

산겨릅나무 줄기추출물의 생리활성 및 유효성분 분리

홍보경*¹ · 엄석현***¹ · 이찬옥* · 이지원* · 정종현* · 김재광** · 조동하***
유창연* · 권용수**** · 김명조*[†]

*강원대학교 농업생명과학대학 생물자원공학부, **농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과,
강원대학교 BT특성화학부대학, *강원대학교 약학대학

Biological Activities and Bioactive Compounds in the Extract of *Acer tegmentosum* Maxim. Stem

Bo Kyong Hong*¹, SeoK Hyun Eom***¹, Chan Ok Lee*, Ji Won Lee*, Jong Hyun Jeong*,
Jae Kwang Kim**, Dong Ha Cho***, Chang Yeon Yu*, Yong Soo Kwon****, and Myong Jo Kim*[†]

*Division of Bio-resources Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

**National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea.

***School of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

****College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

ABSTRACT : *Acer tegmentosum* (Aceraceae) has been used a source of traditional medicines for the treatment of hepatic disorders in Korea. This research was conducted to determine biofunctional activities of *A. tegmentosum* stem extract and to identify its bioactive components. Methanolic extract from *A. tegmentosum* stem was partitioned by using organic solvents, including *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water. Two compounds were isolated by using an ODS column chromatography from ethyl acetate soluble fraction shown to the strongest antioxidant activity ($RC_{50} = 3.15 \mu\text{g}/\text{mL}$) among the fractions. The isolated compounds were analyzed by ¹H and ¹³C NMR, IR, UV/VIS, MS spectrum data and identified as catechin, ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside. The compounds have shown strong antioxidant activity, with similar activity to BHA ($RC_{50} = 2 \mu\text{g}/\text{mL}$). Especially, ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside was shown strong anti-lipid peroxidative activity. However, the compounds were not shown antimicrobial activities. In antimicrobial activity assays, ethyl acetate soluble fraction was effective to bacterial inhibition, such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*, with minimum inhibitory concentrations in 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Otherwise, antifungal activity against *Candida albicans* was shown in *n*-hexane soluble fraction exhibiting 63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of minimum inhibitory concentration. In anticomplementary activity assays, water soluble fraction was the most effective exhibiting 24% inhibitory activity.

Key Words : *Acer tegmentosum*, anticomplement activity, antimicrobial activity, DPPH free radical scavenging activity, ferric thioxyanate method

서 언

산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Maxim.)는 국내 고산지대의 계곡에 자라는 단풍나무과 (Aceraceae)의 낙엽 소교목으로서, 민간에서는 벌나무라 부르며 본초에서는 청해척이라 하여 종기와 외상 출혈에 짓궂어서 환부에 붙이고 외상 출혈에 지혈 작용을 나타낸다 (안, 1998). 인산 김일훈의 저서 (1986)에 의하면 벌나무는 간암, 간경화, 간옹, 간위, 백혈병 등 일체의 간병에 탁월한 효과가 있다고 한다.

산겨릅나무의 연구로는 phenol성 물질로 (-)-Catechin, Morin-3-*O*- α -L-lyxoside, ρ -Hydroxyphenylethyl-*O*- β -D-glucopyranoside, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*O*- β -D-glucoside, Fraxine, 2,6-Dimethoxy-4-hydroxybenzyl alcohol -1-*O*- β -D-glucopyranoside, 4-(2',3'-Dihydroxypropyl)-2,6-dimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside, 3,7,3',4'-Tetramethyl-quercetin과 5,3'-Dihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone 및 2,6-dimethoxy- ρ -hydroquinone이 밝혀져 있으며 (박, 2006), 또한 Hur 등 (2006)이 Methyl gallate 4-*O*- β -glucopyranoside와 Salidroside을 분리 하여 보고

¹These two authors are equally contributed to this work.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6414 (E-mail) kimmjo@kangwon.ac.kr

Received July 22, 2007 / Accepted August 2, 2007

하였다. 동맥경화 억제 활성을 나타내고 (Yu *et al.*, 2003), Shin 등 (2005)은 위암세포와 간암세포에 대해 높은 억제력을 나타내었다고 보고하였다. Kim 등 (2005)은 소 뇌조직의 Mg²⁺ 비의존형, 중성형 sphingomyelinase 억제 활성에 대하여 우수한 활성을 나타내었다고 보고하였다. 박 (2006)이 연구한 compound의 5종 암세포주 (non small cell lung adenocarcinoma, breast; epithelial; pleural effusion adenocarcinoma, colon cancer cells)를 대상으로 한 세포증식 저해 효과 실험에서 높은 세포독성을 나타내었다고 보고 하였다.

본 연구에서는 산겨릅나무 추출물에 대한 생리활성 검정을 목적으로 항산화 활성, 항지질과산화 활성, 항미생물 활성, 항보체 활성을 실험하였으며, 산겨릅나무 ethyl acetate분획을 대상으로 silica, ODS gel을 이용하여 column chromatography를 실시하여 생리활성이 뛰어난 성분을 분리하여 그 구조를 동정하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용한 산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Maxim.)는 강원도 인제군 점봉산 고지대에서 2005년 7월에 채취하여 전문가에게 동정 받은 것으로 실온 음지에서 7일 동안 건조한 후 잘게 잘라 사용하였다.

2. 기기 및 시약

본 연구에서 물질 분리 및 생리활성 검정에 사용한 UV/VIS Spectra는 Jasco社 V530 spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, ELISA reader는 Molecular Devices Corp.社의 VERSAMAX reader를 이용하여 측정하였다. ¹H 및 ¹³C-NMR spectra는 Varian Gemini 200 spectrometer와 Bruker DPX 400 MHz (9.4T)를 사용하여 측정하였으며, FAB-MS는 Autospec. M363 series (Micromass, Euroscience, Manchester. U. K.)를 이용하였고 RT-IR은 EXCALOBER Series (BIORAD, Cambridge, U.S.A)로 측정하였다. TLC 전개용매 및 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였고, column chromatography의 충전제는 Kieselgel 60 (70-230 mesh, 230-400 mesh ASTM, Merck Art, No. 7734, 9385) 및 YMC*GEL ODS-A (12 nm, S-175 μm)를 사용하였다. NMR 분석용 DMSO-d₆는 ALDRICH社 제품을 구입하여 사용하였다. 생리활성 실험에서 사용된 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), linoleic acid, ammonium thiocyanate, hemolysin, complement와 대조구로 사용한 BHA (tert-butyl hydroxyanisole), BHT (tert-butyl hydroxytoluene), α-tocopherol, (+)-catechin, tetracyclin은 Sigma社 제품을 사용하였다. 양 적혈구 (SRBC)는 Union Lab社 제품을 이용하였으며, 그 외에 사용한 시약들은

모두 DEAJUNG 및 Junsei社의 특급 제품을 구입하여 사용하였다.

3. 추출 및 분획

산겨릅나무 줄기 856.8g을 100% methanol에 60°C에서 4시간 동안 환류추출시켜 3회 반복 추출하여 546.8g의 methanol 조추출물을 얻었다. methanol 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol 순으로 용매분획을 실시하였다. 위 과정은 각각 3회 반복하였으며, 각각 용매의 분획물은 40°C 이하의 중탕에서 감압 농축하여 hexane 분획 2.8g, ethyl acetate 분획 9.24g, butanol 분획 15.07g 그리고 물 층 61.9g을 얻었다.

4. 생리활성 실험

1) DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성

항산화 활성을 조사하기 위하여 자유 라디칼인 DPPH를 사용한 항산화활성 측정방법 (Xiong *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1993)을 이용하였다. 유리 시험관에 4 ml의 methanol을 넣고 시료 화합물을 농도별 (1.5~30 μl)로 첨가한 다음 상기 DPPH (0.15 mM) 용액을 1 ml 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 UV/VIS spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 이 때 RC₅₀ (μg/ml)은 화합물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α-tocopherol, BHA, BHT와 비교하였다.

2) Ferric-thiocyanate 법에 의한 지질과산화 억제 활성

Linoleic acid를 기질로 한 과산화 반응 하에서 과산화물의 생성 억제능을 측정하는 Inatani 등 (1983)의 방법에 따라 실험하였다. 2.51% linoleic acid의 ethanol 용액 (2.0 ml), 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0, 4.0 ml), H₂O (1.9 ml) 및 10% tween 20 (0.1 ml)을 20 ml의 시험관에 시료의 최종농도가 0.005%가 되도록 전량을 10 ml로 하여 40°C의 암소에 방치하였다. 상기 시료 0.1 ml에 75% ethanol (9.7 ml) 및 30% ammonium thiocyanate (0.1 ml)를 가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 2 × 10⁻² M ferrous chloride tetrahydrate의 3.5% HCl (0.1 ml)을 가하고, 3분 후에 500 nm에서 UV/VIS spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 다음 식에 따라 과산화물 생성 억제능 (%)을 계산하였다.

$$\text{Lipid peroxidation (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abc}}{\text{Abs}}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of treated control at 500 nm

Abs : Absorbance of treated sample at 500 nm

3) 항미생물 활성

항미생물 활성을 조사하기 위하여 Kobayasi 등 (1996)의 serial 2-fold dilution법에 따라 조사하였다. 세균에 대한 항균 시험은 피검균으로 bacteria strain의 그람 양성균인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*와 그람 음성균인 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhimurium*, fungi strain인 *Candida albicans*를 이용하였다. 피검균을 1개월 간격으로 계대하여 사용하였으며 세균은 microcococcus와 nutrient, YM 배지에 배양하여 균체 현탁액을 직경 25 mm 시험관에 10 ml 씩 접종하여 각각 37°C와 30°C에서 12시간 진탕 배양 (100 rpm)하였다. 이 배양액을 각각의 배지에 100배 희석하여 항균시험에 사용하였다. 시료를 96 well micro assay plate의 제 1번구에 넣고 조제된 균체 현탁액을 분주하여 2배씩 희석하였다. 이것을 37°C와 30°C에서 24시간 동안 암 조건에서 배양하면서 세균의 증식을 육안으로 관찰하였다. 항균 활성은 세균의 생육을 억제하는 최저농도 (MIC : minimum inhibitory concentration)를 측정하였다 (Kim *et al.*, 1997).

4) 항보체 활성

Klerx 등 (1983)의 방법을 변형하여 항보체 활성을 측정하였다. Sample은 최저무게 (50 mg)에 대하여 200 μ l의 DMSO를 첨가한다. 1%의 RBC (red blood cell)와 hemolysin을 동일한 비율로 섞은 후 37°C에서 20분간 반응시키고 4°C에서 보관한다. Kolmen buffer는 0.1g의 $MgCl_2$ 와 0.04g의 $CaCl_2$, NaCl 8.5 g을 H_2O 1 l 에 용해시켜 만든다. 200 μ l의 Kolmen buffer에 sample 2 μ l를 첨가하고, 상기 용액 1 μ l를 complement 100 μ l 과 섞어 37°C에서 30분간 반응시키고 RBC와 hemolysin 반응액을 100 μ l 첨가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시킨다. 30분간 반응 시킨 후 10분 동안 2000 rpm에서 원심분리하고 상등액 150 μ l를 취하여 96 well micro assay plate에 옮긴 후, ELISA reader (SOFT_{max} Pro 4.0)를 이용하여 541 nm에서 흡광도를 측정한다. 항보체 활성은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = B - A$$

$$A : \text{DMSO (\%)} = \frac{\text{Abs}_{(-)\text{control}} - \text{Abs}_{\text{DMSO}}}{\text{Abs}_{(-)\text{control}}} \times 100$$

$$B : \text{Anticomplementary activity (\%)} = \frac{\text{Abs}_{(-)\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{(-)\text{control}}} \times 100$$

5. Column chromatography 법에 의한 생리활성 물질분리 및 정제

산겨릅나무 추출물로부터 얻은 용매 분획 중 DPPH 항산화 활성을 지표로 활성물질을 분리·정제하였다. 높은 항산화 활

성을 보인 ethyl acetate 분획 9.24 g을 methanol로 용해시킨 후, silica gel (7734, Merck 社)이 충전된 glass column (ϕ 5.5 \times 70 cm)을 이용하여 toluene, acetone, methanol의 혼합용매로 전개하여 10개의 소분획을 얻었다. 이 중 활성을 강하게 나타내며 수율이 높은 소분획 5 (875.3 mg)을 대상으로 다시 silica gel (7734, Merck 社)을 glass column (ϕ 2 \times 20 cm)에 충전하고 toluene : acetone : methanol (6/2.5/1.5)의 혼합용매를 사용하여 6개의 소분획을 얻었다. 이 중 가장 강한 활성을 보이는 소분획 5 (80 mg)를 대상으로 3차 open column chromatography를 실시하였다. Silica gel (9385, Merck 社)를 glass column (ϕ 1 \times 15 cm)에 충전하고 HPLC용 pump를 이용하여 chloroform : methanol (9/1)에서 chloroform : methanol (0/10) 까지 stepwise chromatography를 실시하여 최종적으로 compound 1 (37 mg)을 얻었다.

다시 상위의 1차 open column chromatography를 실시하여 얻은 소분획 중 항산화 및 항미생물 활성이 가장 강하고 수율이 높았던 At-13-8 1091.5 mg 중 300 mg을 취하여 2차 open column chromatography를 실시하였다. Octadecylsilica gel (ODS)을 glass column (ϕ 0.7 \times 15 cm)에 충전하고 HPLC용 pump를 이용하여 20% methanol에서 60% methanol까지 stepwise chromatography를 실시하여 compound 2 (17 mg)를 분리하였다. 상기의 방법으로 분리된 화합물은 IR, UV/VIS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS 등의 기기분석을 통하여 그 구조를 밝혔다.

Compound 1

Catechin : Pale yellow powder

MS m/z : 290 [M]⁺, [C₁₅H₁₄O₆]⁺

IR : γ max (KBr, cm⁻¹) 3291 (OH), 1515, 1456 (aromatic C=C)

UV : λ max (MeOH, nm) : 235, 280

¹H-NMR (200 Mhz, DMSO-*d*₆) : δ : 6.70 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-2'), 6.62 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6'), 6.58 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-5'), 5.90 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.69 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 4.49 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2), 4.15 (1H, m, H-3), 2.70 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, H-4a), 2.62 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-4b)

¹³C-NMR (50 Mhz, DMSO-*d*₆) : δ : 157.26 (C-7), 156.99 (C-5), 156.16 (C-8a), 145.63 (C-3', 4'), 131.35 (C-1'), 119.19 (C-6'), 115.81 (C-5'), 115.23 (C-2'), 99.77 (C-4a), 95.80 (C-6), 94.54 (C-8), 81.70 (C-2), 66.98 (C-3), 28.50 (C-4)

Compound 2

ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside : yellow liquid

MS m/z : 452 [M]⁺, [C₂₁H₂₄O₁₁]⁺
 IR : γ max (KBr, cm⁻¹) 3267 (OH), 1706 (-COO-), 1512, 1445 (aromatic C=C),
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 6.96 (4H, dd, J=8.38, 3.45 Hz, galloyl H), 6.61 (2H, d, J=8.36 Hz, aromatic H), 5.18 (1H, s, aromatic H), 5.07 (2H, s, aromatic H), 4.39 (1H, dd, J=10.14, 1.67 Hz, glucose H), 4.25 (2H, dd, J=5.63, 7.60 Hz, aromatic H), 3.78 (1H, m, glucose H), 3.58 (1H, m, glucose H), 3.43 (2H, m, glucose H), 3.20 (3H, m, glucose H), 3.00 (1H, t, J=16.07 Hz glucose H), 2.69 (2H, m, -CH₂CH₂-), 1.05 (1H, t, J=14 Hz, -CH₂CH₂-)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 166.153 (-COO-), 155.91 (C-4'), 145.90 (C-3), 138.81 (C-4), 130.08 (C-2', 6'), 128.84 (C-1'), 119.77 (C-1), 115.38 (C-3', 5'), 108.94 (C-2), 103.41 (C-1''), 76.856 (C-3''), 74.046 (C-5''), 73.739 (C-2''), 70.501 (C-4''), 70.258 (C-1), 56.393 (C-6'')

결과 및 고찰

1. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성

산겨릅나무 줄기 추출물에 대한 항산화 활성은 DPPH free radical을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도 (RC₅₀)로 나타냈다. 항산화 활성 실험을 시행한 결과 (Table 1)를 보면 산겨릅나무 methanol 추출물 (RC₅₀=5 μg/ml)에서 높은 활성을 보였으며, ethyl acetate 분획 (RC₅₀=3.15 μg/ml)과 butanol 분획 (RC₅₀=5.17 μg/ml)에서도 강한 항산화 활성을 보였다. 이는 대조군인 합성 항산화제 BHT (RC₅₀=39.3 μg/ml)와 천연 항산화제 α-tocopherol ((RC₅₀=3.33 μg/ml)과 비교해 볼 때 더 강하거나 비슷한 활성을 나타냄을 확인할 수 있다. 항산화 활성이 가장 높았던 ethyl acetate 분획을 대상으로 분리한 compound 1 (RC₅₀=2.3 μg/ml)과 compound 2 (RC₅₀=2 μg/ml 이하)의 활성이 우수한 결과를 볼 때 두 화합물은 산겨릅나무의 항산화 활성을 관여하는 주요 성분일 것으로 판단된다. Catechin으로 동정된 compound 1의 경우 (+)-catechin이 2 μg/ml 이하의 RC₅₀ 값을 나타내어 유사한 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

단풍나무과인 신나무의 추출물 및 분획물을 대상을 항산화 실험을 한 보고 (Han *et al.*, 1999)와 비교하여 볼 때 전체적으로 산겨릅나무 추출물 및 분획물이 더 강한 활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다. Fumijo 등 (1996)은 녹차에서 분리한 catechin을 대상으로 항산화 활성을 연구한 결과 SC₅₀ 값 2.9 μM을 나타냄으로서 대조군인 α-tocopherol (SC₅₀=18 μM) 및 ascorbic acid (SC₅₀=13 μM) 보다 우수한 활성을 나타내었다고 보고하였다. Flavonoids 기능의 메카니즘은 scavenging이나 chelating 과정을 통해 나타나며 (Kessler *et*

Table 1. DPPH¹⁾ free radical scavenging activities in methanolic extract of *A. tegmentum* and its subfractions

Extract and fractions	RC ₅₀ ²⁾ (μg/ml)
MeOH extract	5
Hexane fraction	27 ± 10
EtOAc fraction	3.15 ± 0.29
BuOH fraction	5.17 ± 0.29
Aqueous fraction	14.33 ± 0.58
Compound 1	2.30 ± 0.20
Compound 2	« 2
α-Tocopherol	3.33 ± 1.15
BHA	« 2
BHT	39.3 ± 0.58
(+)-Catechin	« 2

¹⁾ DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

²⁾ RC₅₀ : Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min. Each value is mean ± standard derivation of triplicate tests.

al., 2003), phenol성 화합물의 경우 free radical에 terminator 작용을 함으로서 활성을 나타내는데 (Shahidi and Wanasundara, 1992), 이러한 기작을 통해 flavonoid와 lignan류인 compound 1과 2가 DPPH free radical에 대하여 소거 활성능을 나타냄을 확인할 수 있다.

2) Ferric thiocyanate 법에 의한 지질과산화 억제 활성

Linoleic acid의 산화를 억제하는 효과를 관찰하기 위해 ferric thiocyanate 방법을 사용한 실험은 산겨릅나무 methanol 추출물 및 분획을 동일한 조건으로 처리하고 15일 동안 2일에 한번씩 측정하였다 (Fig. 1). Control은 5일부터 급격한 산화를 보였으며, hexane 분획, 산겨릅나무 추출물, butanol 분획, ethyl acetate 분획, 물 층 순으로 지질과산화 억제 활성을 나타냈다. Ethyl acetate 분획에서 분리된 compound 1과 compound 2의 경우 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA, BHT와 비슷하게 13일 동안 흡광도의 변화를 보이지 않으면서 지속적인 과산화 지질 형성 억제능을 보여 최종 15일에는 각각 76%, 85%의 항지질과산화 억제율을 보였다 (Fig. 1 B; Fig. 2). Ethyl acetate 분획에서 항지질과산화 활성이 우수한 것은 Bindol 등 (1977)이 보고한 flavonoid에 의한 막의 지질과산화를 방지하는 oxygen-free radical scavenging effect라고 생각된다.

3) 항미생물 활성

산겨릅나무 줄기 추출물 및 용매에 따른 분획물에 대한 항미생물 활성 검정은 2-fold dilution method (Kobayasi *et al.*, 1996)을 이용하여 최저 억제 농도 (MIC : minimum inhibitory concentration)를 조사하였다 (Table 2). 박테리아에 대한 항균시험은, gram 양성균 중 식품의 부패에 관계하는 고

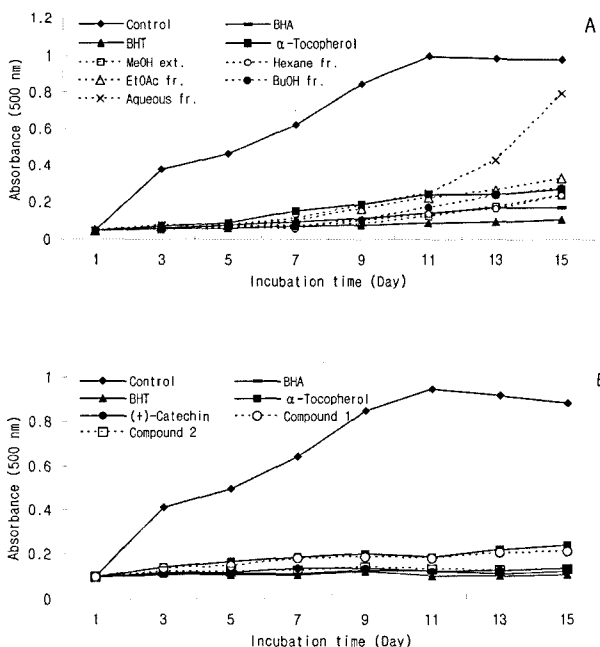


Fig. 1. Antioxidative activities of *A. tegmentosum* extracts based on a ferric thiocyanate method.

(A) : Antioxidative activities of methanolic extract and its subfractions, (B) : Antioxidative activities of compounds isolated from EtOAc fraction compared with standard chemicals

초균 *B. subtilis*, 회농성질환 병원균이며 식중독 원인 균인 *S. aureus* 균주와 gram 음성균 중 식품오염의 지표균인 *E. coli*, 식중독 미생물인 *S. typhimurium*, 세균성 폐렴을 일으키는 *K. pneumonia*를 사용하였다.

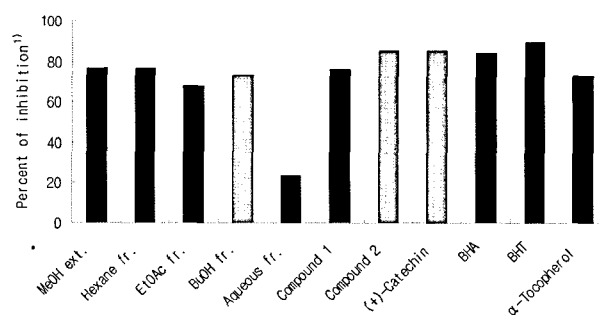


Fig. 2. Antioxidant activities of methanolic extract of *A. tegmentosum* and its subfractions based on a ferric thiocyanate method after 15 day incubation.

¹⁾ Percent inhibition (capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid) = [1 - (absorbance of sample at 500 nm) / (absorbance of control at 500 nm)] × 100

A high inhibition percent indicates a high antioxidant activity.

항균활성 실험결과 추출물 및 분획물은 *S. aureus*를 제외한 피검균에 대해 생육 억제 활성을 나타냈으며, 특히 ethyl acetate 분획이 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다. 반면 ethyl acetate 분획에서 분리한 compound 1, 2 및 항균활성이 우수하다고 알려져 있는 (+)-catechin은 모든 피검균에 대해 1000 µg/ml 이상의 최저 억제 농도를 나타냈다. 이는 catechin 류 함량이 많은 차에서 항균효과가 뛰어났으며, polyphenol 화합물 중 gallate 기가 결합되어 있는 catechin 류가 주로 관여한다는 보고와 결부시켜 볼 때, non-gallate 화합물인 compound 1 및 (+)-catechin은 항균 작용이 낮은 것으로 생각된다. (Yeo *et al.*, 1995; 原과 正, 1989; Sakanaka *et al.*, 1989).

Table 2. Antimicrobial activities in methanolic extract of *A. tegmentosum* and its subfractions

Extracts and fractions	MIC ¹⁾ (µg/ml)					
	Bacteria strain					Fungi strain
	Gram (+)		Gram (-)			
	B.s. ²⁾	S.a. ²⁾	E.c. ²⁾	S.t. ²⁾	K.p. ²⁾	C.a. ²⁾
MeOH extract	500	1000<	500	500	500	250
Hexane fraction	125	1000<	1000<	1000<	1000<	62
EtOAc fraction	250	1000	125	500	125	250
BuOH fraction	250	1000	500	500	500	250
Aqueous fraction	250	1000<	500	1000	1000	250
Compound 1	1000<	1000<	1000<	1000<	1000<	500
Compound 2	1000<	1000<	1000<	1000<	1000<	250
(+)-Catechin	1000<	1000<	1000<	1000<	1000<	500
Ketoconazol	-	-	-	-	-	250
Mycostantin	-	-	-	-	-	500
Tetracyclin	8	8	8	8	8	-

¹⁾ The MIC value against bacteria was determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye.

²⁾ B.s. : *Bacillus subtilis*, S.a. : *Staphylococcus aureus*, E.c. : *Escherichia coli*, S.t. : *Salmonella typhimurium*, K.p. : *Klebsiella pneumonia*, C.a. : *Candida albicans*

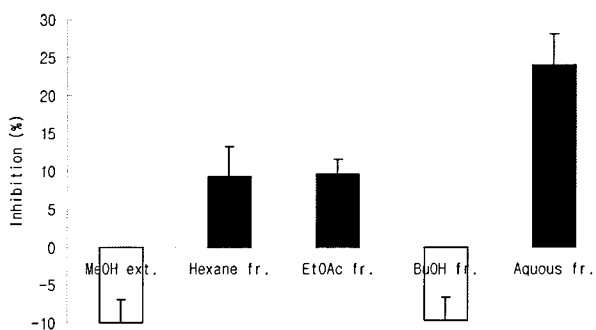


Fig. 3. Anticomplementary activities in methanolic extract of *A. tegmentosum* and its subfractions. Each bar represents the mean of at least four independent experiments with standard deviation.

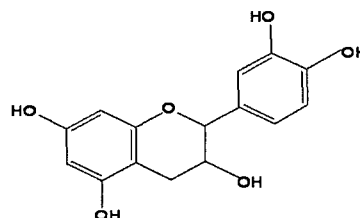
사람의 생식기나 입주위에 칸디다증 (candidiasis)을 일으키는 *C. albicans*를 대상으로 항균활성을 실험한 결과 실험 군주에 대하여 산겨릅나무 추출물 및 분획물에서 균 증식 억제 능이 확인되었다. 대조군인 ketoconazole이 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 첨가구에서 생육저해 효과가 나타난 것에 대해, 전반적으로 유사한 농도에서 증식이 상당히 억제 되었으며 특히 hexane 분획에서는 62 $\mu\text{g/ml}$ 의 첨가구에서 증식억제 효과를 나타내었다. Ethyl acetate에서 분리한 compound 2는 *C. albicans*에 대해 생육 증식 최저 억제 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 로서 대조군인 ketoconazole과 동일한 활성을 나타내었다. Catechin으로 동정된 compound 1은 최저 억제농도 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 첨가구에서 생육 저해 효과가 나타났으며, 대조군 mycostantin (MIC = 500 $\mu\text{g/ml}$)과 유사한 증식 억제 효과를 나타내었다. *Feronia limonia*에서 분리된 lignan류를 대상으로 *C. albicans* 생육 저해 활성능을 실험 한 보고 (Rahman and Alexander, 2002)와 비교해 볼 때 강한 항균작용을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

4) 항보체 활성

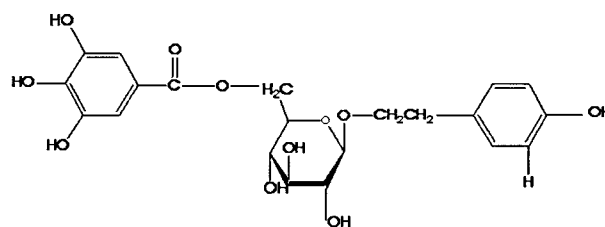
산겨릅나무가 갖는 면역활성능을 검토하기 위해 Fig. 3에 제시된 바와 같은 추출물 및 분획물을 대상으로 Klex 등 (1983)의 방법을 변형하여 보체계 활성화 정도를 검토하였다. 항보체 활성은 보체의 용혈작용을 50% 억제시키는 조건에서 시료의 항보체 활성을 percent로 표시하였다. 본 실험에서는 시료가 면역활성능을 가지게 되면 보체계를 활성화 시켜서 결과적으로 보체를 감소시키게 되므로 용혈작용이 감소하게 된다. 따라서 항보체 활성이 높을수록 면역활성능이 크다고 할 수 있다. 시료들을 각 10 mg/ml 농도로 조제하여 보체계 활성화능을 측정 한 결과 물 층 24%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, hexane 분획과 ethyl acetate 분획은 각각 9.2%, 9.6%의 활성을 나타냈다. 보리 추출물, *Lithospermum euchromum*에서 분리된 다당 및 균체인 *Lactobacillus plantarum*의 당류에 의해 높은 항보체 활성을 나타낸다는 보고 (Kim and Koo,

1997; Yamada *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2002) 를 통해 본 실험의 물 층이 높은 활성을 나타내는 것은 함유되어 있는 다당류에 기인한 것이라 생각된다.

3. 생리활성물질 분자구조 해석



Compound 1



Compound 2

Fig. 4. Chemical structures of compounds isolated from stem of *A. tegmentosum*.

Compound 1의 구조

Compound 1은 연한 황색 분말 물질로서 IR spectrum에서는 3267 (OH), 1515, 1456 (aromatic C=C) cm^{-1} 등에서 흡수를 나타내었으며, UV spectrum λ 에서 max가 280 nm, 235 nm 에서 나타났다. MS spectrum에서는 molecular ion peak $[\text{M}]^+$ 가 290로 관찰되었으며, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 종합하여 molecular formula를 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 로 추정하였다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum의 aromatic 지역에 δ 6.70에서 $J=9$ Hz 인 H-2' signal, δ 6.62에서 $J=1.6$ Hz 인 H-6' signal 및 δ 6.58에서 $J=1.8$ Hz 인 H-5' signal이 doublet signal임을 확인하였다. δ 5.90, δ 5.69에서는 5,7-dihydroxylation pattern의 H-6, H-8의 두개의 meta couple된 doublet signal ($J=2.2$ Hz)을 확인하였다. oxygenated proton으로는 δ 4.49에서는 H-2에 의한 doublet ($J=7.2$ Hz), δ 4.15에서는 H-3에 의한 multiplet signal임을 확인할 수 있었다. aliphatic 지역에서 나타난 δ 2.70과 δ 2.62에서 H-4에 의한 각각 doublet signal ($J=5.4$ Hz 및 $J=5.6$ Hz)의 2개의 peak가 관찰되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 olefinic carbon에서 δ 157.26, δ 156.99, δ 156.16, δ 145.63, δ 131.35, δ 119.19, δ 115.81, δ 115.23, δ 99.77, δ 95.80, δ 94.54 및 oxygenated carbon에서 δ 81.70, δ 66.98을 관찰하였으며, δ 28.50 aliphatic carbon을 관찰하였다. 이상의 실험과 문헌 (Kim *et al.*, 2001;

박, 2006)을 비교하여 이 화합물을 catechin으로 동정하였다.

Compound 2의 구조

Compound 2는 황색 액상 물질로서 IR spectrum에서는 3267 (OH), 1706 (-COOC-), 1512, 1445 (aromatic C=C) cm^{-1} 등에서 흡수를 나타내었으며, FAB-MS spectrum에서 molecular ion peak $[M+H]^+$ 가 253, $[M+Na]^+$ 가 475로 관찰되어 $[M]^+$ 가 452임을 확인할 수 있었다. 그리고 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 종합하여 molecular formula를 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ 로 추정하였다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum의 galloyl 지역에 δ 6.96에서 $J=8.38$ Hz 인 H signal을 관찰하였으며, aromatic 지역에서 δ 6.61 (2H, d, $J=8.36$ Hz), δ 5.18 (1H, s), δ 5.07 (2H, s), δ 4.25 (2H, dd, $J=5.63, 7.60$ Hz)을 관찰하였다. Glucose 지역으로는 δ 4.39 (1H, dd, $J=10.14, 1.67$ Hz)와 3.78 (1H, m), 3.58 (1H, m), 3.43 (2H, m), 3.20 (3H, m), 3.00 (1H, t, $J=16.07$ Hz)을 관찰할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 galloyl carbon에서 δ 166.15, δ 145.90, δ 138.81, δ 119.77, δ 108.94 및 aglycone carbon에서 δ 130.08, δ 115.38을 관찰하였으며, δ 76.85, δ 74.04, δ 73.73, δ 70.50, δ 70.25, δ 56.39 glucose carbon을 관찰하였다. 이상의 실험과 문헌 (Nonaka *et al.*, 1982)을 비교하여 이 화합물을 ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1- O - β -D-(6"- O -galloyl)-glucopyranoside로 동정하였다. ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1- O - β -D-(6"- O -galloyl)-glucopyranoside는 *Quercus stenophylla* M. 및 *Salix triandra* L에서 분리된 바 있으나 산겨릅나무에서는 처음 분리되었다.

적 요

본 연구에서는 소종과 외상출혈 치료에 사용되며, 주로 간암, 간경화 등의 간 질환 치료제로 사용되어 온 산겨릅나무 추출물에서 식품 및 음료 등과 같은 기능성 식품으로서의 다양한 산업적 응용분야에 널리 응용될 수 있는 기초연구의 일환으로 산겨릅나무 추출물을 이용하여 항산화 활성, 항지질과산화 활성, 항미생물 활성, 항보체 활성을 실험하였으며, 또한 유용한 생리활성 성분을 분리, 동정하고자 하였다. 그 결과 산겨릅나무 추출물은 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성 실험에서는 ethyl acetate 분획 ($\text{RC}_{50}=3.15 \mu\text{g}/\text{ml}$), butanol 분획 ($\text{RC}_{50}=5.17 \mu\text{g}/\text{ml}$)에서 강한 항산화 활성을 보였다. 또한 분리된 2개의 화합물도 대조군인 α -tocopherol 이나 BHA보다 유사하거나 강한 항산화 활성을 나타냈다. linoleic acid에 대한 항지질과산화 활성 실험은 15일 째에 물층을 제외한 추출물, 분획물 및 화합물에서 높은 활성을 나타냈으며 특히 화합물 2 (85%)는 항산화 물질로 알려진

catechin (85%)과 유사한 활성을 나타내었다. 박테리아에 대한 항균실험은 *Staphylococcus aureus* 에서만 활성을 보이지 않았을 뿐 다른 피검균에서는 높은 활성을 보였다. 하지만 대부분의 피검균에 대하여 강한 활성을 보인 ethyl acetate 분획에서 분리된 화합물 1, 2는 모든 피검균에 대해 활성을 보이지 않았다. 다만 fungal strain인 *Candida albicans*에 대해 각각 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$, $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 생육 억제 농도를 나타내었다. 보체계 활성화능을 측정한 결과 물 층 24%를 제외한 다른 분획물은 10% 이하의 낮은 억제효과를 보이거나 활성이 나타나지 않았다. 산겨릅나무 ethyl acetate 분획을 silica gel이 충전된 grass open column에 넣은 후, toluene, acetone, methanol의 혼합용매로 순차용출 (stepwise)시킨 후, ODS와 silica gel을 이용하여 column chromatography를 실시함으로써 2종의 단일 물질을 얻었다. 이 화합물은 ^1H - 및 ^{13}C -NMR, IR, UV, EI/FAB-Mass spectrum을 이용하여 기기분석한 결과 compound 1은 catechin으로, compound 2는 ρ -Hydroxyphenethyl alcohol 1- O - β -D-(6"- O -galloyl)-glucopyranoside로 동정되었으며, 특히 compound 2의 경우 산겨릅나무에서 처음 분리되었다. 위 결과 산겨릅나무 추출물은 항산화 활성, 항지질과산화 활성, 항미생물 활성이 우수하였다. 또한 산겨릅나무 추출물을 이용한 다면 식품 및 음료 등과 같은 기능성 식품으로서의 다양한 산업적 응용분야에 널리 응용될 수 있으리라 사해된다.

사 사

본 연구는 강원도 농업기술원 지원 및 강원대학교 한방바이오연구소 지원에 의한 것으로 이에 감사를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Bindol A, Carallin L, Silipandri N (1997) Inhibitory action of silymarin of lipid peroxidation formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochemical and Pharmacology* 26:2405-2409.
- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Korean Journal of Pharmacology* 24:299-303.
- Fumijo N, Keiichi G, Ryota S, Masayuki S, Miwa S, Yukihiko H (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine* 21:895-902.
- Han SS, Lo SC, Choi YH, Kim MJ, Kwak SS (1999) Antioxidative compounds in extracts of *Acer ginnala* Max. *Journal of Korean Crop Science* 7:51-57.
- Hur JM, Yang EJ, Choi SH, Song KS (2006) Isolation of phenolic glucosides from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *Journal of Korean Science* 49:149-152.
- Inatani R, Nakatani N, Fuwa H (1983) Antioxidative effect of

- the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:521-528.
- Kessler M, Ubeaud G, Jung L** (2003) Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55:131-142.
- Kim JH, Shin KS, Lee H** (2002) Characterization and action mode of anticomplementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean Journal of Food Science and Technology* 34:290-295.
- Kim JS, Cho SM, Kim JH, Lee MW** (2001) Phenolic compounds from the node of lotus rhizome (*Nelumbo nucifera* Gaertn). *Korean Journal of Pharmacy and science* 45:599-603.
- Kim MJ, Hyun JO** (1997) Genetic variation in urushiol components of *Rhus verniciflua* Stokes. *Kor. J. Vreed.* 29:115-123.
- Kim SK, Jung SM, Ahn KH, Jeon HJ, Lee DH, Jung KM, Jung SY, Kim DK** (2005) Identification of three competitive inhibitors for membrane associated, Mg²⁺- dependent and neutral 60kDa sphingomyelinase activity. *Archives of pharmcal Research* 28:923-929.
- Kim YY, Koo SJ** (1997) Anticomplementary activity and immune-stimulating effect of the extracts from barley (*Hordeum vulgare*). *Korean Journal of Food Science and Technology* 13:661-668.
- Klerx JP, Benkelman CJ, Van DH, Willers JM** (1983) Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *Journal of Immunological Methods* 63:215-220.
- Kobayasi A, Kim MJ, Kawaz K** (1996) Uptake and exudation of phenolic compounds by wheat and antimicrobial components of the root exudate. *Zeitschrift fur Naturforsch* 51:527-533.
- Nonaka GI, Nishimura H, Nishioka I** (1982) Tannins and related compounds seven new phenol glucoside gallates from *Quercus stenophylla* Makino. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30:2061-2067.
- Rahman MM, Alexander IG** (2002) Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. *Phytochemistry* 59:73-77.
- Sakanaka S, Mujo K, Makoto T, Yamamoto T** (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:2307-2311.
- Shahidi F, Wanasundara PKJPD** (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32:67-103.
- Shin IC, Sa JH, Kim TW, Park KY, Jeong KJ, Lee TW, Han KS, Shim TH, Oh HS** (2005) The influenceable of plant extracts of inside Gangwon-do on AGS cell and Hep3B cell growth control. Report institute of health and environment 16:39-45.
- Xiong Q, Kadota S, Tadota T, Namba T** (1996) Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19:1580-1585.
- Yamada H, Yanahira S, Kiyhara H, Cyong JC, Otsuka Y** (1989) Water-soluble glucans from the seed of *Coix laorymajobi* var. *Ma-Yuen*. *Phytochemistry* 25:129.
- Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB** (1995) Antimicrobial effect of tea extracts from gren tea, oolong tea and black tea. *Journal of Korean Society Food Nutrient* 24:293-298.
- 박기면** (2006) 산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Maxim.)의 페놀성 성분연구, 성균관대학교 대학원 석사학위논문.
- 안덕균** (1998) 한국본초도감, 교학사, p. 523.
- 김일훈** (1986) 신약, 나무, p. 78-288.
- 原 征彦, 正 石上** (1989) 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に對する抗菌活性, 日本食品工業學會誌 36:996-999.