

참죽나무 심재의 항산화 성분

박새롬 · 양석원 · 안달래 · 양재현 · 조종현¹ · 김학용² · 이재혁³ · 박정숙⁴ · 김대근*

우석대학교 약학대학, ¹전북농업기술원, ²전북대학교 의용생체공학과,
³남부대학교 한방제약개발학과, ⁴남부대학교 대체의학과

Antioxidant Constituents of the Heartwood of *Cedrela sinensis* A. Juss.

Saerom Park, Seokwon Yang, Dalrae Ahn, Jae Heon Yang, Chong Hyeon Cho¹, Hak Yong Kim²,
Jae Hyeok Lee³, Jeong-Suk Park⁴ and Dae Keun Kim*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

¹Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-140, Korea

²Department of Textile Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

⁴Department of Complementary and Alternative Medicine, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract – As part of ongoing study focused on the discovery of natural antioxidants from Korean plants by measuring the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging effect and superoxide quenching activity, methanol extract of *Cedrela sinensis* (Meliaceae) was found to show potent antioxidant activities. Subsequent activity-guided fractionation of the methanolic extract led to the isolation of four phenolic compounds, (+)-catechin (1), (-)-epicatechin (2), catechin-(4 α →8)-catechin (3) and catechin-(4 α →8)-epicatechin (4). Their structures were elucidated by spectroscopic studies. These compounds showed the significant antioxidative effects on DPPH. In riboflavin originated superoxide quenching activity, four compounds exhibited the formation of the blue formazan in a dose dependant manner.

Key words – *Cedrela sinensis*, Meliaceae, DPPH, Superoxide quenching activity

체내의 에너지 대사 과정에서 산소의 대부분은 산화적 인 산화를 통해 정상적으로 환원되지만 그 중 일부는 인체에 유해한 활성산소나 유리기를 형성하여 인체에 장해를 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 활성 산소는 노인성 질환과 노화를 비롯한 많은 질환의 중요 원인으로 보고²⁾되어 있으며, 활성 산소종이나 유리기를 제거하기 위한 많은 항산화의 연구가 진행되고 있다.³⁾

참죽나무 *Cedrela sinensis* A. Juss.는 멸구슬나무과 (Meliaceae)에 속하는 중국 원산의 낙엽교목으로 중부이남에 식재하고 있다. 높이 20 m까지 자라고 수피는 회흑색이며, 잎은 호생하고 10-22개의 소엽으로 된 우상복엽이다. 꽃은 양성으로 6월에 백색으로 원추화서를 이루며 길이 40 cm로 밑으로 처진다.^{4,5)} 참죽나무에 대한 식물 화학적 성분 연구는 limonoid, triterpenoid 및 flavonoid 성분들이 종자, 잎, 가지와 나무껍질 등에서 보고되어 있다.⁶⁻¹¹⁾ 그러나 참죽나

무 심재에 대해서는 지금까지 보고된 바가 없어 국내산 천연자원에서 항산화물질을 찾는 연구의 일환으로 참죽나무 심재의 methanol 추출물을 몇 가지 용매로 계통분획하여 얻은 분획물을 DPPH radical 소거효과에 기인한 항산화활성을 확인하여 보았다. 그 결과 ethyl acetate 분획에서 가장 강한 활성이 확인되어 본 연구는 ethyl acetate 분획에서 항산화 물질을 분리하고 그 구조를 확인하여 참죽나무의 천연 항산화제로서의 이용가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 참죽나무는 2007년 10월에 전북 완주군에서 채취하였으며, 정확히 감정한 후에 음건제 절하여 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관하고 있다 (WSU-07-019).

시약 및 기기 – 실험에 사용한 기기로는 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer (Japan)

*교신저자 (E-mail): dkkim@mail.woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1574

를 이용하여 확보하였다. 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 1급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Art. 1.07734, 230-400 mesh, Merck)이며, molecular sieve column chromatography용 packing material은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ precoated plate (Art. 1.07752, Merck)를 사용하였다. 발색시약으로는 10% H₂SO₄ (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV의 검색은 254, 365 nm에서 하였다.

추출 및 분리 - 신선한 참죽나무 심재를 음건 세절한 다음 건조하여 얻은 시료 약 500 g을 methanol로 가끔 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스 약 160 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스에 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 *n*-hexane(15 g), methylene chloride(4 g), ethyl acetate(55 g) 및 *n*-butanol(30 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 이들 중 항산화 활성이 가장 강한 ethyl acetate분획에서 DPPH free radical 소거법을 지표로 항산화물질을 분리하였다. Ethyl acetate분획 3 g을 Sephadex LH-20(MeOH) column chromatography를 실시한 후 TLC 양상에 따라 4개 분획(E1-E4)으로 나누었다. 이 중 주요 반점을 나타낸 E1과 E3에서 물질 분리를 시도 하였다. E1을 reverse phase Silca gel column (MeOH : H₂O = 2 : 3)을 통과시키고, Lobar A column (*n*-hexane : EtOAc : MeOH

= 10 : 10 : 1)으로 정제하여 화합물 1 (50 mg)과 화합물 2 (20 mg)을 각각 얻었다. E3을 HPLC(GS310 column, MeOH)로 통과시켜 2개 소분획 (E31, E32)으로 나누고 Sephadex LH-20(MeOH) column chromatography로 정제하여 E31에서 화합물 3 (35 mg), E32에서 화합물 4 (110 mg)를 각각 얻었다.

(+)-Catechin (1) - FeCl₃ test: positive; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.82 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5'), 6.71 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, H-6'), 5.91, 5.82 (each 1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6, 8), 4.54 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2), 3.95 (1H, ddd, *J* = 8.5, 8.0, 5.5 Hz, H-3), 2.83 (1H, dd, *J* = 16.5, 5.5 Hz, H-4), 2.48 (1H, dd, *J* = 16.5, 8.5 Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: Table II.

(-)-Epicatechin (2) - FeCl₃ test: positive; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 6.70 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, H-6'), 5.88, 5.87 (each 1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6, 8), 4.76 (1H, brs, H-2), 4.12 (1H, m, *J* = 2.9 Hz, H-3), 2.79 (1H, dd, *J* = 16.5, 5.5 Hz, H-4), 2.50 (1H, dd, *J* = 16.5, 8.5 Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: Table I.

Catechin-(4 α →8)-catechin (3) - FeCl₃ test: positive; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.95-6.25 (6H, B, B'-ring H), 6.07-5.78 (3H, A, A'-ring H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: Table II.

Catechin-(4 α →8)-epicatechin (4) - FeCl₃ test: positive; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.09-6.41 (6H, B, B'-ring H), 6.10-5.79 (3H, A, A'-ring H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: Table II.

DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성¹²⁾ - 96 well plate에 시료를 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (EtOH)을 일 정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid와 BHA (butylated hydroxy anisole)를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가

Table I. DPPH Radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions of *Cedrela sinensis*

Fraction	IC ₅₀ (μg/ml) ^a
Methanol	18.7
Methylene chloride	36.2
Ethyl acetate	7.4
<i>n</i> -Butanol	10.5
Ascorbic acid	5.2
BHA	7.1

^aThe values indicate 50% decrease of DPPH radical and are the means of triplicate data.

Table II. ¹³C-NMR spectral data of compounds 1-4

Compound	Unit	Isomer	C-2	C-3	C-4	C-6	C-8	C-10
1			82.9	68.8	28.6	96.3	95.4	100.7
2			79.8	67.5	29.2	96.3	95.8	100.0
3	T	M/m	83.9/84.1	73.7/73.7	38.5/38.5	96.9/97.5	96.8/96.2	107.2/107.2
		B	82.4/82.9	68.9/68.6	28.6/28.7	97.3/96.9	108.2/108.1	102.2/100.5
4	T	M/m	84.0/83.8	73.8/73.8	38.7/38.8	97.7/97.1	96.1/96.1	107.2/107.4
		B	79.9/79.8	67.4/67.7	30.0/29.3	97.6/96.4	108.7/108.3	101.4/99.5

Recorded at 100 MHz in CD₃OD

T : 4-substituted unit; B : 8-substituted unit

하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Superoxide 억제 활성^{13,14)} - 시료의 superoxide 억제능력은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가 시스템을 이용하여 광화학 작용을 측정하는 것이다. 반응 혼합액은 2.6 μM riboflavin, 13 μM methionine, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA, PBS(pH 7.4) 및 여러 농도의 시료로 이루어졌다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 넣어두었다. light box 안의 온도는 20±1°C, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 blue formazan으로 환원되어지는데, 이 생성물을 560nm에서 측정하였다. Blue formazan 형성 억제가 superoxide 억제능력이 된다.

결과 및 고찰

참죽나무 심재로부터 얻은 MeOH 엑스를 용매로 계통분획하여 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 *n*-butanol 엑스를 제조하였다. 이 중 가장 강한 DPPH radical 소거활성을 나타낸 ethyl acetate 분획물(Table I)을 몇 가지 column chromatography를 반복 실시하여 4종의 페놀성 성분을 단리하였다(Fig. 1).

화합물 1은 FeCl₃ 시액에 양성으로 나타났으며, ¹H-NMR spectrum에서 A ring의 H-8과 H-6으로 귀속되는 δ 5.91와 5.82 (each 1H, d, *J* = 2.3 Hz)의 *m*-coupled doublet가 확인되었고, δ 4.54 (1H, d, *J* = 8.0 Hz)에서 C ring의 H-2 signal이 관찰되었으며, 이는 δ 3.95 (H-3) peak와 trans coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. δ 3.95 (1H, ddd, *J* = 8.5, 8.0,

5.5 Hz, H-3)과 2.83 (1H, dd, *J* = 16.5, 5.5 Hz, H-4)의 signal 양상으로 화합물 1이 flavan-3-ol 계통의 화합물로 추정하였다.¹⁵⁾ 이상의 결과와 ¹³C-NMR spectrum을 기존 문헌^{16,17)}의 data와 비교하여 화합물 1은 (+)-catechin으로 확인·동정하였다.

화합물 2는 FeCl₃ 시액에 양성으로 확인되었고, NMR data는 화합물 1과 아주 유사하게 나타났다. ¹H-NMR spectrum에서 H-2에 귀속되는 δ 4.76의 broad한 singlet이 관찰되고, H-3에 귀속되는 δ 4.12의 triplet-like가 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum data에서 화합물 1과 C-2와 3의 chemical shift 값만 차이가 났을 뿐 나머지 다른 carbon의 chemical shift 값이 거의 일치하였다. 이상으로 보아 화합물 2는 (-)-cis catechin type 화합물로 추정할 수 있었으며, 기존의 문헌¹⁸⁾ data와 비교하여 (-)-epicatechin으로 구조를 확인·동정하였다.

화합물 3은 FeCl₃ 시액에 양성으로 나타나 페놀성 화합물임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum의 양상이 화합물 1과 유사하게 나타났는데 각각의 위치에서 몇 개의 carbon을 제외하고는 2-4배의 수로 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서도 화합물 2와 유사한 양상이면서 겹쳐서 나타나 multiplet 처럼 관찰되었다. 따라서 catechin 축합 화합물로 추정하고 chemical shift를 비교하여 구조를 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum은 구조식 윗부분 구조(T; 4-substituted unit)의 C-ring의 δ 83.9/84.1(C-2)과, 아래 부분 구조(B; 8-substituted unit)의 C-ring의 δ 82.4/82.9(C-2)와 같이 이성체가 혼재되어 있는 것으로 확인되었으며, 이는 기존문헌^{19,20)}의 수치와 비교한 결과 catechin-(4α→8)-catechin과 일치함을 확인하였다.

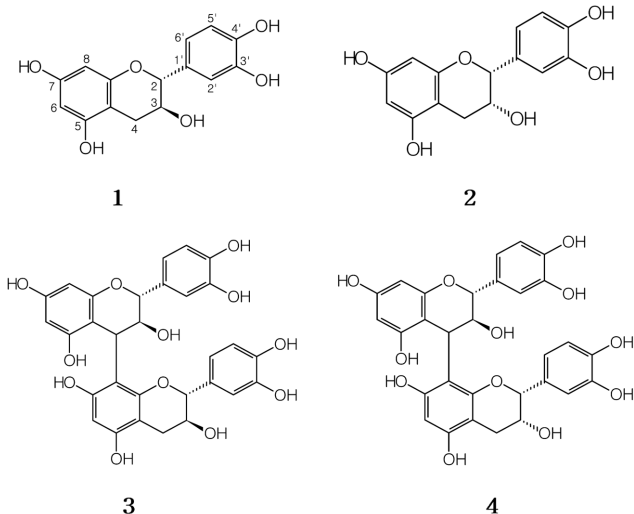


Fig. 1. Structures of compounds 1-4 isolated from *Cedrela sinensis*.

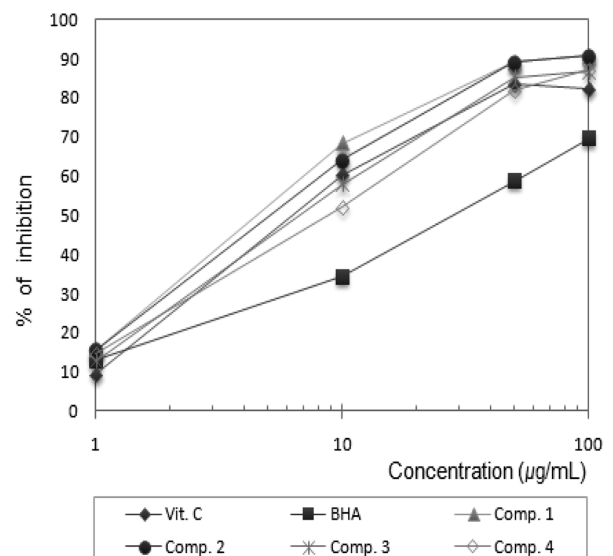


Fig. 2. Radical scavenging effects of DPPH radical of compounds 1-4.

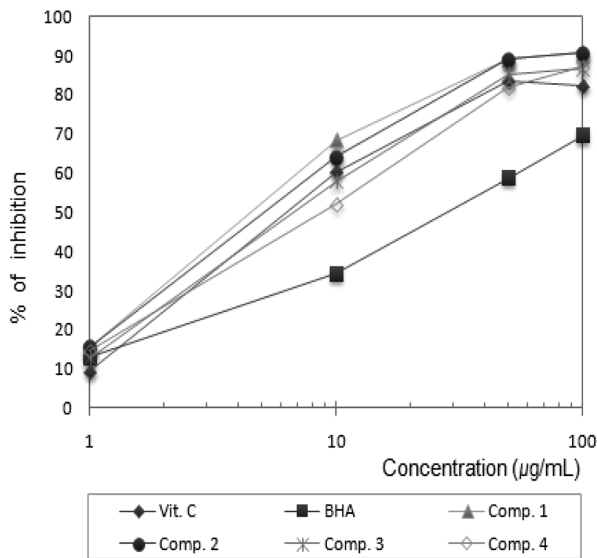


Fig. 3. Riboflavin originated superoxide quenching activities of compounds 1-4.

화합물 4는 FeCl₃ 시액에 양성으로 확인되었고, NMR data 는 화합물 3과 아주 유사하게 나타났다. 가장 큰 차이점은 아래 부분 구조(B)의 C-ring의 C-2의 chemical shift값이 δ 79.9/79.8로 화합물 3과 다르게 나타났다. 이 data를 바탕으로 기존문헌²⁰⁾과 비교한 결과 화합물 4는 catechin-(4α→8)-epicatechin으로 확인하였다.

이상과 같이 참죽나무의 심재의 methanol추출물 중 소거 활성이 가장 좋은 ethyl acetate 분획에서 물질 4종을 분리 하여 그 구조를 동정하였다. 화합물 2-4는 본 식물에서 처음 보고되는 화합물이다. 분리된 화합물의 DPPH free radical 소거활성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 화합물 모두가 좋은 DPPH free radical 소거활성(IC₅₀; 5.1-6.2 µg/ml)을 보여 vitamine C(IC₅₀; 4.9 µg/ml)와 유사한 효능을 보여 주었다. Riboflavin 유래 superoxide quenching 활성 또한 분리된 화합물 모두 대조화합물인 BHA(IC₅₀; 30.3 µg/ml)보다 좋은 활성을 나타냈다(IC₅₀; 4.4-9.0 µg/ml). 화합물 1이 가장 좋은 활성을 보였으나 모두 vitamine C(IC₅₀; 6.3 µg/ml)와 유사한 활성을 보여 주었다. 이상의 결과로 볼 때 참죽나무는 항산화물질을 개발하는 천연자원으로서의 이용가능성이 충분히 있을 것으로 사료된다.

결 론

참죽나무 심재의 methanol추출물 중 ethyl acetate분획에서 4종의 화합물을 분리하였으며, 이들의 spectral data로부터 구조를 확인한 결과 (+)-catechin (1), (-)-epicatechin (2), catechin-(4α→8)-catechin (3)과 catechin-(4α→8)-epicatechin (4)으로 각각 확인·동정하였다. 이 중 화합물 2-4는 본 식

물로부터 처음 분리·보고되는 화합물이며, 화합물 1-4 모두 강한 DPPH radical 소거 효능 및 riboflavin 유래 superoxide quenching 활성을 보여 주었다.

사 사

이 논문은 2010년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Contrl.* **2**: 427-442.
- Yu, B. P. (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 651-668.
- Heo, C., Chung, J. H., Jo, B. K., Kim, H. P. and Heo, M. Y. (2003) Antioxidative activities of 60 plant extracts. *The Journal of Applied Pharmacology* **11**: 196-199.
- 이우철 (1996) 원색한국기초식물도감, 212, 아카데미 서적, 서울
- 이창복 (1989) 대한식물도감, 506, 향문사, 서울.
- Mitsui, K., Saito, H., Yamamura, R., Fukaya, H., Hitotsuyanagi, Y. and Takeya, K. (2007) Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from *Cedrela sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 1442-1447.
- Mitsui, K., Saito, H., Yamamura, R., Fukaya, H., Hitotsuyanagi, Y. and Takeya, K. (2006) Hydroxylated Gedunin Derivatives from *Cedrela sinensis*. *J. Nat. Prod.* **69**: 1310-1314.
- Mitsui, K., Maejima, M., Saito, H., Fukaya, H., Hitotsuyanagi, Y., and Takeya, K. (2005) Triterpenoids from *Cedrela sinensis*. *Tetrahedron* **61**: 10569-10582.
- Mitsui, K., Maejima, M., Fukaya, H., Hitotsuyanagi, Y., and Takeya, K. (2004) Limonoids from *Cedrela sinensis*. *Phytochemistry* **65**: 3075-3081.
- Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N., and Park, J. C. (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* **10**: 544-551.
- Luo, X.-D., Wu, S.-H., Ma, Y.-B., and Wu, D.-G. (2000) Limonoids and phytol derivatives from *Cedrela sinensis*. *Fitoterapia* **71**: 492-496.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V.- Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.

13. Choi, D. S., Kim, S. J., and Jung, M. Y. (2001) Inhibitory activity of berberine on DNA strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 452-455.
14. Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**, 309-314.
15. Morimoto, S., Nonaka, G-I., Nishioka, I., Ezaki, N., and Takizawa, N. (1985) Tannins and related compounds. XXIX. - Seven new methyl derivatives of flavan-3-ols and a 1,3-dia-rylpropan-2-ol from *Cinnamomum cassia*, *C. obusifolium* and *Lindera umbellata* var. *membranacea*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2281-2286.
16. Yeo, H. S., Park, J. C., and Choi, J. S. (1992) Phytochemical studies on the constituents of *Filipendula glaberrima*. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 121-125.
17. Young, H. S., Park, J. C. and Choi, J. S. (1987) Isolation of (+)-catechin from the roots of *Rosa rugosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**: 177-179.
18. Do, J. C., Son, K. H., and Kang, S. S. (1988) Studies on the constituents of the roots of *Rubus parvifolius*. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**: 170-173.
19. Brandon, M., Foo, L., and Porter, L. (1982) Proanthocyanidins of barley and sorghum; composition as a function of maturity of barley ears. *Phytochemistry* **21**, 2953-2957.
20. Agrawal, P. K. (1989) Carbon-13 NMR of flavonoids, 454, Elsevier, New York.

(2010. 11. 24 접수; 2010. 11. 30 심사; 2010. 12. 6 게재확정)