

차가버섯으로부터 분리한 페놀성 화합물의 항산화효과

김형자^{1,2} · 진창배¹ · 이용섭^{2*}

¹한국과학기술연구원 생체대사연구센터, ²경희대학교 약학대학

Antioxidative Activities of Phenolic Compounds Isolated from *Inonotus obliquus*

Hyoung Ja Kim^{1,2}, Changbae Jin¹, and Yong Sup Lee^{2*}

¹Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Division of Life Sciences, Korea Institute of Science & Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

²Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 1 Hoegi-Dong, Dongdaemoon-ku, Seoul 130-701, Korea

Abstract – In our continued search for biologically active compounds from traditional medicine, we found that ethyl acetate fraction from *Inonotus obliquus* showed potent antioxidant activities on three different cell-free bioassay systems. Bioassay-directed chromatographic fractionation of the ethyl acetate fraction from *Inonotus obliquus* afforded four phenolic compounds, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one (1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (2), protocatechuic acid (3) and caffeic acid (4) along with three sterols such as lanosterol (5), ergosterol peroxide (6) and 9,11-dehydroergosterol peroxide (7). Among isolates, phenolic compounds (1-4) were assessed for antioxidant activities. Almost phenolic compounds showed potent DPPH and superoxide anion radicals scavenging and lipid peroxidation inhibitory activities indicating that these phenolic compounds contribute to the antioxidative activities of *I. obliquus*. Compounds 2-3 and 7 were isolated for the first time from this plant.

Key words – antioxidant, hymenochaetaceae, *Inonotus obliquus*, phenolic compounds, sterols

인체 내에는 안정한 상태의 산소가 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응과 같은 환경적 및 생화학적 요인 등에 의하여 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$), 히드록실 라디칼(hydroxyl radical, $HO\cdot$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항 산소(singlet oxygen, 1O_2)와 같은 반응성이 큰 활성산소(reactive oxygen species: ROS)로 전환되어 세포구성 성분을 비가역적으로 파괴한다고 알려져 있다. 하지만 이들 활성산소의 작용은 체내 방어기구인 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase), 퍼옥시다아제(peroxidase), 글루타치온(glutathione) 등과 같은 항산화 효소 및 비타민 C(vitamin C, ascorbic acid), 비타민 E(tocopherol) 등의 항산화 물질의 작용에 의하여 최소화 될 수 있다. 그러나 이러한 생체 방어력에 이상이 생기거나 과도한 활성산소에 노출될 경우, 활성산소가 생체에 치명적인 산소

독성을 일으켜서 세포구성성분인 지질, 단백질, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴를 유도함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨씨병과 같은 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이와 같은 산화적 스트레스가 노화를 비롯한 각종 질환을 일으키는 중요한 원인으로 밝혀지면서 생체내 활성산소를 제거하는 항산화제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 체내의 활성 산소종을 조절할 수 있는 천연물 유래의 저분자 항산화 물질에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔지만 항산화 활성이 탁월하면서 보다 안전하고 효능이 탁월한 새로운 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균종 자실체를 형성하는 고등 균류로서 다양한 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 독특한 맛과 향기를 지니고 있어, 예로부터 식용 및 약용되어 왔다. 담자균류의 약리활성에 대한 연구는 1957년 Lucas 등이 그물버섯 추출물의 항암효과를 최초로 발표한 것을 비롯하여³⁾ 1960년대 말부터 일본 및 중앙

*교신저자(E-mail): kyslee@khu.ac.kr
(FAX): 02-966-3885

아시아에서 본격적인 연구가 진행되어 말굽버섯과의 식용 균류 자실체의 항종양활성과 표고버섯(*Lentinus edodes*), 운지버섯(*Coriolus versicolor*), 자작나무버섯(*Piptoporus betulinus*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 등의 항종양 효과가 발표되었다.^{4,5)} 이들 버섯의 활성성분들은 대부분 다당류들로서 표고버섯 자실체에서 분리한 다당체 lentinan 및 운지버섯에서 추출한 단백당 또한 잘 알려진 항암활성 성분이다.⁶⁾

이에 본 연구자들은 다양한 식물에 함유된 성분 중에서 항산화 활성을 나타내는 물질을 연구하던 중, 차가버섯 추출물과 차가버섯에 함유된 성분들이 항암효과 이외에도 항산화 활성이 있음을 확인하였다.

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 버섯으로 검은 자작나무에 덩이로 자생하며 약용되어왔다. 차가버섯의 주요 자생 지역으로는 시베리아, 캐나다, 일본 홋카이도 지역이며, 형태학적으로는 갓을 형성하지 않고 표면은 딱딱한 검은 광택이 있으며, 내부가 코르크질로 형성되어있다. 알려진 효능으로는 항암, 항산화, 항당뇨 효과 등이 보고되어 있어 기능성식품 및 건강식품으로 각광을 받고 있다.⁷⁻⁹⁾ 차가버섯에는 lanosterol, inotodiol, ergosterol 등과 같은 sterol 화합물 및 betulin과 같은 triterpene 성분들이 풍부하며, 이들 성분이 항종양활성을 갖는다고 보고되어 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 페놀성 화합물들은 일반적으로 항산화 활성을 갖는다는 것은 알려져 있지만, 차가버섯의 페놀성 화합물들에 대한 성분연구는 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 차가버섯의 항산화 활성을 갖는 화합물을 연구하는 과정에서 에틸 아세테이트 분획으로부터 페놀성 성분들을 분리하여 규명하였으며, 이들이 차가버섯 추출물의 항산화 작용에 기여하는 것을 발견하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 화합물의 분리 방법 - 경동시장에서 구입한 차가버섯가루(956-15) 5.17 kg을 1800 ml의 메탄올(MeOH)로 초음파 추출기(sonicator)를 이용하여 2시간 동안 추출하였다. 이를 3회 반복하여 추출한 후 여과 하고, 여과액을 감압 농축하여 잔사(92.4 g)를 얻었다. 이를 1000 ml의 물에 용해하여 계통적 추출방법에 따라 CH₂Cl₂(800 ml × 3), EtOAc(800 ml × 3), BuOH(800 ml × 3), H₂O 층으로 나누었다. 얻어진 EtOAc 분획 9.62 g 중 2.84 g를 취하여 메탄올에 용해하였다. 메탄올에 용해하지 않는 불용성 화합물(ES)은 여과하였다. 여액을 세파덱스(Sephadex LH-20)를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 실시하였으며, 메탄올을 전개용매로 사용하여 10개의 소분획(EA-EJ)으로 나누었다. 소분획 ED(530 mg)를 LiChrosorb RP-18을 이용한 역상 컬럼 크

로마토그래피를 실시하여(30→70% MeOH) 15개의 분획(ED1-ED15)으로 나누었으며, 소분획 ED6(26.4 mg)을 분취용 RP-18 TLC(10 × 10 cm, Merck)를 이용하여 화합물 1(21.1 mg)을 얻었다. 소분획 ED2(102.3 mg)는 분취용 HPLC를 이용하여 30% MeOH를 전개용매로 사용하여 화합물 2(21.6 mg)와 3(12.3 mg)을 얻었다. 소분획 ED4(41.7 mg)는 각각 분취용 RP-18을 이용한 TLC(10 × 10 cm, Merck)를 이용하여 화합물 4(6.3 mg)를 얻었다. 위의 메탄올 불용성 화합물(ES, 386 mg)은 실리카 겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피(Hexane:EtOAc=5:1→3:1)를 반복 실시하여 화합물 5(37.0 mg), 6(25.2 mg), 7(2.1 mg)을 각각 얻을 수 있었다.

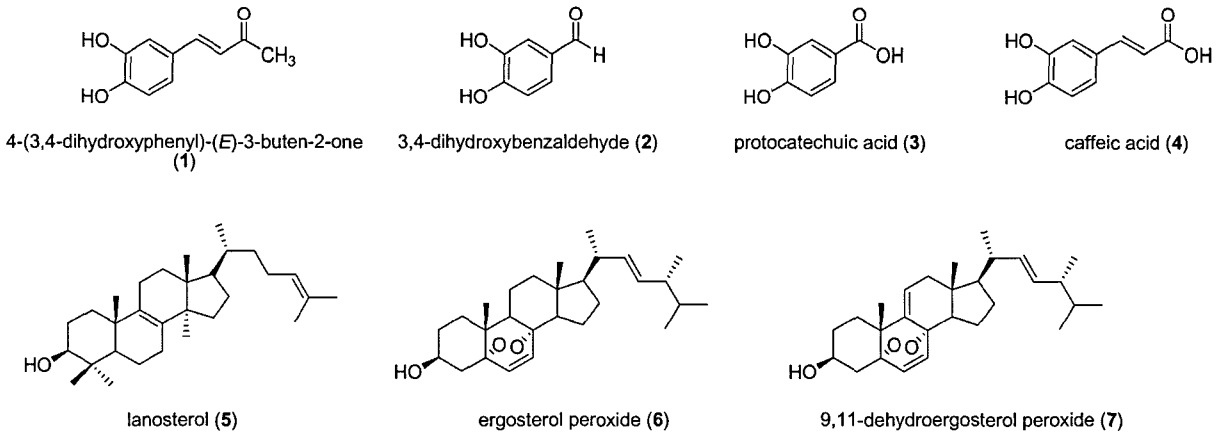
4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one (1) - ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 2.55 (s, 3H, CH₃), 6.46 (d, 1H, J=16.2 Hz, H-8), 6.70 (d, 1H, J=8.2 Hz, H-5), 6.91 (dd, 1H, J=8.2, 1.9 Hz, H-6), 6.99 (d, 1H, J=1.9 Hz, H-2), 7.44 (d, 1H, J=16.2 Hz, H-7); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 25.6 (C-CH₃), 113.9 (C-2), 115.2 (C-5), 122.1 (C-8), 123.3 (C-6), 126.4 (C-1), 145.4 (C-7), 145.5 (C-3), 148.6 (C-4), 200.2 (C-9).

3,4-Dihydroxybenzaldehyde (2) - ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.92 (d, 1H, J=8.6 Hz, H-5), 7.31 (d, 1H, overlapped with H-6, H-2), 7.33 (d, 1H, overlapped with H-2, H-6), 9.70 (s, 1H, H-CHO); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 115.5 (C-2), 116.3 (C-5), 126.5 (C-6), 130.9 (C-1), 147.3 (C-3), 153.8 (C-4), 193.2 (C-CHO).

Protocatechuic acid (3) - ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.57 (d, 1H, J=8.7 Hz, H-5), 7.20 (dd, 1H, J=9.0, 1.9 Hz, H-6), 7.22 (br d, 1H, H-2); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 115.8 (C-5), 117.8 (C-2), 123.3 (C-1), 124.0 (C-6), 146.1 (C-3), 151.6 (C-4), 170.4 (C-COOH).

Caffeic acid (4) - ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.14 (d, 1H, J=15.9 Hz, H-8), 6.69 (d, 1H, J=8.2 Hz, H-5), 6.86 (dd, 1H, J=8.2, 1.9 Hz, H-6), 6.96 (d, 1H, J=1.9 Hz, H-2), 7.45 (d, 1H, J=15.9 Hz, H-7).

Lanosterol (5) - ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.62 (s, 3H, H-18), 0.74 (s, 3H, H-30), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.84 (d, 3H, J=6.2 Hz, H-21), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.93 (s, 3H, H-29), 1.53 (s, 3H, H-26), 1.61 (s, 3H, H-27), 3.16 (dd, 1H, J=11.3, 4.7 Hz, H-3), 5.03 (m, 1H, H-24); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 15.4 (C-30), 15.8 (C-18), 17.6 (C-26), 18.3 (C-6), 18.6 (C-21), 19.1 (C-19), 21.0 (C-11), 24.3 (C-28), 24.9 (C-23), 25.7 (C-27), 26.5 (C-2), 27.9 (C-7), 28.0 (C-29), 28.2 (C-12), 30.9 (C-16), 31.0 (C-15), 35.6 (C-1), 36.3 (C-20), 36.4 (C-22), 37.0 (C-10), 38.9 (C-4), 44.5 (C-13), 49.8 (C-14), 50.4 (C-5, 7), 79.0 (C-3), 125.3

Structures of compounds isolated from the ethyl acetate fraction of *Inonotus obliquus*

(C-24), 130.9 (C-25), 134.4 (C-8, 9).

Ergosterol peroxide (6) – ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.74 (d, $J=6.2$ Hz, H-26 or 27), 0.75 (s, 3H, H-18), 0.76 (d, 3H, $J=7.0$ Hz, H-26 or 27), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.83 (d, 3H, $J=6.2$ Hz, H-28), 0.92 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-21), 3.89 (m, 1H, H-3), 5.06 (dd, 1H, $J=15.3, 7.7$ Hz, H-22), 5.15 (dd, 1H, $J=15.3, 7.1$ Hz, H-23), 6.16 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.43 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 12.9 (C-18), 17.6 (C-28), 18.2 (C-19), 19.6 (C-26 or 27), 19.9 (C-26 or 27), 20.6 (C-15), 20.9 (C-21), 23.4 (C-11), 28.6 (C-16), 30.1 (C-2), 33.1 (C-25), 34.7 (C-1), 36.8 (C-4), 37.0 (C-10), 39.3 (C-12), 39.7 (C-20), 42.8 (C-24), 44.6 (C-13), 51.1 (C-9), 51.7 (C-14), 56.2 (C-17), 66.4 (C-3), 79.4 (C-8), 82.2 (C-5), 130.7 (C-7), 132.3 (C-23), 135.2 (C-22), 135.4 (C-6).

9,11-Dehydroergosterol peroxide (7) – ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.67 (s, 3H, H-18), 0.75 (s, 3H, $J=6.6$ Hz, H-26 or 27), 0.76 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-26 or 27), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.84 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, H-28), 0.93 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-21), 3.94 (m, 1H, H-3), 5.08 (dd, 1H, $J=15.4, 7.6$ Hz, H-22), 5.17 (dd, 1H, $J=15.3, 7.1$ Hz, H-23), 5.35 (dd, 1H, $J=6.0, 1.9$ Hz, H-11), 6.21 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, H-6), 6.53 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 13.0 (C-18), 17.6 (C-28), 19.6 (C-26 or 27), 19.9 (C-26 or 27), 20.7 (C-21), 20.9 (C-16), 25.6 (C-19), 28.6 (C-15), 30.6 (C-2), 32.6 (C-25), 33.1 (C-1), 36.1 (C-4), 39.9 (C-20), 41.2 (C-12), 42.8 (C-24), 43.6 (C-13), 48.1 (C-14), 55.9 (C-17), 66.4 (C-3), 76.4 (C-8), 119.7 (C-11), 130.8 (C-7), 132.6 (C-23), 135.1 (C-22), 135.5 (C-6), 142.6 (C-9).

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화효능 검색 – 항산화 효능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용하

여 라디칼 소거능(radical scavenging effect)을 측정하였다.¹³⁾ 96-well plate에 100 μM DPPH 에탄올 용액에 농도별로 희석한 시료용액을 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 VERSAmax, microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정한다. 항산화 효능은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능(IC_{50})으로 표시하였으며, 3회 반복 실험하여 데이터를 구하였다.

Xanthine/xanthine oxidase를 이용한 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거활성에 의한 항산화효능 검색 – 반응 용기에 40 mM sodium carbonate buffer(pH 10.2), 0.1 mM xanthine, 0.1 mM EDTA, 50 mg protein/ml bovine serum albumin, 25 mM NBT와 농도별로 희석한 시료용액, 1.4×10^{-8} unit of xanthine oxidase(EC1.2.3.2)를 가하여 최종 부피가 200 ml가 되도록 한다. 이 혼합 용액은 25°C에서 20분 동안 반응시킨 후 6 mM CuCl_2 용액 6.6 μl 를 가하여 반응을 종결시킨다. 이때 생성된 포마잔(formazan)을 VERSAmax, microplate reader(Molecular Devices, USA)을 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능을 측정한다.¹⁴⁾ 항산화 효능은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능(IC_{50})으로 표시하였으며, 3회 반복 실험하여 데이터를 구하였다.

쥐의 간 균질액을 이용한 과산화지질 저해효능 검색 – 50 mM Tris HCl(pH 7.5), 간 균질액 300 μl (11 mg protein/ml), 10 mM FeSO_4 의 혼합용액에 농도별로 희석한 시료를 가하고 0.4 mM ascorbic acid를 가하여 총 부피가 1 ml이 되도록 하여 37°C에서 30분 동안 반응시켜 과산화지질을 유발시킨다.¹⁵⁾ 이 용액을 TBA-TCA 용액(0.375% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl, 0.01% butylated hydroxytoluene)을 가하여 95°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 얼음물에서 5분 동안 냉각시킨다. 이 용액을 5000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하여 과산화지질의 저해효능을 측정한다.¹⁶⁾ 효능은

흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 저해능(IC₅₀)으로 표시하였으며, 3회 반복 실험하여 데이터를 구하였다.

결과 및 고찰

화합물 1은 하나의 벤젠고리와 trans로 결합한 이중결합이 메틸기와 케톤결합을 하고 있는 구조로 이루어져 있다. ¹H NMR에서 δ 7.44과 6.46에서 vinyl기의 coupling constant가 16.2 Hz로 나타나 trans로 결합을 하고 있으며, δ 6.70 (d, *J*=8.2 Hz, H-5), 6.91 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, H-6), 6.99 (d, *J*=1.9 Hz, H-2)의 피크는 벤젠고리가 ABX system으로 치환되어있음을 알 수 있었다. 또한 δ 2.25에서의 단일피크는 3개의 수소에 해당하는 피크로 메틸기에서 유래한 것임을 알 수 있었다. ¹³C NMR에서 δ 200.2 (C-9)의 피크는 이 화합물에 카르보닐기가 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one로 동정하였다.¹⁷⁾

화합물 2는 ¹H NMR에서 δ 9.70의 단일피크가 알데히드기에서 기인한 것임을 예상할 수 있었으며, δ 6.92에서의 피크(d, *J*=8.6 Hz, H-5)와 7.31과 7.33에서의 피크로부터 벤젠고리에 3개의 치환체가 있음을 알 수 있었다. ¹³C NMR에서 δ 193.2의 피크는 알데히드의 카르보닐기에서 기인한 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 화합물 2는 3,4-dihydroxybenzaldehyde임을 알 수 있었으며, 이 식물로부터 처음 분리된 화합물이다.¹⁸⁾

화합물 3은 ¹H NMR에서 화합물 2와 유사한 구조를 가지고 있었지만 δ 6.57(d, *J*=8.7 Hz, H-5), 7.20(dd, *J*=9.0, 1.9 Hz, H-6), 7.22(br d, H-2)의 3개의 피크만 나타나고 있어 벤젠고리에 3개의 치환체가 있는 구조임을 알 수 있었다. ¹³C NMR에서 역시 δ 170.4의 피크는 이 화합물에 카르복실산기가 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 7개의 탄소로 구성된 protocatechuic acid임을 알 수 있었으며, 이 식물로부터 처음 분리된 화합물이다.¹⁹⁾

화합물 4는 ¹H NMR에서 화합물 1과 유사한 피크 모양을 나타내고 있지만 고자장에서의 메틸기는 나타나지 않았다. 따라서 이 화합물은 caffeic acid임을 알 수 있었다.¹⁹⁾

Lanosterol(5)과 ergosterol peroxide(6)은 이미 이 식물에서 분리 보고된 스테롤들이며,²⁰⁾ 화합물 7은 화합물 6과 거의 유사하지만 C ring의 9번과 11번에 이중결합이 있는 화합물로 이 식물에서 처음 분리된 화합물인 9,11-dehydroergosterol peroxide로 동정하였다.²¹⁾

항산화 효능 - 차가버섯으로부터 분리한 페놀성 화합물들에(1-4) 대한 항산화효능을 DPPH 라디칼 소거능과 잔틴/잔틴옥시다제에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능으로 검색하였다. 대조약물로 항산화효과가 잘 알려진 비타민 C, 레스베라트롤, 플라보노이드 화합물인 콰르세틴을 사

Table I. Antioxidant activities of phenolic compounds (1-4) from the ethyl acetate fraction of *Inonotus obliquus*

Compound	IC ₅₀ (μg/ml)		
	DPPH	XO/XOD	LPO
1	3.97±0.80	6.04±1.12	11.38±0.56
2	1.84±0.11	29.91±3.51	10.85±2.38
3	4.61±0.52	9.10±2.24	>50
4	6.61±0.52	4.83±0.46	>50
Ascorbic acid	8.09±0.30	>50	NT
Resveratrol	23.82±1.92	>50	17.60±0.61
Quercetin	4.45±0.44	11.66±0.28	6.68±1.48
Trolox	NT	NT	26.35±1.26

NT:Not tested.

용하여 비교 검색하였고 결과를 Table I에 나타내었다. 검색결과 페놀성 화합물 모두에서 좋은 효능을 보였으며, 특히 화합물 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one(1)은 DPPH 라디칼 소거능은 IC₅₀가 3.97±0.80 μg/ml로 나타나 유해 활성 라디칼 소거능이 우수하게 나타났다. 이는 천연 항산화제로 잘 알려진 비타민 C(IC₅₀ 8.09±0.30 μg/ml)와 포도씨의 레스베라트롤(IC₅₀ 23.82±1.92 μg/ml) 및 콰르세틴(IC₅₀ 4.45±0.44 μg/ml)의 효능보다 우수함을 알 수 있었다. 또한 이 식물에서 처음으로 분리된 화합물 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2)에서의 DPPH 라디칼 소거능은 IC₅₀가 1.84±0.11 μg/ml로 탁월하였으며, 3가지의 대조약물 보다 우수하게 나타났다. 화합물 protocatechuic acid(3)에서의 효능은 IC₅₀가 4.61±0.52 μg/ml로 나타나 콰르세틴과 유사한 효능을 보였다.

잔틴/잔틴옥시다제에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능에서는 화합물 1에서의 소거능이 IC₅₀ 6.04±1.12 μg/ml로 나타나 대조 약물보다 탁월한 효능을 보였으며, 화합물 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2)는 IC₅₀가 29.91±3.51 μg/ml로 나타나 효과가 다소 약하였지만, 화합물 protocatechuic acid(3)에서의 효능은 IC₅₀가 9.10±2.24 μg/ml로 나타나 대조약물로 사용한 콰르세틴의 소거능(IC₅₀, 11.66±0.28 μg/ml) 보다는 우수한 효과를 나타내었다.

쥐의 간 균질액을 이용한 과산화지질 저해효능 - 생체막 구성성분인 인지질의 불포화 지방산의 과산화반응은 세포독성뿐만 아니라 노화현상 등 여러 가지 질환을 초래하는 것으로 알려져 있어서 차가버섯에서 분리한 페놀성 화합물에 대한 과산화지질 저해능을 검색하였다. 대조 약물로 천연 항산화제인 레스베라트롤과 콰르세틴을 포함하여 합성 항산화제인 trolox를 사용하여 비교 검색하였다. 과산화지질은 Fe²⁺/ascorbic acid로 유도하였으며, 쥐의 간 균질액을 사용하여 실험하였다. 그 결과 화합물 1과 2에서 각각 IC₅₀가 11.38±0.56과 10.85±2.38 μg/ml로 우수한 저해효과를 보

였으며, 이는 콰르세틴의 저해능($6.68 \pm 1.48 \mu\text{g}/\text{m}$)보다는 약하지만, 레스베라트롤($17.60 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{m}$)과 trolox($26.35 \pm 1.26 \mu\text{g}/\text{m}$) 보다 높게 나타났다. 반면에 화합물 3과 4에서는 실험한 농도에서 효과가 나타나지 않았다.

결 론

차가버섯에는 sterol 계열의 화합물인 lanosterol, inotodiol, ergosterol 등과 betulin과 같은 triterpene 성분들이 풍부하며 이들 성분이 항종양활성을 갖는다고 보고되어 있다. 그러나 본 연구를 통하여 차가버섯의 에틸 아세테이트 분획이 항산화 효능이 있으며, 에틸 아세테이트 분획에는 페놀성 화합물이 많이 존재함을 알 수 있었다.

차가버섯의 에틸 아세테이트 분획으로부터 4가지 페놀성 화합물 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one(1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2), protocatechuic acid(3), caffeic acid(4)를 분리하여 구조를 동정하였다. 이 중에서 화합물 2와 3은 차가버섯에서 처음으로 분리된 화합물이며, 추가로 분리된 3가지 sterol 계열의 화합물인 lanosterol(5), ergosterol peroxide(6), 9,11-dehydroergosterol peroxide(7)중에서 화합물 7은 이 버섯에서 처음으로 분리된 화합물임을 알 수 있었다. 또한 이 식물에서 분리한 페놀성 화합물들에 대한 항산화 효능을 검색하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능과 잔틴/잔틴옥시다제에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능 및 간 균질액을 이용한 과산화지질 저해능을 검색하였고 그 결과를 Table I에 나타내었다. 그 결과 화합물 1에서 유해 산소종인 라디칼 소거능이 우수하게 나타났으며, 과산화지질 저해효능도 우수함을 알 수 있었다. 한편 이 식물에서 처음으로 분리된 화합물 3,4-dihydroxybenzaldehyde(2)에서의 효과도 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능은 다소 약하게 나타났지만 DPPH 라디칼 소거능이나 지질과산화 저해능은 가장 뛰어난 것을 알 수 있었다. 화합물 3과 4에서는 인체에 유해한 라디칼 소거능에서는 우수한 효능을 나타내고 있었지만, 과산화지질 저해능은 검색 농도에서 효과가 나타나지 않았다.

이들 결과들을 종합하면, 차가버섯 추출물의 에틸 아세테이트 분획에서 분리한 페놀성 화합물의 항산화 효능은 대조약물인 비타민 C, 레스베라트롤, quercetin, trolox 보다 우수하게 나타나고 있어 이들 페놀성 화합물이 항산화 효능을 나타내는 유효 성분을 알았으며, 차가버섯 추출물의 에틸 아세테이트 분획으로부터 천연 항산화제 개발 가능성 보여 주었다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용

기술개발사업단의 연구비 지원(과제번호 PF0320202-01)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M. and Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* **107**: 526-545.
- Adelman, R., Saul, L. R. and Ames, N. B. (1988) Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2706-2708.
- Lucas, E. H. and Ringler, R. L. (1957) Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibio. Chemotherapy*, **7**: 1-4.
- Ikegawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. (1968) Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Song, C. H., Moon, H. Y. and Ryu, C. H. (1997) Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **25**: 130-132.
- Goro, C., Junji, H., Yukiko, Y., Yoshiko, A. and Fumoko, F. (1970) Fraction and purification of the polysaccharides with masked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Shivrina, A. N. (1967) Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* **66**: 17271-17279.
- Kahlos, K. and Hiltunen, R. (1983) Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm. Fenn.* **92**: 200-224.
- Mizuno, T., Zhuang, C., Abe, K., Okamoto, H., Kino, T., Ukai, S., Leclerc, S. and Meijer, L. (1999) Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sclerotia* and *Mycelia* of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) pIL. (Aphyllophoromycetidae). *Int. J. Med. Mush.* **1**: 301-316.
- Ludwiczak, R. S. and Wrzecziono, U. (1960) Chemical components of *Inonotus obliquus*. IV. Ergosterol. *Roczniki Chemii.* **34**: 1701-1705.
- Loviagina, E. V. and Shivrina, A. N. (1962) Steroids of the chaga fungus. *Bio-khimiya.* **27**: 794-800.
- Kahlos, K., Kangas, L. and Hiltunen, R. (1987) Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta. Pharm. Fenn.* **96**: 33-40.
- Lee, J. S., Kim, H. J., Park, H., and Lee, Y. S. (2002) New diarylheptanoids from the stems of *Carpinus cordata*. *J. Nat. Prod.* **65**: 1367-1370.
- Toda, S., Kumura, M. and Ohnishi, M. (1991) Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.* **57**: 8-10.
- Sanz, M. J., Ferrandiz, M. L., Cejudo, M., Terencio, M. C., Gil, B., Bustos, G., Ubeda, A., Gunasegaran, R. and Alcaraz,

- M. J. (1994) Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*. **24**: 689-699.
16. Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. **52**: 302-310.
17. Chun, H., Kon, K., Yung, H., Yang, J. Y., Kim, S. I., Chung, Y. C., Kang, S. K. and Jeon, S. S. (2005) Separation method of 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-but-3-en-2-one from *Inonotus obliquus* via extraction with alcohol, extraction with water/alkane, extraction with ethyl acetate and purification by chromatography. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*. KR 2005100879.
18. Mulvena, D., Webb, E. C. and Zerner, B. (1969) 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, a fungistatic substance from green *Cavendish bananas*. *Phytochemistry*. **8**: 393-395.
19. Das, V. S. R., and Rao, J. V. S. (1964) Phenolic acids of onion plant. *Current Science*. **33**: 471-472.
20. Kahlos, K. (1994) The effects of some amino acids on growth and lipid production in *Inonotus obliquus* grown in vitro. *Acta Biotechnologica*. **14**: 169-179.
21. Yu, S. M., Kim, H. J., Woo, E.-R. and Park, H. (1994) Some sesquiterpenoids and 5 α ,8 α -epidioxysterols from *Solanum lyratum*. *Arch. Pharm. Res.* **17**: 1-4.

(2007년 3월 27일 접수)