

## 석위의 항산화작용에 관한 연구

요 품 과, 숙명여자대학교\*

이정숙 · 양기숙\* · 윤원용

## Studies on the Antioxidative Activity of *Pyrrosia lingua*

Cosmetics Division, Sook Myung Women's university\*

Jeong-Sook Lee, Ki-Sook Yang\*, Won-Yong Yun.

### =Abstract=

*Pyrrosia lingua*(*Polypodiaceae*) is a perennial herb which has been used as treatment of diuretics, expectorant, antitumor agent in folk remedies. The pharmacological studies of this natural drug have not yet established. So, we examined electron donating ability by DPPH method. Antioxiditive effectivities by DPPH method increase according to concentration in MeOH Ex, hexane fr, EtoAc fr, BuOH fr and water fr. Radical scavenging effect of EtoAc fr and BuOH fr are superior to silymarin in 500ppm. PEF2 which was taken by silical column chromatography in EtoAc fr showed strong radical scavenging effect.

### 서 론

석위 石韋는 고사리과 (*Polypodiaceae*)에 속하는 多年生 常綠 羊齒類로서 석위 *Pyrrosia lingua*의 全草이다. 봄, 여름, 가을에 채취하여 根莖과 蔓根을 제거하고 陰乾하여 사용한다. 우리나라 각지, 일본, 중국의 樹林이나 石上에 自生하며 예로부터 小便不通, 热淋, 肺熱, 咳嗽 등에 사용되어 왔다. 또한 중국 등지에서는 항암작용, 항균작용, 기관지 천식에 藥效가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)-3)</sup> 동속식물로는 애기석위 *P. petiolosa*, 廬山석위 *P. Shaereri*, 鮫毛석위 *P. drakeana*, 세뿔석위 *P. tricuspis* 등이 알려져 있다.<sup>4)</sup> 석위의 性味는 微寒,

微苦, 甘하며 歸肺, 勝胱經에 입한다. 치방 예로는 석위 산이 있으며 利尿通淋, 止咳平喘, 血尿, 急性腎炎의 수종치료, 止癆止瀉, 清熱解毒, 子宮出血, 月經過多에 유효하며 외과에서는 각종 궤양증독의 치료에 사용한다.<sup>2),5)</sup> 성분에 관한 연구로는 saponin, anthraquinone, flavone배당체, diploptene, tannin 등이 알려져 있고, flavonoid로서는 kaempferol, astragalin, quercetin, isoquercetin, trifolin,  $\beta$ -sitosterol, sucrose, chlorogenic acid 등, anthraquinone류로는 mangiferin, isomangiferin 등이 알려져 있다. 또한 *Pyrrosia lineafolia*에서 pyrrosia A와 pyrrosia B의 flavanone배당체를 분리하였다.

kaempferol 3-O-sophoroside-7-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, neohesperidosides 등이 *Pyrrosia serpens*에 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>6~11)</sup> 인간의 호흡을 통하여 흡수되어진 산소는 체내에서 활성화되어 여러 가지 효소반응에 이용되어져 생명유지에 필수적이다. 그러나 이러한 활성 산소로 인해 지질막등에서 free radical이 생성되며 이것은 노화, 고지혈증 등을 유발하는 것으로 알려져있다. 석위는 많은 flavonoid 배당체를 함유하고 있어 석위 MeOH 추출물의 용량별 각 fraction의 DPPH에 대한 free radical scavenging effect를 이용하여 항산화작용을 검토하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험식물

本 實驗에 사용한 석위石葦(*Pyrrosia lingua*)는 경동시장에서 구입하여 기원을 확인한 후 음건 세절하여 재료식물로 하였다.

#### 2) 시약

L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. USA 제품을 사용하였고, hexane, ethylacetate, n-butyl alcohol, ethanol, chloroform, methanol (Junsei chemical Co. Japan) 등은 GR을 사용하였다. acetonitrile은 HPLC용 TEDIA, Co제품을 사용하였다. silymarin은 식품의약품안전본부에서 분양받아 사용하였으며 기타 시약은 GR 또는 EP 급을 사용하였다.

#### 3) 기구 및 기기

Vaccum rotary evaporator(Buchi), freeze dryer(Kumsung), ultra sonicator(Branson), spectrophotometer(Hewlett-packard), shaking incubator (JeioTech Co.), vortex mixer (Hwa Shin Med Lab), drying oven(Cheil Co.), stirrer/hot plate (Fisher Scientific), water bath (Buchi), HPLC(Waters) 등의 기기를 사용하였다.

### 2. 實驗方法

#### 1) 시료의 조제

재료식물을 음건한 뒤 세절하여 methanol로 4시간씩 3회 가온 추출 후 여과하고 여액을 모아 감압농축하여 methanol Ex.(MeOH Ex.)를 얻었다.(Yield: 8.7%) 이 MeOH Ex.에

증류수를 가하여 혼탁시키고 분액여두에 넣어 순차적으로 분획하여 각각 hexane fraction(Hexane fr. 13.2%), ethylacetate fraction(EtoAc fr. 10.9%), butanol fraction(BuOH fr. 17.4%), water fraction(Water fr. 45.9%)을 얻었으며 각 분획을 감압농축하여 시료약물을 얻었다.(Scheme 1.) 각 분획을 0.5% CMC-Na solution에 혼탁시켜 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약의 조제

##### (1) 0.1 mM DPPH solution의 조제

DPPH 39.43mg을 ethanol에 용해시켜 100ml로 하고 이를 10배 희석하여 조제하였다.

##### (2) 양성대조약물의 조제

DPPH 실험의 경우는 L-ascorbic acid를 ethanol에 녹여 0.5mg/ml가 되도록 조제하고 silymarin은 2.0mg/ml가 되도록 조제하여 단계희석하여 사용하였다.

#### 3) DPPH에 대한 radical scavenging effect 측정

(1) 석위 MeOH Ex.의 각 fraction의 radical scavenging effect 측정

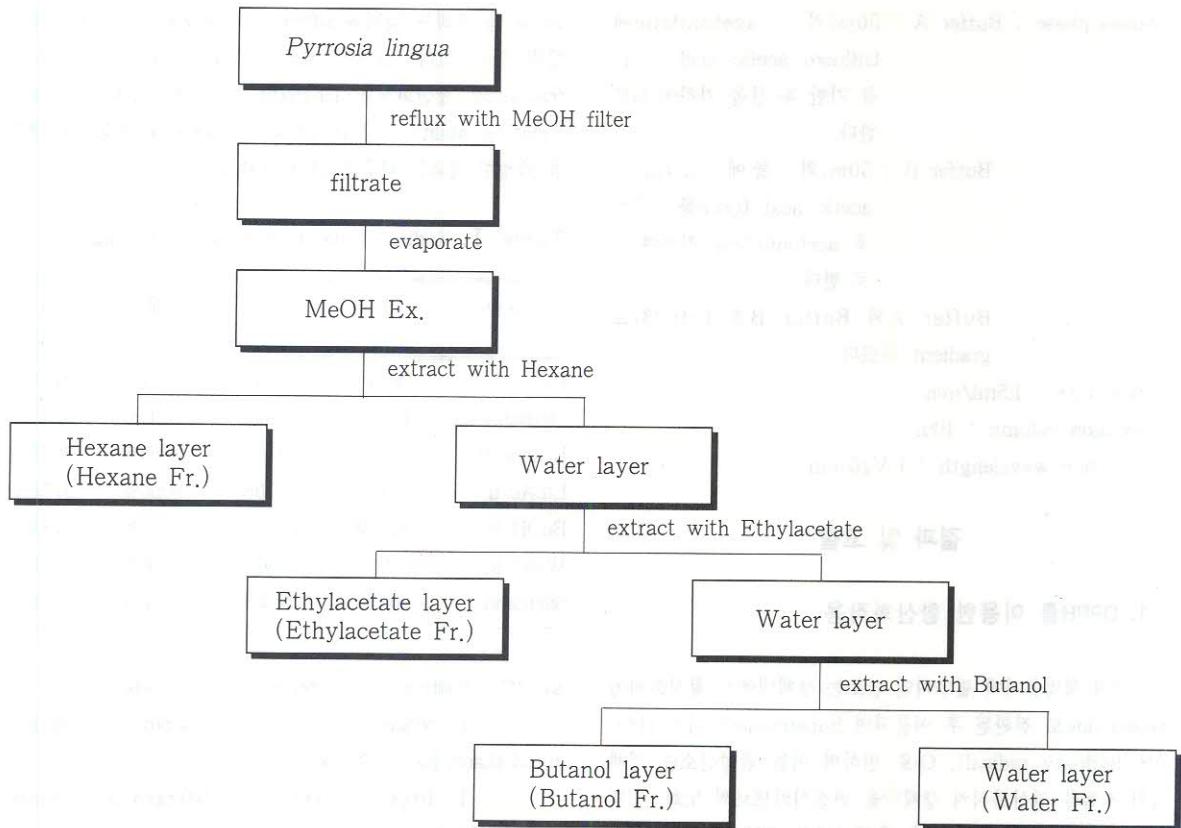
DPPH를 0.1mM의 농도가 되도록 조제한 용액 4.75ml에 각 fraction과 양성대조 약물인 silymarin을 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml의 농도로 조제한 용액을 250ul씩 가하고 37°C에서 30분간 incubation한 후 ethanol을 대조로하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조약물로서 합성약물인 L-ascorbic acid는 각각 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.25mg/ml, 0.5mg/ml의 용량별로 조제하여 측정하였다. 각 fraction의 radical scavenging effect는 electron donating ability(EDA%)로써 나타내었다.

(2) 석위 EtoAc Fr.의 각 fraction의 radical scavenging effect 측정

EtoAc fr을 silicagel column chromatography(이동상 Chloroform : Methanol)를 이용하여 11개의 분획을 얻었다.(이하 ethylacetate fraction의 각 분획의 이름을 PEF1, 2, 3, …로 표시하였다.) 각각의 분획의 농도를 1.0mg/ml로 조제한 용액 250ul을 0.1mM의 DPPH 4.75ml에 가하여 (1)의 방법으로 흡광도를 측정하였다. 실험결과 EDA%가 75% 이상인 분획에 대하여 각 농도를 10, 50, 100, 250, 500, 1000ppm으로하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 분획성분의 확인 시험 및 분석

4.1 석위의 MeOH Ex.의 각 분획에 대하여 flavonoid,



Scheme 1. Extraction and Fractionation of *P. lingua*.

anthraquinone, terpenoid 및 steroid, saponin등의 확인 반응을 실시하였다.

#### (1) Anthraquinone의 확인반응

각 분획을 소량 취하여 methanol에 녹인 후 10%KOH용액 수방울을 가할 때 적색으로 발색됨을 관찰하였다.

#### (2) Terpenoid 및 steroid의 확인반응

각 분획을 소량 취하여 acetic anhydride 1ml을 가하여 녹인 후 진한 황산 2-3방울을 가했을 때 나타나는 전계면의 적록색을 관찰하였다.

#### (3) Flavonoid의 확인반응

각 분획을 소량 취하여 methanol에 녹인 후 Mg분말 소량과 진한 염산 수방울을 가하여 나타나는 적색의 발색반응을 관찰하였다.

#### (4) Saponin의 확인반응

각 분획을 소량 취하여 5ml의 중류수에 녹이고 심하게 흔들어 준 다음 방치한 후 30분 동안 지속되는 미세거품(honey-comb froth)의 발생 유무를 관찰하였다.

#### 4.2 분획성분의 HPLC에 의한 pattern 분석

실험에 사용한 재료와 분석기기 및 조건은 아래와 같다.

##### (1) 재료

석위의 MeOH Ex.의 각 분획 hexane fr, EtoAc fr, BuOH fr, water fr을 methanol에 녹인후 HPLC로 분석하였다.

EtoAc fr 1g을 silicagel column chromatography (Mobile phase:chloroform:methanol gradient)를 실시하여 분획 11개를 얻었으나 그 중 항산화효과가 강력한 PEF 2를 HPLC로 분석하였다.

##### (2) 분석기기 및 조건

HPLC(High performance liquid chromatography)

Injector : waters U6K

Detector : UV-visible detector (waters 484)

Pump : waters 510

Integrator : HP3395

Column :  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>

Mobile phase : Buffer A : 50ml의 acetonitrile에 trifluoro acetic acid 1ml를 가한 후 물을 가하여 1l로 한다.

Buffer B : 50ml의 물에 trifluoro acetic acid 0.8ml를 가한 후 acetonitrile을 가하여 1l로 한다.

Buffer A와 Buffer B를 1-100%로 gradient 하였다.

Flow rate : 1.5ml/min

Injection column : 10ul

Detection wavelength : UV269nm

## 결과 및 고찰

### 1. DPPH를 이용한 항산화작용

인체의 생명유지에 필수적인 산소는 생체내에서 활성화되어 Superoxide로 전환된 후 이용되며 Superoxide는 다시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH(hydroxy radical), O<sub>2</sub>로 변하며 이들 활성산소는 생체막의 지질을 과산화시켜 생체막을 변질시키므로써 노화, 동맥경화 및 당뇨병 등의 질환을 촉진시키며 발암성, 돌연변이와도 관계가 있다고 보고되어 있다.<sup>14)</sup>

생체는 생체에 이용되고 남은 활성효소를 제거시켜주는 효소계 또는 물질을 함유하고 있으며 그 주요한 작용이 간장에서 일어나고 있다. 그러나 간장이 유독물질(CCl<sub>4</sub>, benzopyrene, ethanol등)로부터 손상을 입을 경우 이 같은 간 세포막의 지질이 과산화되며 내부의 효소계가 파괴됨으로서 혈액 및 조직내 과산화지질량이 증가하며 이 과산화지질과 활성효소의 연쇄반응으로 기타조직에 병변을 유발한다고 알려져있다.<sup>15)</sup>

한등은<sup>16)</sup> 치자로부터 항산화 활성성분에 관해 연구하였고, 이등은<sup>17)</sup> Polygonum aviculare L.의 전초가 지질과산화 및 간 기능에 미치는 영향을 연구하였고, Seo등은<sup>18)</sup> 두릅나무의 부탄을 추출물이 지질과산화에 미치는 영향에 관하여 연구하였다. 백등은<sup>19)</sup> 인삼의 각종 용매추출물의 항산화성물질의 존재와 항산화정도를 검토한 결과 항산화성 물질들을 확인하였다.

#### 1) 석위의 MeOH Ex.의 각 fraction의 DPPH를 이용한 항산화능에 미치는 영향.

항산화효과를 측정하는 방법에는 POV(peroxide value), AV(acid value), COV(carbonyl value), IV(iodine

value)를 구하는 방법과 DPPH의 환원성을 이용하여 구하는 방법 등이 있다. 실험에 사용한 석위의 MeOH Ex.와 각 fraction의 항산화력을 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA%)으로 그 환원력에 의한 항산화능을 측정한 결과는 다음과 같다.(Table I.).

Table I. Radical scavenging effect of *P. lingua*.

Group	I	II	III	IV (EDA%)
P.C	29.43%	52.45%	79.44%	94.71%
Methanol Ex.	14.95%	39.87%	71.92%	89.73%
Hexane fr.	6.86%	12.49%	20.58%	32.39%
EtoAc fr.	21.17%	77.70%	90.96%	91.58%
BuOH fr.	16.02%	61.23%	89.37%	91.83%
Water fr.	3.30%	10.97%	17.96%	39.36%
Silymarin	30.42%	37.50%	63.18%	81.70%

a) P.C : Positive control, concentration of Ascorbic acid

I : 50ppm II : 100ppm III : 250ppm IV : 500ppm

b) Methanol Ex 와 각 fraction 의 농도.

I : 100ppm II : 500ppm III : 1000ppm IV : 2000ppm

c) EDA(Electron donating ability)

$$\text{EDA (\%)} = (\text{control O.D.} - \text{sample O.D.}) / \text{control O.D.} * 100$$

sample O.D. = 시료를 가한 시험액의 흡광도

양성대조약물로 사용한 ascorbic acid는 50, 100, 250, 500ppm까지 농도를 변화시키면서 측정한 결과는 29.43%, 52.45%, 79.44%, 94.71%에 이르는 환원력을 보였다.

MeOH Ex. 및 모든 fraction에서 농도 증가에 따라 항산화효과가 증가하였다. EtoAc fr과 BuOH fr에서는 500ppm부터 항산화 효과가 생약 양성대조물질인 silymarin보다 효과가 컸으며, ascorbic acid 250ppm과 비슷한 효과를 나타내었다. EtoAc fr의 효과가 가장 강력하였으며, water fr과 hexane fr에서는 효과가 미약하였다.(Figure 1.)

#### 2) 석위 EtoAc fraction의 각 분획의 DPPH를 이용한 항산화능에 미치는 영향.

실험에 사용한 석위의 EtoAc fr의 각 fraction의 항산화력을 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA%)으로 그 환원력에 의한 항산화능을 측정한 결과는 다음과 같다.(Table II.).

Table II. Radical scavenging effect of Fraction of EtoAc Fr.

Group.	I	II	III	IV	V	VI (EDA %)
P.C	12.48%	30.02%	51.53%	80.02%	95.08%	-
PEF 1	-	-	-	-	-	29.99%
PEF 2	6.96%	23.11%	38.93%	65.52%	92.70%	93.27%
PEF 3	9.18%	14.35%	29.20%	40.22%	76.81%	88.67%
PEF 4	-	-	-	-	-	56.93%
PEF 5	8.02%	12.03%	25.76%	32.00%	58.74%	84.34%
PEF 6	-	-	-	-	-	65.17%
PEF 7	-	-	-	-	-	50.42%
PEF 8	-	-	-	-	-	40.85%
PEF 9	-	-	-	-	-	19.96%
PEF 10	8.65%	12.97%	23.91%	28.72%	56.43%	79.72%
PEF 11	10.23%	20.07%	28.01%	31.18%	49.81%	85.34%

a) P.C : Positive control, Ascorbic acid

b) ascorbic acid와 각 fraction의 농도

I : 10ppm II: 50ppm III: 100ppm IV: 250ppm V: 500ppm VI: 1000ppm

c) EDA(Electron donating ability)

EDA (%) = (control O.D. - sample O.D.) / control O.D. \*100

sample O.D. = 시료를 가한 시험액의 흡광도

d) - 은 미량이므로 측정하지 않았음.

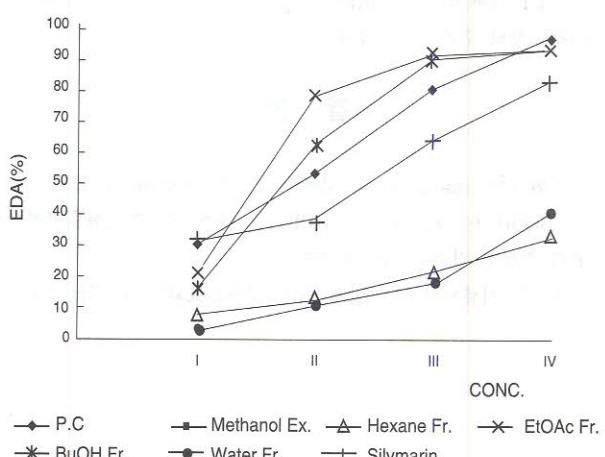


Figure 1. Radical scavenging effect of *P. lingua*

a) P.C : Positive control, concentration of Ascorbic acid

I : 50ppm II :100ppm III: 250ppm IV: 500ppm

b) Methanol Ex 와 각 fraction 의 농도

I : 100ppm II :500ppm III : 1000ppm IV : 2000ppm

각각의 분획을 비교해보면 PEF 2, 3, 5, 10, 11에서 EDA%가 75% 이상의 환원력을 보였으며 그 정도는 Ascorbic acid의 환원력과 비슷하였다.(Figure 2.)

EtoAc fr의 1000ppm과 비교하였을 때 더 강한 효과를

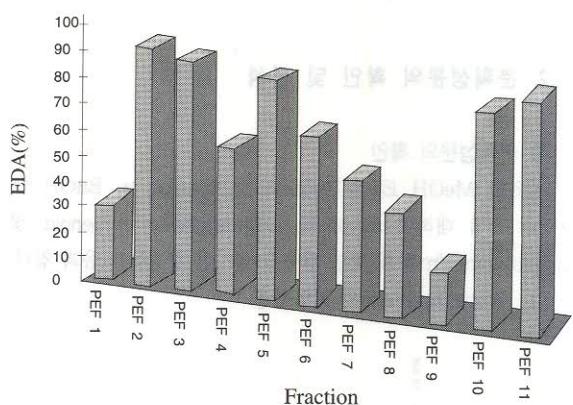


Figure 2. Radical scavenging effect of Fraction of EtoAc Fr.

a) PEF : EtoAc Fr.의 각 Fraction

b) 각 fraction의 농도 1000ppm

PEF 2에서 보이고 있다. PEF 2, 3, 5, 10, 11을 농도별로 항산화능을 측정하였을 때 농도증가에 따라 항산화효과가 증가하였다.(Figure 3.)

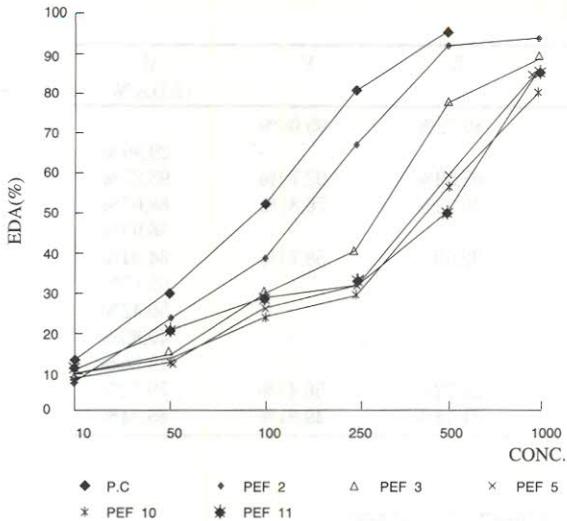


Figure 3. EtoAc Fr.의 각 fraction의 농도별 Radical scavenging effect.

- a) PEF : EtoAc Fr.의 각 Fraction.
- b) 각 fraction의 농도 ppm

## 2. 분획성분의 확인 및 분석

### 1) 분획성분의 확인

석위의 MeOH Ex.의 hexane fr, EtoAc fr, BuOH fr, water fr에 대하여 flavonoid, anthraquinone, terpenoid 및 steroid, saponin 등의 확인 반응을 실시한 결과는 다음과 같다.

#### (1) Anthraquinone의 확인반응

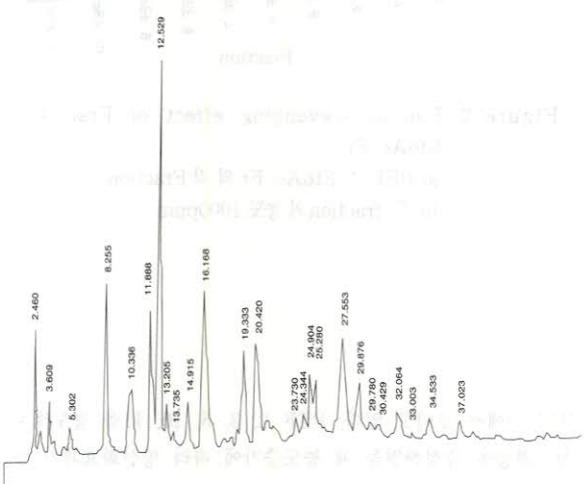


Figure 4. Chromatogram of MeOH Ex. by HPLC

- 102 -

MeOH Ex.와 EtoAc fr, BuOH fr에서 양성반응을 나타내었다.

#### (2) Terpenoid 및 steroid의 확인반응

MeOH Ex.와 hexane fr에서 양성반응을 나타내었다.

#### (3) Flavonoid의 확인반응

MeOH Ex.와 EtoAc fr, BuOH fr에서 양성반응을 나타내었다.

#### (4) Saponin의 확인반응

MeOH Ex.와 water fr, BuOH fr에서 양성반응을 나타내었다.

## 2) 분획성분의 HPLC에 의한 분석

석위의 MeOH Ex.의 각 분획을 HPLC를 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.(Figure 4, 5, 6, 7, 8, 9) EtoAc fr에서는 retention time 8.280, 12.562, 16.212, 20.499분에서 peak가 검출되었고, BuOH fr에서는 retention time 12.580, 16.195, 27.579분에서 peak가 검출되었고, water fr에서는 peak가 검출되지 않았다.

PEF 2에서는 retention time 8.256분에서 peak area 65%이상의 주피크가 검출되었다.

## 결 론

석위 *Pyrrosia lingua*의 MeOH Ex.의 hexane fr, EtoAc fr, BuOH fr, water fr를 DPPH를 이용하여 항산화효과에 관해 검토한 결과는 다음과 같다.

### 1. 각 시료의 DPPH법에 의한 항산화효과는 MeOH Ex.

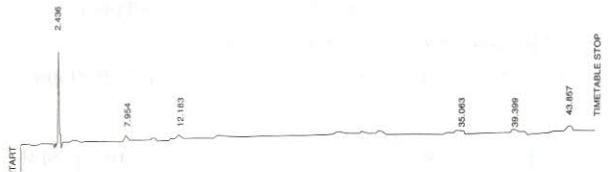
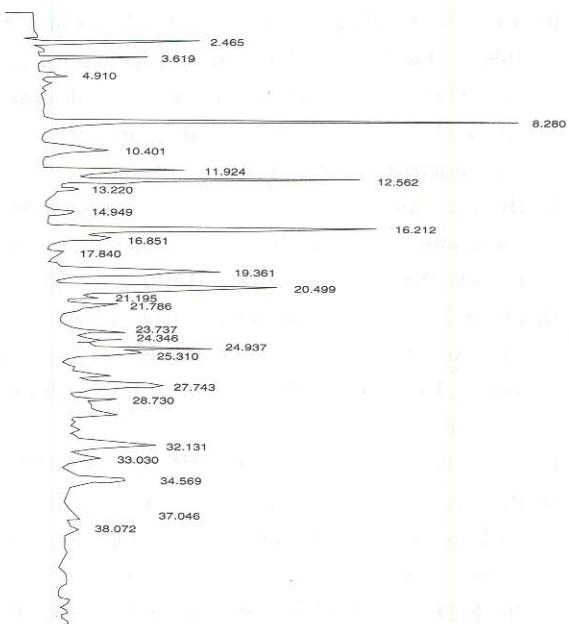
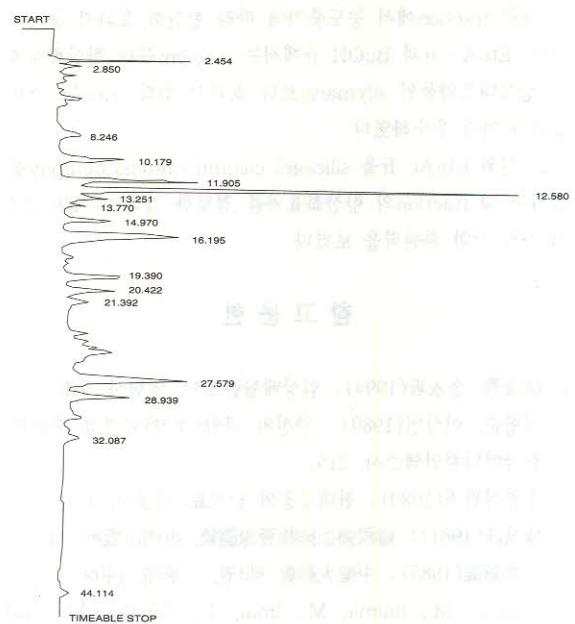


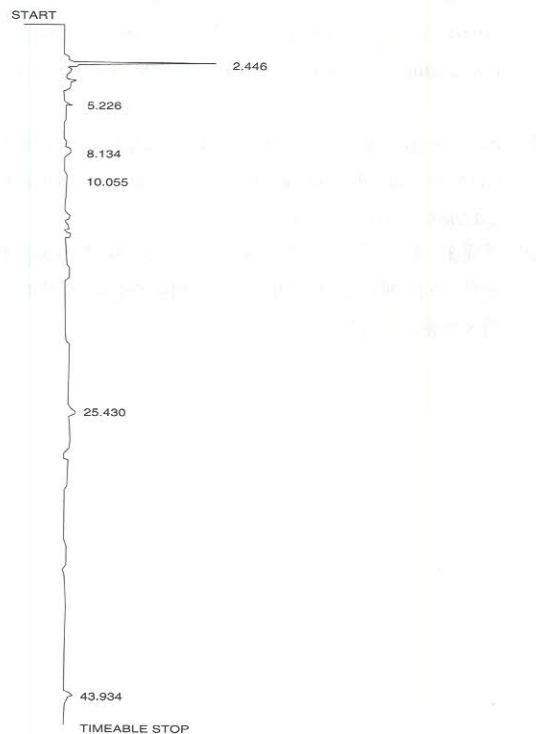
Figure 5. Chromatogram of Hexane fraction by HPLC



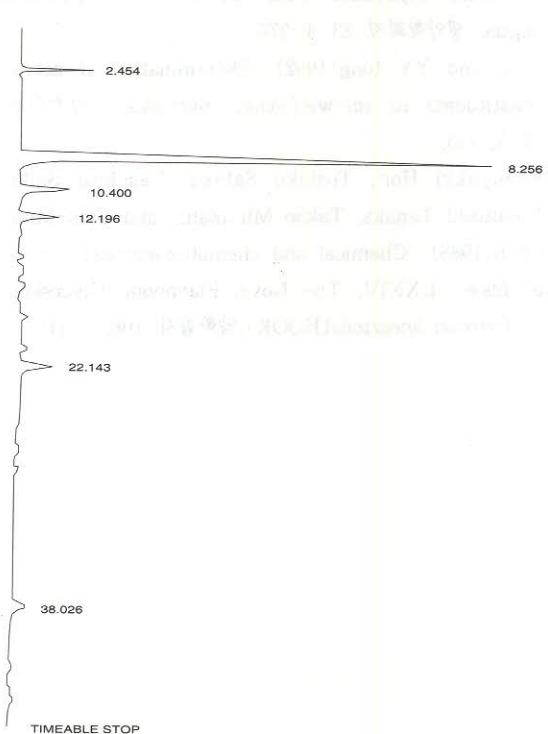
**Figure 6.** Chromatogram of Ethylacetate fraction by HPLC



**Figure 7.** Chromatogram of Butanol fraction by HPLC



**Figure 8.** Chromatogram of Water fraction by HPLC



**Figure 9.** Chromatogram of PEF 2 by HPLC

및 모든 fraction에서 농도증가에 따라 항산화 효과가 증가하였다. EtoAc fr과 BuOH fr에서는 500ppm부터 항산화효과가 양성대조약물인 silymarin보다 효과가 컸다. EtoAc fr의 효과가 가장 우수하였다.

2. 석위 EtoAc fr을 silicagel column chromatography를 실시한 각 fraction의 항산화효과를 검토한 결과는 PEF 2에서 가장 강한 환원력을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. 康秉秀, 金永坂(1994); 임상배합본초학, 영림사, 545.
2. 지형준, 이상인(1989); 약전외 한약(생약)규격집 주해서, 한국메디칼인덱스사, 215.
3. 홍원식편저(1980); 현대중공의 암치료, 영문사, 314.
4. 陸昌洙(1981); 韓國藥品植物資源圖鑑, 進明出版社, 11.
5. 小學館編(1985); 中藥大辭典 제3권, 小學館, 1409.
6. Mizuno, M., Iinima, M., Imai, T., Tanaka, M., and Min, Z.: *Zhiwu Xuebao* 28, 339 (1986); *Chem. Abstr.* 105, 13072h (1986).
7. Jae Chul Do, Keun Young and Kun Ho Sun(1992); Flavonoid Glycosides from the Fronds of *Pyrrosia lingua*, *생약학회지*, 23, 4, 276.
8. J Li and YY tong(1992); Determination of active constituents in *shi-wei(folium pyrrosiae)*, *약학학보*, 27, 2, 153.
9. Kazuyuki Hori, Toshiko Satake, Yasuhisa Saiki, Nobutoshi Tanaka, Takao Murakami, and Chiu-Ming Chen(1988); Chemical and chemotaxonomical studies of filices, LXXIV. The Novel Flavanone Glycosides of *Pyrrosia linearfolia*(HOOK), *약학잡지*, 108, 5, 417.
10. Kenneth R. Markham and Oyvind M. Andersen (1990); Kaempferol-3-O-Sophoroside-7-O-a-L-arabinofuranoside, neohesperidosides and other flavonoids from the fern *pyrrosia serpens*. *Phytochemistry*, 12, 29, 3919.
11. Hiroshi Hikino, Kanji Meguro, Tsunematsu Takemoto(1963); Isolation of Diploptene from *pyrrosia lingua* Farwell., *Chem. Abstract*, 11, 409.
12. Zheng M.(1990); Experimental study of 472 herbs with antiviral action against the herpes simplex virus, *Chung Hsi I Chieh, Ho Tsa Chih(CHINA)* 10, 1, 39.
13. 정윤주(1995); 석위의 신기능에 미치는 영향, 숙명여대.
14. B. Chance, H. Sies and A. Boveris (1979); Hydroperoxide metabolism mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59, 527.
15. 강승호(1960); 지질대사와 동맥경화증, 최신의학, 33, 715.
16. Yong Nam Han, Hee Kyung Oh (1994); Antioxidant Components of *Gardenia Fruit*, *Kor. J. Pharmacogn.* 25, 3, 226.
17. Chung Gi Lee, Nam Jae Kim(1994); Anti lipid peroxidation and Liver Protective Effects of *Polygonum aviculare L.*, *Kor. J. Pharmacogn.* 25, 1, 59.
18. Bo-Gwon Seo, Yeoun-Bong Chung Kim(1993); Effects of *Aralia elata* on Lipid peroxidation, *Yakhak Hoeji*, 3, 270.
19. 백태홍, 홍정태, 홍순영(1982); 인삼 중의 항산화물질에 관한 연구 제1보. 인삼의 각종 용매추출물의 항산화작용, *한국식품과학회지*, 14, 1, 130.