

해당화 줄기 및 뿌리의 주성분 분리 및 항산화활성

박병재*

키타미공업대학 SVBL

Isolation of main component and antioxidant activities on the stem and root of *Rosa rugosa*

Byoung-Jae Park*

SVBL, National University Corporation Kitami Institute of Technology, Kitami, Hokkaido 090-8507, Japan

Abstract - Total phenol content was obtained from the stem extract of 7.8 (g/100 g, D.W.) and root extract of 10.5 (g/100 g, D.W.) on *Rosa rugosa*. S-4 and R-2 compounds were isolated from the stem and root of *R. rugosa*. The structure of S-4 and R-2 compounds was assigned as catechin by ^1H , ^{13}C NMR signal and TOF-MS. The tannin content of stem extract was 752.5 (mg/100g, D.W.) as 6.3 of gallic acid, 61.5 of epicatechin and 684.8 of catechin. The tannin content of root extract was higher about 2 times (1676.0) as 6.8 of gallic acid, 160.3 of epicatechin and 1508.5 of catechin than that of stem. It was shown that catechin was main compound in the stem and root extracts of *R. rugosa*. Antioxidant activities were stronger low concentration, and were not different of stem and root extracts. As the results, stem and root of *R. rugosa* were evaluated, as natural antioxidant resource.

Key words - *Rosa rugosa*, Total phenol, Catechin, Antioxidant

서 언

해당화(*Rosa rugosa* Thunb.)는 장미과 장미속으로 해안가에 자생하는 낙엽관목이며, 일본, 한국, 중국을 포함한 동아시아의 온대지역부터 캄차카반도, 오후츠크해안의 아한대지역까지 넓게 분포하고 있다(Krussmann, 1982). 공해나 추위 등의 거친 환경에서도 잘 견디며, 토양선택성이 적어 원예용으로 널리 식재되고 있다(Shorthouse, 1988).

꽃은 차나 향료의 원료로서 이용되고 있고, 열매는 잼과 같은 가공식품으로 이용되고 있으나, 중국에서는 오래전부터 위통, 토혈, 월경과다, 설사 등의 치료에 이용해 왔으며, 한국과 일본에서는 민간약으로 당뇨의 치료와 예방에 이용되어 왔다(육, 1981; Akametsu, 1974; Kimura, 1978; Shanghai, 1985).

해당화에는 vitamin C가 풍부하며, terpenoid 및 phenyl-propanoid와 quercetin, isoquercetin, rutin 등의 flavonoid

와 tellimagrandin I, II, rugosin 등의 가수분해형 탄닌 및 catechin, catechin 유도체의 축합형 탄닌 등이 보고되어 있다(Kim, 2001; Hashidoko, 1996; Young, 1987; Park, 1993; Hatano, 1990a, 1990b). 이러한 성분들은 여러 생리활성에 관여하며, 해당화에서 항염증, 진경작용, 항알레르기작용, 항고지혈증, 피부노화예방, 미백효과, 당뇨치료 등의 연구가 보고되고 있고(Okawa, 2005; Hashidoko et al., 1989; Park et al., 2005; Choi et al., 1993; Jung et al., 2005), 특히, Ogata and Kano(1992)는 tellimagrandin I과 pedunculagin의 가수분해형탄닌은 HIV, HTLV-1의 transcriptase에 억제효과, Lee et al.(2003)은 *in vitro*에서 암세포의 생육을 억제시키며, 면역세포의 생육을 증진시키는 효과가 있다고 보고했다. 이와같이 해당화는 여러 생리활성과 관계가 깊어 기능성식품으로서의 이용, 의약품소재로서 주목을 받고 있다.

본 연구는 기능성식품소재, 의약품원료로서의 이용성을 증대시키기 위한 목적으로 해당화의 폴리페놀에 주목해, 일본산과 한국산 해당화의 줄기와 뿌리의 항산화활성을 비

*교신저자(E-mail) : seabass80@hanmail.net

교하고, 그 주성분으로 추정되는 성분을 단리, 정량하고자 한다.

재료 및 방법

추출 및 분리

2007년 7월 초순, 한국의 화성(K-1)과 양양(K-2), 일본의 북해도 Esashi(J-1), Wakkanai(J-2)에서 채취한 해당화의 줄기와 뿌리를 건조, 분말화하여 50% 에탄올로 3회 추출 후, 감압농축하여 동결건조시켰다. 동결건조된 추출물은 총페놀함량, 항산화활성, UPLC분석의 시료로 하였다.

주성분의 단리는 K-1의 줄기(S) 및 뿌리(R) 추출물을 사용하였다. 각각의 추출물 0.5 g은 sephadex LH-20(ϕ 3.0 × 34 cm) column을 사용해, EtOH-H₂O의 용매를 순차적으로 용출시켜 각 10개의 분획을 얻었고, 각각의 분획은 HPLC로 분석되었다. 90% EtOH로 용출된 뿌리의 R-2(70.0 mg), 줄기의 S-4(84.1 mg)분획은 HPLC로 단일화합물임을 확인한 후, 구조결정에 이용되었다.

¹H과 ¹³C-NMR은 JNM-A500 spectrometer(JEOL)로 500 MHz와 125 MHz에서 측정하였다. 측정온도는 30°C로 용매는 CD₃OD를 사용하였고, TMS를 internal standard로 하였다.

TOF-MS(JMS-T100LC)는 ESI-ion mode, probe voltage 2000V, desolvating chamber temp, 250°C, N₂ gas 0.7 MPa, mass rage 100-1000[m/z], scan speed 0.4 scan/s, Agilent 1100 series LC의 조건으로 분자량을 측정했다.

HPLC의 분석조건은 Shimadzu SPD-10A, column : TSK-gel (ODS-80STM) 4.6 × 250 cm, temp. : 30°C, UV : 280 nm, mobile phase : A phase 5% CH₃CN + 0.1% HCOOH, B phase CH₃CN + 0.1% HCOOH, gradient : 0 → 5 min. (A100%), 5 → 40 min. (A100 → 80%), 40 → 45 min. (A80 → 50%), 45 → 46 min. (A50 → B100%), flow rate : 0.8 ml/min.

총페놀함량

총페놀화합물의 함량은 Folin-Denis방법에 준하여 측정하였다. 동결건조된 추출물은 50% 에탄올에 용해시켜 시료로 하였다. 각각의 시료용액 60 μ l에 증류수 960 μ l, Folin-Denis 시약 60 μ l를 첨가해 교반하였다. 혼합용액에 포화 Na₂CO₃ 120 μ l 첨가해 교반후, 37°C에서 30분간

반응시켰다. 반응용액은 spectrometer(Ultrospec 3300 pro, USA)로 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 catechin(TCI, Japan), gallic acid(TCI, Japan)를 이용하여 작성된 검량선으로 총 페놀화합물의 함량을 계산하였다.

UPLC분석

K-1, K-2, J-1, J-2의 줄기 및 뿌리 추출물은 UPLC (ultra performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다. 표준물질은 gallic acid(TCI), catechin (TCI), epicatechin(Acrose)를 사용하였다.

분석조건은 Waters ultra performance LC PDA System, column : Acquity UPLC BEH C₁₈(ϕ 2.1 × 100 mm, 1.7 μ m), temp. : 30°C, flow rate : 0.2 ml/min, mobile phase : A phase 5% CH₃CN + 0.1% HCOOH, B phase CH₃CN + 0.1% HCOOH, gradient : 0 → 4 min. (A100%), 4 → 9 min. (A100 → 90%), 9 → 20 min. (A90 → 85%), 20 → 24 min. (A85 → 80%), 24 → 28 min. (A80 → 60%), 28 → 29 min. (A60 → 40%), 29 → 30 min. (A40 → B100%)

항산화활성

Free radical 소거활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Wako) 라디칼에 대한 전자공여효과에 나타나는 시료의 환원력으로 측정하였다. 동결건조된 각각의 추출물을 농도별 시료 1 ml에 500 μ M DPPH용액 1 ml를 첨가해 교반후, 37°C, 암소에서 20분간 반응시켰다. 반응용액은 517 nm의 흡광도를 측정하여, radical scavenging activity를 계산하였다.

$$\text{radical scavenging activity (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료첨가 흡광도

B: 시료무첨가 흡광도

SOD(Superoxide dismutase)유사활성은 추출물을 50% DMSO로 용해시켜 시료용액으로 하였다. SOD 유사활성은 SOD 활성검출 kit(Wako)를 이용하여 NBT(Nitro blue tetrazolium)환원법에 의해 측정하였다. 일정농도의 0.1 ml 시료에 0.1 M phosphate buffer(pH8.0), 0.2 mM xanthine, 0.24 mM NO₂-TB의 발색시약 1.0 ml과 0.049 Unit/ml Xanthine oxidase 1 ml를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 69 mM NaDS 2 ml로 반응을 정지시키고, 560 nm에서 흡광도를 측정하여 SOD 유사활성을 계산하였다.

결과 및 고찰

해당화의 에탄올추출 수율은 뿌리의 평균수율이 17.3%로 줄기의 15.1%보다 높게 나타났다. 총페놀화합물의 함량은 줄기와 뿌리 모두 높은 함량으로 줄기추출물이 평균 7.8(g/100 g, D.W.)이고, 뿌리추출물이 평균 10.5(g/100 g, D.W.)으로 모든 시료에서 뿌리추출물의 함량이 높게 나타났다. 특히 K-1시료는 추출수율 및 총페놀화합물의 함량도 가장 높게 나타났다(Table 1).

총페놀화합물의 함량이 높은 K-1의 줄기와 뿌리 추출물(0.5 g)에 대한 주성분은 HPLC분석으로 확인하고, sephadex LH-20 column을 사용하여 줄기로 부터 S-4(84.1 mg)과 뿌리로부터 R-2(70.0 mg)의 화합물을 분리했다.

S-4의 화합물은 ¹H-NMR(in CD₃OD)에서 δ6.84, 1H, d, J=1.9 Hz, 6.77, 1H, d, J=8.2 Hz, 6.72, 1H, dd, J=1.9,

Table 1. Total phenol contents and extract yield on the stem and root of *R. rugosa*

	extract yields (%)		Total phenol (g/100g, D.W.)	
	Stem	Root	Stem	Root
K-1	17.8	19.8	9.3	10.5
K-2	14.3	17.1	7.0	8.7
J-1	14.7	17.4	7.8	9.5
J-2	13.4	15.0	7.1	8.1
mean	15.1±1.9	17.3±2.0	7.8±1.1	9.2±1.0

8.2 Hz, 5.93, 1H, d, J=2.4 Hz, 5.86, 1H, d, J=2.4 Hz 4.57, 1H, d, J=7.8 Hz 3.98, 1H, m, J=5.4, 7.8, 7.8 Hz 2.85, 1H, dd, J=5.4, 16.1 Hz, 2.51, 1H, dd, J=8.2, 16.1 Hz의 시그널(Fig. 1), ¹³C-NMR에서 δ157.8, 157.5, 156.9, 146.2, 146.1, 132.2, 120.0, 116.1, 115.3, 100.9, 96.3, 95.5, 82.8, 68.8, 28.5의 시그널이 확인되었다(Fig. 2). TOF-MS에서는 m/z:289.46[(C₁₅H₁₄O₆-H)⁻]의 분자량이 확인되었다(Fig. 3). S-4화합물은 NMR과 TOF-MS의 분자량에 의해 catechin로 결정되었다. R-2 화합물도 HPLC retention time, ¹H, ¹³C -NMR의 chemical shift가 일치하는 결과, S-4과 동일한 물질로 확인됐다. 이로써, 해당화의 줄기와 뿌리에 대한 주성분의 하나가 catechin으로 추정된다.

해당화의 주성분의 하나로 사료되는 catechin과 함께 epimer인 epicatechin의 함량, gallic acid의 함량을 UPLC로 분석했다. 줄기추출물의 탄닌함량은 평균 752.5(mg/100 g, D.W.)으로, gallic acid가 평균 6.3, epicatechin이 61.5, catechin이 684.8이다. 뿌리추출물의 탄닌함량은 줄기의 약 2배이상 많은 1676.0(mg/100 g, D.W.)이며, gallic acid가 평균 6.8, epicatechin이 160.3, catechin이 1508.5이다(Table 2). 해당화의 줄기 및 뿌리추출물은 탄닌의 90% 이상을 catechin이 함유해 주성분의 하나로 추정된다. Hashidoko(1996)는 해당화 뿌리에서 주로 catechin 및 afzelechin-catechin, procyanidin B-3 등의 축합형탄닌이 많은 양을 함유하며, 극성분획에서는 catechin polymer가 주성분을 이룬다고 보고했다. flavonoid로서는 kaempferol, quercetin 등의 flavonoid과 그 배당체를 함유하며, 특히

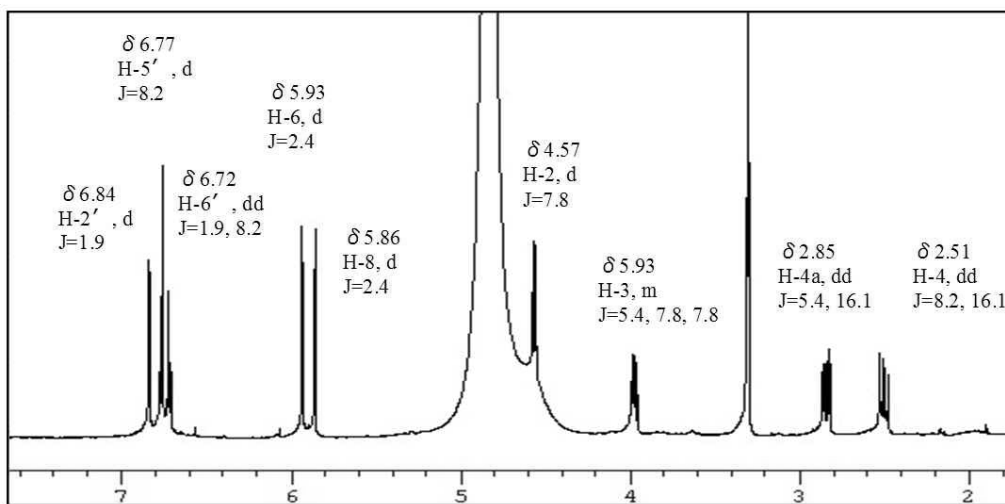


Fig. 1. ¹H-NMR spectrum of S-4 compound in CD₃OD.

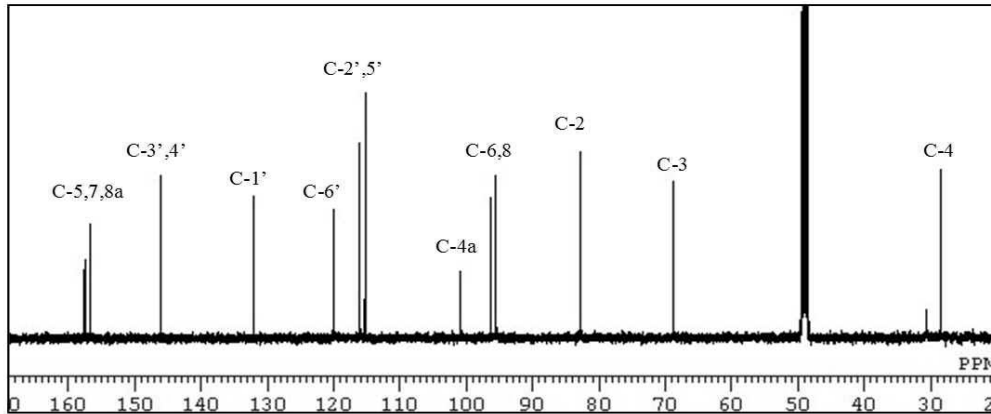


Fig. 2. ¹³C-NMR spectrum of S-4 compound in CD₃OD.

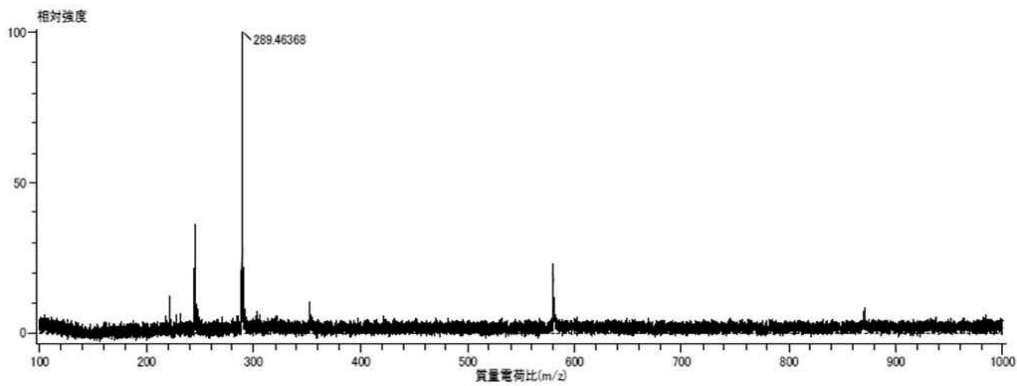


Fig. 3. TOF-MS spectrum of S-4 compound.

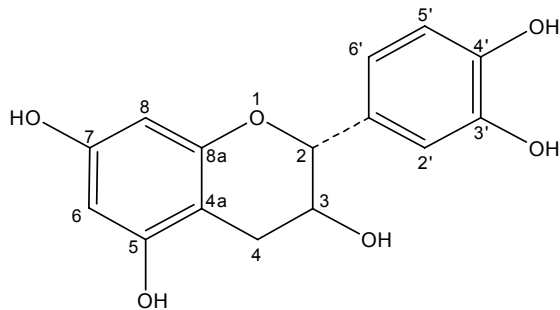


Fig. 4. Structure of S-4 and R-2 compound.

rutin의 함량이 높다고 보고하고 있다(Kaneta et al., 1979). 반면, 해당화의 꽃잎은 Tellimagrandin I, II, Rugosin A, B 등의 가수분해형탄닌이 주를 이룬다(Okuda, 1982a, 1982b; Hatano, 1990a, 1990b).

활성산소는 인체의 유해한 물질을 제거하는 방어작용이 있는 반면, 인체의 세포 및 생체물질을 파괴하는 유해한 작용도 함께하여, 발암, 당뇨병, 고혈압, 노화 등을 일으키는

원인의 하나로 추정되고 있다. 이와같은 활성산소종에 의한 인체 내의 손상으로 부터 보호하거나 회복시켜주는 천연의 항산화물질을 찾고 그 효과를 검토하는 시스템이 필요하다.

해당화의 free radical 소거활성을 측정한 결과, 추출물의 IC50는 뿌리가 13.7 µg/ml, 줄기가 14.5 µg/ml의 소거활성을 나타냈고, 기존의 항산화물질인 vitamin C, BHA, gallic acid, catechin의 IC50와 해당화추출물의 IC50와 유사한 농도로서 강한 활성을 나타냈다(Table 3). SOD 유사활성은 50 µg/ml의 농도에서 뿌리추출물은 평균 75.1%이고, 줄기추출물은 71.9%의 활성을 나타냈다(Table 4). 해당화의 항산화활성은 Table 2와 같이 항산화물질인 catechin이 다량으로 함유되어 있고, 또한 Hashidoko(1996)나 Kaneta et al.(1979)의 보고와 같이 catechin 유도체, flavonoid, vitamin C 등의 항산화활성이 높은 여러 성분에 기인한 것으로 사료된다. free radical 소거 및 SOD 유사활성은 부

Table 2. Contents of gallic acid, catechin, epicatechin (mg/100g, D.W.) on the stem and root of *R. rugosa*

		Gallic acid	Catechin	Epicatechin	Total
stem	K-1	5	777	16	798
	K-2	5	457	39	501
	J-1	9	702	83	794
	J-2	6	803	108	917
	mean	6.3±1.9	684.8±157.8	61.5±41.6	752.5±177.1
root	K-1	5	1683	186	1876
	K-2	7	1360	160	1527
	J-1	5	1257	119	1381
	J-2	10	1734	176	1920
	mean	6.8±2.4	1508.5±235.7	160.3±29.5	1676.0±263.8

Table 3. Free radical scavenging activities on the stem and root of *R. rugosa*

	IC50 (µg/ml)				
	stem	root	control		
K-1	15.3	15.1	vitamin C	12.7	
K-2	15.8	14.7	gallic acid	6.0	
J-1	13.2	13.5	catechin	8.4	
J-2	13.5	11.5	BHA	10.1	
mean	14.5±1.3	13.7±1.6			

Table 4. SOD like activities on the stem and root of *R. rugosa*

	SOD like activities (50µg/ml)	
	stem	root
K-1	66.7	73.7
K-2	79.3	80.0
J-1	67.1	73.6
J-2	74.3	72.9
mean	71.9±6.1	75.1±3.3

위간 큰 차이는 없었으나, 모든 시료가 저농도에서도 강한 활성을 보여, 해당화가 천연항산화제로서의 이용성이 높음을 시사하고 있다.

적 요

1. 해당화의 총페놀화합물 함량은 줄기추출물이 평균 7.8 (g/100 g, D.W.)이고 뿌리추출물이 평균 10.5(g/100 g, D.W.)이며, 모든 시료에서 뿌리추출물의 함량이 높게 나타났다.
2. K-1의 줄기와 뿌리 추출물(0.5 g)에서 주성분의 하나

로 추정되는 S-4(84.1 mg)과 R-2(70.0 mg)의 화합물을 단리했고, 그 구조를 catechin으로 결정했다.

3. UPLC 분석에 의해 줄기추출물의 탄닌함량은 평균 752.5(mg/100 g, D.W.)로, gallic acid 6.3, epicatechin 61.5, catechin 684.8이고, 뿌리추출물의 탄닌함량은 줄기의 약 2배 이상 높은 1676.0(mg/100 g, D.W.)으로 gallic acid 6.8, epicatechin 160.3, catechin 1508.5로 나타났다.

4. 해당화의 free radical 소거활성에서 추출물의 IC50는 뿌리가 13.7 µg/ml, 줄기가 14.5 µg/ml으로 높은 소거활성을 나타냈고, SOD 유사활성은 50 µg/ml의 농도에서 뿌리추출물이 평균 75.1%, 줄기추출물이 71.9%로써 높은 활성을 나타냈다.

인용문헌

- Akamatsu K. 1974. Herb medicine in Japan, Ishiyaku Publisher Inc.(in Japan), p. 381
- Choi Y.S., C. Ahn, J.W. Jhoo and S.Y. Lee. 1993. Lipotropic action of the extracts of *Rosa rugosa* roots on the induced fatty liver of rats. Korean J. Lipidology 3(1): 33-40
- Hashidoko Y. 1996. Phytochemistry of *Rosa rugosa*, Phytochemistry, 43: 535-549
- Hashidoko Y., S. Tahara and J. Mizitani. 1989. Antimicroboal sesquiterpene from damaged *Rosa rugosa* leaves, Phytochemistry, 28: 425-430
- Hatano T., N. Ogawa, T. Yasuhara and T. Okuda. 1990a. Tannins of Rosaceous plants. VIII. Hydrolysable tannin monomers having a valoneoyl group from flower petal of *Rosa rugosa* Thunb. Chem. Pharm. Bull., 38: 3308-3313

- Hatano T., N. Ogawa, T. Shingu and T. Okuda. 1990b. Tannins of Rosaceous plants. IX. Rugosin D, E, F and G, dimeric and trimeric hydrolysable tannins with valoneoyl group(s), from flower petal of *Rosa rugosa* Thunb. Chem. Pharm. Bull., 38: 3341- 3346
- Jung H.J., J.H. Nam, J. Coi, K.T. Lee and H.J. Park. 2005. 19 α -Hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive antiinflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28: 101-104
- Kaneta M., H. Hikichi, S. Endo and N. Sugiyama. 1979. Identification of flavones in nineteen *Rosaceae species*. Agric. Biol. Chem. 43: 657-658
- Kim M.J., K.E. Kim, K.H. Shin, K. Heo, D.H. Cho, C.H. Park and C.Y. Yu. 2001. Comparison of antioxidative activities from different organs of *Rosa rugosa* Thunb., Korean J. Medicinal Crop Sci., 9(1): 40-44
- Kimura S. 1978. China, Japan medical plant-natural medicine, Hirakawa Punlisher Inc. Tokyo(in Japan)
- Krussmann G. 1982. Roses, B.T. Batsford Ltd., London, pp. 269-270
- Okawa M. 2005. Study on the antioxidative and antiproliferative activity of the polyphenol contained some functional foods. Pharmaceutical Bul. Fukuoka Univ. 5: 1-12
- Okuda T., T. Hatano, J. Yazajum and N. Ogawa. 1982a. Rugosin A, B, C and praecoxin A, Tannins having a valoneoyl group. Chem. Pharm. Bull., 30: 4230- 4233
- Okuda T., T. Hatano and N. Ogawa. 1982b. Rugosin D, E, F and G, dimeric and trimeric hydrolysable tannins. Chem. Pharm. Bull., 30: 4234- 4237
- Park H.J., J.H. Nam, H.J. Jung, M.S. Lee, K.T. Lee, M.H. Jung and J.W. Choi. 2005. Inhibitory effect of euscaphic acid and tormentic acid from the roots of *Rosa rugosa* on high fat diet-induced obesity in the rat. Kor. J. Pharmacogn. 36(4): 321-331
- Park J.C. and K.D. Ok. 1993. Phenolic compounds isolated from *Rosa rugosa* Thunb. in Korea. Yakhak Hoeji. 37: 365-369
- Shanghai Science-technology Publication. 1985. Dictionary of Chinese Medicine, Vol. 4, Shogakukan, Tokyo(in Japan)
- Shorthouse J.D. 1988. Occurrence of two gall wasps of the genus *Diplolepis*. (Hymenoptera: Cynipidae) on the domestic shrub rose, *Rosa rugosa* Thunb. (*Rosaceae*). Can. Ent., 120: 727-737
- 육창주. 1981. 한국약품식물도감, 진명출판사, p. 186

(접수일 2008.8.18; 수락일 2008.10.14)