화 효과를 나타낸 fraction E-3로부터 주성분을 분리하기 위하여 다시 MeOH : H₂O = 10 : 1에서 1 : 10으로의 전개 용매를 사용한 Lipophilic Sephadex LH-20으로 재정제하여 활성 주성분의 하나인 화합물 **1**을 얻었다.

화합물 **1**은 미황색 비결정질의 분말로 TLC 상에서 UV 254 nm 조사에 흡수가 있고, cerium sulfate 황산 발색에 남색을 띠었으며, UV spectrum으로부터 206, 287, 335 nm에서 특이적인 phenylpropanoid glycoside의 흡수 band를 확인하였으며, IR에서는 3450 cm⁻¹의 OH, 1705 cm⁻¹의 C=O, 1535 cm⁻¹의 aromatic double bond 및 1100~1000 cm⁻¹에서의 CO기를 확인하였다. 최종적으로 화합물 **1**의 ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치²²⁻²⁴의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 **1**의 구조는 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 2'-acetylacteoside로 동정하였다.

계속하여 EtOAc 분획물보다 보다 큰 항산화 활성의 차이를 나타낸 육종용의 *n*-BuOH 분획물에 대해서도 활성 주성분을 분리하기 위하여 소분획하여 얻어진 6종의 소분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용을 실시한 결과 fraction B-4의 소분획물이 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA와 유사한 효과를 나타내었다. 우수한 효과를 나타낸 fraction B-4로부터 주성분을 분리하기 위하여 다시 MeOH : H₂O = 10 : 1에서 1 : 10으로 전개 용매를 사용한 Lipophilic Sephadex LH-20으로 정제하여 화합물 **2**를 얻었다.

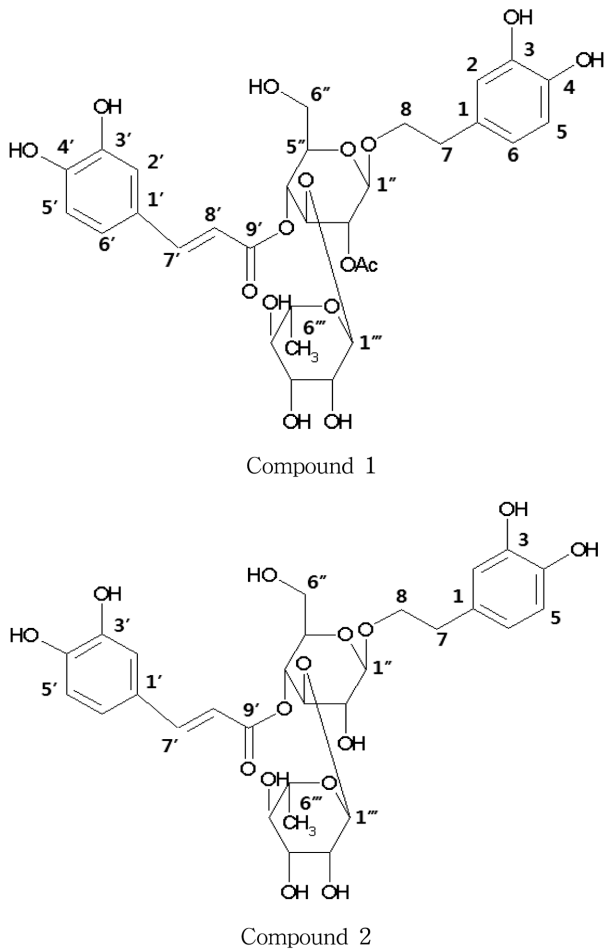


Fig. 1. Structure of compound 1 and compound 2 isolated from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma

화합물 2는 미황색 비결정질의 분말로 TLC 상에서 UV 254 nm 조사에 흡수가 있고, cerium sulfate 황산 발색에 남색을 띠었으며, UV spectrum으로부터 206, 287, 335 nm에서 특이적인 phenylpropanoid glycoside의 흡수 band를 확인하였으며, IR에서는 3400 cm^{-1} 의 OH, 1701 cm^{-1} 의 C=O, 1520 cm^{-1} 의 aromatic double bond 및 1100-1000 cm^{-1} 에서의 CO기를 확인하였다. 최종적으로 화합물 2의 ^1H 및 ^{13}C -NMR 등의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치²⁵⁻²⁷의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 2의 구조는 Fig. 1에 나타난 것과 같이 acteoside로 동정하였다.

육종용의 활성 주성분 2'-acetylacteoside와 acteoside의 항산화 활성 - 육종용의 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물로부터 항산화 활성 주성분으로 분리한 2'-acetylacteoside와 acteoside에 대해서도 분획물과 같은 DPPH법을 이용한 free radical 소거 효과에 의한 항산화 실험을 실시한 결과 Table II에 나타난 바와 같이 α -tocopherol보다는 우수하고 BHA와는 거의 유사한 효과를 나타내었다. 이 결과는 Xiong 등이 보고²⁸한 육종용의 phenylethanoid 배당체 성분들의 항

Table II. Radical scavenging effect of 2'-acetylacteoside and acteoside isolated from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma on DPPH method

Samples	50% Reduction(mg) ^a
α -Tocopherol	0.022
BHA	0.015
2'-Acetylacteoside	0.014
Acteoside	0.015

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} mM, 0.079 mg) solution.

산화 효과 실험 결과와 유사한 결과를 보임으로 이들 두 성분이 항산화 활성 주성분이 확인되어졌다.

2'-Acetylacteoside와 acteoside의 HPLC 분석법 및 검량선 - 육종용과 수치 육종용에 있어서 항산화 활성 주성분이 이들 두 성분이 확인되어짐에 따라 육종용에 있어서 수치에 따른 항산화 활성의 변화는 이들 주성분들의 함량 변화에 따라 발생되어짐을 알 수 있었다. 따라서 이들 두 성분의 함량 변화를 분석하기 위해 검액 및 활성 주성분인 표준액의 분석을 위하여 Capcell Pak C18 (4.6 \times 150 mm, 5 μm , UG 80) 칼럼과 35°C의 칼럼온도, UV 320 nm 파장, 아세트나이트릴과 2% 초산용액의 이동상을 이용한 gradient 조건, 1 ml/min의 유속에서 육종용의 활성 주성분인 2'-acetylacteoside와 acteoside의 HPLC 분석법을 확립하였다. 이 조건은 Li 등¹³의 방법에서 19분, 17분대에서 보이던 피크를 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 2'-acetylacteoside는 13.2분대 acteoside는 11.7분대로 옮겨 분리함으로써, 다른 피크의 간섭 없이 활성 주성분의 피크가 분리되어 분리능이 우수한 분석 방법으로 판단되었다.

육종용과 수치 육종용 중의 활성 주성분의 함량 측정을 위하여 지표물질인 2'-acetylacteoside와 acteoside의 농도를 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 제조하고, 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시하여 x축은 농도, y축은 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과 상관계수 R^2 값이 각각 0.998과 0.997인 상관관계를 나타내었다.

육종용과 수치 육종용에 함유된 2'-acetylacteoside와 acteoside의 함량 - 육종용과 수치 육종용 MeOH 추출물을 각각 4 mg씩 취하여 50% MeOH 1 ml에 녹여서 확립된 HPLC 분석법으로 측정된 2'-acetylacteoside와 acteoside의 피크 면적값을 각각의 검량선을 이용하여 함량을 구하여 항산화 활성 성분의 함량 변화를 알아본 결과, 육종용에서는 2'-acetylacteoside가 1 g 당 1.89 mg, acteoside는 1 g 당 5.81 mg이 함유되어 있었고, 수치 육종용에서는 2'-acetylacteoside가 1 g 당 0.62 mg, acteoside는 1 g 당 2.67 mg이 함유되어 있었다(Table III).

따라서 육종용을 술에 담가 수치 육종용인 주구 육종용으로 가공하면 육종용에 함유되어 있던 항산화 활성 주성분인

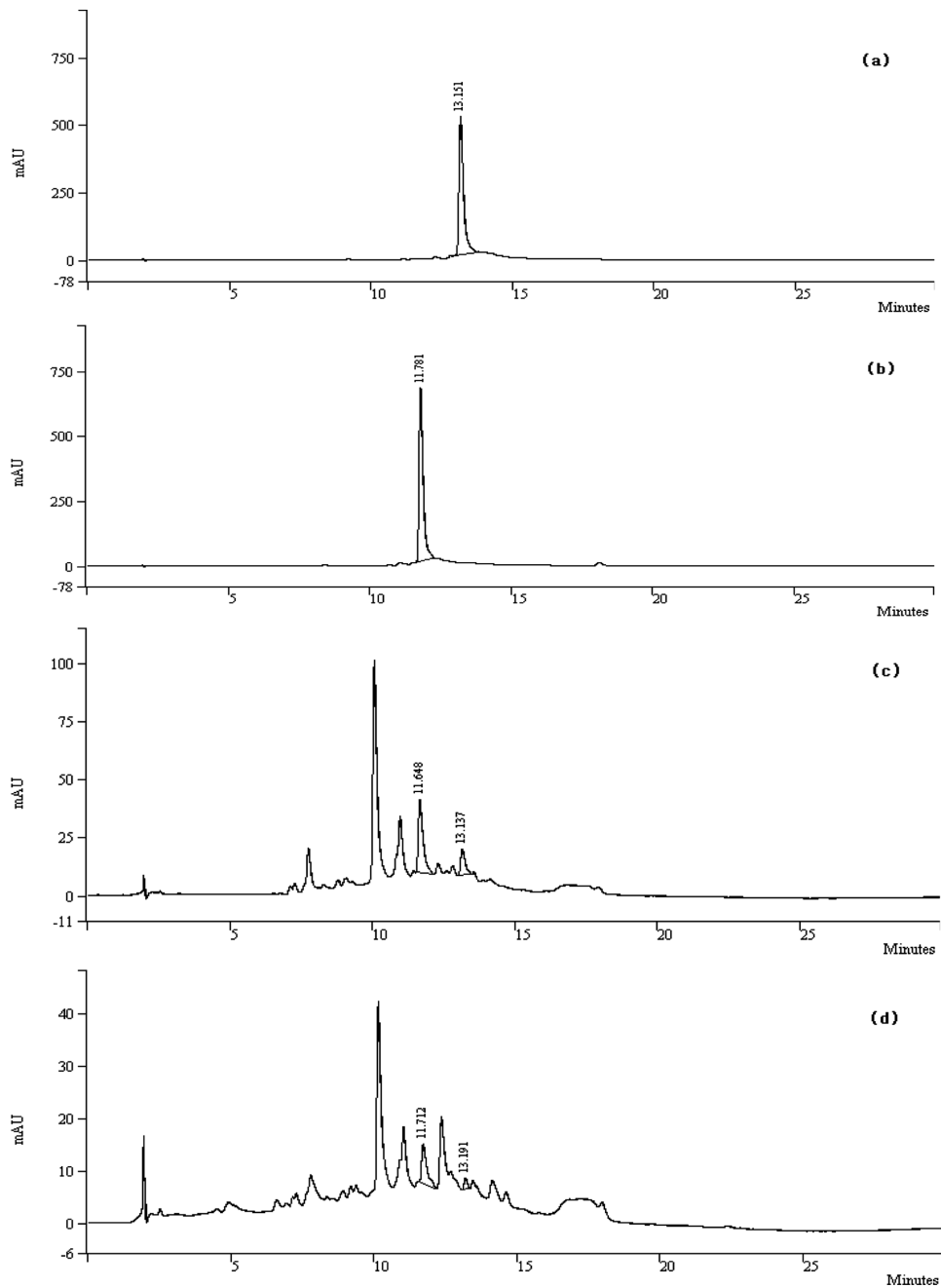


Fig. 2. HPLC chromatogram of 2'-acetylacteoside(a), acteoside(b), *Cistanche deserticola* Y. C. Ma(c), and processed *Cistanche deserticola* Y. C. Ma(d)

Table III. Contents of 2'-acetylacteoside and acteoside in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma and processed *Cistanche deserticola* Y. C. Ma

Compound	<i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma (Yookjongyoung) (m/g)	Processed <i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma (Jugu Yookjongyoung) (m/g)
2'-Acetylacteoside	1.89 ± 0.20	0.62 ± 0.01
Acteoside	5.81 ± 0.05	2.67 ± 0.05

Values are mean ± S.D (n=3)

2'-acetylacteoside는 3배, acteoside는 2배 정도 감소함에 따라 육종용과 수치 육종용간에 있어서 활성 주성분이 감소한 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물의 항산화 활성은 감소하고, 수치 과정에서 항산화 활성 주성분의 당개열로 추정되는 분해에 의해 비당부인 페놀성 화합물의 함량이 증가될 것으로 예상되는 *n*-hexane 분획물의 항산화 활성이 증가되는 현상이 발생함을 확인할 수 있었다.

결 론

생약의 수치는 동양의 전통 의학에서 많이 사용되어져 온 가공 방법으로서 오늘날 한방에서 약을 지을 때에도 많이 사용해 오고 있다. 오랜 세월을 거쳐 오는 동안 수치에 관한 여러 가지 방법도 진화 되어져 왔으며, 근래에는 이러한 수치를 통한 약효의 증강이나 독성 감소 등을 목적으로 하여 널리 이용되는 약이나 보약 등에 빈번하게 활용되어지고 있다. 하지만 수치에 따른 생약의 성분 및 활성의 변화에 관한 연구는 많이 이루어지고 있지 않다. 따라서 본 연구는 수치에 따른 생약의 성분 및 활성 변화를 알아보고자 백출, 지모, 보골지, 육종용의 4종 생약의 수치 따른 성분변화를 TLC를 통하여 비교하고, free radical 소거 효과의 측정 방법인 DPPH법을 이용하여 항산화 활성의 변화를 확인하였다. 그 결과 성분 및 항산화 활성에 큰 변화를 나타낸 육종용으로부터 활성에 영향을 미친 주성분을 분리하여 활성 주성분의 화학구조 결정, HPLC 정량 분석법 개발 및 육종용과 수치 육종용에 있어서의 활성 주성분의 함량 연구를 실시하여 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. 생약 4종과 그들의 수치 생약의 분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거효과 시험 결과, 육종용과 수치 육종용의 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에서 가장 큰 free radical 소거효과의 변화를 나타내었다.

2. TLC를 이용한 육종용과 수치 육종용의 성분을 비교 시험한 결과, 육종용과 수치 육종용의 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에서 성분의 변화를 나타내었고, EtOAc 분획물로부터는 2'-acetylacteoside를 *n*-BuOH 분획물로부터는 acteoside를 확인하였다.

3. 육종용 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물에서 활성 주성분으로 분리된 2'-acetylacteoside와 acteoside의 항산화 활성을 DPPH법에 의해 시험한 결과 2'-acetylacteoside와 acteoside 모두 대조군인 α -tocopherol 보다는 우수하고, BHA와는 유사 또는 우수한 항산화 효과를 보였다.

4. 육종용 EtOAc 분획물에서 분리된 2'-acetylacteoside에 대하여 HPLC 분석과 검량선을 작성한 결과, 피크 retention time은 13.2 분으로 다른 물질과의 간섭없이 분리되었고, 상관계수(R^2)는 0.998을 나타내었다. 육종용 *n*-BuOH 분획물에서 분리된 acteoside에 있어서도 HPLC 분석과 검량선을

작성한 결과, 피크 retention time은 11.7 분으로 다른 물질과의 간섭없이 분리되었고, 상관계수(R^2)는 0.997을 나타내었다.

5. 육종용에는 2'-acetylacteoside가 1.89 mg/g, acteoside는 5.81 mg/g가 함유되어 있었으며, 수치 육종용에는 2'-acetylacteoside는 0.62 mg/g, acteoside는 2.67 mg/g를 함유하고 있었다. 따라서 수치에 의해 2'-acetylacteoside는 3배 감소되었고, acteoside는 2배가 감소되어짐에 따라서 육종용의 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에서는 항산화 활성이 감소하고, *n*-hexane 분획물의 항산화 활성은 증가하는 변화를 나타내었다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2010년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 김남재 (1995) 한방약물의 약리작용. 병원약사회지 **12**: 121-138.
2. 강수영, 서부일, 최호영 (2003) 한약포제와 임상응용, 15-28. 영림사, 서울.
3. Kitagawa, I., Chen, Z. L., Yoshihara, M., Kobayashi, K., Yoshikawa, M., Ono, N. and Yoshimura, Y. (1984) Chemical studies on crude drug processing. III. Aconiti tuber (2). On the constituents of pao-fuzi, the processed tuber of *Aconitum carmichaeli* Debx, and biological activities of lipo-alkaloids. *Yakugaku Zasshi* **104**: 858-866.
4. Park, S. Y., Chung, B. S., Lee, H. K., Lee, H. S. and Ryu, J. H. (1989) Studies on the preparation of processed Aconiti tubers. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**: 25-31.
5. Kitagawa, I., Fukuda, Y., Taniyama, T. and Yoshikawa, M. (1991) Chemical studies on crude drug processing. VII. On the constituents of *Rehmanniae Radix*.(1) : Absolutes stereostructures of rehmaglutins A, B, and D isolated from chine *Rehmanniae Radix*, the dried root of *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Chem. pharm. Bull.*, **39**: 1171-1176.
6. Lee, J. H., Koh, J. A., Hwang, E. Y. and Hong, S. P. (2002) Quantitative determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from *Rehmanniae Radix preparata* according to various processings. *Kor. J. Herbology* **17**: 145-149.
7. Kim, N. J. and Hong, N. D. (1996) Studies on the processing of crude drugs(V). On the constituents and biological activities of *Glycyrrhizae Radix* by processing. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 196-206.
8. Shin, Y. W., Kim, D. H. and Kim, N. J. (2003) Studies on the processing of crude drugs(VII). On the constituents and biological activities of *Gardeniae Fructus* by processing. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 45-54.

9. 김남재 (1997) 한약의 수치와 약효. 병원약사회지, **14**: 66-69.
10. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K. (1968) Biochemical studies of physiological function of tocopheronolactone. 1. *Yakugaku Zasshi* **88**: 678-683.
11. Choi, J. S., Park, J. H. and Kim, H. G. (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 299-303.
12. Yoshikawa, M., Harada, E., Miki, A., Tsukamoto, K., Liang, S. Q., Yamahara, J. and Murakami, N. (1994) Antioxidant constituents from the fruit hulls of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam. *Yakugaku Zasshi* **114**: 129-133.
13. Li, L., Tsao, R., Liu, Z., Liu, S., Yang, R., Cristopher Young, J., Zhu, H., Deng, Z., Xie, M. and Fu, Z. (2005) Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1063**: 161-169.
14. Namba, T. (1994) The encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino- Japanese Medicines) with color pictures. Vol. II. 16-17. Hoikusha, Osaka.
15. Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W. and Chen, F. (2006) A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* **97**: 705-711.
16. Kobayashi, H., Karasawa, H. and Miyase, T. (1984) Studies on the constituents of Cistanchis Herba. III. Isolation and structures of new phenylpropanoid glycosides, Cistanoside A and B. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 3009-3014.
17. Kobayashi, H., Oguchi, H., Takizawa, N., Miyase, T., Ueno, A., Usmanhani, K. and Ahmad, M. (1987) New phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Hook. F. I. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 3309-3314.
18. Zong, G., He, W., Wu, G. L. and Chen, L. H. (1996) Comparisons between *Cistanche deserticola* Y. C. Ma and *Cistanche tubulosa*(Schrenk) Wight on some pharmacological activities. *J. Tradit. Chin. Med.* **21**: 436-438.
19. Xiong, Q., Hase, K., Tezuka, Y., Tani, T., Namba, T. and Kadota, S. (1998) Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Planta Med.* **64**: 120-125.
20. Lu, M. C. (1998) Studies on the sedative effect of *Cistanche deserticola*. *J. Ethnopharmacol.* **59**: 161-1655.
21. Cheng, X. Y., Wei, T., Guo, B., Ni, W. and Liu, C. Z. (2005) *Cistanche deserticola* cell suspension cultures: Phenylethanoid glycosides biosynthesis and antioxidant activity. *Process Biochem.* **40**: 3119-3124.
22. Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N., Usmanhani, K. and Ahmad, M. (1990) The constituents of *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Hook. F. II. Isolation and structures of a new phenylethanoid glycoside and a new neolignan glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1927-1930.
23. Munkombwe, N. M. (2003) Acetylated phenolic glycosides from *Harpagophytum procumbens*. *Phytochemistry* **62**: 1231-1234.
24. Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Cristopher Young, J. and Zhu, H. (2008) Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter chromatography. *Food chem.* **108**: 702-710.
25. Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiehlhaller, B. and Bartsch, H. (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined Olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* **41**: 703-717.
26. Wu, Y. T., Lin, L. C., Sung, J. S. and Tsai, T. H. (2006) Determination of acteoside in *Cistanche deserticola* and *Boschniakia rossica* and its pharmacokinetics in freely-moving rats using LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **844**: 89-95.
27. Yin, J. G., Yuan, C. S. and Jia, Z. J. (2007) A new iridoid and other chemical constituents from *Pedicularis kansuensis* forma *albiflora* Li. *Arch. Pharm. Res.* **30**: 431-435.
28. Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. and Namba, T. (1996) Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 1580-1585.

(2012. 1. 27 접수; 2012. 2. 27 심사; 2012. 3. 2 게재확정)