

고로쇠나무의 항산화물질 분리와 활성비교

권용수*·김명조**·최용화***·곽상수***

Activity of Antioxidative Components from the Stem of *Acer mono* Max.

Yong Soo Kwon*, Myong Jo Kim**, Yong Hwa Choi*** and Sang Soo Kwak

ABSTRACT : One flavan 3-ol derivative was isolated from the stem of *Acer mono* Max, along with two known coumarins. On the basis of spectroscopic evidence, the structures of these compounds were established as (-)-epicatechin, scopoletin and isoscapoletin. Antioxidative activity of (-)-epicatechin was examined by the DPPH free radical scavenging method. Antioxidative activity of (-)-epicatechin (RC₅₀ : 7.5 µg) was more greater than those of α-tocopherol (RC₅₀ : 12 µg) and BHA (RC₅₀ : 14 µg).

Key words : *Acer mono* Max, Aceraceae, Phenolic compounds, Antioxidative activity

緒 言

고로쇠나무(*Acer mono* Max.)는 단풍나무과(Aceraceae)에 속하는 낙엽교목으로서 소지에 털이 없다. 잎은 대생하고 등굴며 5-7개로 갈라지고 열편은 漸尖頭이며 亞心臟底 또는 원저이고 지름 7-15cm로서 뒷면 脈腋에 束生한 털이 있으며 가장자리에 톱니가 없다. 散房花序는 새가지 끝에서 잎과 같이 나오고 꽃은 일가화로써 5월에 피며 연한 황록색이고 지름 5-7mm이다. 꽃받침과 꽃잎은 각각 5개이며 8개의 수술과 1개의 암술이 있고 翅果는 길이 2-3cm로서 예각으로 벌어지며 10월에 익는다, 잎이 가을철에 황색으로 되고 이른봄에 수액을 받아 약수로 한다¹⁰. 또한 중국에서

는 그 가지와 잎을 祛風除濕, 活血逐瘀의 효능을 목표로 風濕骨痛, 腰背痛, 跌打損傷의 치료제로 사용하고 있으며 成分으로는 chrysanthemine, cyanidin-3-glucoside, keracyanin, licoricyanin, paeonin등이 보고 되어 있다¹⁹.

최근 노화와 성인병 질환의 원인이 활성 산소종에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 활성 산소종을 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 superoxid dismutase, peroxidase, catalase, glutathione peroxidase등의 항산화 효소와 tocopherol, ascorbate, carotenoid등의 천연물 유래의 저분자 항산화물질에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며^{3, 6} BHT, BHA등 합성 항산화제가 많이 개발되어 의약품과 식품 분야에서 이용되고 있다^{7, 8, 12}. 그러나 합성

* 江原大學校 藥學大學 (College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea)
** 江原大學校 農業生命科學大學 植物應用部 (College of Agriculture & Life Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea)
*** KIST 生命工學研究所 (Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P. O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea) < '97. 10. 27 接受 >

항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 발암성이 보고되고 있어²⁾ 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다. 이로 인하여 천연 항산화제의 개발이 활발히 진행되어 여러 물질들이 보고되고 있으나, 현재까지 이들 천연 항산화제의 효력, 비용면에서 합성 항산화제를 능가하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 효력이 탁월하고 보다 안전한 새로운 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다.

이에 저자 등은 고로쇠나무에 다량 함유되어 있는 Phenolic 화합물을 단리하고, 단리된 화합물들에 대한 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성을 조사 하였으며 그 결과 고로쇠나무 줄기의 MeOH 추출물중 EtOAc가용부로부터 2종의 coumarin 화합물과 강한 항산화활성을 나타내는 flavan 3-ol 계열의 화합물을 단리하였기에 이를 보고한다.

材料 및 方法

1. 재료

본 실험에 사용한 고로쇠나무 (*Acer mono* Max.)는 1997년 8월 강원도 춘천시 지암리 일대에서 채취하고 건조한 후 줄기만을 세절하여 시료로 사용하였다.

2. 방법

2-1. 기기

Mp는 Fisher-Johnes의 melting point apparatus를 이용하여 측정하였고 온도는 보정하지 않았다. IR spectrum은 Perkin Elmer 783 Infrared spectrophotometer를 사용하여 KBr disc 법으로 측정하였으며 ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AM 300을 이용하여 측정하였다. 선광도는 Polartronic Universal의 hmidt and Haensch를 사용하여 측정하였다. Mass spectrum은 Hewlett Packard MS-Engine 5989A를 사용하여 direct inlet법으로 측정하였다.

2-2. 분리

음건한 고로쇠나무 줄기를 세절한 후 MeOH 10 L를 가하여 3일간 냉침 추출하고 농축하여

MeOH ext.를 얻었다. 이 MeOH ext.를 물로 현탁시키고 *n*-Hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH순으로 분획하여 각 분획에 대한 항산화 활성 예비실험을 한 결과 EtOAc 분획이 가장 활성이 높은 (RC₅₀: 12 µg) 것으로 나타나 EtOAc분획 19g을 대상으로 Benzene : EtOAc = 1 : 1을 용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 4개의 분획을 얻었으며 이중 분획 2를 대상으로 CHCl₃ 100%에서 CHCl₃ : MeOH = 49 : 1까지 linear gradient silicagel column chromatography를 실시하여 화합물 1 (10 mg) 과 화합물 2 (26.7 mg)를 얻었고, 분획 3을 대상으로 Benzene : EtOAc : MeOH = 7 : 2 : 1을 용매로 silicagel column chromatography를 반복 실시하여 화합물 3 (255 mg)을 얻었다.

2-3. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

각 정제단계의 분획은 최⁴⁾ 등의 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 4ml의 MeOH에 녹여 1.5 x 10⁻⁴ M DPPH MeOH용액 1ml를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 (µg)을 RC₅₀으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α -tocopherol 및 BHA와 비교하였다.

結果 및 考察

화합물 1과 2는 mp, IR, UV, ¹H-NMR 등의

Table 1. DPPH free radical scavenging activities of compound 1, compound 2 and compound 3 isolated from *Acer mono* Max.

Compounds	RC ₅₀ ^{a)} (µg)
Compound 1	120
Compound 2	110
Compound 3	7.5
BHA	14
α -Tocopherol	12

a) Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min.

data와 문헌^{1, 15, 17}을 비교하여 화합물 1은 scopoletin(그림 1), 화합물 2는 isoscapoletin(그림 1)으로 그 구조를 동정하였다. 화합물 3의 UV spectrum에서 215nm와 280nm에서 흡수 극대가 나타나고, IR spectrum에서는 3400cm⁻¹의 -OH, 1620, 1520, 1460cm⁻¹의 이중결합에 의한 흡수대가 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 flavan계열의 화합물임을 추정할 수 있었다^{11, 13}.

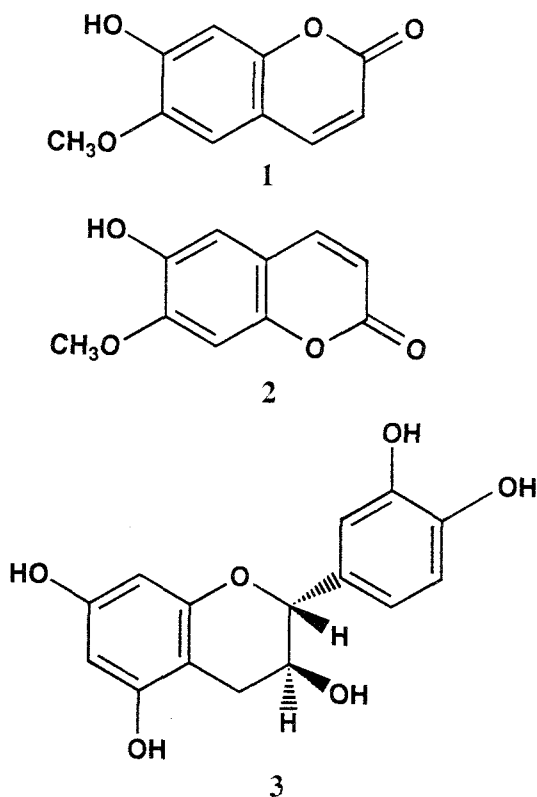


Fig. 1. Chemical structures of compound 1, 2 and 3 isolated from the *Acer mono*.

¹H-NMR spectrum의 6.15 ppm과 5.94 ppm에서 H-6과 H-8에 해당하는 signal이 $J=2.3\text{Hz}$ 의 doublet으로 각각 나타났다. 또한, 7.07 ppm에서 1H에 해당하는 H-2' signal이 $J=1.8\text{Hz}$ 의 doublet으로 나타나고, 6.82ppm에서 2H에 해당하는 H-5'와 H-6' proton signal이 multiplet으로 나타나며 mass spectrum에서 m/z 152의 fragmentation ion이 나타나는 것으로 보아 B ring의 3' 위치와 4' 위

치에 free OH가 존재함을 알 수 있었다¹³. 이와같은 사실은 ¹³C-NMR spectrum에서 C-5가 157.56 ppm에서, C-7이 157.12 ppm에서, 그리고, C-3'가 145.25 ppm에서 C-4'가 145.67 ppm에서 나타나는 것으로도 확인할 수 있었다. C-2의 proton signal이 4.2 ppm에서 $J=4.4\text{Hz}$ 의 doublet으로 나타나고, C-4의 proton signal이 2.86 ppm에서 $J=16.6, 4.5\text{Hz}$ 의 double doublet와 2.73 ppm에서 $J=16.6, 3.3\text{Hz}$ 의 double doublet으로 나타나며 C-2와 C-3의 ¹³C-NMR의 chemical shift가 79.39 및 66.91ppm에서 나타났다. 이상의 결과와 문헌^{5, 16}을 비교하여 화합물 3을 (-)-epicatechin(그림 1)으로 동정하였다.

화합물 1

백색 침상결정; mp : 204-205°; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 234, 298, 350; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3420(OH), 1685(α -pyrone C=O), 1620, 1560(aromatic C=C); ¹H-NMR (200MHz, acetone-*d*₆) ppm : 7.84(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-4), 7.19(1H, s, H-5), 6.79(1H, s, H-8), 6.17(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-3), 3.90(3H, s, OCH₃)

화합물 2

백색 침상결정; mp : 183-184°; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 234, 257, 298, 329, 350; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3420(OH), 1685(α -pyrone C=O), 1620, 1560(aromatic C=C); ¹H-NMR (200MHz, acetone-*d*₆) ppm : 7.61(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-4), 6.93(1H, s, H-5), 6.85(1H, s, H-8), 6.27(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-3), 3.96(3H, s, OCH₃)

화합물 3

백색 분말, mp : 234-235°; $[\alpha]_D = -40^\circ$ (c=0.1, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 215.5 (2.97), 280 (2.15); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH+NaOH}}$ nm (log ϵ) : 218.5 (2.99), 248sh (2.63), 289.5 (2.26); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3400(-OH), 1620, 1520, 1460(C=C); ¹H-NMR (300MHz, acetone-*d*₆) ppm : 7.07(1H, d, $J=1.8\text{Hz}$, H-2'), 6.82(2H, m, H-5', H-6'), 6.15(1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, H-6), 5.94(1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, H-8), 4.2(1H, d, $J=4.4\text{Hz}$, H-2), 3.57(1H, m,

H-3), 2.86(1H, dd, $J=16.6, 4.5\text{Hz}$, H-4a), 2.73(1H, dd, $J=16.6, 3.3\text{Hz}$, H-4b); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, acetone- d_6) ppm : 27.98(C-4), 66.91(C-3), 79.39(C-2), 95.41(C-6), 95.66(C-8), 99.76(C-9), 115.24(C-2'), 115.44(C-5'), 119.33(C-6'), 132.23(C-1'), 145.25(C-3'), 145.67(C-4'), 157.12(C-7), 157.54(C-10), 157.56(C-5); MS(direct inlet, rel.int.) : 290[M⁺]

구조가 결정된 화합물 1, 2 및 3을 대상으로 DPPH free radical scavenging method를 이용하여 항산화 활성을 측정 한 결과 table 1에서와 같이 화합물 1과 2는 BHA나 α -tocopherol보다 낮게 나타났으나 (RC₅₀ : 120, 110 μg) 화합물 3은 BHA나 α -tocopherol보다 높은 활성 (RC₅₀ : 7.5 μg)을 보였다.

이⁶⁾ 등은 고로쇠나무의 수액을 대상으로 수액의 화학적 성분, 영양가치와 사포닌 성분등을 보고하였으며, Waseem¹⁸⁾ 등은 사탕단풍나무로부터 cytokinin류, abscisic acid, indole화합물 등을 발표하였다. 그러나 고로쇠나무를 대상으로 항산화 활성을 갖는 활성물질의 규명은 본 연구가 처음이며 새로운 건강보조식품, 의약품 및 식품첨가물로서의 이용이 기대된다.

摘 要

예로부터 그 수액이 건강보조식품으로 사용되어 온 고로쇠나무의 줄기를 대상으로 항산화 활성을 가지는 성분을 찾기위하여 실험에 착수하였으며, 그 MeOH추출물의 EtOAc분획을 대상으로 column chromatography를 실시하여 scopoletin, isoscopoletin, (-)-epicatechin등 3종의 화합물을 분리하고 항산화 활성을 측정하였다. 이중 scopoletin과 isoscopoletin은 BHA나 α -tocopherol보다 활성이 약하였으나 (RC₅₀ : 120, 110 μg), (-)-epicatechin의 항산화활성 (RC₅₀ : 7.5 μg)은 BHA나 α -tocopherol보다 뚜렷하게 높았다.

引用文獻

1. Baba, K., K. Hata, Y. Kimura, Y. Mat-

suyama and M. Kozawa. 1981. Chemical studies of *Angelica japonica* A. Gray. I. On the constituents of ethyl acetate extract of root. Chem. Pharm. Bull. 29 : 2565-2570.

2. Branen, A. L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS. 52 : 59-63.

3. Chang, S. S., B. Ostric-Matijasevice, A. I. Hsieholiver and C. L. Hyung. 1977. Natural antioxidants from rosmary and sage. J. Food Sci. 42 : 1102-1110.

4. Choi, J. S., J. H. Lee, H. J. Park, H. G. Kim, H. S. Young and S. I. Mun. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. Kor. J. Pharmacognosy. 24 : 299-303.

5. Moumou, Y., Vasseur, J., Troitin, F. and Dubois, J. 1992. Catechin production by cultures of *Fagopyrum esculentum*. Phytochemistry. 31 : 1239-1241.

6. Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt. 1977. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 43 : 556-561.

7. Hatano, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species -Tinnins and related polyphenols-. Natural Medicines. 49 : 357-363.

8. Kitahara, K., Y. Matsumoto, H. Ueda and R. Ueoka. 1992. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of r-irradiated methyl linoleate. Chem. Pharm. Bull. 40 : 2208-2209.

9. 이경후, 박종영, 박관화, 박훈. 1995. 고로쇠나무 수액의 화학적 성분, 영양가치와 사포닌 함유 여부에 관한 연구. 한국임학회지. 84(4) : 415-423.

10. 이창복. 1985. 대한식물도감. 향문사. p522.

11. Marby, T., K. R. Markham, and M. B.

- Thomas. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. pp 260-273.
12. Masaki, H., S. Sasaki, T. Atsumi and H. Sakurai. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. Biol. Pharm. Bull. 18 : 162-166.
 13. Nonaka, G. H., E. Ezaki, K. Hayashi and I. Nishioka. 1983. Flavonoides Glucosides from Rhubarb and *Rhaphiolepis umbellata*. Phytochemistry. 22 : 1659-1661.
 14. Samarawera, U., S. Sotheswaran and M. U. S. Sultanbawa. 1983. 3, 5, 7, 3', 5' - Pentahydroxy and 3 α -Methoxyfridelan from *Humboldtia laurifolia*. Phytochemistry. 22 : 565 - 567.
 15. Shafizadeh, F. and A. B. Melnikoff. 1970. Coumarins of *Artemisia tridentata* sp. *Vaseya-*
na. Phytochemistry. 9 : 1311-1316.
 16. Agrawal, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier. p446.
 17. Steck, W. and M. Mazurek. 1972. Identification natural coumarins by nmr spectroscopy. Lloydia. 418-439.
 18. Waseem, M., J. R. Phipps and J. Simmonds. 1991. Plant growth substances in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) spring sap. Identification of cytokinins, abscisic acid, and an indole compound. J. Plant Physiol. 138 : 489-493.
 19. Zhu You-chang, Wu De-cheng and Li Jing-fu. 1989. Plantae Medicinales Chinae Boreali-Orientalis. Heilongjiang Science & Technology Publishing House. pp 707-708.