

화살나무 물 추출물의 구성성분과 생리활성

오봉윤 · 황수경 · 정미영 · 신흥식¹ · 박복희² · 이정호³ · 김수현*

한국기초과학지원연구원 글라이코믹스팀, ¹케비젠(주), ²목포대학교 식품영양학과,
³전북대학교 의과대학 미생물 및 면역학과

Components and Biological Activity of Aqueous Extract Isolated from Winged Stem of *Euonymus alatus*

Bong Yun Oh, Soo Kyung Hwang, Mi Young Cheong, Hong-Sig Sin¹,
Bock-Hee Park², Jeong-Ho Lee³, and Soohyun Kim*

Glycomics Team, Korea Basic Science Institute

¹Chebigen, Inc., Jeollabuk-do Center for Biotechnology & Bioventure

²Department of Food and Nutrition, Mokpo National University

³Department of Microbiology & Immunology Chonbuk National University Medical school

Although *Euonymus alatus* (EA) has been used as traditional medicine for cancer treatment, exact substances involved in curing of the disease are not yet known. Free radical scavenging and reactive oxygen species (ROS) removal activities of aqueous extract components isolated from winged stem of EA in animal cell line were investigated. Aqueous extract of EA (AEEA) was fractionated by ultrafiltration. All fractions mainly consisted of polysaccharide (44.8%), protein (2.1%), small amounts of phenol compounds and organic acids. Antioxidant activity of AEEA increased depending on concentration fractions, as determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. ROS removal activity was visualized in Chinese hamster ovary cell line using laser scanning confocal microscope, and AEEA activity increased in order of F IV > F III > F I > F II. These results suggest AEEA has bioactive carbohydrates with potentials as functional foods and antioxidants.

Key words: *Euonymus alatus*, bioactive carbohydrates, free radical scavenging activity, ROS removal activity

서 론

화살나무(*Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb.)는 노박덩굴과의 낙엽활엽관목으로 우리나라, 일본, 중국 등에 분포하며, 높이는 1-3 m 정도로 줄기에 2-4개의 날개처럼 코르크질이 붙어 있는 특징을 갖는다. 줄기에 붙어 있는 이 날개의 생김새가 특이하여 귀전우(鬼箭羽) 또는 신전목(神箭木)이라고도 불린다(1-3).

예로부터 민간에서는 화살나무의 줄기나 날개를 구충제, 진통제, 지혈제로 사용하였으며, 잎은 이른 봄에 된장국이나 무침을 해 먹었는데 나물 이름은 훗잎이라고 한다. 한방에서도 화살나무는 혈액 순환을 좋게 하며, 염증을 없애 주는 효과가 있어 고약을 만들어 피부병 치료제로 썼으며, 정신을 안정시키는 효과가 있어 정신불안 치료제로, 월경불순 및 산후에 어혈로 인한 복통 등에 치료효과가 있어 여성의 자궁 출혈을 치료하는 약으로 사용하였으며, 위암, 식도암 등 갖가지 암에 효과

가 있다고 알려져 있다(4). 또한, 혈당을 낮추고, 인슐린 분비를 높여 당뇨병에 효험이 있으며, 고혈압, 동맥경화, 기침가래를 동반하는 천식에 치료 효과가 있다고 알려져 있다(3,5).

지금까지 보고된 바로 화살나무에 함유된 성분은 steroid 계 화합물인 β -sitosterol, β -sitosterone, stigmast-4-en-3,6-dione, epipriedelanol, friedelin이 있으며, alkaloid 계 화합물로는 nicotinamide, alatusamine, evomine, evoline, evoevoline, evoline, evonimine, evonine, evopine, wilfordine이 있고, phenol계 화합물로는 dulcitol, quercetin이, glucosides 계 화합물은 evomonoside, glucoevonoloside, evonoloside 등이 있다(1,6).

Cha 등(7)은 화살나무 줄기에서 다양한 유기용매를 이용해 추출한 분획물이 사람의 간암세포인 Hep3B에서 세포독성효과가 있으며, MMP-9(matrix metalloproteinase-9) 활성을 저해하는 효과가 있다고 보고하였다. Lee 등(8)은 동물실험에서 화살나무 추출물이 종양세포의 증식을 억제하는 동시에 면역계를 활성화시키므로써 항암효과를 입증하였다. 또, 화살나무 추출물은 각 분획물에 따라서 히스타민 유리억제, 염증성 사이토카인의 분비 억제 및 세포의 안정화 작용을 가지고 있음을 구명하였다.

이제까지의 연구 보고들은 대부분 화살나무의 유기 용매 추출물에서 이루어진 결과들이나, Chung 등(2)은 화살나무 물 추

*Corresponding author: Soohyun Kim, Glycomics Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea
Tel: 82-42-865-3425
Fax: 82-42-865-3419
E-mail: shkim@kbsi.re.kr

출물을 복막 macrophage에 처리했을 때 NF-κB(nuclear factor-κB)를 활성화시켜서 NO(nitric oxide)와 TNF-α(tumor necrosis factor-α)의 생성을 증가시킴으로써 항암치료 효과가 있다는 것을 임상적 결과로 제시하였으며, ¹H-NMR 분석에 의해 triterpene 류의 friedelane와 olefinic group이 활성 분획임을 제시한 바 있다. 그러나 이는 전체 추출물의 일부가 관여하는 것으로 화살나무 추출물에서 아직 알려져 있지 않은 구성성분을 조사해야 하며, 이를 더 자세하게 분리·정제하여 그 특징을 검토하는 것이 필요하다고 제안하였다. Chung 등(2)이 화살나무의 열수 추출물에 대한 생리활성을 보고하였으나 1 kDa 이하의 저분자량 화합물들에 대한 것이며, 이들 중에서 일부 화합물들은 약리작용과 함께 독성을 가지고 있어 생리활성이 보고되어 있음에도 의약품으로 승인을 받지 못하는 실정이다. 화살나무 물 추출물에는 아직 구체적인 화학구조나 특성이 알려지지 않은 고분자 다당체를 다량 함유하여 여러 가지 생리활성을 나타낼 것으로 추측된다.

이에 본 연구는 화살나무의 줄기와 날개를 열수 추출하여 분자량 크기별로 분리한 각 분획물의 성분조성을 분석 하였고, 이들 각 분획물의 생리활성을 알아보기 위해 유리 라디칼 소거능과 동물 세포에서 활성산소종 제거능을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 준비

실험에 사용된 화살나무의 줄기와 날개는 2004년 7월에 전북 전주시 재래시장에서 구입하여 먼지 등을 제거하기 위해 물로 수세한 후 60°C 열풍 건조기에서 24시간 건조한 후, 건식 분쇄기(CR-581W, Samsung Electrics Co., Korea)로 마쇄하여 표준체 150 mesh(Standard testing sieve, ITOH Co., Japan)로 통과시킨 균질한 분말시료를 추출용 시료로 사용하였다.

물 추출물 제조 및 한외여과

화살나무 분말 시료에 10배의 증류수를 가해 100°C에서 10시간 추출한 다음 여과하여 회전 감압농축기(Eyela N-N-series, Japan)로 농축시켜 화살나무 물 추출물을 제조하였다. 농축정도는 시료가 paste 상으로 수기 외벽에 붙어 흘러내리지 않을 정도까지 하였으며, 4°C에 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

한외여과는 물 추출물의 중량에 5배에 해당하는 이차 증류수를 가하여 균질화한 후 stirred ultrafiltration cell(Model 8400, Milipore Co., USA)을 이용하여 추출물을 분자량에 따라서 F I(>1 kDa), F II(1-3 kDa), F III(3-10 kDa), F IV(<10 kDa)의 단계별로 분리하였다. 각 분획물은 동결건조기(Freezemoile 12SL, VirTis Co., USA)에서 24시간 동안 건조한 후 밀봉하여 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

분획물의 정성 분석

분획물에 함유된 특정한 성분을 예비적으로 조사하기 위해 일정량의 각 시료에 대하여 유효성분이 어느 분획에 있는지 확인하고자 먼저 천연물 예지 시험법(9)을 이용한 정성 반응을 실시하였다.

탄수화물: 각 분획물 0.1 g을 취해 2 mL 물에 녹인 후, 20% α-naphthol-ethanol 용액 1-2방울을 가한 후 진한 H₂SO₄를 시험관 기벽을 통하여 가할 때 경계면에 적자색환이 나타나는지를 관찰하였다.

환원당: 분획물 0.1 g을 취해서 2 mL의 물에 녹인 후 Fehling 시약 5 mL을 가하여 가열했을 때 적색 침전이 생성되는지를 확인하였다. Fehling 시약은 A액(CuSO₄ · 5H₂O 7g을 물 100 mL에 녹임)과 B액(sodium potassium tartarate 35g, NaOH 100g을 100 mL에 녹임)을 각각 동일 양을 시험 직전에 혼합하여 사용하였다.

단백질 및 펩타이드: Biuret 반응을 실시하기 위해 각 분획물 0.1 g을 취해 물 2 mL에 녹이고, 10% NaOH 1 mL를 가하여 alkali 성으로 한 후, 1% CuSO₄를 1-2방울 가했을 때 청색에서 적자색으로 변하는지를 관찰하였다.

유기산: 분획물 0.1 g을 취해 2 mL 물에 녹인 후, 5% AgNO₃ alcohol용액을 가할 때 혼탁하거나 침전이 생기는지 여부를 관찰하였다.

페놀 화합물: 각 분획물 0.1 g을 취해 5 mL의 물에 녹인 후, 10% FeCl₃-ethanol 용액 1-2 방울을 가할 때 자색 및 청색의 정색반응을 나타내는지 관찰하였다.

스테로이드, 테르페노이드 및 사포닌: Libermann-Burchard 반응을 실시하기 위해 시험관에 무수초산 0.5 mL을 떨어뜨리고 분획물 시료 0.5 mL을 가하여 용해한 후 진한 H₂SO₄ 1 mL을 가하여 vortex mixer로 섞었을 때, 적자색으로 정색화되는지를 관찰하였다.

탄수화물 분석

총당은 phenol-H₂SO₄법(10)에 의해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 당으로 maltose(Sigma Co., USA)를 이용하였다.

다당체 분석은 각 시료에 2-aminobenzamide(2-AB)(Oxford GlycoSciences, Bedford, UK)로 형광 표지하여 SpeedVac(SC 210A Savant Co., USA)에서 건조한 다음 NP-HPLC(normal phase high performance liquid chromatography, Waters Co., USA)로 분석하였다. GlycoSep N column(4.6×250 mm), (Glyko, Milford, MA)으로 30°C에서 분리하였으며, 이동상으로 A 용매는 50 mM ammonium formate(pH 4.4), B 용매는 100% acetonitrile로 하여 0.4 mL/min의 유속으로 분석하였으며, 초기 용매 조성은 20% A 용매에서 시작하여 150분에 A 용매 58%까지 선형구배 조건으로 분석하였다(11). 표준 시료로 2-AB를 표지한 dextran을 같은 조건에서 분석하여, 이의 유지 시간과 glucose unit(GU) 값으로부터 소당류 용출에 대한 GU 곡선식을 얻었다.

유리당, 아미노당, 가수분해 구성당은 high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection(HPAEC-PAD)을 이용하여 Kim 등(11)의 방법으로 분석하였다. 표준 당은 Sigma사에서 구입한 fucose, glucose, galactose, mannose, glucosamine, galactosamine으로 하였다.

총단백질 및 아미노산 분석

총단백질 함량은 Bradford 법(12)에 의해 BSA(Bovine serum albumin, Sigma Co., USA)을 표준시료로 하여 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 구하였다.

아미노산 조성은 Pico-Tag 아미노산 분석방법(13)에 따라 각 분획물의 10 mg 정도를 취하여 phenylisothiocyanate(PITC)로 유도체화시킨 후 HPLC(Model M990, Waters Co., USA)로 분석

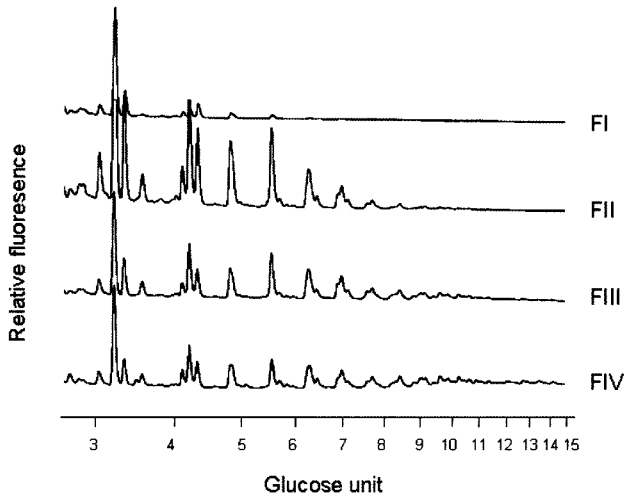


Fig. 1. Glycan profile for each fraction of *Euonymus alatus*. Polysaccharides were labelled with 2-AB and separated on GlycoSep N column (11). Glycan elution in each fraction of *Euonymus alatus* was predicted by comparison with dextran ladder labelled with 2-AB (28). Fraction name : See Table 1.

하였다. 아미노산 표준물질은 amino acid general standard(Sigma Co., USA)를 사용하였다.

분획물의 유리 라디칼 소거능

산화적 스트레스의 원인이 되는 유리 라디칼에 대한 소거능은 Aldrich 사에서 구입한 시약 1,1-diphenyl 2-picryl-hydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다(14).

분획물의 reactive oxygen species(ROS) removal activity

CHO-k1(Chinese hamster ovary) 세포를 한국 세포주 은행에서 분양 받아 25 mM Hepes(pH 7.4), 10%(v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 함유한 Dubelcco's modified Eagle's 배지에 CHO-k1 세포를 round coverslip에 분주하고 36.5±0.5°C의 CO₂ incubator에서 3일 동

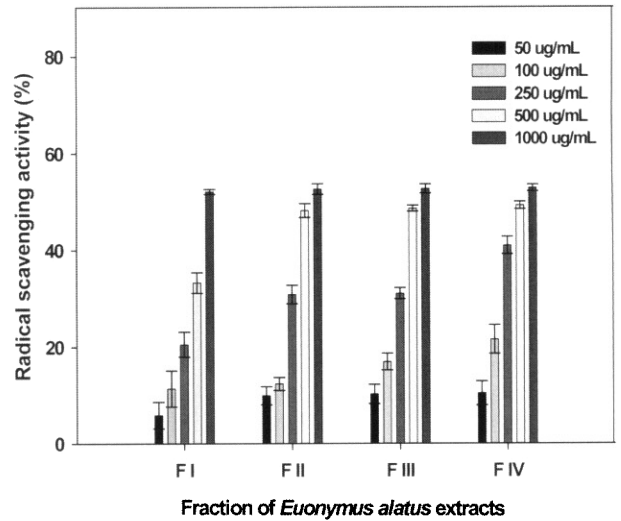


Fig. 2. Free radical scavenging activity for each fraction of *Euonymus alatus*.

Free radical scavenging activities of *Euonymus alatus* extracts treated with different concentrations of ultrafiltered fraction (F I-F IV) were assayed by DPPH (1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl) method (14). Fraction name: See Table 1. Mean ± standard deviation (n=3).

안 정상 배양하여 실험에 사용하였다. CHO-k1 세포내에서 화살나무 추출물의 ROS 저해 효과는 Lee 등(15)의 방법을 변형하여 5 µg/mL apo-transferrin, 1 mg/mL bovine serum albumin, 25 mM Hepes(pH 7.4), 2 mM glutamine, 100 µg/mL streptomycin을 포함하고 phenol red가 없는 serum-free medium(SFM)인 Dubelcco's modified Eagle's 배지를 사용하여 측정하였다. 12-well에 round coverslip을 각각 넣고 세포가 100개 정도 되도록 SFM으로 씻어 낸 후 SFM 880 µL와 화살나무 추출물을 각 농도별로 100 µL를 처리하여 37°C의 CO₂ incubator에서 25분간 안정화시킨 후, 10 µM H₂O₂를 10 µL 넣어 반응시키고, 2분 후에 10 µM 2,7-dichlorodihydrofluoresce in diacetate(DCFH-DA)를 10 µL 넣은 후 3분 동안 반응시켜 형광 발색시킴으로써 488

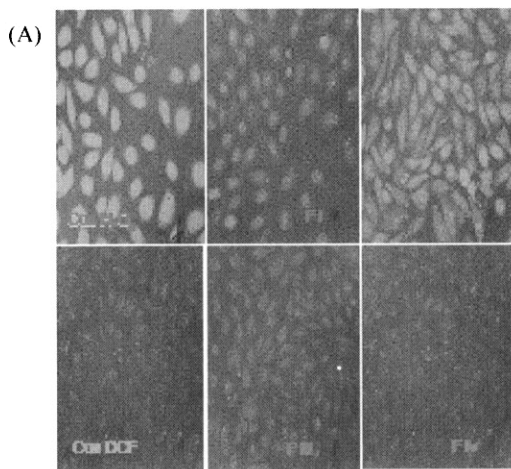


Fig. 3. Reactive oxygen species (ROS) removal activity for each fraction of *Euonymus alatus*.

A: ROS removal activity of CHO-k1 cells were determined by a confocal microscope (15). CHO-k1 cells were treated with each fraction (100 µg/mL) of *Euonymus alatus* extracts. B: ROS removal activities were quantified based on observation by confocal microscope with different concentrations of F I-F IV. Fraction name: See Table 1. Mean ± standard deviation (n = 10).

nm laser scanning confocal microscope(LSM410, Carl Zeiss Co., Germany)를 이용해 ROS 제거 활성 정도를 관찰하였다. 각 농도별로 화살나무 추출물을 처리한 구와 처리하지 않은 positive 대조구(Fig. 3-A, (Con H₂O₂)), H₂O₂를 처리하지 않고 DCFH-DA만 처리한 negative 대조구(Fig. 3-A, (Con DCF))로 하고 negative 대조구의 형광발색정도를 0, positive 대조구의 형광발색정도를 100으로 하여 각 분획물 처리구 세포에서 나타내는 형광 발색 강도를 비교하여 나타냈다.

결과 및 고찰

분획물의 한외여과 분획법 수율

화살나무의 줄기와 날개를 열수 추출하여 성분조성과 생리활성에 대하여 조사하기 위해 분자량 크기에 따라서 한외여과하여 단계별로 분리한 분획물의 F I-F IV 수율은 Table 1과 같다. 네 분획물의 수율은 F IV 분획물이 0.76으로 가장 높았으며, F I은 0.13이었고, 그 다음 F II는 0.07, F III은 0.04로 화살나무의 줄기 및 날개에서 열수 추출한 분획물의 상당부분이 10 kDa 이상의 고분자 화합물 이었다. 한외여과법의 특성상 완벽하게 분자량대로 분획될 수는 없었으나 3회 이상 실시하였을 때 상당히 재현성 있게 나타남을 확인할 수 있었다.

분획물의 정성분석

분획물 구성 성분을 조사하기 위해 천연물의 예지 시험법으로 각 분획물의 일정량을 취해 정성분석을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 네 분획물 모두 진한 탄수화물 정색반응을 보였으며, 환원당 정색반응도 나타냈다. 단백질 및 펩타이드 정색반응도 모든 분획물에서 나타났으며, 그 중에서 특히 F IV 분획물에

Table 1. Fractionation yield by ultrafiltration with aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Fraction	Yield (g/g) ¹⁾
F I (M.W ²⁾ : >1 kDa)	0.13 ± 0.01 ³⁾
F II (M.W : 1-3 kDa)	0.07 ± 0.00
F III (M.W : 3-10 kDa)	0.04 ± 0.01
F IV (M.W : <10 kDa)	0.76 ± 0.02
Sum of crude extract	1.00

¹⁾g fraction by ultrafiltration/g solids of aqueous extracts.

²⁾Molecular weight.

³⁾Mean ± standard deviation (n=3).

Table 2. Qualitative analysis of each fraction obtained from aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Compounds	Fraction	Crude extract	F I	F II	F III	F IV
Carbohydrate		+++ ¹⁾	+++	+++	+++	+++
Reducing sugar		++ ²⁾	+ ³⁾	+	+	+
Protein, Peptide		+	+	+	+	++
Organic acid		+	+	+	- ⁴⁾	-
Phenol compounds		+	-	+	+	+
Steroid, Terpenoid Saponin		-	-	-	-	-

¹⁾Relative thick color reaction, ²⁾Relative medium color reaction, ³⁾Relative weak color reaction, ⁴⁾Non-color reaction or abnormal reaction.

Fraction name: See Table 1.

서 상대적으로 강한 반응을 보였다. 유기산 함유 여부는 F I 분획물에 중간정도의 정색반응이 나타났으며, F II 분획물에도 약한 반응을 나타내서 소량 함유하는 것으로 보이나 F III와 F IV 분획물에서는 정색반응을 나타내지 않았다. 페놀 화합물의 정색반응은 F IV 분획물에서 중간 정도의 반응을 보였고, F II와 F III 분획물에서는 약한 반응을 보였으며 F I에서는 반응하지 않았다. 스테로이드, 테르페노이드 및 사포닌의 정색반응은 모든 분획물에서 적자색을 나타내지 않았으며, 진한 H₂SO₄를 가했을 때 모두 갈색으로 변했다.

이러한 결과는 화살나무의 물 추출물의 분획물을 구성하는 주요 성분이 공통적으로 탄수화물이며, 소량의 단백질이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 이에 각 분획물의 구성요소를 더 자세히 조사하기 위해 총당 및 총단백질의 함량과 이들을 조성하고 있는 단당류 및 아미노산 분석을 하였다.

총당 및 총단백질

화살나무 열수 추출물의 총당과 총단백질 함량을 조사한 결과는 Table 3에 나타냈다. 조 추출물의 총당 함량은 448 mg/g이었으며, 각 분획별로는 F III이 528 mg/g로 가장 높았으며, F IV는 465 mg/g, F II는 451 mg/g이었고, F I는 317 mg/g로 가장 낮았다. 화살나무의 조 추출물의 총단백질 함량은 21 mg/g이었으며, 분획별로는 F IV에서 107 mg/g으로 가장 높았으며, F III은 24 mg/g, F II는 22 mg/g로 비슷한 수준이었으며, F I는 3 mg/g으로 가장 낮았다. 조 추출물에서 총당과 총단백질의 존재 비율은 0.96 : 0.04로 대부분이 다당체임을 알 수 있었다.

분획물의 유리당 및 구성 단당류 분석

화살나무 열수 추출물의 유리당 조성은 Table 4와 같이 조 추출물에서 glucose가 45.69 mg/g로 가장 높았으며, galactose가 5.94 mg/g, fucose는 0.61 mg/g 함유하였다. 분획별로는 F I이 glucose, galactose, fucose 모두 다른 분획물에 비해 가장 높게 함유하였으며, 분자량이 큰 분획일수록 예상대로 유리당 함량

Table 3. Main composition of each fraction obtained from aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Fraction	Carbohydrate (mg/g)	Protein (mg/g)
Crude extract	448.23 ± 10.43	21.00 ± 1.45
F I	317.44 ± 5.34	3.37 ± 0.12
F II	451.42 ± 8.69	22.25 ± 4.30
F III	528.87 ± 4.56	24.38 ± 3.52
F IV	464.93 ± 8.20	107.42 ± 3.64

Fraction name: see Table 1.

Mean ± standard deviation (n=3).

Table 4. Free sugar content of each fraction obtained from aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Free sugar content (mg/g)					
Monosaccharide composition	Crude extract	F I	F II	F III	F IV
Fucose	0.61	1.38	0.23	0.16	0.67
Galactose	5.94	6.82	4.62	5.17	3.72
Glucose	45.69	47.68	45.78	37.31	19.55
Total free sugars	52.24	55.88	50.63	42.64	23.94

Fraction name: see Table 1.

Table 5. Monosaccharide composition of each fraction obtained from aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Monosaccharide	Contents (mg/g)				
	Crude extract	F I	F II	F III	F IV
Fucose	5.48	2.49	2.25	4.24	6.34
Galactose	38.34	21.26	35.84	46.04	50.37
Mannose	3.08	1.94	2.06	3.09	6.32
Glucose	220.68	135.35	157.76	217.02	172.63
Galactosamine	0.14	0.00	0.15	0.34	1.74
Glucosamine	12.70	4.12	20.14	21.25	18.89
Total	279.42	165.16	18.20	291.98	256.29

Fraction name: see Table 1.

이 더 낮았다. 이는 한외여과에 의한 추출물 분획이 정확히 수행되었음을 보여주는 결과이다.

네 분획물을 각각 산가수분해하여 이들의 구성당을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 조 추출물의 구성당 중에 중성당은 mannose : fucose : galactose : glucose가 0.01 : 0.02 : 0.14 : 0.83의 비율로, 아미노당은 galactosamine : glucosamine이 0.01 : 0.99의 비율로 구성되어 있었으며, 전체 구성당 함량에서 중성당 : 아미노당은 0.96 : 0.04의 비율로 조성된 다당체였다.

분획별로 살펴보면, F III는 291.98 mg/g로 조성당 함량이 가장 높았으며, 중성당과 아미노당의 비율은 0.93 : 0.07이었고, F IV는 266.29 mg/g로 중성당과 아미노당의 비율은 0.92 : 0.08이었으며 아미노당의 존재비율이 가장 높았다. 그 다음으로 F II는 218.20 mg/g로 중성당과 아미노당의 비율은 0.91 : 0.09이었으며, F I은 171.16 mg/g로 중성당과 아미노당의 비율은 0.98 : 0.02로 네 분획물 중에 아미노당 함유 비율이 가장 낮았다.

이러한 결과로 화살나무 열수 추출물의 주요 구성성분 중에는 다른 식물 추출물에 비해 특이하게 중성당 중에서 fucose를 함유하는 것과 아미노당 중에서 glucosamine과 galactosamine을 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다. 식품 및 의약계에서는 이들 단당류들의 생체 기능성이 잘 알려져 있어서(16-18) 새우나 게 등 갑각류 껍질에서 추출·분리하여 기능성 식품 및 의약품의 소재로 제조·가공하여 이미 이용을 하고 있는 실정(19-21)에서 화살나무 열수 추출물은 식물성 다당체로서 인체내 생리활성(22)을 나타낼 가능성이 높으며, 구체적인 다당체 화합물의 구조와 세로 및 동물에 대한 실험 결과를 제시한다면 이를 이용해 건강기능(보조)식품을 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

분획물의 아미노산 분석

화살나무 열수 추출물의 아미노산 조성을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 분획별로 살펴보면 분자량이 큰 분획일수록 아미노산 함량이 더 높게 나타나 F IV는 33 mg/g로 가장 높았으며, F III는 17 mg/g, F II는 13 mg/g이었고, F I는 6 mg/g로 가장 낮았다.

전 분획물에 함유된 아미노산 종류와 함량은 Glu > Asp > Pro > Gly > Leu > Val > Ser > Ala > Thr > Ile > Phe > Cys > His > Arg > Met > Lys > Try > Trp > Cys2의 순서로 19종의 아미노산을 함유하는 것으로 나타났으며, 특히 Glu와 Asp의 산성아미노산의 함량이 높았는데, 이 중 Asp의 높은 함량은 분석 중에 Asn의 -NH₃기가 가수분해되면서 Asp와 겹쳐져서 분리되어 나오는 것으로 예측할 수 있다. 중성 아미노산은 비교적 고부 함유되어 있었으며, 상대적으로 Arg이나 Lys의 염기성 아미노산 함량은 낮았다.

Table 6. Amino acid composition of each fraction obtained from aqueous extracts of *Euonymus alatus*

Amino acid	Contents (mg/g)				
	Crude extract	F I	F II	F III	F IV
Cys	0.31	0.20	0.31	0.31	0.26
Asp	1.92	0.84	1.73	2.12	4.15
Glu	4.44	2.20	4.19	4.69	8.37
Ser	0.74	0.19	0.59	0.90	2.56
Gly	1.10	0.25	0.78	1.02	2.59
His	0.28	0.08	0.26	0.30	0.83
Arg	0.24	0.09	0.25	0.48	0.78
Thr	0.65	0.11	0.52	0.78	1.86
Ala	0.73	0.36	0.70	0.76	1.25
Pro	1.49	0.78	1.47	1.51	2.52
Tyr	0.05	0.02	0.06	0.05	0.08
Val	0.93	0.20	0.80	1.05	2.37
Met	0.18	0.05	0.17	0.18	0.51
Cys2 ¹⁾	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Ile	0.65	0.10	0.54	0.75	1.59
Leu	0.93	0.20	0.78	1.08	2.29
Phe	0.54	0.12	0.47	0.60	1.10
Trp	0.00	0.00	0.01	1.12	0.05
Lys	0.14	0.01	0.10	0.18	0.76
Total	15.32	5.80	13.73	17.88	33.93

¹⁾Cystine.

Fraction name: See Table 1.

이러한 아미노산 조성은 항암효과가 있다고 알려져 있는 담자균류 중에 구름버섯의 열수 추출물에서 분리한 단백다당체에 결합된 단백질(23)과 비슷하며, 그 외 약용 버섯이나 식물에서 발견되는 polysaccharide-K(PSK) 또는, krestin의 당질에 결합된 단백질의 아미노산 조성(24-27)과도 비슷하였다.

분획물의 다당체 분석

화살나무 열수 추출물의 주요 구성성분은 다당체로서 크기와 구조를 알아보고자 각 분획물 시료에 2-AB를 표지하여 NP-HPLC를 이용해 다당체를 분석하였다. 이를 위해 먼저 표준물질로 2-AB가 표지된 dextran을 분석하여 dextran ladder로 추세를 구한 후, 각 분획물을 분석하여 얻어진 머무름 시간 값을 이 식에 적용해 구하였다. 각 피크의 GU 값과 소당체 표준물질의 데이터베이스(28)에 나와 있는 GU 값을 비교하여 몇 가지

소당류를 예측할 수 있었지만, GU값이 상대적인 값이기 때문에 본 실험에서 정확한 소당체 구조를 해석하기에는 한계점이 있었다.

하지만 네 분획에서 많은 GU 값이 공통적으로 존재하는 것으로 볼 때 같은 종류의 소당체가 존재하며, 전체적인 중합도는 다른 것으로 판단된다. 각 분획물의 총 분석 시간은 140분이었으며, 머무름 시간 40분 이전에 분리된 피크는 단당류이며, 그 이후에 나오는 피크의 머무름 시간을 추세식에 적용하여 소당체의 GU 값을 계산하였다.

F I의 크로마토그램(Fig 1)에서 구해진 GU 값은 2.70-7.81로 네 분획물 중에서 가장 낮았으며, 대부분의 피크가 40분 이전에 분리되어 나오는 것으로 보아 단당류가 주요 성분임을 알 수 있었다. F II는 2.70-13.21로 비교적 100분 이내까지 피크가 분리되어 나타났으며, F III는 2.69-15.51이었으며, F IV는 2.69-17.80로 네 분획물 중에서 가장 높았으므로 다른 분획물에 비해 분자량이 크며, 중합도가 큰 다당체임을 예측할 수 있었다.

각 분획물에 대한 정확한 구조해석과 정량적 분석을 위해서는 더 세부적으로 분리해서 적절한 효소(exoglycosidases)를 처리하여 분석하는 방법(11)과 복잡한 당 사슬에 대한 구조를 밝히기 위해서는 methylation한 후 GC-MS로 분석(22)하는 것이 적당할 것으로 사료된다.

분획물의 유리 라디칼 소거능

화살나무 열수 추출물의 네 분획물을 각 농도별로 처리하여 DPPH 유리 라디칼 소거능을 조사한 결과는 Fig. 2과 같다. 분획물을 농도별로 50-1,000 µg/mL 처리했을 때 농도에 비례하여 유리 라디칼 소거능 활성을 나타냈다. 특히, F IV는 50-250 µg/mL 처리까지 다른 분획물에 비해서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 500 µg/mL 처리 농도에서부터는 더 이상 큰 차이를 보이지 않았고 거의 비슷한 수준으로 나타나 F IV의 분획물에 대한 DPPH 유리 라디칼 소거 활성이 포화되는 것으로 판단된다. 분획물 F III와 F II의 유리 라디칼 소거능은 거의 비슷한 수준이었다. 네 분획물 중 F I은 가장 낮은 유리 라디칼 소거능을 나타냈으나 처리된 농도에 비례해서 활성을 나타냈으며, 1,000 µg/mL 처리했을 때에는 52% 소거능으로 다른 3개의 분획물과 비슷한 수준으로 나타났다.

지금까지 식물체의 생리활성 물질에 관한 연구들은 주로 유기 용매 추출물 성분 중에서 페놀 화합물(29), terpenoids(30), alkaloids(30) 및 인돌 화합물(31) 등의 저분자 화합물에 관한 항산화성을 보고하였다. 최근, 생리활성이 있는 다당체(bioactive carbohydrate)에 대한 연구가 일부에서 이루어지면서 식물체를 구성하는 성분인 다당체의 항산화성에 관한 연구도 보고되었는데(32-34), 본 연구에서도 화살나무 열수 추출물에 함유된 주요 구성성분인 단백질이 결합된 고분자의 다당체도 항산화성이 있는 것으로 사료된다.

분획물의 ROS removal activity

화살나무 열수 추출 분획물이 활성산소종 제거능 효과가 있는지 알아보기 위해 CHO-k1 세포에 각 분획물을 농도별로 처리하였다(Fig 3). Fig. 3A는 분자량 크기별로 분리한 F I-F IV를 CHO-k1 세포에 각각 100 µg/mL 농도가 되게 처리하여 공초점 현미경으로 관찰했을 때 활성산소종 제거능에 따른 형광발색정도를 나타낸 사진이다. 분획물을 처리하지 않은 positive 대조구(Con H₂O₂)에서 H₂O₂를 처리하지 않는 negative 대조구(Con DCF)의 형광발색 강도의 차이를 100으로 하여 Fig. 3B에

네 분획물을 각 농도별로 처리했을 때 CHO-k1 세포에서 화살나무 분획물이 가지는 활성산소종 제거능의 변화를 나타냈다.

농도별로 분획물을 처리한 CHO-k1의 활성산소종 제거능을 살펴보면 1-100 µg/mL까지는 처리한 분획물의 농도가 증가할수록 이에 비례하여 활성이 상승되는 것으로 나타났으나 100 µg/mL 이상의 처리 농도에서는 활성이 완만해지면서 거의 변화를 보이지 않아 활성이 포화되는 한계점에 이르는 것으로 판단된다. 각 분획물을 처리했을 때 분자량이 10 kDa 이상이며 단백질이 비교적 많이 함유된 F IV에서 가장 높은 활성을 보였으며, 그 다음 F III였고, F I이었으며, F II는 가장 낮은 활성을 나타냈다.

이상의 결과, 탄수화물과 단백질 함량이 비교적 높은 F IV에서 항산화능과 활성산소종 제거능이 가장 높음을 알 수 있었다. 그러나 다른 분획(F I-F III)에서도 정도의 차이는 있지만 활성을 보였다. 화살나무 열수 추출물 중에는 항산화능과 활성산소종 제거능을 나타내는 물질이 여러 가지 있을 것으로 추정되며, 그 중 F IV에는 조성이나 분자량 크기로 보아 생리활성을 가지면서 열에 강한 단백다당체가 다량 포함되어 있을 것으로 사료된다. 현재, 정밀분석과 구조 결정을 통해 활성성분의 존재를 구명하고 기전을 밝히는 실험을 진행 중이다.

요 약

본 연구는 화살나무의 줄기와 날개를 열수 추출하여 분자량 크기별로 네 분획(F I, F II, F III, F IV)으로 분리하여 각 분획물의 성분조성을 분석하였고, 이들 각 분획물의 생리활성을 알아보기 위해 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거능과 동물 세포에서 활성산소종 제거능에 대하여 조사하였다.

열수 추출물의 정성반응 결과, 네 분획물 모두 대부분 탄수화물이었고, 소량의 단백질을 함유하였으며, 일부 분획물에는 소량의 페놀 화합물 및 유기산이 함유되어 있었다. 주요 구성성분인 총당과 총단백질 함량은 448 mg/g과 21 mg/g이었으며, 총당의 함량은 F III가 가장 높았고, F IV, F II 및 F I의 순서였다. 네 분획물을 가수분해하여 이들의 구성당을 분석한 결과, 중성당은 mannose : fucose : galactose : glucose가 0.01 : 0.02 : 0.14 : 0.83의 비율로, 아미노당은 galactosamine : glucosamine이 0.01 : 0.99의 비율로 구성되어 있었으며, 전체 구성당 함량에서 중성당 : 아미노당의 비율은 0.94 : 0.04로 조성된 다당체였다. 분획물별로 총단백질과 구성 아미노산은 F IV가 가장 높았으며, F III, F II 및 F I의 순서로 함유하였다. 조 추출물에 함유된 아미노산의 종류와 양은 Glu > Asp > Pro > Gly > Leu > Val > Ser > Ala > Thr > Ile > Phe > Cys > His > Arg > Met > Lys > Try > Trp > Cys2의 순서로 19종의 아미노산이 분석되었으며, 특히 산성 아미노산과 중성 아미노산 함량이 높았다.

네 분획물을 각 농도별로 처리하여 DPPH 유리 라디칼 소거능을 조사한 결과는 50-1,000 µg/mL 처리했을 때 농도에 비례하여 네 분획물 모두에서 F IV, F III, F II 및 F I의 순서로 활성을 나타냈다. CHO-k1 동물 세포에서 활성산소종 제거능을 조사한 결과는, 분획물을 1-100 µg/mL까지 처리한 농도에 비례하여 활성이 상승되는 것으로 나타났으나 100 µg/mL 이상의 처리농도에서는 거의 변화를 보이지 않았다. 각 분획물별로 F IV이 가장 높은 활성을 보였으며, 그 다음 F III, F I 이었으며, F II는 가장 낮은 활성을 나타냈다.

화살나무 열수 추출물 중에는 항산화능과 활성산소종 제거능을 나타내는 물질이 여러 가지 있을 것으로 추정되지만 분

자랑 크기별로 분획한 네 분획물의 정색반응과 성분조성을 조사한 결과, 주요 구성성분은 단백질이 결합되어 있을 가능성이 높으며, DPPH 유리 라디칼 소거능과 CHO-k1의 세포에서 활성산소종 제거능의 생리활성을 나타내는 다당체(bioactive carbohydrate)일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 2004년도 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Research committee on natural products research institute. Treatise on Asian Herbal Medicines. p. 60. Seoul National Univ., Products Information Library. Seoul, Korea (2003)
2. Chung HS, Jeong HJ, Kim JS, Jeong SI, Kim KS, Kim KS, Kang BK, Ahn JW, Back SH, Kim HH. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Euonymus alatus* in mouse peritoneal macrophages. Clin. Chim. Acta 318: 113-120 (2002)
3. Kim DD. Winged spindle. Available from: <http://home.pusan.ac.kr/ddkim> Accessed Oct. 11, 2004.
4. Lee JH, Kim HK, Ha TY. Antitumor effect of winged *Euonymus* against chemically induced and malignant cell implanted-tumors in mice. Korean J. Immunol. 15: 243-253 (1993)
5. Huang KC. The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Boca Raton, Chinese pp. 93-94 (1993)
6. Buckingham J. Dictionary of Natural Products. Chapman & Hal. NY, USA. p. 125, p. 1967, p. 2341, p. 2342, p. 2428, p. 6096. (1994)
7. Cha BY, Park CJ, Lee DG, Lee YC, Kim DW, Kim JD, Seo WG, Kim CH. Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9. J. Ethnopharmacol. 85: 163-167 (2003)
8. Lee JH, Shin SJ, Moon Y, Lee DK. Reduction of doxorubicin-induced tissue damage by *Euonymus alatus* extract. Korean J. Immunol. 18: 253-263 (1996)
9. Uoo WS. The Method of Study on Natural Products Chemistry. Seoul National Univ. Press, Seoul, Korea. pp. 13-15 (2001)
10. An YG. Method of Purification for Enzyme Protein. Yangseogak, Seoul, Korea. pp. 68-69 (1994)
11. Kim SH, Hwang SK, Dwek RA, Rudd PM, Ahn YH, Kim EH, Cheong CC, Kim SI, Park NS, Lee SM. Structural determination of the N-glycans of a lepidopteran arylphorin reveals the presence of a monoglucosylated oligosaccharide in the storage protein. Glycobiology 13: 147-157 (2003)
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
13. Waters Associates Waters Co. Analysis of Amino acids Pico · Tag system. Young-In Scientific Co. Ltd., MA, USA pp. 41-46 (1990)
14. Gülcin İ, Küfrevioğlu Öİ, Oktay M, Büyükköroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). J. Ethnopharmacol. 90: 205-215 (2004)
15. Lee ZW, Kwon SM, Kim SW, Yi SJ, Kim YM, Ha KS. Activation of in situ tissue transglutaminase by intracellular reactive oxygen species. Biochem. Biophys. Res. Comm. 305: 633-640 (2003)
16. Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. Glycoconj. J. 14: 535-542 (1997)
17. Chan PS, Chron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate reagent gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. Osteoarthritis Cartilage. 13: 387-394 (2005)
18. Rapp A, Brandl N, Volpi N, Huettinger M. Evaluation of chondroitin sulfate bioactivity in hippocampal neurones and the astrocyte cell line U373: influence of position of sulfate group and charge density. Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol. 96: 37-43 (2005)
19. Synowiecki J, Khateeb NA. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43: 145-171 (2003)
20. Hia HC, Jang JH, Ike M, Inoue C, Fujita M, Yoshida T. Improved borated method for the rapid distinction of glucosamine and galactosamine in an exopolysaccharide produced by citobacter sp. Biotechnol. Lett. 26: 1307-1311 (2004)
21. Knorr D. Use of chitinous polymers in food-a challenge for food research and development. Food Technol. 38: 85-97 (1984)
22. Srivastava R, Kulshreshtha DK. Bioactive polysaccharide from plants. Phytochemistry 28: 2877-2883 (1989)
23. Park EK, Kim BK. Antineoplastic components of mushrooms (I): Anti neoplastic activities of PS-K a protein-bound polysaccharide of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. Korean J. Mycol. 5: 25-30 (1977)
24. Cha EJ, Hwang YJ, Kim SH. Studies on physiological functionality proposal of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Korean J. Human Ecology 7: 31-46 (2004)
25. Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analysis of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorg. Med. Chem. 10: 1057-1062 (2002)
26. Iguchi C, Nio Y, Takeda H, Yamasawa K, Hirahara N, Toga T, Itakura M, Tamura K. Plant polysaccharide PSK: cytostatic effects on growth and invasion: modulating effects on the expression of HLA and adhesion molecules on human gastric and colonic tumor cell surface. Anticancer Res. 21: 1007-1013 (2001)
27. Fisher M, Yang LX. Anticancer effects and mechanism of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Res. 22: 1737-1754 (2002)
28. Gilbert K. Introduction to glycoconjugate analysis-GU/DP values for oligosaccharide standards. p. 10. In: Tools for glycobiology 2001 · 2002. Glyko, Inc., CA, USA (2001)
29. Hatano T, Edamatsu R, Mori A, Fujita Y, Yasuhara E. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chem. Pharmaceut. Bull. 37: 2016-2021 (1989)
30. Kumarasany Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Wilcock CC, Sarker SD. Biological activities of *Euonymus europaeus*. Fitoterapia. 74: 305-307 (2003)
31. Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami K. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. Nihon Eiyo Shokuryo Gakkai Shi. 19: 210-214 (1996)
32. Liu F, Ooi VE, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sci. 60: 763-771 (1997)
33. Chen H, Zhang M, Xie B. Quantification of uronic acid in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties. J. Agric. Food Chem. 52: 3333-3336 (2004)
34. Hokputa S, Harding SE, Inngjerdingen K, Jumel K, Michaelsen TE, Heinze T, Koschella A, Paulsen BS. Bioactive polysaccharide from the stem of the Thai medicinal plant. *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. Carbohydr. Res. 339: 753-762 (2004)

(2005년 7월 26일 접수; 2005년 10월 20일 채택)