

쉬땅나무(*Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX.) 열매의 항산화 활성 성분

박종혁, 권진아, 양윤정, 한효상¹, 한민우², 이영일³, 김인수³, 이종일⁴, 강세찬*
세명대학교 자연약재과학과, ¹경원대학교 한의과대학 본초학교실, ²충북대학교 농업생명환경대학,
³울산대학교 화학과, ⁴순천대학교 한약자원학과

Antioxidative Constituents from Fruit of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX.

Jong Hyuk Park, Jin A Kwon, Yoon Jung Yang, Hyo-Sang Han¹, Min-Woo Han², Youngil Lee³,
In Su Kim³, Jong-Il Lee⁴ and Se Chan Kang*

Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

¹Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University, Sunnam 461-701, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

³Department of Chemistry, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

⁴Department of Oriental Medicine Resources, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract - The purpose of this study was to evaluate the antioxidative constituents and their activities of the 80% methanolic extracts from fruit of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX. The isolation of active compound was performed in three steps: solvent partition, open column chromatography, and high-performance liquid chromatography (HPLC). The solvent fractions were tested for their antioxidant activities by oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The antioxidant activity of 80% methanolic extracts by various solvent partitions was in the order of 80% MeOH (1.68 ± 0.027), *n*-hexane (1.02 ± 0.036), CH_2Cl_2 (0.95 ± 0.025), EtOAc (1.98 ± 0.065), *n*-BuOH (1.94 ± 0.054) and Water (1.28 ± 0.032). Therefore, the results indicated that the potential antioxidant activities and functional values were observed significantly at EtOAc fraction from fruit of *S. sorbifolia*, flavonoid compound isolated.

Key words - ORAC assay, *Sorbaria sorbifolia*, Flavonoid, HPLC, NMR

서 언

쉬땅나무는(*sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX)는 한국과 동아시아의 북동부 산기슭 계곡이나 습지에 자생하는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽관목으로 높이는 2 m에 달하며, 소엽은 13~23개로 피침형이다. 꽃은 6~7월에 개화하고 꽃받침과 꽃잎은 5개씩이며, 열매는 9월에 성숙한다(Lee, 1989). 한방에서는 진주매(珍珠梅)라 하여 활혈(活血) 작용이 있어서 골절상과 타박상에 울혈(鬱血)을 풀어 통증을 완화시키는데 사용하는 것으로 보고된 바 있

다(Ahn, 2000).

쉬땅나무의 성분에 관한 선행연구결과에 따르면 lignan계의 화합물(+)-9-hydroxypinoresinol, (-)-olivil과 lupane계의 triterpenoid 화합물인 betulin, flavonoid계의 화합물인 (+)-catechin, (-)-epicatechin, tragalin과 cucurbitacin D, F 등의 화합물이 지상부에서 분리 보고 되어 있으며, 그 밖에도 sorbifolin, kaempferol-3-arabofuranoside, astragalinalin, quercetin-3-glucuronide, isorhamnetin-3-glucoside, scutellarin, chlorogenic acid, arbutin, trifolin, quercetin-3-xyloside, kaempferol-3-xyloside 등이 잎, 줄기 등에 함유되어 있음이 보고되고 있다(Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kim and Shin, 1998; Lee and Lee,

*교신저자(E-mail) : sckang@semyung.ac.kr

2001). Sorbaria속 식물에 대한 성분연구로는 sorbifolin, rhamnoside, quercetin-3-β-D-galactopyranoside가 분리 연구된 바 있다(Arisawa and Nakaoki, 1969; Munehisa *et al.*, 1970; Zaitsev and Makarova, 1969). 생물활성에 관한 선행연구로는 쉬땅나무의 지상부 분획물에 대한 항산화, 지상부 추출물을 이용한 항종양, rats에서의 간암유발억제효과, rats에서의 만성감손상 치료효과, 항산화 및 암전이억제효과, 간보호효과 및 상기의 다양한 화합물을 이용한 세포독성등의 활성이 보고 된 바 있다(Jin *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

최근 합성의약품의 독성과 부작용으로 인한 피해를 줄이기 위한 천연물유래 의약품, 기능성식품 및 화장품에 관한 관심과 연구가 각광 받고 있으며, 그 중 노화와 다양한 질환의 원인이 되는 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 연구개발이 활발하게 진행되고 있다. 기존의 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)와 butylated hydroxytoluene(BHT)의 경우 효과가 뛰어난 반면에 과량 투여시 발암 및 심혈관 계열에 심각한 부작용을 유발하는 것으로 알려지면서, 천연물로부터 유래하는 보다 안전하고 뛰어난 효과를 가지는 화합물에 관한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Seog *et al.*, 2002).

따라서 본 연구는 선행연구 결과에서 국내 자생하는 쉬땅나무의 지상부 80% EtOH 추출물과 분획물이 천연항산화제인 trolox에 비하여 2배 이상의 높은 항산화 활성을 갖는다는 결과를 바탕으로, 쉬땅나무 열매의 항산화 활성을 검색한 결과 열매 또한 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났으며, 이에 따라 쉬땅나무열매에서 항산화 활성을 가지는 단일화합물을 분리, 정제하여 동정하고자 하였다(Yang *et al.*, 2011).

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 쉬땅나무(*Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX.)의 열매는 2010년 8월에 강원도 평창군 일대에서 자생하는 것을 채취하였다. 위 식물은 정확히 동정한 후 상온에서 음건하여 사용하였으며, 표품은 세명대학교 자연약재학과 천연물연구실(표본분류: SSOF)에 보관되어있다.

시약 및 기기

추출, 분획, TLC 및 column chromatography용 용매는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC에는 HPLC급 용매와 3차 증류수를 사용하였다. 역상 column과 gel-filtration column chromatography용으로는 각각 LiChrorep RP-18(40-63 μm)과 Sephadex LH-20 (bead size 25-100 μm, Sigma)를 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ pre-coated plate(layer thickness 0.25 mm, Merck)와 pre-coated RP-18 F₂₅₄ S(layer thickness 0.25 mm, Merck)를 사용하여, 발색시약 10% H₂SO₄ 용액과 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액으로 전개된 물질의 발색에 이용하였다.

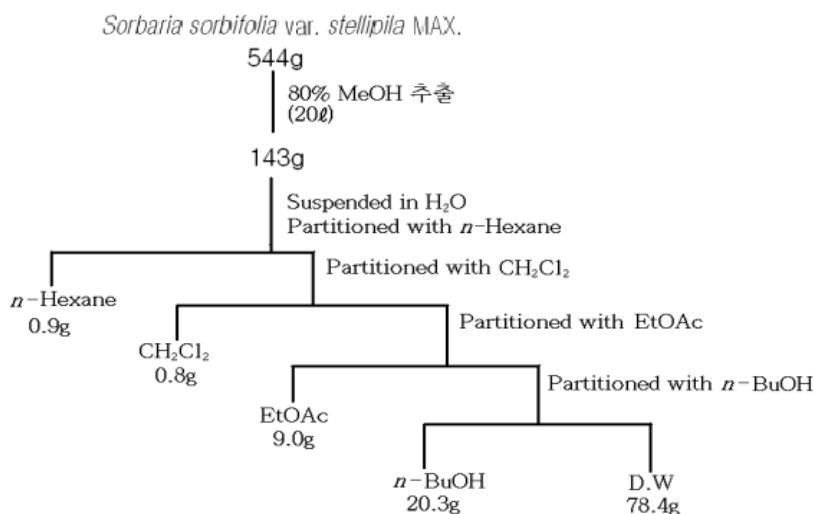
정제에 사용된 HPLC system은 Thermo series로 autosampler(Spectra system AS3000), pump(Spectra system P4000), degasser(Spectra system SCM1000), UV detector(Spectra system UV2000)를 사용하였으며, HPLC column은 YMC사의 ODS(250 × 10 nm, 5 μm) column을 사용하였다. 화합물 동정에 사용 되어진 ¹H과 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AVANCE3 spectrometer로 측정하였다.

추출 및 분획

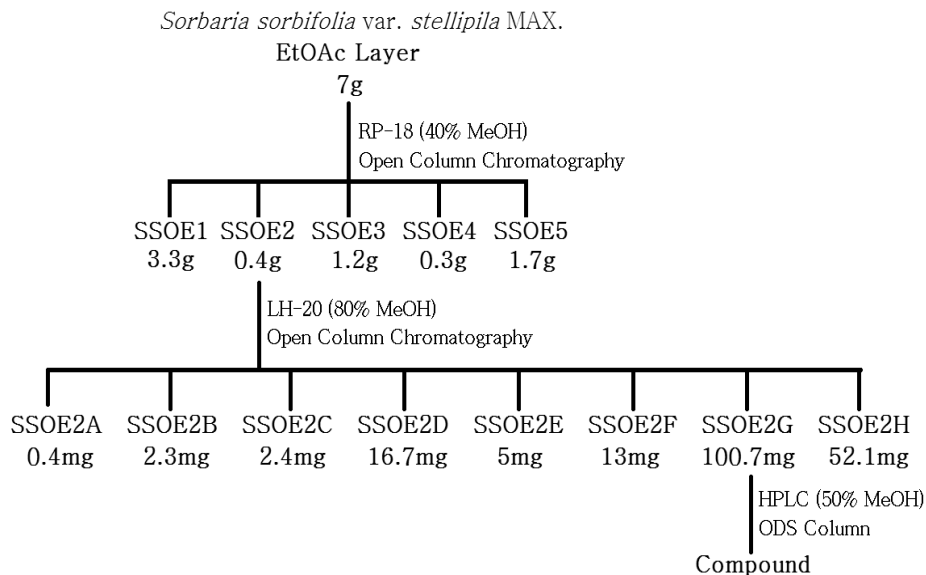
가지와 꽃받침 부분을 제거한 쉬땅나무의 열매 1.5 kg을 상온에서 충분히 음건하여 얻은 건조 시료 544 g을 80% MeOH로 상온에서 교반기를 이용하여 추출하였다. 추출액은 여과지를 이용하여 여과한 후 감압농축하여 80% MeOH 엑스 143 g을 얻었으며, 800 mL의 증류수에 현탁시키고 계통학적 분획방법에 따라 동량의 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH로 각각 3회씩 추출하여 분획한 후 감압농축하여 *n*-Hexane층 0.9 g, CH₂Cl₂층 0.8 g, EtOAc층 9.0 g, *n*-BuOH층 20.3 g을 획득하였다(Scheme 1).

Compound의 분리

EtOAc 분획물 7 g을 open column chromatography에 RP-18 resin을 packing한 후에 40% MeOH를 전개용매로 하여 전개한 후 UV 254 nm의 파장을 참고로 하여 각각 SSOE1, SSOE2, SSOE3, SSOE4, SSOE5의 5개 분획으로 구분하였으며, 이 중 SSOE2 분획물을 open column chromatography에 LH-20 resin을 packing한 후에 80% MeOH을 전개용매로 전개하여 각각 SSOE2A, SSOE2B, SSOE2C, SSOE2D, SSOE2E, SSOE2F, SSOE2G, SSOE2H



Scheme 1. Extraction and solvent partitions from fruit of *S. sorbifolia*.



Scheme 2. Isolation of compound from fruit of *S. sorbifolia*.

의 8개의 분획으로 구분하여 나누었다. SSOE2G 분획물은 HPLC system(UV 254 nm)과 semi-prep column(ODS, 250×10 mm, 5 μm)에 50% MeOH용매를 전개하여 compound를 분리, 정제하였다(Scheme 2).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.83(1 H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.75(1 H, d, $J=7.9$ Hz, H-5'), 6.71(1 H, dd, $J=7.9$, 1.8 Hz, H-6'), 5.92, 5.84(each 1 H, d, $J=2.4$ Hz, H-6, 8), 4.55(1 H, d, $J=7.9$ Hz, H-2), 3.96(1 H, ddd, $J=8.5$, 7.9, 5.5 Hz, H-3), 2.83(1 H, dd, $J=16.5$, 5.5 Hz, H-4), 2.49(1 H, dd, $J=16.5$, 8.5 Hz, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-

d_6) δ : 28.2(C-4), 64.9(C-3), 78.0(C-2), 94.0(C-8), 95.0(C-6), 98.4(C-10), 114.7(C-2'), 114.8(C-5'), 117.9(C-6'), 130.6(C-1'), 144.4(C-3'), 144.8(C-5'), 155.7(C-7), 156.2(C-5), 156.5(C-9).

ORAC assay

항산화력 측정기법 중에서 radical 소거기능 측정법에는, TEAC, ABTS, TRAP, DPPH, DCFDA 법 등이 있는데, 이들 중 최근 미국, 유럽 등에서 항산화 기능을 갖는 식품원료 인증을 받기 위하여, 미국 농림성에서 표준화한 실험기법으

로 ORAC(oxygen radical absorbance capacity) assay를 선택하고 있는 추세이며, 특히 현재 신선한 채소류 추출물의 항산화력을 비교하기 위하여 사용되고 있는 기법이다(Kang and Choung, 2008). 반응과정은 buffer와 시료, fluorescein disodium 용액을 섞은 후 radical generator인 AAPH를 첨가함으로써 반응이 시작되는 것이다. 그 원리는 AAPH에 의하여 형광소멸이 일어나는데 항산화물질이 존재하면 형광소멸 반응이 억제된다. 시료와 buffer는 15분 동안 pre-incubation하며 혼합된 반응액을 37°C에서 형광분광광도계를 사용하여 형광의 감소 과정을 60분 동안 2분 간격으로 형광이 95% 감소 될 때까지 관찰 기록하고 그 측정은 excitation 580 ± 30 nm에서 실시하였다. radical 소거 활성은 trolox를 표준물질로 사용하여 trolox standard curve로부터 산출하였다. ORAC의 결과 산출은 trolox 표준곡선으로부터 산출하며 그 식은 다음과 같다.

$$AUC \text{ (Area under the curve)} = 1+f1/f0+f2/f0+f3/f0+\dots+f19/f0+f20/f0$$

<Relative ORAC value>

$$= [(AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blank}})] \times (\text{molarity of Trolox} / \text{molarity of sample})$$

결과 및 고찰

항산화 활성

상온에서 음건한 쉬땅나무 열매를 80% MeOH로 추출하여 감압농축 한 시료로부터 용매분획을 실시하여 *n*-Hexane (0.9 g), CH₂Cl₂(0.8 g), EtOAc(9.0 g), *n*-BuOH(20.3 g), D.W.(78.4 g)의 분획을 얻어 각 분획을 천연항산화제인 trolox를 대조군으로 하는 ORAC assay를 실시하여 80% MeOH 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물이 대조군인 trolox에 비하여 높은 항산화활성을 가지는 것을 알 수 있었다 (Table 1). 항산화활성이 높은 분획 중 EtOAc(7 g)분획은 open column chromatography에 RP-18을 충전하여 SSOE1 (3.3 g), SSOE2(0.4 g), SSOE3(1.2 g), SSOE4(0.3 g), SSOE5(1.7 g)등 5개의 분획으로 나눈 다음 각각의 분획물에 대한 ORAC assay 실시한 결과 SSOE4를 제외한 대부분의 분획물이 대조군인 trolox보다 높은 활성을 나타냈으며, 특히, SSOE1과 SSOE2 분획물은 trolox보다 3배 이상의 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 1. Antioxidative activity of solvent partitions from fruit of *S. sorbifolia*

Fractions	Yield (%)	Mean ^z
Total		1.68 ± 0.027
<i>n</i> -Hexane	0.6	1.02 ± 0.036
CH ₂ Cl ₂	0.6	0.95 ± 0.025
EtOAc	6.3	1.98 ± 0.065
<i>n</i> -BuOH	14.2	1.94 ± 0.054
H ₂ O	54.8	1.28 ± 0.032

Trolox (vitamin E) ORAC_{PE} Value = 1

^zValues are mean ± S.E.

Table 2. Antioxidative activity of fractions from fruit of *S. sorbifolia*

Fractions	Yield (%)	Mean ^z
SSOE1	47.1	3.00 ± 0.252
SSOE2	5.7	3.28 ± 0.187
SSOE3	17.1	1.64 ± 0.014
SSOE4	4.3	0.99 ± 0.036
SSOE5	24.3	1.43 ± 0.049

Trolox (vitamin E) ORAC_{PE} Value = 1

^zValues are mean ± S.E.

Table 3. Antioxidative activity of compound from fruit of *S. sorbifolia*

Fractions	Yield (%)	Mean ^z
Compoundb	8.7	0.94 ± 0.016

Trolox (vitamin E) ORAC_{PE} Value = 1

^zValues are mean ± S.E.

따라서, SSOE2 분획물로 부터 Sephadex LH-20 open column chromatography 기법과 HPLC정제를 반복 실시하여 flavonoid성분을 단리 하였고 이 화합물을 ORAC assay를 실시한 결과 trolox와 유사한 항산화 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

compound의 확인

Flavonoid화합물은 UV 254 nm 흡광과 TLC상 발색시약 발색단에 의해서 phenolic화합물임을 확인 할 수 있었으며, ESI-MS spectrum을 통해서 m/z 289[M-H] molecular ion peak를 관찰 할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum은 A ring에서 H-8과 H-6을 나타내는 δ5.92, δ5.84의 meta-coupled doublets peak가 관측되며, 이로부터 C-5와 C-7

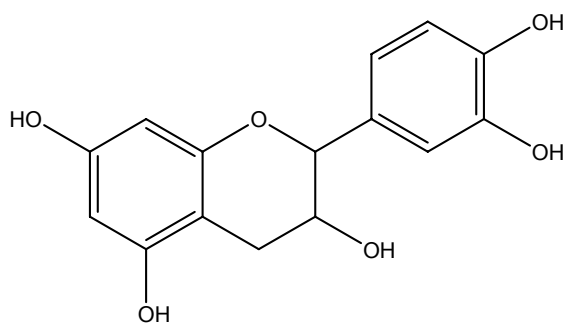


Fig. 1. Structure of active compound from fruit of *S. sorbifolia*.

의 치환체 존재를 확인 할 수 있었으며, H-4(δ 2.83, dd, $J=16.5, 5.5$ Hz, δ 2.49, dd, $J=16.5, 8.5$ Hz)와 H-3(ddd, $J=8.5, 7.9, 5.5$ Hz) peak들의 결합상태로 flavonoid류임을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 hydroxyl group의 존재는 C-3(δ 68.8) peak를 통하여 판단하였으며, carbonyl group이 존재 하지 않는 것으로 판단하였다. 최종적으로 문헌에 보고된 데이터의 분석을 통하여 catechin으로(Fig. 1.) 동정하였다(Young *et al.*, 1987). 또한, 본 성분의 항산화 활성은 vitamin E에 비하여 약 94%의 항산화 활성이 나타났다 (Table 3).

본 연구에서 쉬땅나무 열매로부터 분리된 catechin은 분리과정 중의 활성소분획 및 분획에 비하여 항산화 활성이 감소되었다. 이는 본 물질이 쉬땅나무 열매의 모든 항산화 활성을 대표하는 것이 아니라, 소분획물 및 분획물 또는 쉬땅나무 열매 추출물의 다양한 항산화 활성 성분들의 상호작용에 의한 것으로 판단된다. 따라서, 향후 쉬땅나무의 다양한 항산화 활성 성분들을 더욱 상세하게 규명하여 각 성분들 간의 구조와 활성관계를 연구하여 쉬땅나무 열매의 항산화 활성 성분에 대한 규명과 함께 항산화 활성으로부터 비롯되는 노화, 암, 심혈관계 등의 질환에 대한 예방 및 치료에 대한 작용기전 연구가 병행된다면 쉬땅나무 열매는 새로운 항산화제 소재로 개발될 가치가 높은 것으로 밝혀질 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

합성항산화제의 독성과 부작용으로 인한 천연물유래 항산화제에 대한 관심과 연구개발이 활발한 가운데 추출물 단계에서 ORAC assay를 통하여 우수한 항산화 활성을 가지는 쉬땅나무(*Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* Max.)

열매의 생물학적 생리활성 성분을 분리, 동정하기 위하여 국내에 자생하는 쉬땅나무의 열매를 채집하여 80% MeOH로 추출한 후 일반적인 용매분획법에 의해 분획한 분획물과 추출물을 대상으로 ORAC assay를 실시한 결과 80% MeOH추출물과 EtOAc, *n*-BuOH분획에서 천연항산화제인 trolox보다 우수한 활성이 나타났으며, 이중 가장 우수한 활성을 나타낸 EtOAc 분획물로부터 각종 chromatography 기법을 통하여 분리, 정제한 결과 flavonoid계열의 화합물인 catechin을 단리 하였다. 단리 되어진 catechin은 쉬땅나무의 열매에서는 처음으로 본 연구에서 보고되는 성분으로 ORAC assay에서 대조군인 trolox에 비해 높진 않지만 유사한 활성이 나타나, vitamin E와 유사한 항산화 활성을 나타내는 것으로 보여지며, 따라서, 이 성분 외에 다양한 항산화 활성 성분들의 복합작용으로 인하여 쉬땅나무 열매 추출물 및 분획물이 vitamin E에 비하여 3배 이상의 높은 항산화 활성이 나타나고 있음을 시사하는 바이다.

현재까지 쉬땅나무에 대한 식물학적 성분연구 및 유효활성 성분연구가 다른 천연물에 비하여 상대적으로 활발하게 이루어지지 않았으나, flavonoid계 화합물이 TLC확인 시험을 통하여 확인한 바 다양하게 존재하고 있어, 향후 이와 유사한 다양한 flavonoid계열의 화합물을 분리하여, 우수한 항산화 활성을 갖는 천연물의약품의 기초자료 제공 등 항산화 성분연구에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

인용문헌

- Ahn, D. K. 2000. Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyuhaksa Publishing Co., Seoul, Korea. p. 562 (in Korean).
- Arisawa, M. and Nakaoki, T. 1969. Unutilized resources. II. A new flavonoid glycoside in the leaves of *Sorbaria stellipila*. Yakugaku Zasshi. 89:705-706.
- Jin, X., Chen, L., Jin, Y., Jin, Y., Zhang, X. 2004. Inhibitory effect of *Sorbaria sorbifolia* extract on diethylnitrosamine-induced hepatic precancerous lesion in rats. Tianjin Medical J. 32:159-161.
- Kang, S. C and M. G. Choung. 2008. Comparative study on biological activities of colored potatoes, Hongyong and Jayoung cultivar. Korean J. Crop Sci. 53:233-238.
- Kim, C. M., Shin, M. K, Ahn, D. K and Lee, K. S. 2004. The encyclopedia of oriental herbal medicine. p. 4019 (in Korean).
- Kim, D. K. and T. Y. Shin. 1998. Flavonoids from *Sorbaria*

- sorbifolia* var. *stellipila*. Korean J. Pharmacogn. 29:254-257 (in Korean).
- Kim, D. K., J. S. Eun, J. P. Lim, K. R. Lee and O. P. Zee. 1999. Lignans from *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila*. Yakhak Hoeji. 43:285-288 (in Korean).
- Kim, D. K., S. H. Choi, J. O. Lee, S. Y. Ryu, D. K. Park, D. H. Shin, J. H. Jung, S. K. Pyo, K. R. Lee and O. P. Zee. 1997. Cytotoxic constituents of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila*. Arch. Pharm. Res. 20:85-87.
- Lee, S. M. and C. G. Lee. 2001. Toxic evaluation and chromatographic analysis of cucurbitacin D and F from *Sorbaria sorbifolia*. Analytical Sci. Technol. 14:191-195 (in Korean).
- Lee, T. B. 1989. Illustrated Flora of Korea. Hyangmunsa Publishing Co., Seoul, Korea. p. 132 (in Korean).
- Munehisa, A., Tokutaro, T. and Tashichiro, N. 1970. Stueies on unutilized resource. IV. Flavonoids in the leaver of *S. stellipila*. Chem. Pharm. Bull. 18:916-918.
- Seog, H. M., M. S. Seo, H. M. Kim, M. S. Ahn and Y. T. Lee. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. Korean J. Food Sci. Technol. 34:889-892.
- Yang, Y. J., H. J. Kim, S. H. Kang and S. C. Kang. 2011. Screening of natural herb resources for anti-oxidative effects in Korea. Korean J. Plant Res. 24:1-9 (in Korean).
- Zaitsev, V. G. and Makarova, G. V. 1969. Phytochemical study of *Sorbaria sorbifolia* leaves. Farm. Zh. 24:63-67.
- Zhang, X., Ma, C., Guan, L., Quan, Y. 2003. Effect of *Sorbaria Sorbifolia* extract on anti-oxidative activities in rats with precancerosis induced by diethylnitrosamine. J. Chinese Integrative Med. 1:47-50.
- Zhang, X., Ma, Chao., Guan, L., Quan, Y. 2004. Experimental study on *Sorbaria sorbifolia* extract against chronic liver damage in rats. J. Chinese Med. Mat. 27:751-753.
- Zhang, X., Piao, L., Liu, C., Sun, Q., Jin, H., Yin, Z. 2003. Studies on liver-protection of *Sorbaria sorbifolia* aqueous extract. World Chinese J. Digestol. 11:1497-1499.
- Zhang, X., Zhang, Y., Guan, L., Quan, Y., Sun, Q. 2004. Study on extraction and isolation of active constituents from *Sorbaria sorbifolia* and antitumor effect of the constituents *in vivo*. J. Chinese Med. Mat. 27:36-38.

(접수일 2011.7.11; 수정일 2011.8.3; 채택일 2011.8.5)