

번행초 추출물의 항산화 활성

이민아 · 최혜정 · 강점순¹ · 최영환¹ · 주우홍^{2*}

창원대학교 대학원 생명공학협동과정, ¹부산대학교 생명자원과학부, ²창원대학교 생물학과

Received January 30, 2008 / Accepted February 19, 2008

Antioxidant Activities of the Solvent Extracts from *Tetragonia tetragonioides*. Min A Lee, Hye Jung Choi, Jum Soon Kang¹, Young Whan Choi¹ and Woo Hong Joo^{2*}. *Interdisciplinary Program in Biotechnology, ²Department of Biology, Changwon National University, ¹School of Bioresource Science, Busan National University* - To clarify the antioxidation effect of the various solvent fractionation of *Tetragonia tetragonioides* which has been known to superior plants for the traditional prevention and treatment of stomach-related diseases, total polyphenol and flavonoid contents, vitamin E content, the elimination activity of a DPPH free radical and superoxide anion, inhibition activity of the superoxide generation, reducing power and metal chelating effects were estimated. The contents of the polyphenol compounds were highest in the DCM and EA fractionation, and the content of flavonoid was high in the order of HX and EA fractionation. The vitamin E content showed high in the order of the HX and DCM fractionation among solvent fractions. IC₅₀ for the elimination effect of a DPPH radical were estimated as 554.25 and 394.96 µg/ml in the DCM and EA fractions, respectively. These values were higher than that of BHT 784.7 µg/ml widely used in antioxidation effect. The inhibition activity of the superoxide generation using the *T. tetragonioides* solvent fractions represented the effects similar to that of α-tocopherol known to prevent the lipoprotein oxidation, but lower consequences than that of the phenol-resins, BHT and BHA, respectively. In the antioxidation activity derived by the reducing capability, the EA fractionation in a 1.5 mg/ml concentration showed higher than that of α-tocopherol.

Key words : *Tetragonia tetragonioides*, solvent extract, antioxidant activity

서 론

우리들이 호흡하고 있는 산소의 1-2% 정도는 완전 연소되지 않은 상태로 이와 같은 산소종을 가리켜 넓은 의미에서 활성산소(oxygen free radicals)라고 한다. 이들은 전형적으로 연쇄반응의 산물이며 하나의 활성산소가 다른 활성산소를 생성시킨다. 생체 내에서 활성산소나 free radical은 호중구 등의 식세포가 세균을 죽이는 강력한 무기로 이용되고 있으며, 또한 인류의 적인 암을 사멸시키는데도 사용되고 있다. 활성산소가 적정량이면 본래의 역할을 하지만 생체내의 제거작용에 의한 생성과 소멸의 균형이 깨어질 때에는 자기의 세포나 조직을 해치게 된다[10]. 이들은 지질을 산화시키고 단백질의 변성을 초래하여 세포막을 파괴하며, DNA에도 손상을 입혀 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병 및 알츠하이머형 치매 등 난치병의 90% 이상의 원인이 되기도 한다[2]. 또한 정상세포의 유전자 고리를 절단하여 최초의 단일한 암세포를 만드는 발암과정에도 깊게 관여하고 있다.

활성산소는 균형이 문제이며, 생체 내의 활성산소의 균형을 맞춰주기 위해 항산화제를 사용한다. 이들 항산화 물질은

금속 이온의 착염화 기능, 효소활성과 효소 유사활성 물질에 의한 free radical의 포집력으로 radical 반응을 종결시키므로서 활성산소에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제하여 동맥경화예방, 심장병예방, 노화 억제 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[15]. 그러나 항산화제로 가장 실용화된 것 중의 하나인 tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, 효과가 좋은 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), propyl gallate (PG), tertiary butylhydroquinone (TBHQ)와 같은 합성 항산화제의 경우 일정 수준 이상 섭취 시 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 안전성의 문제가 제기되면서 규제가 강화되고 있다[17]. 특히 건강에 대한 욕구의 증대와 소득의 향상으로 인공합성품의 사용을 꺼리는 추세이므로 안전성의 확보와 각종 질병의 예방 및 치료가 동시에 가능한 천연 항산화제 개발이 절실히 요구되고 있다.

번행초(*Tetragonia tetragonioides*)는 갯상추 또는 뉴질랜드 시금치로 불려지는 석류과(Aizoaceae)에 속하는 다년생풀로 높이는 40~60 cm이고 다육질 돌기가 있으며 밑에서 가지가 많이 갈라져 줄기는 비스듬히 서거나 옆으로 뻗어 땅에 엎드렸다가 접착 일어나서 50 cm 정도의 높이로 자라나 약간의 가지를 치면서 한 뿌리에서 등그렇게 땅에 붙어서 사방으로 퍼져 나간다. 뉴질랜드나 중국, 일본, 남아시아, 오스트레일리아, 남아메리카 등지에도 분포하고 있는 번행초는 생명력이

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

강하여 자갈밭이나 바위틈 등 몹시 척박하고 수분이 없는 곳에서도 잘 자라며, 우리나라는 남부 및 제주도 지방의 바닷가 모래땅에서 군락지를 형성하여 생육하고 있다. 변행초는 외국에서는 생체로서 샐러드로 애용되며 데쳐서 나물로도 섭취되는 식용작물이다. 예로부터 우리나라에서는 변행초는 '바다의 상추' 라고 할 정도로 귀하게 여겨진 약초로서, 산에서 나는 약초인 '삼주뿌리', 나무인 '예덕나무'와 함께 위장에 좋은 '3대 약초' 로 알려져 왔다. 특히 조선시대 명의 허준이 스승 유의태의 병(적취, 반위, 일적: 오늘날 위암에 해당함)을 치료하기 위해 찾던 약초가 변행초로 위장병의 예방 및 치료 효과가 뛰어난 작물로 알려지면서 최근 위암, 위염, 위궤양, 위산과다, 소화불량 등 갖가지 위장병에 치료 및 예방효과가 높은 식물로 한방에서는 귀한 약재로 취급받고 있다[1,12,26]. 또한 변행초는 중약에서 변행이라 하여 전초는 청열, 해독, 거풍, 소종의 효능으로 장염, 패혈증, 옹종창독, 풍열목적의 치료에 사용되어 왔다. 현재까지 이 식물에서 분리된 성분군으로는 β -carotene, diterpene, flavone, cerebrosides, oxilic acid, sterlyglucoside와 polysaccharide 등이 보고 된 바 있으며, 항염증, 항궤양의 활성이 보고되고 있다[1,5,9,12,13,19,24].

현재 국내자생 변행초의 활성 성분의 분리·분석에 관한 연구가 활발하지 못하고, 변행초의 완전한 약효 기능과 활성물질의 구조는 연구가 되어 있지 않다. 그리고 재배화의 근간이 되는 식물의 기초생태에 대한 조사도 미비하다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 자생하는 변행초의 활성물질을 탐색하기 위한 기초 자료를 얻고자 1차적으로 항산화 효과를 조사하여 그 결과를 정리 보고한다.

재료 및 방법

추출물 조제 및 분리

시료의 각 용매 분획을 얻기 위해 변행초 건조 1 kg에 100% methanol (MeOH)을 3 l가하여 실온에서 교반하면서 12시간 동안 3회 반복 추출하여 Whatman 여과지 No. 5A로 감압여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (Ratavapor R-121, Buchi, Switzerland)로 감압농축하고, 얻어진 농축액에 hexane (HX) 2 l를 가하여 HX와 H₂O 층으로 분리하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 분리된 H₂O 층을 dichloromethane (DCM) 2 l, ethylacetate (EA) 2 l와 butanol (BuOH) 2 l 순으로 HX와 동일하게 용매 분획하였다. 각 용매 분획 층을 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 MeOH 분획, HX 분획, DCM 분획, EA 분획 및 BuOH 분획을 얻었다. 농축된 분획물은 상온에서 용매를 완전히 제거하여 건조시킨 뒤 냉동보관하면서 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

총 phenolic compounds 함량 측정

각 분리단계별로 얻어진 추출물에 대한 총 페놀화합물의

함량을 측정하였다. 1 mg/ml의 농도로 조제한 분획 1 ml에 46 ml의 증류수와 1 ml의 2N Folin-Ciocalteu's reagent를 가하여 3분 동안 상온에서 방치 시켰다. 2% Na₂CO₃ 3 ml을 가하여 간헐적으로 섞어주면서 상온에서 2시간동안 반응시킨 후 spectrophotometer (UV-2100, Shimadzu, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀화합물 함량은 Beer's 법칙에 따라 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 표준검정곡선으로부터 구하였다[27].

총 flavonoid 함량 측정

각 용매 추출분획의 총 플라보노이드 함량을 측정을 위해 1 mg/ml의 농도로 조제한 각 분획 0.5 ml에 0.2% AlCl₃ solution 0.5 ml을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 함량은 Beer's 법칙에 따라 rutin을 표준물질로 이용하여 작성한 표준검정곡선으로부터 구하였다[29].

Total antioxidant capacity

총 항산화 능력 측정은 산성 상태에서 각 용매 추출액에 의해 Mo(VI)가 Mo(V)로 전환되어 green phosphate/Mo(V) 형태의 화합물을 만드는 능력으로 측정하였다[23]. 0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate와 4 mM의 ammonium molybdate가 포함된 3 ml의 반응 용액에 1 mg/ml 농도로 조제한 각 용매 추출액 0.3 ml을 첨가하여 95°C에서 90분간 반응시킨 뒤 695 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도 별로 조제하여 반응시킨 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 및 α -tocopherol의 흡광도를 기준으로 하여 작성된 검정곡선에 의해 각 추출액의 측정치를 환산하여 총 항산화 능력을 비교하였다.

총 비타민 E 함량 측정

각 추출 분획의 비타민 E 함량을 측정하기 위해 1 mg/ml로 조제한 각 추출액 0.1 ml에 0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate 와 4 mM의 ammonium molybdate가 포함된 1 ml의 반응 용액을 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시킨 뒤 695 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 α -tocopherol을 사용하였으며, Beer's 법칙에 따라 표준검정곡선으로 각 분획의 비타민 E 값을 산정하였다[23].

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical의 소거활성

DPPH를 사용하여 추출물의 전자공여능을 측정하였다 [11]. 6가지 농도로 조제한 시료 용액 1 ml에 0.2 mM DPPH 용액을 1 ml을 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시켰다. 이 후 spectrophotometer를 이용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 음

성대조군으로는 시료 대신 MeOH를 1 ml 첨가하여 반응시켰고, 양성대조군으로는 BHA와 BHT를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 각 시료를 대조구와 비교하여 감소된 흡광도로부터 radical 제거율을 계산하였고, IC₅₀치 (DPPH radical 형성을 50%로 억제하는데 필요한 농도)를 계산하였다.

Superoxide anion (O₂⁻)의 소거활성

Superoxide anion (O₂⁻) 제거 효과는 nitro blue tetrazolium (NBT)를 기질로 사용하여 자유 라디칼의 감소를 측정하는 방법[20]으로 조사하였다. 6가지 농도로 조제한 추출액 700 µl에 1 mM의 β-NADH, 1 mM의 NBT, 120 µM의 phenazine methosulphate (PMS)를 각각 100 µl 가하여 vortex mixer로 혼합한 뒤 상온에서 10분간 반응시켰다. 10 M의 HCl을 40 µl를 가하여 반응을 종결시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 시료 대신 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 반응시켰고, 양성대조군으로는 gallic acid를 사용하였다. 각 시료의 항산화작용은 대조구에 비하여 감소된 흡광도로부터 anion 제거율을 계산하였고, IC₅₀치 (Superoxide anion 형성을 50%로 억제하는데 필요한 농도)로 나타내었다.

Ferric thiocyanate (FTC) test

Ferric thiocyanate에 의한 지질과산화 측정은 Osawa방법[21]에 의해 측정하였다. 80% ethanol에 녹인 추출액 120 µl를 2.51% linoleic acid 2.88 ml, 40 mM phosphate buffer (pH 7.0) 9 ml와 혼합한 후 37°C에서 암반응시켰다. 24시간 간격으로 반응시킨 추출액 100 µl를 75% ethanol 9.7 ml에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate 용액 100 µl, 20 mM FeCl₂ (in 3.5% HCl) 100 µl씩을 가하여 진탕시킨 다음 정확히 3분 후에 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 변화된 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 시료 대신 80% ethanol을 사용하여 반응시켰고, 양성 대조군으로 BHT, BHA 및 α-tocopherol을 사용하였다.

Reducing power

Reducing power는 Fe³⁺(CN)₆가 반응을 통해 얻어진 전자에 의해 Fe²⁺(CN)₆으로 환원반응이 일어나는 정도를 측정하여 나타내었다[22]. 6가지 농도별로 조제한 추출액 1 ml에 2.5 ml의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6)와 1%의 K₃Fe(CN)₆ 2.5 ml를 가하여 vortex mixer로 혼합한 뒤 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 시료액에 10%의 trichloroacetic acid (TCA) 용액 2.5 ml를 넣어 잘 섞어준 뒤 1,500 rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 이 용액의 상층을 2.5 ml 취하여 증류수 2.5 ml와 10%의 FeCl₃ 0.5 ml과 잘 섞어 700 nm에서 흡광도를 조사하여 농도에 따라 변화된 값을 측정하였다. 음성 대조군으로는 시료 대신 MeOH를 사용하여 반응시켰고,

양성 대조군으로는 BHT 및 α-tocopherol을 사용하였다.

Metal chelating capacity

Fe²⁺-chelating 활성은 반응 용액의 Fe²⁺과 추출액과의 반응에 의해 Fe²⁺-ferrozine 착물 형성을 억제하는 정도를 측정하여 나타내었다[7]. 100 µl의 0.6 mM FeCl₂와 900 µl의 MeOH이 포함된 반응 용액에 각 농도로 조제한 추출액 500 µl를 가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액에 5 mM의 ferrozine을 100 µl를 넣어 혼합한 뒤 5분간 반응시키면서 ferrozine으로 하여금 반응하지 않고 남은 Fe²⁺과의 착물을 형성시켰다. 562 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 대신 MeOH를 넣어 반응시킨 대조구와의 차이를 통해 chelating 효과를 조사하였다.

결 과

수득물

번행초 1 kg을 100% MeOH 90 l로 12시간 추출한 추출액을 여과한 뒤 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 MeOH 추출물 70.0 g과 흰색 결정물질 58.0 g을 얻었다. MeOH 추출물을 HX, DCM, EA와 BuOH 용매 순서로 분획 추출하여 HX 추출물 14.35 g (20.5%), DCM 추출물 8.97 g (12.81%), EA 추출물 6.99 g (9.99%)와 BuOH 추출물 5.15 g (8.88%)을 얻었다(Fig. 1).

총 phenolic compounds, flavonoid 함량 그리고 비타민 E 함량 측정

번행초 각 용매 추출액의 phenolic 함량을 측정하기 위해 gallic acid를 사용하여 환산하였다. 1 mg에 대한 phenolic 함량을 측정한 결과 DCM 추출 분획 73.76 µg/mg, EA 추출 분획에서 69.17 µg/mg로 높게 측정되었고, MeOH 추출 분획에서 41.65 µg/mg, BuOH 추출 분획에서 37.06 µg/mg, HX 추출 분획에서 28.81 µg/mg으로 측정되었다(Table 1).

Rutin을 사용하여 번행초의 각 용매 추출 분획 1 mg의 flavonoid 화합물 함량을 측정하였다. 번행초 분획 중 HX 추출 분획에서 12.41 µg/mg로 가장 높게 측정되었고, DCM 분

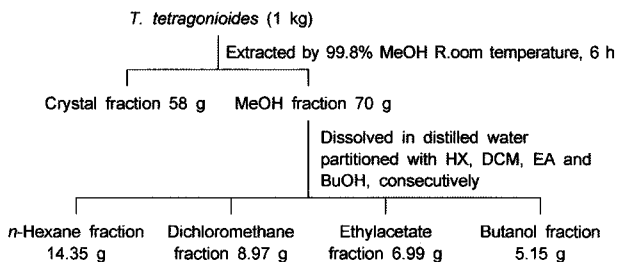


Fig. 1. Extraction and partitioning of *T. tetragonioides* by the use of the various organic solvents.

Table 1. Total phenolic compounds, flavonoid and vitamin E contents of the *T. tetragonioides* extracts

Fraction	Total phenolics ¹ (µg/mg)	Total flavonoids ² (µg/mg)	Vitamin E ³ (µg/mg)
MeOH	41.65 ⁴	7.86	143
HX	28.81	12.41	277
DCM	73.76	9.13	266
EA	69.17	11.13	172
BuOH	37.06	3.73	138

¹Gallic acid equivalents (R²=0.999)

²Rutin equivalents (R²=0.999)

³α-Tocopherol equivalents (R² =0.996)

⁴Values are mean of the triplications.

획 9.13 µg/mg, MeOH 분획 7.86 µg/mg, EA 분획 11.13 µg/mg, BuOH 추출 분획에서는 3.73 µg/mg를 함유하고 있음이 조사되었다(Table 1). 변행초 각 용매 추출 분획 1 mg에 함유된 비타민 E 양을 측정된 결과, DCM과 HX 추출분획에 각각 266 µg/mg, 277 µg/mg의 비타민 E가 함유되어 있음이 확인되었고, MeOH 분획 143 µg/mg, EA 추출 분획에서는 172 µg/mg, BuOH 추출 분획에서 138 µg/mg로 비타민 E가 함유되어 있음을 알 수 있었다(Table 1).

Total antioxidant capacity

총 항산화력은 BHA, BHT 및 α-tocopherol의 항산화력을 기준으로 환산하여 나타내었다. 먼저 BHA 1 mg의 총 항산화력을 기준으로 변행초 각 용매 추출 분획 1 mg의 항산화 능력을 환산한 결과 Table 2에서와 같이 DCM 추출 분획이 0.553 µg/mg으로 가장 높았으며 그 다음으로 HX, MeOH, EA 그리고 BuOH 추출 분획 순으로 측정되었다. 1 mg BHT의 총 항산화력에 대한 변행초 각 용매 추출 분획 1 mg의 항산화력은 DCM 추출 분획이 1,485 µg/mg 로 BHT에 비해 뛰어난 항산화력을 나타냈고, HX 추출 분획은 1,000 µg/mg으로 BHT와 유사한 항산화력이 있음을 확인할 수 있었다. MeOH, EA와

Table 2. Total antioxidant capacity of the *T. tetragonioides* extracts

Fraction	Equivalent to comparison (µg) / Fraction (mg)		
	BHA ¹	BHT ²	α-Tocopherol ³
MeOH	336 ⁴	895	241
HX	375	1000	268
DCM	553	1485	391
EA	291	772	210
BuOH	194	508	143

¹Butylated hydroxyanisole, BHA equivalents (R²=0.991)

²Butylated hydroxytoluene, BHT equivalents (R² =0.997)

³α-Tocopherol equivalents (R²=0.997)

⁴Values are mean of triplications.

BuOH 추출 분획에서는 각각 895 µg/mg, 772 µg/mg과 508 µg/mg으로 항산화력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 마지막으로 1 mg α-tocopherol의 총 항산화력에 대한 변행초 각 용매 추출 분획 1 mg의 항산화력을 환산한 결과 추출 분획 중 DCM 추출 분획이 391 µg/mg으로 높게 측정되었고, HX, MeOH, EA 그리고 BuOH 추출 분획의 순으로 총 항산화력을 가지고 있었다(Table 2). 양성 대조군과 총 항산화력을 비교하기 위해 작성한 회귀검정곡선은 Beer의 법칙에 따라 작성했으며, 상관계수(R²) 값은 0.99 이상이었다.

변행초의 DPPH free radical에 대한 전자 공여능

변행초에서 DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 IC₅₀을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 양성 대조군으로 사용한 BHA의 16.91 µg/ml에 비해서는 다소 떨어지지만 DCM 추출 분획의 IC₅₀이 554.25 µg/ml로 양성 대조군인 BHT의 784.70 µg/ml 보다 높은 항산화 능력이 나타났고, EA 추출 분획의 경우에는 IC₅₀이 394.96 µg/ml로 우수한 항산화 능력이 측정되었다. 각 용매 추출 분획의 IC₅₀을 나타내기 위해 Beer의 법칙에 따라 작성한 회귀검정곡선의 상관계수 값(R²)은 0.99 이상이었다.

Superoxide anion (O₂⁻) scavenging activity

변행초의 각 용매 추출 분획의 superoxide anion 제거 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. Superoxide anion을 50% 억제하는데 필요한 IC₅₀ (mg/ml)을 측정된 결과 HX 추출 분획은 5 mg/ml 이상에서 반응이 나타나 활성이 미약하였고, MeOH와 EA 추출 분획의 IC₅₀ (mg/ml)은 4.45 mg/ml, 4.59 mg/ml로 유사한 활성을 가지고 있음이 조사되었다. DCM 추출 분획의 superoxide anion 제거 활성 IC₅₀ (mg/ml) 값은 2.81 mg/ml로 변행초 추출 분획 중에서는 활성이 우수한 것으로 측정되었지만 양성 대조군으로 사용한 gallic acid의 0.03 mg/ml에 비해서는 다소 활성이 떨어졌다.

Ferric thiocyanate (FTC) test

추출물의 지질과산화 억제효능은 FTC 방법에 의해 지질

Table 3. DPPH radical scavenging activity of the *T. tetragonioides* extracts measured by the DPPH decolorization assay

Extracts	IC ₅₀ (µg/ml)
MeOH	850.62
HX	2246.05
DCM	554.25
EA	394.96
BuOH	1455.12
BHA	16.91
BHT	784.70

Values are mean of triplications.

Table 4. Superoxide radical scavenging activity of the *T. tetragonioides* extracts measured by the PMS/ β -NADH/NBT system

Fraction	IC ₅₀ (mg/ml)
MeOH	4.45
HX	ND ¹
DCM	2.81
EA	4.59
Gallic acid	0.03

¹ND, Not detected
Values are mean of triplications.

과산화의 첫 단계에서 생성되는 peroxide의 양을 측정함으로써 그 능력을 확인할 수 있었다. 지질과산화 반응에 의해서 형성된 과산화물이 Fe²⁺를 Fe³⁺로 산화시키는 원리를 이용하여, 변행초의 각 용매 추출 분획의 지질과산화반응 억제 활성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 24시간 간격으로 측정된 결과 양성 대조군으로 사용한 BHA와 BHT에 비해서는 다소 떨어지는 지질과산화반응 억제 활성이 측정되었지만, α -tocopherol 보다는 변행초의 각 용매 추출 분획의 지질과산화반응 억제 활성이 높게 나타났다.

Reducing power

Reducing power는 시료의 종류에 따라서 차이가 있고 또 반응조건에 따라 상이하어, 상대적인 양의 함량만을 측정할 수 있으므로 양성 대조군으로 BHT와 α -tocopherol을 사용하여 변행초의 각 용매 추출 분획의 reducing power를 측정하여 Fig. 3에 정리하여 놓았다. 분획의 농도가 증가함에 따라 reducing power가 증가하였는데 HX, MeOH, DCM 그리고 EA 순으로 추출 분획의 reducing power가 높아졌다. EA 추

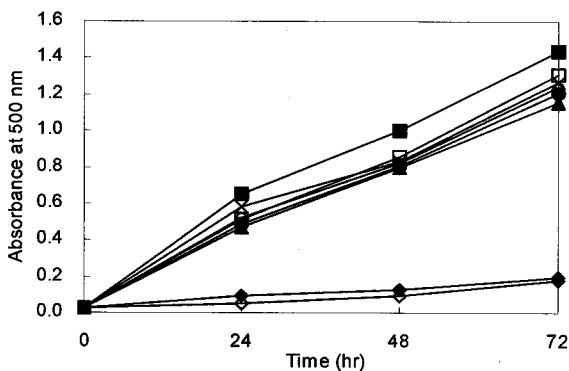


Fig. 2. Antioxidant activity of the *T. tetragonioides* extract as measured by the FTC method depending on the increase of the incubation time, compared with BHA, BHT and α -tocopherol. x, MeOH fraction; o, HX fraction; triangle, DCM fraction; circle, EA fraction; diamond, BHA; open diamond, BHT; square, α -tocopherol; filled square, Blank.

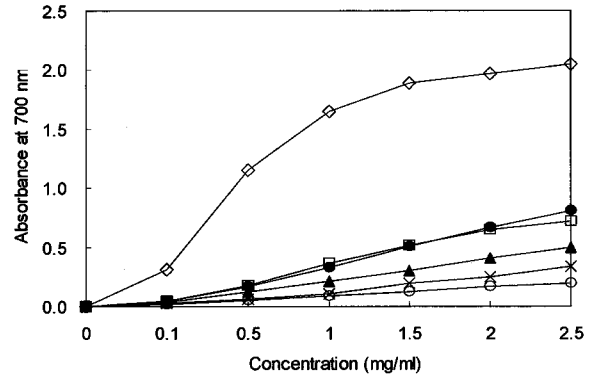


Fig. 3. The Fe³⁺-Fe²⁺ transformation of the *T. tetragonioides* extracts measured by the reducing power method, compared with BHT and α -tocopherol. x, MeOH fraction; o, HX fraction; triangle, DCM fraction; circle, EA fraction; open diamond, BHT; square, α -tocopherol; filled square, Blank.

출 분획의 경우 α -tocopherol과 유사한 환원력을 나타냈으며, 1.5 mg/ml 이후부터는 EA 추출 분획에서 유의하게 높은 활성이 측정되었다.

금속이온의 킬레이트 효과

변행초 각 용매 추출 분획의 Fe²⁺에 대한 chelating 작용으로 Fe²⁺-ferrozine 착물 형성을 억제하는 정도로 항산화 활성을 측정하였다. 흡광도가 낮아질수록 Fe²⁺이 분획과 활발히 반응하여 chelating 효과가 높아지는 것으로 나타나는데, 각 용매 추출 분획의 농도를 100 μ g/ml에서 500 μ g/ml까지 조절하여 측정된 결과 DCM, EA, HX 그리고 MeOH 순으로 chelating 활성이 높았으며 MeOH 추출 분획의 경우 metal chelating에 의한 항산화 능력이 60% 이상으로 우수함이 확인되었다(Fig. 4).

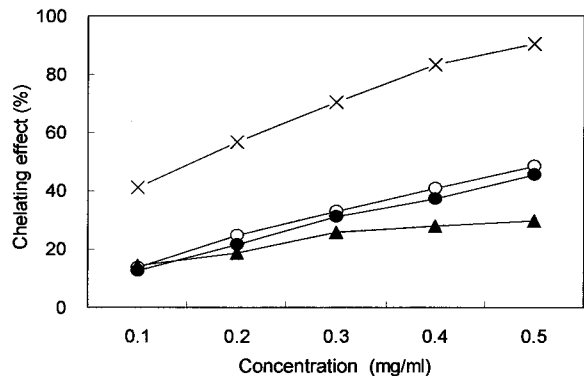


Fig. 4. The Fe³⁺-ferrozine complex formation of the *T. tetragonioides* extracts measured by the Fe²⁺-chelating activity method. x, MeOH fraction; o, HX fraction; triangle, DCM fraction; circle, EA fraction.

고 찰

암, 동맥경화증, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색증, 간염, 신장염, 아토피, 파킨슨병, 자가면역질환, 피부질환 등의 질병과 항산화는 불가분의 관계에 있으며, 활성산소종의 농도의 증가로 산화 환원의 균형이 깨지면 막 조직의 파괴를 유도하여 염증을 더욱 진행시킨다. 활성산소는 세포막을 형성하는 주 성분인 지질의 과산화현상을 일으켜서 세포막의 생체보호, 신호전달체계를 망가뜨리거나 적혈구를 파괴하고, 단백질 과산화현상을 일으켜 생체내의 각종 효소들의 기능을 억제하게 된다. 비타민 E는 지용성 비타민으로 지방조직, 간, 근육에는 다량으로, 혈소판, 부신, 뇌하수체, 고환, 난소에는 적은 양이 저장되며 주로 생체막 속에 존재하고 있다. 생체 내에는 비타민 C, 요산, cystein, glutathion 등 많은 수용성 항산화제가 있으나 이들은 리포좀(세포 내 지방인자)막의 산화는 잘 억제하나 막 안에 존재하는 물질에 의하여 일어나는 산화반응에 대해서는 항산화 능력이 거의 없다. 반면 비타민 E는 생체막 안에 있는 유일한 항산화제로서 막의 연쇄적 산화반응을 억제함으로써 암을 비롯한 여러 성인병 및 적혈구의 생존기간 감소, 신경근질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[25]. 산화성 free radical은 인체 내에서 지질, 단백질 등과 결합하여 각종 질병 및 노화를 일으키므로 free radical을 제거할 수 있는 항산화제를 식물에서 찾으려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 식물의 flavonoid 화합물은 항산화성이 강해 free radical terminator 혹은 금속의 chelater로 작용한다는 보고가 있으며[3,16], phenolic 화합물은 항균작용, 소염작용, 항알러지작용 등 여러 가지 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4,8]. 특히 phenolic 화합물은 식물계에 널리 분포하며, 2차 대사산물로 다양한 구조를 가지며 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려지면서 이들로부터 항균·항산화 물질을 추출하려는 연구가 최근 활발하게 일어나고 있다.

변행초를 대상으로 한 총 항산화력 측정에서 DCM 추출 분획의 항산화력이 우수하게 나타났으며, 특히 BHT의 항산화력 기준으로 환산된 값은 1.485로 DCM 추출 분획에서 우수한 항산화제 물질이 분리될 수 있음을 확인할 수 있었다. DCM 추출 분획에서 phenolic 화합물의 함량과 비타민 E의 함량이 높게 측정되었고, EA 추출 분획의 경우 phenolic 화합물의 함량과 flavonoid의 함량이 높게 확인되었다. 특히적으로 HX 추출 분획에서는 phenolic 화합물의 함량에 비해 flavonoid의 함량뿐만 아니라 비타민 E의 함량도 높게 확인되었다. 변행초의 DCM 과 EA 추출 분획에서 DPPH radical 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 농도인 IC₅₀ 값이 각각 554.25 µg/ml, 394.96 µg/ml로 산화방지제로 널리 이용되고 있는 BHT의 784.7 µg/ml 보다 우수하게 측정되었다. 또 한 민간요법으로 암, 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 기침, 위염 등

에 효과가 알려진 산죽잎의 MeOH 분획의 IC₅₀ 583 µg/ml 보다 우수한 radical 소거활성을 보였으며[30], 마늘의 IC₅₀ 2,500 µg/ml, 고추냉이 IC₅₀ 989.1 µg/ml, 생강의 IC₅₀ 734.8 µg/ml 보다 뛰어난 DPPH radical 소거능을 나타내고 있음을 알 수 있었다[24]. 조 등(2005)의 연구 결과에 따르면 38가지 천연 추출물에 대한 free radical 소거 활성 측정 결과 승마(IC₅₀=426.6 µg/ml), 치자(IC₅₀=487.8 µg/ml), 영실(IC₅₀=515.8 µg/ml), 어성초(IC₅₀=522.2 µg/ml)와 향부자(IC₅₀=631.3 µg/ml)의 활성이 변행초의 DCM 추출분획과 유사하며 EA 추출 분획에서는 더 우수함이 확인되었다[6]. 감국(IC₅₀=329.4 µg/ml)과 연교(IC₅₀=360.6 µg/ml)등은 BHT (IC₅₀=355.0 µg/ml) 보다 높거나 비슷하게 측정되었는데, 조 등의 연구는 0.2 mM DPPH 용액 1 ml에 반응 시료액을 2 ml 첨가하여 반응 시킨 결과로서 변행초의 BHT (IC₅₀=784.7 µg/ml) 보다 우수한 free radical 소거 활성을 가진 DCM과 EA 추출 분획의 경우 BHT와 같이 단일 성분이 아닌 추출분획임을 고려해 볼 때 활성성분의 분리 및 구조 동정을 통하여 우수한 유효성을 가지는 항산화제 개발이 가능할 것으로 생각된다.

변행초의 과산화물 생성 억제 활성을 측정된 결과, 24시간 반응 후부터 다가불포화지방산과 세포막, 지질단백질을 산화로부터 보호한다고 알려진 α-tocopherol보다 변행초 분획에서 활성이 높게 나타났다. *Hyphaene thebaica*의 열수 추출물과 black tea의 열수추출물의 킬레이트 효과는 250 µg/ml의 농도에서 40% 이하로 나타남으로서 변행초의 MeOH 추출 분획의 킬레이트 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다[28]. 단백질이 산화적 손상을 받으면 탄소-산소 불포화결합으로 반응성이 풍부한 carbonyl기를 형성하는데 노화에 따라 조직 내의 carbonyl의 함량이 증가함이 밝혀져 있다[18]. Carbonyl기의 산화는 Ag²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ 또는 할로젠족 원소(Br₂, I₂)의 환원과 동시에 이루어지는데 이러한 능력을 reducing power라고 하며 측정된 변행초의 환원력으로 항산화 활성을 확인하였다. Reducing power 반응을 통한 항산화력 측정에서 EA 추출 분획의 1.5 mg/ml 농도 이후부터는 α-tocopherol과 유의하게 높은 활성이 나타났다.

천연자원에서 개발된 생리활성 물질은 부작용이 적고 효능이 우수하여 현대 의약품의 60% 정도가 천연물에서 유래된 것이며, 앞으로도 새로운 활성물질이 천연물에서 계속 발견될 것으로 예측되고 있어 이 분야의 연구는 의약산업 및 정밀화학 분야에서 대단히 중요하고 국가적으로도 시급한 과제로 인식되고 있다. 이러한 시점에서 변행초는 우수한 항균·항산화 활성을 가진 천연자원으로서 최근 문제가 되고 있는 활성산소로 인한 각종 질병치료 및 예방에 유효한 물질을 많이 함유하고 있음이 본 연구를 통하여 확인되어 추후 지속적인 연구가 기대된다. 변행초의 항균·항산화 활성에 대한 본 기초연구를 토대로하여 유효 물질 정제·분리 기술의 확립과

분리된 유효 성분의 구조 동정 및 약리작용과의 상관관계 분석, 활성에 대한 연구가 추가적으로 진행된다면 장래에 변형초는 중요한 생물 자원으로 평가 될 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 예로부터 위장병의 예방 및 치료 효과가 뛰어난 작물로 알려진 변형초(*Tetragonia tetragonioides*)의 각종 용매 추출 분획물의 항산화 효과를 명확히 하기 위해 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량, 비타민 E함량, DPPH free radical 소거활성, Superoxide 음이온 소거활성, 과산화물 생성 억제 활성, 환원능력 그리고 금속 킬레이트 효과를 측정하였다. 먼저 총 폴리페놀 화합물의 함량은 DCM 분획, EA 분획에서 높게 나타났고, 플라보노이드 함량은 HX 분획, EA 분획 순으로 나타났다. 비타민 E의 함량은 HX 분획, DCM 분획 순으로 높게 나타났다. DPPH radical 소거활성 효과는 DCM과 EA 추출 분획에서 IC₅₀ 값이 각각 554.25 µg/ml, 394.96 µg/ml로 산화방지제로 널리 이용되고 있는 BHT의 784.7 µg/ml 보다 우수하게 측정되었다. 과산화물 생성 억제 활성에서 변형초 분획은 지질단백질을 산화로부터 보호한다고 알려진 α -tocopherol과 유사한 능력을 보였으나, 페놀계 합성 항산화제인 BHT, BHA에 비해서는 억제능이 다소 낮음이 확인되었다. 환원능력을 통한 항산화 활성 측정에서는 1.5 mg/ml 농도에서 EA 분획의 활성이 α -tocopherol보다 유의하게 높게 나타나 좋은 항산화 소재임이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2007년 농촌진흥청 연구과제(105026-03-2-HD110)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Aoki, T., K. Takagi, T. Hira and T. Suga. 1982. Two naturally occurring acyclic diterpene and norditerpene aldehydes from *Tetragonia tetragonioides*. *Phytochemistry* **21**, 1361-1363.
- Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 671-683.
- Bracke, M. E., H. T. Depyoere, T. Boterberg, E. Vanluchene, M. Nuytinck, R. Serreyn and M. M. Mareel. 1999. Influence of tangeretin on tamoxifen's therapeutic benefit in mammary cancer. *J. Nat. Can. Int.* **91**, 354-359.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Cambie, R. C and L. R. Ferguson. 2003. Potential functional foods in the traditional Maori diet. *Fundam. Mol. Mecha. Mutag.* **523-524**, 109-117.
- Cho, Y. J. 2005. Study on the tyrosinase activity inhibition and free radical scavenging activity of natural materials. pp. 58-62, University of Cyber Cosmetics Industry Sookmyung Women's, Korea.
- Decker, E. A. and B. Welch. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 674-677.
- Duh, P. D., Y. Y. Tu and G. C. Yen. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnesm. Wiss. Technol.* **32**, 269-277.
- Emi, O. and Y. Mikio. 1983. The principles of *Tetragonia tetragonioides* having anti-ulcerogenic activity. Isolation and identification of a sterol glucoside mixture (compound A). *Yakugaku zasshi* **103**, 43-48.
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge and C. E. Cross. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now. *J. Laboratory and Clinical Medicine* **119**, 598-620.
- Hatano, T., R. Edamatsu, M. A. Hiranatsu, Y. Fujita, T. Uhara, T. Yosyida and T. Okkuda. 1989. Effect of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenol superoxide anion radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016-2021.
- Kato, M., T. Takeda, Y. Ogihara, M. Shimizu, T. Nomura and T. Tomita. 1985. Studies on the structure of polysaccharide from *Tetragonia tetragonioides*. I. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3675-3680.
- Kemo, M. S., R. S. Bueden and C. Brown. 1979. A new naturally occurring flavanone from *Tetragonia expansa*. *Phytochemistry* **18**, 1765-1766.
- Kodato, S. I., M. Nakagawa and T. Hino. 1989. Synthesis of cerebroside B1b with antiulcerogenic activity II. Total synthesis and determination of absolute configuration of cerebroside B1b and its stereoisomers. *Tetrahedron* **45**, 7263-7280.
- Lee, H. K., N. Y. Kim, M. J. Kim, S. U. Park and C. Y. Yu. 2003. Antioxidant, Antimutagenicity and Anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **11**, 53-61.
- Lee, S. J., H. Y. Chung, I. K. Lee and I. D. Yoo. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 815-822.
- Madavi, D. L. and D. K. Salunkhe. 1995. Toxicological aspects of food antioxidant. *Food antioxidants* pp. 267, Marcel Dekker., New York.
- Meir, S., J. Kanner, B. Akiri and S. P. Hadas. 1995. Determination and involvement of aqueous senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1813-1815.
- Mori, K. and T. Kinsho. 1988. Synthesis of anti-ulcerogenic cerebroside isolated *Tetragonia tetragonioides*. *Liebigs. Ann. Chem.* 807-814.
- Nishikimi, M., N. A. Rao and K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 849-864.

21. Osawa, T., M. Namiki. 1981. A novel type of antioxidant isolate from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-740.
22. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction-Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucoamine. *Jpn. J. Nutritio.* **44**, 307-315.
23. Prieto, P., M. Pineda and M. Aguilar. 1999. Spectrophotometric Quantitaion of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **269**, 337-341.
24. Ryu, H. Y., K. H. Bae, E. J. Kum, S. J. Park, B. H. Lee and H. Y. Sohn. 2007. Evaluation for the Antimicrobial, Antioxidant and Antithrombosis Activity of Natural Spices for Fresh-cut yam. *J. Life Sci.* **17**, 652-657.
25. Sato, T., F. Kiuchi and U. Sankawa. 1982. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry* **21**, 845-850.
26. Singh, N. P. and P. R. Schmidt. 1989. Synthesis of a sphingadienine moiety containing cerebroside from *tetragonia tetragonoides* with antiulcerogenic activity. *J. Carbohydr. Chem.* **8**, 199-216.
27. Slinkard, K. and V. L. Singleton. 1997 Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 49-55.
28. Van Gelder, C. W. G., W. H. Flurkey and H. J. Wicher 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry* **47**, 1309-1323.
29. Woisky, R. G. and A. Salatino. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **37**, 99-105.
30. Yoo, M. Y., S. H. Park, T. M. Kang and J. Y. Yang. 2005. Characterization of Antioxidants Extracted from Leaves of Sanjook (*Sasa Boreails var. Chiisanensis*). *J. Life Sci.* **15**, 796-801.