

수목추출물의 생리활성에 관한 연구(XⅢ)*¹ — 회화나무잎의 化學成分과 抗酸化 活性 —

박영기*^{2†} · 이학주*² · 이성숙*² · 최돈하*²

Studies on Biological Activity of Wood Extractives(XⅢ)*¹ — Chemical Components and Antioxidative activity of the leaves of *Sophora japonica* —

Youngki Park*^{2†} · Hak-Ju Lee*² · Sung-Suk Lee*² · Don-Ha Choi*²

요 약

회화나무잎에서 3종의 화합물을 단리하였으며, 기기분석 결과 hypogallic acid, kaempferol, quercetin으로 각각 동정하였다. 이들 단리 물질의 항산화 활성은 라디칼 소거능으로 측정하였으며, 항산화 활성은 100 µg/ml의 농도에서 각각 98.2%, 96.2% 그리고 90.2%를 나타내었고 이 중 화합물 1 (hypogallic acid)과 화합물 2 (kaempferol)의 경우는 합성 항산화제인 BHT보다 높은 항산화 활성을 나타내었다.

ABSTRACT

From the leaves of *S. japonica*, three compounds were isolated and identified as follows : hypogallic acid, kaempferol and quercetin. The free radical scavenging activities of the isolated compounds were 98.2%, 96.2% and 90.2% at 100 µg/ml, respectively. Compound 1 (hypogallic acid) and compound 2 (kaempferol) indicated higher antioxidative activity compared with reference compound, BHT.

Keywords: *Sophora japonica*, leaves, hypogallic acid, kaempferol, quercetin, antioxidative activity

*¹ 접수 2002년 11월 1일, 채택 2002년 12월 26일

*² 임업연구원 Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

† 주저자(corresponding author) : 박영기(e-mail: day0601@hanmail.net)

1. 서 론

활성산소는 일반적인 신진대사의 산물이며 생물분자를 공격하여 세포나 조직에 피해를 준다 (Maxwell, 1995). 이러한 활성산소는 또한 노화와 각종 성인병 질환에 관여하여 여러 종류의 질병을 야기시킨다 (Bohm, 1998). 최근 이러한 활성산소를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 연구개발이 활발히 진행되어 천연물 유래의 토코페롤이나 카르테노이드 등과 같은 항산화 물질과 합성 항산화제인 BHA나 BHT 등과 같은 많은 항산제가 알려져 있다. 합성 항산화제의 경우는 발암성이 보고되어 그 사용이 제한되어 있다 (Branen, 1975). 그러므로 효력이 우수하고 안전한 천연 항산화제의 연구가 필요하다. 본 연구는 천연 항산화 물질을 탐색하는 과정에서 회화나무 잎의 추출물이 항산화 효과가 있음을 확인하여 연구를 행하였다.

회화나무(*Sophora japonica* L.)는 콩과식물에 속하는 낙엽교목으로 그 높이는 25 m에 달하고 가지가 퍼지며 소지는 녹색이고 자르면 냄새가 난다(이, 1993). 우리나라, 중국, 일본 등지에 분포하며, 우리나라에서는 전남, 경북, 충남, 경기 등지에 널리 분포한다. 잎은 호생하고, 화기는 7-8월로 이 시기의 꽃을 한방에서는 괴화(槐花)라 하고 꽃봉오리는 괴미(槐米)라 하여 약용으로 사용한다. 꽃과 꽃봉오리는 소염성 괴미가 약으로 지혈, 토혈, 변혈 등에 이용되고 있으며, 혈압강하작용과 항염효과도 있는 것으로 알려져 있다(임, 1999).

본 연구에서는 회화나무 수피의 성분연구(Park 등, 2002)에 이어 수피의 항산화 물질을 탐색하는 과정에서 활성이 우수한 것으로 나타난 회화나무 잎의 디클로로 메탄 가용부와 에틸아세테이트가용부에서 물질을 분리하고 기기분석을 통해서 구조를 구명하였으며 분리된 성분들에 대해서는 DPPH(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거효과에 기인한 항산화 활성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

공시수종으로는 1996년 7월 경상대학교 연습림(경

남 산청군 시천면)에서 채취한 회화나무(수령: 20년, 흉고직경 : 9 cm) 잎을 사용하였다.

2.2 추출 및 용매분획

회화나무 잎을 에탄올로 상온에서 3-4일간 추출하였으며, 이를 3회 반복하여 에탄올 조추출물을 얻었다. 이렇게 얻어진 에탄올(EtOH) 조추출물에 대해서 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(DCM), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)등의 용매를 사용하여 순차 용매 분획하였다.

2.3. 기기 분석

단리한 화합물의 질량 (EI-MS)스펙트럼은 JEOL JMS-600W, 핵자기공명 (NMR) 스펙트럼(^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC)은 기초과학연구원 서울분소의 Varian UI 500을 이용하여 측정하였다.

2.4 항산화 활성 검증

각각의 농도를 가진 시료를 메탄올 4 ml에 녹인 후 1.5×10^{-4} M의 DPPH 용액 1 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 메탄올만을 사용하여 측정하였다. 항산화 활성인 자유 라디칼 소거능은 다음의 식에 의해서 구하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample at 518 nm}}{\text{Absorbance of control at 518 nm}}\right) \times 100 \quad (1)$$

2.5. 성분의 단리

2.5.1. 화합물 1

4개의 분획물 중에서 에틸아세테이트 가용부 (6.34 g)에 대해 용출용매를 MeOH-EtOH (1:1, v/v)로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피를 이용하여

5개의 분획물 (SJLE1~SJLE5)로 나누었으며 이 중에서 SJLE2 (500 mg) 분획물에 대해서 benzene-EtOAc (5:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼을 이용하여 9개의 분획물 (SJLE2-1~SJLE2-9)로 나누었다. 분획물 SJLE2-8 (30 mg)을 다시 MeOH-H₂O (7:3, v/v)을 용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 화합물 1 (8 mg)을 분리하였다.

EI-MS m/z : 154 (M^+ , molecular ion) 137, 81, 63. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.79 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, H-5), 7.41 (1H, *s*, H-2), 7.42 (1H, *s*, H-6). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 115.7 (C-5), 117.7 (C-2), 123.6 (C-1), 123.8 (C-6), 146.0 (C-3), 151.3 (C-4), 170.6 (C-7). HMBC correlations: H-5→C-1/C-3/C-4, H-6→C-2/C-4/C-7, H-2→C-6/C-4/C-7.

2.5.2. 화합물 2

DCM 가용부를 DCM-MeOH (30:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 9개의 분획물 (SJLD1~SJLD9)로 나누었으며 이 중에서 SJLD7 (900 mg) 분획물에 대해서 MeOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼을 이용하여 화합물 2 (16 mg)를 분리하였다.

EI-MS m/z : 286 (M^+ , molecular ion) 258, 229, 153, 121, 69. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.15 (1H, *d*, $J = 1.7$ Hz, H-6), 6.36 (1H, *d*, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.88 (2H, *d*, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, *dd*, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 94.4 (C-8), 99.2 (C-6) 104.5 (C-10), 116.2 (C-3', 5'), 123.7 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 137.1 (C-3), 148.0 (C-2), 158.2 (C-9), 160.5 (C-4'), 162.4 (C-5), 165.5 (C-7), 177.3 (C-4). ¹H-¹H COSY correlations: H-8↔H-6, H-2', 6'↔H-3', 5'. HMBC correlations: H-8→C-6/C-9/C-10, H-6→C-5/C-10, H-2', 6'→C-3', 5'/C-4'/C-2, H-3', 5'→C-1'/C-2', 6'/C-4'.

2.5.3. 화합물 3

DCM 가용부의 분획물 SJLD1 (7.12 g)에 대해서는

benzene-EtOAc (10:1, v/v)를 용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 5개의 분획물 (SJLD1-1~SJLD1-5)로 나누었다. 이 중 SJLD1-2 (750 mg)을 MeOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피로 화합물 3 (25 mg)을 분리하였다.

EI-MS m/z : 302 (M^+ , molecular ion), 275, 165, 153, 137, 123. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.17 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.37 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.87 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.62 (1H, *dd*, $J = 1.8, 8.5$ Hz, H-6'), 7.72 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-2'). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 94.3 (C-8), 99.2 (C-6), 104.5 (C-10), 115.9 (C-2'), 116.2 (C-5'), 121.6 (C-6'), 124.1 (C-1'), 137.2 (C-3), 146.2 (C-3') 147.9 (C-2), 148.7 (C-4'), 158.2 (C-9), 162.5 (C-5), 165.5 (C-7), 177.3 (C-4). ¹H-¹H COSY correlations: H-8↔H-6, H-2'↔H-3'. HMBC correlations: H-8→C-6/C-7/C-9/C-10, H-6→C-5/C-7/C-8/C-10, H-2'→C-1'/C-3'/C-6', H-5'→C-1'/C-3'/C-4', H-6'→C-2/C-4'.

3. 결과 및 고찰

3.1. 각 성분의 구조동정

3.1.1. 화합물 1

회화나무 잎의 에틸 아세테이트 분획물로부터 얻어진 화합물 1의 분자량은 EI-MS 스펙트럼에서 m/z 154로 나타났다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 3개의 시그널이 나타났으며, δ 6.79에 나타난 doublet 시그널은 결합정수가 8.1 Hz로 *ortho* 위치의 proton을 나타내어 5번 프로톤에 귀속하였으며 δ 7.42과 δ 7.43의 시그널은 각각 2번 proton과 6번 proton에 귀속하였다.

¹³C NMR에서 δ 170.6의 시그널은 카르보닐 탄소 (C=O)인 7번 탄소에 귀속하였으며, HMQC 스펙트럼에 의해서 δ 115.7, δ 117.7, 그리고 δ 123.6에 나타난 시그널을 각각 5번, 2번 그리고 6번 탄소에 귀속하였다. 이상의 기기 분석 결과와 문헌 data

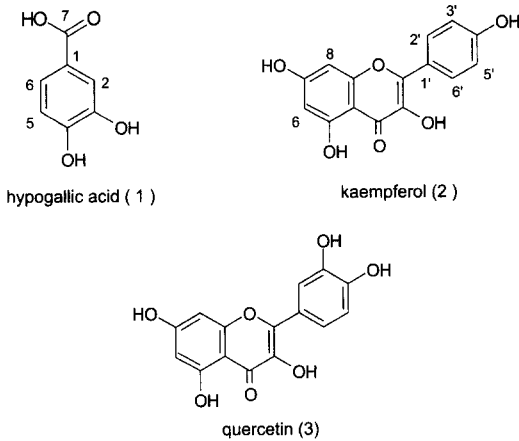


Fig. 1. Compounds isolated from the leaves of *S. japonica*.

(Charles, 1993)의 비교로부터 화합물 1은 3, 4-dihydroxybenzoic acid인 hypogallic acid (Fig. 1)로 확인 동정하였다.

3.1.2. 화합물 2

회화나무 잎의 DCM 분획물에서 분리한 화합물 2의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 6.88과 δ 8.05는 결합정수가 모두 8.6 Hz로서 방향핵환에서 *ortho* 위치에 있음을 알 수 있다. 이것은 1', 4'-2치환 대칭구조를 이루는 벤젠핵의 전형적인 시그널로서 각각 H-3', 5'와 H-2', 6'로 귀속하였다. HMQC 스펙트럼에서 이들 proton과 상관 관계를 이루는 ¹³C-NMR 스펙트럼의 시그널은 각각 δ 116.2과 δ 130.6로 3', 5'번 탄소와 2', 6'번 탄소에 각각 귀속하였다. 다른 탄소의 귀속은 HMQC 스펙트럼과 HMBC 스펙트럼의 상관 관계를 확인하여 각 탄소 시그널을 귀속하였다. 이상의 결과 화합물 2는 3, 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone인 kaempferol (Fig. 1)로 동정하였다.

3.1.3. 화합물 3

¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 6.17과 δ 6.37에 있는 두 개의 doublet 시그널은 결합정수가 모두 1.8 Hz로 *meta* 위치에 있다는 것을 알 수 있으며 각각 6번과 8

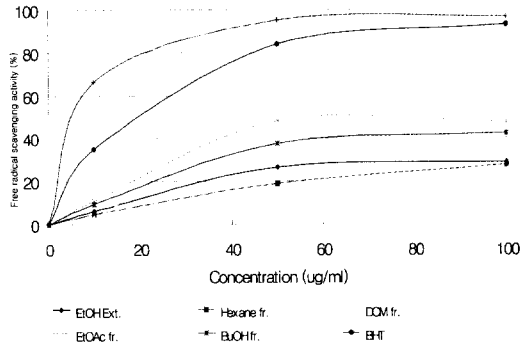


Fig. 2. Free radical scavenging activities of ethanol extracts and its solvent fractions from *S. japonica* leaves.

번 proton으로 귀속하였다. 저자장에 있는 δ 6.87, δ 7.62, δ 7.72의 시그널은 그들의 결합정수에 의해서 각각 B환의 5', 6' 그리고 2'번의 proton에 귀속하였다.

¹³C-NMR에 나타난 시그널 중에서 δ 94.3 (C-8), δ 99.2 (C-6), δ 115.9 (C-2'), δ 116.2 (C-5'), δ 121.6 (C-6')의 시그널은 HMQC 스펙트럼에 의해 각각 8번, 6번, 2', 5' 6'번 탄소에 귀속하였으며, 저자장의 δ 177.3에 나타난 시그널은 카르보닐 탄소로서 4번 탄소에 귀속하였다. 이상의 결과 화합물 3은 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone인 quercetin (Fig. 1)으로 동정하였다. 이 화합물의 NMR data는 Hwang 등(1994), Ternai 등(1976) 그리고 Agrawal (1989)의 결과와도 유사하였다.

3.2. 항산화활성

회화나무의 잎의 에탄올 조추출물과 이것의 용매분획물 그리고 분리된 3종의 화합물의 자유라디칼 소거능에 기인한 항산화 활성을 조사하였다. 에탄올 조추출물과 이들의 용매분획물에 대한 항산화 활성은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 DCM fraction이 51.7% (100 μg/ml)로 가장 강하게 나타났으며, EtOAc fraction도 47.5% (100 μg/ml)로 비슷하게 나타난 반면 나머지는 미약하게 나타났다.

이러한 결과를 기초로 하여 DCM fraction과

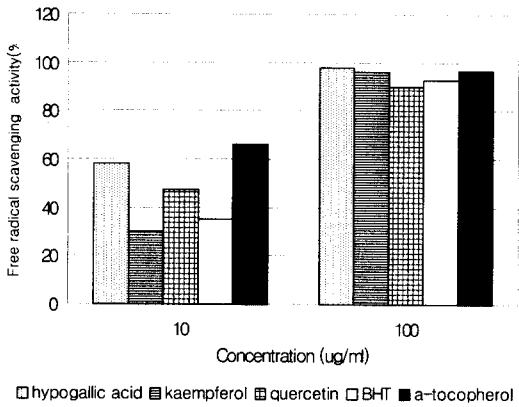


Fig. 3. Free radical scavenging activities of the compounds from *S. japonica* leaves.

EtOAc fraction에서 물질 분리를 실시하였으며 분리된 3종의 화합물에 대한 항산화 활성은 Fig. 3에 나타내었다. 3종의 화합물 중에서 화합물 1 (hypogallic acid)이 가장 강한 활성 (98.2%)을 보여 주었으며 화합물 2 (kaempferol)와 함께 합성 항산화제인 BHT (Butylated Hydroxy Toluene)보다 높은 항산화 활성을 보여주었다. Cooper-Drive 등(1998)에 의하면 환 구조에 결합된 많은 수의 페놀성 수산기를 함유하는 플라보노이드는 항산화 활성은 가지며, 플라보노이드에 당이 결합된 배당체는 이것의 아그리콘 (aglycone)과 비교하여 항산화 활성이 낮다고 하였고, Rice-Evans 등(1996)은 플라보노이드가 항산화 활성이 있는 것은 폴리페놀성 구조(C₆C₃C₆)와 4번 탄소의 카보닐기와 5번 탄소 혹은 3번 탄소의 수산기 때문이라 하였다. 또한 C환에 있는 2번 탄소와 3번 탄소의 불포화와 B환에 있는 3'탄소와 4'탄소의 orthodiphenolic structure가 항산화 활성에 영향을 미친다고 하였다. 오늘날 천연 항산화제는 많은 관심을 끌고 있으며 이 중 플라보노이드는 산소 라디칼을 소거함으로써 효과적인 항산화제로 여기고 있다. 그러므로 이들 두 종의 플라보노이드와 benzoic acid는 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 가지고 있다고 생각된다.

4. 결론

회화나무 잎의 에탄올 추출물로부터 Sephadex LH-20과 silica gel 칼럼 크로마토그래피 등을 이용하여 3종의 화합물을 분리하였으며, 단리 물질에 대해서는 NMR 및 MS 등의 기기분석을 통하여 hypogallic acid, kaempferol 그리고 quercetin으로 각각 동정하였다. 이들 화합물의 항산화 활성은 100 µg/ml의 농도에서 각각 98.2%, 96.2% 그리고 90.2%를 나타내었고 이 중 화합물 1과 화합물 2의 경우는 합성 항산화제인 BHT보다 높은 항산화 활성은 나타내었다.

참고 문헌

1. 이창복. 1993. 대한 식물도감. 향문사. 서울. pp. 466.
2. 임록재. 1999. 조선약용식물지 1. 한국문화사. 서울. pp. 209~210.
3. Agrawal, P. K. 1989. Carbone-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, New York. pp. 152~154.
4. Bohm, B. A. 1998. Introduction to flavonoids- Chemistry and biochemistry of organic natural products : Vol. 2 Harwood academic publishers, Australia, pp. 339~394.
5. Branen. A. L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 52: 59.
6. Charles, J. P. 1993. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra vol. 2 : p. 1116.
7. Cooper-Driver, G. A. and M. Bhattacharya. 1998. Role of Phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*: 49(5): 1165~1174.
8. Hwang, Y. J., S. H. Lee, S. Y. Ryu, J. W. Ahn, E. J. Kim, J. S. Ro, and K. S. Lee. 1994. Chemical study on the phenolic compounds from *Gleditsia japonica*. *Kor. J. Pharmacogn.* 25: 11~17.
9. Maxwell, S. J. 1995. Prospects for the use of antioxidants therapies. *Drugs*. 49(3): 345~361.

10. Park Y. K., H. J. Lee, D. H. Choi, Y. H. Kwon and J. S. Oh. 2002. Extractives from the Bark of *Sophora japonica* L. Mokche Konghak. 30(3): 42~47.
11. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology & Medicine* 20(7): 933~956.
12. Ternai, B. and K. R. Markham. 1976. Carbon-13 NMR studies of flavonoids I. Flavones and flavonols. *Tetrahedron*. 32: 565~579.