최 종
연구보고서

국내의 미활용 식물자원으로부터 신규 항산화물질 탐구

Reaearch on Novel Antioxidative Compound from the Unutilized Plant Resources in Korea

연 구 기 관
경북대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내의 미활용 식물자원으로부터 신규 항산화물질 탐구에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 31

주관연구기관명 : 경북대학교
총괄연구책임자 : 정 신 교
협동연구책임자 : 박 종 철
연 구 원 : 최 상 원
연 구 원 : 강 우 원
연 구 원 : 송 경 식
연 구 원 : 박 승 우
연 구 원 : 박 주 권
연 구 원 : 김 미 연
연 구 원 : 김 영 찬
연 구 원 : 김 효 진
연 구 조 원 : 이 재 호

요 약 문

Ⅰ. 제목

국내의 미활용 식물자원으로부터 신규 항산화물질 탐구

Ⅱ. 연구 개발의 목적 및 중요성

식용 유지의 국내 소비량 증가와 더불어 유지 식품의 자동산화 방지와 인간의 노화억제라는 측면에서 천연 항산화제의 개발에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 즉, 현재 사용되고 있는 BHA, BHT, TBHQ 등의 페놀계 합성 항산화제의 유해성 및 발암성 등이 새로이 구명됨에 따라 이의 사용에 대한 법적 규제가 전 세계적으로 강화되고 있는 실정이다. 따라서 국내에서도 천연항산화제로서 α-tocopherol을 널리 이용하고 있으나 이는 식물성 기름에 효과가 낮고 가격이 고가인 점이 문제이다. 한편 생체 내외에서 유발된 유해산소의 생체 성분의 산화적 손상에 따른 노화 및 성인병, 암 등의 질병유발이 사회적 문제가 됨에 따라 천연항산화 기능성 식품의 개발 및 보급이 국민보건 차원에서 시급히 요망된다.

본 연구는 이러한 유지 식품의 산화방지 및 항산화 기능성 식품 인자 탐구를 위하여 현재 각종 폐기되고 있는 농산 미활용 자원과 약용·식용 식물을 대상으로 그 항산화 활성을 검색하고 유용 가능한 자원의 항산화 성분을 구명하여 향후 미활용 식용 식물자원에서 고부가가치를 창출할 수 있는 관련 산업화의 기반을 마련하는 데 목적이 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 미활용 농산자원으로부터 항산화 물질의 탐구 및 이용

본 연구에서 제 1차 연도에는 미활용 농산자원 중 잎류 35종, 과피류 31종, 농산가공부산물 17종, 식물 종자류 69종을 수집하고 메탄올 조추출물을 조제하였다. 그리고 2-deoxyribose 산화법, linoleic acid를 이용한 ferric thiocyanate법, soybean lipoxygenase 저해활성법으로 이들의 항산화 활성을 검정하였다. 2차 연도부터는 그 중 항산화 활성이 강한 뽕잎, 밤의 내·외피, 작약씨, 환삼덩굴로부터 극성별 용매 분획, sephadex LH-20 column chromatography, preparative HPLC로 이들의 항산화 성분을 분리, 정제하고 UV, IR, MS 및 1H, 13C NMR로 그 화학적 구조를 동정하였다.

Bromobenzene을 투여한 흰쥐에서 이들 항산화 성분이 항산화 효소계에 미치는 영향을 검토하였다. 분리, 정제한 항산화 성분을 쥐간 microsome 지질과산화 시스템에서의 항산화 활성을 조사하고 이들의 미백효과를 검토하기 위하여 tyrosinase 저해 활성을 조사하였다. 또한 이들의 변이원성을 Ames test 및 SOS chromotest로 조사하였다. 이들 추출물 및 용매 분획을 천연항산화제로 이용성을 검토하고저 동물성 유지와 식물성 유지에 대하여 POV 및 rancimat으로 항산화 효과를 검정하였다.

2. 약용 및 식용 식물자원으로부터 항산화 물질의 탐구

약용 및 식용식물 자원 중 151종을 수집하여 조추출물을 조제하고 bromobenzene으로 간 독성을 유도한 흰쥐에서 지질과산화 억제 작용을 탐색하였다. 그 중 *in vitro*에서 지질과산화 억제 작용이 인정되는 신선초, 서양고추냉이, 어성초와 엉겅퀴를 활성이 높은 식물로 선택하여 용매 분획 및 silica gel column chromatography로 활성화합물을 분리 및 정제하고 UV, MS 및 NMR로 그 화학적 구조를 결정하였다. 또한 bromobenzene을 모델 약물로 Sprague-Dawley

웅성 흰쥐를 대상으로 동물 실험을 수행하여 이들 항산화 성분의 활성을 *in vivo*에서 검정하고 그 약리 기전을 구명하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 미활용 농산자원으로부터 항산화 물질의 탐구 및 이용

미활용 농산자원인 잎, 과피, 종자류, 가공부산물의 항산화 활성을 수용성 및 지용성 모델계, lipoxygenase 저해 활성을 검색하였다. 이 중 잎류에서는 뽕잎, 매실잎, 밤잎 등의 항산화 활성이 강하였고 과피류에서는 밤피, 양파피, 고구마피 등이 강한 활성을 보였다. 종자류에서는 모란을 비롯한 토사자, 비자, 사철나무 종자 등의 전자공여능과 lipoxygenase 저해 활성이 강하였다.

수용성 및 지용성 모델계의 항산화 검정법으로 뽕잎의 메탄올 조추출물 및 용매 분획별 항산화성을 검정한 결과 ethyl acetate 획분에서 가장 강한 항산화성을 보였으며 이로부터 chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin-3-o-β-D-glucoside, kaempferol-3-o-β-D-glucoside를 분리, 동정하였다. 쥐간의 microsome 지질 생성 억제작용은 quercetin에서 가장 높았으며 tyrosinase 저해활성은 chlorogenic acid에서 가장 높게 나타났다. 뽕잎의 메탄올 및 열수추출물과 분리한 항산화 성분들은 Ames test 및 SOS chromotest에서 변이원성이 없는 것으로 판정되었으며 간접변이원에 대하여 높은 항돌연변원성을 나타내었다. 뽕잎의 용매 분획별 항산화능을 동물성 유지 및 식물성 유지를 대상으로 적용성을 검토한 결과 ethyl acetate 획분은 α-tocopherol보다 우수한 항산화성을 나타내어 α-tocopherol 대체 천연 항산화제로서 이용성이 큰 것으로 나타났다.

밤의 은기, 축파 품종의 외피와 내피의 메탄올 주출물의 항산화성을 2-deoxyribose oxidation법과 지용성 모델계인 ferric thiocyanate법으로 검정한 결과, 외피와 내피 모두 우

수한 항산화성을 나타내었다. 은기 품종의 메탄올추출물을 순차용매 분획하여 항산화성을 검정한 결과 ethyl acetate 획분에서 가장 높은 항산화성을 나타내었다. 따라서 Sepadex LH 20 column chromatography, HPLC를 통하여 항산화 활성이 뛰어난 화합물을 분리하고, 이들의 구조를 1H, 13C-NMR 등 기기분석을 통하여 gallic acid와 ellagic acid로 동정하였다. 이들 화합물을 쥐간 microsome 지질과산화물 생성억제를 시험한 결과 gallic acid는 57.06%, ellagic acid에서 53.11%의 지질과산화물 생성억제를 나타내었다. Bromobezene을 투여한 Sprague-Dawley 웅성 흰쥐의 식이에 밤피분말과 밤피 ethyl acetate 분획물을 첨가하였을 때 분말 첨가 식이에서 glutathion 관련 효소계에서 높은 효과가 있었고 cytochrome p-450 관련 효소들에게는 ethyl acetate 분획물 첨가 식이의 효과가 컸다. 그리고 이들 식이에 의해 cholesterol과 중성지질의 함량이 낮아지고 간조직 검경 결과 조직손상에 대한 회복이 있었다. Ames test 및 SOS chromotest에서 밤피의 용매 추출물의 변이원성은 없는 것으로 판정되었고, 항돌연변이원성시험에서 높은 돌연변이원성을 나타내었다. 돈지와 대두유를 사용하여 유지에 대한 oven test와 rancimat으로 항산화성을 측정하였을 때, gallic acid와 ellagic acid에서 α-tocopherol보다 우수한 항산화능을 보였다. 또한 건조 및 추출 조건을 달리하여 항산화성을 비교하였을 때 80℃에서 건조하여 볶음 처리한 후 acetone으로 추출하였을 때 가장 강한 항산화성을 나타내었다. 밤내피는 높은 항산화성을 가지고 있으며 또한 최근 다양한 생리적 기능성을 가진 폴리페놀화합물의 존재가 본 실험을 통하여 확인되어 유용자원으로서 이용성이 높다. 향후 밤 가공공장에서 가공 후 다량 폐기되고 있는 밤의 외피 및 내피의 효율적인 건조 등의 전처리 방법과 이들 항산화 기능성 성분의 대량 분리 및 산업화 공정에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

작약씨의 메탄올 추출물은 돈지와 대두유에 대하여 α-tocopherol보다 더 높은 항산화성을 나타내었다. 작약씨로부터 항산화 물질을 분리하기위하여 순차용매 분획후 silica gel, Sepadex LH 20 column chromatography 및 preparative HPLC를 수행하였다. 정제된 화합물은

UV, IR 및 1H, 13C-NMR로 구조 분석하여 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone(luteolin), 5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone, trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol), 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone으로 동정하였다. Linoleic acid와 쥐간 microsme을 사용하여 항산화 활성을 조사한 결과, 5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone, trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol), 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone은 α-tocoherol보다 우수한 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해활성은 거의 없거나 낮았고, 작약씨 메탄올 추출물에서는 변이원성이 없었으며, 간접변이원인 2-AF에서는 80% 이상의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 특히 작약씨에서 분리된 resveratrol은 포도주에 함유되어 항암, 항염증, 면역증강 효과 등 다양한 생리활성을 나타내어 최근 주목받고 있는 기능성 성분이다. 따라서 본 연구 결과 resveratrol을 다량 함유하고 있는 것으로 밝혀진 작약씨는 천연항산화제 뿐만아니라 치료제재로서도 이용성이 기대된다. 향후 작약 씨 중의 resveratrol의 대량 분리 공정, 항암, 항염증 등 다양한 약리적 기능성 검증을 통한 기능성 식품과 신약 개발의 응용연구 및 산업화 연구가 수반되어야할 필요성이 있다.

환삼덩굴의 용매분획별 항산화 작용은 ethyl acetate 및 butanol 분획에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 높은 ethyl acetate로부터 Amberlite XAD-2 column chromatography 및 peperative HPLC를 사용하여 이중 vitexin, luteolin-7-O-β-D-glucoside, apigenin-7-O-β-D-glucoside를 분리 및 동정하였다. linoleic accid model계에서의 항산화 활성을 측정한 결과 luteolin-7-O-β-D-glucoside 및 apigenin-7-O-β-D-glucoside는 90% 이상의 지질과산화물 생성 억제를 보여 α-tocopherol보다 우수한 활성을 나타내었다. Ames test 및 SOS chromotest 결과 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 용매분획은 변이원성을 나타내지 않았으며, 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 강하지 않은 것으로 나타났는데 비하여 2-AF를 사용한 간접변이원에서는 물 분획을 제외하고는 모든 분획에서 80 90%의 높은 항돌연변이 활성을 보였다. 환삼덩굴은 국내에서 자생하는 풍부한 식물자원으로서

본 연구 결과 항산화성이 높은 luteolin을 다량 함유하고 있어 안전성 및 독성 검사를 통하여 향후 유용 천연자원으로서 이용성이 기대된다.

2. 약용 및 식용식물 자원으로부터 항산화 물질 탐구

151종의 약용 및 식용식물 자원을 bromobenzene으로 간 독성을 유도한 흰쥐에서 지질과산화물 생성의 억제 작용을 검색하였다. 이 중 신선초, 서양고추냉이, 어성초와 엉겅퀴 등이 지질과산화물 생성 억제 작용이 강하였다. 이들 항산화 성분을 silica gel chromatography로 분리 정제하고 UV, MS, NMR로 화학적 구조를 결정하였다. Bromobenzene을 모델약물로 한 동물을 대상으로 신선초에서 과산화지질의 생성 및 epoxide 해독계 효소에 미치는 영향을 조사하여 흰쥐의 간독성 해독작용에 항산화 성분인 cynaroside가 관여함을 밝혔다. 서양고추냉이 잎에서 분리한 kaempferol-3-O-β-D-galactopyronoside와 kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosyl (1→2)-β-D-galactopyranoside의 흰쥐 간에서 유발된 지질과산화 생성억제 효과를 조사하였다. 어성초에서 분리한 quercetrin을 흰쥐에 대한 지질과산화물 억제활성을 조사하였다. 엉겅퀴에서 분리한 hispidulin 7-o-neohesperidoside의 간독성의 경감 기전을 밝히기 위하여 산화 지질의 생성 및 epoxide 해독계 효소에 주는 영향을 검토하였다.

본 연구에서 in vitro 및 in vivo에서 지질과산화 억제작용이 강하게 발현된 신선초, 서양고추냉이, 어성초와 엉겅퀴는 향후 간장보호 약제나 기능성 식품으로서 개발 가능성이 높다. 따라서 이들 식물의 유용 항산화성분을 대량 추출 및 분리하는 공정과 약제 및 식품개발에 필요한 응용연구가 이들을 산업화하는데 필요하다.른 응용 연구가 산업화에 필요하다.

Summary

Ⅰ. Title

Reaearch on Novel Antioxidative Compound from the Unutilized Plant Resources in Korea

Ⅱ. Objective and Importance of the Project

As the consumption of edible oil has been increased in recent times, studies on the devolopment of natural antioxidants has been researched in the view of the protection of antioxidation in lipid rich foods and control of human aging.

Because the toxicity and carcinogenicity of the phenolic systhetic antioxidants e.g. BHA, BHT, TBHQ has been gradually find out, the regulation of using them is being fortified. α-tocopherol is using as natural antioxidant in korea, but it is less effective in plant oil and expensive. Oxygen free radical initiated from *in vitro* and *in vivo* is causing aging, cancer and several diseases by the oxidative damage of living cell. Therefore development of natural antioxidant functional food for preventing these disorders is urgently need. In order to solve these problem some or more, we had been examined the antioxidative effects of some discarded agricultural products and medicinal edible plants and isolated and identified their antioxidant compounds.

On the basis of our research the industrialization of useful resources from discarded agricultural products will be expected in the near furture.

Ⅲ. Scope and Contents of the Project

1. Research on the natural antioxidant from unutilized agricultural products

We had collected and prepared methanolic extracts of 35 kinds of plant leaves, 31 kinds of fruit and vegetable peels, 17 kinds of agricultural by-products and 69 kinds of plant seeds. And the antioxidant effects of them had been examined by 2-deoxyribose oxidation, ferric thiocyanate method in linoleic acid system and soybean lipoxygenase inhibition method. The antioxidant compounds from mulberry leaf, chestnut peels, seeds of *Paeonia lactiflora* and *Humulous japonicus* had been isolated by solvent

fractionation, sephadex LH-20 column chromatography and preparative HPLC. Furtheremore the chemical structure of purified compounds was identifed by the instrumental analysis of UV, IR, MS, 1H and 13C NMR. The effect of their antioxidant compounds on antioxidant enzyme system was examined in bromobenzene administrated rat.
Antioxidant effect using rat liver microsome and tyrosinase effect were also tested. And mutagenicity of these natural antioxidants was verified by the Ames test and SOS chromotest.
In order to examine the usefulness of these extracts and compounds as natural antioxidant, AOM test by peroxide value and rancimat was accompanied.

2. Research on the natural antioxidant from medicinal and edible plant resources

We have studied the effect of 151 extracts of the medicinal and edible plants on the formation of lipud peroxide. The antioxidant compounds from *Angelica keiskei, Armoracis rusticana, Houttuymia cordata* and *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* was isolated by the silica gel chromatography and their chemical structure was identified by UV, MS and NMR.
Their antioxidant effects and physiological detoxification mechanism *in vivo* had been verified in bromobenzene administrated Sprague-Dawley rats.

IV. Results and Recommendations

1. Research on the natural antioxidant from unutilized agricultural products

The antioxidant effect of 152 kinds of unutilized agricultural products e.g. leaf, peel, by-products and plant seeds had been screened by 2-deoxyribose oxidation method, ferric thioxyanate method and lipoxygenase inhibition method. Leaves of the mulberry, ume and chestnut had stronger antioxidant effects than any other kinds of leaves. Peels of the chestnut, onion and sweet potato showed strong antioxidants effects in aqueous and lipid model test system. *Paeonia moutan Sims, Cuscuta australis R. Brown and Torreyta nucifera Sieb. et Zucc* seeds had strong radical scavenging effect and lipoxygenase inhibition effect. Chlorogenic acid, caffeic acid and quercetin-3-o-β-D-glucose, kaempferol-3-o-β-D-glucose was isolated and identified in Mulberry leaf by the preparative TLC and HPLC. The antioxidant effects and tyrosinase inhibition effect

of them were tested. The solvent fraction and identified antioxidant compound had no mutagenicity. Ethyl acetate fraction had stronger effects than α-tocopherol in AOM test by peroxide value and rancimat test.

Ethyl acetate fraction of mulberry leaf showed the strong antioxidant effect in aqueous and lipid model system. Chlorogenic acid, quercetin-3-o-β-D-glucose, kaempferol-3-o-β-D-glucose was identified. Antioxidant effect using rat liver microsome was the strongest in quercetin and tyrosinase inhibition effect was the strongest in chlorogenic acid. Methanol extract and hot water extract of mulberry leaf and antioxidant compounds isolated from them showed no mutagenicity in SOS chromo test and showed antimutagenicity in indirect mutagenicity. Ethyl acetate fraction showed stronger antioxidant effect than α-tocopherol in rancimat test with animal and plant oil.

The ethyl acetate fraction of *Eungi* chestnut endoderm had strong antioxidant effect and was isolaterd by sephadex LH-20 column and HPLC. Gallic acid and ellagic acid was identified by ^{1}H and ^{13}C NMR. They showed comparable antioxidant effect to α-tocopherol using rat liver microsome and DPPH test.

Solvent fraction of chestnut endoderm had no mutagenicity by Ames test and SOS chromotest. The strong antioxidant effect was showed in the acetone extract of 80℃ air dried chestnut endoderm. Chestnut endoderm having strong antioxidant and polyphenol compounds discarded in the chestnut processing company wil be expected to be useful natural resource.

Methanol extract of *Paeonia lactiflora* seeds showed stronger antioxidant effects than α-tocopherol. In order to isolate the strong antioxidant compounds, solvent fractionation, silica gel, sephadex LH-20 column chromatography and preparactive HPLC was executed. 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone(luteolin), 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy flavone,trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol), 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone was identified. These isolated compounds showed stronger effects than α-tocopherol in rat liver microsome test and linoleic acid model system. Methanol extract had no mutagenicity by Ames test and SOS chromotest. Resveratrol isolated from *Paeonis lactiflora* seeds through this study is the novel functional compound contained in wine. Resveratnol has varied physiological activities e.g. antitumor and antiinflamation. In order to develop novel functional food and drugs from this plant seeds, the application study of macro level isolating process and varied pharamacological activies should be urgently needed. The antioxidant flavonoids from

the ethyl acetate fraction of *Humulous japonicus* was isolated using Amberlite XAD-2 column chromatography and preparative ODS HPLC. Vitexin, luteolin-7-o-β-D-glucoside, apigenin-7-o-β-D-glucoside was identified by UV, MS and NMR analyses. Luteolin-7-o-β-D-glucoside and apigenin-7-o-β-D-glucoside showed stronger antioxidant effect than α-tocopherol by the ferric thiocyanate method. On the results of Ames test and SOS chromo test methanol fraction and ethyl acetate fraction showed no mutagenicity. *Humulous japonicus* is richful plant resources well grown in contaminated fields. It has contained high contents of antioxidant flavonoids e.g. luteolin by the result of this study. The application study for macro level isolating these flavonoids and safety and toxicity test should be followed to use functional foods and drugs.

2. Research on the natural antioxidant from medicinal and edible plant resources

We have studied the effect of 151 extracts of the edible and medicinal plants on the formation of lipid peroxide. The extracts of *Angelica keiskei*, *Armoracia rusticana*, *Houttuynia cordata* and *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* decreased the formation of lipid peroxide in the isolated liver of rat. To investigate detoxification of bromobenzene-induced hepatic lipid peroxidation by *Angelica keiskei*, hepatic lipid peroxide level and the activities of enzymes responsible for production and removal of epoxide were studied. The level of lipid peroxide elevated by bromobenzene was significantly reduced by methanol extract and cynaroside. The methanol extract and cynaroside administered daily over 4 weeks before intoxication with bromobenzene did not affect the activities of aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, glu tathione S-transferase. Epoxide hydrolase activity was decreased significantly by bromobenzene, which was restored to the control level by pretreatment of cynaroside. Bioactive component of this plant responsible for the detoxification of bromobenzene, at least in part, is thought to be cynaroside. In the studies on lipid peroxidation in bromobenzene-treated rats *in vitro*, the methanol extract of *Armoracia rusticana*, and kaempferol-3-O-β-D-xylofuranoside, kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside and kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside isolated from *Armoracia*

rusticana inhibited the lipid peroxidation. Hepatic lipid peroxide level in control rats increased significantly by the i.p. injection of bromobenzene and pretreatment of methanol extract of *Houttuynia cordata* prevented rats from hepatic lipid peroxidation. Hispidulin 7-O-neohesperidoside isolated from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* reduced the level of lipid peroxides induced by bromobenzene. Epoxide hydrolase activity was restored in liver of rats given hispidulin 7-O-neohesperidoside. However hispidulin 7-O-neohesperidoside did not influence the activities of aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase and glutathione S-transferase.

CONTENTS

I. Introduction 1
II. Research on the natural antioxidant from unutilized agricultural products 5
1. Preface 5
2. Systematic structure analysis of natural antioxidant 7
3. Materials and methods 24
1) Materials 24
2) Preperation of crude extract 28
3) Determination of antioxidative activity 28
4) Isolation of antioxidative compound 31
5) Identification of antioxidative compound 33
6) Mutagenicity and antimutagenicity 34
7) Tyrosinase inhibition test 37
8) Animal experiment 38
4. Results and discussion 37
1) Screening of unutilized agricultural resources 44
a. Antioxidant effects of unutilized leaves 44
b. Antioxidant effects of unutilized peels 46
c. Antioxidant effects of unutilized seeds 48
2) Isolation of antioxidant compound from mulberry leaf 51
a. Flavonoid content and antioxidant effect by species 51
b. Antioxidant effect of solvent fractions 52
c. Isolation of antioxidant compounds 54
d. Identification of antioxidant compounds 56
e. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition effect 61
f. Mutagenicty and antimutagenicity 64
g. Antioxidant activity of solvent extraction in edible oils 71
3) Isolation antioxidant compound from chestnut peel 75
a. Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidant compounds 75
b. Animal experiment 98
c. Antioxidant activity according drying and extraction conditions 110
4) Isolation and identification of antioxidant compounds from *Paeonia lactiflora* seeds 118
a. antioxidative activity of crude extract 118

b. Isolation of antioxidant compounds 118
c. Identification of antioxidant compounds 121
d. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition effect 126
e. Mutagenicity and Antimutagenicity 130
5) Isolation & identification of antioxidant compounds from *Humulous japonus* 133
a. Antioxidative activity of solvent extraction 134
b. Antioxidative activity of solvent fraction 135
c. Isolation of antioxidant compounds 136
d. Structural identification of anitoxidant compounds 138
e. Antioxidant effect of isolated antioxidant compounds 145
f. Mutagenicity and Antimutagenicity 147
III. Research on the natural antioxidant from medicinal and edible plant resources 155
1. Preface 155
2. Materials & methods 157
1) Materials 157
2) Lipid peroxide inhibition effect 163
3) Isolation of natural antioxidants 166
3. Results and discussion 183
1) Screening of lipid peroxide inhibition effects 183
2) Lipid peroxide inhibition effects and natural antioxidants of *Angelica keiskei* 192
3) Lipid peroxide inhibition effects and natural antioxidants of *Armoracis rusticana* 200
4) Lipid peroxide inhibition effects and natural antioxidants of *Houttuynia cordata* 205
5) Lipid peroxide inhibition effects and natural antioxidants of *Cirsium japonicum* Var. *ussuriense* 211
IV. Results and recommendation 215
1) Research on the natural antioxidant from unutilized agricultural products 215
2. Research on the natural antioxidant from medicinal and edible plant resources 218
V. Reference 219

목 차

제1장 서 론 1
제2장 미활용 농산자원으로 부터 항산화 물질의 탐구 및 이용 5
제1절 서 설 5
제2절 천연항산화 물질의 체계적 구조 분석 7
제3절 재료 및 방법 24
1. 실험재료 24
2. 조추출물의 조제 28
3. 항산화성 시험 28
4. 항산화 물질의 분리 31
5. 항산화 물질의 구조 분석 33
6. 변이원성 및 항돌연변이원성 34
7. Tyrosinase 저해활성 37
8. 동물실험 38
제3절 결과 및 고찰 44
1.미활용 농산자원의 항산화 활성 검색 44
가. 잎류의 항산화 활성 44
나. 껍질류의 항산화 활성 46
다. 종자류의 항산화 활성 48
2. 뽕잎으로부터 항산화 물질의 분리 51
가. 품종별 뽕잎의 flavonoid 함량 및 항산화 활성 51
나. 획분별 항산화 활성 52
다. 항산화 물질의 분리 54
라. 항산화물질의 구조분석 56
마. 분리한 항산화물질의 항산화성 및 tyrosinase 저해활성 61
바. 변이원성 및 항돌연변이원성 64
사. 식용유지에 대한 뽕잎 용매 추출물의 항산화성 71
3. 밤피로부터 항산화 물질의 분리 및 동정 75
가. 밤피의 항산화성 및 항산화 물질의 분리 75
나. 동물실험 98
다. 밤내피의 건조 및 추출조건에 따른 항산화성 110

4. 작약씨로부터 항산화물질의 분리 및 동정 118
가. 조추출물의 항산화성 118
나. 항산화 물질의 분리 118
다. 항산화 물질의 구조 분석 121
라. 분리된 항산화 물질의 항산화성 및 tyrosinase 저해활성 126
마. 작약씨 메탄올 추출물의 변이원성 및 항돌연변이원성 130
5. 환삼으로부터 항산화 물질의 분리 및 동정 133
가. 추출용매별 항산화 활성 133
나. 메탄올 추출물의 용매분획별 항산화 활성 134
다. 환삼덩굴로부터 부터 항산화 성분의 분리 136
라. 항산화 성분의 구조동정 138
마. 분리한 항산화 물질의 항산화성 145
바. 변이원성 및 항변이원성 시험 147
제3장 약용 및 식용식물자원으로부터 항산화 물질 탐구 155
제1절 서설 155
제2절 재료 및 방법 157
1. 실험재료 157
2. 지질과산화억제작용 163
3. 화합물의 분리 166
제3절 결과 및 고찰 183
1. 식용 및 약용식물자원 추출물의 지질과산화억제작용의 탐색 183
2. 신선초의 지질과산화억제작용 및 활성화합물 192
3. 서양고추냉이의 지질과산화억제작용 및 활성화합물 200
4. 어성초의 지질과산화억제작용 및 활성화합물 205
5. 엉겅퀴의 지질과산화억제작용 및 활성화합물 211
제4장 결론 및 건의사항 215
1. 미활용 농산자원으로부터 항산화 물질의 탐구 및 이용 215
2. 약용 및 식용식물 자원으로부터 항산화 물질 탐구 218
제5장 참고문헌 219

제1장 서 론

식용유지의 국내 소비량은 매년 증가하여 1988년도 44만톤 정도가 국내에서 소비되었으며 그 중 38만톤이 식물성유지로 그 사용률이 매년 증가하고 있다. 1995년도에는 약 70만톤이 소비되었고 다가오는 2000년도에는 약 86만톤 정도로 예측된다. 이 중 식물성 유지가 차지하는 비율이 약 95% 정도가 될 것으로 추정된다. 대개 유지의 용도는 가정용 혹은 업체용의 조리 및 튀김용으로 거의 70-80%가 사용되고 있고 그 외에 제빵 및 제과, 쇼트닝, 마가린, 마요네즈, 샐러드, 기타의 용도에 이용되고 있다. 따라서 유지의 이러한 소비량의 증가는 국민소득의 증가에 따른 식생활의 다양함과 영양성과 편이성, 맛 등에 따른 유지를 사용한 튀김식품의 생산 및 소비량의 증가에 기인한다고 할 수 있다. 식물성 유지는 그 자체가 일부 천연항산화제를 함유하고 있으나 불포화지방산의 함량비가 높아 조리 및 튀김의 고온에서 쉽게 산화되어 항산화제의 이용이 불가피하다. 식물성 유지의 이러한 소비량의 증가에 따라 항산화제의 사용도 비례적으로 증가하며 현재 대부분이 수입에 의존하고 있으며 일부가 국내의 식품첨가물회사에서 년간 2억 정도 생산 공급되고 있다.

항산화제는 식품의 자동산화 방지와 인간의 노화 억제라는 측면에서 많은 연구가 진행되어왔으며 합성 항산화제로는 현재 BHA, BHT 등의 페놀계 항산화제가 많이 사용되고 있다. 그러나 이들은 50mg/kg/day 이상을 섭취할 경우 생체 효소계 및 지질의 변화를 유발하고 발암성 등의 부작용이 있다고 보고되고 있다. 또한 휘발성이 아주 높고 고온에서 쉽게 분해되며 식물성 기름에는 그 효과가 낮은 단점이 있다. 이외에 새로이 개발된 페놀계 항산화제가 TBHQ(tertiary butylhydroquinone)인데, 이는 산소 흡수능력은 우수하나 산패에 따른 불쾌취가 문제가 된다. 최근 각종 생체내외에서의 각종 독성 시험 연구 기술의 개발에 따라 이러한 합성 항산화제의 장기 조직에 미치는 유해성이 새로이 밝혀짐에 따라 전 세계적으로 페놀계 항산화제의 법적 규제가 더욱 강화되고 그 사용이 기피되고 있는 실정이다. 따라서 인체에

무해하고 효과나 안정성에서 사용상의 제약이 따르지 않는 강한 항산화력을 지닌 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다. 현재 천연항산화제로서 가장 널리 이용되고 있는 것이 tocopherol이나 이는 식물성 기름에 효과가 낮고 가격이 고가인 점이 문제가 된다. 천연항산화제의 개발을 위하여 가장 많이 연구된 분야는 향신료의 정유성분으로서 이들 성분이 가지는 독특한 이취 때문에 적용성에 문제가 있어 왔다. 또한 유지자원 중에서 참깨의 sesamolinol, sesaminol, sasamol 등의 항산화 성분과 anthocyanin 등의 색소 성분 , 왕겨의 메탄올 추출물 중 isovitexin, 호주의 유카리수 잎 중에서의 항산화 물질이 밝혀진 바 있다. 그리고 최근 국내외에서 오미자, 고구마, 더덕, 해조류, 탈지미강, 감초, 칡뿌리, 인삼, 붉나무 등에서 강한 항산화 효과가 보고되고 있다. 이와 같이 우리가 식생활에서 널리 이용하고 있는 식품재료나 또한 한약재 등의 천연물에 강한 항산화물질이 함유되어 있으나 현재까지도 토코페롤에 버금갈만한 천연항산화제는 개발되고 있지못한 실정이다.

한편 고소득 시대에 접어 들면서 국민의 건강과 장수에 대한 관심이 고조되고 또한 과학과 기술의 발달로 식용식물이 함유하고 있는 각종 기능성(생체조절, 질병예방, 질병회복, 노화억제 등)이 분자 레벨에서 구명되면서 이를 이용한 기능성 식품(식이섬유 음료, 숙취해소 음료, 천연아미노산 음료, DHA강화식품, SOD첨가 식품 등)이 연구 개발되고 있으며 일부 시판되고 있으며 향후 그 수요도 폭발적으로 증가할 것으로 예상된다. 일본의 경우는 문부성이 주관이 되어 '식품 기능의 계통적 해석과 전개'라는 명제아래 1984년부터 1989년까지 범국가적인 과제를 수행하고 이를 실용화하고 있는 단계이며 미국 국립 암연구소에서는 90년도부터 매년 3천만불 규모의 예산으로 암 예방 식품에 관한 연구를 지속적으로 수행하고 있으며 designed food, medicinal food 등으로 시판되고 있다. 이러한 기능성 식품의 시장 규모는 매년 급격히 증가하는 추세에 있다. 기능성 식품과 가장 가까운 개념인 건강 식품의 경우, 우리나라에서 120개사, 24종, 886개 품목이 생산되어 시판되고 있으며 연간 200% 씩 성장하여 현재 약 1천억 여원 정도의 시장 규모를 형성하고 있다. 일본은 현재 3,000여 종류가 시판되어 약 6천억

엔의 시장 규모이며 미국은 92년도 53억불로서 미국 경제성장률의 약 3배에 달하는 연간 13.8% 의 성장율로 시장 규모가 확대되고 있다. 이에 따라 기능성 식품에 관한 FDA 규정도 보완 수정 될 전망이며 우리 나라의 위생법도 일부 개정되어 건강보조 식품의 일부로서 EPA, DHA 함유 식품, 효소 식품, 유산균 식품, 화분 가공 식품 등을 포함시키고 있으나 점차 기능성 식품으로 구체화될 전망이 높다.

대개 이러한 건강식품 및 기능성 식품 중 주종을 이루고 있는 것은 주로 항산화물질을 함유하거나 생체내의 항산화 효소계의 활성증가 등으로 생체조직의 산화적 손상을 방지하며 노화를 억제하고 건강을 유지하며 순환기질환 등의 성인병 예방 및 치유 효능을 가진 천연 항산화성 식품들이다. 선진국의 범국가적인 활발한 연구와 시장 규모의 초고속 성장에 비하여 우리 나라에서는 기술 수준의 부족으로 무분별한 수입 건강식품이 범람하고 있어 이에 대한 대책과 기능성 식품으로서의 천연 항산화제의 개발 및 활용에 따른 국내 기술 개발과 축적, 업계의 기술 이전 등이 시급히 요구됨에도 불구하고 국내에서는 연구 지원이나 활동이 미약한 실정이다. 그리고 최근 국민 소득의 증가와 더불어 각종 신선 채소, 과일과 이를 이용한 음료 등 가공 식품의 소비량이 급증함에 따라 착즙 후의 박이나 잎, 껍질 등의 폐기물도 큰 공해로서 사회적으로 문제화되고 있다. 사과박, 당근박, 감귤의 껍질, 박 등이 그 대표적인 예로서 일부가 사료로서 재활용되고 있으나 전량은 수거 및 폐기되고 있는 실정이다. 그러나 과채류의 껍질과 잎에는 wax 층에 에스테르 결합된 C6-C3 구조 형태인 phenyl propanoid 등 과 C6-C3-C6 구조를 지닌 Flavonoid가 다량 함유되어 있으며 줄기에는 phenyl propanoid 화합물과 lignins 등이 함유되어 우수한 항산화성 소재이나 현재까지 이러한 방면으로는 연구가 거의 전무한 실정이다.

따라서 이러한 점에서 농산 가공 산업의 폐기물과 껍질, 잎 등의 미활용 식물자원 및 식용 및 약용 식물로부터 항산화 효과를 보다 일관성 있고 효율적인 수용성, 지용성 모델 시스템을 이용하여 검색하고 이들 중 활성이 높은 성분을 분리, 정제하며 화학적 구조 결정과 이화학적

인 특성의 구명을 바탕으로 이를 식품첨가물이나 약용제재나 피부미용 등에 기능성 소재로서 재활용할 수 있는 연구가 절실히 요망된다.

제2장

미활용 농산자원으로 부터 항산화 물질의 탐구 및 이용

제1절 서 설

국민 1인당 유지의 연간 소비량은 1980년도 4.98 kg에서 1988년도 10.40kg, 1995년도 15.22, 2000년도 18.7kg으로 매년 큰 폭으로 증가하고 있다. 대개 유지가 튀김 및 조리 식품용으로 이용됨에 따라 유지의 열에 의한 산화 안정성과 보존의 문제를 해결하기 위하여 합성 항산화제를 사용하는 경우가 대부분이며 BHA, BHT, TBHQ와 같은 합성 항산화제의 인체 독성 발암성 등이 크게 문제시되고 있다. 또한 이러한 유지의 섭취량 증가는 유지가 분해되어 생성되는 각종 과산화물 등이 생체 성분에 산화적 작용을 하여 각종 성인병 및 암의 발생율을 가속화시킴으로 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다. 즉 천연 항산화제는 유지 자체의 산화 방지 효과 뿐만 아니라 유지 식품 섭취 후에 생체 내에서 일어날 수 있는 각종 산화적 부작용도 방지할 수 있는 양면적인 효과를 가져다 줄 수 있다.

1969년도 Fridvoch에 의해 인체의 노화에 과산화 지질을 비롯한 free radical이 관여한다는 학설이 제기된 이래 건강과 노화 방지라는 예방학적인 차원에서도 천연 항산화제에 대한 연구가 다각도로 진행되고 있다. 현재까지 천연물 중에서 항산화물질로서는 tocopherol, lignan 유도체, phenol성 물질, flavone유도체, 갈변물질, 아미노산, peptide, 방향족 아민 등이 보고되고 있다. 이외에도 해조류 중에서 phospolipids, 3,4-dihydroxy benzal aldehyde 등이 분리되었다. 국내에서도 인삼, 영지, 붉나무, 생강, 칡뿌리, 향신료 추출물의 항산화 효과에 관한 다수의 보고가 있다. 그러나 이러한 연구는 대부분 그 항산화 활성의 검정이 조추출 내지는 정제되지 못한 획분에 대하여 이루어진 것으로서 그 이용성이 제한되어 있고 경제적인 문제와 그 효과 등으로 인하여 토코페롤 이외에는 사용되지 못하고 있는 실정이다. 한

편 최근 국민 소득의 증가와 더불어 각종 신선 채소, 과일과 이를 이용한 음료 등 가공 식품의 소비량이 급증함에 따라 착즙 후의 박이나 잎, 껍질 등의 폐기물도 큰 공해로서 사회적 문제화되고 있다. 사과박, 당근박, 감귤의 껍질, 박 등이 그 대표적인 예로서 일부가 사료로서 재활용되고 있으나 전량은 수거 및 폐기되고 있는 실정이다. 그러나 과채류의 껍질과 잎에는 wax 층에 에스테르 결합된 C6-C3 구조 형태인 phenyl propanoid 등 과 C6-C3-C6 구조를 지닌 Flavonoid가 다량 함유되어 있으며 줄기에는 phenyl propanoid 화합물과 lignins 등이 함유되어 우수한 항산화성 소재이나 현재까지 이러한 방면으로는 연구가 거의 전무한 실정이다.

또한 최근 과채류의 소비 증가와 함께 용적이 큰 이들의 폐기물이 심각한 환경 및 산업 공해로 대두되고 있으나 이에 대한 대책이 거의 무방비 상태에 있다. 이러한 국민보건적 측면과 환경보호적인 측면에서도 천연 항산화제의 개발과 농산 미활용 자원의 활용 방안이 시급히 요망되며 우리 나라의 부존 식물 자원 중에서 이러한 우수한 천연항산화 기능성 소재의 개발은 우리 국민의 우리 농산물 애호정신과 애국심을 더욱 고취시킬 수 있는 계기가 될 것이다.

제2절 천연항산화 물질의 체계적 구조 분석

식품의 저장, 가공, 유통 등 제관계에 있어서 품질열화의 주요한 원인으로서 지질의 산화, 과산화지질의 생성, 축적을 들 수 있다. 또한 생체내에서도 이러한 원인에 의해서 DNA의 손상, 발암, 노화 등이 유발되거나 촉진된다. 이러한 식품의 열화와 생체조직의 노화 및 이에 따른 질병발생을 예방하기 위하여 천연 기원의 항산화 물질의 검색, 분리, 정제 등의 연구가 다양하게 진전되어 왔다. 그 중 가장 활발한 부분이 향신 식물이며 향신료는 식품의 부패억제 목적뿐만 아니라 약용으로서도 많이 이용되어 왔다. 향신료의 산화방지 효과를 처음 발표한 Maveety에 이어 Chipault는 32종의 향신료를 시험하여 Sage, rosemary, thyme, clove 등의 항산화 효과를 발표하였고, 이후 많은 보고들이 계속되었다. 이중 rosemary, sage, thyme 등에서 많은 페놀성 항산화 물질이 구명되었다. 또한 식물 속에 광범위하게 분포되어 있는 carotenoid, flavonoid, anthocyanin 등의 색소도 그 구조에 따라 강한 항산화 효과를 발현한다. 그 외에 생약을 비롯하여 각종 식용식물이나, 해조류 성분에서도 항산화 효과가 보고되고 있다. 대개 지금까지 보고된 천연 항산화제를 화학구조에 따른 유형별로 구분하면 다음과 같다.

1. 페놀화합물

보통 산성 페놀화합물은 강한 항산화력을 가진 것으로 보고되고 있다. Caffeic acid(1), chlorogenic acid(2)와 4-O-caffeoyl quinic acid(3)가 고구마로부터 분리되었다. 이 중 chlorogenic acid는 식물추출물에 광범위하게 분포되어 있으며, linoleic acid system에서 1.2×10^{-5}M 농도에서 거의 80%의 과산화물 생성 억제능이 있으며, caffeic acid는 그 이상의 항산화력이 있다고 보고되었다. Sterol과 triterpene alcohol의 caffeic acid ester가 *Phalaris canariensis* 종자로부터 분리되었으며, 이들 지용성 ester가 lard oil을 이용한 AOM test에서 BHT에 필적하는 효과가 있는 것으로 알려졌다. 또한 ferulic acid ester도 쌀겨 등

에서 검출되었으며 10-3M 정도의 농도에서 항산화력을 가진 것으로 보고 있다. 한편 본인 등은 mustard에서 3종의 강한 sinapic acid 유도체(4-6)를 분리하여 보고하였으며 이들은 같은 농도에서 caffeic acid 보다 강한 항산화 효과를 나타내었다.

향신료 중 rosemary에서 많은 항산화성 페놀화합물이 분리되었다. Carnosol(7), rosemanol(8), isorosmanol(9), epirosmanol(10)류의 rosemaridiphenol 이며 이중 rosemanol, epirosmanol은 lard 기질의 항산화 시험에서 BHA, BHT 보다 월등히 강한 것으로 평가되었다. 또한 thyme에서 thymol의 dimer로 된 biphenyl 화합물(11,12)이 분리되었고 이는 BHT와 대등한 항산화 활성을 가진다. Turmeric의 메탄올 추출물에서 분리된 황색 색소 curcumin(13)은 linoleic acid 계에서 IC50이 5×10-4M 농도로서 vitamin E보다 강하였다. 이러한 curcumin의 활성은 중심부의 β-diketone 구조의 금속 ion chelation에 의한 것이다. 한편 Osawa와 Hukuda 등은 참깨의 탈지박에서 일련의 항산화성 지용성, 수용성 lignan(14-20)을 분리하였다. 이들은 모두 토끼 적혈구막을 이용한 항산화 실험에서 α-tocopherol 이상의 항산화 효과를 나타내었다.

Cinnamic acid와 flavonoid의 생합성 중간 생성물인 다가의 수산기를 가진 chalcone과 butein(21)도 flavonol quercetin과 α-tocopherol의 2배 정도의 항산화 효과를 나타내었다. 이는 lard의 자동산화시 유도 기간을 1.3 시간에서 50 시간으로 연장하였다. 또한 chalcone 화합물의 수소화(22)는 항산화 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

Ubiquinol(23)은 ubiquinone의 환원물로서 대부분 세포내 환경과 같은 저산소 조건에서 항산화 가능성을 가진 것으로 추정된다. 이는 hemoglobin을 함유한 mitochondrial lipid의 광산화 뿐만아니라 vitamin E와 arachidonic acid emulsion에서 지질 과산화를 억제한다. 이는 in vivo에서 peroxy radical에 chain breaking antioxidant로서 작용하는 것으로 보인다.

지질의 산화억제에는 생성된 perxoy radical을 포촉하여 더 이상의 연쇄반응을 저지하는 것이 필요하다. 주로 페놀계 화합물은 다음과 같이 radical 포촉제로서 이용된다.

$$ROO\cdot + ArOH \rightarrow ROOH + ArO\cdot$$

이때 생성된 perxoy radical은 벤젠고리의 공명 효과에 의해 안정화 된다. 이러한 공명효과는 para위치에 공역이중결합을 가진 치환기나, ortho, para 위치에 1개 이상의 OH기가 붙으면 더욱 커지게 되어 항산화력이 증가한다.

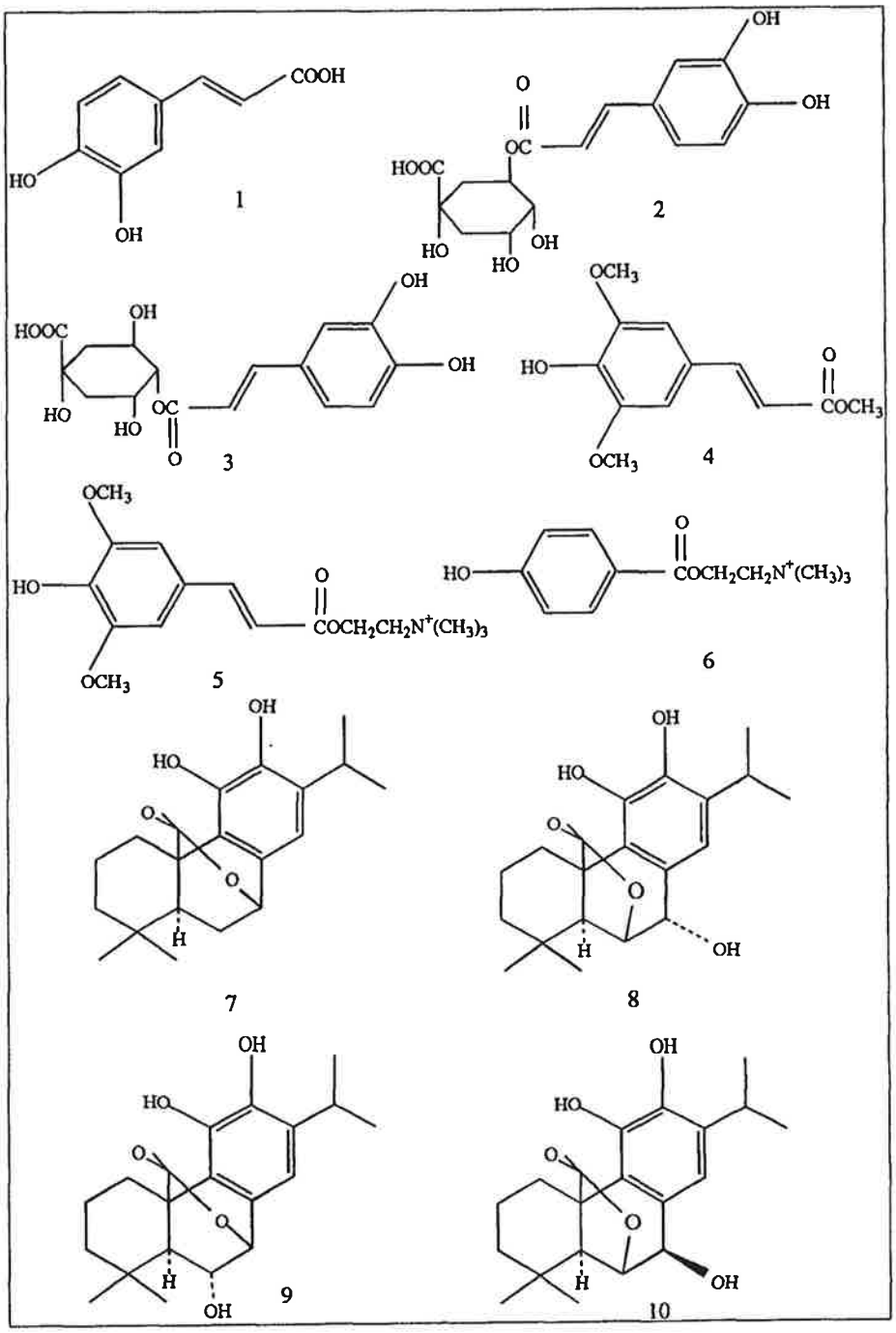


Fig. 1. Chemical structure of antioxidative phenolic compound

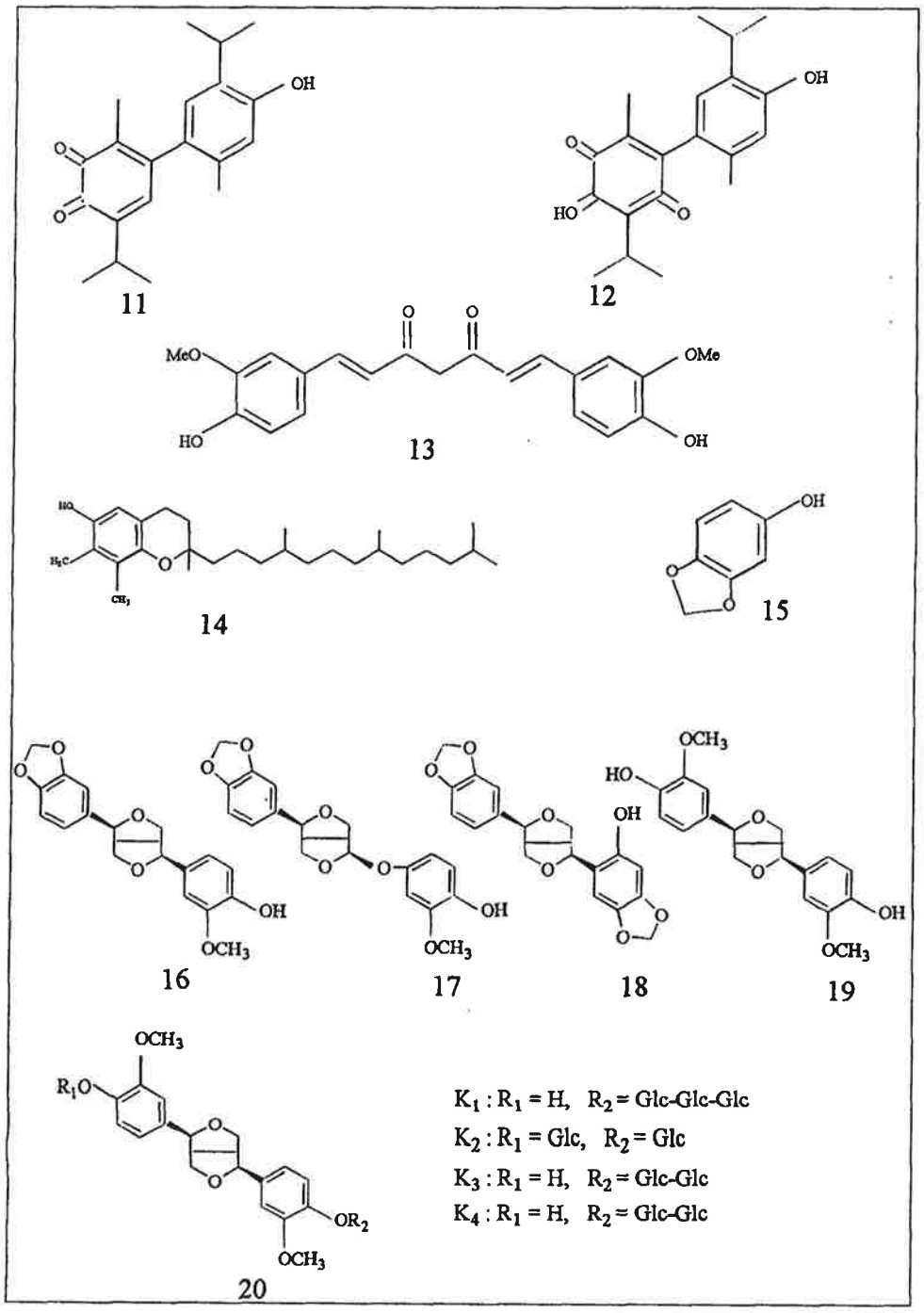


Fig. 1. continued

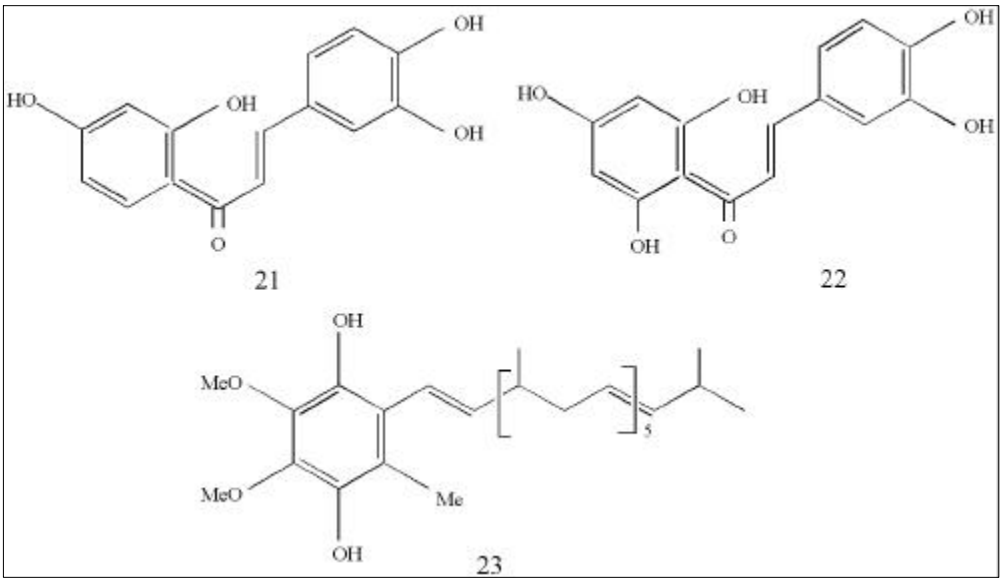


Fig 1. continued

2. Flavonoid

Flavonoid는 식물의 잎과 꽃, 꽃가루, 줄기와 수피 등에 널리 분포되어 있다. 이들의 산화 방지 작용은 오래 전부터 알려져 왔다. 식물체에서 flavonoid와 phenol 화합물의 생합성은 빛과 관련이 깊으며 양지에서 자란 식물이 음지 식물보다 보통 그 함량이 높은 것으로 알려져 있다. Flavonoid는 pyran ring으로 축합된 3개 탄소의 지방족 chain으로 연결된 2개의 benzene 고리로 구성되어 있다. Lea 등[8]이 gossypetin(3, 5, 7, 8, 3′,4′,-hexahydroxyflavone), guercetagetin(3, 4, 5, 7, 3′,4′-hexahydroxyflavone)의 항산화 효과를 발표한 이래 수많은 항산화 flavonoid가 보고 되었다.

Pratt 등은 lard 계에서 여러 채소 조직의 열수 추출물이 항산화 효과를 보이고 이들은 주로 quercetin에 의한 것이라고 하였다. Hudson 등은 ryeglass, broadben, alfalfa의 잎에서 강한 항산화 효과를 나타내었고 이들 중 주성분은 tocophrol, feruic acid, quercetin이라고 하였다. 또

한 Pratt는 linoleic acid와 β-carotene의 혼합계를 이용한 실험에서 5×10-4M 농도에서 B ring에 3′,4′,5′위치에 수산기가 치환된 myricetin(1), robinetin이 가장 활성이 강하고 quercetin(2), dihydroquercetin(3), fisetin(4)의 순으로 활성이 적다고 하였다.

Cavallini 등은 quercetin과 flavonol-lignan 유도체인 silymarin(5)을 rat의 간 microsome과 mitochondrial 계에서 test하였다. Silymarin이 5×10-5M에서 76%의 과산화 억제를 보였으며 quercetin은 동 농도에서 67%의 억제율을 나타내었다.

Torel 등은 linoleic acid와 methyl linolate의 자동산화의 저해제로서 일련의 flavonoid를 test 하고 그중 morin(6)과 kaempferol(7)이 활성이 강하다고 하였다. 그리고 rutin과 quercetin(quercetin glycoside) 역시 항산화 활성을 가지나 이들 활성은 aglycone보다 미비하였다. 본인 등도 감잎으로부터 4개의 flavonol aglycoside(8-11)를 분리하고 이들의 활성을 각각의 aglycone과 비교 하였다. linoleic acid와 토끼의 적혈구막을 이용한 항산화 실험 결과 aglycone 항산화 활성이 glycoside에 비해 강하였으나 이들 glycoside가 acyl化 된 kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside-2″-gallate, quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside-2″-gallate는 거의 BHA와 대등하며 α-tocopherol보다는 월등한 항산화 효과를 나타내었다.

이러한 flavonoid는 prooxidant로 작용하는 금속을 chelating하며 과산화 지질의 peroxy radical에 수소 공여체로 작용하여 항산화 효과를 나타내었다. Flavonoid는 또한 lipoxygenase와 prostaglandin synthetase와 같은 효소적 산화의 저해제로서 작용한다. Rhee 등은 lipoxygenase에 의한 linoleic acid의 자동 산화가 2.5×10-4M 농도의 quercetin 첨가시 90% 억제 된다고 하였다. 그리고 감귤류의 biflavonoid, 콩류의 isoflavonoid의 항산화성에 관하여도 보고된 바 있다.

이러한 보고들을 종합할 때 항산화성 flavonoid는 그 구조상

1. B ring의 O-dihydroxy기를 가지며
2. C ring의 4-oxo기와 C2, C3 이중결합의 conjugation
3. C ring의 4-oxo기와 C3, C5 위치의 수산기

와 같은 요건이 필수적인 것으로 사료된다.

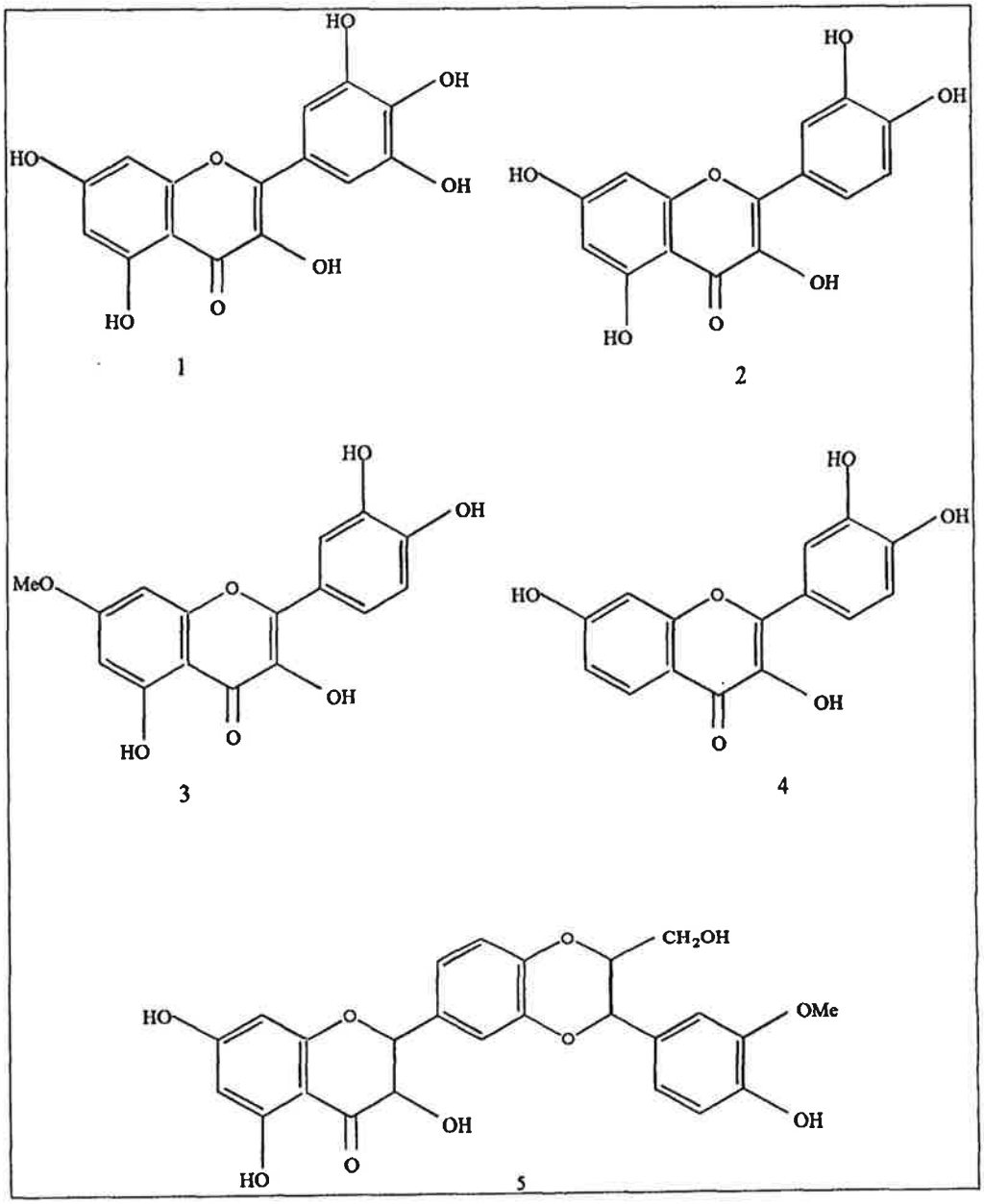


Fig. 2. Chemical structure of antioxidative flavonoids

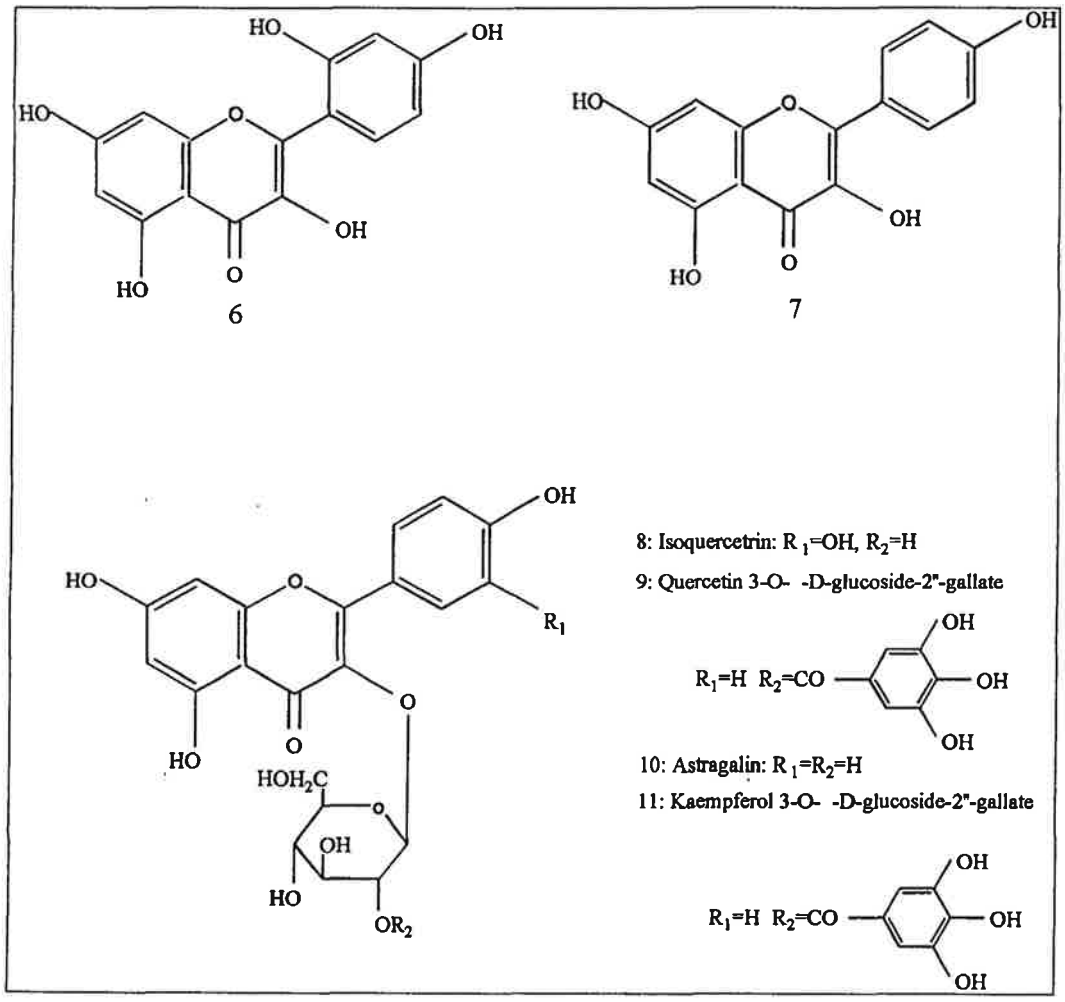
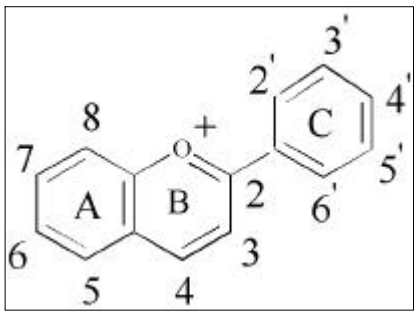


Fig. 2. continued

3. Anthocyanin

안토시아닌은 과실류, 야채류, 서류에 널리 분포 되어 있는 적색 색소이며 천연 착색제로서 주목되고 있다. 최근 그 항산화성도 조사되고 있다. 최근 산포도에서 malvidin-3,5,-diglucoside가 분리되고 linoleic acid 계에서 항산화성이 인정되고 있다.

또한 쌀겨의 에탄올 추출물을 품종별로 그 항산화 활성을 linoleic acid 및 적혈구막 이용계에서 조사한 결과 cyanidin 3-O-β-D-glucopyranoside와 peonidin 3-O-β-D-glucoside의 함량이 높은 수원 425, 혈진미가 BHA와 α-tocopherol에 버금가는 항산화 활성을 나타내었다.



Aglycone	3	5	7	3′	4′	5′
Delphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Cyanidin	OH	OH	OH	O	OH	H
Pelargonidin	OH	OH	OH	H	OH	H
Malvidin	OH	OH	OH	OCH3	OH	OCH3
Peonidin	OH	OH	OH	OCH3	OH	H

Fig. 3. Chemical structure of anthocyanin

한편 Wang 등은 수 종의 anthocyanin의 산소 radical 흡수능을 조사하고 flavonoid와 같은 B환에 3′,4′-CH기가 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 최근 포도주의 심장병 예방 효과에 관한 일련의 효과에서 포도주의 색소 성분인 procyanidin이 인간의 LDL의 산화를 억제한다는 보고가 있어 주목되고 있다. Procyanidin은 polyhydroxy flavon 3-ol, (+)-catechin, (-) epicatechin과 gallic ester의 oligomer이다.

4. Catechin류

Catechin류는 녹차의 polyphenol 화합물의 주성분으로서, 그 중 epigallocatechin gallate(EGCg)가 60%, epigallocatechin(EGC)가 20%, epicatechingallate(ECg)가 14%, epicatechin(EC)가 6% 정도이다. 이들 catechin류의 항산화성을 ACM 법으로 조사한 결과 EGCg>EGC>ECg>EC 의 순이다. 또한 EC의 상대 활성을 1로 하였을 때 EGCg, EGC, ECg는 각각 3.73, 3.64, 1.36이다. 이는 3', 4', 5′-위치에 3개의 수산기를 가진 gallocatechin이 3', 4′위의

dihydroxy형인 catechin보다 활성이 3배 이상인 것을 나타내고 있다. 이들 catechin류는 tocopherol, ascorbic acid, malonic acid, citric acid 등의 유기산과 상승효과를 나타내어 더욱 흥미롭다.

한편 polyphenol류의 항산화 효과를 합성 항산화제와 비교하여 Vinsen 등이 종합적으로 고찰하였다.(Table 1) Flavonoid 중에는 quercetin이 BHA, BHT와 유사한 강한 활성을 나타내었고 녹차의 catechin류인 EGCg, EGC, ECg 등은 모두 BHA보다 낮은 IC50치를 나타내었다. 페놀산 중에는 tannic acid, caffeic acid, pyrocatechol이 비교적 강한 활성을 보이고 있다.

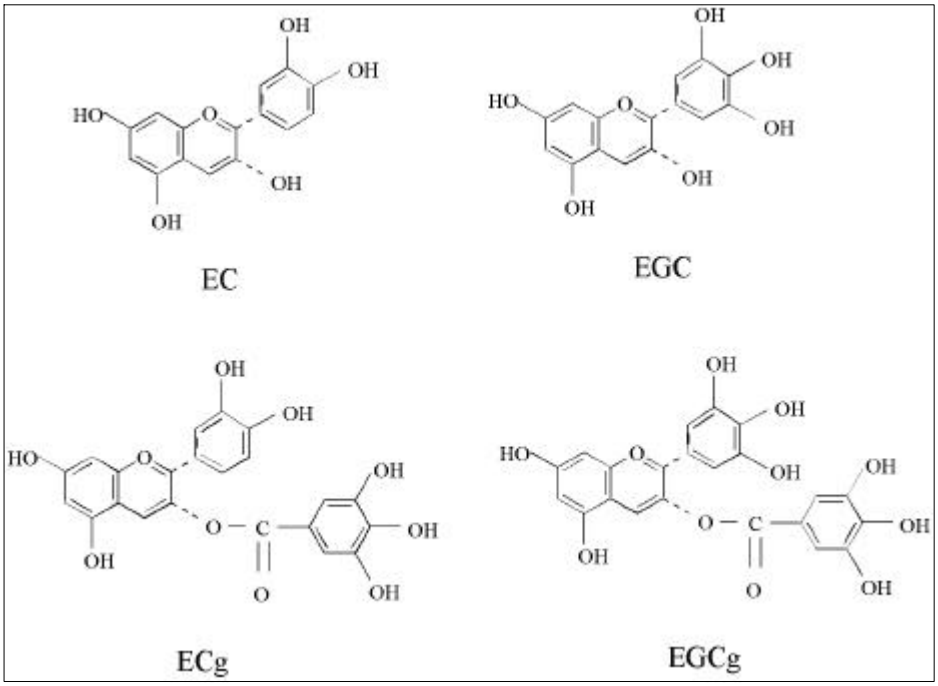


Fig. 4. Chemical structure of tea polyphenol compounds

Table 1. Comparison of Antioxidants Effectiveness of Vitamins, Flavonoids and Phenolsa

compound	CH substitution	IC50 (μM)
trolox	mone	1.26
ascorbic acid (vitamin C)	vicinal	1.45
α-tocophenol (vitamin E)	mone	2.40
β-carotene (provitamin A)	none	4.30
	Flavones	
genistein (isoflavone)	5,7,4′	14.3
apigenin	5,7,4′	>16
baicalein	5,6,7′	>16
chrysin	5,7	>16
flavone	none	>16
	Flavanones	
hesperitin	5,7,3′	3.66
hesperidin(hesperetin rutinoside)	5,3′	>16
neohesperidin	5,3′	>16
naringenin	5,7,4′	>16
	Flavonols	
quercetin	3,5,7,3′,4′	0.224
taxifolin (dihydroquercetin)	3,5,7,3′,4′	0.344
morin	3,5,7,2′,4′	0.734
kaempferol	3,5,7,4′	1.82
	Flavanols	
epigallocatechin 3-gallate	5,7,3′,4′,5′,3″,4″,5	0.075
epigallocatechin	3,5,7,3′,4′,5′	0.097
epicatechin 3-gallate	5,7,3′,4′,3″,4″,5″	0.142
catechin	3,5,7,3′,4′	0.187
	Anthocyanins	
cyanindin chloride	3,5,7,3′,4′	0.212
grape skin extract		0.951b
	Phenolic Acids	
tannic acid (2-5 gallic ester with glucose)		0.152
caffeic acid (cinnic acid)	3,4	0.241
nordihydroguairetic acid pyrocatechol)	3,4,3′,4′	0.255
chlorogenic acid (cinnamic ester)	3,4	0.296
3,4-dihydrobenzoic acid	3,4,	0.455
gallic acid (benzoic acid)	3,4,5	1.25
ellagic acid (gallic lactone)	one ortho, one mono	2.50

5. Carotenoids

Singlet oxygen의 우수한 quencher로서 식물조직의 광산화를 억제하는 것으로 알려져 있다. Carotenoid의 conjugated diene의 수가 증가할수록 항산화 효과는 증가한다. 그러나 저산소 농도에서는 β-carotene이 radical로 전환되어 산화를 촉진하기도 한다.

6. Chlorophyll 유도체

Chlorophyll 과 pheophytin은 감광제로서 빛의 존재하에 산화를 촉진한다. 빛이 없는 조건하에서는 자동산화의 억제효과를 가진다. 30℃ 암실에서 chlorophyll A는 2×10^{-5}M 농도하에서 peroxy radical과 반응하여 BHT의 거의 2배 정도의 산화 억제 효과를 가진다.

7. Alkaloids

다양한 고등식물로부터 얻어지는 함질소성분은 in vivo 및 in vitro에서 일어나는 산화과정을 억제시킬 수 있는 잠재적인 inhibitor라는 사실을 뒷받침할 자료가 많이 나오고 있다. 방사선이나 철이온에 의해 유도된 지질과산화는 bisbenzylisoquinoline alkaoid cepharanthin(1)에 의해 억제된다고 보고되었다. 미토콘드리아의 지질과산화 진행 20분 후 이 성분을 2.5×10^{-5} M 농도로 첨가하자 지질과산화가 50% 억제되었다. tea의 잎과 coffee로부터 얻은 caffeine은 BHA 및 BHT와 비슷한 항산화활성을 보였다.

합성한 6-hydroxy-1,4-dimethylcarbazole(2)은 항종양물질인 alkaloid 9-hydroxyellipticine(3)과 밀접한데 몇몇 in vitro 과산화계에서 뛰어난 inhibitor작용을 나타내었다. 이 물질은 1nmol/mg protein농도에서 rat liver microsomes의 과산화를 완전히 억제하였으며 이보다 아주 낮은 농도에서도 propyl gallate와 같은 합성 항산화제의 활성보다 강력한 억제작용을 하는 것으로 나타났다. 이와 유사한 mepacrine(4)은 항원생동물성 약품으로 quinine과 유사하고 rat의 적혈구의 과산화에 의한 용혈현상과 malondialdehyde형성을 활발히 억제한다. 이는 소

수성의 양이온을 띄는 약품이 인지질과 세포막의 다른 음이온 물질과 강하게 결합하기 때문인 것으로 보인다.

다양한 구조를 가진 몇몇 alkaloid가 $^1O_2$ 억제제로 발견되었다. 특히 strychnine(5a)과 brucine(5b)과 같이 indol alkaloid가 뚜렷한 활성을 나타내었다. 그러한 alkaloid는 엄격히 물리적인 quencher로 포촉 과정 중에 화학적으로 분해되지 않으므로 많은 singlet oxygen 분자들을 불활성화시킬 수 있다.

spermine(6)과 같은 polyamines는 콩과 식물에서 발견되며, 이 물질은 고농도에서 superoxide radical을 제거하는 것이 밝혀졌다.

trimethylamine과 같은 3차 아민류는 peroxy radicals 포촉활성이 아주 뛰어난 것으로 나타났다. 아민으로부터 유도된 radical은 매우 큰 termination rate 상수를 가져 radical의 chain reaction 종결에 효과가 큼을 설명하고 있다.

quinolizidine type의 alkaloid, 예를 들면 sparteine(7)는 *Lupinus*속의 4종류의 식물체의 표피세포에 주로 20mM까지 축적되어 있다. 이러한 현상은 이런 성분이 광화학 작용에 대한 산화 작용을 억제하는 것과도 연관이 있다. 그러나 이들 성분은 태양광선의 UV흡수가 아주 적어 자외선의 filter 역할은 아닌 것 같다.

9. Amino acids peptides and proteins

아미노산은 항산화제일뿐만 아니라 산화촉진제로서의 활성도 보인다. Marcuse는 linoleic acid, methyl linoleate, methyl linolate를 기질로 하여 alanine, glycine, histidine, tryptophan 과 같은 아미노산의 항산화력을 측정하였다. 이중 histidine과 tryptophan이 가장 큰 활성을 보였고 glycine, alanine순으로 나타났다. 대부분의 아미노산이 저농도에서 확실한 항산화력을 보였지만 고농도에서는 산화촉진제로서의 활성을 보이기도 하였다. pH에 따라서는 낮은 pH에서는 산화촉진제로서, 높은 pH에서는 항산화제로서 작용하였다.

16종의 아미노산을 농도 1%로 하여 safflower(잇꽃) oil emulsion에 대한 항산화력을 측정하였다. 이들 중 histidine, lysine, methionine threonine만이 항산화효과를 나타내었고 다른 아미노산은 산화를 촉진시키는 것으로 나타났다. 수용액계에서의 아미노산의 이러한 산화촉진 효과는 양성자화 된 amino nitrogen 때문인 것으로 보이며 비수용액계에서는 아미노산과 금속의 결합에 의한 것으로 보인다.

Clausen등은 lard를 기질로 하여 100ppm 농도에서의 아미노산과 α-tocopherol, hydroquinone, nordiphydroguaiaretic acid를 조합하여 상승효과를 측정한 결과, methionine과 tryptophan이 가장 큰 상승효과를 나타내었다. 합성항산화제인 Trolox-C과 공유결합한 형태인 Troloxyl-methionine-methyl ester는 corn oil에 대하여 BHA나 BHT보다 큰 항산화력을 나타내었다. 이들은 헤모글로빈에 의해 산화촉진된 linolate emulsion계에서는 BHA와 BHT보다 항산화력이 낮았다.

가수분해된 대두단백도 lard에 대하여 항산화효과가 있는 것으로 나타났다. 특히, 분자량이 700 dalton 이하의 저분자량의 peptide가 고분자량의 peptide보다 항산화 효과에 주요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

Romijn 등은 0, 8, 16, 24%의 대두 추출물을 가열한 beef와 냉동한 beef에 각각 첨가하였을 때 TBA value가 감소하였다고 보고하였다.

10. Phospholipids

Phospholipids는 oil의 향미안정성에 중요한 인자로 인식되어왔다. Phospholipids은 oil에 대하여 항산화제로, 상승제로, 촉매제로, 산화촉진제로, off-flavor 전구체로 작용하는 것으로 나타났으며 phospholipids가 tocopherol과 같은 항산화제와 함께 oil의 향미안정성을 유지하는데 상승효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

Phosphatidyl choline은 금속을 함유하지 않은 soybean oil의 산화안정성은 상승시키지 못하

였으나 0.5 내지 1ppm의 Fe를 함유한 soybean oil에 대해서는 산화안정성을 증가시켰다. 이러한 결과로 phosphatidyl choline은 Fe에 대한 촉매제로 작용하여 Fe를 함유한 oil에 대해서는 산화안정 효과를 가져오는 것으로 보여진다. 이들 중 phosphatidyl ethanolamine과 phosphatidic acid가 phosphatidyl choline 과 phosphatidyl glycerol에 비해 우수한 항산화 효과를 보였고 phosphatidyl inositol이 가장 낮은 효과를 나타내었다.

phospholipid는 산화에 민감한 불포화지방산 함량이 높은 oil에 대해서는 산화촉진제로 작용할 수 있다. phospholipid가 상당량 존재하게 되면 oil의 색깔을 어둡게 하며 off-flavor의 전구체가 된다. 따라서 phospholipid는 식품의 조성에 따라 항산화제이거나 산화촉진제로 작용하게 된다.

11. 기타 천연 항산화제

Oliveto는 많은 식물체, 특히 대표적으로 미국 남서부 지방에 서식하는 cresote bush(*Larrea divaricata*)의 수지계 성분 중에 존재하는 항산화제인 NDGA에 대해 조사하였다. NDGA는 회백색의 결정체로 상업적으로 합성이 되며 1950, 60년대에 식품에 항산화제로 널리 사용되었으나 그 이후 독성실험의 결과 발표로 식품뿐만 아니라 GRAS list에서도 삭제되었다.

구아검은 인도서부지방의 나무(*Guajacum officinale*)로부터 얻어진다. 구아검의 항산화성분은 α,β-guaiaconic acid로 수년간 동물유지의 산화를 억제하기 위해 첨가되어 왔으며 상승제로는 phosphoric acid 유도체를 사용하여 왔다. Mastic은 지중해연안지방에서 자라는 *Pistacia lentiscus*로부터 얻어지는 수지로 항산화제 로서 terpenolic acid를 함유하고 있고 면실유와 해바라기유에 대해 BHA와 유사한 항산화효과를 보인다. 일부 미생물과 algae도 항산화력을 가지고 있다. 무색결정체인 2-benzofuran은 Baker' and Brewers' yeast의 혼합물로 부터 분리된 항산화제이다. Smith와 Alford는 14종의 bacteria와 그람양성균 및 음성균의 항산화특성을 lard에 대해 조사한 결과 일부 산화를 억제하는 효과가 있었으나 BHA, BHT, α

-tocopherol에는 미치지 못하였다. Zaika와 Smith는 *Aspergillus niger*와 *Pseudomonas ovalis* 추출물이 lard에 대해 항산화효과가 있다고 보고하였다. Tutor는 7종의 algae 추출물을 첨가하여 해바라기유를 75℃에 보관하면서 실험한 결과 항산화효과가 있었다고 보고하였으며 vitamin E에 대하여 상승효과가 있었다고 하였다.

제 3 절 재료 및 방법

1. 실험재료

실험용 시료는 미활용 농산 식물자원 중 경제적인 면과 환경적인 면 등을 고려하여 잎 35종, 과피 31종, 농산가공부산물 17종, 씨 69종을 포함하여 현재까지 총 152종을 수집하여 음건한 후 분쇄하여 보존하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. The sample list of unutilized plant leaves for antioxitative test

NO	sample name	production area	ID	NO	sample name	production area	ID
1	콩잎	군위	GML	19	유채잎	제주	BRL
2	참깨잎	군위	SIL	20	매실잎	광양	PML
3	들깨잎	군위	PFL	21	호프잎	횡성	HLL
4	토란잎	군위	CAL	22	고구마잎	군위	IBL
5	복숭아잎	청도	PPL	23	사과잎	경북대농장	MPL
6	감잎	상주	DKL	24	포도잎	경북대농장	VVL
7	겨자잎	군위	BNL	25	환삼잎	팔공산	HJL
8	땅콩잎	군위	AHL	26	밤잎	광양	CCL
9	팥잎	군위	PAWL	27	담배잎	대전	CAL
10	칡잎	군위	PTL	28	인삼잎	대전	PGL
11	마늘잎	위성	ASL	29	방아잎	하동	ARL
12	은행잎	군위	GDL	30	익모초잎	약령시장	APL2
13	감자잎	군위	STL	31	대추잎	경산	ZJL
14	호박잎	군위	CML	32	뽕잎(KS)	상주	MAL1
15	박잎	군위	LLL	33	뽕잎(개량종)	상주	MAL2
16	쑥잎	인제	APL1	34	뽕잎(청잎)	상주	MAL3
17	고추잎	군위	CAL	35	아카시아잎	팔공산	RPL
18	감귤잎	제주	CUL				

Table 2. The sample list of unutilized fruit and vegetable peels for antioxitative test

NO	sample name	production area	ID	NO	sample name	production area	ID
1	꽃사과과피	경북대농장	MP1	17	호박외피	칠곡	CMCP
2	홍옥과피	경북대농장	MP2	18	호박내피	칠곡	CMIP
3	부사과피	경북대농장	MP3	19	완두콩피	칠곡	GMP
4	다노넷피	칠성시장	VVP1	20	땅콩외피	군위	AHCP
5	거봉피	칠성시장	VVP2	21	양파피	창녕	ACP
6	세레단피	칠성시장	VVP3	22	수박내피	성주	CVIP
7	감피(둥시)	칠곡	DKP1	23	수박외피	성주	CVCP
8	감피(부유)	진영	DKP2	24	바나나피	칠성시장	BAP
9	밤외피	광양	CCP	25	감자피	군위	STP
10	옥수수외피	강원도	ZLP	26	고구마피	군위	IBP
11	참외피	성주	CMMP	27	코코넛피	롯데제과	CNP
12	금귤피	제주	CU1	28	병귤피	제주	CU6
13	하귤피	제주	CU2	29	심감하피	제주	CU7
14	용연만감피	제주	CU3	30	당유자피	제주	CU8
15	금감자피	제주	CU4	31	조생온주피	제주	CU9
16	팔삭피	제주	CU5				

Table 3. The sample list of unutilized agricultural by-products

No	sample name	prodution area	ID	No.	sample name	pro ution area	ID
1	고추씨	군위	CAS	18	사과박	협성농산	MPR
2	참외씨	성주	CMMS	19	당근박	건영식품	DCR
3	호박씨	칠곡	CMS	20	맥주박	OB맥주	BBR
4	감씨(둥시)	칠곡	DKS1	21	대추박	미건식품	ZJR
5	감씨(부유)	진영	DKS2	22	청주박	경주법주	CHR
6	사과씨(꽃사과)	경북대 농장	MPS1	23	마늘순	의성	ASR
7	사과씨(부사)	칠성시장	MPS2	24	메밀껍질	군위	FER
8	사과씨(홍옥)	칠성시장	MPS3	25	콩깍지	군위	CMR
9	수박씨	경남 하동	CVS	26	참깨꼬투리	군위	SIR
10	인삼씨	대전	PGS	27	옥수수수염	강원도	ZL
11	포도씨(거봉)	칠성시장	VVPS1	28	호프꽃	OB맥주	HLR
12	포도씨(다노넷)	칠성시장	VVPS2	29	유채꽃	제주	BRR
13	포도씨(세레단	칠성시장	VVPS3	30	철쭉꽃	팔공산	RSR
14	대추씨	하양	ZJS	31	돌나물	팔공산	SSR
15	복숭아씨	청도	PPS	32	아카시아꽃	팔공산	RPR
16	오디(국상)	상주	MAR1	33	방아줄기	경남 하동	ARR
17	오디(카다네오)	상주	MAR2	34	환삼덩굴	팔공산	HJ

Table 4. The sample list of various plant seeds

No.	Korean name	Plant seeds	No.	Korean name	Plant seeds
1	감	*Diospyros kaki* Thunb.	19	매실	*Prunus mume* Sieb. et Zucc.
2	(백)개자(겨자)	*Brassica juncea* Cosson	20	맥아	*Hordeum vulgare* L.
3	검인(가시연꽃)	*Euryale ferox* Salisbury	21	모란	*Paeonia moutan* Sims
4	견우자(나팔꽃)	*Pharbitis nil* Choisy	22	밀	*Triticum aestivum* L.
5	결명자	*Cassia tora* L.	23	백자인 (측백나무)	*Thuja orientalis* L.
6	고추	*Capsicum annuum* L.	24	비자(주목)	*Torreyta nucifera* Sieb. et Zucc.
7	공사인(축사밀)	*Amomum xanthoides* Wallich	25	사철나무	*Euonymus japonicus* Thunb.
8	과루인 (하늘타리)	*Trichosanthes kirilowii* Max.	26	산조인	*Zizyphus jujuba* Miller
9	구맥(패랭이)	*Dianthus sinensis* L.	27	서과피(수박)	*Citrullus vulgaris* Schrad
10	구자(부추)	*Allium odorum* L.	28	석류	*Punica granatum* L.
11	금귤	*Citrus aurantium* L.	29	소자(차조기)	*Perilla sikokiana* Nakai
12	기장	*Panicum miliaceum* L.	30	수세미	*Lufa cylindrica* Roem
13	나복자(무우)	*Raphanus sativus* L.	31	수수	*Sorghum bicolor* Moench
14	녹두	*Rhaseolus radiatus* L.	32	시금치	*Spinacia oleracea* L.
15	대풍자	*Hydnocarpus anthelmintica* Pierre	33	연자	*Nelumbonucifera Gaertner* var. macrorhizimata Nakai
16	도인	*Prunus persica* Batsch	34	옥수수	*Zea Mays* L.
17	동과자(동아)	*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogniaux	35	욱이인(산이스라지)	*Prunus ishidoyana* Nakai
18	동규자(아욱)	*Malva verticillata* L.	36	운랑자(유채)	*Erassica campestris* L.

Table 4. continued

No.	Korean name	Plant seeds	No.	Korean name	Plant seeds
37	차전자(질경이)	*Plantago asiatica* Decaisne	45	행인	*Prunus ansu* (Max.) Komarov
38	참외	*Cucumis melo* L. var makuwa	46	호마(참깨)	*Sesamum indicum* L.
39	청상자(개맨드라미)	*Selosia argentea* L.	47	정력자(꽃다지)	*Draba nemorosa* L. var. hebecarpa Ledebour
40	충위자(익모초)	*Leonurus sibiricus* L.	48	조	*Setaria italica* BEAUV
41	토사자(실새삼)	*Cuscuta australis* R. Brown	49	월견초	*Oenothera odorata* Jacq.
42	팥	*Phaseolus angularis* Wight	50	은행	*Ginkgo biloba* L.
43	포도	*Vitis vinifera* L.	51	의이인	*Coix ma-yuen* Roman
44	피마자	*Ricinus communis* L.			

2. 조추출물의 조제

분쇄한 시료 일정량을 10배량의 메탄올을 가하여 5시간씩 2회 항온진탕기에서 추출, 여과하고 회전감압농축기에서 용매 및 잔존 수분을 제거 후 활성 검정 시료로 사용한다. 씨 및 지질의 함유량이 많은 시료는 5배의 n-hexane으로 3시간씩 2회 항온진탕기에서 탈지 후 잔사를 위와 같은 방법으로 메탄올로 조추출물을 제조하였다.

3. 항산화성 시험

가. 수용성 모델계 검정법

1) 2-Deoxyribose 산화법

시료의 ·OH 소거활성은 2-deoxyribose oxidation method로 측정하였다. 시험관에 0.1mM $FeSO_4$/EDTA 용액 0.2ml, 10mM 2-deoxyribose 0.2ml, 시료액 0.2ml와 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2ml, 10mM H_2O_2 0.2ml를 가하고 37℃ 수욕조에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1ml를 가하여 반응을 중지시키고, 1.0% TBA(thiobarbituric acid)용액 1ml를 가하여 100℃ 에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532nm 에서 흡광도를 측정였으며, 다음의 식으로부터 소거활성을 계산하였다.

$$\cdot OH \text{ radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{(A_{bs} - A_{bo})}{(A_{bc} - A_{bo})}\right) \times 100$$

Abo : Absorbance of no treatment at 532nm

Abc : Absorbance of treated control at 532nm

Abs : Absorbance of sample at 532nm

2) Benzioc acid 수산화법

안식향산은 fenton 반응에서 유발된 ·OH에 의하여 C3, C4위치에 수산화된다. 안식향산의 수산화 정도를 형광광도계를 이용하여 측정하여 이를 시료의 상대적인 항산화력으로 평가한다. 0.1mM Fe^{2+}/EDTA 용액 200㎕, 0.1 mM sodium benzoate, 시료액 200㎕(0.1㎎/㎖)와 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 1200㎕, 10mM H_2O_2 200㎕를 가하고 37℃ 수욕조에서 2시간 반응시킨 후 0.1 mM DTPA(Diethylenetriamine-N,N,N',N",N'"-penatacetic acid)를 가하여 반응을 정지시킨 후 형광광도계에서 exicitation 305㎚, emission 407 ㎚에서 형광강도를 측정하였다.

3) DPPH radical scavenging activity

각 추출물의 free radical sacvenging activity는 Blois의 방법(1958)에 따라 DPPH를 이용하여 측정하였다. 즉, 0.2mM 1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl(DPPH) 1.0㎖에 메탄올추출물

(50㎎/㎖) 2.0㎖을 가하여 상온에서 10분간 방치한 후 517㎚에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 따라 시료의 radical scavenging activity를 구하였다.

100 - (A/B × 100) A: 517㎚에서 시료의 흡광도

B: 517㎚에서 메탄올(시료무첨가구)의 흡광도

나. 지용성모델계 검정법

1) Ferric thiocyanate법

Linoleic acid를 기질로 한 과산화 반응에서 과산화물의 생성 억제능은 Nakatani 등의 thiocyanate 방법에 따라 시험하였다. 80% 에탄올에 녹인 각 시료 추출물 120㎕(5, 10㎎/㎖)를 2.51% linoleic acid 2.88㎖, 40㎜M phosphate buffer(pH 7.0) 9㎖와 혼합한 후 40℃에서 incubation하면서 경시적으로 시료액 100㎕를 취하여 75% 에탄올 9.7㎖에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate액 100㎕, 20㎜M $FeCl_2$/3.5% HCl 100㎕ 씩을 가한 다음 정확히 3분 후 500㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) Soybean lipoxygenase(SLC) assay

SLO assay는 Block 등의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 0.1M Tris buffer(pH 8.5) 2㎖와 시료용액 20㎕을 넣은 cuvette에 soybean lipoxygenase(type Ⅴ, 500U/최종농도) 30㎕을 넣고 5분간 반응시킨 후 linolenic acid(110㎛M/최종농도) 50㎕을 가하여 234㎚에서 2분간 직선적으로 증가하는 흡광도의 변화를 관찰하였다. 이때 각 시료의 효소저해율은 다음 식에 따라 측정하였다.

저해율(%) = (A-B)/A × 100 A: 시료무첨가구의 2분후 234㎚에서 흡광도

B: 시료의 2분후 234㎚에서 흡광도

3) Rancimat법

메탄올 조추출물의 항산화 효과를 이용하여 Rancimat을 사용하여 무첨가구를 대조구로 하여 항산화 정도를 AI(antioxidative index, 추출물 첨가구의 유도기간 / 무첨가구의 유도기간)로 표시하였다. 첨가량은 100ppm, 10ppm으로 하고 측정조건은 130℃, air flow rate 20ℓ/hr, 유지사용량은 2.5g으로 하였다.

4) Peroxide 가의 측정

대두유, 돈지, 들깨유를 기질로하여 oven test를 실시하였다. 시험관에 시료를 500ppm의 농도로 가한 후 용매를 휘발시키고 대두유 4g을 가하여 혼합한 후 70℃에서 산화를 유도하면서 일정 간격으로 시료 일정량을 취하여 과산화물가를 측정하였다.

4. 항산화 물질의 분리

가. 용매분획

조추출물을 10% 메탄올에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 계통 분획하여 chloroform(ethyl ether), ethyl acetate, butanol 및 H_2O 층을 얻고 감압농축하여 활성 시험용 시료로 사용하였다.

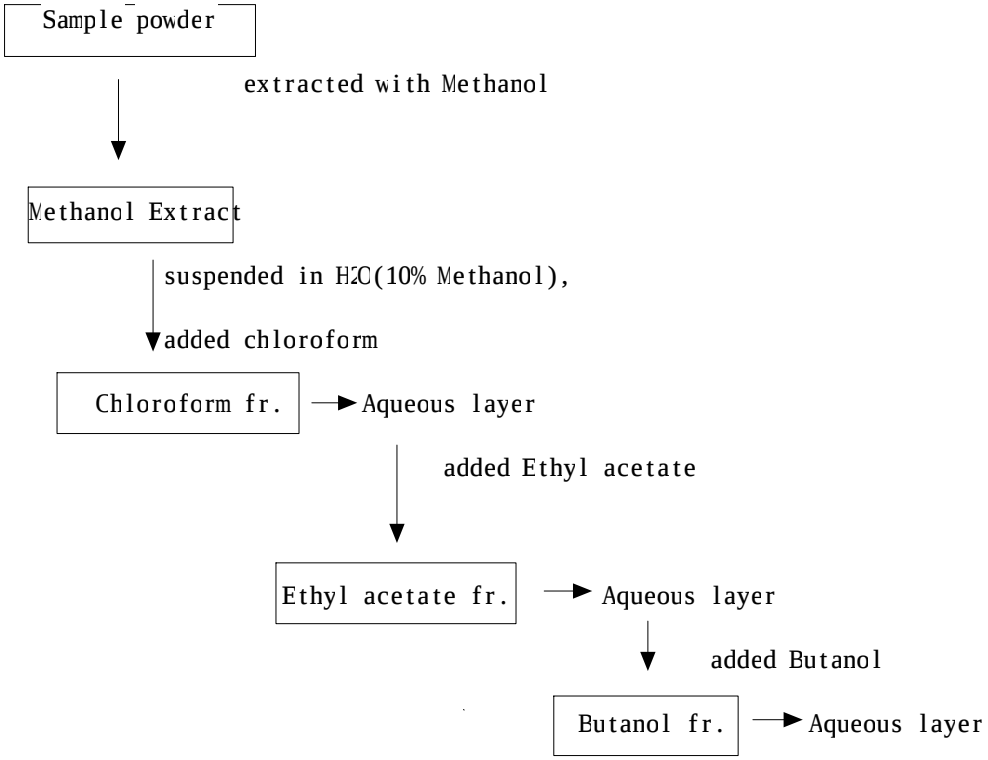


Fig. 1. Schematic diagram for the solvent fractionation of extract from each samples.

2) column chromatography에 의한 분리

항산화 성분을 분리하기 위해서 Amberlite XAD-2 column chlomatography, Sepadex LH 20 column chromatography, Silica gel column chromatography를 행하였다.

3) TLC에 의한 분리

활성이 뛰어난 획분에 대하여 silica gel coating plate(sigma, 250㎛ thick)를 사용하여 ethyl acetate : methanol : H2O2 (7 : 1: 2) 혼합용매를 전개용매로 사용하였다. 전개 후 육

안 및 UV lamp로 band를 확인하였다. 각각의 band를 확인한 후 Prep. TLC를 사용하여 ethylacetate : methanol : H_2O (75:14:11)를 전개 용매로 사용하여 전개 후 각 band를 모아 ethyl acetate 50㎖로 2회 추출한 후 농축하여 HPLC로 각각의 band를 확인하고 구조분석에 사용했다.

4) HPLC에 의한 분리

항산화 활성이 뛰어난 획분에 대하여 감압농축하여 methanol에 녹인 후 0.45㎛ membrane filter로 여과 하고 고속액체크로마토그래피법으로 분석하였다. 사용된 기기는 HPLC(LC-10A, Shimadzu Co, Japan), column은 Develosil ODS-5(5㎛, 250 × 4.6㎜ i.d., Nomura Co., Japan), mobile phase는 H_2O(100%)에서 methanol(100%)까지 gradient로 60분간, flow rate는 0.8㎖/min의 조건으로 분석하였다. 검출은 UV detector(SPD-10A, Shimadzu Co, Japan)를 사용하여 254㎚, 280㎚에서 실시하였다.

5. 항산화 물질의 구조 분석

가. UV-visible spectrophotometry

시료를 메탄올에 용해한 후 spectrophotometer (S2030, SINCO Co., Korea)를 사용하여 200-600㎚의 영역에서 scanning하여 그들의 최대흡수파장을 측정하였다.

나. ^1H-NMR 및 ^{13}C-NMR spectroscopy

시료의 ^1H, ^{13}C-NMR (500MHz)의 스펙트럼은 Unity Plus 300 spectrometer (Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였으며, 이때, CD_3OD, D_2O 및 acetone d6를 시료용매로, 그리고 내부표준물질로서 TMS (trimethylsilane)를 각각 사용하였다.

다. EI-MS spectrometer

시료의 분자량은 Quattro II EI-MS spectrometer (VG, U.K)를 사용하여 이온화전압(70eV), ion source temperature 200℃의 조건에서 direct inlet 방식으로 측정하였다.

6. 변이원성 및 항돌연변이원성

가. Ames test

1) 사용균주 및 유전적 특성

Ames test에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100으로서 TA 98은 histidine dehydrogenase를 coding하는 *hisD* gene에 돌연변이를 일으킨 것으로 frame shift mutation이 일어난 부근에 반복되는 8개의 -GC-잔기들, 즉 -GCGCCCGC-의 sequence를 가진다. 따라서 TA 98은 frame shift mutagen을 검출하는데 이용된다. 한편 TA 100은 histidine 생합성의 첫 번째 효소를 coding하는 *hisG* gene에 돌연변이를 일으켜 wild type의 -GAG-(leucine)이 -GGG-(proline)으로 치환되어 있다. 따라서 TA 100은 주로 G-C pair들의 하나에서 point mutation을 일으키는 돌연변이 물질을 검출하는데 사용된다. TA 98과 TA 100의 유전적 특성은 Table 5와 같다.

Table 5. Genotype of *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains used for mutagenisity and antimutagenicity test

Strains*	Histidine mutation in strain	Additional mutations in LPS Repair	Introduced R-factor pKM 101
TA 98	*hisD3052*	*rfa(△)uvrB*	+
TA 100	*hisG46*	*rfa(△)uvrB*	+

* Two strains were orginally derived from *Salmonella typhimurium* LT-2. The deletion(△) through *uvrB* also includes the nitrate reductase and biotin genes. The *rfa* mutations eliminate the polysaccharide side chain of lipopolysaccharides(lLPS) that coats the bacterial surface.

2) Toxicity 및 Dose-respons test

시료의 균주에 대한 독성유무를 알아보기 위해서 살균된 cap tube에 top agar 3ml를 분주한 후, 균주 100㎕와 희석한 시료 100㎕를 첨가하여 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37℃에서 24시간 배양한 후 독성유무를 관찰하여 독성을 나타내지 않는 농도범위내에서 실험하였다. 또한 돌연변이원의 사용농도를 결정하기 위하여 각 농도별로 시험한 후 직선성을 나타내는 농도범위 내에서 실험하였다.

3) 배지 및 S9 mixture의 조제

Minimal glucose agar는 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-Difco agar와 2%의 glucose를 함유하며, Vogel-Bonner medium E(50×)은 distilled water 670ml, $MgSO_4.7H_2O$ 10g, citric acid monohydrate 100g, K_2HPO_4 500g, $NaNH_4PO_4.4H_2O$ 175g을 함유하게 제조하였다. Top agar는 0.6% Difco agar와 0.5%의 NaCl을 함유하며 top agar 100ml당 10ml의 0.5mM L-histidine/0.5mM biotine 용액을 첨가하여 사용하였다. 간접변이원의 대사활성화를 위한 S9 mixture는 Maron과 Ames의 방법[7]으로 Sprague-Dawley male rat에 aroclor 1245를 복강주사한 후 5일째 4℃ 무균상태에서 간을 적출하여 0.15M KCl(3ml/g liver)과 함께 homogenizer로 균질화한 후 9,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상징액(S9 fraction) 2.0ml에 $MgCl_2$-KCl salts 1.0ml, 1M glucose-6-phosphate 0.25ml, 0.1M NADP 2.0ml, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 25.0ml, 멸균수 19.75ml를 가하여 조제하였다.

4) 실험방법

Maron과 Ames와 방법을 이용하여 Fig. 3과 같이 preincubation 방법으로 실험하였다. 돌연변이원성 시험은 멸균된 cap tube를 ice bath에 보관하면서 S9 mix 0.5mL(간접변이원의 경우) 또는 phosphate buffer 0.5ml(직접변이원의 경우), nutrient broth에서 하룻밤 배양한 균배양액(37℃, 120rpm) 0.1mL, 시료 0.05mL를 각 tube에 첨가한 다음 vortex하고 37℃에서 30분간 preincubation하였다. 45℃의 top agar 3ml를 각 tube에 분주하고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar 위에 부어 top agar를 균일하게 퍼지게한 다음, 37℃에서 48시간 배양하여 histidine revertant를 계측하였다.

돌연변이원성의 판정은 3개의 plate에 나타난 복귀돌연변이 집락수를 평균하여 negative control의 2배 이상의 복귀돌연변이 집락수가 관찰되거나 농도 의존성이 있을 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다.

항돌연변이원성 시험은 mutagen을 0.05mL 씩 가한 다음 시료용액을 각 농도별로 첨가하여 돌연변이원성 시험과 동일하게 조작하였다. Mutagen은 직접돌연변이원으로는 NQO(4-nitroquinolin-N-oxide)와 NPD(4-nitro-o-phenylenediamine)를, 간접돌연변이원으로는 2-AF(2-aminofluorene)을 사용하였으며, 돌연변이 억제활성은 다음식에 의해 산출하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{M - S1}{M - S2} \times 100$$

M : number of revertants by mutagen
S1 : number of spontaneous revertants
S2 : number of revertants when the sample and mutagen were added to TA series simultaneously

나. SCS chromotest

Ames test는 현재 가장 널리 쓰이는 돌연변이 측정방법이지만 시료의 histidine 함량이 높을때는 사용이 곤란한 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위하여 Quillardet 등이 개발한 SCS chromotest는 시료에 혼입될수 있는 histidine 농도에 영향을 받지 않을 뿐아니라 frame shift mutation이나 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 방법이다.

Quillardet의 방법을 변형시킨 백과 함의 방법에 따라 실험하였다. 냉동보관중인 *E. coli* PQ37 균주 50㎕를 5㎖의 L medium에 접종하고 37℃ 에서 흡광도가 0.3-0.4에 이를 때 까지 2시간 동안 진탕배양시킨 후, 여기서 얻은 균주를 L medium에 1/10로 희석하여 사용하였다. 96well micro plate에 시료를 농도별로 10㎕씩 가한 후, 상기의 균 배양액을 100㎕ 가하여 37℃에서 2시간 배양하여 SCS반응을 유도한 후, 한쪽에는 β- galactosidase의 활성측정을 위해 CNPG 100㎕, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase의 활성을 측정하기 위해 PNPP 100㎕를 첨가하여 30분간 발색시킨 후, β-galactosidase는 1.5M Na2CO3 100㎕, alkaline phosphatase는 1M HCl 50㎕로 효소반응을 정지시키고, 5분후 akaline phophatase 쪽에 50㎕의 2M Tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고, ELISA processor로 405㎚에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 OD 405㎚ 값은 Miller의 공식에 의해 enzyme unit(Eu) 값을 구하였고, IF(induction factor)로서 돌연변이 유무를 판정하였다.

Eu = (1000 × A420)/t(min)

Induction factor(IF) = R(C)/R(0)

R(C) : 시료농도(C)에서의 R값, R(0) : 시료농도가 0 일때의 R값

R값 : β-galactosidase의 Eu/Akaline phophatase의 Eu

7. Tyrosinase 저해활성

Mushroom tyrosinase 저해활성 측정은 Kubo의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 시

료에 mushroom tyrosinase 용액(2,750units/㎎)과 1/15 M 인산완충액(pH 6.8)를 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시킨 후 기질 0.03% L-DCPA 용액을 가하여 반응을 개시한 후 25℃에서 2분간 475㎚에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때, 시료에 대한 475㎚에서 흡광도의 변화는 2분간 직선적으로 비례하였으며, tyrosinase 저해율은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = (A - B)/A \times 100$$

A: Absorbance at 475nm after incubation without test sample.

B: Absorbance at 475nm after incubation with test sample.

8. 동물실험

가. 실험동물 및 식이

1) 실험동물의 사육 및 식이

실험 동물은 Sprague-Dawley 종의 4주령 흰쥐를 14일간 기본 식이로 적응시킨 후, 평균 체중이 130 g ±10 g 인 것을 난괴법에 의하여 각 군당 6마리씩 나누어 stainless steel cage에 나누어 한 마리씩 분리하여 6주간 사육하였다. 실험 동물은 정상군 (control), bromobenzenen 처리군(B), 사과 박피군(A+BrB), 사과 박피 추출물군(AE + BrB), 감 과피 투여군(P+B), 감 과피의 추출물 군(PE + B), 밤피(C +BrB) 와 밤피 추출물군(CE + BrB)으로 나누었다. 사육실의 온도는 18±2°C 로 유지하였으며, 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 본 실험에서 사용한 기본 식이는 AIN-76 식이 조성에 준하였으며 사과박피의 추출물과 감과피의 추출물은 흰쥐 체중 50㎎/kg 씩 매일 일정 시각에 경구 투여하였다.

2) Bromobenzen 유도 흰쥐

간과 신장의 독성을 유발시키기 위해 bromobenzene을 1% tween 80에 500㎎/kg되게 현탁하여

한군은 실험 식이 시작전에 복강주사 하였고 다른 한군은 6주의 식이 후 희생 24시간 전에 복강 주사 하였다.

3) 시료의 채취 및 분석

6주간 사육시킨 흰쥐를 12시간 절식시킨후 에테르로 마취시켜 개복한 즉시 복부 대동맥으로부터 채혈하였으며 채혈한 혈액은 실온에서 30분간 방치시킨 다음 2500 rpm 에서 10분간 원심분리하여 분석 실험에 사용하였다. 채혈 후 간과 신장 조직은 즉시 적출한 후 0.9% 생리식염수로 수회 세척하고 혈액과 이물을 제거한 후 무게를 측정하였다. 그리고 각 간엽에서 고르게 일정량(2g)을 취하여 조직 1g에 0.25M sucrose 용액을 5배 가하고 빙냉상태에서 homogenizer(Kinematica, Switzerland)로 마쇄하였다. 마쇄액은 600g 에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상징액을 취하였다. 이 상징액을 다시 10,000g 에서 10분간 원심 분리하여 mitochondrial fraction 을 얻고, 분리된 상징액을 105,000g 에서 1시간 동안 초원심 분리하여 microsomal fraction은 cytochrome P 450 함량 측정에, cytosolic fraction 은 superoxide dismutase, glutathione -S-transferase, 와 glutathione peroxidase 의 활성도 측정의 효소액으로 사용되었다. 채취 및 조제된 시료는 분석시 까지 -70℃에서 냉동 보관하였다.

나. *In vitro* 시험

1) 쥐간 microsome 지질과산화반응

쥐 간 microsome 분획의 제조는 Osawa 등의 방법에 따라 실시하였다. 즉, Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(10 weeks, 180-200g)를 24시간 동안 절식시킨 후 희생하여 간을 끄집어 내었다. 여기에 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4)를 가하여 균질화 한 다음 10,000g에서 10분간 원심분리하고 난 후 얻어진 상등액을 다시 105,000g에서 60분간 원심분리하여 침전되는 간 microsome 분

획을 얻었다. 분리된 microsome은 위와 같은 buffer로 현탁시킨 후 단백질이 1.0 mg/mL 되게 조제하였으며, 이 때 microsome의 단백질 농도는 Lowry 등의 방법으로 측정하였다. 다음 쥐 간 microsome의 지질과산화반응은 Pederson과 Aust 방법에 따라 유도하였다. 즉, 간 microsome에 일정한 농도(10-100μg/mL)의 시료(메탄올에 용해)와 1.7mM ADP/0.1mM $FeCl_3$, 및 0.11mM EDTA/0.1mM $FeCl_3$로 구성된 반응혼합물에 0.1mM NADPH를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 급냉하고 난 다음 Buege 및 Aust 방법을 약간 변형하여 생성된 과산화물량을 정량하였다. 즉, 반응혼합물에 0.375% TBA/15% TCA/0.25N HCl 혼합액을 가하여 100℃에서 15분간 반응시킨 다음 급냉하고 1,500g에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 TBA반응물질(TBA reacting substances)의 농도는 몰흡광계수($1.56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}L^{-1}$)를 사용하여 계산하였으며, 시료의 지질과산화 억제률은 control(시료 무첨가구)에 대한 상대치로 나타내었다.

다. *In vivo* 시험

1) 간조직내 과산화지질 함량 측정

실험 동물을 ether로 마취시킨 후 간을 적출하여 여지로 혈액 및 기타 이물질을 제거하고 평량한 후 Uchiyama 와 Mihara 의 방법에 따라 과산화물 반응을 측정하였다. 즉 0.5g의 조직에 9배 부피의 0.01M sodium phosphate buffer(pH7.0)를 넣어 homogenizer (Kinematica AG, Switzerland)로 마쇄한 후 0.5ml 의 homogenate를 취하여 3ml 의 1% phosphoric acid 와 1 ml 의 0.6% TBA를 넣어 잘 혼합하였다. 혼합된 시료를 boiling water bath 에서 45분간 가열한 뒤 4 ml 의 n-butanol로 발색 물질을 추출한 후 2000 rpm에서 원심분리하여 butanol 상층액의 흡광도(A 535nm)를 측정 하였다.

2) Total glutathion

GSH 측정은 Tietz의 방법을 이용하여 DTNB가 GSH를 산화시키는 정도를 측정하는 것으로 412 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) Glutathion peroxidase activity

GSH-Px 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법으로 산화형 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340㎚에서 감소하는 정도를 측정하였다. 0.1M Tris HCl (pH 7.2) buffer 2.6㎖ 와 30 ㎜ 환원형 glutathione 0.1㎖ 를 넣고 6㎜ NADPH 용액 (0.1M Tris buffer NADPH, 5ul/㎖) 0.1㎖에 6.25uM H2C2 를 넣은 뒤 25℃에서 5분간 먼저 preincubation시킨 뒤 여기에 0.1㎖의 시료를 혼합하여 25℃에서 5분간 incubation 시킨 뒤 340㎚에서 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성의 1단위는 1분간 1㎚ol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양을 나타낸다

4) Glutathion S-transferase activity

GST의 활성도는 Habig의 방법으로 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione이 반응하여 생성된 GSH-DNCB conjugate를 이용하여 흡광도가 340㎚에서 측정하였다.

5) cytochrom p-450

간 조직의 cytochrome P450 함량측정을 위한 간조직의 microsome 분획은 5㎖의 0.25M sucrose 용액으로 약 1g의 간 조직을 균질화 시킨 후 8,000g에서 4분간 원심 분리하였다. 이때 얻어진 상층액을 105,000g에서 1시간 원심 분리하여 상층액인 cytosol 분획과 하층액인 microsome 분획을 분리한다. 다시 pellet 층에 4㎖의 0.25M sucrose 용액으로 부유시켜 얻은 microsome을 Omura와 Sato의 방법으로 환원형 일산화탄소 결합물을 450㎚와 490㎚에서 spectrophotometer로 측정하였다. 즉 microsome 용액 1㎖를 0.1㎜ phosphate (pH 7.4) 6㎖로

희석시켜 약 1㎎/㎖ 의 단백질 농도로 만든 다음 CO gas로 처리한 희석용액을 3 5분 지난 후 base line을 측정하였다. Sodium dithionite를 넣고 3분 후 450㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 molar extinction coefficient는 91㎜M-1㎝-1로 하였다

6) cytochrom b5

간 조직 microsome 중의 Cytochrome b5 의 함량은 Omura와 Sato의 방법으로 측정하였다. 분리해 둔 microsome 용액 0.2㎖를 5㎖의 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 희석시킨 다음 2.5㎖씩 두 cuvette에 NADH 용액을 0.5 ㎖ 넣어 NADH 최종농도가 0.2㎜M이 되도록 한 다음 424㎚와 409㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이 때의 molar extinction coefficient는 185 ㎜M-1㎝-1로 하였다.

7)SOD activity

SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용한 Marklund 와 Marklund의 방법으로 측정하였다. 50 ㎜M Tris HCl buffer (10㎜M EDTA 함유, pH 8.6) 2.8㎖ 와 15㎜M의 pyrogall 0.1㎖를 혼합하여 5℃에서 5분간 미리 incubation 시킨 후 시료 0.1㎖를 가하여 최종 반응액이 3.0㎖가 되도록 하였다. 이 반응 액을 25℃에서 10분간 반응시킨 다음 1N HCl 0.1㎖ 를 가하여 반응을 종료시키고 440㎚ 에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성도를 산출하였다. 효소 활성의 unit는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 15㎜M pyrogallol 용액의 자동 산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 정하였다.

8) protein

단백질 정량은 Bradford의 방법을 이용하여 bovine serum albumin을 standard 로 사용하였다.

9) Total cholesterol, triglyceride, HDL in liver and plasma

실험 동물의 간과 혈장에서 지방조성은 아산제약의 kit를 사용하여 콜레스테롤 함량과 중성지방, HDL를 측정하였다.

라. 현미경 검경

간과 신장의 necrosis의 정도를 보기 위해 광학 현미경과 전자 현미경의 관찰을 했다. 육안적인분석 후, phosphate buffer saline(PBS)에 씻은 후 10% paraformaldehyde/phosphate buffer saline 용액(4℃)에 2시간 담그고 , 4℃의 30% sucrose/PBS 용액에서 조직이 가라앉을 때까지 처리한 후, 간과 신장의 조직을 절단하여 -70℃에서 냉동 고정시켰다. 그 후 조직을 O.C.T. compound로 포매하고 8um 두께로 cryostat로 절편하여 hematoxilin과 eosin으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

마. 통계처리

통계처리는 SAS (statical analysis system)의 two-way ANOVA를 이용하여 통계처리 분석을 실시하였고 분산 분석 결과 유의성이 발견된 경우 유의도는 Fisher's LSD test에 의해 분석하였다. 각 parameter 간의 상관 관계는 correlation coefficient를 구하여 분석하였다.

제 4 절 결과 및 고찰

1.미활용 농산자원의 항산화 활성 검색

가. 잎류의 항산화 활성

1) 수용성 모델계에서의 항산화 활성 검정

농가의 미활용 자원인 채소류 및 과수류의 잎류 35종을 수용성 모델계인 2-deoxyribose 산화법으로 검정한 결과는 Table 1과 같다. 식물의 잎과 그 종류에 따라 다르나 장시간 일광 등 외부환경에 노출되면서 내부의 세포 기관 및 그 영양물질을 산화적 환경에서 보호한다. 이는 특히 식물류의 잎 등에 UV-A, UV-B등의 자외선 흡수력이 뛰어난 flavonoid 등의 성분이 많이 함유된 점과 관련이 있다. 잎류는 모든 시료가 미약하나마 항산화 활성을 나타내었다. 그 중 참깨, 들깨, 박잎, 감귤(조생온주)잎, 매실, 뽕잎 등이 활성이 강하게 나타났다.

Table 1. The antioxidative effects of unutilized plant leaves by 2-Deoxyribose oxidation method

NO	ID	inhibition(%)		NO	ID	inhibition(%)	
		10ppm	1ppm			10ppm	1ppm
1	GML	77	9	19	BRL	85	36
2	SIL	86	76	20	PML	89	63
3	PFL	83	56	21	HLL	90	77
4	CAL	84	21	22	IBL	94	69
5	PPL	92	44	23	MPL	82	40
6	DKL	90	72	24	VVL	85	72
7	BNL	93	62	25	HJL	89	20
8	AHL	88	48	26	CCL	80	38
9	PAWL	74	31	27	CAL	91	62
10	PTL	78	34	28	PGL	86	15
11	ASL	38	7	29	ARL	84	53
12	GDL	88	26	30	APL2	83	34
13	STL	86	23	31	ZJL	84	66
14	CML	31	3	32	MAL1	90	74
15	LLL	96	52	33	MAL2	95	80
16	APL1	91	34	34	MAL3	89	54
17	CAL	84	36	35	RPL	87	18
18	CUL	96	63				

2) 지용성 모델계에서의 항산화 활성 검정

Linoleic acid를 기질로 한 ferric thiocyanate 법에 따라 미활용 농산자원 중 잎류의 항산화력을 검색한 결과는 table 2와 같다. 검정농도는 각각 10, 50ppm 로 하였다. 10ppm 농도에서 잎류는 대부분 10% 이상의 활성을 나타내었다. 그 중 감잎, 박잎, 매실잎, 고구마잎, 밤잎, 담배잎, 익모초 등이 항산화활성이 강하였으며 특히 밤잎은 10ppm 농도에서도 거의 70% 이상의 강한 과산화물 생성 억제능을 보였다.

Table 2. The antioxidative effects of unutilized plant leaves by ferric thiocyanate oxidation method

NO	ID	inhibition(%)		NO	ID	inhibition(%)	
		50ppm	10ppm			50ppm	10ppm
1	GML	30	8	19	BRL	75	31
2	SIL	72	13	20	PML	75	54
3	PFL	18	19	21	HLL	81	75
4	CAL	23	13	22	IBL	85	70
5	PPL	43	30	23	MPL	69	34
6	DKL	55	44	24	VVL	55	17
7	BNL	45	32	25	HJL	84	45
8	AHL	49	28	26	CCL	95	72
9	PAWL	84	23	27	CAL	75	70
10	PIL	27	13	28	PGL	75	27
11	ASL	9	7	29	ARL	93	35
12	GDL	70	11	30	APL2	82	68
13	SIL	63	40	31	ZJL	58	30
14	CML	47	29	32	MAL1	90	65
15	LLL	82	48	33	MAL2	72	43
16	APL1	43	37	34	MAL3	95	42
17	CAL	68	33	35	RPL	79	49
18	CUL	56	26				

나. 껍질류의 항산화 활성

1) 수용성모델계의 항산화성 검정

과실 및 채소의 과피는 잎류보다 전반적으로 미약한 활성을 나타내었다. 그러나 밤외피, 양파피, 고구마피, 감자피 등은 1ppm 농도에서도 50%이상의 강한 활성을 나타내었다. 밤외피는 탄닌, 양파피의 경우는 quercetin 등의 폴리페놀화합물과 고구마, 감자피는 자색 색소 성분인

anthocyanin 류에 의하여 비교적 강한 활성을 나타내는 것으로 판단되나 추후 좀더 항산화 성분의 분획 및 동정의 연구가 필요하다.

Table 3. The antioxidative effects of unutilized fruit and vegetable peels by 2-Deoxyribose method

NO	ID	inhibition(%)		NO	ID	inhibition(%)	
		10ppm	1ppm			10ppm	1ppm
1	MPP1	83	35	17	CMCP	73	25
2	MPP2	83	22	18	CMIP	63	27
3	MPP3	81	12	19	GMP	79	43
4	VVP1	45	11	20	AHCP	89	39
5	VVP2	68	9	21	ACP	75	53
6	VVP3	80	12	22	CVIP	74	40
7	EKP1	68	27	23	CVCP	66	42
8	EKP2	57	7	24	BAP	76	28
9	CCP	77	58	25	STP	84	53
10	ZLP	86	39	26	IBP	91	50
11	CMMP	70	45	27	CNP	84	32
12	CU1	5	8	28	CU6	65	18
13	CU2	40	24	29	CU7	50	38
14	CU3	60	40	30	CU8	67	27
15	CU4	55	23	31	CU9	69	48
16	CU5	57	20				

2) 지용성 모델계에서의 항산화 활성 검정

지용성 모델계에 대한 과피류의 항산화 활성은 Table 4와 같다. 과피류는 전반적으로 잎류에 비하여 약한활성을 나타내었다. 그 중 밤외피, 양파피, 고구마피, 감귤류 중 조생온주의 과피가 비교적 강한활성을 나타내었다. 이러한 결과는 앞의 2-Deoxyribose 산화법으로 조사한 결과와 유사한 경향이었다. 박잎, 매실잎, 밤외피, 양파피, 고구마피 등이 2가지 방법에서 모

두 강한 활성을 보여주므로 이는 활성성분의 극성이 중간정도이거나 이들 시료 중에는 극성이 서로 다른 강한 활성성분들의 공존 상태 등을 생각할 수 있으므로 이들 성분의 분리 및 구명 연구가 필요하다.

Table 4. The antioxidative effects of unutilized vegetable peels by ferric thiocyanate oxidation method

NO	ID	inhibition(%)		NO	ID	inhibition(%)	
		50ppm	10ppm			50ppm	10ppm
1	MP1	35	15	17	CMCP	16	15
2	MP2	60	19	18	CMIP	16	5
3	MP3	53	20	19	GMP	21	3
4	VVP1	22	8	20	AHCP	50	20
5	VVP2	40	26	21	ACP	79	46
6	VVP3	32	22	22	CVIP	10	5
7	DKP1	8	5	23	CVCP	34	10
8	DKP2	44	12	24	BAP	55	32
9	CCP	83	51	25	STP	56	25
10	ZLP	68	16	26	IBP	70	50
11	CMMP	18	15	27	CNP	68	35
12	CU1	15	10	28	CU6	35	23
13	CU2	35	21	29	CU7	43	19
14	CU3	37	29	30	CU8	44	22
15	CU4	53	33	31	CU9	70	33
16	CU5	42	32				

다. 종자류의 항산화 활성

51종의 농산물 및 약용식물 종자에 대한 전자 공여능과 soyben lipoxygenase의 저해활성을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 청상자, 동규자, 연자, 조 등에서 높은 전자공여능을 보였으며 soybean lipoxygenase 저해활성에서는 토사자, 비자, 사철나무, 산조인, 모란 등에서 높은

활성을 나타내었는데 이 중 특히 모란에서는 98%의 높은 활성을 나타내어 향후 이들 항산화 성분의 분리, 동정에 관한 좀 더 구체적인 연구가 요망된다.

Table 5. Electron donating activity and soybean lipoxygenase inhibitory activity of various plant seeds

No.	Korean name	Electron donating activity	SLO inhibitory activity	No.	Korean name	Electron donating activity	SLO inhibitory activity
1	감	72	74	19	매실	78	39
2	(백)개자(겨자)	77	17	20	맥아	66	65
3	검인(가시연꽃)	35	22	21	모란	46	98
4	견우자(나팔꽃)	64	36	22	밀	45	22
5	결명자	57	40	23	백자인(측백나무)	69	58
6	고추	73	36	24	비자(주목)	75	87
7	공사인(축사밀)	48	78	25	사철나무	79	90
8	과루인(하늘타리)	77	36	26	산조인	49	83
9	구맥(패랭이)	57	46	27	서과피(수박)	30	47
10	구자(부추)	26	35	29	석류	78	69
11	금귤	76	31	29	소자(차조기)	78	82
12	기장	53	27	30	수세미	70	32
13	나복자(무우)	68	52	31	수수	62	91
14	녹두	57	23	32	시금치	75	38
15	대풍자	70	74	33	연자	83	68
16	도인	77	33	34	옥수수	67	75
17	동과자(동아)	80	24	35	욱이인(산이스라스)	85	44
18	동규자(아욱)	85	25	36	운랑자(유채)	80	47

Table 5. continued

No.	Korean name	Electro donating activity	SLO inhibitory activity	No.	Korean name	Electro donating activity	SLO inhibitory activity
37	차전자(질경이)	74	35	45	호마(참깨)	28	29
38	참외	43	28	46	월견초	54	78
39	청상자 (개맨드라미)	86	21	47	은행	68	54
40	충위자(익모초)	74	37	48	의이인	77	30
41	토사자(실새삼)	67	89	49	정력자(꽃다지)	78	30
42	팥	80	40	50	조	80	41
43	포도	91	87	51	행인	25	26
44	피마자	34	29				

2. 뽕잎으로부터 항산화 물질의 분리

가. 품종별 뽕잎의 flavonoid 함량 및 항산화 활성

뽕잎의 품종별 함량 및 항산화활성을 알아보기 위하여 8품종(개량종, 당까이요마, 대호축, 갑선, 검설, 적목, 독조, 신광)의 메탄올 추출물의 항산화 활성 및 가수분해 후 flavonoid aglycone의 함량을 조사하였다. Kaempferol의 함량은 46 176㎎%, quercetin은 48 229㎎%로 품종별로 큰 차이를 나타내었으며, 개량종에서 두 물질 모두 가장 높은 함량을 나타내었다. 품종별 TBA법에 의한 라디칼 소거능은 개량종, 대호축, 신광 순으로 활성이 높았다. 이는 이들 flavonoid의 함량에 따라 항산화 활성이 높게 나타난 것으로 생각된다.

Table 1. Flavonids contents and antioxidative activity of several *Morus alba* L. cultivars

cultivars	Quercetin(㎎/100g)	Kaempferol (㎎/100g)	Radical scavenging activity (% at 1ppm)
개량종	229.06	176.61	85.28
당까이요마	76.358	69.50	71.17
갑선	110.98	76.36	80.88
적목	48.19	88.19	82.88
대호축	146.61	81.71	83.43
신광	112.27	62.56	77.47
독조	49.56	46.85	65.76
검설	122.37	76.06	72.97

나. 획분별 항산화 활성

1) 2-deoxyribose 산화법에 의한 항산화 활성

Fenton 반응계에서 ·OH를 발생시켜 기질인 2-deoxyribose를 산화시키는 정도를 TBA(Thiobarbituric acid)법에 의해 뽕잎의 조추출물 및 각 용매 분획별 획분에 대하여 측정한 결과는 Fig.1과 같다. 각 획분별 라디칼 소거 활성은 ethyl acetate, chloroform, butanol, water 순이며 조추출물 및 ethyl acetate 획분은 BHA와 거의 유사한 활성을 나타내었다.

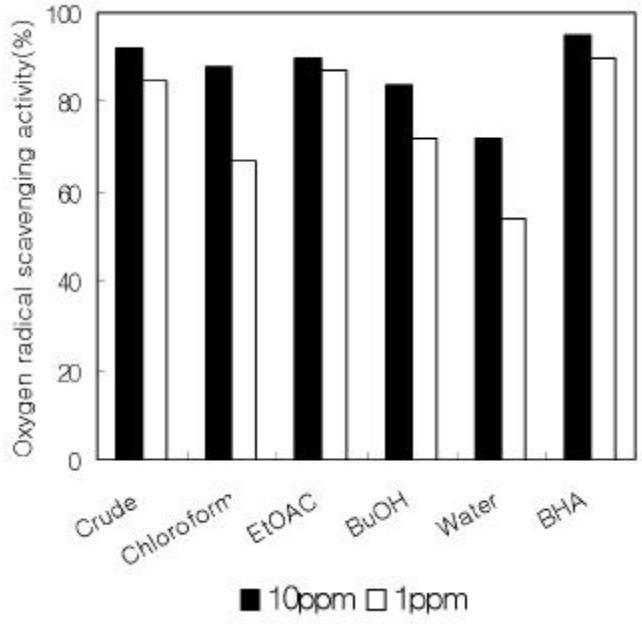


Fig. 1. Antioxidative activitives of each solvent from *Morus alba* L. leaves by 2-deoxyribose oxidation method.

2) Ferric thiocyanate법에 의한 항산화 활성

Linoleic acid 기질계에서의 뽕잎의 각 회분별 항산화능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 지용성 모델계인 linoleic acid system에서도 전항의 산소라디칼 소거능과 유사하게 뽕잎의 에틸아세테이트 획분이 강한 항산화 작용을 나타내었다. α-tocopherol과 비교하여 50ppm에서 뽕잎의 에틸아세테이트 획분은 유사한 활성을 나타내었으며 10ppm 농도에서는 보다 약한 것으로 나타났다.

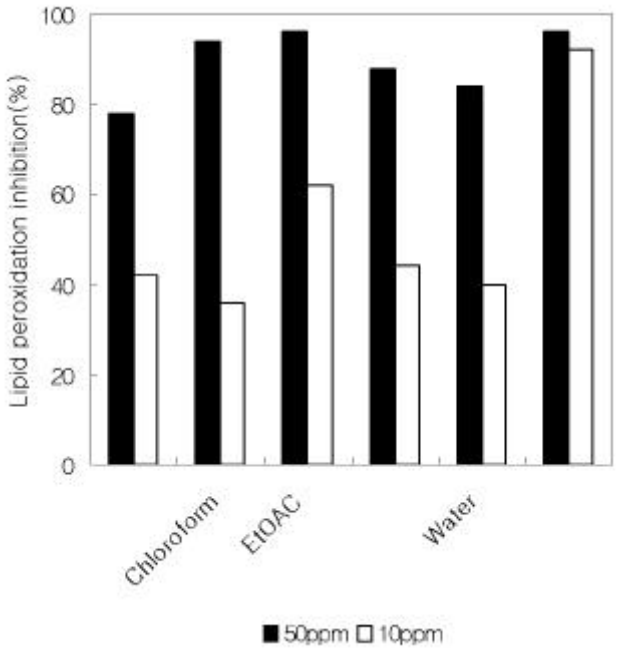


Fig. 2. Antioxidative activitives of each solvent from *Morus alba* L. leaves in linoleic acid model system.

다. 항산화 물질의 분리

1) TLC에 의한 분리

항산화 활성이 우수한 뽕잎의 ethyl acetate 획분을 감압농축하여 silica gel plate (sigma, 250㎛ thick)를 사용하여 ethyl acetate : methanol : H2O (7 : 1: 2) 혼합용매를 전개용매로 사용하였다. 전개 후 육안 및 UV lamp로 band를 확인한 결과 Fig. 3과 같이 UV(254nm)에 의해 갈색 및 보라색의 7개의 band를 확인할 수 있었으며, 표준품 kaempferol-3'-glucoside, quercetin-3-glucoside와 비교하였을 Rf치가 일치하였으며 HPLC 상에도 동일한 결과를 얻었다.

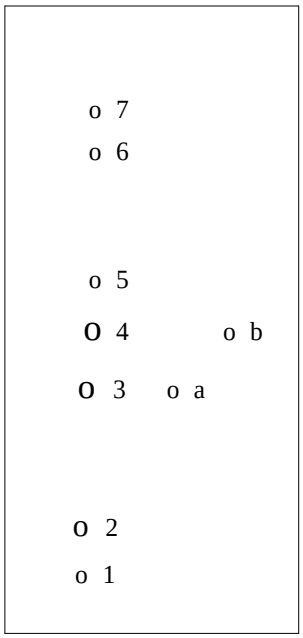


Fig. 3. TLC pattern of ethyl acetate fraction from *Morus alba* L. leaf and authentic compounds. a:quercetin-3-glucoside b:kaempferol-3-glucoside, solvent: ethyl acetate/methanol/H2O(75/14/11)

위에서 확인된 뽕잎의 ethyl acetate 획분을 분리하기 위하여 Prep. TLC상에서 ethyl acetate/methanol/H2C(75/14/11)를 전개 용매로 하여 전개한 후 7개의 band를 확인한 후 각각의 band를 모아 ethyl acetate 50mℓ로 2회 추출한 뒤 여과한 후 농축하여 band 1 (16.4mg), band 2(21.6mg), band 3(55.4mg), band 4(22.0mg), band 5(19.0mg), band 6(9.4mg) band 7(5.0mg)을 회수한 후 HPLC로 확인하고 각각의 구조분석을 행하였다.

2) HPLC에 의한 분리

뽕잎을 순차 용매 분획한 획분 중 ethyl acetate 분획을 prep TLC로 전개하여 모은 band에 대하여 HPLC로 분리하고 이 중 4개의 주요 성분을 분취하였다.

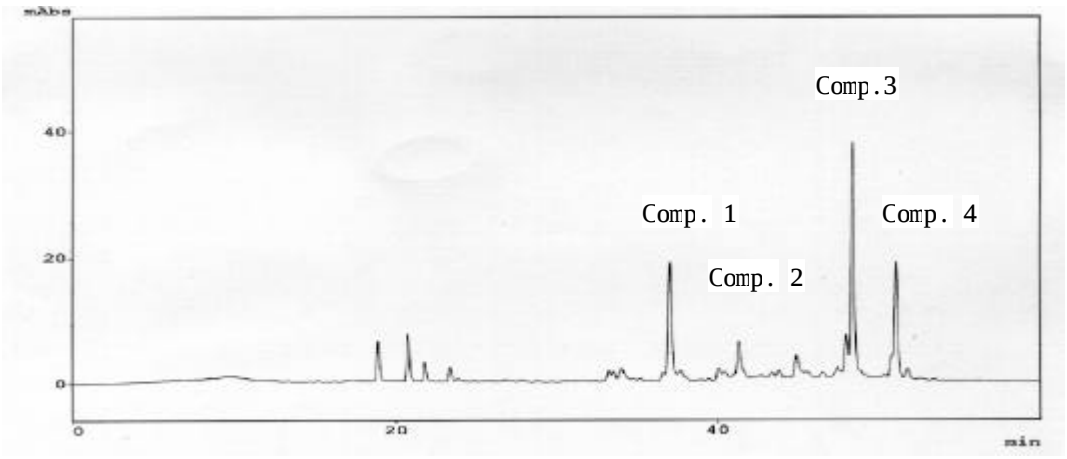


Fig. 4. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Morus alba* L.leaf. column: ODS-5(20ø × 250mm); mobil phase: gradient elution from 0.1% TFA/H2O to 0.1% TFA/MeOH; detector: UV 280nm

라. 항산화물질의 구조분석

1) compound 1과 compound 2의 구조 분석

Preparative HPLC로 분취한 compound 1과 compound 2의 ^1H 및 ^{13}C-NMR data는 Table 2와 같다. CD_3OD를 용매로 먼저 ^1H -NMR을 실시한 결과 compound 1은 7.55(1H,d), 7.04(1H, d), 6.94 (1H,dd), 6.75(1H,d), 6.25(1H,d)에 proton signal이 관찰되므로 benzene ring proton과 olefinic proton이 인정되었다. 따라서 caffeoyl기를 가진 구조로 추정하였으며, FAB-MS spectra에서 분자량이 354임을 확인하였다. 또한 ^{13}C-NMR을 실시하여 signal을 Aldrich library NMR spectra(1,1235,C)와 비교한 결과 일치하여 chlorogenic acid로 동정하였다.

Compound 2는 ^1H -NMR의 6-8ppm에서 거의 compound 2와 유사한 proton signal이 관찰되었다. FAB-MS spectra에서 분자량이 180임을 확인할 수 있었으며 ^{13}C-NMR 결과 Aldrich library NMR spectra의 trans-3,4-dihydroxy cinnamic acid(2,1058,B)와 일치하였다.

Table 2. ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data for compound 1 and 2

Carbon	Compound 1	Compound 2	Proton	Compound 1	Compound 2
C1	126.77	127.85	2-H	7.04(d)	7.03(d)
C2	115.17	115.13	5-H	6.75(d)	6.78(d)
C3	146.78	146.86	6-H	6.94(dd)	6.92(dd)
C4	149.55	149.51	1'-H	7.55(d)	7.51(d)
C5	115.24	116.53	2'-H	6.25(d)	6.21(d)
C6	122.96	122.89			
C1'	147.06	147.09			
C2'	116.46	115.56			
C3'	168.65	171.06			
C1''	76.08				
C2''	71.87				
C3''	70.09				
C4''	38.99				
C6''	39.78				
C7''	176.99				

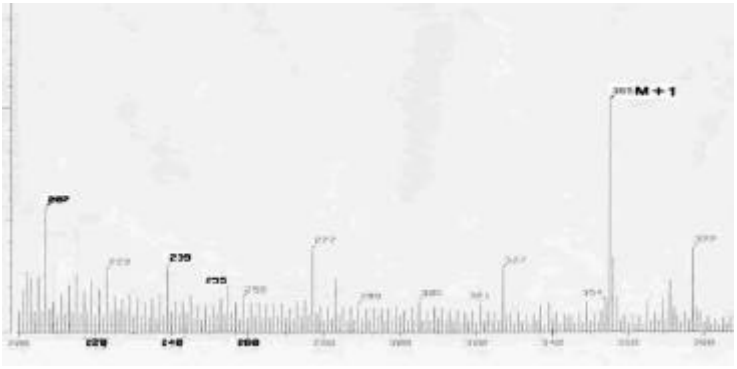


Fig. 5. FAB-MS spectrum of the compound 1 from *Morus alba* L.

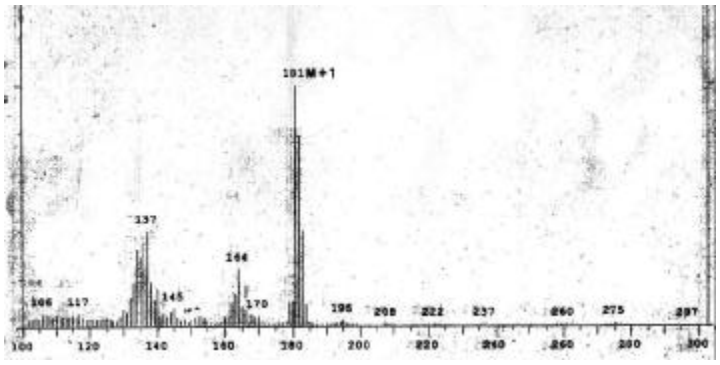


Fig.6. FAB-MS spectrum of the compound 2 from *Morus alba* L.

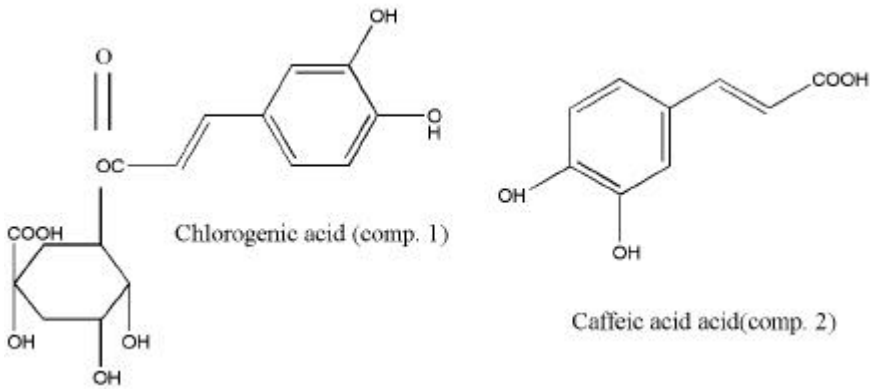


Fig. 7. chemical structure of the compound 1 and 2 from *Morus alba* L.

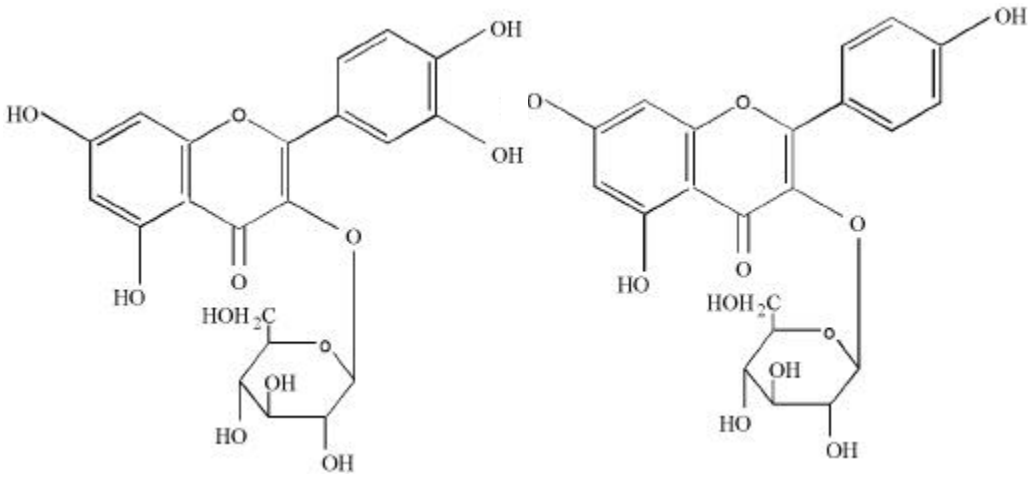
나. compound 3**과** 4**의 구조 분석**

뽕잎에서 분리 정제한 성분 중 compound 3**과** HPLC, TLC **상에서 본 실험실에서 천연물로부터 분리 정제하여 구조를 확인한** quercetin-3-glucoside**의** HPLC retention time**과 일치하였으며 또한** TLC**의** Rf**치도 일치하였다. 이들 성분은** ^{1}H **및** ^{13}C-NMR**로 구조를 확인한 결과** Table 3**와 같이 나타났다.**

Table 3. ^{13}C-NMR and ^{1}H-NMR data of compound 3 and 4 isolated from *Morus alba* L.

Carbon	Comp. 3	Comp. 4	Proton	Comp. 3	Comp. 4
C2	147.6	158.5	H6	6.41(d)	6.22(d)
C3	136.1	135.4	H8	6.78(d)	6.42(d)
C4	176.1	179.4	H2', 6'	8.07(d)	7.96(d)
C5	160.4	164.0	H3',5'	6.95(d)	7.02(d)
C6	98.8	99.9	G1	5.06(d)	5.29(d)
C7	162.7	166.0			
C8	94.4	94.8			
C9	155.8	159.1			
C10	104.7	105.7			
C1'	121.6	122.8			
C2'	129.6	132.2			
C3'	115.5	115.1			
C4'	159.4	161.6			
C5'	115.5	115.1			
C6'	129.6	132.2			
G1	99.9	103.3			
G2	73.2	75.8			
G3	77.2	77.1			
G4	69.6	71.3			
G5	76.5	78.3			
G6	60.7	62.6			

따라서 compound 3**과** 4**를 각각** quercetin-3-O-β-D-glucoside, kaempferol-3-C-β-D-glucoside**로 구조 동정하였다.**



Quercetin-3-C-β-D-glucoside(comp. 3) Kaempferol-3-C-β-D-glucoside(comp. 4)

Fig.8. chemical structure of the compound 3 and 4 from *Morus alba* L.

마. 분리한 항산화물질의 항산화성 및 tyrosinase 저해활성

1) 2-deoxyribose 산화법에 의한 항산화성

항산화 활성이 뛰어난 뽕잎의 ethyl acetate 획분으로부터 분리한 4개의 화합물의 항산화 활성을 시험한 결과 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히quercetin-3-glucoside로 동정된 compound 3이 가장 강한 활성을 나타내었으며 chlorogenic acid, caffeic acid도 합성항산화제인 BHA와 거의 대등한 활성을 나타내었다.

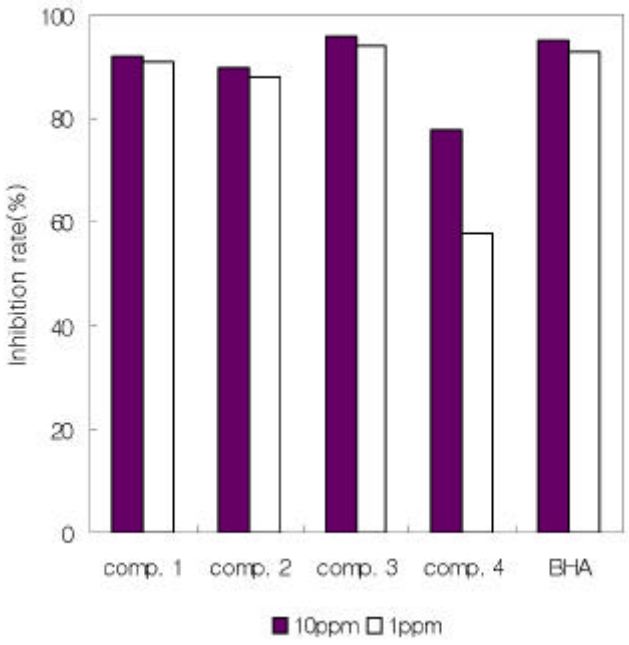


Fig. 9. Antioxidative activitives of each compound isolated from *Morus alba* L. leaf by 2-deoxyribose oxidation method.

2) 쥐간 microsome 지질과산화 반응

뽕잎으로부터 분리·동정한 4개의 화합물에 대하여 쥐간 microsome의 지질과산화 반응을 시험한 결과 Table 3과 같다. Quercetin-3-glucoside와 kaempferol-3-glucoside에서 각각 44.07, 36.16%의 지질과산화물 생성 억제를 나타내었고, chlorogenic acid와 caffeic acid의 경우 27.12%와 4.62%로 비교적 낮은 지질과산화물 생성 억제를 나타내었다.

Table 4. Inhibitory effects of each compound isolated from *Morus alba* L. on enzymatically ADP/ NADPH/ EDTA/Fe^{2+} induced lipid peroxidation in rat liver microsomes

Compounds	Inhibition(%)
Chlorogenic acid	27.12
Caffeic acid	4.62
Quercetin-3-glucoside	44.07
Kaempferol-3-glucoside	36.16
BHA	62.46

Each experiment was performed in duplicate.
Lipid peroxidation was expressed as % inhibition of MDA(malondialdehyde) production
The concentration of all compounds used was 10 ppm
Butylated hydroxyanisole(BHA) was used as a positive reference

3) Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 tyrosine을 산화하여 L-DOPA (L-dihydroxy- phenylalanine)을 생성시키고, 이를 다시 dopaquinone으로 산화하는 반응을 촉매해주며, 여기서 생성된 quinone은 다른 quinone 또는 아미노산이나 단백질과 중합하여 효소적 갈변반응의 최종산물인 흑갈색의 melanin 색소를 생성하게 된다. 현재 상업적으로 kojic acid, arbutin, L-ascorbic acid 유도체 및 melanostatin 등이 사용되고 있으나 안전성 및 가격면에서 많은 문제점이 있으므로 천연물 유래의 강한 저해활성을 지닌 화합물의 이용이 필요하다. 뽕잎으로부터 분리한 4개의 화합물의 tyrosinase 저해활성을 시험한 결과는 Table 5와 같다. Caffeic acid, quercetin-3-glucoside, Kaempferol-3-glucoside에서는 저해활성을 나타내지 않았고

chlorogenic acid의 경우 20.76%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. Kojic acid와 비교할 때 다소 낮은 활성이나 ascorbic acid 보다 더 강한 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 따라서 chlorogenic acid를 함유한 뽕잎의 ethyl acetate 분획은 미백 효과를 가지므로 화장품 및 미백 식품에 이용성이 있다고 사료된다.

Table 5. Inhibitory effects of each compound isolated from *Morus alba* L. against commercially available mushroom tyrosinase

Compounds	Tyrosinase inhibitory activity(%)
Chlorogenic acid	20.76
Caffeic acid	NE
Quercetin-3-glucoside	NE
Kaempferol-3-glucoside	NE
Kojic acid	78.42
Ascorbic acid	18.12

The final concentration of all compounds tested was 0.16 mg/mL
Kojic acid and L-ascorbic acid were used as positive references
Each experiment was performed in duplicate.
NE; no effect

바. 변이원성 및 항돌연변이원성

1) 뽕잎 추출물의 변이원성

가) Ames test

Ames test는 *Salmonella typhimurium*의 복귀돌연변이 현상을 관찰하여 돌연변이 유무를 판정하는 방법으로, 시료가 변이원성을 나타내게 되면 복귀돌연변이 colony 수가 증가하게 된다.

뽕잎의 메탄올 추출물과 열수추출물을 frame shift type mutant인 TA98과 base pair exchange type mutant인 TA100에 대하여 변이원성 실험을 한 결과는 Table 6과 같다. 추출물을 plate당 0.5mg에서 4.0mg까지 농도를 증가시키면서 실험한 결과, 복귀돌연변이된 colony 수(histidine revertant)가 농도에 의존하여 증가하지 않았으며, S-9 mixture를 가하여 대사활성화를 시켰을 때도 histidine revertant의 수가 증가하지 않으므로, 뽕잎의 메탄올 추출물과 열수추출물은 변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

Table 6. Mutagenicity of extractions from *Morus alba* L. on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants/plate			
		Without S-9 mix		With S-9-mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Spontaneous		19±2	151±12	21±2	148±14
MeCH ex.	0.5	21±1	150± 2	23±0	161±7
	1.0	22±2	149± 5	22±1	158±14
	2.0	23±3	174±11	27±3	163± 7
	4.0	22±3	161± 9	24±4	171±8
Water ex.	0.5	18±3	151±11	20±3	159±13
	1.0	20±4	157± 7	23±2	150± 9
	2.0	24±2	171±19	25±2	168±11
	4.0	21±1	154± 9	21±4	154± 7

나) SOS chromotest

SCS chromotest는 시료의 histidine 함량에 영향을 받지 않을 뿐만 아니라, frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할수 있고, 민감도도 매우 높은 편이다.

뽕잎의 메탄올 추출물과 용매분획물의 SCS chromotest를 시험한 결과는 Table 7과 같다. 양

성대조물질로 NQC를 첨가했을때, IF(induction factor)가 2.328로 SOS 반응이 유도됨을 알 수 있었다. 뽕잎의 메탄올 추출물과 각 용매분획을 첨가했을 경우는, 농도에 따라 IF값의 뚜렷한 증가가 없고, IF값이 높지 않아 변이원성을 나타내지 않는 것으로 생각되었다. 따라서 뽕잎의 메탄올 추출물과 각 용매분획은 Ames test 뿐만 아니라 SOS chromotest에서도 변이원성을 나타내지 않아 변이원 활성물질이 존재하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 7. Mutagenicity of each extraction from *Morus alba* L. by SOS chromotest

Samples	Dose (μg/plate)	β-galactosidase		Alkaline phosphatase		Induction factor
		OD405	unit	OD405	unit	
Negative		0.275	9.54	1.027	33.92	1.000
NQO	0.02	0.693	23.87	1.134	37.85	2.328
MeOH ex.	1	0.288	10.57	1.054	35.60	1.019
	2.5	0.278	9.79	1.078	34.40	1.033
	5	0.276	9.12	1.092	36.30	1.032
	10	0.301	9.10	1.114	37.27	1.037
Water ex.	1	0.286	10.47	1.111	34.37	1.054
	2.5	0.294	11.70	1.059	35.36	1.047
	5	0.289	9.83	1.041	35.60	1.058
	10	0.321	10.45	1.067	36.27	1.088

2) 뽕잎 추출물의 항돌연변이원성

뽕잎의 메탄올 추출물과 열수추출물의 항돌연변이원성을 조사한 결과는 Table 8,9와 같다. 직접변이원인 NPD와 NQO로 돌연변이를 유도하면서 TA 98과 TA 100에 대한 돌연변이 억제 활성을 측정한 결과 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 53.5%, TA 100에서는 69.4%의 억제활성을 보였다. 반면 열수추출물에서는 TA 98에서는 46.1%, TA 100에서는 48.0%로 메탄올 추출물에 비하여 약간 낮은 돌연변이 억제 활성을 보였다. 뽕잎 메탄올 추출물과 열수추출물에서 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 어느 정도 있는 것으로 나타났다.

간접변이원인 2-AF를 S9 mixture를 사용하여 대사활성화를 시키면서 TA 98과 TA 100의 항변이원성을 조사한 결과 Table 9와 같이 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 81.1%, TA 100에서는 65.7%의 억제 활성을 나타내었고, 물추출물의 경우 TA 98에서는 44.5%, TA 100에서는 26.4%의 낮은 억제 활성을 나타내었다. 메탄올 추출물의 경우 간접변이원에 대해서는 특히 강한 억제활성을 보이고 있으며, 물추출물의 경우 직접변이원에 대한 억제활성이 높게 나타났다. 따라서 뽕잎 메탄올 추출물은 직접변이원 보다는 간접변이원에 대한 돌연변이를 억제하는데 유용할 것으로 생각되며, 간접변이원이 대사활성화되는 과정에 불활화시키는 것으로 추정되어진다.

Table. 8. Antimutagenic effects of methanol and water extraction from *Morus alba* L. on the mutagenecity induced by direct mutagen(NPD and NQC) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 without S9 mixture

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	128±6
NPD	800±31	
NQO		673±17
MeOH ex.	374±19(53.5)	210±18(69.4)
Water ex.	429±25(46.1)	348±33(48.0)

Table. 9. Antimutagenic effects of methanol and water extraction from *Morus alba* L. on the mutagenecity induced by indirect mutagen(2-aminofluorene) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 with S9 mixture

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	128±6
2-AF	1160±21	380±17
MeOH ex.	225±17(81.1)	134±9(65.7)
Water ex.	645±32(44.5)	224±14(26.4)

3) 분리한 항산화 물질의 변이원성

뽕잎으로부터 분리한 4개의 화합물의 변이원성을 *S. typhimurium* TA 98과 TA 100을 이용한 Ames test를 실시한 결과 4개의 화합물 모두 frame shift mutant인 TA 98과 base pair exchange mutant인 TA 100에 대하여 negative에 대한 mutant ratio가 2.0 이하를 나타내며 농도의존성을 나타내지 않으므로 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다.

Table 10. Mutagenicity of antioxidant compounds isolated from *Morus alba* L. on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants/plate			
		Without S-9 mix		With S-9-mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Spontaneous		17±2	157±13	22±3	145±12
Chlorogenic acid	0.5	20±3	153± 6	21±2	164±6
	1.0	21±4	151± 7	21±3	159±14
	2.0	24±2	164±10	26±3	157± 9
	4.0	21±2	160± 5	25±1	170±7
caffeic acid	0.5	19±2	157±10	24±4	162±12
	1.0	21±3	150± 8	25±5	147± 14
	2.0	23±0	168±12	24±3	168±10
	4.0	21±1	170± 7	20±2	153± 7
Quercetin-3-glucoside	0.5	17±4	154±14	21±3	156±12
	1.0	23±2	150± 6	22±5	157± 9
	2.0	19±3	171±11	26±3	164±10
	4.0	20±0	150± 10	27±2	161± 8
Kaempferol-3-glucoside	0.5	21±2	153±9	21±3	151±12
	1.0	23±1	161± 9	25±1	154± 11
	2.0	22±3	170±10	23±2	162±10
	4.0	19±2	149± 7	26±3	152± 8

4) 분리한 항산화 물질의 항돌연변이원성

뽕잎으로부터 분리한 4개의 화합물의 항돌연변이원성을 *S. typhimurium* TA 98과 TA 100을 이용하여 변이원 4-NQO와 aflatoxin B1에 대한 Ames test를 실시한 결과는 Table 11,12와 같다.

직접변이원으로 4-NQO를 사용한 경우 TA 98과 TA 100 모두 chlorogenic acid의 억제활성이 가장 높게 나타났으며, caffeic acid의 경우 낮은 활성을 나타내고 있는 반면, quercetin-3-glucoside와 kaempferol-3-glucoside의 경우에는 항돌연변이 활성을 나타내지 않고 있다.

간접변이원으로 aflatoxin B1을 사용하여 S-9 mix에 의해 대사활성화 시키면서 돌연변이 억제 활성을 시험한 결과는 Table 12와 같다. 직접변이원에서와 마찬가지로 chlorogenic acid가 TA 98에서는 17.6%, TA 100에서는 25.4%로 가장 높은 억제활성을 나타내었다.

kaempferol-3-glucoside의 경우 직접변이원에서는 항돌연변이 활성을 나타내지 않았으나 간접 변이원의 경우 TA 100에서 20.7%의 억제 활성을 나타내었다.

Table 11. Antimutagenic effects of antioxidant compounds isolated from *Morus alba* L. on the mutagenicity induced by 4-nitroquinolin-1-oxide (4-NQO, 0.25μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Revertant / plate	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	23±4	147±10
4-NQO	872±34	1529±49
Chlorogenic acid	706±13(19.6)	885±15(46.6)
Caffeic acid	718±43(18.1)	1178±60(25.4)
Quercetin-3-glucoside	998±23(-)	1605±27(-)
Kaempferol-3-glucoside	883±26(-)	1515±37(1.0)

Table 12. Antimutagenic effects of antioxidant compounds isolated from *Morus alba* L. samples on the mutagenicity induced by aflatoxin B1 (AFB1, 1μg /plate) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Revertant / plate	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	21±1	144±7
AFB1	815±36	1768±128
Chlorogenic acid	675±28(17.6)	1356±71(25.4)
Caffeic acid	749±24(8.3)	1414±62(21.8)
Quercetin-3-glucoside	841±30(-)	1745±63(1.4)
Kaempferol-3-glucoside	763±22(6.5)	1432±58(20.7)

사. 식용유지에 대한 뽕잎 용매 추출물의 항산화성

1) 동물성 유지에 대한 항산화성

뽕잎 추출물의 동물성 유지에 대한 항산화성을 시험하기 위하여 돈지를 65℃에서 장기간 저장하면서 시간에 따른 PCV의 변화를 측정한 결과는 Fig.10에 나타내었다.

핵산 획분을 제외한 모든 획분에서 돈지로부터 과산화물 생성억제를 보여주고 있다. 핵산의 경우 돈지에 대한 항산화성을 거의 나타내지 않았으나, 다른 추출물의 경우 저장 12일 부터는 더 이상의 과산화물의 생성이 일어나지 않았다. 특히 열수 추출물, 메탄올 추출물에서 천연항산화제인 α-tocopherol과 거의 대등한 항산화력을 보여 주었으며, 따라서 뽕잎 추출물의 식용유지에 대한 항산화성이 인정되며 이용가능성을 보여 주었다.

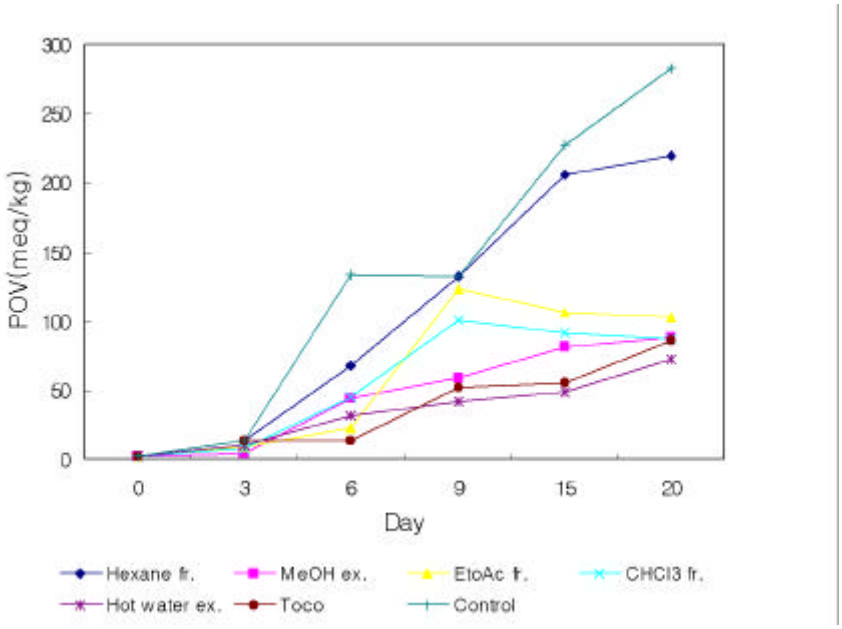


Fig.10. POV of each solvent fractions from *Morus alba* L. leaf on lard.

2) 식물성유지에 대한 항산화성

대두유를 100℃에서 저장하면서 과산화물을 유발시켜 뽕잎 추출물에 대한 PCV의 변화를 시험한 결과는 Fig. 11과 같다.

돈지와는 달리 저장 3일째 PCV가 최고치를 나타내었으며 추출물별 큰 차이는 보이지 않았다. 이중 ethyl acetate 획분의 경우 합성 항산화제인 BHA와 천연항산화제인 α-tocopherol보다 우수한 과산화물 억제 활성을 나타내었다. 따라서 뽕잎의 ethyl acetate 획분은 식물성 유지에 대하여 α-tocopherol을 대체할 수 있는 천연 항산화제로서 이용이 가능하다고 사료된다.

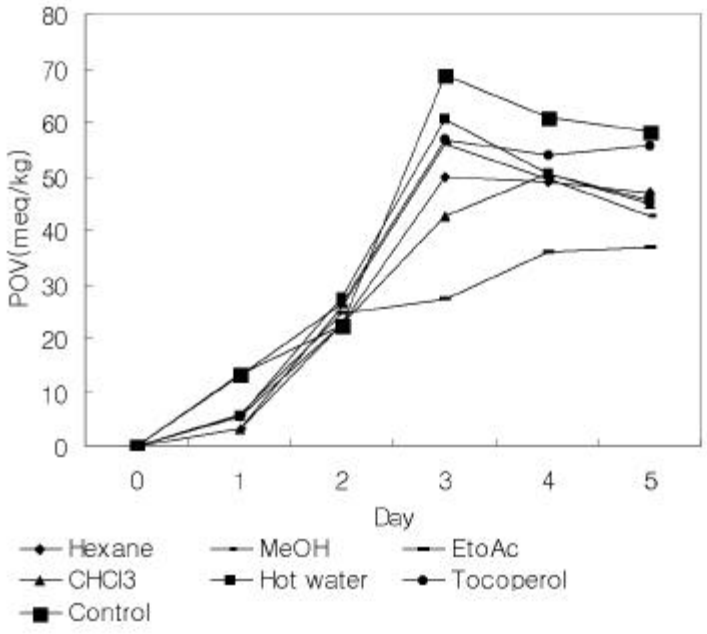


Fig.11. POV of each solvent fractions from Morus alba L. leaf on soybean oil.

3) Rancimat test

대두유를 기질로 하여 뽕잎의 용매 추출물과 획분의 항산화성을 rnacimat을 이용하여 지질 산화를 가속화 시켜 각각 추출물 및 획분의 AI(antioxidative index)를 구하였다. Table 13에서와 같이 ethyl acetate fr.(1.7), chloroform fr.(1.5), methanol ex.(1.4) 순으로 나타났으며, 열수추출물은 다소 낮은 AI 값을 나타내었는데 대두유를 이용한 oven test에서도 물추출의 과산화물 억제 작용이 다소 낮은 결과와 유사하였다.

Table 13. Antioxidative index of each solvent fractions of *Morus alba* L.on soybean oil

Solvent extraction	Antioxidative index
MeCH ex.	1.4
CHCl3 fr.	1.5
EtCAC fr.	1.7
Water ex.	1.3
α-tocopherol	1.5

3. 밤피로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

가. 밤피의 항산화성 및 항산화 물질의 분리

1. 획분별 항산화성

가) 2-deoxyribose법에 의한 항산화성

생체내에서 특히 호흡효소계나 산화환원계에서 radical의 생성과 소거작용이 크게 관여하고 있다. 이들 유리 radical의 작용은 생체조직의 노화나 질병에 관련이 있는 것으로 여겨지며, 이러한 유리 radical을 소거하는 물질로는 ascorbic acid, tocopherol, polyphenol, carotenoid 등이 알려져 있으며 식품첨가물로 이용되고 있다.

은기 및 축파 두 품종을 외피 및 내피로 구분하여 조추출물 및 용매분획에 대하여 항산화 활성을 조사한 결과는 Fig. 1-4와 같다. 10ppm 및 1ppm 농도에서 산소라디칼의 소거능에 따른 항산화 활성을 비교한 결과 축파의 내피 및 외피는 조추출물에 비하여 에틸아세테이트 획분의 항산화 활성이 강하게 나타났다. 특히 외피의 에틸아세테이트 획분의 활성은 BHA와 거의 대등한 활성을 보였다. 은기의 경우 획분별 항산화 활성은 축파와 유사한 경향이었으며 조추출물에 비하여 용매분획별 획분에서 활성이 약간 높은 경향을 나타내었으며 전반적으로 내피에 비하여 외피의 활성이 높고, 은기 역시 외피의 에틸아세테이트 획분의 활성이 BHA와 거의 대등한 결과를 나타내었다. 내피의 경우 두 품종 모두 ether 획분의 항산화 활성이 높게 나타난 반면 외피에서는 오히려 ether 획분 보다는 butanol 획분이 더 강한 활성을 나타내었다.

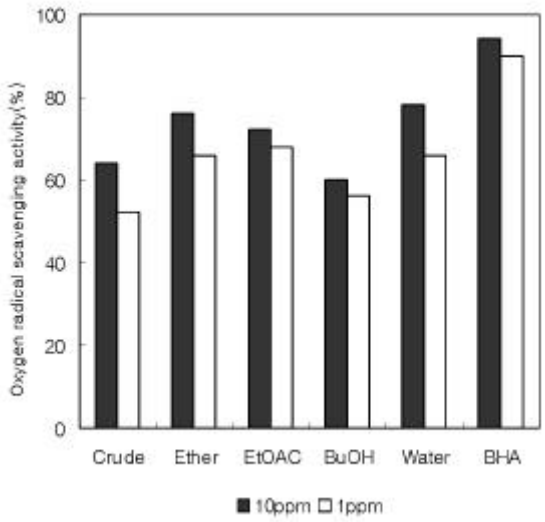


Fig. 1. Oxygen radical scavenging activity of each solvent fractions of Chukpa endoderm.

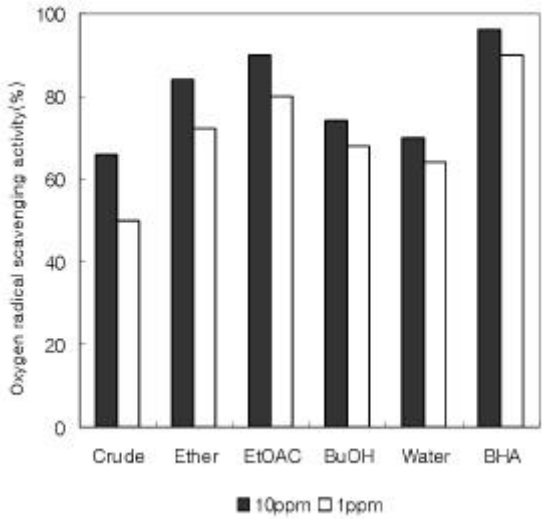


Fig. 2. Oxygen radical scavenging activity of each solvent fractions of Chukpa husk.

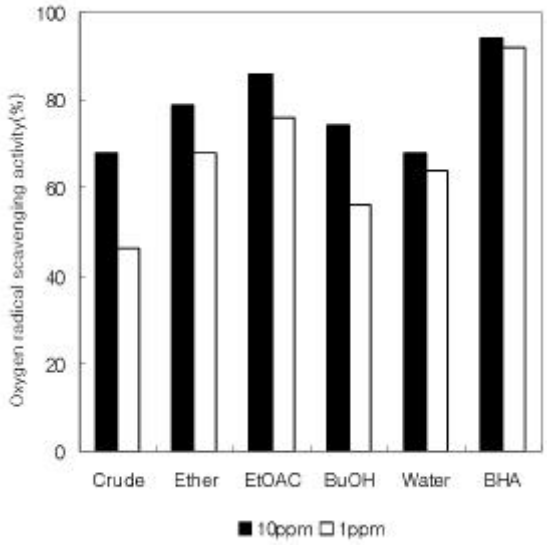


Fig.3. Oxygen radical scavenging activity of each solvent fractions of Eungi endoderm.

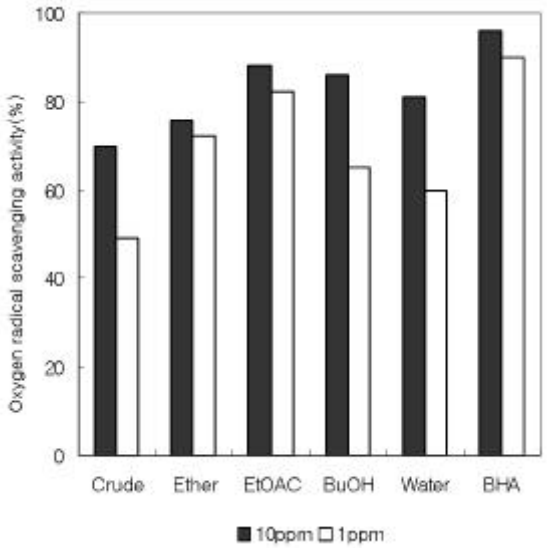


Fig.4. Oxygen radical scavenging activity of each solvent fractions of Eungi husk.

나) Ferric thiocyanate법에 의한 항산화성

지질의 과산화물 및 저분자의 지방족 카르보닐 화합물은 생체내 대사에서 단백질 변성, DNA의 손상 등 생체 대사조직에 장애를 초래하여 노화, 동맥경화증, 당뇨증, 뇌졸중, 암 등 성인병의 주된 원인이 되며, 식품의 변패를 초래하여 식품 품질 저하의 주된 원인이 된다.

항산화제는 식품의 자동산화와 인간의 노화억제라는 측면에서 많은 연구가 진행되어 왔으며 현재 합성 항산화제로는 BHA, BHT 등의 페놀계 항산화제가 많이 사용되고 있다. 그러나 이들은 50mg/kg/day 이상을 섭취할 경우 생체 효소계 및 지질의 변화를 초래하여 발암성 등의 부작용이 나타나기도 한다. 따라서 강력한 항산화능을 가진 안전한 천연물 유래의 항산화제가 요구된다.

Linoleic acid 기질계에서 자동산화로 유발된 ferric thiocyanate법에 의한 밤의 외피 및 내피의 메탄올 추출물의 각각 50ppm, 10ppm 농도에서 항산화능을 측정한 결과는 Fig. 5-8과 같다.

수용성 모델계에서와 같이 지용성 모델계인 linoleic acid 기질계에서도 밤의 외피, 내피의 용매분획별 획분은 강한 항산화 활성을 보였다. 은기에 비하여 축파 품종 모두 ether 획분에서 α-tocopherol과 거의 대등한 강한 활성을 나타내었고 다음으로 ethyl acetate, butanol, water 순이었으며, 내피의 경우 물 획분에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 은기와 축파 두 품종 간의 항산화 활성은 큰 차이를 보이지 않았으며, 다만 축파의 butanol과 water 획분에서 은기보다 높은 활성을 보였다.

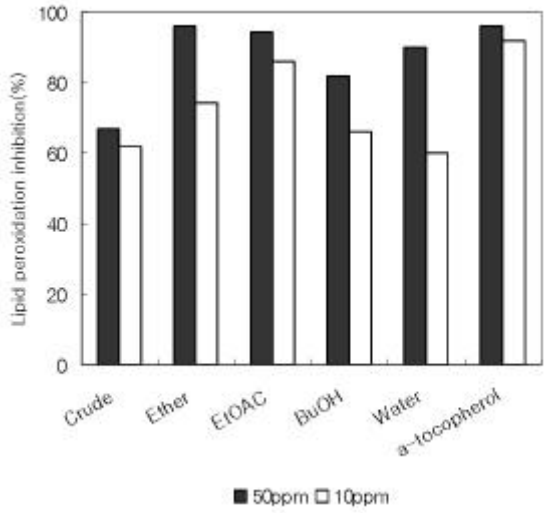


Fig. 5. Antioxidative activitives of each solvent fractions of Chukpa endoderm in linoleic acid model system.

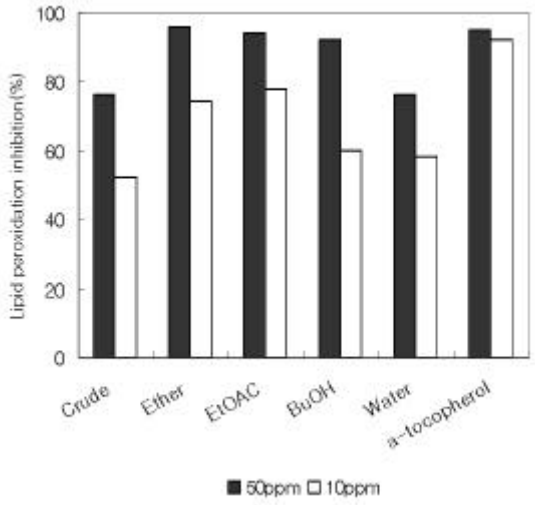


Fig. 6. Antioxidative activitives of each solvent fractions of Chukpa husk in linoleic acid model system.

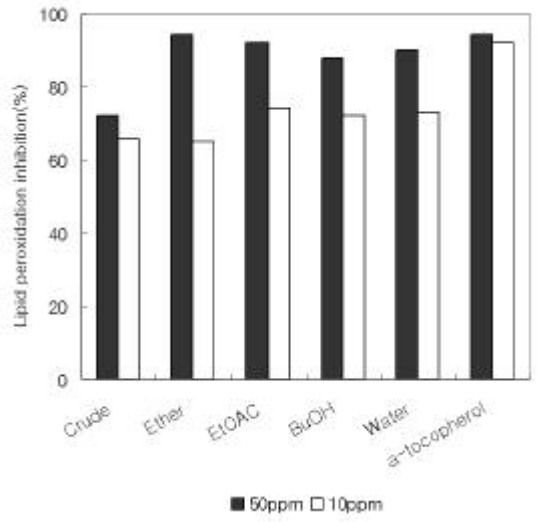


Fig. 7. Antioxidative activitives of each solvent fractions of Eungi endoderm in linoleic acid model system.

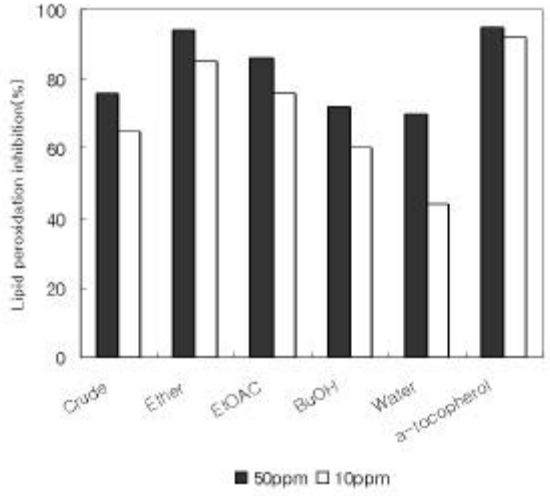


Fig. 8. Antioxidative activitives of each solvent fractions of Eungi husk in linoleic acid model system.

2) 항산화 물질의 분리

가) GC에 의한 페놀산의 분석

밤의 내피 및 외피에는 비교적 가수분해형 탄닌, simple phenol, phenyl propanoid계 화합물을 비롯한 폴리페놀화합물 들이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 이들 폴리페놀화합물 들에 의하여 밤피의 강한 항산화 활성이 나타나는 것으로 사료되어 은기와 축파 품종의 페놀산을 GC로 분석하였다. 석유에테르로 탈지한 시료를 메탄올로 반복 추출한 후 1M HCl로 가수분해하여 aglycone을 얻은 후 ethyl acetate로 분획하여 가용성 산성 획분을 얻어 N,O-bis-(trimethlsilyl)-acetamide로 TMS화 시킨 후 GC로 밤피의 페놀산을 결과 Fig. 9에서 처럼 gallic acid, ellagic acid, caffeic acid 등 10여종의 페놀산을 표준품의 retention time과 비교하여 peak area를 비교하여 개별 페놀산의 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

은기의 내피에서는 gallic acid(431.59), ellagic acid(187.89), p-hydroxybenzoic acid(183.29㎎%)가 주요 페놀산으로 확인 되었으며, 외피에서는 ellagic acid(158.63㎎%) , gallic acid(98.91㎎%), protocatechuic acid(25.55㎎%)가 주된 페놀산으로 확인 되었다.

축파의 경우 내피에서 gallic acid(254.70㎎%), ellagic acid(66.74㎎%), syringic acid(31.95㎎%)가 주된 페놀산이었으며, 외피에서는 ellagic acid(50.07㎎%), gallic acid(35.92), protocatechuic acid(25.14㎎)가 주된 페놀산이었다.

품종별로 보면 축파보다 은기에서 더 높은 페놀산 함량을 나타내고 있으며, 주요 페놀산 또한 gallic acid 및 ellagic acid로 이 두 페놀산이 총페놀산 함량의 50% 이상을 차지하고 있음을 알 수 있다. 또한 내피에서 외피보다는 월등히 많은 페놀산 함량을 나타내고 있으며, vanillic acid의 경우 내피에서만 발견되었다.

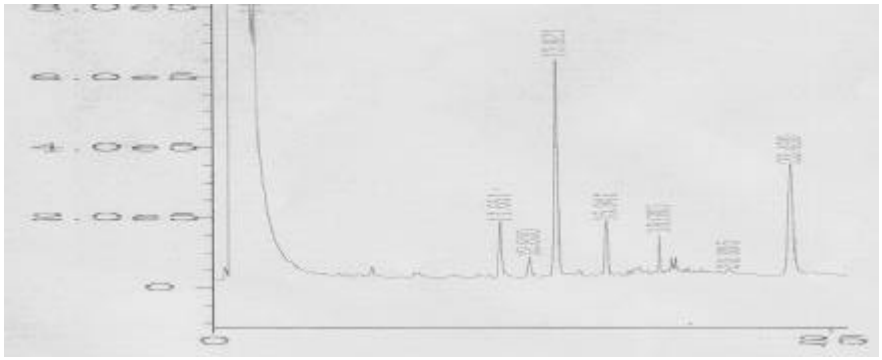


Fig.9-A

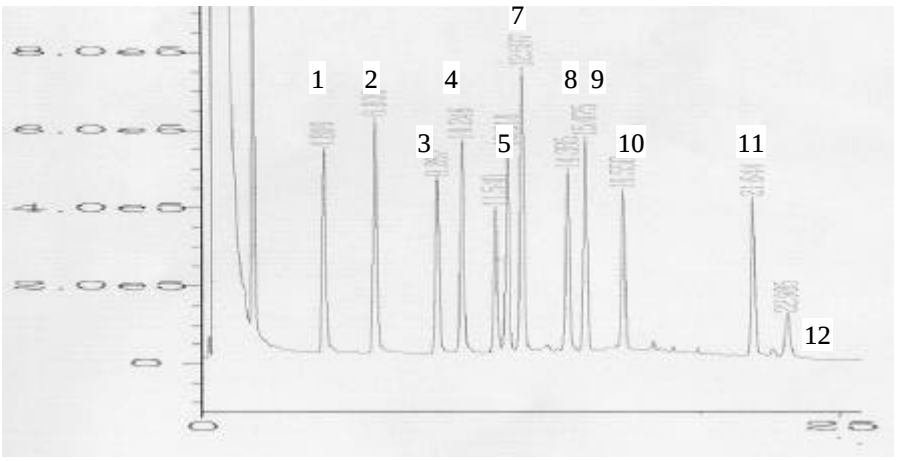


Fig. 9-B

Fig. 9. GC chromatogram of endoderm of Eungi.

A: outer peel of Eungi

E: authentic phenolic acid

1:salicylic acid 2:p-hydroxybenzoic acid 3:vanillic acid 4:protocatecuic acid 5:syringic acid 6:p-coumaric acid 7:gallic acid 8:ferulic acid 9:caffeic acid 10:sinamic acid 11:chlorogenic acid 12:ellagic acid

Table 1. Contents of phenolic acids in chestnut peels (mg%, dry basis)

Phenolic acid	Eungi		Chukpa	
	Endoderm	Husk	Endoderm	Husk
Catechol	-	-	27.54	1.02
Salicylic acid	18.96	1.02	25.90	2.39
p-hydroxy benzoic acid	183.29	1.10	4.55	1.69
Vanillic acid	21.69	-	7.43	-
Protocatechuic acid	47.31	25.55	24.37	25.14
Syringic acid	93.49	13.39	31.95	6.62
p-coumaric acid	-	-	-	1.62
Gallic acid	431.59	98.91	254.70	35.92
Ferulic acid	-	25.38	9.94	9.78
Caffeic acid	43.39	-	3.49	4.32
Ellagic acid	187.89	158.63	66.74	58.07

나) Column chromatography

페놀산 함량이 많은 은기의 내피로부터 항산화물질을 분리하기 위하여 메탄올 조추출물로부터 항산화 활성이 뛰어난 에틸아세테이트 획분을 sephadex LH-20 column을 사용하여 95%에탄올, 70% 아세톤으로 순차적으로 용출하여 DPPH에 의한 전자공여능을 시험한 결과한 결과는

Fig. 10과 같다. 전자공여능에 따라 7개의 획분(SE 1:1-9(test tube No.), SE2:10-14, SE3:15-22, SE4:16-30, SE5:31-37, SE6:37-42, SE7:43-50)으로 다시 나누고 각 획분별 항산화성을 시험한 결과 Fig. 11과 같이 SE2와 SE5획분에서 우수한 항산화능을 보여 이들 두 획분으로부터 항산화 물질을 분리하기 위하여 prep. HPLC를 행하였다.

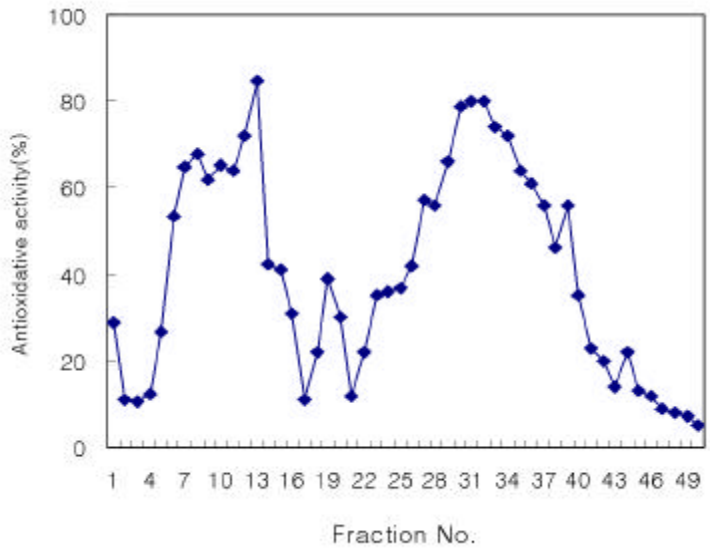


Fig. 11. Electron donating activity of each fraction isolated from chestnut endoderm by Sepadex LH 20 column chromatography.

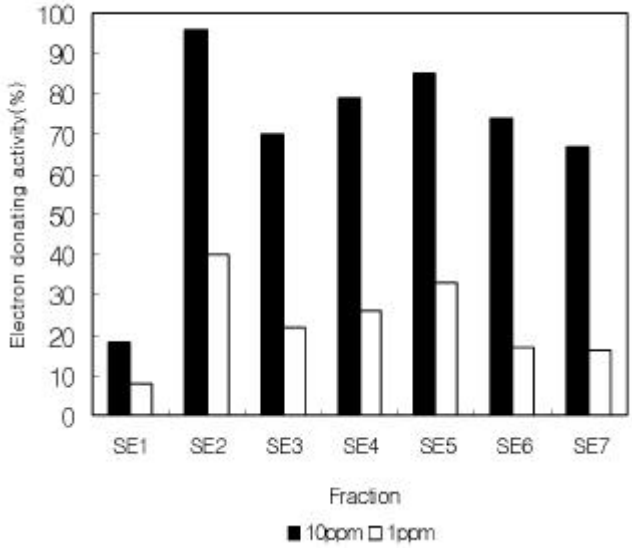


Fig. 12. Electron donating activity of each subfraction isolated from chestnut endoderm by Sepadex LH 20 column chromatography.

다) HPLC에 의한 분리

Column chromatography에서 분획한 7개의 획분 중에서 DPPH에 의한 전자공여능이 우수한 SE2와 SE5에 대하여 ODS-5(20ø × 250㎜) column을 이용하여 20% methanol상에서 분취하여 분석용 column으로 확인한 결과 단일 peak 임을 확인하였다.

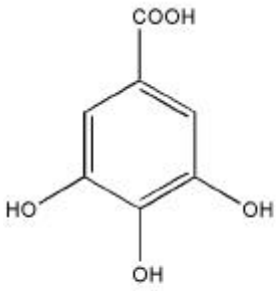
3) 항산화 물질의 구조 분석

가) compound 1 과 2의 구조분석

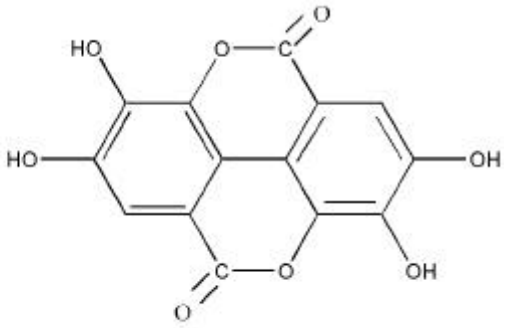
HPLC로 분리정제한 compound 1의 UV 흡수 파장은 278㎚에서 강한 흡수대를 보이고 있으며, compound 2는 253㎚와 360㎚에서 흡수대가 나타났다. 이들 성분은 1H 및 13C-NMR로 구조를 확인한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 따라서 compound 1을 gallic acid, compound 2를 ellagic acid로 구조 동정하였다.

Table 1. 1H and 13C-NMR spectral data for compound 1 and 2

13C	Compound 1	Compound 2	1H	Compound 1	Compound 2
C1	121.19	101.9	1-H	7.01(d)	
C2	109.76	139.7	5-H		7.61(s)
C3	145.47	153.2	5'-H		7.45(s)
C4	138.59	154.6			
C5	145.47	115.4			
C6	109.76	117.5			
C7		163.0			
C1'	69.12	107.7			
C2'		138.3			
C3'		146.7			
C4'		150.6			
C5'		110.3			
C6'		114.9			
C7'		163.0			
C1''		144.1			
C2''		140.3			
C3''		135.9			
C4''		140.1			
C5''		106.7			
C6''		112.9			



Gallic acid(comp. 1)



Ellagic acid(comp. 2)

Fig. 13. Chemical structure of the compound 1 and 2 isolated from chest nut endoderm.

4) 분리된 항산화 물질의 항산화성 및 trosinase 저해활성

가) Oxtgen radical 소거능

밤내피로부터 분리한 gallic acid와 ellagic acid의 radical 소거능을 시험한 결과는 Fig.14와 같다. Gallic acid, ellagic acid 모두 강한 radical 소거능을 나타내었으며 대조구로 사용한 합성항산화제인 BHA와 천연항산화제인 α-tocopherol과 거의 대등한 우수한 항산화성을 보였다. 이러한 화합물은 밤의 내피에 많이 함유되어 있음을 GC를 통하여 확인하였고 이를 이용할 수 있는 대량 분리 기술이 요구된다.

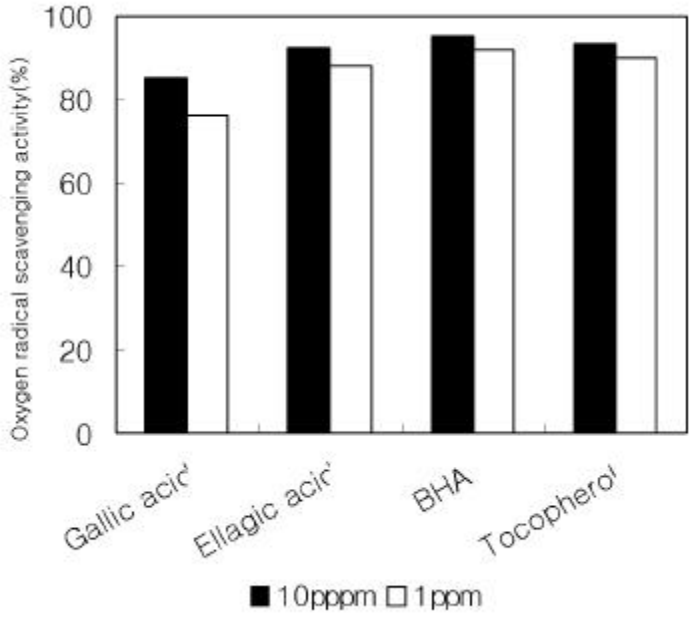


Fig. 14. Oxygen radical scavenging activity of antioxidant compounds isolated from chestnut endoderm.

나) 전자공여능

1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl(DPPH)를 이용하여 밤내피로부터 분리한 gallic acid와 ellagic acid의 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 15와 같다. 2-deoxyribose oxidation법에 의한 radical 소거능과는 달리 gallic scid의 전자공여능이 ellagic acid보다 높게 나타났으며, 10ppm에서는 gallic acid, ellagic acid 모두 BHA와 α-tocopherol보다 더 뛰어난 전자공여능을 보여 저농도에서 강한 항산화성이 있음을 보여 주었다. 이러한 전자공여능은 페놀성화합물의 항산화력의 지표가 되는데 gallic acid와 ellagic acid 모두 수용성 모델계의 항산화 검정에서 높은 항산화활성을 나타내었다.

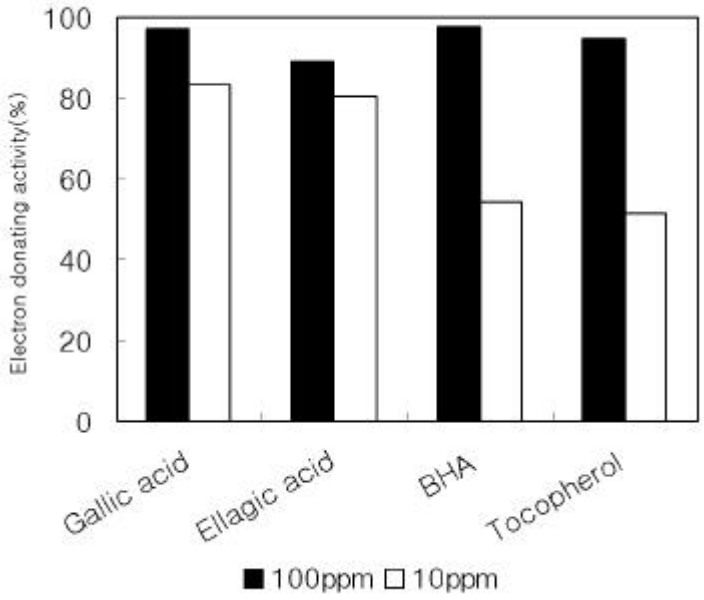


Fig. 15. Electron donating activity of antioxidant compounds isolated from chestnut endoderm.

다) rancimat test

동물성 유지인 돈지와 식물성 유지인 대두유에 대한 항산화력을 시험하기 위하여 뽕잎으로부터 분리한 gallic acid와 ellgic acid를 시험 유지에 첨가하여 Rancimat을 사용하여 무첨가구를 대조구로 하여 항산화 정도를 AI(antioxidative index, 추출물 첨가구의 유도기간 / 무첨가구의 유도기간)를 구하였다. Table 3과 같이 lard에서는 gallic acid와 ellagic acid의 AI 값은 각각 1.7과 2.1로 ellagic acid의 경우 α-tocopherol보다 우수한 항산화력을 보였다.

대두유를 사용한 경우 돈지보다는 다소 낮은 AI 값을 나타내어 밤피로부터 분리한 gallic acid와 ellagic acid는 식물성 유지보다는 동물성 유지에 강한 항산화능을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 3. Antioxidative index of antioxidant compounds isolated from chest nut endoderm

compounds	Antioxidative index(AI)	
	Lard	Soya bean oil
Gallic acid	1.7	1.4
Ellagic acid	2.1	1.9
BHA	2.3	2.2
α-tocopherol	1.7	1.5

라) Peroxide value

밤내피로부터 분리한 화합물의 동물성 유지인 돈지에 대한 항산화성을 알아보기 위하여 100℃에서 가속화시켜 48시간 후 POV를 측정하여 이들 화합물의 영향을 조사하였다. control

구의 PCV가 140meq/kg인 반면 gallic acid와 ellagic acid의 경우 각각 16meq/kg, 18meq/kg로 우수한 항산화성을 나타내었으며 항산제로 널리 사용되는 BHA(12meq/kg), α-tocopherol(45meq/kg)과 비교하여도 대등한 항산화성을 보여 주었다.

식물성 유지인 대두유를 사용한 경우 Fig. 17과 같이 BHA, ellagic acid, gallic acid, α-tocopherol 순으로 과산화물 생성 억제 작용을 보였다. 48시간 후 대조구의 PCV 값과 비교할 때 50%의 과산화물 억제 작용이 있었다. 따라서 밤내피로부터 분리한 gallic acid와 ellagic acid는 동물성 유지 및 식물성유지에서 과산화물 생성 억제를 보여주고 있으며, 특히 ellagic acid의 경우 기존 항산화제와 버금가는 강한 항산화력을 나타내어 식품 첨가물로서 이용 가능성을 보였다.

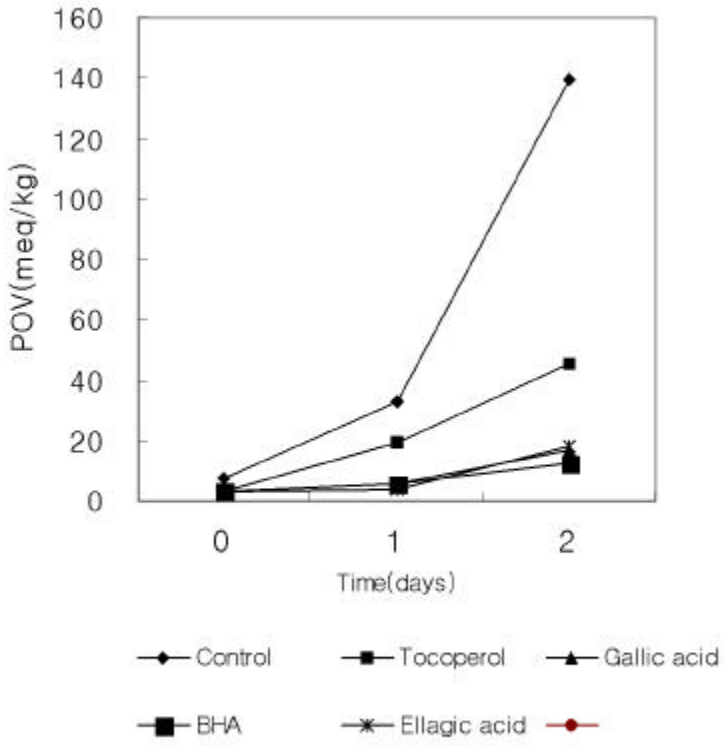


Fig. 16. POV of each compounds isolated from chestnut endoderm on lard during storage at 100℃.

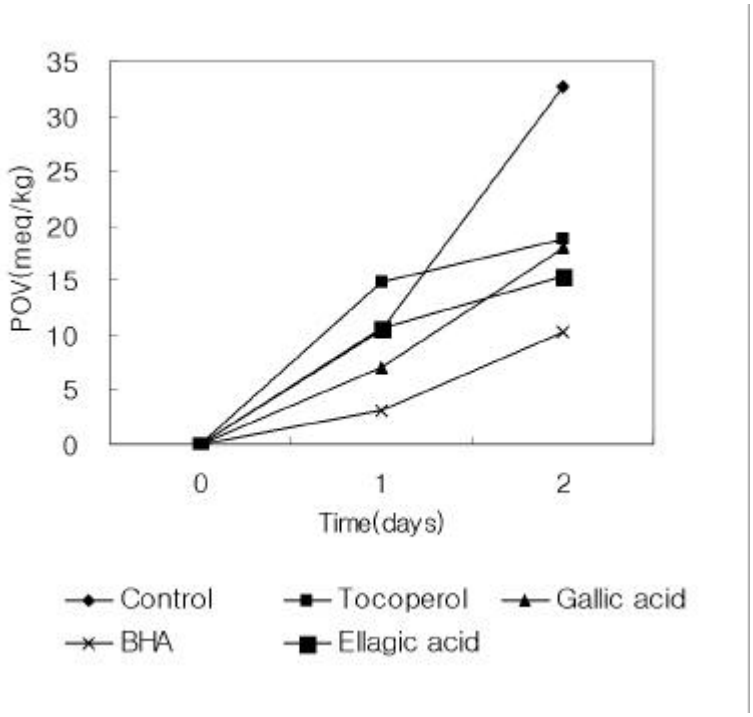


Fig. 17. POV of each compounds isolated from chestnut endoderm on soybean oil during storage at 100℃.

마) 쥐간 microsome 지질과산화반응

생체모델시스템으로서 쥐 간 microsome의 지질과산화반응을 이용하여 밤피로부터 분리한 gallic acid와 ellagic acid의 항산화 작용을 측정하였다. gallic acid의 경우 57.06%, ellagic acid의 경우 53.11%의 지질과산화 억제 작용을 보였으며 대조구로 사용한 BHA에 조금 못미치는 강한 항산화능을 보였다.

Table 4. Inhibitory effects of each compound isolated from chest nut endoderm on enzymatically ADP/ NADPH/ EDTA/Fe^{3+} induced lipid peroxidation in rat liver microsomes

Compounds	Inhibition(%)
Gallic acid	27.12
Ellagic acid	4.62
BHA	62.46

바) Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 tyrosine을 산화하여 L-DCPA (L-dihydroxy- phenylalanine)을 생성시키고, 이를 다시 dopaquinone으로 산화하는 반응을 촉매해주며, 여기서 생성된 quinone은 다른 quinone 또는 아미노산이나 단백질과 중합하여 효소적 갈변반응의 최종산물인 흑갈색의 melanin 색소를 생성하게 된다.

밤 내피로부터 분리한 분리한 2개의 화합물의 tyrosinase 저해활성을 시험한 결과는 Table 5와 같다. gallic acid의 경우 41.73%, ellagic acid의 경우 27.95%의 tyrosinase 저해활성을 나타내어 ascorbic acid보다 더 높은 저해 활성을 보이고 있다.

Table 5. Inhibitory effects of each compound isolated from chest nut endoderm against commercially available mushroom tyrosinase

Compounds	Tyrosinase inhibitory activity(%)
Gallic acid	41.73
Ellagic acid	27.95
Kojic acid	78.42
Ascorbic acid	18.12

The final concentration of all compounds tested was 0.16 mg/mL
Kojic acid and L-ascorbic acid were used as positive references
Each experiment was performed in duplicate.
NE; no effect

5) 밤피 추출물의 변이원성 및 항돌연변이원성

가) 변이원성

Ames test는 *Salmonella typhimurium*의 복귀돌연변이 현상을 관찰하여 돌연변이 유무를 판정하는 방법으로, 시료가 변이원성을 나타내게 되면 복귀돌연변이 colony 수가 증가하게 된다. 뽕잎의 메탄올 추출물과 열수추출물을 frame shift type mutant인 TA98과 base pair exchange type mutant인 TA100에 대하여 변이원성 실험을 한 결과는 Table 6과 같다. 추출물을 plate당 0.5mg에서 4.0mg까지 농도를 증가시키면서 실험한 결과, 복귀돌연변이된 colony 수(histidine revertant)가 농도에 의존하여 증가하지 않았으며, S-9 mixture를 가하여 대사활성화를 시켰을 때도 histidine revertant의 수가 증가하지 않으므로, 밤내피의 메탄올, 열수 및 아세톤추출물은 변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

Table 6. Mutagenicity of each extraction from chest nut endoderm on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants/plate			
		Without S-9 mix		With S-9-mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Spontaneous		21±4	147±12	23±3	156±11
MeCH ex.	0.5	22±3	153± 7	24±2	169±13
	1.0	24±2	162± 9	23±0	174±15
	2.0	24±3	154±11	26±2	168± 9
	4.0	24±4	167± 8	25±3	178±12
Acetone ex.	0.5	19±3	147±10	19±4	155±12
	1.0	21±4	153± 6	24±2	163± 9
	2.0	22±3	162±10	26±3	172±13
	4.0	22±2	158± 7	27±2	169± 8
Water ex.	0.5	22±1	148± 7	26±4	159± 7
	1.0	23±4	143± 9	24±7	158±12
	2.0	23±2	156± 7	23±2	163±19
	4.0	21±3	162±12	28±5	161±13

나) 밤내피 추출물의 항돌연변이원성

밤내피의 메탄올, 열수 및 아세톤물의 항돌연변이원성을 조사한 결과는 Table 7,8와 같다. 직접변이원인 NPD와 NQO로 돌연변이를 유도하면서 TA 98과 TA 100에 대한 돌연변이 억제 활성을 측정한 결과 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 70.5%, TA 100에서는 65.1% 아세톤 추출물의 경우 TA 98에서는 65.4%, TA 100에서는 58.1%억제활성을 보였다. 반면 열수추출물에서는 TA 98에서는 47.5%, TA 100에서는 42.0%로 메탄올 추출물에 비하여 약간 낮은 돌연변이 억제활성을 보였다. 뽕잎 메탄올 추출물과 열수추출물에서 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 어느 정도 있는 것으로 나타났다.

간접변이원인 2-AF를 S9 mixture를 사용하여 대사활성화를 시키면서 TA 98과 TA 100의 항변이원성을 조사한 결과 Table 8과 경우 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 85.3%, TA 100에서는 76.3% 아세톤 추출물의 경우 TA 98에서는 69.3%, TA 100에서는 47.1%억제활성을 보였다. 반면 열수추출물에서는 TA 98에서는 43.4%, TA 100에서는 39.1%로 메탄올 추출물에 비하여 약간 낮은 돌연변이 억제 활성을 보였다.

Table. 7. Antimutagenic effects of each solvent extractions from chest nut endoderm on the mutagenecity induced by indirect mutagen(2-aminofluorene) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 without S9 mixture

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	139±5
NQO	956±21	1210±12
MeOH ex.	123±7(70.5)	172±9(65.1)
Acetone ex.	63±5(65.4)	151±6(58.1)
Water ex	417±13(47.5)	203±11(42.0)

Table. 8. Antimutagenic effects of each solvent extractions from chest nut endoderm on the mutagenecity induced by indirect mutagen(2-aminofluorene) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 with S9 mixture

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	139±5
2-AF	820±21	324±12
MeOH ex.	123±9(85.3)	196±11(76.3)
Acetone ex.	190±11(69.3)	262±20(47.1)
Water ex	564±14(43.4)	287±17(39.1)

나. 동물실험

1) In vivo 시험

가) 간조직내 과산화지질 함량

생체내에서 과산화반응은 지질 산화효소인 lipoxygenase에 의해서 생성되며 이 때 생성되는 지질 과산화물 및 그 분해물인 malondialdehyde(MDA)는 단백질이나 핵산의 아민기와 반응하여 복잡한 복합체를 생성한다. 추출물 식이에서는 MDA 생성량이 모두 감소하였으며 특히 식이 후 bromobenzene을 주사한 구에서 대조구에 비해 현저한 감소를 보이고 있다. 분말 식이에서도 MDA 생성량이 모두 감소하였는데 식이 전 bromobenzene을 주사한 구에서 더 낮은 값을 나타내었다. 이것은 밤피 추출물과 분말 식이에 의해 쥐 간조직내의 MDA 함량이 낮아지는 것을 보여주고 있다.

Table 9. Malondialdehyde contents in liver of rats fed chestnut extract and powder

Group	MDA content
Control	3.545±0.32
A	3.964±1.70
CEA	2.219±1.72
CFA	2.979±0.94
B	4.215±1.86
CEB	3.256±1.13
CFB	3.050±0.81

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

나) Total glutathione 함량

Glutathione은 체내에서 glutathione peroxidase에 의해 환원형 glutathione(GSH)이 산화형 glutathione(GSSG)으로 자기 자신은 산화되면서 free radical을 소거하는 작용을 하며 glutathione conjugation 반응에 의해 독성물질의 epoxide를 mercapturic acid로 바꾸어 무독화 한다. 추출물 식이에서는 bromobenzene을 주사한 시기에 관계없이 간조직과 신장조직 모두에서 대조구보다 glutathione 함량이 낮게 나타났다. 분말 식이에서 간조직에서는 식이 후 bromobenzene을 주사한 구에서 대조구의 약 2배 가량높은 함량을 나타내었으며 신장조직에서는 대조구보다 낮은 함량을 나타내었다.

Table 10. Glutathion contents in liver and kidney of rats fed chestnut extract and powder (μmoles/min)

Group	liver	kidney
Control	7.076±2.06*	7.21±1.43ns
A	7.780±3.36*ns	6.638±2.17
CEA	5.276±4.19	5.885±1.69
CFA	13.254±0.84b	3.468±1.44b
B	16.477±3.57*c	9.448±1.67
CEB	15.728±4.30c	8.282±1.47
CFB	16.283±1.96c	5.783±0.89d*

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

다) Glutathione peroxidase **활성**

Glutathione peroxidase**는 대부분의 조직에서 존재하며 특히 간에서 많은 양이 존재하는데 이 효소는** glutathione **존재하에서 지질과산화물과** hydrogen peroxide**의 분해를 촉매하는** selenium **의존성 효소이다. 추출물 식이군에서 간조직과 신장조직에서 식이 전** bromobenzene **을 처리한 구에서 대조구보다 활성이 높았다. 분말 식이군에서는 간조직과 신장조직 모두에서** bromobenzene**을 주사한 시기에 관계없이 대조구에 비해 높은 활성을 나타내었는데 특히 식이 후** bromobenzene**을 주사한 군에서 보다 높은 활성을 나타내었다. 이것은 추출물보다 분말식이가** glutathione peroxidase**의 활성을 더 높이는 것을 보여주고 있다.**

Table 11. Glutathion peroxidase activity in liver and kidneyof rats fed chestnut extract and powder (μmoles/mg protein/min)

Group	liver	kidney
Control	11.105±1.94ns	1.446±0.39*
A	9.722±3.04	2.461±0.65*ns
CEA	7.402±3.86	1.907±0.30*
CFA	20.468±3.09	3.582±1.24
B	6.629±2.72	4.039±0.38
CEB	7.551±0.76	4.806±1.60*
CFB	9.040±3.23	7.363±3.70

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

라) Glutathione-s-transferase 활성

Glutathione-s-transferase는 glutathione이 독성물질과 conjugation을 이루어 무독화 하는 작용을 촉매하는 효소이다. 추출물 식이에서 식이 전 bromobenzene을 주사한 군에서만 대조구 보다 높은 활성을 나타내었고 나머지 군에서는 대조구에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 분말 식이에서 중 간조직에서는 대조구보다 낮은 활성을 나타내었으며 신장 조직에서는 bromobenzene을 주사한 시기에 관계없이 대조구보다 높은 활성을 나타내었다. 이것은 glutathione-s-transferase가 밤피 분말과 추출물에 의해서 간 조직 보다는 신장조직에서 더 높은 활성을 나타냄을 보여준다.

Table 12. Glutathion-s-transferase activity in liver and kidney of rats fed chestnut extract and powder (ηmoles/mg protein/min)

Group	liver	kidney
Control	735.252±13.95*	8.969±2.82ns
A	499.139±28.51a	14.285±4.01
CEA	291.498±51.50b	7.360±0.59
CFA	343.063±25.87b	24.936±12.11*
B	551.621±26.94c	14.680±2.59*ns
CEB	323.916±15.34d	19.145±9.06
CFB	331.866±22.68d	32.004±22.56*

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

마) Cytochrome p-450 관련 효소 함량

Cytochrome p-450과 cytochrome b5는 NADPH와 NADP의 촉매작용으로 산화, 환원, 수화에 의해 독성물질을 무독화시키는 일산소화 효소로서 자기 자신이 산화되면서 독성물질을 무독화시키는 작용을 한다. 추출물 식이에서는 간조직내에서 cytochrome p-450과 cytochrome b5의 함량이 대조구보다 낮은 값을 가지지만 NADPH의 함량이 대조구 보다 높아 cytochrome p-450과 cytochrome b5의 항산화 작용이 큰 것으로 사료된다. 분말 식이에서는 cytochrome p-450과 cytochrome b5의 함량이 대조구와 유사하지만 NADPH 함량이 낮아 식이에 의한 효과가 나타나지 않은 것으로 사료된다.

Table 13. Effect of chestnut on the liver microsomal cytochrome P-450, cytochrome b5 and NADPH Cytochrome reductase(μmoles/mg protein)

Group	Cytochrome p-450	cytochrome b5	NADPH Cytochrome reductase
Control	14.932±7.18*	2.769±1.31*	5.830±3.87ns
A	6.239±5.87ns	2.408±1.53*a	5.074±2.94
CEA	5.069±1.99	2.354±0.65*a	7.093±7.25
CFA	4.294±2.77	2.777±1.24a	2.20±0.58a
B	4.363±2.95ns	1.550±0.68ns	3.477±3.12ns
CEB	3.279±1.25	1.792±0.51*	7.926±7.48
CFB	2.064±0.82	1.548±0.20	2.360±0.28

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

바) Superoxide dismutase 활성

Superoxide dismutase(SOD)는 superoxide anion radical을 산소분자로 전환시켜 무독화하는 구리 의존성 효소이다. 추출물 식이에서는 간조직과 신장조직 모두에서 bromobenzene을 주사한 시기에 관계없이 대조구보다 낮은 활성을 나타내었다. 분말 식이에서는 식이 전 bromobenzene을 주사한 군의 신장 조직에서만 대조구 보다 약간 높은 활성을 나타내었고 나머지 군에서는 대조구 보다 낮은 활성을 나타내었다. 이것은 Superoxide dismutase의 활성이 식이에 의해 증가되지 못함을 보여주고 있다.

Table 14. Superoxide dismutase activity in liver and kidney of rats fed chestnut extract and powder (μmoles/mg protein/min)

Group	liver	kidney
Control	15.348±1.28*	8.014±1.11*
A	12.609±1.29*ns	12.80±0.31*ns
CEA	10.933±3.30*	6.674±1.88*
CFA	6.674±1.88	15.394±0.66
B	18.020±4.17	16.512±0.50*c
CEB	12.218±1.86*c	11.024±0.56*c
CFB	11.024±0.56	15.213±0.60c

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

사) Cholesterol 함량

Cholesterol은 동물계에만 널리 존재하며 세포막들의 필수성분이고 특히 뇌나, 신경조직의 수초(myelin sheath)의 구성 성분으로 다량 존재하며 담즙산, 성호르몬, 비타민 D의 생합성 전구체로서 생체에 필수적인 물질이다. 하지만 체내 과량 존재시 동맥경화 등의 심장혈관 질환을 일으킨다. 추출물 식이에서 간과 혈액중의 cholesterol 함량은 bromobenzene을 주사한 시기에 관계없이 낮게 나타났으며 특히 식이 전 bromobenzene을 주사한 군의 혈액 중에 많이 낮게 나타났다. 분말 식이에서도 모든 구간에서 cholesterol 함량이 대조구에 비해 낮게 나타났으며 특히 혈액중의 cholesterol 함량이 더욱 낮게 나타났다.

Table 15. Cholesterol level in blood and liver of rats fed chestnut extract and powder

Group	plasma(mg/100ml serum)	liver(mg/g tissue)
Control	126.391±31.58*	16.11±4.44ns
A	129.484±30.49*a	17.559±3.21
CEA	127.535±32.53*a	16.783±1.09
CFA	98.350±17.32*b	14.944±1.27
B	217.113±65.83c	17.616±1.78
CEB	132.247±15.14*d	17.371±0.97
CFB	102.474±18.63*d	15.100±2.53

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

아) Triglyceride 함량

Triglyceride는 자연계에 가장 널리 분포하고 있는 지방질로서 중성지방 수준의 증가는 고지혈증을 의미하며 이는 동맥경화증의 원인이 되기도 한다. 추출물 식이에서 혈액 중의 중성지질의 함량은 식이 전 bromobenzene을 주사한 구에서 낮게 나타났고 간조직에서는 식이 후 bromobenzene을 주사한 구에서 낮게 나타났다. 분말 식이에서는 혈액과 간조직 중의 중성지질의 함량이 bromobenzene을 주사한 시기와 관계없이 대조구 보다 낮게 나타났으며 특히 간조직 중에서 중성지질 함량의 감소율이 높았다.

Table 16. Triglyceride contents in blood and liver of rats fed chestnut extract and powder

Group	plasma(mg/100ml serum)	liver(mg/g tissue)
Control	82.514±6.93*	17.031±4.77*
A	101.336±13.40*ns	16.543±1.29*a
CEA	104.224±14.62*	13.684±1.52b
CFA	85.166±17.74*	11.461±0.91b
B	159.351±20.12c	14.688±1.46*c
CEB	118.092±16.13d	11.156±1.31d
CFB	113.359±13.45d	11.893±0.74d

All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

자) HDL 함량

HDL에 의해 cholesterol이 간으로 운반되어 산화되어 담즙산이 된다. 이렇게 운반될 때 cholesterol은 지방산과 ester를 형성하여 순환하는데 필수지방산과 ester가 기타 지방산의 ester 보다 순환속도가 빠를 뿐만 아니라 수용성이 더 크고 잘 분산된다. 출물 식이에서는 혈액중 HDL의 함량이 식이 후 bromobenzene을 주사한 구에서 높게 나타났고 식이 전 bromobenzene을 주사한 구에서는 대조구와 유사한 함량을 나타내었다. 분말 식이에서는 식이 후 bromobenzene을 주사한 구에서는 대조구와 유사한 함량을 나타내었고 식이전 bromobenzene을 주사한 구에서는 대조구 보다 낮은 함량을 나타내었다. HDL 함량에 대한 식이의 효과는 분말식이에서는 나타나지 않았고 추출물 식이에서만 나타난 것으로 사료된다.

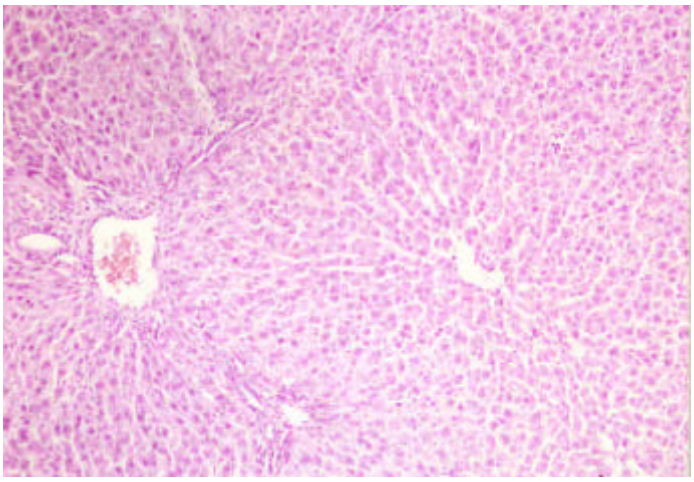
Table 17. High density lipoprotein contents in blood and liver of rats fed chestnut extract and powder

Group	plasma(㎎/100㎖ serum)
Control	95.606±12.17
A	108.636±30.84a
CEA	119.834±24.47a
CFA	109.772±41.60
B	87.190±13.44ns
CEB	87.777±15.81
CFB	97.603±36.19

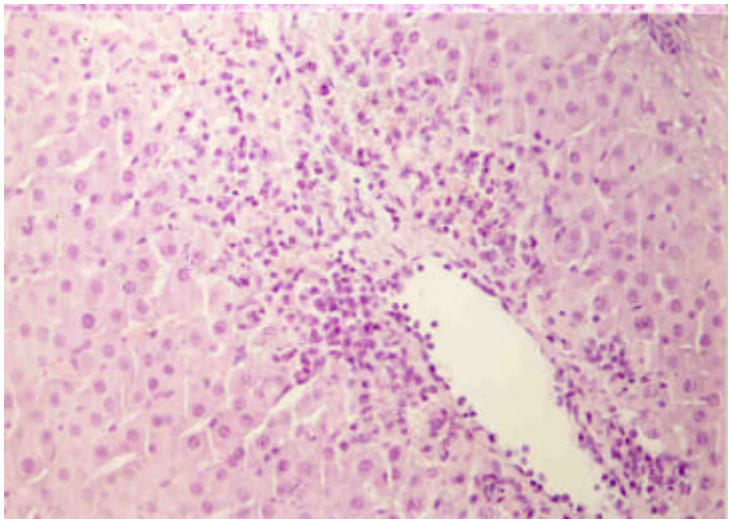
All values are mean ±SD
Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Fisher's LSD test
ns:not significant, A: pre-treatment control, B: post-treatment control,
CE: chestnut skin extract, CF: chestnut skin powder

3) 현미경 검경

식이를 시작하기 전 bromobenzene을 주사한 구에서 추출물 식이군에서는 간세포들이 완전히 회복되었으며 분말식이군에서는 단핵세포의 염증을 동반한 세포괴사가 발견되었으나 일반식이군에 비해서는 많은 회복이 있었다. 식이를 끝낸 후 bromobenzene을 주사한 구에서는 추출물 식이의 경우 중앙혈관 주위의 많은 단핵 세포들의 염증이 발견되고 분말식이에서는 약간의 간괴사가 발견되었다. 하지만 일반식이군에 비해서는 염증과 세포괴사의 양이 적게 나타났다. 이것은 밤피 추출물과 분말을 첨가한 식이에 의해 간 손상의 회복이 있음을 보여주고 독성물질에 대한 해독능력이 증가함을 짐작케 한다.

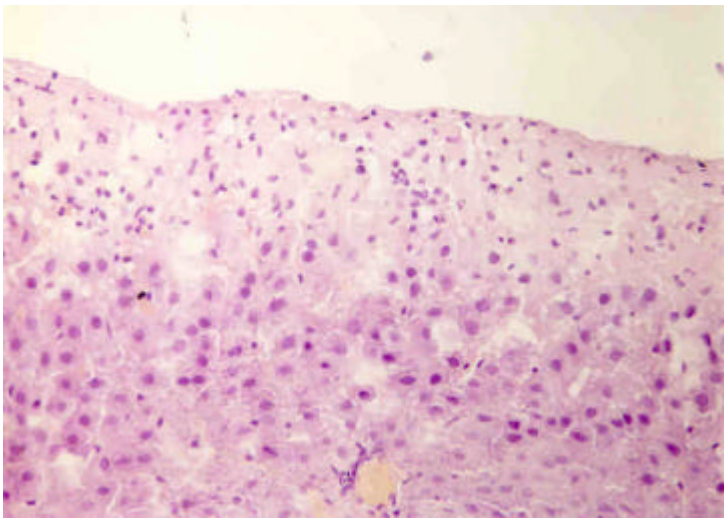


A

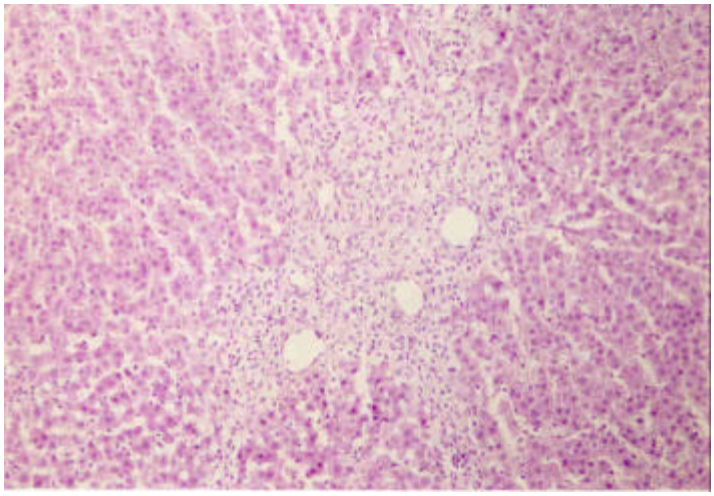


B

Fig. 18. Microscopic photographs of the liver tissue of chestnut endodermel ethyl acetate extract diet rat.
A : Bromobenzene injection before feeding
B : Bromobenzene injection after feeding



A



B

Fig. 19. Microscopic photographs of the liver tissue of chestnut endoderm powder diet rat.

A : Bromobenzene injection before feeding

B : Bromobenzene injection after feeding

다. 밤내피의 건조 및 추출조건에 따른 항산화성

1) 항산화성

가) Cxygen radical 소거능

2-Lecxyribcse의 산화를 이용한 산소 라디칼 소거능을 시험한 결과는 Fig. 20과 같다.

추출용매별 활성실험에서 열수 및 70% 아세톤 추출물 10ppm의 경우 항산화 활성은 비슷하였으나 80% 에탄올 추출물의 경우 낮은 항산화활성을 보였다. 건조 조건별로는 HD 80(80℃열풍건조)가 가장 우수한 활성을 나타내었고 추출용매로는 아세톤에서 약간 높았다.

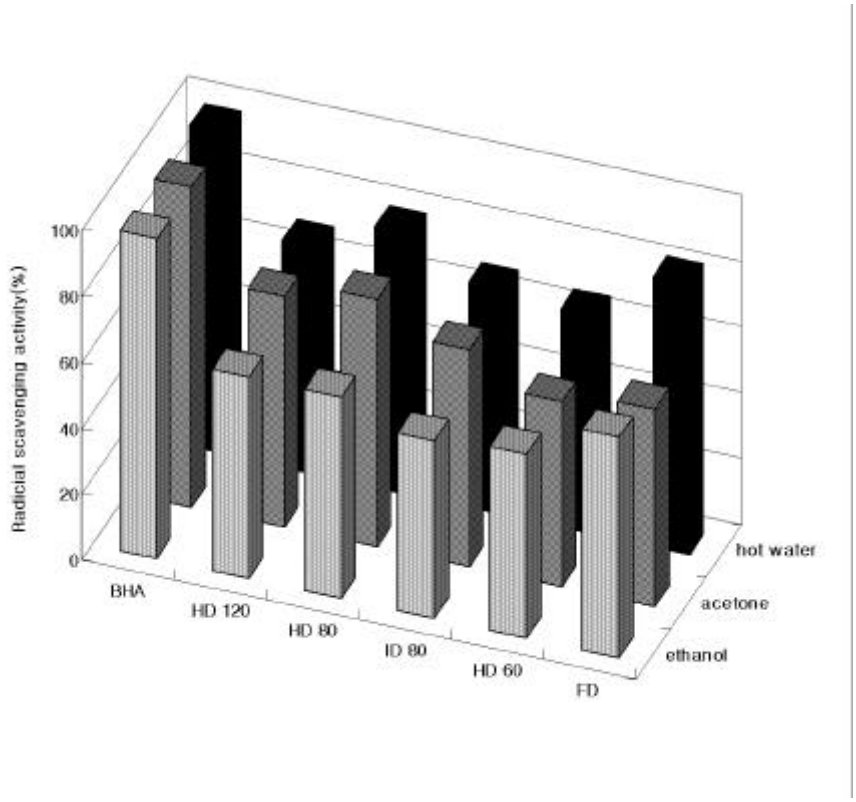


Fig. 20. Oxygen radical scaveging activities of solvent extracts from chestnut endoderm by 2-doxyribose oxidation method(10ppm).
HD 120 : hot air drying at 120℃, HD 60 : hot air drying at 60℃,
HD 80 : hot air drying at 80℃, ID 80 : infrared drying at 80℃,
FD : freeze drying

나) Peroxide value

돈지와 대두유에 시료를 0.2% 첨가하고 60℃, 120℃에서 각각 500ppm첨가 하였으며 무첨가구와 첨가구를 저장기간에 따라 PCV의 변화를 측정한 결과는 Fig. 21,22와 같다.

돈지를 3, 6, 9, 15, 20 일간 저장 하였을 때 PCV는 15meq/kg 시료인 M.H.RP(80% 에탄올 추출물 80℃열풍건조 후 볶음처리)는 4, 25, 59, 65, 75meq/kg 로 나타났으며 시료 중 가장 낮았

으며, W.H.RP(상온 열수 추출물 80℃열풍건조 후 볶음처리)는 8, 37, 46, 68 85㎷eq/㎏로 나타났다. A.H.RP(70% 아세톤 추출물 80℃열풍건조 후 볶음처리)는 3일째 13㎷eq/㎏, 6일째 115㎷eq/㎏로 나타났으며 무첨가구와 비슷한 변화를 보였다. 대두유를 1, 2, 3일간 저장한 후 PCV의 변화를 측정한 결과 W.H.RP가 산화를 억제하는 효과가 높았으며, α-tocopherol의 경우 산화 억제효과가 낮았다. 식물성유지는 첨가구와 무첨가구간의 변화가 적은 것으로 보아 식물성유지에는 tocopherol과 같은 천연 항산화물질이 함유되어 있기 때문에 아무리 정제한 식물성유지라 하더라도 그들의 원료 중에 함유되어 있던 항산화성의 일부가 첨가되어 항산화 첨가효과가 적게 나타나는 것으로 생각된다..

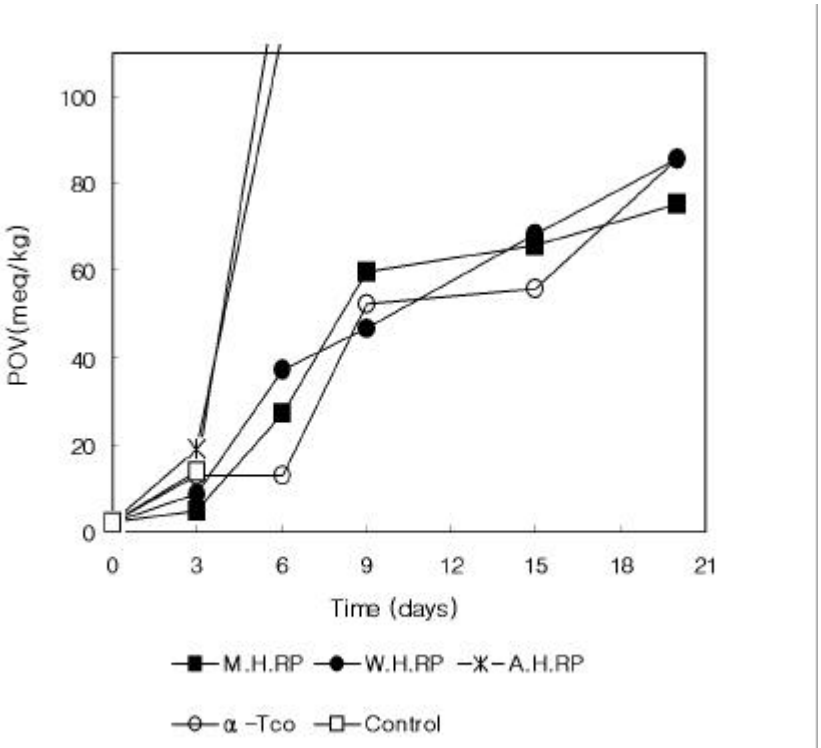


Fig. 21. Change of peroxide values during the storage of lard containing chestnu endoderm solvent exstracts at 60℃.
E.H.RP(80% ethancl extract rcasting prccessess after hot air dryirg at 80℃)
A.H.RP(70% acetcne extract rcasting prccessess after hot air dryirg at 80℃)
M.H.RP(hct water extracts rcasting processess after hct air dryirg at 8C℃)

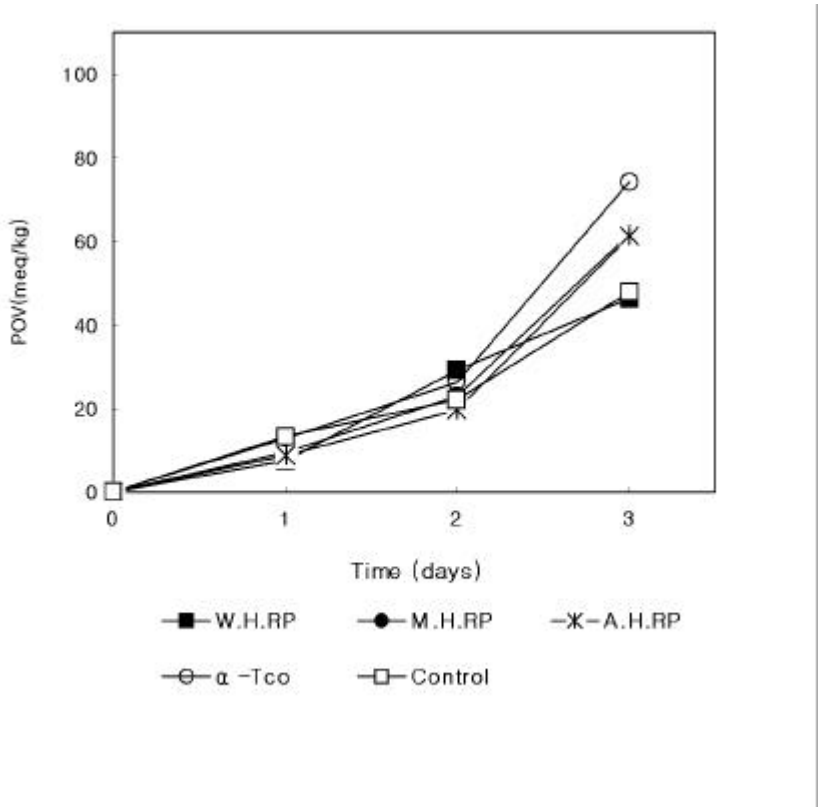


Fig. 22. Change of peroxide values during the storage of soybean oil containing chestnut endoderm solvent exstracts at 120℃.

E.E.RP(80% etharol extract roasting prccessess after hot air drying at 80℃)

A.E.RP(70% acetcne extract roasting prccessess after hot air drying at 80℃)

M.E.RP(hot water extracts rcasting prccessess after hct air drying at 80℃)

다) Rancimat test

밤내피의 식품첨가물로서의 이용성을 알아보기 위해서 본 실험에서 항산화활성이 높은 70%

아세톤 추출물을 사용하여 라드에 대한 과산화물 생성 억제 효과를 시험한 결과는 Fig. 23와 같았다. 밤 내피의 유도기간을 대조구의 유도기간으로 나눈 AI(Antioxidative index) 값으로 각각 나타내었다. 밤내피의 첨가 농도별 영향을 보면 500ppm, 1000ppm에서 차이를 나타내었으며 H.RP(Hot drying at 80 ℃ Roasting processess)가 높은 AI값을 나타내었다.

밤내피의 첨가물에 따른 상승효과를 Fig. 24에 나타내었다. 비교적 항산화 활성이 우수한 70% 아세톤 추출물인 H.RP(80℃ 열풍건조 후 볶음 처리)를 시료로 사용하였다. 첨가물로는 α-tocopherol, Vit-C,cCitric acid를 사용하여 AI값을 나타내었으며 Vit-C, α-tocopherol , citric acid 단독 처리구의 경우 AI 값은 각각 1.2, 2, 1.5로 나타났으며 추출물과 이들 첨가물을 혼합하여 첨가한 경우 α-tocopherol 일 때 AI 값이 2.78로 가장 높게 나타났으며 Vit-C와 citric acid도 AI 값이 각각 1.8과 2로 처리구보다 더 높은 항산화 효과를 나타내었다.

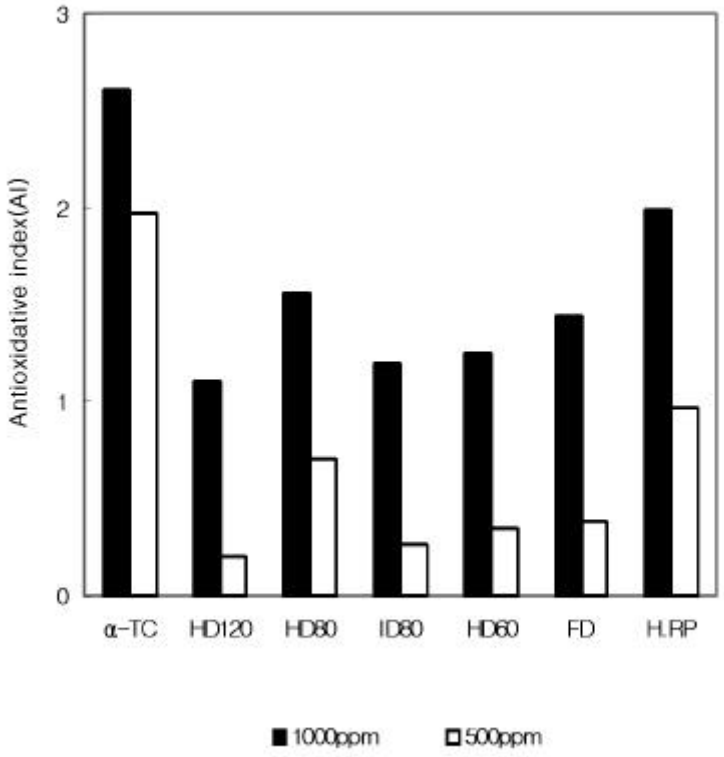


Fig. 23. Induction periods of acetone extracts from chestnut endoderm in lard.

HD 120 : hot air drying at 120℃,HD 60 : hot air drying at 60℃, HD 80 hot air drying at 80℃, ID 80 : infrared drying at 80℃, FD : freeze drying ·F.RP : after roasting prccesses hct air dryirg at ℃

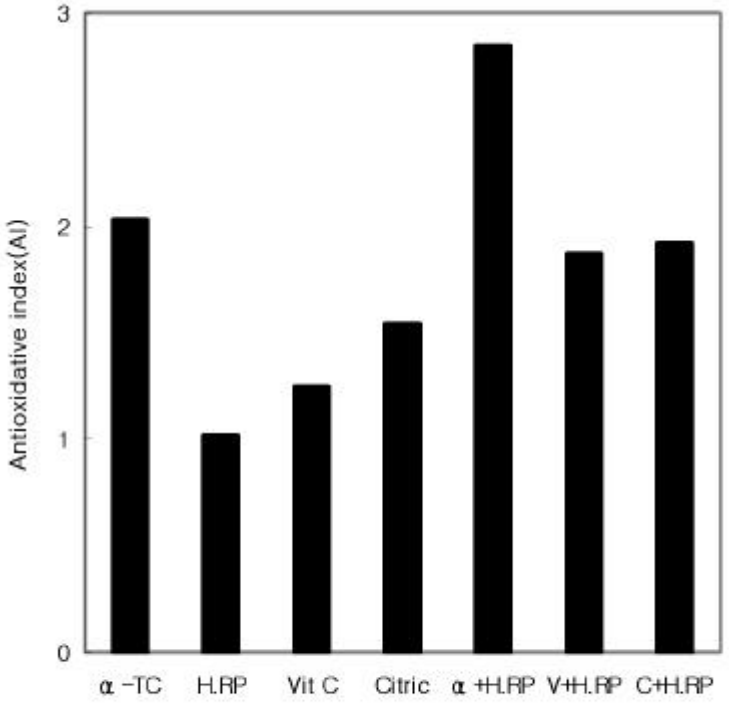


Fig. 24. Synergistic effect of acetone extracts with several synergists.

HD 120 : hot air drying at 120℃,HD 60 : hot air drying at 60℃, HD 80 hot air drying at 80℃, ID 80 : infrared drying at 80℃, FD : freeze drying ·F.RP : after roasting processes hot air drying at 80℃

4. 작약씨로부터 항산화물질의 분리 및 동정

가. 조추출물의 항산화성

n-hexane으로 충분히 탈지한 후 얻은 유박을 열탕 MeCH로 반복 추출한 후 여과 및 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 작약씨의 메탄올 조추출물의 항산화성을 시험하기 위하여 electron donation activity, soybean lipoxygenase(SLC) inhibitory activity, 동·식물성 유지에 대한 rancimat test를 행하였다. 작약씨의 메탄올 추출물은 특히 SLC에 대해 98%이상의 높은 저해 활성을 나타내었고, 돈지의 경우 2.1, 대두유의 경우 1.7의 높은 AI 값을 나타내었다.

Table 1. Antioxidative activity of *Paeonia lactiflora* seeds

Antioxidative test	Antioxidative activity
Electron donating activity(%)	46
Lipoxygenase inhibitory activity(%)	98
Antioxidative index(AI) in lard	2.1
Antioxidative index(AI) in soya bean oil	1.7

나. 항산화 물질의 분리

1) 용매 분획

작약씨로부터 항산화 물질 즉 lipoxygenase 저해제의 분리 및 정제는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 작약씨를 먼저 열탕 n-hexane으로 충분히 탈지한 후 얻은 유박을 열탕 MeCH로 반복 추출한 후 여과 및 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 다음 80% 메탄올 수용액으로 원액을 충분히 녹인 후 여기에 n-hexane을 가하여 재반복 탈지하였다. 메탄올 추출물은 다시 부분 농축한 다음 여기에 ether, ethyl acetate 및 n-butanol 순으로 가하여 용매분획 하였다.

2) Column chromatography

용매 분획하여 얻은 Et_2O 획분(7.2g)을 silica gel column을 사용하여 $CHCl_3$:MeOH(5:1)을 용매로 하여 메탄올의 농도를 순차적으로 증가시키면서 용출한 후 다시 Sepadex LH 20 column 상에서 메탄올로 용출하여 prep. HPLC로 분리 정제 하였다.(Fig. 1)

3) HPLC에 의한 분리

Column chromatography에 의해 분리된 획분 중 주된 SLO 저해활성분획 (UVmax λ=225, 250 and 336nm)은 최종적으로 preparative HPLC를 사용하여 분리·정제하였다. 이때 HPLC의 조건은 다음과 같다; Column, Novapak C18 (2cm × 25cm × 2 catridge); solvent, 50% MeOH containing 0.1% TFA; flow rate, 5.0mL/min; UV detector, 340nm.

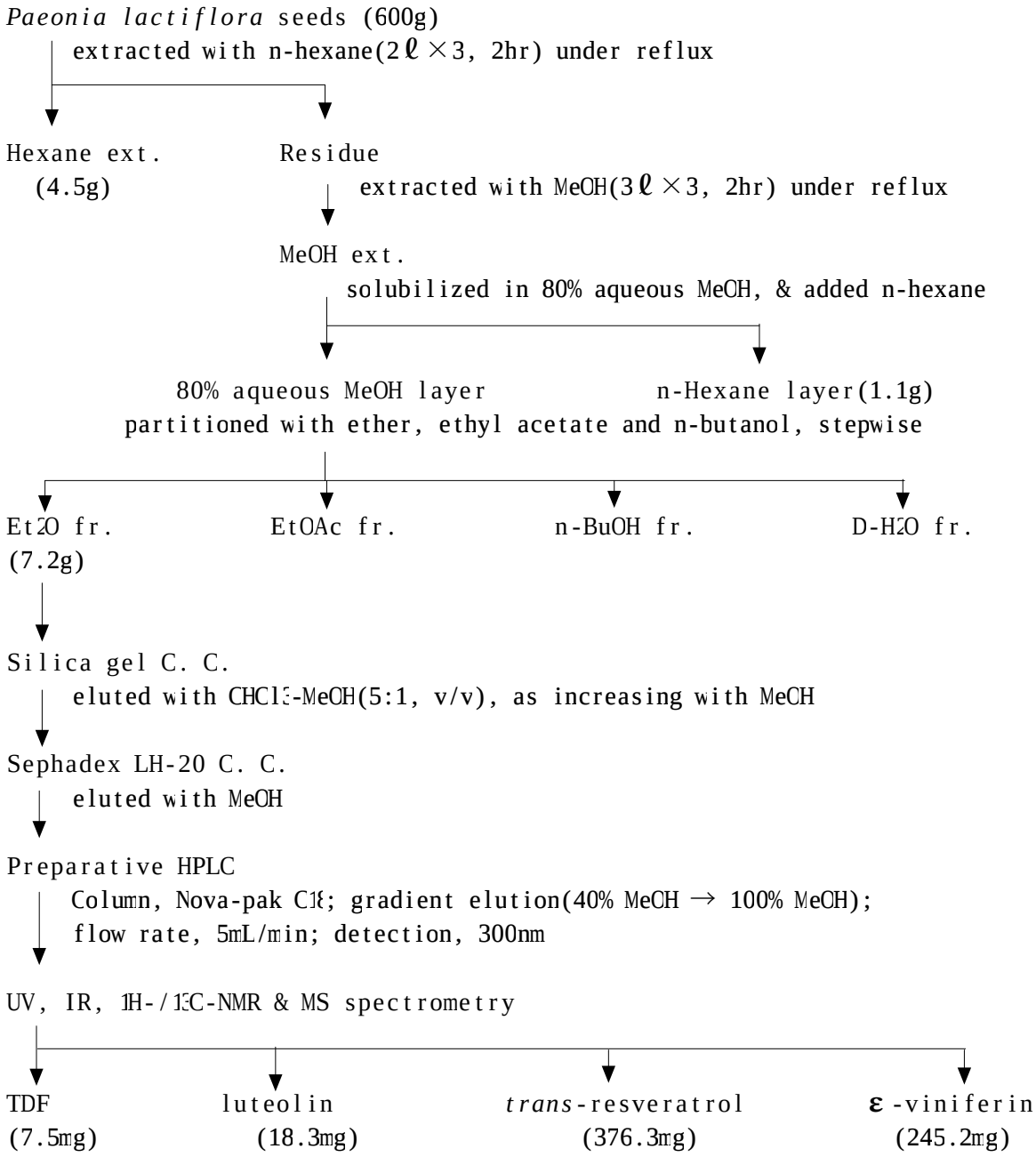


Fig. 1. Isolation and purification of *Paeonia lactiflora* seeds.

다. 항산화 물질의 구조 분석

1) Compound 1과 2의 구조 동정

Compound 1의 UV 흡수 파장은 253nm, 349nm에서 최대 흡수 파장을 나타냈으며, EI-MS(*m/z*)에서 분자량이 286으로 확인되었고 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data를 분석한 결과 compound 1을 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone(luteolin)으로 구조동정하였다. Compound 2는 278nm, 342nm에서 최대 흡수 파장을 보였으며, EI-MS(*m/z*)에서 분자량이 286으로 확인되었고 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data를 분석한 결과 compound 2를 5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone으로 구조동정하였다.

Compound 1과 compound 2의 UV, IR 및 MS, ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data는 Table 2와 같다.

Table 2. UV, IR, NMR and EI-MS spectral data of Luteolin and TDF isolated from *Paeonia lactifloa* seeds

Instrumental analysis	Luteolin	TDF*
UV λ_{max} nm (log ε)	253 (4.13), 349 (4.17)	278 (4.12), 342 (4.07)
IR ν_{max} (cm^{-1})	3421 (CH), 2927, 2853, 1680 (C=O), 1629, 1453, 1203	3423 (CH), 2929, 2876, 1682 (C=O), 1612, 1449, 1211
^{1}H-NMR		
	6.69 (1H, *s*, H-3)	6.67 (1H, *s*, H-3)
	6.22 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-6)	6.28 (1H, *s*, H-8)
	6.47 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-8)	
	6.92 (1H, *d*, *J*=8.8 Hz, H-5')	6.96 (1H, *d*, *J*=8.8 Hz, H-5')
	7.44 (1H, *dd*, *J*=2.0 & 8.8 Hz, H-6')	7.56 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-2')
-OCH3	7.59 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-2')	7.60 (1H, *dd*, *J*=2.0 & 8.8 Hz, H-6')
-OCH3		3.97 (3H, *s*)
^{13}C-NMR		3.94 (3H, *s*)
	166.32 (C-2)	166.05 (C-2)
C=O	103.92 (C-3)	104.37 (C-3)
	183.92 (C-4)	184.39 (C-4)
	163.34 (C-5)	151.89 (C-5)
	100.15 (C-6)	131.23 (C-6)
	166.02 (C-7)	156.64 (C-7)
	94.94 (C-8)	91.41 (C-8)
	159.48 (C-9)	148.46 (C-9)
	105.37 (C-10)	105.61 (C-10)
	123.75 (C-1')	122.63 (C-1')
	114.16 (C-2')	112.42 (C-2')
	147.02 (C-3')	148.22 (C-3')
	150.93 (C-4')	150.24 (C-4')
	116.84 (C-5')	116.12 (C-5')
	120.37 (C-6')	119.02 (C-6')
-OCH3		56.61
-OCH3		55.77
EI-MS (*m/z*)	286 [M+], 270, 242	330 [M+], 314, 286

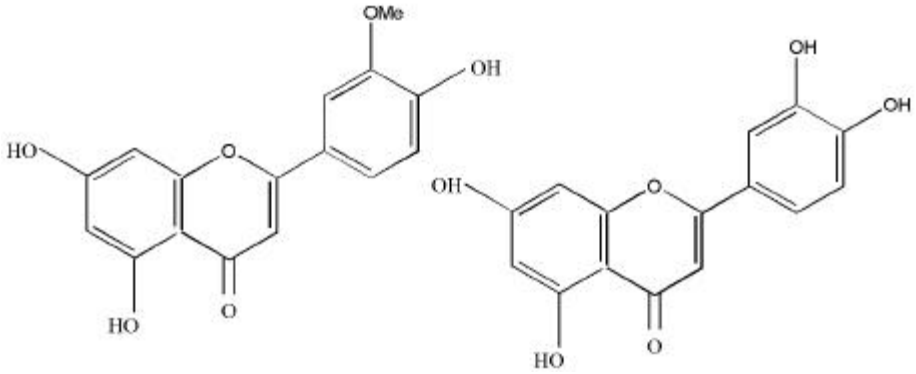
2) Compound 3과 4의 구조 동정

Compound 3의 UV 흡수 파장은 219㎚, 308㎚, 320㎚에서 최대 흡수 파장을 나타냈으며, EI-MS(*m/z*)에서 분자량이 228로 확인되었고 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data를 분석한 결과 compound 3을 trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol)으로 구조동정하였다. Compound 4는 218㎚, 312㎚, 324㎚에서 최대 흡수 파장을 보였으며, EI-MS(*m/z*)에서 분자량이 454로 확인되었고 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data를 분석한 결과 compound 4를 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone으로 구조동정하였다.

Compound 3과 4의 UV, IR 및 MS, ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR의 data는 Table 3과 같다.

Table 3. UV. IR. NMR and EI-MS spectral data of *trans*-resveratrol and ε-viniferin isolated from *Paeonia lactiflora* seeds

Instrumental analysis	*trans*-Resveratrol	ε-Viniferin
UV λ_{max} nm (log ε)	219 (4.28), 308 (4.02), 320 (3.34)	218 (4.52), 312 (4.40), 324 (4.48)
IR ν_{max} (cm^{-1})	3200-3300, 1589, 1507, 1150, 966	3230, 1594, 1510, 1440, 1,002, 964
^{1}H-NMR	6.43 (1H, *d*, *J*=2.5 Hz, H-2)	7.19 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-2 & 6)
	6.14 (1H, *t*, *J*=2.5 Hz, H-4)	6.83 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-3 & 5)
	6.43 (1H, *d*, *J*=2.5 Hz, H-6)	5.41 (1H, *d*, *J*=5.5 Hz, H-7)
	7.33 (1H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-2')	4.47 (1H, *d*, *J*=5.5 Hz, H-8)
	7.33 (1H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-6')	6.32 (2H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-10 & 14)
	6.75 (1H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-3')	6.29 (1H, *t*, *J*=2.0 Hz, H-12)
	6.75 (1H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-5')	7.15 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-2' & 6')
	6.79 (1H, *d*, *J*=16.5 Hz, Hα)	6.75 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-3' & 5')
	6.94 (1H, *d*, *J*=16.5 Hz, Hβ)	6.91 (1H, *d*, *J*=16.5 Hz, H-7')
		6.71 (1H, *d*, *J*=16.5 Hz, H-8')
		6.24 (1H, *d*, *J*=1.0 Hz, H-12')
		6.03 (1H, *d*, *J*=1.0 Hz, H-14')
^{13}C-NMR		133.69 (C-1)
	141.31 (C-1)	127.93 (C-2 & 6)
	105.76 (C-2)	116.27 (C-3 & 5)
	159.37 (C-3)	158.27 (C-4 & C-4')
	102.64 (C-4)	94.13 (C-7)
	159.37 (C-5)	57.01 (C-8)
	108.20 (C-6)	147.17 (C-9)
	127.02 (Cα)	106.90 (C-10 & 14)
	130.42 (Cβ)	159.83 (C-11 & 13)
	131.40 (C-1')	101.76 (C-12)
	129.38 (C-2')	129.87 (C-1')
	115.84 (C-3')	128.72 (C-2' & 6')
	158.37 (C-4')	116.27 (C-3' & 5')
	116.48 (C-5')	130.88 (C-7')
	128.79 (C-6')	126.12 (C-8')
		137.18 (C-9')
		120.03 (C-10')
		162.56 (C-11')
		96.53 (C-12')
		159.51 (C-13')
		106.72 (C-14')
EI-MS (*m*/*z*)	228 [M+], 181, 114	454 [M+], 438, 360, 342, 256, 239



5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (luteolin) (comp. 1)

5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (comp. 2)

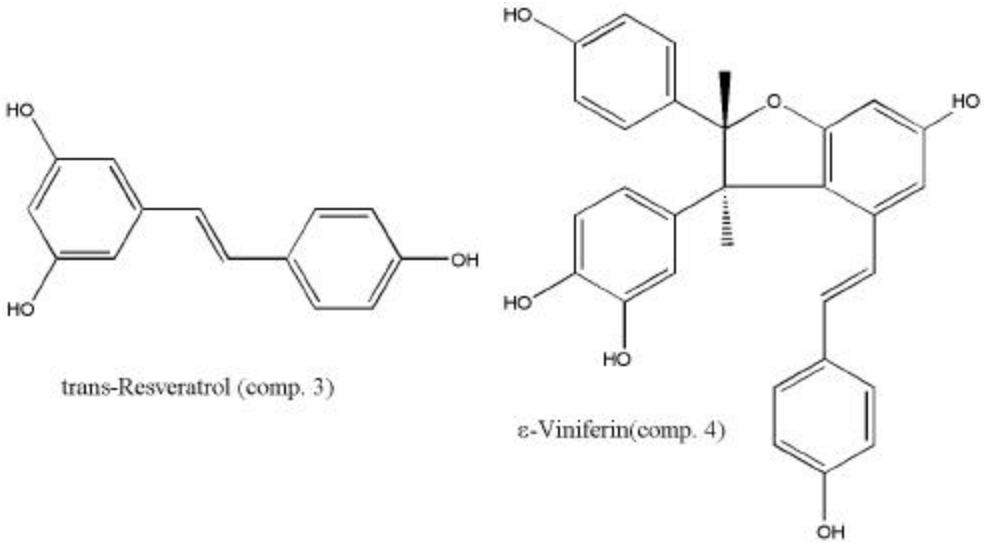


Fig. 2. Chemical structure of antioxidant compounds isolated from *Paeonia lactiflora* seeds.

라. 분리된 항산화 물질의 항산화성 및 tyrosinase 저해활성

1) 분리한 화합물의 linoleic acid 자동산화 억제 효과

4가지 화합물의 항산화 작용을 식품 모델시스템으로서 linoleic acid를 함유한 water-alcohol emulsion system을 사용하여 측정하였다. 항산화 지수(시료를 함유한 반응혼합액의 흡광도가 0.3에 도달하는 데 경과한 일 수)를 비교하였을 때 luteolin의 경우 기존 항산화제인 α-tocopherol과 BHA 보다 뛰어난 효과를 보였으며 다른 화합물도 BHA보다 높은 항산화 효과를 나타내었다.

Table 4. Antioxidative index of antioxidant compounds isolated from *Paeonia lactiflora*

Compound	Atioxidative Index
5,7,3‘,4'-Tetrahydroxyflavone(luteolin)	15
5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone	22
5,4'-Dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone	24
trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene(resveratrol)	20
BHA	27
α-Tocopherol	18

2) 쥐간 microsome 지질과산화반응

생체모델시스템으로서 쥐 간 microsome의 지질과산화반응을 이용하여 분리한 4가지 화합물의 항산화 작용을 측정하였다. 25, 50, 100㎛ 농도에서 4가지 화합물 모두 α-tocopherol보다 뛰어난 저해활성을 나타내었으며, 특히 luteolin과 resveratrol의 경우 100㎜ 농도에서 100%에 가까운 저해활성을 나타내었다.

Table 5. Inhibition effects of lipid peroxidation of eantioxidant compounds isolated from *Paeonia lactiflora* in rat liver microsome

compounds	Inhibition(%)		
	25μM	50μM	100μM
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone(luteolin)	65	85	98
5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone	46	68	87
5,4'-Dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone	45	71	89
trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene(resveratrol)	67	89	99
α-Tocopherol	8	11	28

3) Soybean lipoxygenase 저해활성

Lipoxygenase(EC 1.13.11.12)는 불포화지방산의 *cis*,*cis*-1,4-pentadiene에 산소를 첨가하여 hydroperoxide의 생성반응을 촉매하는 산화환원효소이다. 이 효소는 식물이나 동물의 조직에 널리 존재하며, 특히 콩의 비린내와 변향과 연관있는 soybean lipoxygenase(SBL)가 가장 널리 연구되어져 왔다. 한편, 사람의 5-lipoxygenase(5-LO)는 아라키돈산을 5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid로 산화를 촉진하며, 나아가 그것을 다시 leukotrienes류로 전환시킨다. 이들 leukotrienes류는 인체의 염증, 알레르기 및 종양의 발생과 깊은 연관이 있다.

작약씨로부터 분리한 화합물 들의 SLO 저해활성을 시험한 결과는 Table 6과 같다.

ε-viniferin의 경우 IC_{50}치가 0.81μM로 가장 강한 저해활성을 나타내었으며, TDF와 trans-resveratrol도 각각 1.24μM, 1.02μM의 IC_{50}치를 나타내어 강력한 SLO 저해제인 NDGA와 거의 대등한 억제효과를 보였다.

Table 6. Inhibitory effects of antioxidant compounds isolated from *Paeonia lactiflora* seeds on a soybean lipoxygenase (SBL)

Compound	SBL inhibitory activity (IC_{50}, μM)*
TDF	1.24
Luteolin	10.23
trans-Resveratrol	1.02
ε-Viniferin	0.81
NDGA	0.57

*IC_{50} value, the concentration of sample causing 50% inhibition of SBL activity, was calculated by linear regression analysis
TDF; 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone
NDGA, nordihydroguaiaretic acid, was used as a reference compound.

4) Tyrosinase 저해활성

식품의 효소적 갈변반응의 주역을 담당하고 있는 polyphenol oxidase(PPO; C-diphenol; C2 oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유하고 있는 산화효소로서 polyphenolase 또는 tyrosinase로 일컬어진다. Tyrosinase는 tyrosine를 산화하여 L-DOPA(L-dihydroxy-phenylalanine)을 생성시키고, 이를 다시 dopaquinone으로 산화하는 반응을 촉매해주며, 여기서 생성된 quinone은 다른 quinone 또는 아미노산이나 단백질과 중합하여 효소적 갈변반응의 최종산물인 흑갈색의 melanin 색소를 생성하게 된다. 한편, tyrosinase에 의한 효소적 갈변반응의 초기단계는 피부의 melanin 색소의 생합성과정과 매우 유사하다. 따라서 tyrosinase 저해제는 피부 멜라닌 생성 저해물질로써 kojic acid, arbutin, L-ascorbic acid 유도체 및 melanostatin 등은 이미 상품화되어 미백화장품의 원료로 사용되고 있지만 이 또한 안전성과

경제성 등의 문제점을 안고 있다.

작약씨로부터 분리한 화합물들의 tyrosinase 저해활성을 시험한 결과는 Table 7과 같다. Table 7과 같이 작약으로부터 분리한 4종의 화합물은 mushroom tyrosinase에 대하여 저해 활성을 나타내고 있지 않고 있으며 trans-resveratrol에서 2.35%의 저해활성만을 보여주고있다.

Table 7. Inhibitory effects of antioxidant compounds isolated from *Paeonia lactiflora* seeds against commercially available mushroom tyrosinase

Compounds	Inhibition(%)
TDF*	NE
Luteolin	NE
trans-Resveratrol	2.35
ε-Viniferin	NE
Kojic acid	78.42
L-Ascorbic acid	18.12

The final concentration of all compounds tested was 0.16 mg/mL
Kojic acid and L-ascorbic acid were used as positive references
Each experiment was performed in duplicate.
TDF; 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone
NE; no effect

마. 작약씨 메탄올 추출물의 변이원성 및 항돌연변이원성

1) 변이원성

가) Ames test

작약씨의 메탄올 추출물을 frame shift type mutant인 TA98과 base pair exchange type mutant인 TA100에 대하여 변이원성 실험을 한 결과는 Table 8과 같다. 추출물을 plate당 0.5mg에서 4.0mg까지 농도를 증가시키면서 실험한 결과, 복귀돌연변이된 colony 수(histidine revertant)가 농도에 의존하여 증가하지 않았으며, S-9 mixture를 가하여 대사활성화를 시켰을 때도 histidine revertant의 수가 증가하지 않으므로, 작약씨의 메탄올추출물은 변이원성을 나타내지 않는 것으로 판정하였다.

Table 8. Mutagenicity of methanol extract from *Paeonia lactiflora* on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants/plate			
		Without S-9 mix		With S-9-mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Spontaneous		18±2	164±12	22±2	158±14
MeCH ex.	0.5	22±1	161± 5	21±1	164±5
	1.0	21±3	157± 7	24±3	159±13
	2.0	19±2	172±11	26±4	164±8
	4.0	22±2	169± 3	23±3	173±9

나) SCS chromotest

작약씨의 메탄올 추출물과 용매분획물의 SOS chromotest를 시험한 결과는 Table 9와 같다. 양성대조물질로 NQO를 첨가했을때, IF(induction factor)가 2.432로 SOS 반응이 유도됨을

알 수 있었다. 그러나 한삼덩굴의 메탄올 추출물과 각 용매분획을 첨가했을 경우는, 농도에 따라 IF값의 뚜렷한 증가가 없고, IF값이 높지 않아 변이원성을 나타내지 않는 것으로 생각되었다. 따라서 작약씨의 메탄올 추출물과 각 용매분획은 Ames test 뿐만 아니라 SCS chromo test에서도 변이원성을 나타내지 않아 변이원 활성물질이 존재하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 9. Mutagenicity of methanol extract from *Paeonia lactiflora* by SCS chromotest

Samples	Dose (μg/plate)	β-galactosidase		Alkaline phosphatase		Induction factor
		OD450	unit	OD450	unit	
Negative		0.268	9.45	1.018	33.64	1.000
NQO	0.02	0.686	23.66	1.129	37.25	2.432
MeCH ex.	1	0.283	10.10	1.046	36.58	1.016
	2.5	0.287	10.74	1.088	35.55	1.045
	5	0.291	9.33	1.076	37.90	1.028
	10	0.302	9.46	1.109	37.30	1.027

2) 항돌연변이원성

작약씨의 메탄올 추출물과 열수추출물의 항돌연변이원성을 조사한 결과는 Table 10, 11과 같다. 직접변이원인 NPD와 NQO로 돌연변이를 유도하면서 TA 98과 TA 100에 대한 돌연변이 억제활성을 측정한 결과 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 62.85%, TA 100에서는 53.27%로 작약씨 매탄올추출물에서 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 어느 정도 있는 것으로 나타났다.

간접변이원인 2-AF를 S9 mixture를 사용하여 대사활성화를 시키면서 TA 98과 TA 100의 항변이원성을 조사한 결과 Table 11과 같이 메탄올 추출물의 경우 TA 98에서는 87.66%, TA 100에서는 78.93%의 억제 활성을 나타내었다.

Table. 10. Antimutagenic effects of methanol extract from *Paeonia lactiflora* on the mutagenecity induced by direct mutagen(NPD and NQO) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 without S9 mixture.

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	128±6
NPD	800±31	
NQO		673±17
MeCH ex.	305±19(62.85)	389±16(53.27)

Table. 11. Antimutagenic effects of methanol extract from *Paeonia lactiflora* on the mutagenecity induced by indirect mutagen(2-aminofluorene) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 with S9 mixture.

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	128±6
2-AF	1160±21	380±17
MeCH ex.	156±19(87.66)	189±7(78.93)

5. 환삼으로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

가. 추출용매별 항산화 활성

추출용매별 항산화 활성을 측정하기 위하여, 환삼덩굴 분말을 메탄올, 에탄올, 디클로로메탄, 아세톤 및 물을 이용하여 80℃에서 8시간씩 2회 추출한 후 DPPH radical에 대한 소거활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 추출수율은 물 추출물이 22.8%로 가장 높았고, 메탄올 추출물이 10.2%, 에탄올 추출물이 8.0%, 아세톤 추출물이 5.0% 였다. 그러나 디클로로메탄 추출물은 수율이 매우 낮게 나타났다. DPPH radical 소거활성은 메탄올 추출물이 43.7%로 가장 높았고, 에탄올과 아세톤 추출물이 41.2%와 37.8% 였다. 그러나 물 추출물은 전혀 항산화 활성을 나타내지 않았다.

Table 1. DPPH radical scavenging activities by extraction solvents

Solvents	Yield(%)	DPPH radical scavenging(%)
Methanol	10.2	43.7
Ethanol	8.0	41.2
Dichloromethane	2.8	32.5
Acetone	5.0	37.8
Water	22.8	0.0

나. 메탄올 추출물의 용매분획별 항산화 활성

환삼덩굴의 메탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 분획한 용매 분획물의 항산화작용을 실험하기 위하여 지질에 대한 과산화물 생성억제능과 프리라디칼에 대한 소거활성을 측정하였다. Linoleic acid를 기질로 이용하여 환삼덩굴의 메탄올 조추출물과 용매분획의 과산화물 생성억제능을 시험한 결과는 Fig. 1과 같다. 메탄올 조추출물과 각 용매분획은 대조군에 비하여 과산화물 생성을 억제하였으며, 특히 에칠아세테이트 분획과 부탄올 분획은 천연 항산화제로 많이 사용되고 있는 α-tocopherol 보다 항산화능이 우수하였으며, 합성 항산화제인 BHA와 대등한 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical에 대한 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 다른 실험결과와 유사하게 에칠아세테이트 분획과 부탄올 분획이 다른 분획에 비해 활성이 높게 나타났으며, α-tocopherol 보다는 높게 나타났고, BHA와는 대등한 활성을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 환삼덩굴의 에칠아테이트 분획과 부탄올 분획은 강력한 항산화물질을 함유하고 있는 것으로 판단되며, 이 항산화물질은 지질의 과산화물 생성억제와 프리라디칼 소거작용 등 다양한 항산화 작용을 나타내는 것으로 생각되었다.

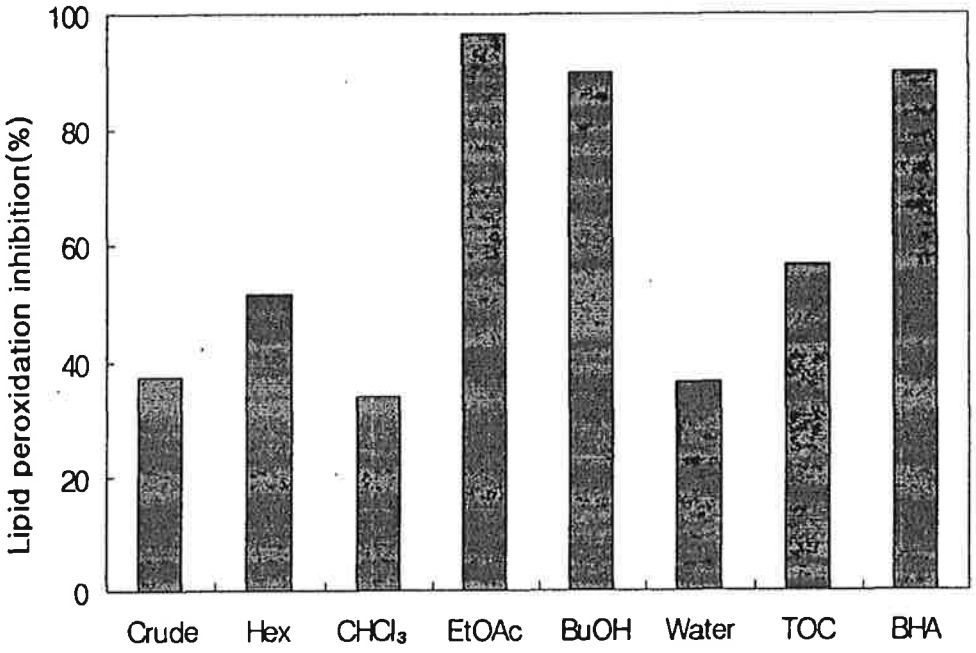


Fig. 1. Antioxidative activities of each solvent fractions of *Humulus japonucus* in linoleic acid model system.(1ppm)

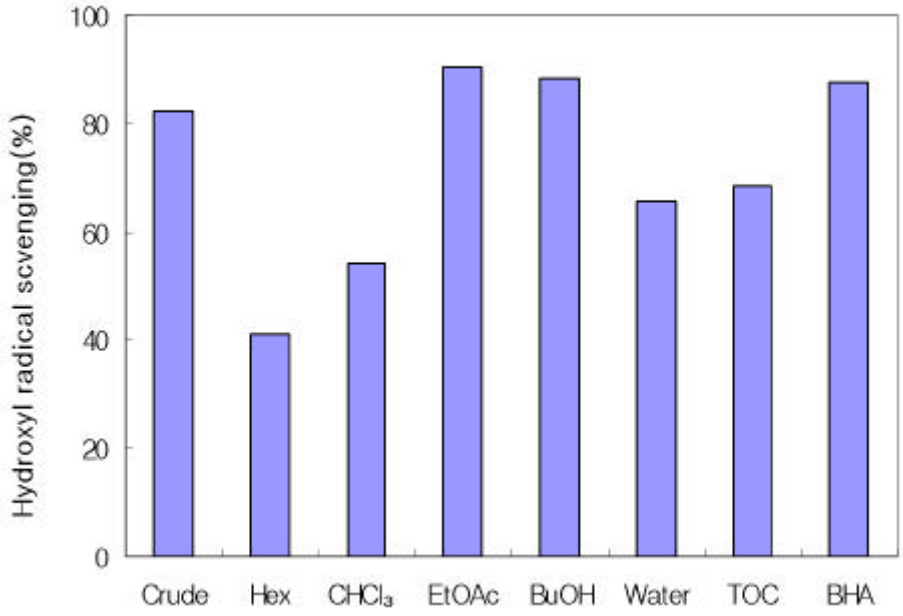


Fig. 2. Hydroxyl radical scavenging activities of each solvent fractions of *Humulus japonucus*.

다. 환삼덩굴로부터 부터 항산화 성분의 분리

1) Amberlite XAD-2 column chromatography**에 의한 분리**

항산화 작용이 높게 나타난 에칠아세테이트 분획으로 부터 항산화 성분을 분리하기 위하여 Amberlite XAD-2 column chromatography**를 실시하였다. 에칠아세테이트 분획** 1,000mg**을** Amberlite XAD-2 column**에** loading**한 후 비극성도를 높이면서 용출하여 물**

분획 111.3mg, 50% 메탄올 분획 473.3mg, 메탄올 분획 149.4mg, 아세톤 분획 30.6mg을 얻었다. 각 분획의 linoleic acid에 대한 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 50% MeOH fraction에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었고, MeOH fraction도 90% 이상의 지질과산화물 생성을 억제하였다.

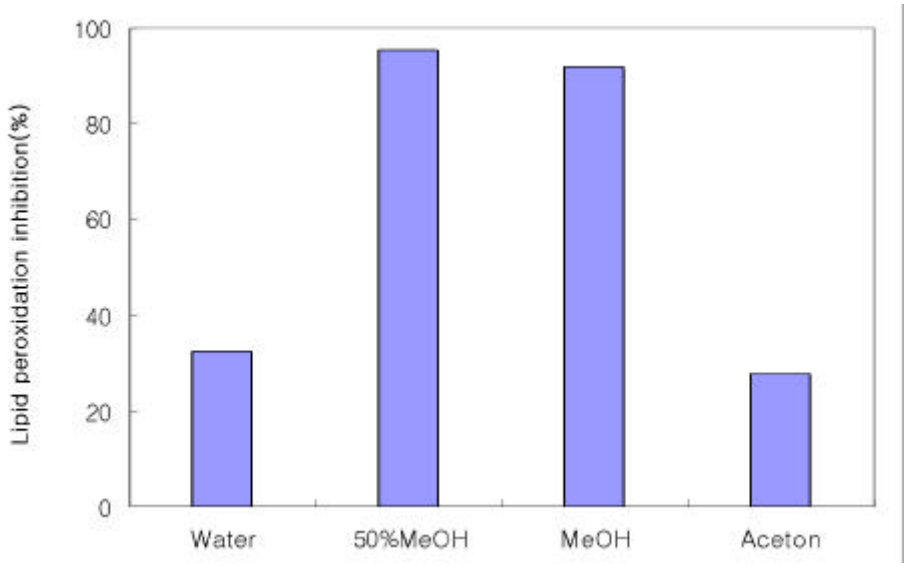


Fig. 3. Antioxidative activities of each fractions by Amberlite XAD-2 column chromatography in linoleic acid model system.

2) Preparative-HPLC에 의한 분리

항산화 활성이 가장 강하게 나타난 50% MeOH fraction으로 부터 항산화 활성물질을 분리하기 위하여 50% MeOH fraction에서 네 개의 주요 peak를 확인하고, 이들 성분을 분리하기 위하여 분취용 ODS-5 column(8×250㎜)으로 prep-HPLC 실시하였다. 용매는

0.1%TFA에서 MeCH까지 60분동안 gradient하면서, UV detector 365nm에서 분리되는 각 성분을 분취하였다. 분취한 4종의 주요 성분을 분석용 column(μ-Bondapak C18, 3.9×300mm)으로 분석한 결과 단일 peak를 나타내어 순수하게 분리된 것으로 판단되었다.

라. 항산화 성분의 구조동정

1) Compound 2의 구조동정

환삼덩굴의 에칠아세테이트 분획으로부터 분리한 compound 2의 UV spectrum을 관찰한 결과 메탄올 용액에서 λ max는 271, 334nm 로 flavonoid 화합물의 A환과 B환의 흡수 spectrum을 보였으며, shift reagent로 NaOMe를 가할때, 280, 326, 395nm, $AlCl_3$를 가할 때, 277, 305, 347, 387nm, $AlCl_3$/HCl를 가할 때, 278, 303, 342, 383nm, NaOAc를 가할 때, 271, 302, 340nm, NaOAc/H_3BO_3를 가할 때, 270, 300, 342nm로 shift되었으며, LC-MS로 분석한 결과 m/z가 431(M-1)이므로 분자량은 432였다.

^{1}H-NMR spectrum에서 proton signal 6개가 6 8 ppm에서 나타났으며, δ6.26에서 singlet으로 나타나 전형적인 flavonoid A환의 H-6 signal 임을 확인하였으며 C-8 위치에 치환기가 존재함을 추정하였다. 그리고 δ6.52에서 singlet peak가 나타나 C-3 위치에 치환기가 존재하지 않는 flavone 화합물임을 알 수 있었다. δ6.81과 δ7.51에서 두 개의 o-coupled doublet peak가 나타났는데 이는 A환의 proton들 보다 저자장에 나타나는 B환의 proton들로 C-4' 위치에만 치환기가 존재하는 것을 알 수 있었다. 당 유래의 peak가 나타나는 3 4 ppm 사이에서의 수 개의 peak는 문헌과 비교하여 glucose로 확인하였고 aglycone과 연결되는 당의 H-1는 4.2 6 ppm 사이에서 나타나는데 본 물질에서는 δ4.94에서 나타났다.

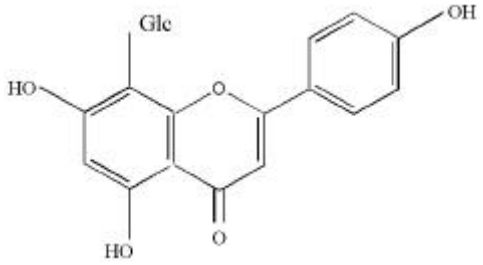
^{13}C-NMR spectrum에서 signal이 90 185 ppm에서 얻어져 flavonoid류로 확인되었고 flavonoid의 carbonyl(4-keto)기는 가장 저자장에서δ184.11 나타났다. 치환기가 존재하는 위치인 C-8이 δ103.62로 치환기가 없는 C-8(δ94.0)의 값보다 저자장으로 10 ppm 가량 이동하여

C-glycosylation 되었음을 추정하였고, 또한 당의 C-1이 δ75.32에서 나타나 C-glycoside의 C-1이 δ74에서 나타난다는 문헌상의 보고와 일치하여 C-8 위치에서 C-glycosylation 되었음을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면 Table 2와 같으며, 이 결과로 부터 compound 2는 apigenin-8-C-β-D-glucoside 즉, vitexin으로 확인되었으며, 그 구조는 Fig. 4와 같다.

Table 2. Spectral data of compound 2 isolated from *Humulus japonicus*

Items	Spectral data
MS : m/z	432
UV : λmax, nm	(MeOH) 271, 334; (NaOMe) 280, 326, 395; ($AlCl_3$) 277, 305, 347, 387; ($AlCl_3$/HCl) 278, 303, 342, 383; (NaOAc) 271, 302, 340; (NaOAc/H_3BO_3) 270, 300, 342
^{1}H-NMR : DMSO-dδ, ppm	aglycone : δ 6.52(1H, s, H-3), 6.26(1H, s, H-6), 7.51(1H, d, H-2′), 6.81(1H, d, H-5′), 7.51(1H, d, H-6′) glycosyl : 4.95(1H, d, H-1), 4.08(1H, d, H-2), 3.52(1H, d, H-3), 3.95(1H, d, H-4), 3.50(1H, m, H-5), 3.77(2H, dd, H-6)
^{13}C-NMR : DMSO-dδ, ppm	aglycone : 164.54(C-2), 100.87(C-3), 184.11(C-4), 158.06(C-5), 100.87(C-6), 166.06(C-7), 103.62(C-8), 162.63(C-9), 103.60(C-10), 123.99(C-1′), 120.88(C-2′), 116.68(C-3′), 162.61(C-4′), 116.68(C-5′), 120.88(C-6′) glycosyl : 75.32(C-1), 72.80(C-2), 80.27(C-3), 72.26(C-4), 82.89(C-5), 63.19(C-6)‘‘



Apigenin-8-C-β-D-glucoside

Fig.4. Structure of compound 2 isolated from *Humulus japonicus*

2) Compound 3의 구조동정

환삼덩굴의 에칠아세테이트 분획으로부터 분리한 compound 3의 UV spectrum을 관찰한 결과 메탄올 용액에서 λ max는 255, 267s, 348nm으로 flavonoid 화합물의 A환과 B환의 흡수 spectrum을 보였으며, shift reagent로 NaOMe를 가할 때, 266, 403nm, $AlCl_3$를 가할 때, 274, 414nm, $AlCl_3$/HCl을 가할 때, 272, 360, 387nm, NaOAc를 가할 때, 256, 350nm, NaOAc/H_3BO_3를 가할 때, 259, 372nm로 shift되었으며, LC-MS로 분석한 결과 m/z가 447(M-1)이므로 분자량은 448이었다.

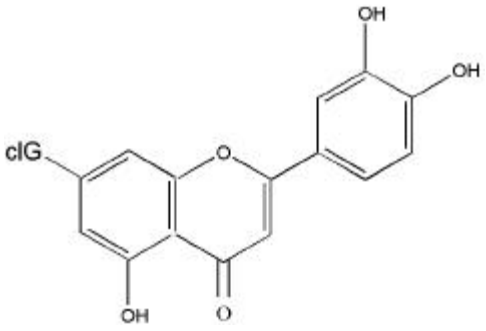
^{1}H-NMR spectrum은 proton의 signal 6개가 6 8 ppm에서 나타났고 이 중 signal이 δ6.76과 δ6.46에서 나타나 m-coupled doublets인 H-8과 H-6 signal로 추정할 수 있었고, δ6.71에서의 singlet peak는 H-3의 peak로 compound 2와 같이 C-3위치에 치환기가 존재하지 않는 flavone으로 확인되었다. 또한 A환의 signal 보다 저자장에 3개의 peak가 나타나 B환에 2개의 치환기가 존재함을 알 수 있다. 당 유래의 peak는 3 4 ppm 사이에서 나타났는데 문헌과 비교하여 glucose 임을 확인하였고 당의 H-1은 δ5.07에서 나타났다.

^{13}C-NMR spectrum은 signal이 90 185 ppm에서 flavonoid의 signal이 나타났다. Carbonyl(4-keto)기의 signal은 181.85 ppm에서 확인되었고 C-7의 signal이 162.92 ppm으로 치환기가 없는 C-7의 signal이 162.92 ppm으로 치환기가 없는 C-7의 signal(164.7)보다 1.78 ppm 고자장으로 이동되어 C-glycosylation 되었음을 알 수 있었고, 또한 당의 C-1이 δ99.89에서 나타나 C-glycoside의 C-1 signal이 100 ppm 주위에 나타나는 문헌과 일치하여 구조를 확인 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 Table 3과 같으며, 이 결과로 부터 compound 3은 luteolin-7-C-β-D-glucoside로 확인되었으며, 그 구조는 Fig. 5와 같다.

Table 3. Spectral data of compound 3 isolated from *Humulus japonicus*

Items	Spectral data
MS : m/z	448
UV : λmax, nm	(MeOH) 255, 267s, 348; (NaOMe) 266, 403; ($AlCl_3$) 274, 414; ($AlCl_3$/HCl) 272, 360, 387, 383; (NaOAc) 256, 350; (NaOAc/H_3BO_3) 259, 372
^{1}H-NMR : DMSO-d6, ppm	aglycone : δ 6.71(1H, s, H-3), 6.46(1H, d, H-6), 6.76(1H, d, H-8), 7.47(1H, d, H-2′), 6.95(1H, d, H-5′), 7.51(1H, dd, H-6′) glycosyl : 5.07(1H, d, H-1), 3.34(1H, m, H-2), 3.46(1H, dd, H-3), 3.22(1H, dd, H-4), 3.51(1H, m, H-5), 3.64(2H, dd, H-6)
^{13}C-NMR : DMSO-d6, ppm	aglycone : 164.45(C-2), 103.12(C-3), 181.85(C-4), 161.10(C-5), 99.51(C-6), 162.92(C-7), 94.72(C-8), 156.91(C-9), 105.31(C-10), 121.34(C-1′), 113.58(C-2′), 145.70(C-3′), 149.90(C-4′), 115.98(C-5′), 119.90(C-6′) glycosyl : 99.89(C-1), 73.10(C-2), 76.38(C-3), 69.54(C-4), 77.14(C-5), 60.59(C-6)



Luteolin-7-O-β-D-glucoside

Fig. 5. Structure of compound 3 isolated from *Humulus japonicus*

3) Compound 4의 구조동정

환삼덩굴의 에칠아세테이트 분획으로부터 분리한 compound 4의 UV spectrum을 관찰한 결과 메탄올 용액에서 λ max는 268, 329nm 으로 flavonoid 화합물의 A환과 B환의 흡수 spectrum을 보였으며, shift reagent로 NaOMe를 가할 때, 274, 392nm, $AlCl_3$를 가할 때, 275, 300, 347, 385nm, $AlCl_3$/HCl를 가할 때, 276, 299, 342, 382nm, NaOAc를 가할 때, 270, 335nm, NaOAc/H_3BO_3를 가할 때, 270, 298, 335nm로 shift되었으며, LC-MS로 분석한 결과 m/z가 431(M-1)이므로 분자량은 432였다.

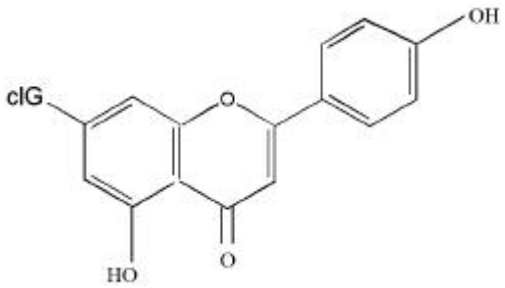
^{1}H-NMR spectrum은 proton signal 6개가 δ 6 ~ 8 ppm에서 나타났고 signal 중 δ6.65와 δ6.36이 m-coupled doublet인 H-8과 H-6으로 확인되었으며, δ6.48에서 singlet peak 가 나타나 compound 2, 3과 같은 flavone임을 확인하였다. 또한 δ8.15와 δ6.8에서 두 개의 o-coupled doublet peak가 나타나 이로 C-7과 C-4' 위치에 치환기가 존재함을 알 수 있었다. 당 유래의 peak는 δ3 ~ 4 ppm 사이에서 얻어졌으며 문헌과 비교하여 glucose로 확인되었다. 당의 H-1은 δ4.88에서 나타났다.

^{13}C-NMR spectrum은 compound 2, 3과 같이 δ 90 ~ 185 ppm사이에서 얻어졌고 carbonyl(4-keto)기는 184.04 ppm에서 나타났다. C-7의 signal은 162.90 ppm으로 치환기가 없는 C-7의 signal(164.9)보다 2 ppm 고자장으로 이동되어 C-glycosylation 되었음을 알 수 있었으며, 당의 C-1은 δ101.14로 C-1에서의 C-glycoside 임을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면 Table 4와 같으며, compound 4는 apigenin-7-C-β-D-glucoside로 확인되었고, 그 구조는 Fig. 6과 같다.

Table 4. Spectral data of compound 4 isolated from *Humulus japonicus*

Items	Spectral data
MS : m/z	432
UV : λmax, nm	(MeOH) 268, 329; (NaOMe) 274, 392; ($AlCl_3$) 275, 300, 347, 385; ($AlCl_3$/HCl) 276, 299, 342; (NaOAc) 270, 335; (NaOAc/H_3BO_3) 270, 298, 335
^{1}H-NMR : DMSO-d6, ppm	aglycone : δ 6.65(1H, d, H-3), 6.36(1H, s, H-6), 6.65(1H, d, H-8), 8.15(1H, d, H-2′,), 6.80(1H, d, H-3′,), 6.80(1H, d, H-5′,), 8.15(1H, d, H-6′,) glycosyl : 4.88(1H, d, H-1), 3.41(1H, d, H-2), 3.49(1H, d, H-3), 3.34(1H, d, H-4), 3.49(1H, m, H-5), 3.76(2H, dd, H-6)
^{13}C-NMR : DMSO-d6, ppm	aglycone : 166.73(C-2), 104.10(C-3), 184.04(C-4), 158.92(C-5), 101.58(C-6), 162.90(C-7), 96.04(C-8), 164.76(C-9), 107.04(C-10), 123.03(C-1′,), 120.88(C-2′,), 117.01(C-3′,), 162.83(C-4′,), 117.01(C-5′,), 120.88(C-6′,) glycosyl : 101.14(C-1), 74.70(C-2), 77.82(C-3), 71.24(C-4), 78.37(C-5), 62.43(C-6)''



Apigenin-7-O-β-D-glucoside

Fig. 6. Structure of compound 4 isolated from *Humulus japonicus*

마. 분리한 항산화 물질의 항산화성

1) Hydroxyl radical 소거작용

Hydroxyl radical은 활성산소종 중에서도 반응성이 매우 강한 라디칼로서 생체산화에 중요한 역할을 하고 있다. 각 성분의 hydroxyl radical에 대한 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 각 성분을 반응내에 1ppm의 농도로 첨가한 경우에는 모든 성분이 90% 이상의 강한 라디칼 소거작용을 나타내었다. 한편 0.1ppm 농도에서는 luteolin-7-C-β-D-glucoside가 78%, compund 1이 76% 정도의 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었고, apigenin-8-C-β-D-glucoside와 apigenin-7-O-β-D-glucoside는 44 46% 정도의 라디칼 소거작용을 나타내어, luteolin-7-C-β-D-glucoside와 compound 1이 hydroxyl radical에 대하여 강한 소거작용을 나타내었다.

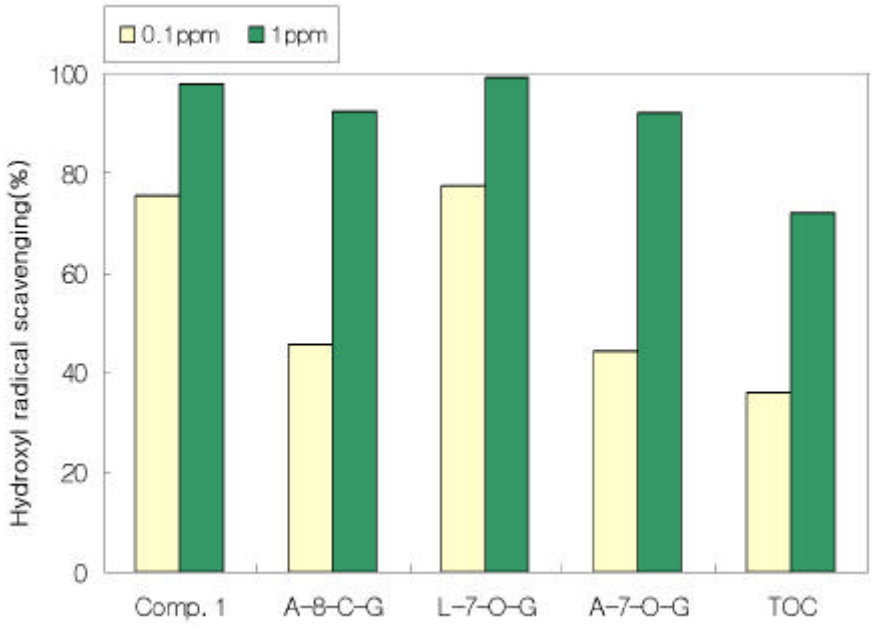


Fig. 7. Hydroxyl radical scavenging activities of flavonoid compounds isolated from *Humulus japonicus*.

2) Linoleic acid에 대한 항산화 작용

Linoleic acid model system에서 지질과산화물 생성 억제능을 ferric thiocyanate법으로 측정하였다. 각 성분의 지질과산화물 생성 억제능은 Fig. 8에서 보는 바와 같이 compound 1은 대조군에 비하여 약 91%, luteolin-7-O-β-D-glucoside는 약 95%의 지질과산화물 생성을 억제하였고, apigenin-8-C-β-D-glucoside와 apigenin-7-O-β-D-glucoside도 50% 이상의 지질과산화물 생성을 억제하였다. compound 1과 luteolin-7-O-β-D-glucoside는 α-tocopherol에 비하여 훨씬 높은 항산화 활성을 나타내었고, apigenin-8-C-β-D-glucoside도 α-tocopherol과 비슷한 활성을 보여주었다.

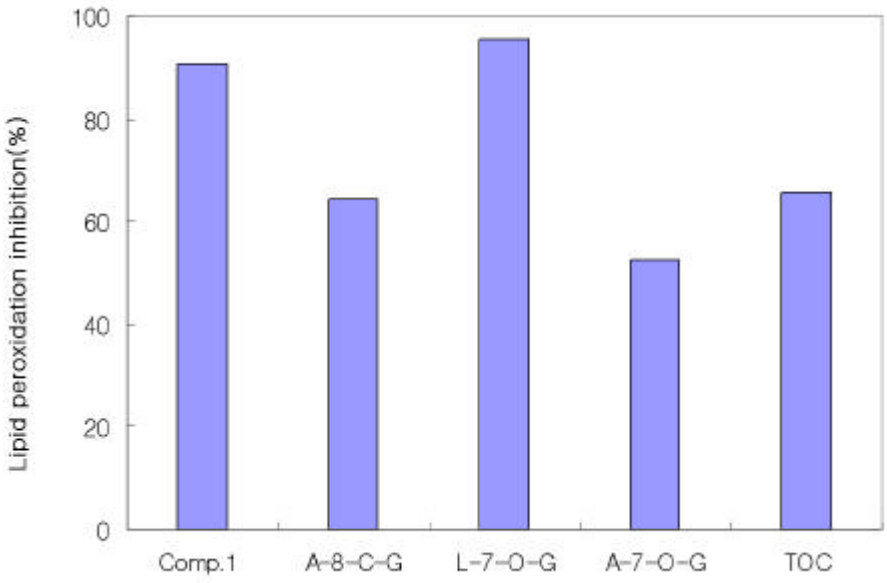


Fig. 8. Antioxidative activities of flavonoid compounds isolated from *Humulus japonucus* in linoleic acid model system.

3) 식용유지에 대한 항산화 작용

대두유를 기질로하여 각 성분을 500ppm의 농도로 가하여 과산화물 생성억제능을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 표에서 보는 바와 같이 모든 성분이 대조군에 비하여 지질의 과산화 반응을 어느 정도는 지연시켰으나, 그다지 활성이 높지는 않았다. α-tocopherol도 대두유에 대하여 항산화 활성이 높지 않았는데, 이는 α-tocopherol이 식물성 유지에 대하여 항산화 활성이 강하지 않다는 다른 연구자의 결과와 일치하였다.

Table 5. Antioxidative activities of flavonoid compounds isolated from *Humulus japonucus* on soybean oil by oven test at 70℃

Compounds	POV(meq/kg)					
	Storage days					
	2	4	6	8	10	12
Control	20	49	87	123	190	330
Compound 1	16	36	75	101	140	305
A-8-C-G	15	35	73	95	135	275
L-7-C-G	34	34	69	90	155	300
A-7-C-G	18	42	76	107	170	295
α-tocopherol	18	45	82	112	175	290

바. 변이원성 및 항변이원성 시험

1) 환삼덩굴 추출물의 변이원성

Ames test는 *Salmonella typhimurium*의 복귀돌연변이 현상을 관찰하여 돌연변이 유무를 판정하는 방법으로, 시료가 변이원성을 나타내게 되면 복귀돌연변이 colony 수가 증가하게 된다.

환삼덩굴의 메탄올 추출물과 용매분획물을 frame shift type mutant인 TA98과 base pair exchange type mutant인 TA100에 대하여 변이원성 실험을 한 결과는 Table 6과 같다. 모든 추출물을 plate당 0.5mg에서 4.0mg까지 농도를 증가시키면서 실험한 결과, 복귀돌연변이된 colony 수(histidine revertant)가 농도에 의존하여 증가하지 않았으며, S-9 mixture를 가하여 대사활성화를 시켰을때도 histidine revertant의 수가 증가하지 않으므로, 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 각 용매분획물은 변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

Table 6. Mutagenicity of each solvent fractions from *Humulus japonicus* on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants/plate			
		Without S-9 mix		With S-9-mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Spontaneous		21±4	147±12	23±3	156±11
MeCH ex.	0.5	22±3	153± 7	24±2	169±13
	1.0	24±2	162± 9	23±0	174±15
	2.0	24±3	154±11	26±2	168± 9
	4.0	24±4	167± 8	25±3	178±12
Hexane fr.	0.5	19±3	147±10	19±4	155±12
	1.0	21±4	153± 6	24±2	163± 9
	2.0	22±3	162±10	26±3	172±13
	4.0	22±2	158± 7	27±2	169± 8
CHCl3 fr.	0.5	23±5	156± 9	22±5	164±12
	1.0	21±6	141±12	20±4	153±14
	2.0	23±2	156± 7	28±2	169± 7
	4.0	22±3	162±10	26±4	172±13
EtCAc fr.	0.5	18±4	149± 8	25±1	169±16
	1.0	23±2	153±15	23±3	159±13
	2.0	21±3	166±11	26±4	171± 8
	4.0	22±1	162± 8	24±5	172±12
BuCH fr.	0.5	24±2	167± 9	27±3	164± 8
	1.0	25±3	155± 7	25±4	159±13
	2.0	21±4	162±10	27±4	168±17
	4.0	23±2	159±11	29±5	162±12
Water fr.	0.5	22±1	148± 7	26±4	159± 7
	1.0	23±4	143± 9	24±7	158±12
	2.0	23±2	156± 7	23±2	163±19
	4.0	21±3	162±12	28±5	161±13

2) 추출물의 항변이원성

환삼덩굴의 메탄올 조추출물과 용매분획의 항변이원성을 조사한 결과는 Table 7 및 Table 8과 같다. 직접변이원인 NPD와 NQO로 돌연변이를 유도하면서 TA 98과 TA 100에 대한 돌연변이 억제 활성을 측정한 결과는 Table 7에서 보는 바와 같이 메탄올 조추출물과 각 용매분획물은 어느 정도의 항변이원성을 나타내었다. TA 98에는 21 37% 정도, TA 100 에는 12 36% 정도의 돌연변이 억제활성을 나타내어, 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 각 용매분획물은 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 강하지 않은 것으로 나타났다.

간접변이원인 2-AF를 S9 mixture를 사용하여 대사활성화를 시키면서 TA 98과 TA 100의 항변이원성을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 각 추출물을 첨가할 경우, TA 98과 TA 100의 돌연변이 유발을 강하게 억제하였으며, 특히 에칠아세테이트 분획과 부탄올 분획은 frame shift type mutant인 TA 98 및 base pair exchange type mutant인 TA 100 모두에 대하여 90% 이상의 돌연변이 억제활성을 나타내었고, 물 분획을 제외한 다른 분획들도 80% 90%의 억제활성을 나타내었다. 따라서 환삼덩굴 추출물은 직접변이원 보다는 간접변이원에 대한 돌연변이를 억제하는데 유용할 것으로 생각되며, 간접변이원이 대사활성화되는 과정에 불활화시키는 것으로 추정되어진다.

Table. 7. Antimutagenic effects of each solvent fractions from *Humulus japonicus* on the mutagenecity induced by direct mutagen(NPD and NQO) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 without S9 mixture.

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	135±7
NPD	814±21	
NQO		924±17
MeOH ex.	624±16(23.9)	699±13(32.3)
Hexane fr.	645±12(21.3)	640±23(36.0)
CHCl3 fr.	521±23(36.9)	691±18(29.5)
EtOAc fr.	614±16(25.2)	827±26(12.2)
BuOH fr.	539±11(27.6)	678±17(31.2)
Water fr.	586±19(28.7)	713±23(26.7)

The amount of NPD, NQO and test samples were 10μg/plate, 0.2μg/plate and 500μg /plate , respectively.

Table. 8. Antimutagenic effects of each solvent fractions from *Humulus japonicus* on the mutagenecity induced by indirect mutagen(2-aminofluorene) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 with S9 mixture

Samples	Revertants/plate(inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Spontaneous	20±2	139±5
2-AF	820±21	324±12
MeOH ex.	123±7(87.1)	172±9(82.2)
Hexane fr.	171±11(81.1)	152±8(93.0)
CHCl3 fr.	153±11(83.4)	149±7(94.4)
EtOAc fr.	43±4(97.1)	147±8(95.7)
BuOH fr.	63±5(94.6)	151±6(93.5)
Water fr.	417±13(50.4)	203±11(65.4)

The amount of 2-AF and test samples were 10μg/plate and 500μg/plate, respectively.

3) SCS chromotest

Ames test는 변이원성 시험에 가장 많이 사용되는 방법이지만 , 시료내에 histidine 함량이 높으면 사용이 곤란하다. 그러나 SCS chromotest는 시료의 histidine 함량에 영향을 받지 않을 뿐만 아니라, frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할수 있고, 민감도도 매우 높은 편이다.

환삼덩굴의 메탄올 추출물과 용매분획물의 SOS chromotest를 시험한 결과는 Table 9와 같다. 양성대조물질로 NQO를 첨가했을때, IF(induction factor)가 2.328로 SCS 반응이 유도됨을 알 수 있었다. 그러나 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 각 용매분획을 첨가했을 경우는, 농도에 따라 IF값의 뚜렷한 증가가 없고, IF값이 높지 않아 변이원성을 나타내지 않는 것으로 생각되었다. 따라서 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 각 용매분획은 Ames test 뿐만 아니라 SCS chromo test에서도 변이원성을 나타내지 않아 변이원 활성물질이 존재하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 9. Mutagenicity of each solvent fractions from *Humulus japonicus* by SOS chromotest.

Samples	Dose (μg/plate)	β-galactosidase		Alkaline phosphatase		Induction factor
		OD405	unit	OD405	unit	
Negative		0.272	9.47	1.037	33.90	1.000
NQO	0.02	0.686	22.87	1.124	37.47	2.328
MeCH ex.	1	0.287	9.57	1.074	35.80	1.019
	2.5	0.292	9.73	1.071	35.70	1.042
	5	0.294	9.80	1.083	36.10	1.034
	10	0.303	10.10	1.115	37.17	1.038
Hexane fr.	1	0.284	9.47	1.028	34.27	1.053
	2.5	0.291	9.70	1.061	35.37	1.046
	5	0.289	9.63	1.038	34.60	1.061
	10	0.312	10.40	1.094	36.47	1.088
CHCl3 fr.	1	0.270	9.00	1.016	33.87	1.015
	2.5	0.282	9.40	1.023	34.10	1.053
	5	0.274	9.13	1.010	33.67	1.034
	10	0.293	9.77	1.045	34.83	1.069
EtCAc fr.	1	0.281	9.37	1.045	34.83	1.027
	2.5	0.279	9.30	1.072	35.73	0.992
	5	0.301	10.03	1.084	36.13	1.061
	10	0.296	9.87	1.107	36.90	1.019
BuCH fr.	1	0.286	9.53	1.072	35.73	1.019
	2.5	0.291	9.70	1.088	36.17	1.023
	5	0.286	9.53	1.096	36.53	0.996
	10	0.307	10.23	1.114	37.13	1.053
Water fr.	1	0.274	9.13	1.010	33.67	1.034
	2.5	0.272	9.07	1.021	34.03	1.019
	5	0.283	9.43	1.032	34.40	1.045
	10	0.279	9.30	1.069	35.63	0.996

제3장 약용 및 식용식물자원으로부터 항산화물질의 탐구

제1절 서설

다양한 생활 환경의 변화로 질병 형태에 있어서 많은 변화를 가져왔으며 특히 순환계 및 맥관계 질환(심장병, 암, 고지혈증, 당뇨병 등)등 노화와 관련된 질환이 증가되는 추세이다. 이러한 대사성 질환의 약 80%이상이 주로 환경성 요인 (오염, 식이 및 약물등)에 의한 것으로 알려져 있으며 그 발생율이 매년 증가하고 있는 추세이다. 활성산소란 반응성이 큰 화학물질로서 생체의 대사과정에서 부생되는 산물이면서 또한 세포의 거대분자의 훼손에 관여하는 독성대사물질이다. 사실 노화에 의해 생체내 각 조직에 활성산소의 반응산물이 증가되어 여러가지 대사상 질환이 증가한다는 것은 잘 알려져 있다. 그 대표적인 것이 lipofusion과 과산화지질이며, 이들은 노화의 지표로 이용되기도 한다. 나이에 다른 활성산소 반응산물의 축적도는 생체의 항산화등에 의존할 것이다.

이상과 같이 활성산소 및 그의 반응산물들에 의해 노화가 진행되고 특히 대사성 질환이 활성산소와 지질과산화에 의해 유발된다면 생체내에서 끊임없이 생성되고 있는 활성산소를 어떻게 처리하는가가 대단히 중요하다. 즉 활성산소 발생정도에 대한 항산화능의 정도가 미치지 못한다면, 체내의 활성산소 및 그 생산물에 의해 노화 및 성인병이 진행될 것이다. 바람직한 것은 정상적으로 활성산소가 제거되는 것이 가장 중요하나 현대에서 우리들은 이러한 활성산소의 생성 및 제거의 불균형에서 생활하므로 이러한 균형을 조절하는 인자를 찾는 것이 대사성 질환의 예방과 치료제 및 기능성식품 개발을 위해서 대단히 중요한 분야라 사료된다.

따라서 부작용이 적은 천연식물자원인 식용 및 약용식물을 이용하여 항산화작용을 검토하여 활성물질을 규명함으로서 기능성 식품 및 신약품의 새로운 소재로서 활용하고자 하였다.

151종의 약용 및 식용식물자원을 채집하여 브로모벤젠으로 간 독성을 유도한 흰쥐에서 지질

과산화생성의 억제작용을 탐색한 결과 저해활성이 우수한 식물자원을 발견하였다. 강력한 4종의 활성식물(신선초, 서양고추냉이, 어성초, 엉겅퀴)은 다시 *in vivo*로 지질과산화억제작용을 관찰하고 이의 약리기전을 규명하였으며, column chromatography를 실시하여 활성화합물을 분리, 화학구조를 결정하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 식물재료는 직접 채집 및 시장에서 구입하여 식물을 동정한 후, 80% acetone 또는 MeCH로 추출하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Plant list

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Achyranthes japonica (Miq.) Nakai	우슬	Amaranthaceae	Aerial part
Achyranthes japonica (Miq.) Nakai	우슬	Amaranthaceae	Root
Allium fistulosum L.	파	Liliaceae	Aerial part
Allium tuberosum RCH.	부추	Liliaceae	Aerial part
Allium monanthum MAX.	달래	Liliaceae	Whole plant
Angelica keiskei Koidz	신선초	Umbelliferae	Aerial part
Ajuga decumbens Thunb.	금창초	Labiatae	Whole plant
Aralia elata Seem.	두릅나무	Araliaceae	Leaf
Aralia elata Seem.	두릅나무	Araliaceae	Stem
Aralia elata Seem.	두릅나무	Araliaceae	Rachis
Armoracia rusticana P. Gaertn	서양고추냉이	Cruciferae	Aerial part
Artemisia apiacea Hance	개사철쑥	Compositae	Aerial part
Artemisia apiacea Hance	개사철쑥	Compositae	Root
Artemisia princeps var. *orientalis* (PAMP.) HARA	쑥	Compositae	Aerial part
Aster tripolium L.	갯개미취	Compositae	Aerial part
Beta vulgaris var. *cicla* L.	근대	Chenopodiaceae	Aerial part
Brassica juncea var. *integrifolia* SINSK.	갓	Cruciferae	Aerial part
Capsicum annuum L.	고추	Borraginaceae	Leaf
Castanea crenata S. et Z.	밤나무	Fagaceae	Stem
Castanea crenata S. et Z.	밤나무	Fagaceae	Leaf
Cedrela sinensis A. JUSS	참죽나무	Meliaceae	Leaf
Chamaecyparis obtusa (S. et Z.) Endl.	편백	Cupressaceae	Leaf
Chamaecyparis obtusa (S. et Z.) Endl.	편백	Cupressaceae	Stem
Chelidonium majus var. *asiaticum* (Hara) Chwi	애기똥풀	Papaveraceae	Flos
Chelidonium majus var. *asiaticum* (Hara) Chwi	애기똥풀	Papaveraceae	Aerial part
Chelidonium majus var. *asiaticum* (Hara) Chwi	애기똥풀	Papaveraceae	Root
Chenopodium album var. *centrorubrum* Makino	명아주	Chenopodiaceae	Leaf
Chenopodium album var. *centrorubrum* Makino	명아주	Chenopodiaceae	Stem
Chenopodium album var. *centrorubrum* Makino	명아주	Chenopodiaceae	Root
Chenopodium virgatum Thunb.	버들명아주	Chenopodiaceae	Aerial part
Chenopodium virgatum Thunb.	버들명아주	Chenopodiaceae	Root
Cinamomum camphora SIEB.	녹나무	Lauraceae	Leaf
Cinnamomum japonicum SIEB.	생달나무	Lauraceae	Leaf
Cirsium japonicum var. *ussuriense* Kitamura	엉겅퀴	Compositae	Aerial part

Table 1. continued

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Dioscorea batatas Decne.	마	Dioscoreaceae	Aerial part
Dioscorea batatas Decne.	마	Dioscoreaceae	Root
Duchesnea chrysantha (Zoll. et Morr.) Miq.	뱀딸기	Rosaceae	Whole plant
Erigeron annuus (L.) Pers.	개망초	Compositae	Flos
Erigeron annuus (L.) Pers.	개망초	Compositae	Aerial part
Erigeron annuus (L.) Pers.	개망초	Compositae	Root
Eucommia ulmoides OLIVER	두충나무	Eucommiaceae	Leaf
Euonymus japonica Thunb.	사철나무	Celastraceae	Leaf
Euonymus japonica Thunb.	사철나무	Celastraceae	Stem
Forsythia koreana Nakai	개나리	Oleaceae	Leaf
Forsythia koreana Nakai	개나리	Oleaceae	Stem
Geranium nepalense subsp. *thunbergii* (S. et Z.) Hara	이질풀	Geraniaceae	Aerial part
Geranium nepalense subsp. *thunbergii* (S. et Z.) Hara	이질풀	Geraniaceae	Root
Glycine max MERR	콩	Leguminosae	Leaf
Hemerocallis fulva L.	원추리	Liliaceae	Aerial part
Hemistepta lyrata BUNGE	지칭개	Compositae	Aerial part
Houttuynia cordata BUNGE	어성초	Saurruraceae	Aerial part
Humulus japonicus S. et Z.	환삼덩굴	Cannabinaceae	Aerial part
Humulus japonicus S. et Z.	환삼덩굴	Cannabinaceae	Root
Imperata cylindrica var. *koenigii* (Retz.) Durand et Schinz	띠	Gramineae	Aerial part
Imperata cylindrica var. *koenigii* (Retz.) Durand et Schinz	띠	Gramineae	Root
Indigofera kirilowii Max.	땅비싸리	Leguminosae	Aerial part
Indigofera kirilowii Max.	땅비싸리	Leguminosae	Aerial part
Ixeris dentata (THUNB.) NAKAI	씀바귀	Compositae	Whole plant
Kummerowia striata (Thunb.) Schindl	매듭풀	Leguminosae	Whole plant
Lactuca indica var. *laciniata* (C. Kuntze) Hara	왕고들빼기	Compositae	Whole plant

Table 1. continued

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Lygodium japonicum (Thunb.) Sw.	실고사리	Schizaeaceae	Aerial part
Lygodium japonicum (Thunb.) Sw.	실고사리	Schizaeaceae	Root
Machilus thunbergii S. et Z.	후박나무	Lauraceae	Leaf
Machilus japonica SIEB	생달나무	Lauraceae	Leaf
Malva verticillata L.	아욱	Malvaceae	Aerial part
Morus alba L.	뽕나무	Moraceae	Stem
Morus alba L.	뽕나무	Moraceae	Leaf
Nandina domestica Thunb.	남천	Berberidaceae	Leaf
Nandina domestica Thunb.	남천	Berberidaceae	Stem
Nandina domestica Thunb.	남천	Berberidaceae	Flos
Neolitsea aciculata (BL.) KOIDZ	새덕이	Lauraceae	Leaf
Neolitsea serical (BL.) KOIDZ	참식나무	Lauraceae	Leaf
Oenanthe javanica (BL.) DC.	미나리	Umbelliferae	Aerial part
Oenothera odorata Jacq.	달맞이꽃	Onagraceae	Aerial part
Oenothera odorata Jacq.	달맞이꽃	Onagraceae	Root
Oxalis corniculata L.	괭이밥	Oxalidaceae	Whole plant
Parthenocissus tricuspidata (S. et Z.) Planch.	담쟁이덩굴	Vitaceae	Leaf
Parthenocissus tricuspidata (S. et Z.) Planch.	담쟁이덩굴	Vitaceae	Stem
Persicaria perfoliata H. Gross	며느리배꼽	Polygonaceae	Aerial part
Persicaria perfoliata H. Gross	며느리배꼽	Polygonaceae	Root
Photinia glabra (THUNB.) MAXIM.	홍가시나무	Rosaceae	Stem
Photinia glabra (THUNB.) MAXIM.	홍가시나무	Rosaceae	Leaf
Phragmites communis Trin.	갈대	Gramineae	Aerial part
Phragmites communis Trin.	갈대	Gramineae	Root
Physalis alkekengi var. *francheti* (Masters) Hort.	금창초	Solanaceae	Whole plant
Phytolacca esculenta V. Houtte	자리공	Phytolaccaceae	Stem
Phytolacca esculenta V. Houtte	자리공	Phytolaccaceae	Leaf
Phytolacca esculenta V. Houtte	자리공	Phytolaccaceae	Root
Phytolacca esculenta V. Houtte	자리공	Phytolaccaceae	Fructus
Platycodon grandiflorum (JACC.) A. DC.	도라지	Campanulaceae	Root

Table 1. continued

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Prunella vulgaris var. *lilacina* Nakai	꿀풀(하고초)	Labiatae	Flos
Prunella vulgaris var. *lilacina* Nakai	꿀풀(하고초)	Labiatae	Aerial part
Prunella vulgaris var. *lilacina* Nakai	꿀풀(하고초)	Labiatae	Root
Pulsatilla koreana Nakai	할미꽃	Ranunculaceae	Aerial part
Pulsatilla koreana Nakai	할미꽃	Ranunculaceae	Root
Quercus myrsinaefolia Bl.	가시나무	Fagaceae	Stem
Quercus myrsinaefolia Bl.	가시나무	Fagaceae	Leaf
Raphanus sativus var. *hortensis for. acanthisformis* MAKINO	무순	Cruciferferae	Aerial part
Reynoutria elliptica (Koidz.) Migo	호장근	Polygonaceae	Leaf
Reynoutria elliptica (Koidz.) Migo	호장근	Polygonaceae	Stem
Reynoutria elliptica (Koidz.) Migo	호장근	Polygonaceae	Root
Saxifraga stolonifera Meerb.	바위취	Saxifragaceae	Flos
Saxifraga stolonifera Meerb.	바위취	Saxifragaceae	Aerial part
Saxifraga stolonifera Meerb.	바위취	Saxifragaceae	Root
Sedum sarmentosum BUNGE	돌나물	Crassulaceae	Aerial part
Smilax china L.	청미래덩굴	Liliaceae	Leaf
Smilax china L.	청미래덩굴	Liliaceae	Stem
Smilax china L.	청미래덩굴	Liliaceae	Root
Sophora flavescens Ait.	고삼	Leguminosae	Flos
Sophora flavescens Ait.	고삼	Leguminosae	Aerial part
Sophora flavescens Ait.	고삼	Leguminosae	Root
Suaeda asparagoides (Miq.) Makino	나문재	Chenopodiaceae	Aerial part
Suaeda asparagoides (Miq.) Makino	나문재	Chenopodiaceae	Root
Suaeda japonica Makino	칠면초	Chenopodiaceae	Aerial part
Suaeda japonica Makino	칠면초	Chenopodiaceae	Root
Taraxacum officinale Weber	서양민들레	Compositae	Flos
Taraxacum officinale Weber	서양민들레	Compositae	Aerial part
Taraxacum officinale Weber	서양민들레	Compositae	Root
Taxodium distichum (L.) Rich.	낙우송	Taxodiaceae	Leaf
Taxodium distichum (L.) Rich.	낙우송	Taxodiaceae	Stem
Thuja orientalis L.	측백나무	Cupressaceae	Leaf
Thuja orientalis L.	측백나무	Cupressaceae	Stem

Table 1. continued

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Trichosanthes kirilowii Max.	하늘타리	Cucurbitaceae	Aerial part
Viola mandshurica W. Becker	제비꽃	Violaceae	Aerial part
Viola mandshurica W. Becker	제비꽃	Violaceae	Root
Youngia sonchifolia M2.	고들빼기	Compositae	Whole plant
Poncirus trifoliata Rafin.	탱자나무	Rutaceae	Fructus
Poncirus trifoliata Rafin.	탱자나무	Rutaceae	Leaf
Poncirus trifoliata Rafin.	탱자나무	Rutaceae	Stem
Poncirus trifoliata Rafin.	탱자나무	Rutaceae	Root
Poncirus trifoliata Rafin.	탱자나무	Rutaceae	Thorn
Portulaca oleracea L.	쇠비름	Portulacaceae	Aerial part
Portulaca oleracea L.	쇠비름	Portulacaceae	Root
Lindera obtusiloba Bl.	생강나무	Lauraceae	Leaf
Lindera sercea (S. et Z.) Bl.	털조장나무	Lauraceae	Leaf
Liriodendron tulipifera L.	튜울립나무	Magnoliaceae	Leaf
Liriodendron tulipifera L.	튜울립나무	Magnoliaceae	Stem
Litsea japonica JUSS.	까마귀쪽나무	Lauraceae	Leaf
Lonicera japonica Thunb.	인동덩굴	Caprifoliaceae	Leaf
Lonicera japonica Thunb.	인동덩굴	Caprifoliaceae	Stem
Lozoste lancifolia (S. et Z.) NEES	육박나무	Lauraceae	Leaf

Table 1. continued

Scientific Name	Korean name	Family	Used part
Cocculus trilobus DC.	댕댕이덩굴	Menispermaceae	Aerial part
Cocculus trilobus DC.	댕댕이덩굴	Menispermaceae	Root
Colocasia antiquorum var. *esculenta* Engl.	토란	Araceae	Aerial part
Commelina communis L.	닭의장풀	Commelinaceae	Aerial part
Commelina communis L.	닭의장풀	Commelinaceae	Root
Cucurbita moschata DUCHESNE	호박	Cucurbitaceae	Leaf
Daucus carota var. *sativa* DC.	당근	Umbelliferae	Root
Lindera erythrocarpa MAKINO	비목나무	Lauraceae	Leaf
Lindera glauca BL.	백동백	Lauraceae	Leaf

2. 지질과산화억제작용

가. 실험동물

동물은 체중 150 ± 10g 의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 웅성 흰쥐를 한국실험동물개발로 부터 분양받아 일정한 사료 및 조건 (온도: 20±2℃, 습도: 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle) 하에서 충분히 적응시켰으며, 실험전 24시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

나. 브로모벤젠 유도 흰쥐

한국실험동물개발로부터 분양 받은 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐(150±10 g)를 1주일동안 적응시킨 후 일정한 조건(온도: 20±2℃, 습도: 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 사육한 후 사용하였다. 각 추출물 또는 화합물의 실험부에 명시된 각각의 용량을 복강내 또는

경구로 4주간 전처리하였으며, 간독성을 유발시킬 목적으로 Zampaglion등의 방법에 준하여 bromobenzene을 1% tween 80에 460 mg/kg되게 현탁시켜 12시간 간격으로 2일간 복강주사 하였으며 대조군은 동일량의 생리식염수와 1% tween 80을 투여하였다. 실험동물은 실험전 24시간 물만 주고 절식시켰다.

다. 효소원의 조제

실험동물을 탄산가스로 마취시킨 후 복부정중선을 따라 절개하고 간을 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거하고 적출하여 여지로 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 평량한 다음 조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)을 가하여 glass telfon homogenizer로 마쇄 하였다. 이 마쇄액을 600g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상징액을 15,000g에서 10분간 원심분리하여 침전물과 상징액을 얻었다. 이 상징액을 105,000g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 상징액 (cytosol 분획)을 glutathione S-transferase의 활성의 효소원으로 사용하였으며, 침전물은 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁하여 epoxide hydrolase, aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조건은 따로 규정이 없는 한 4℃이하에서 행하였다.

라. 간조직중 지질과산화의 함량 측정

Chkawa 등의 방법에 준하여 간 조직 1g당 9배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각시켜 n-BuOH : Pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리시킨 후 홍색의 n-BuOH : Pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당

malondialdehyde nmole로 표시하였다.

마. 효소활성의 측정

1) Aminopyrine N-demethylase의 활성

Nash의 방법을 약간 변경하여 반응액 2 ml중 0.1 M Na^+/K^+ phosphate buffer (pH 7.5)에 2 mM amonopyrine. HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM semicarbizide 및 효소액 (300-400 μg의 단백질)을 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 15% $ZnSO_4$와 포화 $Ba(OH)_2$를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상징액 5ml에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상징액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소할성의 단위는 1분당 mg protein이 생성한 formaldehyde n moles로서 표시하였다.

2) Aniline hydroxylase의 활성

Bidlack 등의 방법에 준하여 반응액 2 ml중 10 mM $MgCl_2$와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris. HCl 완충액 (pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액 (300-400 μg의 단백질)을 가하여 이액을 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가한 후 10분간 원심분리하여 상징액에 발색의 목적으로 10% Na_2CO_3와 0.2 N-NaCH (2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. 효소할성의 단위는 1분간에 mg protein이 생성한 p-aminophenol n moles로서 표시하였다.

3) Glutathion S-transferase의 활성

Habig 등의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 기질인 1 mM

1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 1 mM glutathion을 넣고 일정량의 효소액을 함유한 반응액을 25℃에서 10분간 반응시킨 후 생성된 glutathion-2,4-dinitrobenzene conjugate를 340 nm에서 흡광도를 측정한 다음 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 n mole 수로 표시하였다.

4) Epoxide hydrolase의 활성

Hammock 등의 방법에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 기질로서 trans-stilbene oxide (TSO, 3 mM)와 효소원 (100-200 μg의 단백질)을 가하여 반응액 3 ml 되도록 하였다. 이 반응액을 37℃에서 20분간 반응시켰을 때 이때 소실되는 기질의 양을 229 nm에서 흡광도의 감소되는 것을 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 기질인 trans-stilbene oxide의 양을 n mole 수로 나타내었다.

5) 단백질 정량 및 통계처리

Lowry 등의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였으며, 실험 결과의 통계 처리는 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

3. 화합물의 분리

가. 신선초에서 화합물 1의 분리

1) 실험재료 및 기기

신선초는 전남 순천시 승주군에서 채집하였으며 이의 표본은 순천대 한약자원학과에 보관중이다. 기기분석용 기기는 Gallen Kamp Melting Point Apparatus, Bomen MB 100-C15 FT-IR spectrometer, CE 599 Universal automatic scanning spectrphotometer, Bruker AM-200

spectrometer를 이용하였으며 column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck Art. 7729) 및 Wako-300, thin layer chromatography 용 precoated plates는 Kiesel gel 60 F254 (Merck Art. 5715) 을 사용하였다.

2) 추출 및 분획

신선초 지상부 (900g)를 음건후 분쇄하여 수욕상에서 환류냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 감압하에서 용매를 유거하여 얻은 MeOH엑스를 10% MeOH에 현탁시킨후 계통 분획을 실시하여 CHCl3, EtOAc, n-BuOH 및 수층으로 분획하였다. 이중 EtOAc 분획을 silica gel column chromatography 를 행하여 $CHCl_3$ - MeOH - H_2O (7:3:1, 하층), $CHCl_3$ - MeOH - H_2O (65:35:10, 하층) 의 용매로 용출, 화합물 1을 분리하였다(Fig. 1).

3) 화합물 1 (cynaroside)

mp: 250-252℃

UV

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} ; 3450 (OH), 1659 (C=O), 1611, 1499 (C=C), 1088, 1029 (C-O)

UV λ_{max}, nm ; (MeOH): 255, 268, 349; (NaOMe): 264, 398 ; (NaOAc): 260, 370, 403 ;(NaOAc + H_3BO_3): 260, 372; (AlCl3): 274, 300, 329, 431; (AlCl3 + HCl): 273, 298, 359, 390

1H-NMR (DMSO-d6, 200 MHz) δ 13.1 (1H, brs., C5-OH), 7.65 (1H, d, J=8.9 Hz, H-6'), 7.58 (1H, s, H-2'), 6.90 (1H, d, J=8.9 Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.73 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.07 (1H, d, J=7.0 Hz, anomeric H)

13C-NMR (DMSO-d6, 100 MHz) : 181.79 (C-4), 164.44 (C-2), 162.88 (C-7), 161.08 (C-5), 156.87 (C-9), 149.96 (C-4'), 145.77 (C-3'), 121.27 (C-1'), 119.05 (C-6'), 115.96 (C-5'), 113.54 (C-2'), 105.29 (C-10), 103.07 (C-3), 99.90(C-1), 99.49 (C-6), 94.67

(C-8), 77.12 (G-5), 76.36 (G-3), 73.08 (G-2), 69.55 (G-4), 66.60 (G-6)

4) 화합물 1의 산 가수분해

화합물 1 (50 ㎎)을 5% H2SO4 로 수욕상에서 환류냉각하면서 4시간동안 가열하여 가수분해한후 냉각, EtOAc로 추출하였다. 추출액을 농축, MeOH 로 재결정하여 표준품과의 대조 (IR, 1H-NMR)에 의해 luteolin으로 동정하였다.

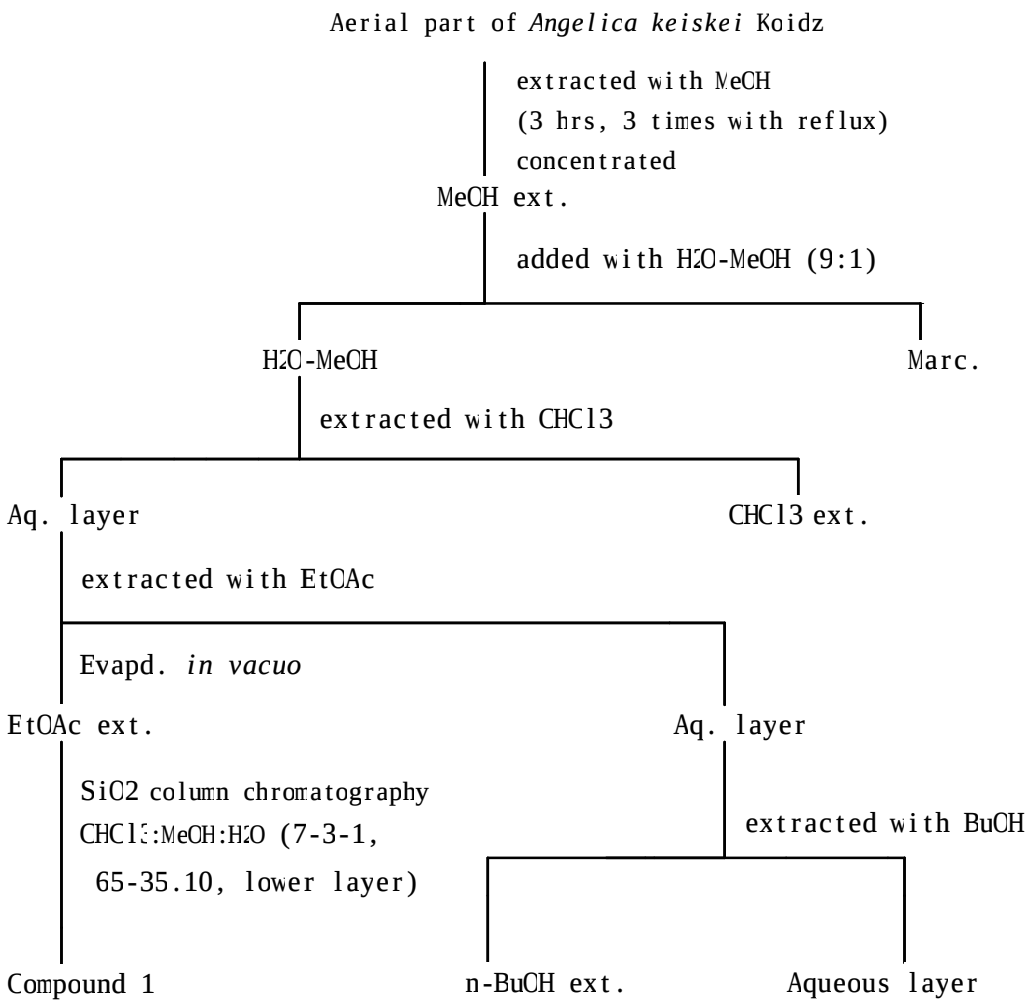


Fig. 1. Isolation of compound from *Angelica keiskei*

나. 서양고추냉이에서 화합물 2, 3 및 4의 분리

1) 실험재료

실험에 사용한 서양고추냉이 잎은 순천대학교 약용식물원에서 재배한후 채집하여 음건세절하여 시료로 사용하였다.

2) 기기 및 시약

IR spectrum은 Bruker IFS 66 FT-IR spectrophotometer를, UV spectrum은 Shimadzu Mps-50L spectrometer를, NMR spectrum은 Bruker AM 200 spectrometer로 용매는 DMSO-d_6, 내부표준물질은 TMS를 사용하여 측정하였다. 융점은 Gallen Kamp Melting Point Appratus를 사용하였고 보정하지 않았다.

용매는 특급 및 1급 시약을, column chromatography용 충진제는 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merk, No. 7734)을, thin layer chromatography는 precoated kiesel gel 60 F_{254} (Merck, No. 5735)를 사용하였다.

3) 추출 및 분리

서양고추냉이 잎 (2.8 kg)을 음건세절하여 먼저 n-hexane으로 실온에서 7일간 3회 반복 추출하여 탈지한 후 MeOH을 사용하여 동일한 방법으로 추출한 다음 각각 rotary evaporator로 용매를 제거하여 MeOH 엑스 513 g을 얻었다. MeOH 엑스는 10% MeOH로 현탁시켜 Scheme 1과 같이 용매의 극성을 증가시키는 계통분획법에 의해 $CHCl_3$, EtOAc, n-BuOH, 물 순으로 분획한 후 감압농축하여 각 분획분을 145 g, 27 g, 52 g 및 220 g 얻었다.

서양고추냉이의 EtOAc 가용부 엑스 27 g중 20 g을 silica gel 20 g에 흡착시켜 $CHCl_3$로 충진한 silica gel column의 상층에 넣은 다음 silica gel 20 g을 그 위에 다시 충진시켜 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (5:1:1, 하층), $CHCl_3$-MeOH-H_2O (25:8:5, 하층), $CHCl_3$-MeOH-H_2O (7:3:1, 하층)

및 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (65:35:10, 하층)의 용매로 용출하는 column chromatography를 실시하여 subfraction을 30 ㎖씩 받아 3종의 화합물을 순수하게 분리하였다(Fig. 2).

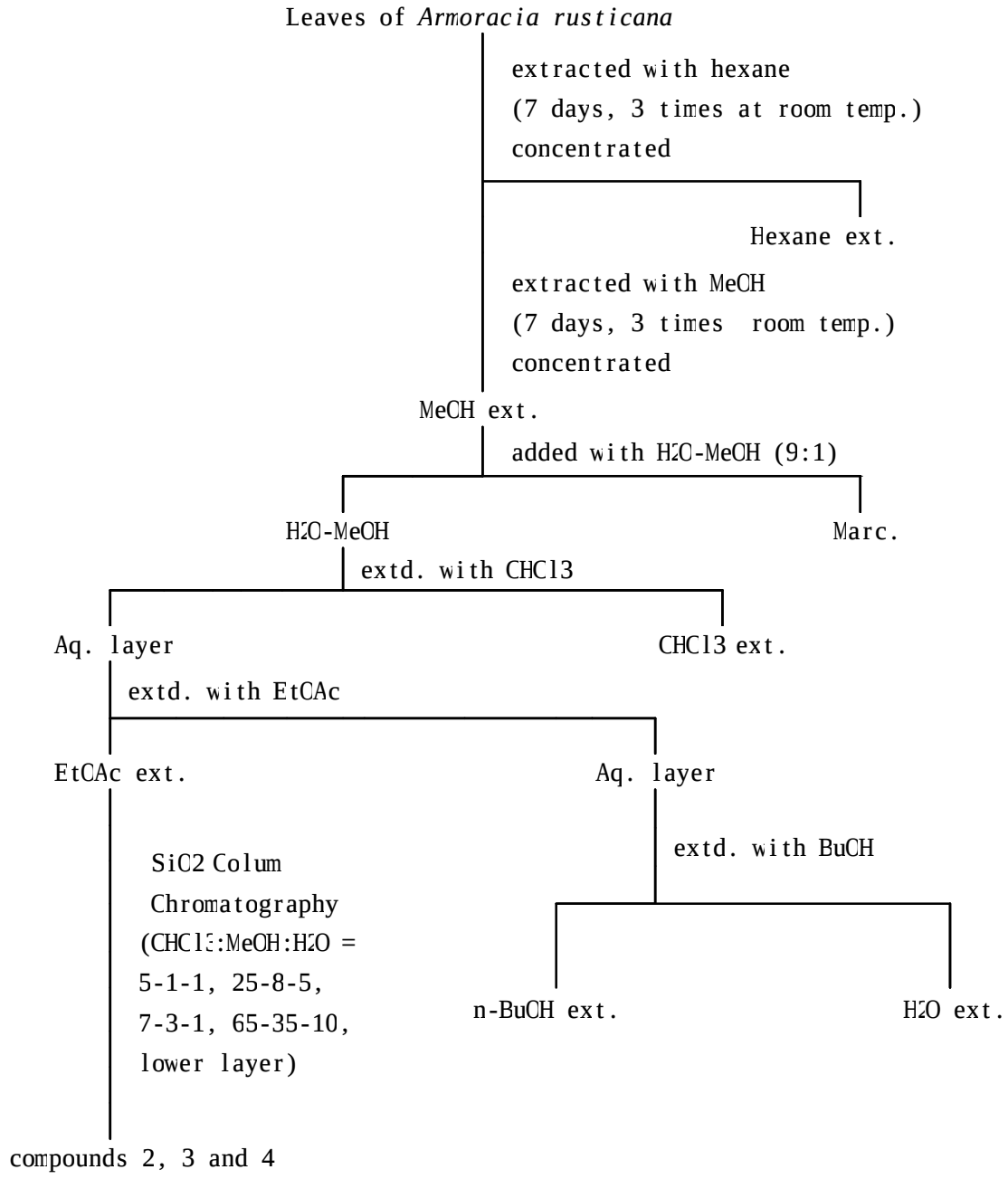


Fig. 2. Isolation of compound 2, 3 and 4 from *Armoracia rusticana*

4) **화합물** 2 (kaempferol-3-O-β-D-xylofuranoside)

mp: 242-244°.

IR ν_{max}^{KBr} cm-1: 3374 (OH), 1657 (α, β-unsaturated ketone), 1607, 1605, 1506, 1456 (aromatic C=C), 1365, 1282, 1179, 1056 (glycosidic C-O).

UV λ_{max}(MeOH)nm: 267, 355; (NaOMe) 278, 326, 407; ($AlCl_3$) 276, 308, 353, 410; ($AlCl_3$/HCl) 276, 303, 354, 409; (NaOAc) 278, 310, 374; (NaOAc/H_3BO_3) 267, 353.

1H-NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 12.62 (1H, s, C5-OH), 8.01 (2H, d, J=8.8 Hz, H-2' & H-6'), 6.89 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3' & H-5'), 6.44 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.33 (1H, d, J=7.0 Hz, H-1").

13C-NMR (DMSO-d6, 100 MHz): Table 2

5) **화합물** 3 (kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside)

mp: 220 224°.

IR ν_{max}^{KBr} cm-1: 3457 (OH), 1659 (α, β-unsaturated ketone), 1605, 1560, 1491 (aromatic C=C), 1362, 1262, 1183, 1062 (glycosidic C-O).

UV λ_{max}(MeOH)nm : 265, 356; (NaOMe) 277, 329, 410; ($AlCl_3$) 277, 310, 355, 412; ($AlCl_3$/HCl) 275, 305, 348, 411; (NaOAc) 277, 307, 371; (NaOAc/H_3BO_3) 263, 354.

1H-NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 8.06 (2H, d, J=8.8 Hz, H-2' & H-6'), 6.85 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3' & H-5'), 6.42 (1H, d, J=1.9 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J=1.9 Hz, H-6), 5.39 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1").

13C-NMR (DMSO-d6, 100 MHz): Table 2

6) **화합물** 4 (kaempferol-3-C-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside)

mp: 187-189°

IR ν_{max}^{KBr} cm-1: 3366(OH), 1657 (α, β-unsaturated ketone), 1608, 1605, 1504, 1443 (aromatic C=C), 1360, 1280, 1173, 1045 (glycosidic C-O).

UV λ_{max}(MeOH)nm: 261, 354; (NaOMe) 273, 324, 404; ($AlCl_3$) 274, 305, 357, 407; ($AlCl_3$/HCl) 273, 306, 349, 405; (NaOAc) 274, 305, 371; (NaOAc/H_3BO_3) 263, 354.

1H-NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 8.13 (2H, d, J=8.8 Hz, H-2' & H-6'), 6.89 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3' & H-5'), 6.45 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.69 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1"), 4.57 (1H, d, J=7.3 Hz, H-1"').

13C-NMR (DMSO-d6, 100 MHz) : Table 2

Table 2. ^{13}C-NMR data for compounds 2, 3 and 4 isolated from *Armoracia rusticana*

Carbon No.	Compounds		
	2	3	4
2	156.4	156.4	156.3
3	133.2	133.3	132.9
4	177.5	177.6	177.5
5	161.3	161.2	161.2
6	98.8	99.4	98.5
7	164.2	164.2	164.3
8	93.8	93.7	93.6
9	156.4	156.4	156.3
10	104.0	104.0	103.8
1'	120.7	120.9	120.9
2'	130.9	131.0	131.0
3'	115.4	115.1	115.2
4'	160.2	160.0	160.0
5'	115.4	115.1	115.2
6'	130.9	131.0	131.0
1"	101.8	101.7	98.3
2"	73.8	71.2	79.7
3"	75.9	73.1	73.6
4"	69.6	67.9	67.7
5"	66.0	75.6	75.8
6"		60.2	60.0
1"'			104.7
2"'			74.0
3"'			76.3
4"'			69.4
5"'			65.8
6"'			

다. 어성초로부터 화합물 5, 6 및 7의 분리

1) 실험재료

실험에 사용한 어성초는 고흥에서 재배한 것을 구입하여 음건세절하여 시료로 사용하였다.

2) 기기 및 시약

IR spectrum은 Bruker IFS 66 FT-IR spectrophotometer를, UV spectrum은 Shimadzu Mps-50L spectrometer를, NMR spectrum은 Bruker AM 200 spectrometer로 용매는 DMSO-d_6, 내부 표준물질은 TMS를 사용하여 측정하였다.

용매는 특급 및 1급 시약을, column chromatography용 충진제는 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merk, No. 7734)을, thin layer chromatography는 precoated kiesel gel 60 F_{254} (Merck, No. 5735)를 사용하였다.

3) 추출 및 분리

어성초의 전초 (3.5 kg)을 음건세절하여 먼저 n-hexane으로 실온에서 7일간 3회 반복 추출하여 탈지한 후 MeOH을 사용하여 동일한 방법으로 추출한 다음 각각 rotary evaporator로 용매를 제거하여 MeOH 엑스 513 g을 얻었다. MeOH 엑스는 10% MeOH로 현탁시켜 계통분획법에 의해 $CHCl_3$, EtOAc, n-BuOH, 물 순으로 분획한 후 감압농축하여 각 분획분을 얻었다.

어성초 지상부의 EtOAc 가용부 추출물을 silica gel에 흡착시켜 $CHCl_3$로 충진한 silica gel column의 상층에 넣은 다음 silica gel을 그 위에 다시 충진시켜 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (5:1:1, 하층), $CHCl_3$-MeOH-H_2O (25:8:5, 하층), $CHCl_3$-MeOH-H_2O (7:3:1, 하층) 및 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (65:35:10, 하층)의 용매로 용출하는 column chromatography를 실시하여 화합물 5, 6, 7을 분리하였다(Fig. 3).

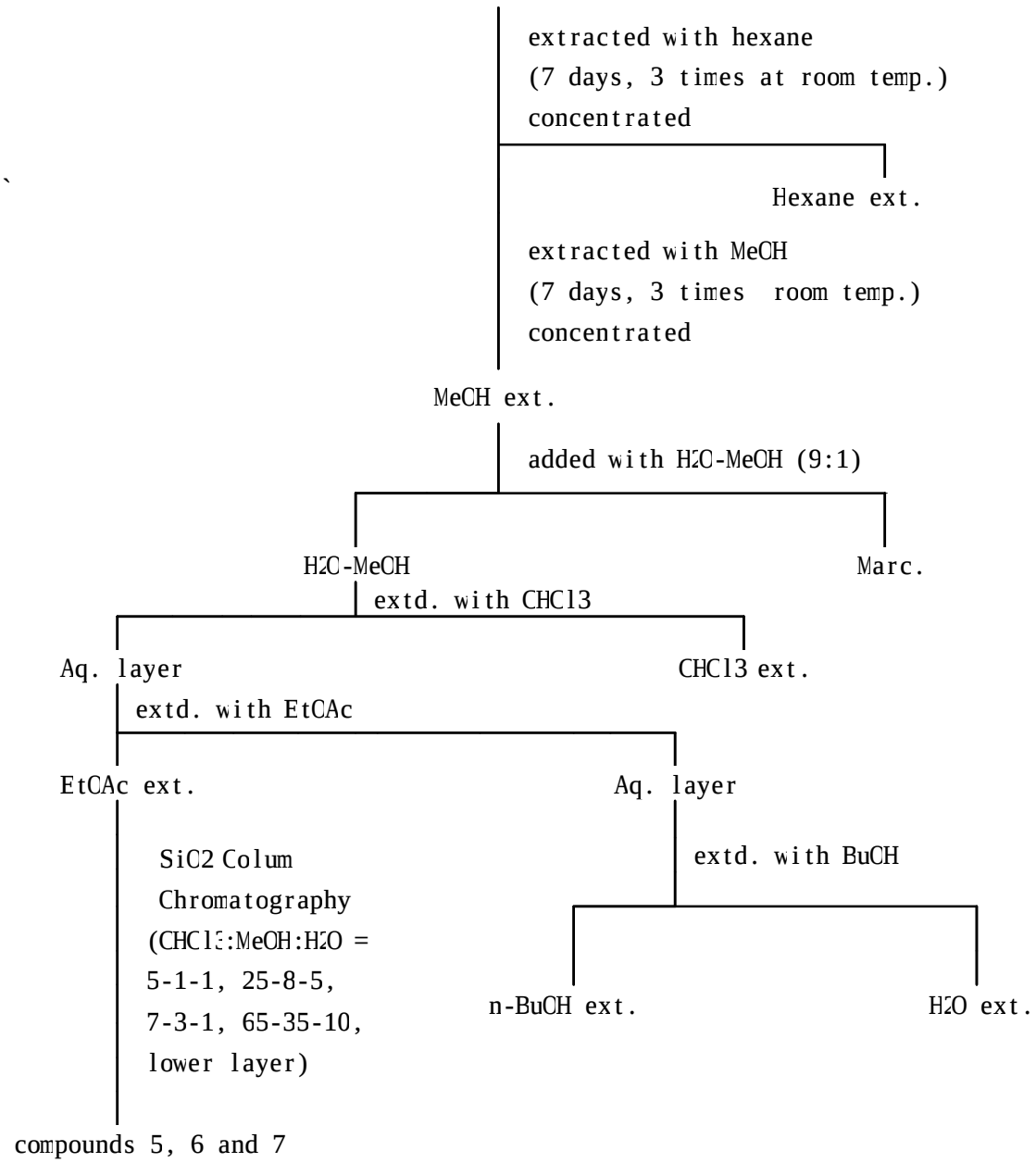


Fig. 3. Isolation of compounds from *Houttuynia cordata*

4) **화합물** 5 (apigenin)

mp: 169-171℃

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3374 (OH), 657 (α, β-unsaturated ketone), 1605, 1607, 1506, 1456 (aromatic C=C), 1365, 1282, 1179

UV λ_{max}^{MeOH} nm(logε) 265, 295sh, 335 ; with NaOMe 274, 323, 391 ; with NaOAc 273, 300, 375 ; with NaOAc+H_3BO_3 265, 301sh, 337 ; with $AlCl_3$ 275, 300, 347, 383 ; with $AlCl_3$+HCl 275, 298, 339, 380

^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS) δ : 7.92 (2H, d, J=8.7Hz, H-2' & 6'), 6.92 (2H, d, J=8.7Hz, H-3' & 5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, J=1.9Hz H-8), 6.18 (1H, d, J=1.9Hz, H-6)

^{13}C-NMR(DMSO-d$_6$, TMS) ; 163.7 (C-2), 102.6 (C-3), 181.7 (C-4), 161.0 (C-5), 98.7 (C-6), 164.0 (C-7), 93.7 (C-8), 157.3 (C-9), 103.6 (C-10), 121.1 (C-1'), 128.4 (C-2' & 6'), 115.8 (C-3' & 5'), 161.4 (C-4')

5) **화합물** 6 (afzelin)

mp: 175-177 °

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3420 (OH), 1660 (α, β-unsaturated ketone), 1614, 1506, 1448 (aromatic C=C), 1362, 1285, 1175, 1063 (glycosidic C-O)

UV λ_{max}^{MeOH} nm(logε) 265, 344 ; with NaOMe 274, 325, 388 ; with NaOAc 271, 360 ;with NaOAc+H_3BO_3 266, 348 ; with $AlCl_3$ 274, 304, 348, 397 ; with $AlCl_3$+HCl 275, 301, 342, 396

^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS) δ : 12.61 (1H, s, 5-OH), 7.74 (2H, d, J=8.6Hz, H-2' & 6'), 6.91 (2H, d, J=8.6Hz, H-3' & 5'), 6.42 (1H, d, J=1.9Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J=1.9Hz, H-6), 5.29 (1H, s, anomeric H), 0.78 (3H, d, J=5.3Hz, -CH_3)

^{13}C-NMR(DMSO-d$_6$, TMS) ; 157.3 (C-2), 134.2 (C-3), 177.7 (C-4), 161.3 (C-5), 98.7 (C-6),

164.3 (C-7), 93.8 (C-8), 156.5 (C-9), 104.1 (C-10), 120.5 (C-1'), 130.6 (C-2' & 6'), 115.4 (C-3' & 5'), 160.0 (C-4'), 101.8 (R*-1), 70.1 (R-2), 70.4 (R-3), 70.6 (R-4), 71.1 (R-5), 17.5 (R-6)

*R: rhamnopyranose

6) **화합물** 7 (quercitrin)

mp: 186-188°

IR ν_{max}^{KBr} cm-1: 3370 (OH), 1658 (α, β-unsaturated ketone), 1607, 1574, 1507, 1452 (aromatic C=C), 1375, 1280, 1169, 1050 (glycosidic C-O)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (logε) 259, 304sh, 352 ; with NaOMe 272, 328, 395 ; with NaOAc 275, 324sh, 374 ; with NaOAc+H3BO3 263, 303sh, 369 ; with AlCl3 278, 306sh, 335, 433 ; with AlCl3+HCl 273, 304sh, 354, 405

1H-NMR (DMSO-d6, TMS) δ : 7.30 (1H, d, J=1.9Hz, H-2'), 7.24 (1H, dd, J=1.9 & 8.4Hz, H-6'), 6.66 (1H, d, J=8.4Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, J=1.6Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J=1.6Hz, H-6), 5.25 (1H, s, anomeric H)

13C-NMR (DMSO-d6, TMS) ; 157.3(C-2), 134.3(C-3), 177.8(C-4), 161.3(C-5), 98.8(C-6), 164.3(C-7), 93.7(C-8), 156.5(C-9), 104.1(C-10), 121.2(C-1'), 115.6(C-2'), 145.3(C-3'), 148.5(C-4'), 115.8(C-5'), 120.6(C-6'), 101.7(*R-1), 70.1(R-2), 70.4(R-3), 71.3(R-4), 72.5(R-5), 17.5(R-6)

*R: rhamnopyranose

라. 엉겅퀴로부터 화합물 8의 분리

1) 실험재료

엉컹퀴는 남해에서 채취하였고, 표본은 순천대학교 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

2) 기기 및 시약

IR spectrum은 Hitachi 270-30로 시판용 KBr을 사용하였고, UV spectrum은 CE 599 UASS를 사용하였다. NMR spectrum은 Bruker AM-200, AMX 400 spectrometer로 용매는 DMSC-dϵ, 내부 표준물질은 TMS를 사용하여 측정하였다.

용매는 특급 및 1급 시약을, Column chromatography용 충진제를 kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merck, No. 7734)를 thin layer chromatography는 precoated Kiesel gel 60 F254 (Merck, No. 5735)를 사용하였다.

3) 추출 및 분리

엉겅퀴 (1.0 kg)의 지상부를 음건세절하여 먼저 MeCH로 추출하고 실온에서 10일간 3회 반복 추출하여 rotary evaporator로 용매를 제거하여 MeCH 엑스 140g을 얻었다. MeOH 엑기스는 10% MeCH로 현탁시켜 Scheme 1과 같이 용매의 극성을 증가시키는 계통분획법에 의해 클로로포름 (CHCl₃), 초산에틸 (EtCAc), 부탄올 (n-BuCH), 물 (H₂O) 순으로 분획한 후 감압 농축하여 각 분획물을 40 g, 30 g, 및 20g을 얻었다 이중 n-BuCH 가용부 엑스 20 g을 silica gel 20 g에 흡착시켜 CHCl₃로 충진한 silica gel column의 상층에 넣은 다음 CHCl₃-MeCH-H₂O (25:8:5, lower phase, 7:3:1, lower phase)의 용매로 용출하는 column chromatographjy를 실시하여 화합물 8을 순수히 분리하였다(Fig. 4).

4) **화합물** 8 (hispidulin 7-O-neohesperidoside)

mp: 192-196o

IR: 3380 cm-1, 1606, 1569 cm-1 (α,β-unsaturated carbonyl), 1073 cm-1 (glycosidic C-O)

UV λmax MeOHnm(log ε): MeOH; 275, 335, NaOMe; 270, 395, NaOAc; 276, 335, 390, AlCl3; 280, 305, 366, AlCl3 + HCl; 286, 300, 350

1H-NMR (DMSO-d6, 200 MHz); 7.93 (2H, d, J=8.75 Hz, H-2' & 6'), 7.02 (1H, s, H-8), 6.93 (2H, d, J=8.75 Hz, H-3' & 5'), 6.83 (1H, s, H-3), 5.33 (1H, d, 7.25 Hz, anomeric H of Glucose), 4.65 (1H, brs, anomeric H of Rhamnose), 3.77 (3H, s, -OCH3), 1.14 (3H, d, J=6.3 Hz, -CH3 of Rhamnose)

13C-NMR (DMSO-d6, 50.3 MHz) δ: 182.3 (C-4), 164.4 (C-2), 161.5 (C-7'), 155.8 (C-7), 152.5 (C-9), 152.1 (C-5), 132.8 (C-4' & 6'), 128.6 (C-2' & 6'), 121.1 (C-1'), 116.1 (C-3' & 5'), 105.8 (C-10), 102.7 (C-3), 100.0 (C-1'"), 70.6 (C-3'"), 70.4 (C-2'"), 69.8 (C-4'"), 68.6 (C-5'"), 60.6 (C-6'"), 60.3 (OCH3), 18.2 (C-6'")

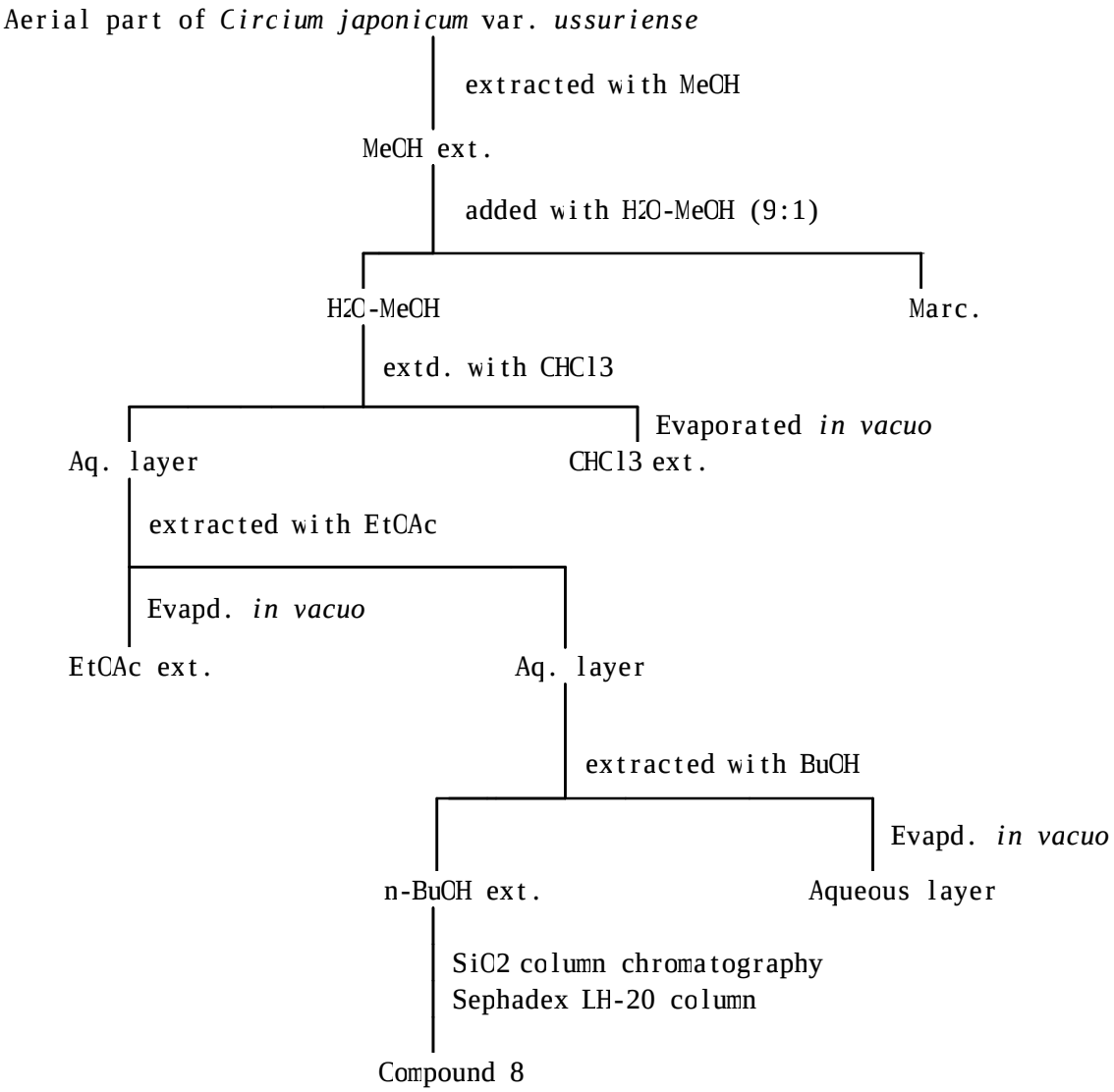


Fig. 4. Isolation of compound 8 from *Circium japonicum* var. *ussuriense*

제3절 결과 및 고찰

1. 식용 및 약용식물자원 추출물의 지질과산화억제작용의 탐색

151종의 약용 및 식용식물자원의 추출물을 실험재료로 하여 대사성질환 원인의 하나인 과산화지질에 대한 효과를 탐색하였다. 즉 불포화지방산의 과산화반응에 미치는 영향을 시험관내에서 정상흰쥐 또는 간장독성물질인 브로모벤젠으로 처리한 흰쥐의 간장조직을 이용하여 관찰하였다 (Table 3, 4). 추출물중 신선초 (*Angelica keiskei*), 서양고추냉이 (*Armoracia rusticana*), 어성초 (*Houttuynia cordata*) 및 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)가 *in vitro* 지질과산화생성억제작용이 각각 58%, 64%, 64%, 51%로 강력한 활성이 관찰되었다. 활성식물로 인정되는 4종의 식물자원을 선택하여 지질과산화의 *in vivo*실험 및 활성화합물의 분리를 위하여 column chromatography를 실시하였다.

Table 3. Effect of the extracts of edible and medicinal plants on the hepatic lipid peroxide content

Scientific name	Korean name	Used part1)	Extract2)	Dose (mg/ml)	Malondialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Control					17.5 ∓ 0.98	
Allium fistulosum	파	A	A	10-1	NS	
Allium tuberosum	부 추	A	A	10-1	NS	
Allium monanthum	달 래	W	A	10-2	16.9 ∓ 1.35	3
				10-1	14.6 ∓ 0.96*	17
				1	11.8 ∓ 1.04**	33
Artemisia princeps var. *orientalis*	쑥	A	M	10-1	NS	
Beta vulgaris var. *cicla*	근 대	A	A	10-2	12.7 ∓ 0.95**	27
				10-1	9.5 ∓ 1.63**	46
				1	7.3 ∓ 0.59**	58
Brassica juncea var. *integrifolia*	갓	A	A	10-2	10.9 ∓ 0.32**	38
				10-1	9.0 ∓ 0.31**	49
				1	6.7 ∓ 0.45**	62
Capsicum annuum	고추	L	M	10-2	12.3 ∓ 0.64**	30
				10-1	9.7 ∓ 0.59**	45
				1	7.7 ∓ 0.26**	56
Cedrela sinensis	참죽나무	L	M	10-1	NS	
Cinamomum camphora	녹나무	L	A	10-1	NS	
Cinnamomum japonicum	생달나무	L	A	10-1	NS	
Laucus carota var. *sativa*	당 근	R	A	10-1	NS	
Eucommia ulmoides	두충나무	L	M	10-1	NS	
Hemistepta lyrata	지칭개	A	A	10-1	NS	
Ixeris dentata	씀바귀	W	A	10-1	NS	

Table 3. continued

Scientific name	Korean name	used part[1)]	extract[2)]	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Lactuca indica var. *laciniata*	왕고들빼기	W	A	10-1	NS	
Lindera erythrocarpa	비목나무	L	M	10-1	NS	
Lindera glauca	백동백	L	M	10-1	NS	
Lindera obtusiloba	생강나무	L	M	10-1	NS	
Lindera sercea	털조장나무	L	M	10-1	NS	
Litsea japonica	까마귀쪽나무	L	M	10-1	NS	
Lozoste lancifolia	육박나무	L	M	10-1	NS	
Machilus thunbergii	후박나무	L	M	10-1	NS	
Machilus japonica	센달나무	L	M	10-1	NS	
Malva verticillata	아 욱	A	A	10-1	NS	
Neolitsea aciculata	새덕이	L	M	10-1	NS	
Neolitsea serical	참식나무	L	M	10-1	NS	
Ceanathe javanica	미나리	A	M	10-1	NS	
Platycodon grandiflorum	도라지	R	M	10-1	NS	
Raphanus sativus var. *hortensis for. acanthis formis*	무 순	A	A	10-1	NS	
Sedum sarmentosum	돌나물	A	M	10-1	NS	
Youngia sonchifolia	고들빼기	W	A	10-1	NS	

1) A, aerial part; W, whole plant; L, leaf; R, root

2) A, 80% acetone extract; M, methanol extract

The values are mean ± S.D. of 5 replications.

Significantly different from the control value: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

NS: Not Significant

Table 4. Effect of the methanol extracts of edible and medicinal plants on the hepatic lipid peroxide content in bromobenzen treated rat.

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	inhibition (%)
Normal			23.3 ∓ 2.19	
Control			56.6 ∓ 1.44	
Achyranthes japonica	Root	1	NS	
	Aerial part	102	NS	
		101	46.2 ∓ 3.08	18
		1	45.3 ∓ 1.83	20
*Angelica keiskei*1)	Aerial part	1	24.4 ∓ 2.47	58
Ajuga decumbens	Whole plant	1	NS	
Aralia elata	Leaf	1	NS	
	Stem	102	54.5 ∓ 2.16	4
		101	51.4 ∓ 1.07	9
		1	46.7 ∓ 1.79	17
	Rachis	102	45.7 ∓ 0.61	20
		101	42.7 ∓ 2.43	25
		1	42.1 ∓ 1.82	26
*Armoracia rustixana*1)	Aerial part	1	20.84 ∓ 1.84	64
Artemisia apiacea	Aerial part	102	NS	
		101	NS	
		1	47.4 ∓ 1.11	16
	Root	102	50.4 ∓ 1.06	11
		101	45.6 ∓ 0.81	19
		1	43.4 ∓ 1.16	23
Aster tripolium	Aerial part	1	NS	
Castanea crenata	Leaf	1	NS	
	Stem	102	53.9 ∓ 3.26	5
		101	50.5 ∓ 0.81	11
		1	44.0 ∓ 1.46	22
Chamaecyparis obtusa	Stem	1	NS	
	Leaf	102	45.4 ∓ 2.21	20
		101	43.4 ∓ 1.22	23
		1	40.0 ∓ 1.32	29

Table 4. continued

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Cirsium japonicum var. *ussuriense*1)	Aerial part	1	28.8 ∓ 2.15	51
Cocculus trilobus	Aerial part	102	51.8 ∓ 0.90	8
		101	44.4 ∓ 1.72	22
		1	41.6 ∓ 3.06	27
Cocculus trilobus	Root	1	NS	
Colocasia antiquorum var. *esculenta*	Aerial part	1	NS	
Commelina communis	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
*Cucurbita moschata*1)	Leaf	1	34.9 ∓ 0.72	40
Dioscorea batatas	Aerial part	102	NS	
		101	53.7 ∓ 2.55	5
		1	42.1 ∓ 1.56	26
	Root	1	NS	
Duchesnea chrysantha	Whole plant	1	NS	
Erigeron annuus	Flos	1	NS	
	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Euonymus japonica	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
Forsythia koreana	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
Geranium nepalense subsp. *thunbergii*	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
*Glycine max*1)	Leaf	1	33.3 ∓ 4.01	43
*Houttuynia cordata*1)	Aerial part	1	21.1 ∓ 1.50	64
Hemerocallis fulva	Aerial part	1	NS	
Humulus japonicus	Aerial part	1	NS	
	Root	102	48.3 ∓ 1.87	15
		101	43.3 ∓ 2.00	23
		1	40.5 ∓ 0.61	28

Table 4. continued

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Lactuca indica var. *laciniata*	Root	1	NS	
Liriodendron tulipifera	Stem	1	NS	
	Leaf	1	NS	
Lonicera japonica	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
Lygodium japonicum	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Morus alba	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
Nandina domestica	Leaf	1	NS	
	Stem	102	44.7 ∓ 1.41	21
		101	42.8 ∓ 2.17	24
		1	35.0 ∓ 1.32	38
	Flos	1	NS	
Oenothera odorata	Aerial part	1	NS	
	Root	102	40.3 ∓ 1.08	29
		101	37.6 ∓ 1.02	34
		1	30.6 ∓ 1.00	46
Oxalis corniculata L.	Whole plant	1	NS	
Parthenocissus tricuspidata	Leaf	102	51.9 ∓ 3.64	8
		101	38.5 ∓ 1.25	32
		1	35.9 ∓ 3.16	37
	Stem	1	NS	
Persicaria perfoliata	Root	1	NS	
	Aerial part	102	39.3 ∓ 0.61	31
		101	34.5 ∓ 3.31	39
		1	31.4 ∓ 1.61	45
Photinia glabra	Stem	1	NS	
	Leaf	102	NS	
		101	53.4 ∓ 3.06	6
		1	36.3 ∓ 2.66	36

Table 4. continued

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Phytolacca esculenta	Stem	102	45.9 ∓ 1.76	19
		101	44.4 ∓ 1.20	22
		1	40.7 ∓ 1.51	28
	Leaf	1	NS	
	Fructus	1	NS	
Poncirus trifoliata	Fructus	1	NS	27.4
	Leaf	102	33.5 ∓ 3.10	41
		101	36.6 ∓ 3.00	35
		1	34.2 ∓ 2.37	40
	Stem	1	NS	
	Root	1	NS	
	thorn	1	NS	
Portulaca oleracea	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Prunella vulgaris var. *lilacina*	Flos	102	42.9 ∓ 2.17	24
		101	44.3 ∓ 3.68	22
		1	40.6 ∓ 1.31	18
	Aerial part	102	NS	
		101	51.8 ∓ 2.80	8
		1	35.8 ∓ 1.69	37
	Root	102	53.9 ∓ 3.26	5
		101	50.5 ∓ 0.81	11
		1	44.0 ∓ 1.46	22
Pulsatilla koreana	Root	1	NS	
	Aerial part	1	NS	
Quercus myrsinaefolia	Stem	1	NS	
	Leaf	102	NS	
		101	NS	
		1	45.9 ∓ 1.37	19
Reynoutria elliptica	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
	Root	1	NS	

Table 4. continued

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Sophora flavescens	Flos	1	NS	
	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Suaeda asparagoides	Aerial part	102	42.4 ∓ 0.87	25
		101	41.3 ∓ 1.52	27
		1	37.1 ∓ 2.06	34
	Root	1	NS	
Suaeda japonica	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Taraxacum officinale	Flos	1	NS	
	Aerial part	102	42.3 ∓ 1.97	25
		101	38.6 ∓ 1.69	32
		1	36.3 ∓ 3.05	36
	Root	1	NS	
Taxodium distichum	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
Thuja orientalis	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	
	Fructus	1	NS	
Imperata cylindrica var. *koenigii*	Aerial part	1	NS	
	Root	102	44.6 ∓ 2.10	21
		101	42.5 ∓ 1.17	25
		1	40.7 ∓ 0.81	28
Indigofera kirilowii	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Chelidonium majus var. *asiaticum*	Aerial part	102	42.8 ∓ 1.42	24
		101	41.5 ∓ 1.28	27
		1	38.8 ∓ 2.67	31
	Root	1	NS	
	Flos	102	39.5 ∓ 1.30	30
		101	35.3 ∓ 0.95	38
		1	30.0 ∓ 2.10	47

Table 4. continued

Scientific Name	Used part	Dose (mg/ml)	Malonialdehyde (n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Trichosanthes kirilowii	Aerial part	1	NS	
Viola mandshurica	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Saxifraga stolonifera	Aerial part	1	NS	
	Flos	102	44.5 ∓ 0.82	21
		101	41.4 ∓ 0.90	27
		1	40.3 ∓ 1.02	29
	Root	1	NS	
Smilax china	Stem	1	NS	
	Root	1	NS	
	Leaf	1	NS	
Phragmites communis	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Physalis alkekengi var. *francheti*	Fructus	102	NS	
		101	43.8 ∓ 1.55	23
		1	44.7 ∓ 3.41	21
Physalis alkekengi var. *francheti*	Aerial part	1	NS	
	Root	1	NS	
Phytolacca esculenta	Root	102	NS	
		101	NS	
		1	42.7 ∓ 1.72	25
Chenopodium album var. *centrorubrum*	Leaf	1	NS	
	Stem	1	NS	

1) control 58.4∓9.68

2. 신선초의 지질과산화억제작용 및 활성화합물

가. 화합물 1의 화학구조결정

신선초 지상부의 EtCAc 분획으로부터 분리한 화합물 1의 화학구조분석은 다음과 같다. 즉 ^{1}H-NMR spectrum에서 meta coupling을 하고 있는 두 aromeric proton의 signal [δ 6.78 (1H, d, J=2.0Hz), 6.43 (1H, d, J=2.0Hz)] 는 전형적인 flavonoid A환의 H-8과 H-6의 signal로 추정할수 있다. 그리고 특징적인 δ 6.73 에서의 single peak는 이 화합물이 C-3위치에 치환기가 존재하지 않는 flavone 화합물임을 암시하고 있다. 그리고 1몰의 anomeric proton유래의 signal [δ 5.07 (1H, d, J=7.0 Hz, H-1″)] 관측되며 ^{13}C-NMR spectrum에서 D-glucopyranose 유래의 signal [δ 99.90 (C-1"), 77.12 (C-5"), 76.36 (C-3"), 73.08 (C-2"), 69.55 (C-4"), 60.60 (C-6")]이 관찰된다. 이상의 data 로 부터 flavonoid 화합물은 flavone 유도체인 luteolin glucoside로 추정되었다. 한편 이 화합물은 UV spectrum에서 MeCH 용매로 측정하였을 경우 band Ⅰ이 349nm에서 관측되어 flavone화합물임을 시사하며, NaCAc 용매중에서 측정하였을 경우 band Ⅰ의 파장변화가 보이지 않으므로서 C-7위치에 당이 결합한 flavone 배당체임을 알수 있다. 이러한 사실은 ^{13}C-NMR data 검토결과와 함께 당의 결합위치는 luteolin의 C-7위치에 D-glucopyranose가 결합하고 있음을 알수 있다. 더구나 이 화합물의 산 가수분해시 genin은 문헌치 (^{1}H-NMR, UV, IR, mp)와의 대조에 의해 luteolin으로 동정할수 있다. 그러므로 이들의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR spectrum을 종합하여 볼때 화합물 1은 cynaroside (luteolin 7-C-β-D-glucoside)로 결정하였다.

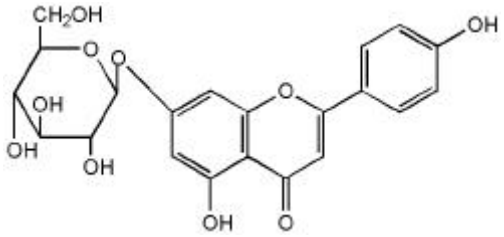


Fig 5. Compound 1 isolated from *Angelica keiskei*.
Compound 1: cynaroside

나. 신선초 추출물과 분리한 화합물 1의 지질과산화생성억제작용 및 약리기전

신선초 (*Angelica keiskei* Koidz)은 미나리과에 속하는 다년생초본으로서 일본의 팔장도에서 주로 재배되고 우리나라에는 1970년대 말에 처음 들어와 명일엽, 선삼초, 신립초 및 함초 등으로 불리고 있다. 신선초는 고혈압, 간장병, 신경통 등 각종 성인병에 옛부터 민간약으로 사용되어 왔으며, 생리적 활성을 나타내는 각종 유기산, flavonoid, coumarin, saponin 등과 각종 무기질 특히 유기게르마늄이 들어 있다고 보고되어 있다. 최근 성인병이 점점 증가함에 따라 자연건강 식품에 대한 관심도 더욱 높아지고 있어 이 식물도 생채, 분말, 엑스트렉트, 생즙등의 형태로 많이 이용되고 있다. 특히 생즙은 소화되기 어려운 섬유소가 대부분 제거된 형태이므로 다량을 섭취할 수 있다는 장점이 있다. 우리나라에서는 자연그대로의 영양소를 유지하게 해주는 녹즙기가 개발되어, 생즙으로 이용하는 사람이 계속 늘고 있다.

신선초에서 분리한 성분인 cynaroside의 bromobenzene에 의하여 유도된 간독성의 경감기전을 추구할 목적으로 산화지질의 생성 및 epoxide의 해독계 효소에 어떠한 영향을 주는가를 검토하였다.

브로모벤젠은 간독소의 일종으로 생체에 폭로되었을 때 간세포의 mixed function oxidation

system에 의하여 간독성을 야기시키는 bromobenzene 3, 4-oxide로 전환된다. Epoxide는 독성물질로 그 생성원은 자연환경 및 산업의 공정과정에서 생기는 외인성인 것과 생체내 생합성에 존재하는 내인성으로 구분할 수 있다. Epoxide 독성유발 model로 bromobenzene을 흔히 사용하고 있다. Bromobenzene은 mixed function oxidation system에 의하여 독성이 강한 bromobenzene-3,4-oxide로 전환되며 이 epoxide를 대사시켜 독성이 없는 bromobenzene-3,4-dihyrodiol로 대사시키는 효소가 epoxide hydrolase이며 또 다른 계로는 glutathione S-transferase에 의하여 bromobenzene glutathine으로 배설된다.

신선초에서 페놀성 화합물의 in vivo 간 해독작용을 연구하기 위해 과산화지질의 생성 및 epoxide 해독계 효소에 미치는 영향을, bromobenzene을 model약물로 한 동물을 대상으로 하여 관찰하였다. 즉 브로모벤젠을 분해하여 epoxide생성을 담당하는 효소계인 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성과, 생성된 epoxide를 해독하는 glutathione S-transferase의 활성, epoxide를 가수분해하여 대사시키는 효소인 epoxide hydrolase 활성을 관찰하였다.

신선초가 epoxide 생성에 어떤 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 bromobenzene에 의해 유도된 쥐의 간 과산화지질함량을 비교 관찰하였다. Bromobenzene 단독 투여군에서는 과산화지질함량이 현저히 증가되었며, 신선초 MeCH 추출물 100 mg 경구투여 전처리 군에서는 bromobenzene 군과 비교하였을 때 23%, 200 mg 투여에서는 27%의 억제율을 보였고 신선초에서 분리한 cynaroside 10mg 복강투여 전처리 에서는 bromobenzene에 의해 유도된 지질과산화의 함량이 33% 억제율을 보였다. (Table 5, 9).

신선초 MeCH 추출물의 전처리가 bromobenzene에 의해 유도된 지질과산화를 억제함으로써 이들이 epoxide 생성과정에 어떤 영향을 주는 가를 관찰하였다.

Bromobenzene을 분해하여 epoxide 생성을 담당하는 효소계인 aminopyrine N-demethylase와 aniline hydroxylase 활성에 대해 MeCH 추출물은 활성변동에 별다른 영향을 미치지 못하므로

epoxide의 생성계에는 영향을 주지 않는 것으로 생각할 수 있었다 (Table 6).

Bromobenzene에 의해 생성된 epoxide를 해독하는 해독계에 작용하는 glutathione의 포합효소인 glutathione S-transferase의 활성변동을 관찰한 실험에서도 bromobenzene 단독 투여시나 신선초 추출물과 성분을 전처리한 군에서 별다른 활성의 변동이 나타나지 않음으로 신선초 추출물과 성분은 glutathione S-transferase를 매개로 하는 대사과정에 관여하지 않는 것으로 추정되었다.(Table 7, 10)

Epoxide를 가수분해하여 독성이 없는 dihydrodiol로 대사시키는 효소인 epoxide hyrolase 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때 bromobenzene의 단독 투여로서 대조군에 비하여 현저히 억제된 것이 신선초 MeOH 추출물 100 ㎎을 전처리하고 bromobenzene을 투여하였을 때, 대조군 수준에는 미치지 못하나 bromobenzene 투여군에 비해 40% 효소 활성의 증가를 볼 수 있다. 신선초에서 분리한 성분인 cynaroside 10 ㎎ 으로 전처리하고 bromobenzene을 투여하여 본 결과 bromobenzene을 단독으로 투여한 군보다 80% 효소활성이 현저히 증가됨을 관찰하였다. (Table 8, 11).

이상의 결과로 bromobenzene에 의하여 유도된 지질과산화의 함량 증가를 억제하는 신선초의 약리기전은 epoxide를 생성하는 계에 작용하는 것보다는 이를 분해하는 효소인 epoxide hydrolase의 활성을 유도하여 나타나는 결과로 사료된다. 그리고 이러한 bromobenzene에 유도된 흰쥐의 간독성 해독작용을 일으키는 신선초의 활성화합물은 cynaroside가 일부로 작용하는 것으로 추정된다.

Table 5. Effect of methanol extract of *Angelica keiskei* on the hepatic lipid peroxide content in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	Content	Percentage
Control	0	25.2 ± 4.25a	
Bromobenzene(BB)	460	52.6 ± 11.72b	100
MeOH ext. + BB	50	43.2 ± 3.26b,c	82
	100	40.7 ± 2.96c	77
	200	38.6 ± 3.17c	73

Rats were orally administered various concentration of methanol extract daily for one week and then bromobenzene(BB) was intraperitoneally injected twice with 12 hrs interval for two days. Rats were described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five animals. Values followed by the same letter are not significantly different from control ($p<0.05$)

Table 6. Effect of methanol extract of *Angelica keiskei* on the hepatic microsomal aminopyrine N-demethylase(AD) and aniline hydroxylase(AH) activities in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	AD activity (p-aminophenol nmole/mg protein/min)	AH activity (HCHO-nmole/mg protein/min
Control	0	4.86 ± 0.58a,b	0.49 ± 0.09a
Bromobenzene (BB)	460	5.97 ± 0.76b	0.92 ± 0.17b
MeCH ext. + BB	50	5.67 ± 0.86b	0.86 ± 0.15b
	100	5.86 ± 0.80b	0.94 ± 0.13b
	200	5.90 ± 0.67b	0.93 ± 0.17b

Rats were orally administered various concentration of methanol extract daily for one week and then bromobenzene(BB) was intraperitoneally injected twice with 12 hrs interval for two days. Rats were described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five animals. Values followed by the same letter are not significantly different from control ($p<0.05$)

Table 7. Effect of methanol extract of *Angelica keiskei* on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	Activity*	Percentage
Control	0	258.7 ± 9.40a	
Bromobenzene (BB)	460	279.6 ± 10.40a,b	100
MeCH ext. + BB	50	286.4 ± 14.20a,b	102
	100	288.1 ± 22.12b	103
	200	300.1 ± 20.29b	107

Rats were orally administered various concentration of methanol extract daily for one week and then bromobenzene(BB) was intraperitoneally injected twice with 12 hrs interval for two days. Rats were described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five animals. Values followed by the same letter are not significantly different from control ($p<0.05$)

Table 8. Effect of methanol extract of *Angelica keiskei* on the hepatic epoxide hydrolase activity in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	Activity*	Percentage
Control	0	13.2 ± 1.27a	
Brombenzene (BE)	460	4.89 ± 0.89b	100
MeCH ext. + BB	50	6.27 ± 0.13b,c	128
	100	7.26 ± 0.13c	140
	200	6.54 ± 0.79c	113

Rats were orally administered various concentration of methanol extract daily for one week and then bromobenzene(BB) was intraperitoneally injected twice with 12 hrs interval for two days. Rats were described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five animals. Values followed by the same letter are not significantly different from control ($p<0.05$)

Table 9. Effect of cynaroside from *Angelica keiskei* on the hepatic lipid peroxide content in bromobenzene-treated rats.

Treatment	Dose(mg/kg)	lipid peroxide Content*	Percentage
Control	0	18.5 ± 1.31a[1),2)]	
Bromobenzene(BE)	460	35.3 ± 1.48b	100
cynaroside + BB	5	32.5 ± 2.42b	92
cynaroside + BB	10	23.6 ± 1.74c	67

Rats were intraperitoneally injected cynaroside daily for one consecutive week. Then bromobenzene (460 mg/kg) was *i.p.* injected four times at 12h interval for final two days. Rats were decapitated 12h after the injection of bromobenzene treatment.
The assay procedure was described in the experimental methods.
1) Values represent mean ± S.D.(n=5)
2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.
*; lipid peroxide content: malondialdehyde(MDA) n mole / g tissue

Table 10. Effect of cynaroside from *Angelica keiskei* on the hepatic glutathione S-transferase(GST) activity in bromobenzene-treated rats.

Treatment	Dose(mg/kg)	GST*	Percentage
Control	0	264.8 ± 7.76a,b	
Bromobenzene(BB)	460	272.1 ± 9.36a	100
cynaroside + BB	5	275.6 ± 8.66a	101
cynaroside + BB	10	278.7 ± 10.6b	102

Rats were intraperitoneally injected cynaroside daily for one consecutive week. Then bromobenzene (460 mg/kg) was *i.p.* injected four times at 12h interval for final two days. Rats were decapitated 12h after the injection of bromobenzene treatment.
The assay procedure was described in the experimental methods.
1) Values represent mean ± S.D.(n=6)
2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.
*; 1,2-dinitro-4-nitrobenzene n mome / mg protein / min

Table 11. Effect of cynaroside from *Angelica keiskei* on the hepatic epoxide hydrolase activities in bromobenzene-treated rats.

Treatment	Dose(mg/kg)	Epoxide hydrolase*	Percentage
Control	0	10.2 ± 1.30a[1),2)]	
Bromobenzene(BB)	460	4.6 ± 0.54b	100
cynaroside + BB	5	5.3 ± 0.66b	115
cynaroside + BB	10	8.3 ± 0.94c	180

Rats were intraperitoneally injected cynaroside daily for one consecutive week. Then bromobenzene (460 mg/kg) was *i.p.* injected four times at 12h interval for final two days. Rats were decapitated 12h after the injection of bromobenzene treatment.
The assay procedure was described in the experimental methods.
1) Values represent mean ± S.D.(n=5)
2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.
*; TSO n mole / mg protein / min

3. 서양고추냉이의 지질과산화억제작용 및 활성화합물

가. 화합물 2, 3 및 4의 화학구조 결정

서양고추냉이 잎을 hexane으로 탈지한후 MeCH 추출물을 계통분획하여 얻은 EtCAc 가용분획을 silica gel column chromatography를 행하여 3종의 kaempferol 배당체를 분리하였다.

화합물 2는 $FeCl_3$, Mg/HCl 반응에서 양성을 나타내며 IR spectrum에서는 3374 cm^{-1}에서 hyroxyl기, 1567 cm^{-1}에서 α, β-unsaturated ketone 그리고 1607, 1605, 1506 cm^{-1}에서 관측된 aromatic doulbe bond에 기인한 흡수대는 flavonoid의 일반적인 성상과 일치한다. Molisch test 반응에서 양성과 함께 IR spectrum의 1056 cm^{-1}에서 C-O 흡수 band 관측으로 이 화합물은 flavonoid 배당체로 추정되며, UV spectrum은 MeCH 용매에서 band Ⅰ의 355 nm로 flavonoid

C-3의 free hydroxyl기가 치환된 화합물임을 암시하였다.ε) Shift reagent에 의한 변화ξ)에서 MeOH에 NaOAc를 첨가하였을 때 band Ⅱ가 11 nm 장파장 이동하므로 C-7위치의 free hydroxyl기, NaOMe를 첨가하여 MeOH용매의 band Ⅰ과 비교하였을 때 52 nm 장파장 이동으로 C-4'위치의 free hydroxyl기, AlCl₃와 AlCl₃/HCl 비교에서 band Ⅰ이 변화를 보이지 않으므로 B-ring에 ortho dihydroxyl기가 존재하지 않음을 추정할 수 있다. ¹H-NMR spectrum에서 meta coupling하는 두 aromatic proton의 signal[δ 6.44 (1H, J=2.0 Hz), 6.21 (1H, d, J=2.0 Hz)]과 ortho coupling을 하고 있는 두 aromatic proton유래의 signal [δ 8.01 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.89 (2H, d, J=8.8 Hz)] 외에, anomeric proton signal이 δ 5.33 (1H, d, J=7.0 Hz)에서 관측되었다. ¹³C-NMR spectrum은 당부분을 제외한 chemical shift 값이 kaempferol과 비슷하며 당은 anomeric carbon을 제외한 4개의 carbon data는 D-methylxylofuranose의 문헌치[10]와 유사한 signal이 δ 73.8 (C-2"), 75.9 (C-3"), 69.6 (C-4"), 66.0 (C-5")에서 관측되었다. 이상의 data를 종합하여 볼때 화합물 2는 kaempferol-xyloside로 추정 가능하였다. 당부분와 aglycone의 결합위치는 UV에서 MeOH용매로 측정하였을 때 band Ⅰ이 355 nm로 관측되고 문헌치 kaempferol의 ¹³C-NMR chemical shift값과 비교하였을 경우 C-3이 고자장 shift하므로 C-3위치에 당이 결합하고 있음을 알 수 있다. 따라서 화합물 2는 kaempferol-3-O-β-D-xylofuranoside로 동정하였다. 이 화합물은 서양고추냉이 잎에서 처음 분리한 물질이다.

화합물 3의 정성반응과 IR, UV 및 ¹H-NMR spectral data는 화합물 2과 유사하다. ¹³C-NMR spectrum에서도 비당부의 signal이 화합물 2과 유사하며, 당부분은 D-galactopyranose 유래의 signal [δ 101.7 (C-1"), 71.2 (C-2"), 73.1 (C-3"), 67.9 (C-4"), 75.6 (C-5"), 60.2 (C-6")]이 관측된다. 당의 결합위치도 화합물 2와 비슷한 data를 볼수 있으므로 이 화합물의 화학구조는 kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside로 결정하였으며 서양고추냉이에서는 처음으로 분리되었다.

화합물 4의 정성반응과 분광학적 data도 화합물 2, 3과 매우 유사하여 kaempferol 배당체로

추정하였다. ^{1}H-NMR spectrum에서 anomeric proton peak가 δ 5.69 (1H, d, J=7.6 Hz), 4.57 (1H, d, J=7.3 Hz)에서 두 개가 관측되어 당은 2 mole이 결합하고 있음을 알 수 있다. ^{13}C-NMR spectrum에서 당의 종류는 galactose와 xylose임을 알수 있으며, 결합위치는 galactose의 C-2위치가 화합물 3과 비교하였을 때 8.8 ppm 고자장 이동하므로서 (Table 2) 이 위치에 xylose가 결합하고 있음을 알수 있다. 따라서 화합물 4의 화학구조는 kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside로 결정하였다.

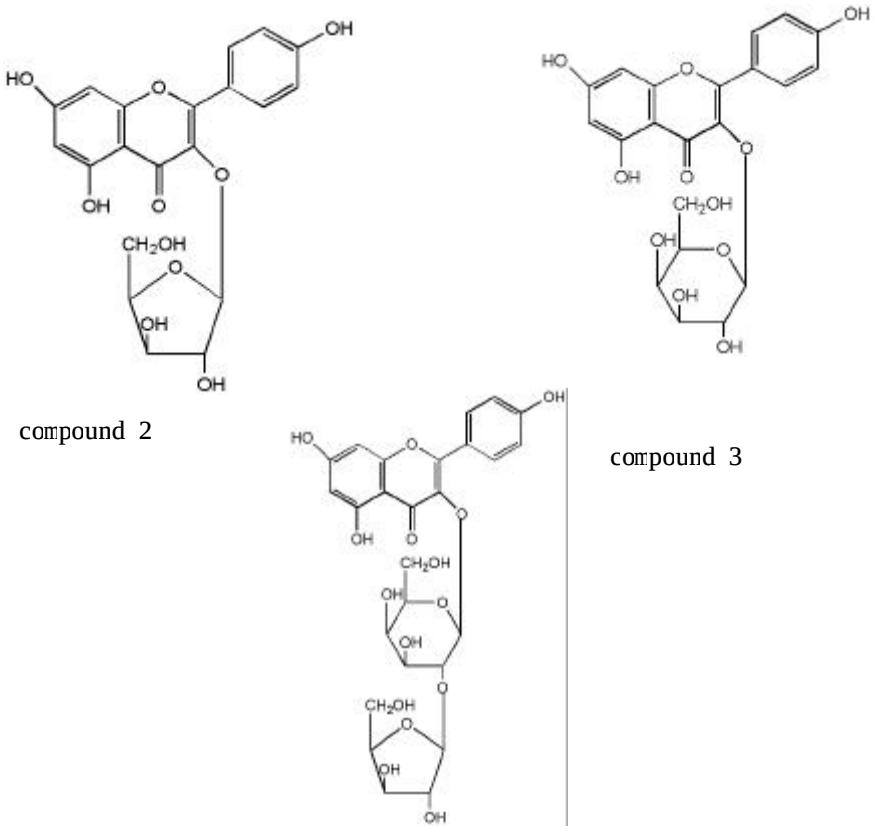


Fig 4. Flavonoids isolated from *Houttuynia cordata*
Compound 2: kaempferol-3-O-β-D-xylofuranoside
Compound 3: kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside
Compound4:kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosy (1→2)
-β-D-galactopyranoside

나. 서양고추냉이 추출물과 분리한 화합물 2, 3, 4의 *in vitro* 지질과산화억제작용

서양고추냉이 (*Armoracia rusticana*)는 유럽원산으로 십자화과에 속하는 다년초로 유럽에서는 horseradish라 하고, 우리 나라에서는 겨자무라고도 한다. 식용, 약용 및 향신료로 사용되는 서양고추냉이는 고추냉이(*Wasabia japonica*와 *Wasabia koreana*)와 비슷한 향신료 식물로 뿌리를 갈거나 깎아보면 톡 쏘는 자극성이 강한 향미가 있다. 이 향미는 sinigrin 배당체가 myrosinase에 의해 분해되어 겨자유 매운 맛을 내는 것으로 유태인들은 오래 전부터 유월절에 먹는 5가지 쓴 나물 중의 하나로 이용하였다. 식용으로 이용할 때는 열을 가하면 고추냉이 특유의 톡 쏘는 매운 맛의 향미가 사라지므로 생체로 갈아서 쓰거나 건조시켜 두고 이용하는데 유럽에서는 육류요리, 생선요리, 소시지 등의 소스를 만들 때 사용하였으며, 약용으로는 민간약 형태로 혈액순환 촉진, 식욕증진, 류마티스와 관절염의 치료 등에 쓰였으며, 방부제 및 살균제로도 이용하였다.

한편, 우리 나라와 일본에서 많이 이용되고 있는 고추냉이는 한국 (울릉도), 일본, 사할린 등 온대에서 난대지방에 걸쳐 분포하며, 생선회에 곁들인 향신료로 주로 이용하고 있고 우리 나라에서는 봄에 전초를 봄에 채취하여 김치를 담가먹기도 하였다. 한방에서는 전초(全草)를 산유채(山 菜), 봄에 잔뿌리 제거하여 말린 뿌리를 산규근(山葵根)이라 하여 식욕증진, 신경통, 류마티스, 생선중독 및 국수증독 등의 치료에 쓰였다. 그러나 서양고추냉이는 물이 흐르는 곳에 재배해야 하는 등 재배조건이 까다로운데 비하여 서양고추냉이는 밭에서 쉽게 재배할 수 있어서 값비싼 고추냉이의 대용으로 이용되고 있다.

식용, 약용 및 향신료로 쓰이고 있는 서양고추냉이 잎 MeOH 추출물과 분리한 flavonoid 배당체를 이용하여 bromobenzene에 의해 흰쥐 간에서 유발된 과산화지질의 생성억제효과를 시험관내에서 실험하였다. 서양고추냉이 잎 MeOH 추출물을 시험관내에서 1 ㎎/㎖와 10-1 ㎎/㎖ 농도에서 모두 64%의 과산화지질 생성을 억제하는 효과가 관찰되었다(Table 12). 이 식물에서 분리한 3종의 kaempferol 배당체의 과산화지질에 대한 억제활성은 10-2 ㎎/㎖농도로 시험관내

에 첨가하였을 때는 거의 억제작용이 없었으나, 10-1 ㎎/㎖ 농도에서는 kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside와 kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside는 각각 16%와 39%의 억제효과가 나타났다.

과산화지질이 생체에 중대한 영향을 미치므로 이에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. 즉 과산화지질은 생체의 외적, 내적 요인에 의하여 생성된 oxygen radical이 세포의 성분이나 기질, 특히 세포막에 다량 존재하는 불포화지방산에 작용하여 세포막의 손상이나 세포괴사 등의 독성을 유발한다. 생체는 정상적인 대사과정 중에서도 free radical이 생성되고 과산화지질이 생성되지만, 이러한 free radical을 제거하는 제거계가 있어 생체를 조직의 과산화로부터 보호한다. 그러나 어떤 원인에 의해 조직의 free radical 제거계의 활성이 저하되거나 free radical 생성계의 촉진으로 이들 간의 균형이 깨어졌을 때 조직손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등과 같은 여러 가지 독작용이 유발된다. 여러질병들의 원인이 될 수 있는 과산화지질의 생성억제 실험에서 서양고추냉이의 활성이 관찰되었다.

Table 12. Effect of methanol extract and compounds isolated from *Armoracia rusticana* on the hepatic lipid peroxidation in bromobenzene-treated rats *in vitro*

Group	Conc. (mg/ml)	content (MDA n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Control	0	58.4 ± 7.68^{a}	
methanol extract	1	20.8 ± 1.84^{b}	64
	10^{-1}	21.2 ± 3.31^{b}	64
kaempferol-3-O-β-D-xylofuranoside	10^{-1}	57.7 ± 1.07^{a}	2
	10^{-2}	58.2 ± 0.94^{a}	0
kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside	10^{-1}	49.1 ± 0.95^{c}	16
	10^{-2}	57.2 ± 0.97^{a}	2
kaempferol-3-O-β-D-xylofuranosyl(1→2) galactopyranoside	10^{-1}	35.4 ± 1.09^{d}	39
	10^{-2}	57.5 ± 1.17^{a}	2

The values are mean±S.D. of three replications.
Means sharing the same superscript letter are not significantly different from control ($p < 0.05$).

4. 어성초의 지질과산화억제작용 및 활성화합물

가. 화합물 5, 6 및 7의 화학구조결정

해열, 소염, 소종 등의 효능이 알려져 있는 어성초의 MeOH 추출물에서 분획한 EtOAc분획물을 silica gel column chromatography를 실시하여 3종의 화합물을 순수히 분리하였다. 화

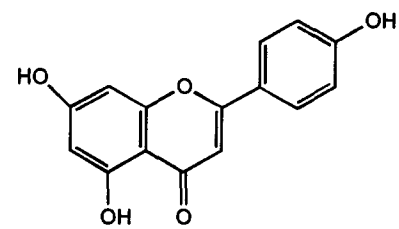
합물 5는 황색의 부정형 결정으로 정성반응 ($FeCl_3$, Mg/HCl)과 IR spectrum에서 3374 cm^{-1} (OH), 1657 cm^{-1} (α, β-unsaturated ketone), 1605, 1607, 1506, 1456 cm^{-1} (aromatic C=C)의 흡수대는 flavonoid 화합물임을 알 수 있었으며, MeOH 용매로 측정한 UV spectra에서 band I이 335 nm에서 나타나 C-3에 free hydorxyl기가 존재가 존재하지 않음을 알 수 있다. Shift reagent에 의한 변화에서 MeOH에 NaOAc 첨가로 C-7위치에 free hydroxyl기, NaOMe에서 C-4′ 위치에 free hydroxyl기, $AlCl_3$와 $AlCl_3$에 HCl을 첨가로 C-5 hydroxyl기 존재를 추정할 수 있었으며, $AlCl_3$용매와 $AlCl_3$에 HCl 첨가에서 band I이 변화가 없고, NaOAc와 H_3BO_3 첨가하여 측정하였을 때 band I이 MeOH 측정값과 차이가 없으므로 B-ring에 ortho dihydroxyl기가 존재하지 않는 flavone 화합물로 추정하였다. ^{1}H-NMR spectrum의 δ 7.92 (2H, J=8.7 Hz, H-2′ & H-6′)와 6.92 (2H, d, J=8.7 Hz, H-3′ & H-5′) peak는 B-ring의 proton이 자기등가로 ortho coupling 과 δ 6.77 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, J=1.9 Hz, H-8)과 6.18 (1H, d, J=1.9 Hz, H-6)에서 A-ring의 meta coupling 하고 δ 6.77에서 H-3의 proton singnal이 관측되었다. ^{13}C-NMR spectrum data에서 C-3이 δ 102.6이고 당에 기인한 signal이 없었다. 화합물 5는 IR, UV 및 ^{1}H와 ^{13}C-NMR spectral data의 종합으로 flavone화합물인 apigenin으로 결정하였다.

화합물 6과 7은 정성반응, IR의 1100-1000 cm^{-1} 에서의 흡수대 및 UV의 MeOH에서의 band I 측정값이 각각 344 및 355 nm에서 나타나 flavonol 배당체로 추정하였다.

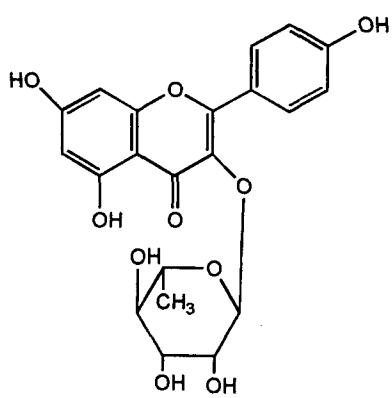
화합물 6는 MeOH 용매를 사용한 UV spectrum에서 band I이 화합물 5의 값보다 단파장 이동하여 C-3이 치환되었음을 알 수 있었고 shift reagent에서는 화합물 5와 매우 비슷하였다. ^{1}H-NMR spectrum에서 aromatic B-ring에 기인한 ortho coupling이 δ 7.74 (2H, d, J=8.6Hz, H-2′ & 6′)에서 관측되고 A-ring의 meta coupling 하는 methine proton이 δ6.91 (2H, d, J=8.6Hz, H-3′ & 5′)와 6.42 (1H, d, J=1.9Hz, H-8)에서 보이며 1 mole의 당에 기인한 annomeric proton signal이 δ 5.29 (1H, s)와 rhamnose methyl기로 추정되는 signal이 δ 0.78 (3H, d, J=5.3, -CH_3)에서 관측되었다. ^{13}C-NMR spectral data는 당부를 제외한 signal

이 kaempferol과 매우 유사하였으며 당은 L-rhamnose signal이 δ101.8 (C-1), 70.1 (C-2), 70.4 (C-3), 70.6 (C-4), 71.1 (C-5) 및 17.5 (C-6)에서 관측되었다. 이상의 분광학적 분석으로 화합물 6은 kaempferol rhamnoside로 추정하였다. 당부와 aglycone의 결합위치는 shift reagent에 의한 UV 분석결과와 함께 ^{13}C-NMR에서 C-3의 값이 kaempferol보다 저자장이동하여 당이 C-3위치에 결합하고 있음을 알 수 있다. 따라서 화합물 6은 kaempferol-3-O-α-L-rhamnpyranoside인 afzelin로 화학구조를 결정하였다.

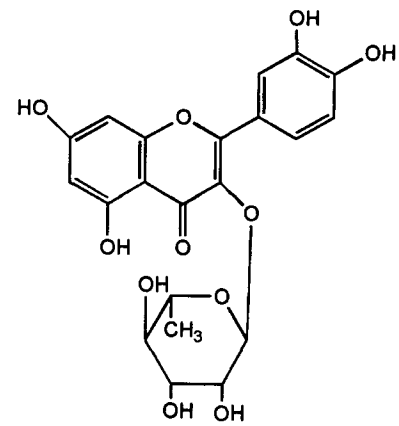
화합물 7은 화합물 6과 마찬가지로 UV spectrum에서 MeOH 용매와 $AlCl_3$/HCl와 NaOAc/H_3BO_3의 shift reagent 측정값과의 비교로 B-ring에 ortho dihyroxyl기가 존재함을 추정할 수 있다. ^{1}H-NMR spectrum은 δ 7.30 (1H, d, J=1.9Hz), 7.24 (1H, dd, J=1.9 & 8.4Hz), 6.66 (1H, d, J=8.4Hz)에서 관측된 signal이 ortho와 meta coupling하여 aglycone이 quercetin임을 알 수 있으며 1 mole의 당에 기인한 signal은 화합물 6의 당부와 일치하여 화합물 7은 quercetin rhamnoside임을 알 수 있다. ^{13}C-NMR spectral data는 agycone은 quercetin의 문헌치와 일치하며, 당과 algycone의 결합위치는 화합물 7과 마찬가지로 UV의 shift reagent에 의한 측정과 ^{13}C-NMR spectral data에서 flavonol의 C-3 위치에 결합함을 알수 있다. 그러므로 화합물 7의 화학구조는 quercetin-3-O-α-L-rhamnpyranoside (quercitrin)로 동정하였다.



compound 5



compound 6



compound 7

Fig 7. Chemical structures isolated from *Armoracia rusticana*

Compound 5: apigenin

Compound 6: kaempferol-3-0-α-L-rhamnpyranoside (afzelin)

Compound 7: quercetin-3-0-α-L-rhamnpyranoside (quercitrin)

나. 어성초 추출물과 분리한 화합물 7의 지질과산화억제작용

어성초는 약모밀 (*Houttuynia cordata* Thunb.)의 전초로서 중약, 십약등으로 불리우며, 삼백초과에 속하며 해열, 소염, 소종 등의 효능이 알려져 있다.

다년생 초본인 이 식물은 높이 15~50cm쯤 자라며 줄기의 하부는 땅위를 기어가듯이 옆으로 뻗고 마디에서 뿌리가 나오며 근경은 백색이다. 잎은 호생하고 길이 3~8cm, 나비 4~6cm로 끝이 뾰족하고 밑부분은 심장형이고 가장자리는 밋밋하며 선점이 있다. 하면은 보통 자색이고 양면의 엽맥에는 섬모가 나 있다. 穗狀花序는 줄기의 위끝에서 나와서 잎과 대생하고 길이는 약 2cm이며 백색이다. 꽃은 작고 꽃잎은 없고 3개의 수술은 화서가 길고 蒴果는 다소 구형이고 화주 사이에서 갈라져 연한 갈색의 종자가 나온다. 꽃은 엷은 황색이고 개화기는 5~6월, 결실기는 10월이다. 길가나 나무 밑에 나며 제주도 및 울릉도에 분포한다.

간독소의 일종으로 생체에 폭로되었을 때 간세포의 mixed function oxidation system에 의하여 간독성을 야기시키는 브로모벤젠을 처리한 흰쥐의 간장을 이용하여 관찰하였다. 즉 어성초 MeOH 추출물 250 mg/kg을 경구투여하였을 때 브로모벤젠 단독투여군에 비해 21%, 500 mg/kg을 투여하였을 경우에는 24%의 지질과산화생성억제효과를 나타내었다(Table 13).

정상쥐에서 어성초에서 분리한 화합물중 quercitrin을 10^{-4}, 10^{-2}mg/ml 농도로 시험관내에 첨가하였을 때 각각 12% 및 16%의 지질과산화억제활성이 관찰되었다(Table 14).

Table 13. Effect of the methanolic extract of *Houttuynia cordata* on the hepatic lipid peroxidation in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	Content	Inhibition (%)
Control	0	22.4 ± 2.25	
Bromobenzene(BB)	460	60.5 ± 4.00	0
MeOH ext. + BB	250	47.7 ± 4.59	21
	500	46.0 ± 4.70	24

Rats were orally administered various concentration of methanol extract daily for one week and then bromobenzene(BB) was intraperitoneally injected twice with 12 hrs interval for two days. Rats were described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five animals.

Table 14. Effect of compound isolated from *Houttuynia cordata* on the hepatic lipid peroxidation in normal rats *in vitro*

Table 14. Effect of the compound isolated from *Houttuynia cordata* on the hepatic lipid peroxidation in normal rats *in vitro*

Group	Conc. (mg/ml)	content (MDA n mole/g of tissue)	Inhibition (%)
Control	-	17.5±0.98	
Quecitrin	10^{-4}	15.41±0.60	12
	10^{-2}	14.8±00.51	16

The values are mean±S.D. of three replications.

5. 엉겅퀴의 지질과산화억제작용 및 활성화합물

가. 화합물 8의 화학구조결정

화합물 8은 $FeCl_3$, Mg/HCl test에서 양성을 보이고, IR spectrum의 3380 cm^{-1}에서 hydroxyl 흡수대와 1659 cm^{-1}에서 ketone 흡수대 그리고 1606, 1569 cm^{-1}에서 aromatic double bond의 흡수대를 나타내므로써 aromatic ring에 hyroxyl기와 ketone기가 있는 flavonoid의 일반적 성상과 일치하며, Molisch test에서 양성반응과 IR spectrom의 1073 cm^{-1}의 흡수대는 이 화합물이 flavonoid 배당체임을 예측할 수 있게 하였다. 또한 UV spectrum의 MeOH 용매에서 B-ring에 기인한 band Ⅰ이 333 nm로 flavonoid 골격의 C-3이 치환되지 않은 flavone 또는 C-3의 hydroxyl이 치환된 화합물임을 추정할 수 있었다. Shift reagent에 의한 흡수대의 변화를 보면 NaOMe 첨가시 band Ⅰ이 MeOH 용매에서와 비교하였을 때 60 nm 장파장 이동하므로써 C-4위치에 free hydroxyl 존재를 관측할 수 있었다. 또한 $AlCl_3$ 첨가 후 산을 가하였을 때 $AlCl_3$ 용매에서와 비교에서 Band Ⅰ이 30~40 nm 단파장 이동하지 않으므로 B-ring에 ortho dihydroxyl기가 없음이 확실하고, MeOH의 흡수대와 비교하였을 때 20 nm 장파장 이동하므로 C-5의 hydroxyl기와 C-6에 methoxyl기를 예측하였다. NaOAc 첨가시 MeOH와의 비교에서 A-ring에 기인한 band가 변화를 보이지 않으므로 C-7위치의 hydroxyl기가 치환되었을 것으로 추정하였다.

^{13}C-NMR spectrum에서, 80 ppm 이하의 고자장 영역을 살펴볼 때 당은 2 mole이 존재함을, 그리고 18.2 ppm 피크가 관측되어 하나의 당은 rhamnose임을 알 수 있었다. A ring의 data (C-5, 6, 7, 8, 9, 10) 및 C-2, 3, 및 4의 signal은 pectolinanrin의 spectrum과 매우 유사하므로, 이화합물은 C-7 위치에 당이 결합하며, C-6 위치에 methoxyl기가 결합하고 있는 flavone 배당체로 추정하였다. 또한 B-ring (C-1′, 2′, 3′, 4′, 5′, 6′)의 부분은 apigenin-7-O-glucoside의 data와 거의 일치함으로서 화합물 1은 B-ring의 C-4′ 위치에 hydroxyl기가 결합하고 있음을 나타내고 있다. 따라서 화합물 1은 aglycone이 hispidulin로서

이의 C-7위치에 2 mole의 당이 결합하고 있는 화합물로 추정할 수 있다. 이와 같은 사실은 ^{1}H-NMR spectrum에서 확실히 알 수 있다. 즉 δ 7.93 및 δ 6.93의 coupling constant 8.75 Hz의 피크에서 B-ring의 H-2', 6'와 H-3',5'가 meta coupling하므로써 C-4' 위치에 hydroxyl기가 존재하는 사실을 알 수 있다. 그리고 δ 7.02 및 6.83의 singlet들도 H-8, H-3으로 assignment 되므로써 위와 같은 사실을 뒷받침하고 있다. 당부분은 ^{1}H-NMR spectrum에서 2 개의 anomeric proton (δ 5.33, δ 4.65) 관측으로 2 mole의 당이 존재함을 확인 할 수 있으며, 당의 종류는 ^{13}C-NMR spectrum을 살펴볼 때 glucose와 rhamnose의 피크와 유사하고, 또한 이미 잘 알려져 있는 rhamnose의 문헌치와 비교하여 볼 때 glucose의 C-2와 C-6 위치만 서로 차이가 나고 있음을 알 수 있다. δ 5.33의 β-form임을 나타냄으로써 당은 β-D-glucose의 C-2 위치에 rhamnose가 결합하고 있는 neohesperidose로 확정하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 화합물 1의 구조는 hispidulin 7-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-glucopyranoside로 결정하였다.

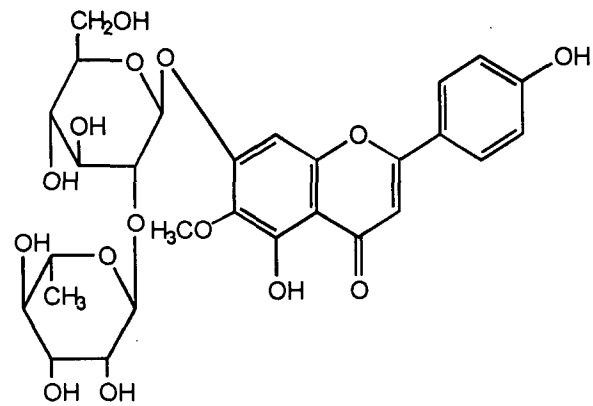


Fig 8. Hispidulin 7-O-neohesperidoside isolated from *Cirsium japonicum var. usssuriense.* compound 8: hispidulin 7-O-neohesperidoside

나. 엉겅퀴에서 분리한 화합물 8의 지질과산화억제작용 및 약리기전

엉겅퀴에서 분리한 성분인 화합물 8 (hispidulin 7-O-neohesperidoside)의 bromobenzene에 의하여 유도된 간독성의 경감기전을 추구할 목적으로 산화지질의 생성 및 epoxide의 해독계 효소에 어떠한 영향을 주는가를 검토하였다. 화합물 8의 10mg/kg을 구강으로 1주간 투여하고 bromobenzene(460mg/kg, i.p.)을 주사하였을때 간장중 과산화지질의 함량은 bromobenzene 단독 투여군에서 대조군보다 감소하였다. 이 성분의 지질과산화 억제작용의 약리기전을 규명하기 위한 효소활성 실험에서 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, glutathione S-transferase활성에서는 변화가 없었으나 epoxide hydrolase활성은 현저히 억제되던 것이 회복되었다.

브로모벤젠은 간장독성유발 물질로서 epoxide를 생성시켜 독성을 유발하고 있다. 즉 bromobenzene은 mixed function oxidation system에 의하여 독성이 강한

bromobenzene-3,4-oxide로 전환되며 이 epoxide를 대사시켜 독성이 없는 bromobenzene-3,4-dihyrodiol로 대사시키는 효소가 epoxide hydrolase이며 또 다른 계로는 glutathione S-transferase에 의하여 bromobenzene glutathione으로 배설된다. 엉겅퀴에서 분리한 플라보노이드 성분인 hispidulin 7-O-neohesperidoside 화합물의 지질과산화 억제작용의 약리기전을 규명하고자 실험한 효소활성연구에서, bromobenzene의 투여에 의한 과산화지질의 함량감소 현상은 epoxide hydrolase 의 농도 회복으로 bromobenzene에 의해 유도되는 epoxide를 해독하는 약리기전이 있는 것으로 사료된다.

Table 15. Effects of hispidulin 7-O-neohesperidoside (8) on the hepatic lipid peroxide (LPO), aminopyrine N-demethylase(AD), aniline hydroxylase (AH), cytosolic glutathione S-transferase (GST) and epoxide hydrolase (EH) activities in bromobenzene-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	LPO[a]	AD[b]	AH[c]	GST[d]	EH[e]
Control	0	21.3 ± 3.22	4.80 ± 0.63	0.47 ± 0.09	270.3 ± 10.2	11.6 ± 2.07
Bromo-benzene (BB)	460 (i.p.)	41.3 ± 4.72**	6.10 ± 0.89	0.98 ± 0.13**	283.4 ± 12.4	5.21 ± 0.79**
Compound 8 + BB	10 (p.o.)	35.7 ± 6.23*	7.00 ± 0.62**	1.06 ± 0.23**	290.6 ± 20.3	7.43 ± 0.97*

The values are mean ± S.D. in five rats.
Significantly different from the control value: *$p<0.05$, **$p<0.01$.
[a]unit: malondialdehyde nmole/g of tissue
[b]unit: p-aminophenol nmole/mg protein/min
[c]unit: HCHO-nmole/mg protein/min
[d]unit: conjugated 1,2-dichloro-4-nitrobenzene
[e]unit: TSO nmole/mg protein/min.

제4장 결론 및 건의사항

1. 미활용 농산자원으로부터 항산화 물질의 탐구 및 이용

미활용 농산자원인 잎, 과피, 종자류, 가공부산물의 항산화 활성을 수용성 및 지용성 모델계, lipoxygenase 저해 활성을 검색하였다. 이 중 잎류에서는 뽕잎, 매실잎, 밤잎 등의 항산화 활성이 강하였고 과피류에서는 밤피, 양파피, 고구마피 등이 강한 활성을 보였다. 종자류에서는 모란을 비롯한 토사자, 비자, 사철나무 종자 등의 전자공여능과 lipoxygenase 저해 활성이 강하였다.

수용성 및 지용성 모델계의 항산화 검정법으로 뽕잎의 메탄올 조추출물 및 용매 분획별 항산화성을 검정한 결과 ethyl acetate 획분에서 가장 강한 항산화성을 보였으며 이로부터 chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin-3-o-β-D-glucoside, kaempferol-3-o-β-D-glucoside를 분리, 동정하였다. 쥐간의 microsome 지질 생성 억제작용은 quercetin에서 가장 높았으며 tyrosinase 저해활성은 chlorogenic acid에서 가장 높게 나타났다. 뽕잎의 메탄올 및 열수추출물과 분리한 항산화 성분들은 Ames test 및 SOS chromotest에서 변이원성이 없는 것으로 판정되었으며 간접변이원에 대하여 높은 항돌연변원성을 나타내었다. 뽕잎의 용매 분획별 항산화능을 동물성 유지 및 식물성 유지를 대상으로 적용성을 검토한 결과 ethyl acetate 획분은 α-tocopherol보다 우수한 항산화성을 나타내어 α-tocopherol 대체 천연 항산화제로서 이용성이 큰 것으로 나타났다.

밤의 은기, 축파 품종의 외피와 내피의 메탄올 주출물의 항산화성을 2-deoxyribose oxidation법과 지용성 모델계인 ferric thiocyanate법으로 검정한 결과, 외피와 내피 모두 우수한 항산화성을 나타내었다. 은기 품종의 메탄올추출물을 순차용매 분획하여 항산화성을 검정한 결과 ethyl acetate 획분에서 가장 높은 항산화성을 나타내었다. 따라서 Sepadex LH 20 column chromatography, HPLC를 통하여 항산화 활성이 뛰어난 화합물을 분리하고, 이들의 구

조를 ^{1}H, ^{13}C-NMR 등 기기분석을 통하여 gallic acid와 ellagic acid로 동정하였다. 이들 화합물을 쥐간 microsome 지질과산화물 생성억제를 시험한 결과 gallic acid는 57.06%, ellagic acid에서 53.11%의 지질과산화물 생성억제를 나타내었다. Bromobezene을 투여한 Sprague-Dawley 웅성 흰쥐의 식이에 밤피분말과 밤피 ethyl acetate 분획물을 첨가하였을 때 분말 첨가 식이에서 glutathion 관련 효소계에서 높은 효과가 있었고 cytochrome p-450 관련 효소들에게는 ethyl acetate 분획물 첨가 식이의 효과가 컸다. 그리고 이들 식이에 의해 cholesterol과 중성지질의 함량이 낮아지고 간조직 검경 결과 조직손상에 대한 회복이 있었다. Ames test 및 SOS chromotest에서 밤피의 용매 추출물의 변이원성은 없는 것으로 판정되었고, 항돌연변이원성시험에서 높은 돌연변이원성을 나타내었다. 돈지와 대두유를 사용하여 유지에 대한 oven test와 rancimat으로 항산화성을 측정하였을 때, gallic acid와 ellagic acid에서 α-tocopherol보다 우수한 항산화능을 보였다. 또한 건조 및 추출 조건을 달리하여 항산화성을 비교하였을 때 80℃에서 건조하여 볶음 처리한 후 acetone으로 추출하였을 때 가장 강한 항산화성을 나타내었다. 밤내피는 높은 항산화성을 가지고 있으며 또한 최근 다양한 생리적 기능성을 가진 폴리페놀화합물의 존재가 본 실험을 통하여 확인되어 유용자원으로서 이용성이 높다. 향후 밤 가공공장에서 가공 후 다량 폐기되고 있는 밤의 외피 및 내피의 효율적인 건조 등의 전처리 방법과 이들 항산화 기능성 성분의 대량 분리 및 산업화 공정에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

작약씨의 메탄올 추출물은 돈지와 대두유에 대하여 α-tocopherol보다 더 높은 항산화성을 나타내었다. 작약씨로부터 항산화 물질을 분리하기위하여 순차용매 분획후 silica gel, Sepadex LH 20 column chromatography 및 preparative HPLC를 수행하였다. 정제된 화합물은 UV, IR 및 ^{1}H, ^{13}C-NMR로 구조 분석하여 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone(luteolin), 5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone, trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol), 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone으로 동정하였다. Linoleic acid와 쥐간 microsme을 사

용하여 항산화 활성을 조사한 결과, 5,7,,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone, trans-3,5,4-trihydroxystilbene(resveratrol), 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone은 α-tocoherol보다 우수한 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해활성은 거의 없거나 낮았고, 작약씨 메탄올 추출물에서는 변이원성이 없었으며, 간접변이원인 2-AF에서는 80% 이상의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 특히 작약씨에서 분리된 resveratrol은 포도주에 함유되어 항암, 항염증, 면역증강 효과 등 다양한 생리활성을 나타내어 최근 주목받고 있는 기능성 성분이다. 따라서 본 연구 결과 resveratrol을 다량 함유하고 있는 것으로 밝혀진 작약씨는 천연항산화제 뿐만아니라 치료제재로서도 이용성이 기대된다. 향후 작약 씨 중의 resveratrol의 대량 분리 공정, 항암, 항염증 등 다양한 약리적 기능성 검증을 통한 기능성 식품과 신약 개발의 응용 연구 및 산업화 연구가 수반되어야할 필요성이 있다.

환삼덩굴의 용매분획별 항산화 작용은 ethyl acetate 및 butanol 분획에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 높은 ethyl acetate로부터 Amberlite XAD-2 column chromatography 및 peperative HPLC를 사용하여 이중 vitexin, luteolin-7-O-β-D-glucoside, apigenin-7-O-β-D-glucoside를 분리 및 동정하였다. linoleic accid model계에서의 항산화 활성을 측정한 결과 luteolin-7-O-β-D-glucoside 및 apigenin-7-O-β-D-glucoside는 90% 이상의 지질과산화물 생성 억제를 보여 α-tocopherol보다 우수한 활성을 나타내었다. Ames test 및 SOS chromotest 결과 환삼덩굴의 메탄올 추출물과 용매분획은 변이원성을 나타내지 않았으며, 직접변이원인 NPD와 NQO에 대하여는 돌연변이 억제활성이 강하지 않은 것으로 나타났는데 비하여 2-AF를 사용한 간접변이원에서는 물 분획을 제외하고는 모든 분획에서 80 ~ 90%의 높은 항돌연변이 활성을 보였다. 환삼덩굴은 국내에서 자생하는 풍부한 식물자원으로서 본 연구 결과 항산화성이 높은 luteolin을 다량 함유하고 있어 안전성 및 독성 검사를 통하여 향후 유용 천연자원으로서 이용성이 기대된다.

2. 약용 및 식용식물 자원으로부터 항산화 물질 탐구

151종의 약용 및 식용식물 자원을 bromobenzene으로 간 독성을 유도한 흰쥐에서 지질과산화 생성의 억제 작용을 검색하였다. 이 중 신선초, 서양고추냉이, 어성초와 엉겅퀴 등이 지질과산화 생성 억제 작용이 강하였다. 이들 항산화 성분을 silica gel chromatography로 분리 정제하고 UV, MS, NMR로 화학적 구조를 결정하였다.

Bromobenzene을 모델약물로 한 동물을 대상으로 신선초에서 과산화지질의 생성 및 epoxide 해독계 효소에 미치는 영향을 조사하여 흰쥐의 간독성 해독작용에 항산화 성분인 cynaroside가 관여함을 밝혔다. 서양고추냉이 잎에서 분리한 kaempferol-3-o-β-D-galacto pyronoside와 kaempferol-3-o-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside 의 흰쥐 간에서 유발된 지질과산화 생성억제 효과를 조사하였다. 어성초에서 분리한 quercetrin을 흰쥐에 대한 지질과산화 억제활성을 조사하었다. 엉겅퀴에서 분리한 hispidulin 7-o- neohesperidoside의 간독성의 경감 기전을 밝히기 위하여 산화 지질의 생성 및 epoxide 해독계 효소에 주는 영향을 검토하였다.

본 연구에서 in vitro 및 in vivo에서 지질과산화 억제작용이 강하게 발현된 신선초, 서양고추냉이, 어성초와 엉겅퀴는 향후 간장보호 약제나 기능성 식품으로서 개발 가능성이 높다. 따라서 이들 식물의 유용 항산화성분을 대량추출 및 분리하는 공정과 약제 및 식품개발에 따른 응용 연구가 산업화에 필요하다. 향후 이들 성분의 대량 분리, 농축, 제품개발에 대한 연구 지원이 요망된다.

제5장 참고문헌

1. 농림수산부 : 농림수산 통계연보, p.88(1988)
2. 신현경 : 기능성 식품의 개발현황. 식품기술, 7(3), 3(1994)
3. Park, S. N., Choi, S. W., Boo, Y. C., Kim, C. K. and Lee, T. Y .: Effect of flavonoids of Gingseng leaves on erythrocyte membrane against singlet oxygen caused damage. *Korean J. Ginseng Sci.* 14(2), 191(1990)
4. Park, S. N., Choi, S. W. and Boo, Y. C.: Antioxidative properties of Ginseng leaf flavonoids on cellular membranes. *J. Society Cosmetic Chemists of Korea*, 16,220(1990)
5. Choi, S. W., Osawa, T., Kawakishi, S. and Tashiro, T.: Antioxidative activity of anthocyanin pigments in black rice seeds. Special Presentation, *Korean J. Food Sci. and Technol.*, May 28-29,1994, Pusan, Korea
6. Tsuda, T., Watanabe, M., Odhima, K., Novinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T.: Antioxidative activity of the anthocyanin pigments, cyanidin 3-o-β-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem*, 42, 2407(1994)
7. Choi, S. W., Kang, W. W., Kawakishi, S. and Osawa, T.: Antioxidative activity of crysanthemin in black rice hulls. *Foods and Biotechnology*, 3(4), 233(1994)
8. Choi, S. W., Kang, W. W., Kim, G. Y., Park, P. S. and Park, M. R.: Antioxidative properties of persimmon leaves. *Foods and Biotechnology*, 5(1), 48(1996)
9. Choi, S. W., Kang, W. W., Cheong, S. K. and Cheon, S. H.: Antioxidative activity of persimmon leaves. *Foods and Biotechnology*, accepted(1996)
10. Hashimoto, A., Katagiri, M., Toril, S., Dainaka, J., Ichigawa, A. and Okuyama, H.: Effect of the dietary α-linolenate/linoleate balance on the leutotriene production and histamin release in rats. *Prostaglandins*, 36, 3(1988)
11. Ciscina, D.V., Yehuda, S., Dixan, L.M., Kish, S.J. and Leprohon-Green Wood, C.E.: Learning is improved by a soybean oil diet in rats. *Life Sci.*, 38, 1789(1986)
12. Neuringer, M., Cannor, W.E., Petten, C.V. and Bastard, L.: Dietary omega-3 fatty

acid deficiency and visual loss in infant Rhesus Monkeys. *J. Clin. Invest.*, 73, 272(1984)

13. Shimokawa, T., Moriuchi, A., Hori, T., Saito, M., Naitom Y., Kabasawa, H., Nagae, Y. and Matsubara, M.: Effect of dierary α-linolenate/linoleate balance on mean survival time, incidence of stroke and blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 43, 2067(1988)
14. Bang, H.O., Dyerberg, J. and Sinclair, H.M.: The composition of the Eskimos food in NorthWestern Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 2657(1980)
15. Dyerberg, J.: Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, 44, 125(1986)
16. Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstard, L. and Luck, S.: Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal ω_3-fatty acid deficiency of retina and brain in Rhexas Minkeys. *Proc. Natl. Aead. Sci.*, 83, 4201(1986)
17. Pratt, D.E. and Birac, P.M.: Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, 44(6), 1720(1979)
18. Pratt, D.E., Pietro, C.D., Porter, W.L. and Giffee, J.W.: Phenolic antioxidants of soy protein hydrolyzates. *J. Food Sci.*, 47(1), 24(1981)
19. Hammer Schmidt, P.A. and Pratt, D.E.: Phelolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, 43(2), 556(1978)
20. Okada, T. and Yamaguch, N.: Antioxidative effect and pharmacology of oryzanol. *J. Jpn. Oil Soc.*, 33(6), 305(1983)
21. Fenton, T.W., Leung, J. and Clandinin, D.R.: Phenolic components of rapeseed neal. *J. Food Sci.*, 45(6), 1702(1980)
22. Vliegenthart, J.F.G. and Veldink, G.A.: Lipoxygenase: In Free Radicals in Biology. Pryor, W.A.(ed.), Vol.5, pp 29-64, Academic Press, New York(1982)
23. Mack, A.J., Peterman, T.K. and Siedow, I.N.: Lipoxygenase isozymes in higher plants: Biological Properties and physiological role. Isozymes Current Topics in Biological and Medical Research 13: 127(1987)

24. Schewe, T., Rapoport, S.M. and Kuhn, H.: Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: Comparison with other lipoxygenase. Advance Enzymol. Mol. Biol. 58: 191(1986)

25. Ochi, K., Yoshimoto, T. and Yamamoto, S.: Arachodoniate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 258: 5754(1983)

26. Lewis, R.A., Austen, K.F. and Soderman, R.J.: Leukotrienes and other product of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human disease. New Engl. J. Med. 323: 645 (1990)

27. Fischer, S.M., Mills, G.D. and Slaga, T.J.: Inhibitions of mouse skin tumor promotion by several inhibitors of arachidonic acid metabolism. Carcinogenesis 3: 1243(1982)

28. Dutilh, C.F., Haddeman, E. and Ten H. F.: Role of arachidonate lipoxygenase pathway in blood platelet aggregation. Advance Prostaglandin Thromboxane Research 6: 101(1980)

29. Rouzer, C.A. and Kargman, S.: Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. J. Biol. Chem. 263(22): 10980(1988)

30. Radmark, O., Malmstein, C. and Samuelsson, B.: The inhibitory effects of BW755C on arachidonic acid metabolism in human polymorphonuclear leukocyte. FEBB 119: 213(1980)

31. Hammerstrom, S.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by 5,8,11-eicosatriynoic acid. Biochim. Biophys. Acta. 487: 517(1977)

32. Sekiya, K. and Okuda, H.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. Biochim Biophysic Acta. 713: 68(1982)

33. Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, N.: Studies on *Scutellariae* Radix: Ⅷ. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leukocytes. Planta Medica 132(1985)

34. Kemal, C., Flamberg, P.L., Olsen, R.K. and Shorter, A.L.: Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of

lipoxygenase activity. Biochem. 26: 7064(1987)

35. Laughton, M.J., Evams, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.S. and Halliwell, B.: Inhibition of mammalian 5-Lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Biochem. Pharmacol. 42(9): 1673 (1991)

36. Chen, Q., Huang, M.T. and Ho, C.T.: Effects of rosmaryl extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. J. Am. Oil Chem. Soc. 69: 999 (1992)

37. Takahashi, A., Kudo, R., Kusano, G. and Nozoe, S.: 5-Lipoxygenase Inhibitors isolated from the Mushroom *Boletopsis leucomelas* (Pers.) Fayod. Chemical Pharma. Bull. 40(12): 194(1992)

38. Fukuyama, Y., Kiriyama, Y., Okino, J., Kodama, M., Iwaki, H., Hosozawa, S. and Matsui, K.:Naturally occurring 5-lipoxygenase inhibitor. II. Structures and syntheses of Ardisianones A and B, and Maesanin, alkenyl-1,4-benzoquinones from the Rhizome of *Ardisia japonica*. Chem. Pharm. Bull. 41(3): 561(1993)

39. Masuda, T., Jitoe, A., Isobe, J., Nakatani, N. and Yonemori, S.: Anti-oxidative and anti-Inaflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma damestica*. Phytochem. 32(6): 1557(1993)

40. Masuda, T. and Jitoe, A: Antioxidative and antiinflammatory compounds from tropical gingers: Isolation, structure determination, and activities of cassumunins A, B, and C, new complex curcuminoids from Zingiber cassumunar. J. Agric. Food Chem. 42: 1850(1994)

41. Choi, S.W. and Osawa, T.: Isolation and identification of lipoxygenase inhibitor from nutmeg spice. Foods and Biotechnol. 5: 156(1996)

42. Nakatani, N.: Recent advances in the study on natural antioxidants. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 37: 569(1990)

43. Kazuo, I. and Nobuzi, N.: Functional properties of spices components. In: Physiological and Antioxidative Activities of Spices. pp. 69-82, Kyoangsengkwan Press, Japan (1990)

44. Madsen, H.L. and Bertelsen, G.: Spices as antioxidants. Trends Food Sci. Technol. 6: 271(1995)

45. Lee, S.I.: Bonchohak. Suseowon press, Seoul (1981)

46. Han, D.S.: Sangyakhak. Dongmyeong press, Seoul (1995)

47. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 4617: 1198(1958)

48. Block, E., Iyer, R., Grison, S., Saha, C., Belman, S. and Lossoing, F.P.: Lipoxygenase Inhibitors from the essential oil of garlic. Markovnikov addition of the allyldithid radical to olefins. J. Am. Chem. Soc. 110(23): 7813(1988)

49. 박종철, 최재수, 최종원 : 꾸지뽕나무 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 분획물과 플라보노이드 화합물이 흰쥐의 과산화지질 함량에 미치는 영향., 생약학회지, 26(4), 377~384(1995)

50. 이인경, 송경식, 김창진, 김환묵, 옥구택, 유의동 : 꾸지 뽕나무로부터 분리한 flavonoid 계 화합물의 암세포성장 저해 및 항산화 활성., 한국농화학회지, 37(2), 105~109(1994)

51. Nomura, T., Hano, Y. and Fujimoto, T. : Three new isoprenylated xantones, cudrax anthone A, B and C, from the root barks of *Cudrania tricuspidata.*, Hetrocycles, 20, 213(1983)

52. Fujimoto, T., Hano, Y., Nomura, T. : Components of root bark of *Cudrania tricuspidata,* structures of four new isoprenylated xantones, cudraxanthones A, B, C and D, Planta Medica, 205(1984)

53. Fujimoto, T., Hano, Y., Nomura, T., and Uzawa, J. : Components of root barks of *Cudrania tricuspidata,* 2. Structures of two new isoprenylated flavones, cudraflavones A and B, Planta Medica, 161(1984)

54. Fujimoto, T. and Nomura, T. : Components of root bark of *Cudrania tricuspidata* 3. isolation and structure studies on the flavonoids, Planta Medica. 190(1985)

55. Young, H. S., Park, J. H., Park, H. J., and Choi, J. S. : Chemical study on the stem of *Cudrania tricuspidata,* Arcb. Pharm. Res. 12, 39(1989)

56. Park, J. C., Young, H. S. and Choi, J. S. : Constituents of *Cudrania tricuspidata* in korea, Yakbak Hoeji, 36, 40(1992)

57. Kim, S. H, Kim, N. J., Choi, J. S. and Park, J. C. : Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata*, J. Korean Soc. Food Nutr., 22, 68(1993)

58. Sylvester, N.O., and Navam, S.H., : Antioxidant Activity, Fatty acids and Phenolic Acids Compositiond of potato peels., *J. Sci Food Agric.*, 62. 345~350. (1993)

59. Mitsuru, W., Yasuo, O. and Tojjro, T., : antioxidant Compounds from Buckwheat(*Fagopyrum esculentum Moench*) Hulls., *J. Agric. Food Chem.*, 45.(4)1039~1044 (1997)

60. Lee, J.H., Lee, S.R., : Some Physiological Activity of Phenolic Substances in Plant Food., *Korean J. Food Sci. Technol* 26,(3) 317~323 (1994)5.

61. Choi. U., Shin. D.H., Chang. Y.S., Shin. J.L., : Screening of Natural Antioxidant from Plant and Their Antioxidative Effect., *Korean J. Food Sci. Technol* 24.(2) 142~148 (1992)

62. 李龍守., : 밤꽃의 화학성분 및 추출물의 생물활성., : 慶尙大學校 大學院 食品工科.,(박사) (1996)

63. Ho, C.T., Lee, C.Y., and Huang, M.T. : Phenolic compounds in food and their effects oh health II: Antioxidants & Cancer Prevention. American Chemical Society(1992)

64. Ricardo ds Silva, J. M., Darmon, N., Fermandez, Y. and Mitjavila, S. : Oxygen Free Radical Scavenger Capacity in Aqueous Models of Different Procyanidins from grape Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 39(9), 1549~1552 (1991)

65. 尹基潤., : 밤의 Polyphenol 물질과 Polyphenol oxidase의 생화학적 특성., 경북대학교 식품공학과., (석사) (1991)

66. Senter, S.D,. Horvat, R.J., and Forbus, W.R., : Comparative GLC-MS Analysis of Phenolic Acids of Selected Tree Nuts., *J. Food Science*, 48, 798~799, 824 (1983)

67. Larrauri, J.A., Pilaar, R., Fulgencio, S.C., : Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels., *J. Agric Food. Chem.*, 45, 1390~1393 (1997)

68. 남영중 등 : 농산부산물의 생체방어 기능 소재 탐색 및 이용기술 개발., 한국식품개발연구원. (1994-1995)

69. 서기봉, 한판주, 이성종 : 밤 加工에 관한 硏究, 제 1보 밤의 가공적성 및 유색 가공 개발을 중심으로., 한국식품과학회지., 6(2), 98~108(1974)

70. Choi, O.K., Kim, K.M., Yoo., and G.S., Park. K.H., : Anti-allergic Effects of Castanea crenata Leaf Tea., *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(2) 468~471.(1998)

71. Zampaglione, N., Jollow, D. J., Mitohell, J. R., Manrick, M. and Gillette, J. R., Role of detoxifying enzymes in bromobenzene-induced liver necrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 218(1973)

72. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351(1979)

73. Nash, T., The colorimetric estimarion of formaldehyde by means of the hentisch reaction. *J. Biol. Chem.* 55, 412(1953)

74. Bidlack, W. R. and Lowry, G. L., Multiple drug metabolism: p-Nitoroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 31, 311(1982)

75. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B., The first step in mercapturate acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130(1974)

76. Hasegawa, L. S. and Hammock, B. D., Spectrophotometric assay for mammalian cytosolic epoxide hydrolase using trans-stilbene oxide as the substrate. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1979(1982)

77. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265(1951)

78. Marby, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B., The systematic identification of Flavonoids. Springer, N.Y., pp. 28-233(1970)

79. Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, p.152(1989)

80. Agawal, P. K., NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31, 3307(1992)