

Fomitella fraxinea 중 Steroid계 화합물의 항산화 활성 및 구조분석

박상신* · 이종석¹ · 배강규² · 유국현³ · 한혜철³ · 민태진²

동국대학교 자연과학대학 생화학과, ¹부산대학교 미생물학과
²동국대학교 이과대학 화학과, ³서경대학교 화학과

Antioxidative Activity and Structural Analysis of the Steroid Compound from *Fomitella fraxinea*

Sang-Shin Park*, Jong-Seok Lee¹, Kang-Gyu Bae², Kook-Hyun Yu², Hey-Chul Han³ and Tae-Jin Min²

Department of Biochemistry, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea
¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
²Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
³Department of Chemistry, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

ABSTRACT: A steroid compound, F-1 with antioxidative activity from the fruit bodies of *Fomitella fraxinea* was isolated by ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, and preparative silica thin layer chromatography. The structure of the compound was determined to be ergosta-7,22-diene-3-one-16 β -ol by IR, NMR, and GC-Mass. The compound exhibited inhibition on lipid peroxidation of rat liver microsomes, with IC₅₀ value of 3.8 μ g/ml.

KEYWORD: *Fomitella fraxinea*, antioxidative activity, lipid peroxidation

최근 버섯 유래의 다양한 약리적 효능을 갖는 천연 생리활성물질이 연구되고 있는 가운데, 본 연구진은 63 종의 버섯 자실체의 에탄올 추출물의 항산화 활성을 검색하여 보고하였으며(박 등, 1998), 그 중 뽕나무버섯(*Armillaria mella*)으로부터 항산화 활성물질을 분리 정제하여 화학구조를 구명하였다(Kim 등, 1999). 버섯 중 항산화 활성에 관한 연구로서 *Hypsizygus marmoreus* 자실체의 수용성 추출물이 peroxy 및 alkoxy 라디칼에 대한 포획효과(trap effect)와 지질과산화 반응에 대한 항산화 활성을 나타내었으며(Matsuzawa 등, 1997), *Coriolus versicolor* 중의 단백질 다당류가 이온-라디칼 scavenger로서 superoxide dismutase 활성과 유사한 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Kariya 등, 1992).

그밖에 담자균류인 *Agrocybe cylindracea* 중 지질과산화 저해활성을 나타내는 indole 계열 및 nucleoside 계열의 화합물의 화학구조와 생리활성이 연구 보고된 바 있다(Kim 등, 1997; Lee 등, 1998).

아카시재목 버섯(*Fomitella fraxinea*)은 민주릅버섯목 구명장이버섯과에 속하는 담자균류로서 장수버섯, 또는 아카시아 영지라고 불리며, 한국, 동아시아에서 여름에 아카시아 줄기나 그루터기에서 생육한다(이, 1990). *F. fraxinea*는 영지버섯과 형태적으로 유사하고 오래 전부터 민간 약재로 사용되어 왔으며, 이 버섯중의 생리활성물질로는 먼역

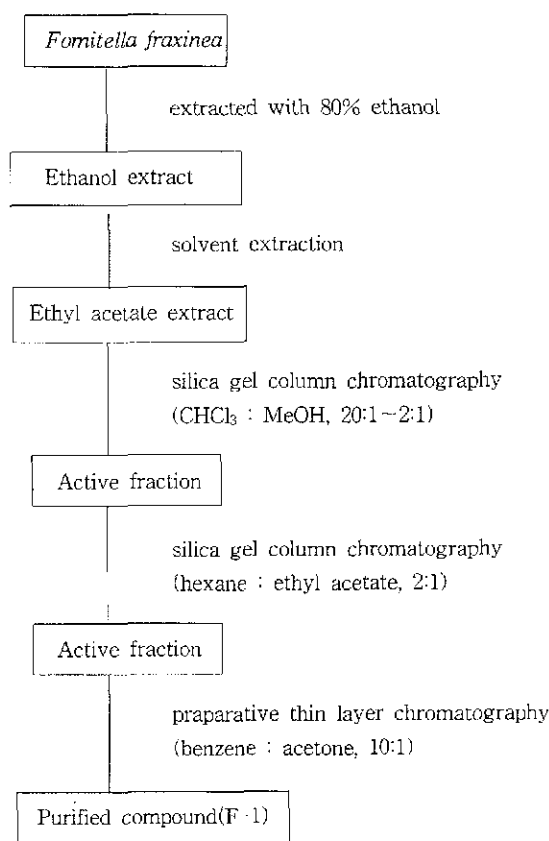


Fig. 1. Purification procedure of antioxidant, F-1 from the fruit bodies of *Fomitella fraxinea*.

*Corresponding author <E-mail: sspark@dongguk.ac.kr>

활성 다당체(조 등, 1995a; 1995b)와 DNA polymerase의 저해제인 5종의 triterpenoid 화합물(Tanaka 등, 1998) 등이 보고되어 있으나 그 밖의 약리적 효능에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다.

본 연구에서는 *F. fraxinea* 중의 생리활성물질을 개발하기 위하여 그 자실체로부터 지질과산화 저해활성을 나타내는 생리활성물질을 분리 정제하여 물리화학적 특성 및 그 화학구조를 결정하고 아울러 항산화 활성을 측정하였기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

*F. fraxinea*는 1998년 8월 중순, 경북 경주 지역 야산에서 채집하여 건조시킨 후 사용하였으며 표본은 동국대학교 생화학부에 보관되어 있다. Thin layer chromatography (TLC) plate(silicagel 60 F₂₅₄)와 silica gel(70~230 mesh)은 Merck사, 2-thiobarbituric acid(TBA), L-ascorbic acid, α-tocopherol은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

구조분석

시료의 구조분석을 위하여 NMR spectra는 CDCl₃를 용매로 사용하였고, ¹H 및 ¹³C NMR은 Varian 200 및 500 MHz NMR(Varian사, 미국) 이 때 화학적 이동은 tetramethyl

Table 1. Phycochemical properties of antioxidant, F-1 from *F. fraxinea*

Molecular formular	C ₂₈ H ₄₆ O ₂
Molecular weight	412.65
Melting point (°C)	162~165
UV λ _{max} (nm)	250 ^a
IR ν _{max} (cm ⁻¹) ^b	3425, 1659, 1626
Solubility	MeOH, CHCl ₃ , acetone
TLC (R _f)	
CHCl ₃ :MeOH (10:1, v/v)	0.75
Hexane:ethyl acetate (2:1, v/v)	0.56
Benzene:acetone (10:1, v/v)	0.45
HPLC RT (min) ^c	11.01

^aDissolved in methanol. ^bMixed with KBr. ^cColumn : Shim-pack CLC-ODS (0.6×15 cm), mobile phase: CH₃OH, flow rate 1 ml/min, detector: UV at 280 nm.

silane을 기준으로 사용하여 측정하였다. IR은 Bomem series 100 spectrophotometer(Hartman and Brown사, 미국)를 사용하여 KBr pellet 법으로 측정하였으며, EI-Mass는 VG Trio 2000(VG Analytical사, 미국)을 사용하였고 항산화활성 검색에는 Shimadzu UV-160A spectrophotometer(Shimadzu사, 일본)를 사용하였다.

항산화 물질의 추출 및 분리정제

*F. fraxinea*로부터 항산화 활성물질의 분리 정제과정은 Fig. 1에 나타내었다. 세절한 시료버섯 5 kg에 80% ethanol을 가하여 40°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하여 얻은

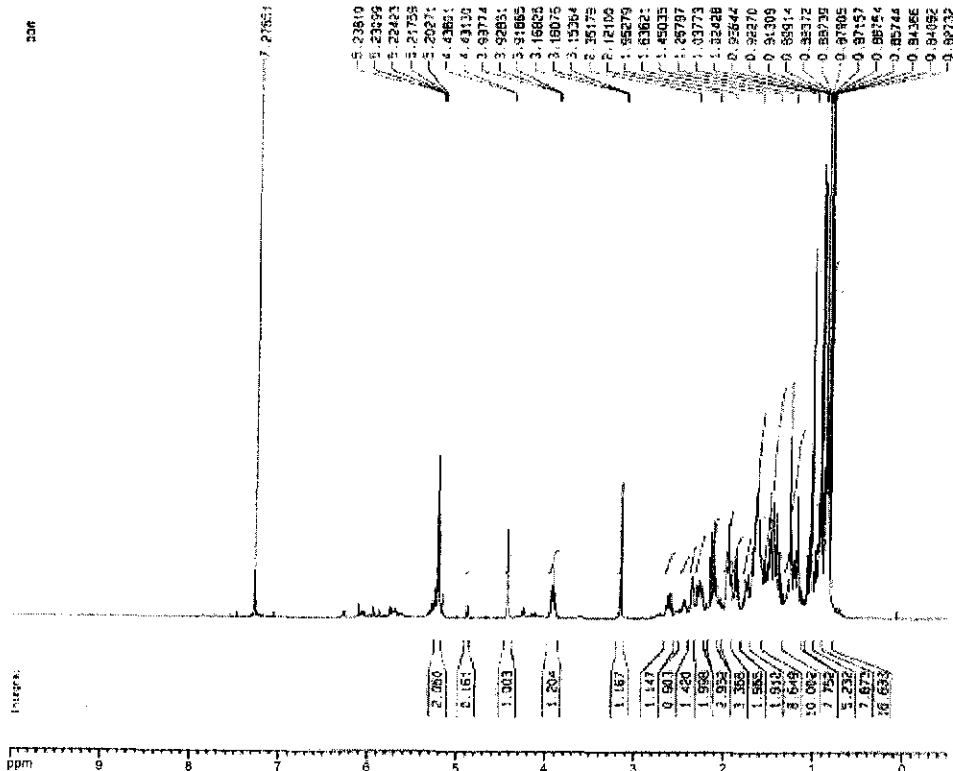


Fig. 2. ¹H NMR spectrum of F-1 from *F. fraxinea* dissolved in CDCl₃.

추출여액을 증발 농축한 후 이를 chloroform, ethyl acetate 및 증류수를 순차적으로 가하여 추출한 다음 증발 농축하였다. 이 중 항산화 활성이 높은 ethyl acetate 추출물을 silica gel column(5×50 cm)상에서 CHCl₃:methanol(20:1~2:1, v/v)로 용출시켜 4개의 분획을 얻었으며, 이중 항산화 활성을 함유하는 분획(3번 분획)을 증발 농축한 후 silica gel column(3×50 cm)에서 hexane:ethyl acetate(2:1, v/v)로 용출시켜 3개의 분획을 얻었다. 이 중 활성분획(2번 분획)을 preparative silica TLC plate상에 점적한 후 benzene:acetone(10:1, v/v)로 전개하여 순수한 활성물질을 얻었다.

항산화 활성 측정

항산화 활성을 검색하기 위하여 Ohkawa 등(1979)의 방법을 인용하여 쥐의 간 조직으로부터 분리한 microsomes 내의 지질과산화 저해활성을 측정하였다. Microsome(0.2 cm protein/mg), 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5), 0.2 mM FeSO₄, 0.1 mM ascorbate 및 각 농도별 활성검색시료를 포함하는 반응용액 1 ml를 37°C에서 1시간 동안 항온시킨 후 3 M trichloroacetic acid(TCA)와 2.0 N HCl을 1:1로 혼합한 용액 0.25 ml를 첨가하여 1,000×g로 10분간 원심분리한 상등액 1 ml에 0.67% TBA 0.25 ml를 혼합하여 95°C에서 20분간 발색시켰다. 반응용액을 냉각시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며 반응에 의하여 생성된 malonaldehyde(MDA)의 양은 MDA의 몰흡광계수, 1.52×10⁵ M⁻¹ cm⁻¹를 이용하여 μmol로 환산하였다. 이 때 활성검색시료를 첨가하지 않은 실험군을 대조군으로 하였다.

Table 2. ¹H NMR spectral data of F-1 from *F. fraxinea* (measured on 500 MHz in CDCl₃)

Carbons	δH (ppm)
7	4.43(d, J = 3.3 Hz)
16	3.16(d, J = 3.6 Hz)
17	1.88(dd, J = 6.9, 3.6 Hz)
18	0.88(s)
19	0.88(s)
20	2.25(tdd, J = 6.9, 6.7, 6.9 Hz)
21	0.93(d, J = 6.9 Hz)
22	5.22(dd, J = 6.7, 7.1 Hz)
23	5.23(dd, J = 7.1, 6.9 Hz)
25	3.93(m)
26	0.85(d, J = 8.2 Hz)
27	0.83(d, J = 8.2 Hz)
28	1.03(d, J = 6.7 Hz)

결과 및 고찰

항산화 활성물질의 정제확인

*F. fraxinea*로부터 항산화 활성을 나타내는 화합물을 분리 정제하여 21 mg의 순수한 분말시료를 얻었다. 이 화합물의 정제 및 순도를 확인하기 위하여 silica TLC에서 chloroform:methanol(10:1, v/v), hexane:ethyl acetate(2:1, v/v), benzene:acetone(10:1, v/v)의 혼합용매로 각각 전개시킨 결과 R_f 값이 각각 0.75, 0.56, 0.45인 단일반점을 나타내었으며(Table 1), benzene:acetone(10:1, v/v)로 1차 전개한 후 이를 chloroform:methanol(10:1, v/v)로 2차 전개하였을 때

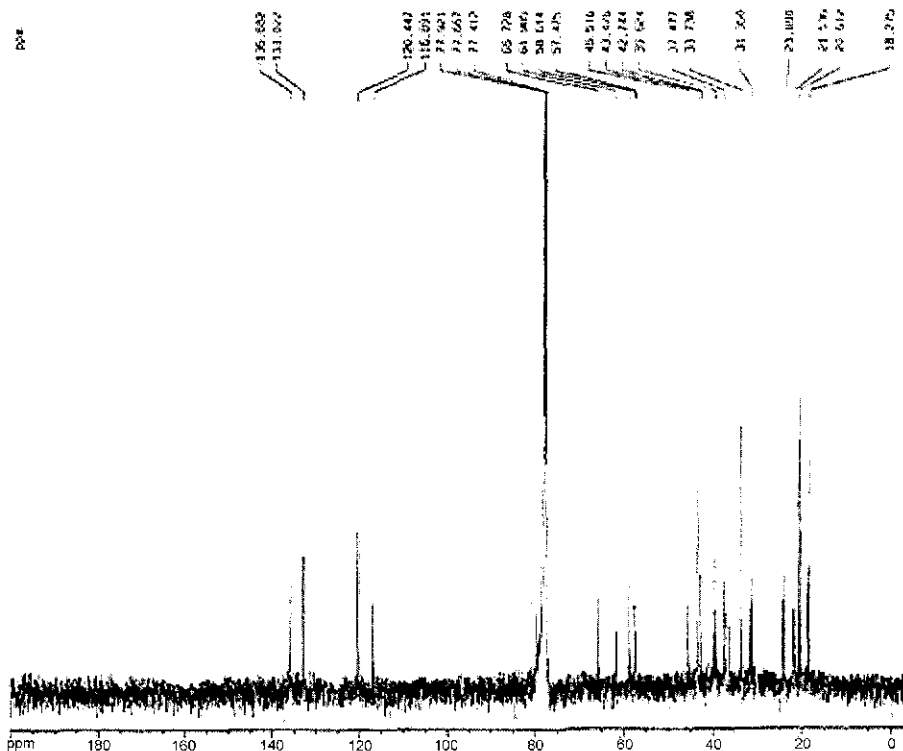


Fig. 3. ¹³C NMR spectrum of F-1 from *F. fraxinea* dissolved in CDCl₃.

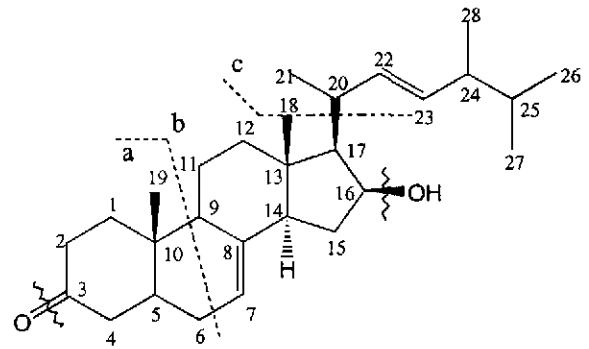
Table 3. ^{13}C NMR spectral data of F-1 from *F. fraxinea* (measured on 200 MHz in CDCl_3)

Carbons	δC (ppm)	Carbons	δC (ppm)
1	31.3	15	37.2
2	23.9	16	78.8
3	210.1	17	58.6
4	37.5	18	20.3
5	45.5	19	18.3
6	20.6	20	33.7
7	120.4	21	39.6
8	133.0	22	116.9
9	43.5	23	135.9
10	37.5	24	65.7
11	21.5	25	62.0
12	31.3	26	21.5
13	42.7	27	21.5
14	57.5	28	23.9

에도 동일하게 단일반점을 나타냄으로써 화합물이 순수하게 분리 정제되었음을 확인하였다.

항산화 활성물질의 물리화학적 특성 및 화학구조 분석

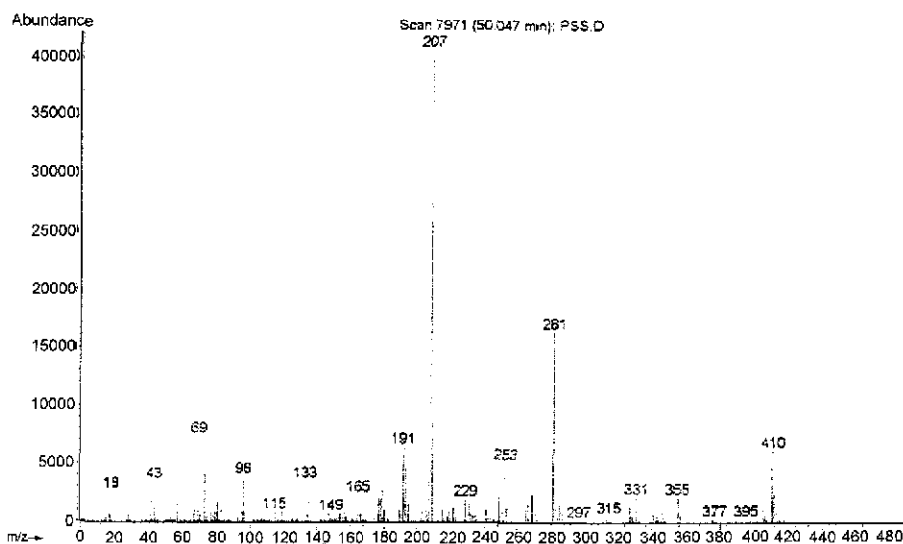
화합물, F-1의 물리화학적 특성은 Table 1에 나타내었다. 순수하게 정제된 화합물은 백색의 무정형 고체로 녹는점은 $162\sim 165^\circ\text{C}$ 이었으며, 250 nm의 UV 흡수특성을 나타내었다. 이 물질은 Libermann-Buchard 반응에 양성을 나타내었고, IR spectrum에서 3425 cm^{-1} 부근의 OH기, 1659 cm^{-1} 부근의 카르보닐기, 1626 cm^{-1} 부근의 $\text{C}=\text{C}$ 결합의 신축진동 등이 확인되어 steroid 계통의 화합물로 추정되었다. 이 화합물의 ^1H NMR spectrum(Fig. 2)에서 $\delta 0.88$ 의 18-H3 및 $\delta 0.89$ 의 19-H3의 methyl singlet들과 $\delta 0.83$ (d, $J=8.2\text{ Hz}$)의 27-H3, $\delta 0.85$ (d, $J=8.2\text{ Hz}$)의 26-H3, $\delta 0.93$ (d, $J=6.9\text{ Hz}$)의 21-H3, $\delta 1.03$ (d, $J=6.7\text{ Hz}$)의 28-H3의 4개의 methyl doublet을 확인하였으며, OH기와 결합한 $\delta 3.16$ (d, $J=3.6\text{ Hz}$)의 16-H, $\delta 4.43$ (d, $J=3.3\text{ Hz}$)의 7-H, $\delta 5.22$ (dd, $J=6.7,$

**Fig. 5.** The structure of F-1(ergosta-7,22-diene-3-one-16 β -ol) from *Fomitella fraxinea*.

7.1 Hz)의 22-H 및 $\delta 5.23$ (dd, $J=7.1, 6.7\text{ Hz}$)의 23-H 등의 methine 수소들을 확인하였다(Table 2). 이 화합물의 ^{13}C NMR spectrum(Fig. 3)으로부터 확인된 28개의 탄소들은, $\delta 210.1$ 의 carbonyl 탄소, $\delta 18.3, \delta 20.3, \delta 20.6, \delta 21.5, \delta 23.9, \delta 39.6$ 의 6개의 methyl 탄소, $\delta 18.3, \delta 21.5, \delta 23.9, \delta 31.3, \delta 31.3, \delta 37.2, \delta 37.5$ 의 7개의 methylene 탄소, $\delta 78.8$ 의 산소와 결합한 3차탄소, $\delta 116.9, \delta 120.4, \delta 130.0, \delta 135.9$ 의 이중결합 탄소, $\delta 37.5, \delta 42.7$ 의 4차 탄소 그리고 $\delta 33.7, \delta 43.5, \delta 45.5, \delta 57.5, \delta 58.6, \delta 62.0, \delta 65.7$ 의 7개의 methine 탄소를 확인되어(Table 3), 이 화합물은 ergosta-7,22-diene-3-one-16 β -ol로 추정되었다. EI-Mass(Fig. 4)로 측정된 이 화합물의 분자량 $[M^+]$ 은 412이며, m/z 410은 $[M-H]^+$, m/z 395는 $[M-OH]^+$, m/z 281은 $[M-a-H_2O]^+$, m/z 253은 $[M-c-H_2O-O]^+$ 로 확인되어 이 화합물이 분자식이 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$, 분자량이 412.65인 ergosta-7,22-diene-3-one-16 β -ol임을 확인하였다(Fig. 5).

항산화 활성

정제된 화합물의 항산화 활성을 관찰하기 위하여 쥐 간의 microsomes의 지질과산화를 측정된 결과를 Fig. 6에 나

**Fig. 4.** EI-Mass spectrum of F-1 from *F. fraxinea*. Electron voltage : 70 eV, Injection:direct inlet.

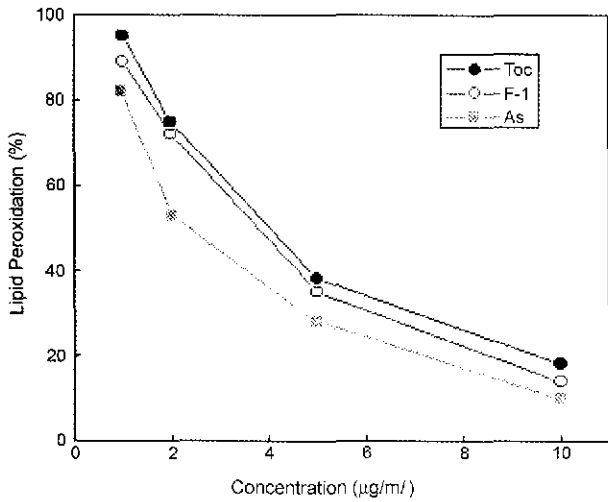


Fig. 6. The inhibitory effects of steroid compound, F-1 from *F. fraxinea*, α -tocopherol (Toc), and ascorbic acid (As) on lipid peroxidation of rat liver microsomes.

타내었다. 화합물의 농도증가에 따라 지질과산화 활성이 증가하였으며, 10 µg/ml의 농도에서 86% 억제현상을 나타내었으며, IC₅₀ 값은 3.8 µg/ml이었다. 이는 항산화제 중 α -tocopherol과 유사한 저해활성을 나타내었으며, ascorbic acid 보다는 낮은 활성을 보였다.

본 연구진이 연구 보고한 뽕나무 버섯 중 항산화 활성을 나타내는 ergosterol peroxide(Kim 등, 1999)는 293 µg/ml의 농도에서 46.3%의 지질과산화 저해효과를 나타내었다. 이와 비교할 때, *F. fraxinea* 중의 F-1이 뽕나무 버섯 중의 ergosterol peroxide 보다 항산화 활성이 뛰어난을 알 수 있었다.

적 요

민간약재로 사용되어지는 이카시재목 버섯(*Fomitella fraxinea*) 자실체의 에탄올 추출물로부터 ethyl acetate 추출, silica gel chromatography, preparative TLC 등의 방법으로 항산화 활성을 나타내는 steroid계 화합물, F-1을 분리 정제하였다. EI-Mass, FT-IR, ¹H 및 ¹³C NMR 등 기기 분석에 의하여 F-1은 분자량이 412.65, 분자식이 C₂₈H₄₄O₂의 steroid 화합물, ergosta-7,22-diene-3-one-16β-ol임을 확인하였다. F-1의 지질과산화 저해활성은 10 µg/ml의 농도에서 86%의 지질과산화 저해활성을 나타내었으며, IC₅₀ 값은 3.8 µg/ml이었다. 이 화합물은 항산화제인 α -tocopherol과

유사한 항산화 활성을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 연구비(1998-015-D00202)에 의하여 지원되었으므로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

박상신, 유국현, 민태진. 1998. 버섯추출물의 항산화활성에 관한 연구. 한국균학회지 26: 69-77.

이인경, 윤봉식, 유익동. 1998. 버섯송이로부터 분리한 Nucleoside 계 화합물의 지질과산화 저해활성. 산업미생물학회지 26: 558-561.

이태수. 1990. 한국 기록종 버섯 총기록. 한국균학회지 18: 233-259.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환복, 유승현, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I) -중성염 용액 추출 다당류의 특성-. 한국균학회지 23: 332-339.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환복, 유승현, 유익동. 1995b. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II) -열수추출 다당류의 분리 및 특성-. 한국균학회지 23: 340-347.

Kariya, K., Nakamura, K., Nomoto, K., Matama, S. and Saigenji, K. 1992. Mimicking of superoxide dismutase activity by protein-bound polysaccharide of *Coriolus versicolor* QUEL, and oxidative stress relief for cancer patients. *Mol. Biotechnol.* 4(1): 40-46.

Kim, S. O., Park, S. S., Min, T. J. and Yu, K. H. 1999. Antioxidant activity of ergosterol peroxide(5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol) in *Armillariella mellea*. *Bull. Korean. Chem. Soc.* 20(7): 819-823.

Kim, W. G., Lee, I. K., Ki, J. P., Ryoo, I. J., Koshino, H. and Yoo, I. D. 1997. New indole derivatives with free radical scavenging activity from *Agrocybe cylindracea*. *J. Nat. Prod.* 60: 721-723.

Matsuzawa, T., Sano, M., Tomita, I., Saitoh, H. and Ikekawa, T. 1997. Studies on antioxidants of *Hypsizygus marmoreus*. I. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidants activities of mice plasma. *Yakugaku Zasshi* 117(9): 623-628.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.

Tanaka, N., Kitamura, A., Mizushima, Y., Sugawara, F. and Sakaguchi, K. 1998. Fomitelic acids, triterpenoid inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a Basidiomycete, *Fomitella fraxinea*. *J. Nat. Prod.* 61: 193-197.