韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 12(3) : 203 - 208(2004)

참돌꽃에서 Salidroside의 동정 및 현탁세포배양을 통한 분리

김수정 · 김광수 · 황성진* · 천상욱** · 김영호*** · 안준철**** · 황 백†

전남대 생물학과, *동신대 식품생물공학과, **동신대 생물자원산업화지원센터,
***충남대 제약학과, ****서남대 생명과학과

Identification of Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. and its Production through Cell Suspension Culture

Soo Jung Kim, Kwang Soo Kim, Sung Jin Hwang*, Sang Uk Chon**,
Young Ho Kim***, Jun Cheul Ahn****, and Baik Hwang†

Department of Biology, Chonnam Natl. Univ., Gwangju 500-757, Korea.
**Department of Food & Biotechnology, Dongshin Univ., Naju 520-714, Korea.*
***Biotechnology Industrialization Center, Dongshin Univ., Naju 520-811, Korea.*
****Department of Pharmacy, Chungnam Natl. Univ., Taejon 305-764, Korea.*
*****Department of Life Sciences, Seonam Univ., Namwon 590-711, Korea.*

ABSTRACT : Salidroside was isolated and purified from *R. sachalinensis* A. Bor. roots. Purified salidroside was obtained from repeated silicagel column chromatography and preparative HPLC, and identified by ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and ^{1}H-^{1}H COSY spectra analyzer. Callus induction and cell suspension from *R. sachalinensis* leaf segments were established on 1/2MS solid medium and in $2B_5$ liquid medium containing 0.5 ㎎/ℓ NAA and 1 ㎎/ℓ BA in the dark condition, respectively. The contents of salidroside for suspension culture were ranging from 0.12% to 0.41% in comparison with 0.17% for natural roots.

Key words : salidroside, callus induction, cell suspension culture, HPLC

서 언

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor.)은 다년생 초본식물로서 돌나물과의 돌꽃속 식물이며 홍경천 이라고도 부른다. 주로 해발 1,700~2,300 m 사이의 고산지대의 석회암이나 화강암 등의 암석 사이에서 서식하며 (Jiang *et al.*, 1994), 주요 성분인 salidroside, p-tyrosol, monoterpene glycoside, cyanoglycoside, penethyl glycoside, aliphatic glycoside, phenylpropanoid, proanthocyanidin 등과 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라본류 화합물과 미량의 휘발성 물질, 아스파라긴산, 트레오닐, 글루타민산, 글리신 등 20여종의 아미노산을 함유하는 것으로 알려졌다 (Lee *et al.*, 2000; Zong *et al.*, 1991; Linch *et al.*, 2000; 박 등, 1999). 이러한 참돌꽃은 예로부터 전통민약을 위주로 진정제, 해열제, 수렴제로 쓰였으며, 중추신경계에 대한 긴장작용, 항피로효과, 신경증과 고혈압에 대해 효과가 있다고 알려져 있다. 특히, 노인성 심장쇠약, 음위에 쓰이며 당뇨병, 폐결핵, 빈혈, 간 및 담낭질병, 정신 및 육체피로, 신경쇠약, 산후 및 병후허약, 건망증 등의 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다 (이 등, 2002). 또한, 인삼이나 가시오가피와 동일하게 열악한 환경에서의 생체의 내성을 증진시키는 작용 뿐만 아니라 항피로, 항방사선, 항산소 결핍증 등의 작용 및 장기기억의 개선작용이 있는 것으로 보고되어 있다 (Ming *et al.*, 1998;

† Corresponding author: (Phone) +82-62-530-3392 (E-mail) bhwang@chonnam.ac.kr
Received December 2, 2003 / Accepted April 19, 2004

Petkov *et al.*, 1986).

그 외 인공재배 (박 등, 1999), 생리활성 연구 (임 등, 1996; Xu *et al.*, 1999) 및 조직배양 (Xu *et al.*, 1998, 1999) 등에 관한 연구가 있었으며, 탈분화된 세포배양을 통해서도 salidroside의 생산가능성이 확인된 바 있다(Xu *et al.*, 1998). 본 연구에서는 참돌꽃의 주요 생리활성물질인 salidroside를 생물공학적인 대량배양의 생산시스템을 확보하고자하는 최종목적을 위하여 일차적으로 참돌꽃 유래 세포배양의 유도 및 현탁세포배양을 확립하고 이를 통한 salidroside의 생산여부를 확인하였다. 아울러 salidroside의 분리시스템을 확립하고자 배양시료 및 원뿌리 등의 시료로부터 반복된 column chromatography와 분취 HPLC 등을 활용하여 순수분리를 시도하고, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{1}H-^{1}H cosy 등의 분광학적 방법으로 salidroside의 동정을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 무균발아

참돌꽃의 종자는 작물과학원 인삼약초과로부터 분양 받아 70% ethanol로 3분간, 5% sodium hypochlorite 용액으로 6분간 표면살균한 후 멸균수로 3회 세척 후 무균발아에 이용하였다. 무균발아에 사용한 배지는 생장조절제가 들어 있지 않는 MS 기본배지에 0.8% agar와 3% sucrose를 첨가하였고 pH는 감압멸균 (121℃, 15분) 전에 1 N NaOH를 사용하여 5.7~5.8 사이로 조정하였다. 무균배지에 이식된 종자는 25±1℃에서 광도 50 $\mu M\ m^{-2}\ s^{-1}$, 16/8시간의 광주기 하에서 발아시켰다.

2. 캘러스 유도 및 배양

캘러스를 유도하기 위해 기내에서 무균발아된 유식물체의 줄기 (길이 약 0.5 ㎝)와 잎 (0.3 x 0.3 ㎠)을 절취하여, 2,4-D와 NAA 그리고 BA를 각각 0.1, 0.5, 1 및 2 ㎎/ℓ로 각각 조합 첨가한 MS와 1/2MS 배지에 치상하여 25℃에서 암 배양 하였다. 배양 3주후에 캘러스의 무게, 지름 등을 측정하여 가장좋은 유기조건을 100%로 정하여 상대적인 유기율을 조사하였다. 유도된 캘러스는 절편으로부터 분리하여 동일조성의 액체배지에 이식한 다음 25±1℃, 100 rpm의 조건에서 현탁배양하였다.

현탁배양은 0.1~2 ㎎/ℓ NAA와 0.1~2 ㎎/ℓ BA를 조합 첨가한 2B5 액체배지 (B5 기본배지의 대량원소가 2배)에 접종하였으며, 2주 간격으로 계대배양하였다. 현탁배양세포는 탄소원인 sucrose의 농도 및 빛의 유무 등을 차별화하여 배양하였으며, 실험방법은 동일한 조성의 배지에서 2주간 배양한 현탁배양세포의 0.5 g을 새로운 배지에 이식하고 3주간 배양한 다음 수확하였다. 수확한 시료는 물기를 충분히 제거하고 생중량을 측정한 다음 동결건조하여 건중량을 측정하고 냉동보관하며, 필요시 분석의 시료로 사용하였다.

3. Salidroside의 분리 및 동정

Salidroside의 추출 및 분리과정은 Wenzhe *et al.* (2001)의 방법에 의하였다. 참돌꽃 뿌리 1.9 ㎏을 세척하여 methanol로 3회 반복 추출한 후, 감압농축 시켰다. 농축시료를 dichloromethane, ethylacetate 그리고 water fraction으로 분리시키고, 이들 분획중 ethylacetate로 추출된 시료를 silicagel column chromatography에서 정제하였다. 이를 다시 silicagel column chromatography을 통하여 6개의 분획으로 분리하고 62℃에서 감압농축시킨 후 녹여 결정화시켰다. 정제된 시료는 ^{1}H-NMR과 ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H-COSY 분석을 통해 salidroside의 물질을 동정하였다

4. Salidroside 분석

배양된 현탁세포는 동결건조 후 건조시료 1 g을 MeOH 3 ㎖로 추출하여 감압농축 하였다. 농축된 시료를 H_2O와 CH_2Cl_2 (3:3)를 혼합한 후 분리된 수층에 EtOAc를 1:1의 비율로 혼합한 후 EtOAc층만 분리하여 rotary evaporator로 농축시켰다. 농축된 시료를 MeOH (0.5 ㎖)로 녹여 TLC와 HPLC분석에 사용하였다.

TLC분석은 고정상으로 silicagel 60 F_{254} (Merck) plate에 농축액 약 3 ㎕를 점적하여, 이동상으로 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (70:30:4 v/v/v)를 사용하여 전개한 후, 10% sulfuric acid를 분무하여 가열 발색시켜 salidroside 의 함유 여부를 확인하였다. HPLC 분석은 Waters (Water Co., U.S.A)를 이용하였으며, 컬럼은 μ-Bondapak C_{18}을, 이동상으로는 20% MeOH을 사용하였다. 시료 5 ㎕ 주입 후, 1 ㎖/min.의 속도로 214 ㎚에서의 자외선 흡광도로 검출하였다.

결과 및 고찰

1. 캘러스유도 및 배양

기내에서 발아된 유식물체로부터 줄기와 잎을 절취하여 2,4-D와 NAA 그리고 BA를 각각 0.1, 0.5, 1, 2 ㎎/ℓ로 각각 혼합한 MS와 1/2MS 배지에 치상한 후, 암조건에서 25±1℃로 배양하였다. 배양 3주후, 캘러스의 유도율을 조사하여 본 결과, NAA 0.5 ㎎/ℓ 이하의 농도 처리구에서는 BA 농도변화에 상관없이 부정근의 발생이 나타났으며, NAA 2 ㎎/ℓ 이상의 농도에서는 캘러스 형성이 전혀

일어나지 않았다 (Data 미제시). BA 농도는 처리 농도가 증가할수록 캘러스의 형성이 양호해지는 경향을 나타내었으며, 그 결과 0.5 ㎎/ℓ NAA와 1 ㎎/ℓ BA가 조합 첨가된 1/2MS 배지에서 가장 높은 빈도로 연노랑색의 부서지기 쉬운 캘러스가 발생하였으며, 유도된 캘러스의 생장 또한 가장 빠르게 나타났다. NAA와 달리 2,4-D에서는 부정근의 발생은 없었으나, NAA에 비교하여 전반적으로 캘러스의 형성이 저조하였다 (Table 1).

Table 1. Effects of growth regulators (PGRs) on callus induction from leaf segments of *R. sachalinensis* plantlets cultured *in vitro*. Explants werw cultured on 1/2MS medium without growth regulators.

PGRs (㎎/ℓ)			Callus induction[a] (%)
BA	NAA	2,4-D	
0.1	0.1		20 (R)
	0.5		-
	1.0		40 (R)
	2.0		-
0.5	0.1		30 (R)
	0.5		50 (R)
	1.0		70
	2.0		-
1.0	0.1		80 (R)
	0.5		100
	1.0		-
	2.0		-
2.0	0.1		80 (R)
	0.5		80 (R)
	1.0		90
	2.0		-
0.1		0.1	20
		0.5	30
		1.0	30
		2.0	-
0.5		0.1	-
		0.5	50
		1.0	40
		2.0	70
1.0		0.1	80
		0.5	-
		1.0	75
		2.0	50
2.0		0.1	-
		0.5	-
		1.0	-
		2.0	-

a: no response, (R): root formation.

유도된 캘러스는 NAA 0.5 ㎎/ℓ와 BA 1 ㎎/ℓ로 조성된 여러 가지 기본배지에서의 생장을 비교하였으며 (Kim *et al.*, 2004), 그 중 $2B_5$ 액체배지를 사용하여 현탁배양하였다. 배양 초기에는 캘러스의 생장율이 좋지 않았지만, 매 2주마다 반복적인 계대배양을 통하여 노란색의 활성이 높고 생장이 빠른 세포주를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 Xu *et al.* (1999)의 실험에서 auxin wnd 2,4-D보다는 NAA가 cytokinin 중 kinetin보다는 BA가 효과가 좋았으며, BA농도별 효과에서도 비교적 2와 5 ㎎/ℓ보다 10 ㎎/ℓ의 고농도에서 노란색 또는 연녹색의 부드럽고 생장이 빠른 세포주를 얻었다고 보고한 바 있다.

2. Salidroside의 추출, 분리 및 동정

참돌꽃 뿌리 (1.9 ㎏)를 MeOH로 추출하여 농축시키고, 이들 농축액 (350 g)을 $CHCl_3$ 3회 추출 (약 5 g)한 다음 EtOAc로 3회 추출한 분획 (7 g)을 얻었으며, EtOAc의 분획을 silicagel column (70 x 240 ㎜)에 $CHCl_3$: MeOH (8:2, v/v)를 전개용매로 하는 3개의 분획 (RS-2-A, RS-2-B, RS-2-C)을 얻었다. 그 중 RS-2-C (2.08 g) 분획만을 rotary evaporator로 농축시킨 후 다시 $CHCl_3$:MeOH (10:1)를 전개용매로하여 silicagel column chromatography (70 x 240 ㎜)를 실시하여 5개의 분획 (RS-4-A, RS-4-B, RS-4-C, RS-4-D, RS-4-E)을 얻었고 TLC 및 HPLC 확인후 RS-4-D 분획만을 rotary evaporator로 농축하였다 (Fig. 1). 농축된 시료를

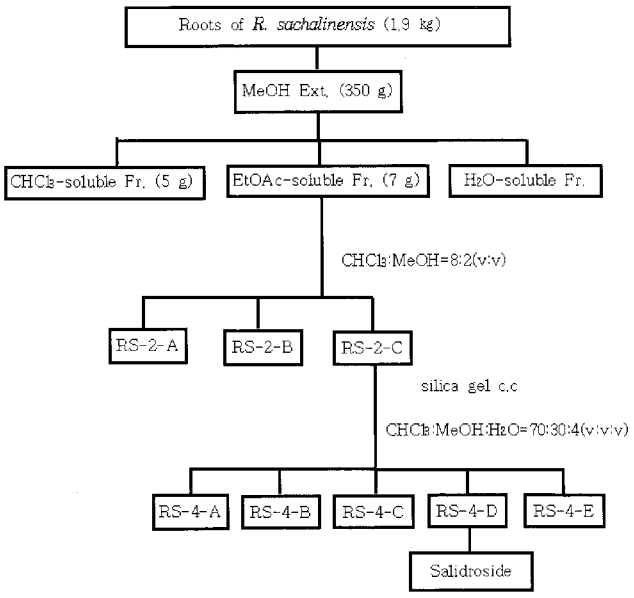

Fig. 1. Isolation scheme of salidroside from *R. sachalinensis* roots and suspension cells. Ext. : extract, Fr. : fraction, c.c : column chromatography.

$CHCl_3$와 MeOH로 62℃에서 재 용해시킨 후 온도를 낮추어주면서 결정을 형성시켰다. 얻어진 결정을 MeOH로 녹여 TLC 및 HPLC로 확인하였다 (Fig. 2).

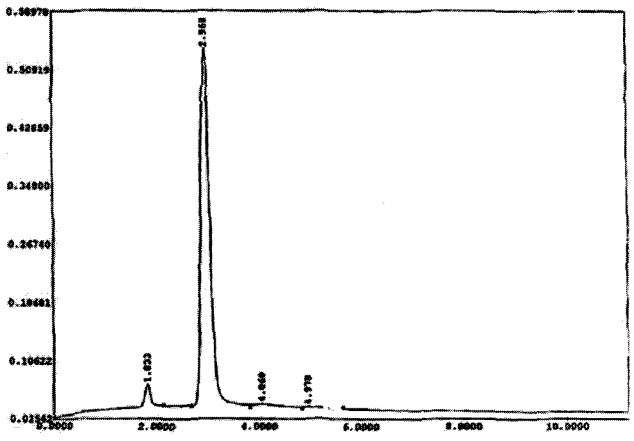

Fig. 2. High performance liquide chromatography of salidroside extracted from *R. sachalinensis* roots native roots and suspension cultured cells.

분리된 시료는 ^{1}H-NMR (Fig. 3)과 ^{13}C-NMR spectrum (Fig. 4), ^{1}H-^{1}H COSY (Fig. 5) 등의 분석을 통하여 4-hydroxy phenyl ethyl group과 glucose 1분자가 결합한 화합물임을 알 수 있었으며, H-2, H-6가 δ : 7.08 (J=8.7 Hz), H-3, H-5가 δ : 6.08 (J=8.7 Hz)에서 doublet으로 나타나므로 anomeric에 4 분자의 H가 결합하고 있음을 알 수 있었고, H-7은 δ : 2.83 (J=7.35 Hz)에서 triplet으로 나타났고, δ :4.32 (J=7.5 Hz)에서 doublet으로부터 glucose는 β-configuration하고 있는 것을 알 수 있어, 이상의 물리화학적 데이터와 spectral 데이터로부터 salidroside을 확인하였다 (Table 2).

3. 캘러스에서 salidroside의 분석

Salidriside의 정성분석을 위해 TLC를 실시한 결과, plate 상에서 salidroside의 relative mobility (Rf) 값은 0.65로 나타났으며, 자연산 뿌리 및 현탁배양 세포 모두 같은 위치에서 밴드가 나타남으로서 현탁배양세포에서도 salidroside가 생성됨을 알 수 있었다(Data 미제시). Salidroside의 정량을 위한 HPLC 분석결과, 표품에서의

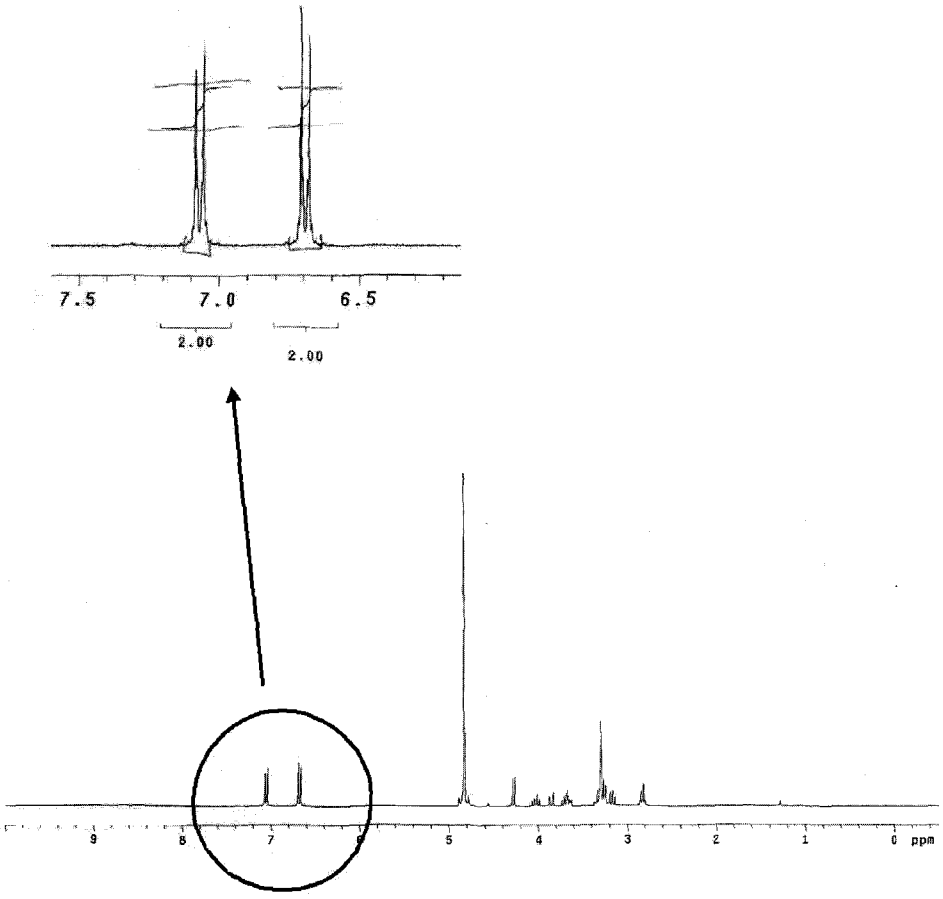

Fig. 3. ^{1}H-NMR spectrum of salidroside in 300 MHz and CD_3OD.

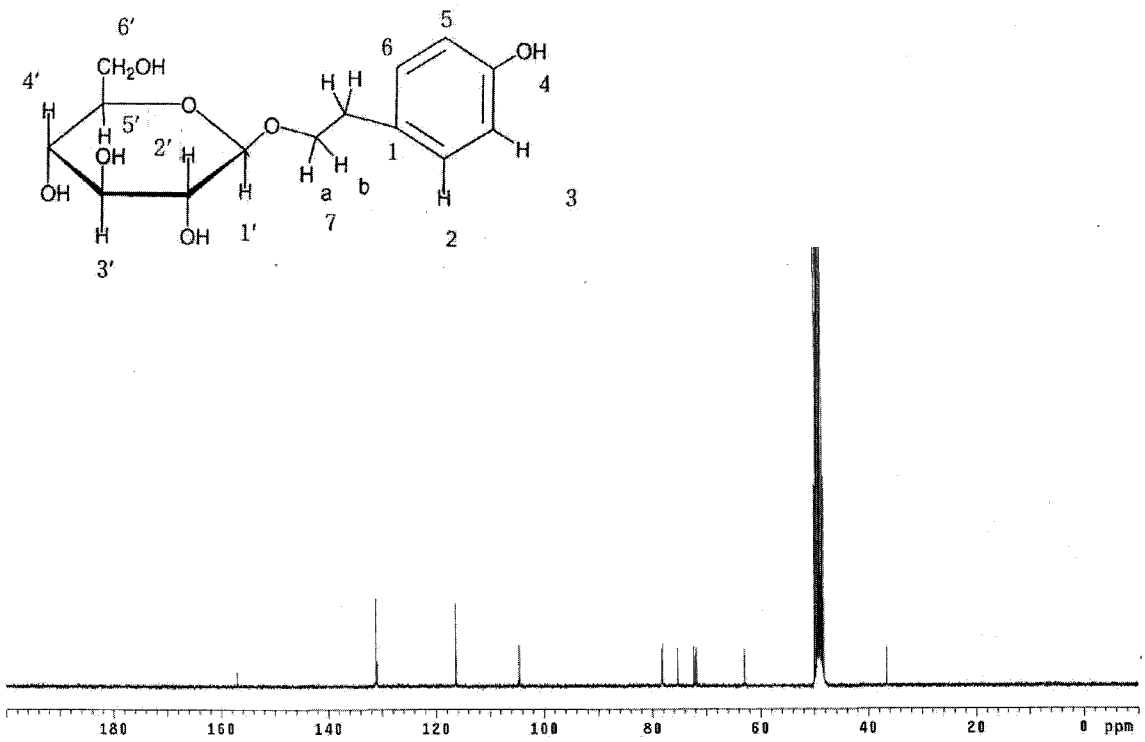

Fig. 4. ^{13}C-NMR spectrum of salidroside in 300 MHz and CD_3OD.

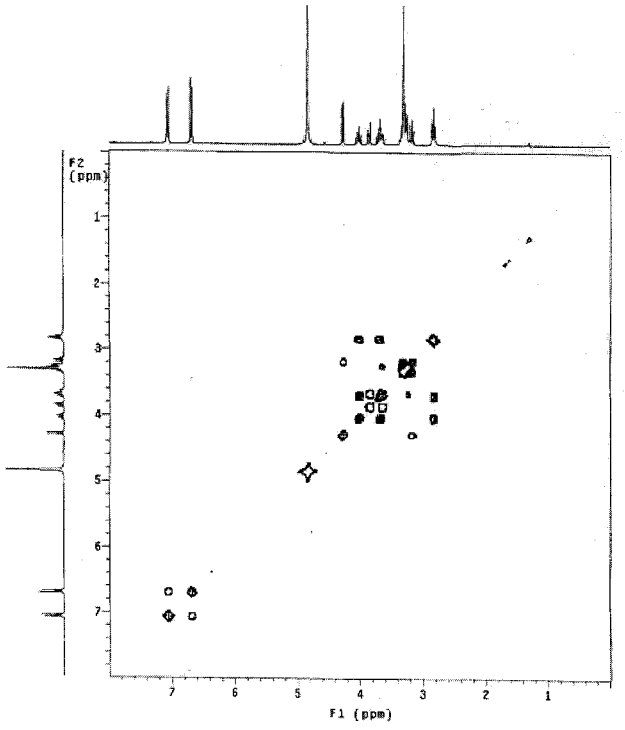

Fig. 5. ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of salidroside in 300 MHz and CD_3OD.

Table 2. Spectral data of compound salidroside in 300 MHz and CD_3OD.

Carbon No.	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	^{1}H-^{1}H COSY
1	130.91	–	–
2	131.08	7.08 (J = 8.7 Hz)	H-3
3	116.27	6.08 (J = 8.7 Hz)	H-2
4	156.97	–	–
5	116.27	6.08 (J = 8.7 Hz)	–
6	131.08	7.08 (J = 8.7 Hz)	–
7	36.52	2.83 (J = 7.35 Hz)	–
8	72.24	–	–
1′	104.53	4.29 (J = 7.5 Hz)	–
2′	75.28	–	–
3′	78.12	–	–
4′	71.82	–	–
5′	78.27	–	–
6′	62.97	–	–

–, No response.

retention time이 약 2분에서 유효 peak가 검출되었으며, 문헌상의 함량 0.5~1.0% (Xu *et al.*, 1999)와 시중에서 약재로 사용되는 중국산 자연산 뿌리의 경우 0.172% (D.W)에 비교하여 현탁배양세포는 배양조건에 상관없이 비교하여 함량이 높았다. sucrose 농도변화에서는 1% sucrose 일 때 0.22% (D.W)에서부터 5% sucrose에서 가장 높은 함량인 0.41% (D.W)까지의 함량변화를 보여 많은 2차대사의 탄소원의 영향에 대한 보고 (Ahn *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997)와 마찬가지로 탄소원의 영향을 나타내었다. 또한 암배양 [0.286% (D.W)]이 광배양 [0.123% (D.W)]에 비해 2배 이상의 높은 salidroside의 함량을 나타내었다 (Table 3). 이는 Xu *et al.* (1999)의 보고에서 제시한 여러 조건에서의 캘러스 현탁세포에서의 함량변화 (0.25~0.8%)에 비교하여 높지 않는 함유량을 보이고 있으나, 추후 배지 조성의 물리적, 화학적 배양환경의 조절여하에 따라서는 생산성의 증진을 이룰 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Salidroside contents in the normal roots and suspension cultured cells of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.

Conditions	Salidroside content (%, D.W.)
Sucrose 1%	0.22±0.06
Sucrose 3%	0.23±0.04
Sucrose 5%	0.41±0.03
Sucrose 7%	0.3 ±0.04
Dark condition	0.29±0.02
Light condition	0.12±0.05
Normal roots	0.17±0.03

적 요

참돌꽃의 캘러스는 0.5 ㎎/ℓ NAA와 1 ㎎/ℓ BA가 조합 첨가된 1/2MS 배지에서 유도하였으며, 현탁세포배양은 0.5 ㎎/ℓ NAA 와 1 ㎎/ℓ BA가 조합 첨가된 2B5 배지에서 확립되었다. 한편, 참돌꽃 뿌리로부터 반복된 silicagel colum chromatography와 분취 HPLC를 통하여 순수한 salidroside 결정을 얻었으며, 얻어진 결정체는 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 및 ^{1}H-^{1}H COSY 등의 분광학적 분석으로 구조를 동정 · 확인하였다. 확립된 세포배양계에서 salidroside 함량은 원뿌리 0.17%에 비교하여 광배양 (0.12%) 암배양 (0.286%) 및 sucrose 5%에서 함량이 0.41% 까지의 함량변화를 나타내었다.

사 사

본 연구는 바이오그린21(2003년) 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

Anh JC, Yang SJ, Sung CK, Pyo BS, Choi JW, Hwang B (1998) Improvement of tropane alkaloid productivity by optimization of sucrose contration and addition of hydroxyapatite in hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Korean J. Plant Tissue Culture 25:21-25.

Lee MW, Lee YH, Park HM, Toh SH, Lee EJ, Jang HD, Kim YH (2000) Antioxidant Phenolic Compounds from the Roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch. pharm. Res. 23:455-458.

Linch PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS (2000) Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. Arch. Pharm. Res. 23:349-352.

Ming HQ, Xia GC, Zhang RD (1998) Advanced research on *Rhodiola*. Chin Traditional and Herbal Drugs 19:229-234.

Miglan Jiang , Wentian Z , Han H (1994) Studies on producting effective medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin. J. Shen. Univ. 25:355-359.

Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, AlovaL., Petkov V, Todorov I (1986) Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rose* L. root on learning and memory. Act Physiol. Pharmacol. Bulg. 12:3-16.

Kim SJ, Hwang B, Hwang SJ, Ahn JC (2004) Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Korean J. Biotechnology 31:89-94

Wenzhe F, Yasuhiro T, Khin MN, Shigetoshi K (2001) Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sachalinensis*. Chem. Pharm. Bull. 49(4):396-401.

Xu JF, Liu CB., Han AM., Feng PS., Su ZG (1998) Strategies for the improvement of salidroside production in cell supension cultures of *Rhodila sachalinensis*. Plant Cell Reports 17:288-293

Xu JF, Ying PQ., Han AM, Su ZG (1999) Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodila sachalinensis*: Manipulation of plant growth regulators and sucrose. Plant cell, Tissue and Organ Culture 55:53-58.

Yang DC, Kong HM, Lee KS, Kim YH, Yang DV (1997) Effect of pH, sucrose and vitamins on the growth and tropane alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. tutula Torr. Korean J. Plant Tissue Culture 24:143-148.

Zong Y, Lowell K, ping JA, Che CT, Pezzuto JM, Fong HH (1991) Phenolic constituents of *Rhodiola* coccinea a Tibetan folk medicine. Planta Med. 57:589.

박석근, 한유경, 김기선, 김정일 (1999) 신비의 약초 홍경천. 도서출판진솔. p. 13-17.

이연아, 조수민, 이민원 (2002) 홍경천의 플라보노이드 화합물. 생약학회지. 33:116-119.

임대관, 최웅, 신동화 (1996) 국내산 약용식물 추출물의 항산화 효과 검색과 용매 분획물의 비교. 한국식품과학회지 28:83-89.