

## 산수유 추출물 및 분획물의 항산화 활성과 활성성분 분석

임도연<sup>1</sup> · 이경인<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>광주여자대학교 교양교직과정부, <sup>2</sup>동신대학교 바이오센터

### Antioxidative Activity and Active Compound Analysis of the Extract and Fractions of Corni Fructus

Do-Youn Im<sup>1</sup> and Kyoung-In Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Liberal Arts and Teacher Training, Kwangju Women's University, Gwangju 62396, Korea

<sup>2</sup>Bio-center, Dongshin University, Naju 58205, Korea

**Abstract** – In this study, analysis of active compounds that are believed to be highly relevant to antioxidant activity was carried out on the methanol extract and its solvent fractions of Corni fructus. The DPPH radical scavenging activity for the comparison of antioxidant activity was higher in order of aqueous fraction > methanol extract > ethyl acetate fraction > *n*-hexane fraction. It is similar to the order of total polyphenol contents in the samples. As a result of LC-MS analysis, phenolic acid compounds such as caffeic acid, gallic acid and chlorogenic acid and lognin, which is known as a representative active ingredient of Corni fructus, were identified as active compounds. And the antioxidative activity and the total polyphenol content of the extracts and solvent fractions were found to be related to the contents of the compounds. Particularly, it was confirmed that phenolic acid such as caffeic acid contributes to the antioxidative activity of the aqueous fraction of Corni fructus methanol extract.

**Keywords** – Corni fructus, Antioxidative activity, Phenolic acid, Loganin, LC-MS

산수유나무(*Cornus officinalis*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽교목으로 성숙한 과실에서 종자를 제거한 것을 건조하여 산수유(Corni fructus)라는 생약재로 활용하고 있다. 생약학적 특성으로서 맛이 시고 떫으며, 성질은 약간 따뜻하고 간경(肝經)과 신경(腎經)에 좋은 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 산수유와 관련된 주요 생리활성으로서 항히스타민 효과,<sup>1)</sup> 항균 효과,<sup>2)</sup> 항산화 효과 등이 보고되고 있고,<sup>3)</sup> 종자 추출물의 항당뇨 효과도 일부 확인되었다.<sup>4)</sup> 최근에는 항염증 활성과 남성갱년기 개선효과 등이 추가적으로 보고됨에 따라 생약재인 산수유의 활용도가 점차 증가될 것으로 예상된다.<sup>5,6)</sup>

산수유의 대표적인 활성성분으로서 쓴맛을 나타내는 loganin 이 알려져 있으며, gallic acid를 산수유에서 추출하기 위한 조건에 대한 연구와 일반적인 성분으로서 malic acid나 tartaric acid와 같은 신맛을 내는 유기산의 함량에 대한 것이 알려져 있다.<sup>7,8)</sup> 하지만 여러 연구에서 항산화 활성을 포함한 다양한 생리활성을 산수유가 가지는 것으로 보고하고 있는 것에

비해 실제 활성을 나타내는 것에 기여하는 성분에 대한 연구는 아직까지 부족한 실정이다. Loganin의 경우 대한약전의 생약 부분에서 산수유의 지표성분으로 설정되어 있으며, 이와 관련된 정량시험법이 제시되어 있지만 산수유의 다양한 활성에 대한 연구를 위해서는 산수유 중에 존재하는 활성 기여 성분에 대한 다각적인 탐색이 필요하게 된다.

따라서 본 연구에서는 산수유 추출물의 성분들 중 생리활성에 기여하는 주요 성분에 대한 기초 자료를 마련하고자 산수유 methanol 추출물 및 용매별 분획을 대상으로 항산화 활성을 측정함과 동시에 기존의 연구에서 개별적으로 다뤄졌던 활성 성분들을 동시에 분석하여 항산화 활성에 기여하는 성분에 대한 기초 자료로서 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 실험에 사용된 산수유는 전남 구례에서 생산된 것으로서 메가바이오(전남 화순)에서 제조된 규격품을 2016년 8월에 구입하여 추출에 사용하였으며, 표준(DSUBIC-16-004)은 동신대학교바이오센터에 보관하였다.

**추출 및 분획** – 산수유 시료 500 g과 methanol 10 L를 혼

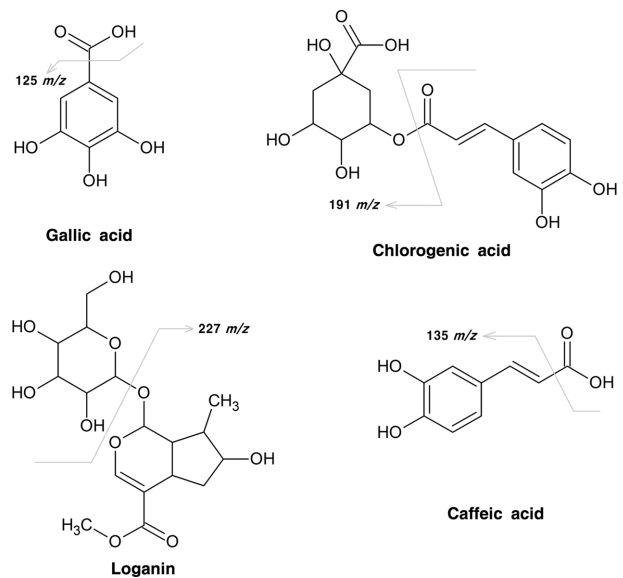
\*교신저자(E-mail): lki@dsu.ac.kr  
(Tel): +82-61-336-3104

합하여 70°C에서 3시간씩 2회 반복하여 추출을 실시하였다. 추출액은 여과 후 동결건조를 실시하여 추출물 268 g을 획득하였으며, 이중 100 g을 증류수에 분산시킨 후 *n*-hexane, ethylacetate을 사용하여 순차적으로 용매분획을 실시하였다. 분획된 시료는 여과와 농축 및 동결건조 후 추출물과 함께 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 최종 분획수율은 *n*-hexane, ethylacetate 및 aqueous 분획이 각각 0.42%, 6.96%, 92.62%로 나타났다.

**총 polyphenol 함량 측정** - Folin-Denis법을 이용하여 산수유 methanol 추출물 및 용매별 분획 시료의 polyphenol 함량을 측정하였다.<sup>9)</sup> Methanol에 1 mg/mL농도로 용해시킨 시료액 80 µL와 Folin-Denis reagent 80 µL를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 80 µL를 혼합하여 1시간동안 암실에서 반응시킨 후, 상등액 120 µL를 취하여 96well plate에 옮긴 후 microplate reader(BIO-TEK, USA)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 chlorogenic acid를 0~500 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준검량선을 작성하고 총 polyphenol 함량을 mg/g로 나타내었다.

**DPPH radical 소거능 측정** - 산수유 methanol 추출물 및 용매별 분획 시료의 항산화 활성을 비교하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 사용하여 radical 소거능을 측정하였다.<sup>10)</sup> 각 시료를 methanol에 0.1~10 mg/mL의 다양한 농도로 용해시킨 시료액 20 µL와 200 µM로 용해시킨 DPPH 용액 180 µL를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 microplate reader(BIO-TEK, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 바탕으로 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였다. Positive control로 ascorbic acid(vitamin C)를 사용하였다.

**LC-MS 분석** - 활성 성분 분석을 위한 액체크로마토그래피-질량분석기(Liquid Chromatography Mass Spectroscopy; LC-MS)로서 Shim-pack GIST C18 column(2.1 × 100 mm, 2 µm)을 장착한 LC-30A(Shimadzu, Japan) 액체크로마토그래피와 연동된 LCMS-8045(Shimadzu, Japan) 삼중사중극자 질량분석기를 사용하였다. 이동상으로서 5 mM ammonium formate를 함유한 water와 methanol을 각각 A와 B 용매로 사용하였으며, 0.3 mL/min의 유속으로 초기 5% B 용매로 시작하여 순차적으로 98%까지 B 용매의 농도를 증가시켜 20분간 분석을 실시하였다. Multiple reaction monitoring (MRM) 분석을 위한 precursor ion과 product ion 전이 조건으로서 caffeic acid는 179 → 135 *m/z*, chlorogenic acid는 353 → 191 *m/z*, gallic acid는 169 → 125 *m/z*, loganin은 389 → 227 *m/z*를 각각 설정하였으며, 모든 성분들은 negative ESI(electrospray ionization) 조건에서 분석하였다(Fig. 1). Caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid 및 loganin 표준



**Fig. 1.** Chemical structures and product ion of [M-H] for phenolic acids and loganin.

품을 각각 0~1 mg/mL 농도로 methanol에 용해시켜 검량선을 작성하였으며, 모든 성분의 검량선에서  $r^2$  값이 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 산수유 추출물 및 분획물은 10 mg/mL 농도로 methanol에 용해시켜 분석에 사용하였으며, *n*-hexane 분획물의 경우 초기에 100 mg/mL 농도로 dimethyl sulfoxide에 용해시킨 후 다시 methanol로 희석하여 분석용 시료로 사용하였다.

**통계 분석** - 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(mean ± SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0(SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행한 후 사후분석으로 Duncan's multiple range test를 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

**산수유 추출물 및 분획물의 항산화 활성** - 산수유와 같은 생약재 중에 존재하는 polyphenol 화합물은 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물의 특성으로 인해 항산화 활성을 비롯한 다양한 생리활성에 기여하는 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup> 산수유 methanol 추출물과 용매별 분획에 존재하는 총 polyphenol 함량을 측정된 결과를 Table I에 나타내었다. Methanol 추출물과 aqueous 분획의 polyphenol 함량은 유사한 수준으로 나타났으며, ethyl acetate 분획에도 일정 수준의 polyphenol 성분이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

산수유 methanol 추출물 및 용매별 분획의 항산화 활성을

**Table I.** Total polyphenol contents of the extract and fractions from Corni fructus

|                           | Total polyphenol compound (mg/g) |
|---------------------------|----------------------------------|
| Methanol extract          | 31.56 ± 2.80 <sup>1)a</sup>      |
| <i>n</i> -Hexane fraction | - <sup>2)c</sup>                 |
| Ethyl acetate fraction    | 23.35 ± 1.78 <sup>b</sup>        |
| Aqueous fraction          | 32.08 ± 1.94 <sup>a</sup>        |

<sup>1)</sup>Values are mean ± SD (n=3). Different superscript letters in the same column show significant differences at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. <sup>2)</sup>Not detected.

확인하기 위해 DPPH radical 소거능을 측정하였으며, 소거능의 결과를 바탕으로 50%의 radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도(SC<sub>50</sub>)를 산출하여 Table II에 나타내었다. 산수유 methanol 추출물과 용매별 분획 중에서 총 polyphenol 함량이 가장 높게 나타났었던 aqueous 분획에서 1.257 mg/mL의 SC<sub>50</sub>으로 DPPH radical 소거능이 가장 높게 나타남에 따라 항산화 활성과 polyphenol 함량 간의 상관관계가 높음을 확인할 수 있었다. Positive control로 사용된 ascorbic acid의 SC<sub>50</sub> 값인 0.184 mg/mL를 기준으로 환산한 비교활성(relative activity; ascorbic acid의 활성을 100%로 설정)에서 aqueous 분획이 14.63% 수준을 나타내는 것으로 확인할 수 있었으며, 다음으로 polyphenol 함량이 aqueous 분획과 유사한 수준이었던 methanol 추출물이 8.87% 수준으로 나타났다. 이와 같은 aqueous 분획의 활성 수준은 일반적인 생약 추출물에서 ethyl acetate나 *n*-butanol과 같은 용매 분획에서 활성이 강하게 나타나는 경우가 많은 양상과 다소 차이가 나는 것으로서,<sup>12,13)</sup> 산수유의 경우 항산화 활성에 기여하는 성분의 상당량이 수용성 강한 극성 화합물일 것으로 추정할 수 있는 결과라고 판단된다.

**LC-MS를 활용한 성분 분석** - Table II에 나타난 바와 같이 DPPH radical 소거능에서 총 polyphenol 함량이 상대적으로 높게 나타난 aqueous 분획과 methanol 추출물의 항산화 활성이 높은 것으로 나타남에 따라 산수유의 대표적 활성 성분으로 알려진 loganin 외에 항산화 활성을 나타낼 수 있는

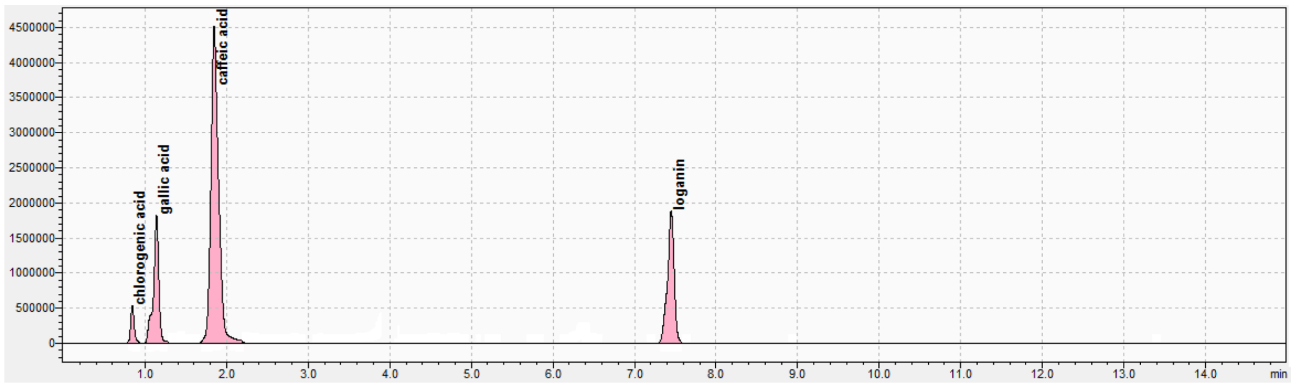
polyphenol 성분에 대한 분석이 추가적으로 필요한 것으로 판단하였다. 활성 성분의 분석에는 동시에 여러 성분을 분석할 수 있으면서 시료에 존재할 수 있는 분석방해 성분의 영향을 최소화할 수 있는 multiple reaction monitoring(MRM) 방법을 구현할 수 있는 삼중시중극자 방식의 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 활용하였다. MRM 방법은 분석 대상이 되는 각 성분의 모분자(precursor ion)가 이온화 시킬 때 충격으로 조각이 나면서 생성되는 분자(product ion)를 선택적으로 추적하는 특성으로 인해 불필요한 성분의 검출을 최소화함으로써 검출한계나 정량한계 수준을 향상시킬 수 있으며, 일반적인 액체크로마토그래피 장비에서 각 성분별로 다른 검출기 조건을 적용해야 하는 성분도 동시에 분석이 가능해지게 된다. 특히 생약재와 같은 천연물 시료의 분석 시 가장 많이 이용되고 있는 액체크로마토그래피 장비에서 나타날 수 있는 성분들 간의 겹침 현상을 극복할 수 있으므로 동시에 분석할 수 있는 성분을 획기적으로 증가시킬 수 있다. 본 연구에서는 기존의 개별 연구보고에서 각각 존재하였던 산수유의 항산화 활성 관련 성분들을 동시에 분석할 수 있도록 조건을 설정하여 분석을 실시하였으며, Fig. 2와 같이 4종의 성분을 동시에 분석할 수 있음을 확인하였다.

산수유 methanol 추출물 및 용매별 분획을 분석한 결과 Fig. 3과 같이 각 성분들을 확인할 수 있었으며, 각 성분의 표준품을 농도별로 분석하여 작성한 검량선을 이용하여 시료 중의 함량을 산출한 결과를 Table III에 제시하였다. 산수유의 주요 활성 성분으로 알려진 loganin이나 chlorogenic acid의 경우 methanol 추출물과 aqueous 분획의 차이가 크게 나타나지 않았으나 caffeic acid와 gallic acid의 경우 추출물에 비해 aqueous 분획에서 높은 함량이 확인되었다. Gallic acid는 항산화 및 항염증 활성 등을 포함한 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 보고되는 성분이며,<sup>14)</sup> caffeic acid의 경우 다양한 연구에서 항산화 활성이 강력한 성분으로 보고하고 있다.<sup>15)</sup> 특히, caffeic acid가 다른 시료에 비해 aqueous 분획 시료에서 현저히 높은 함량을 가지는 것으로 나타남에 따라 항산화 활성에 상당한 기여를 할 것으로 판단되었다.

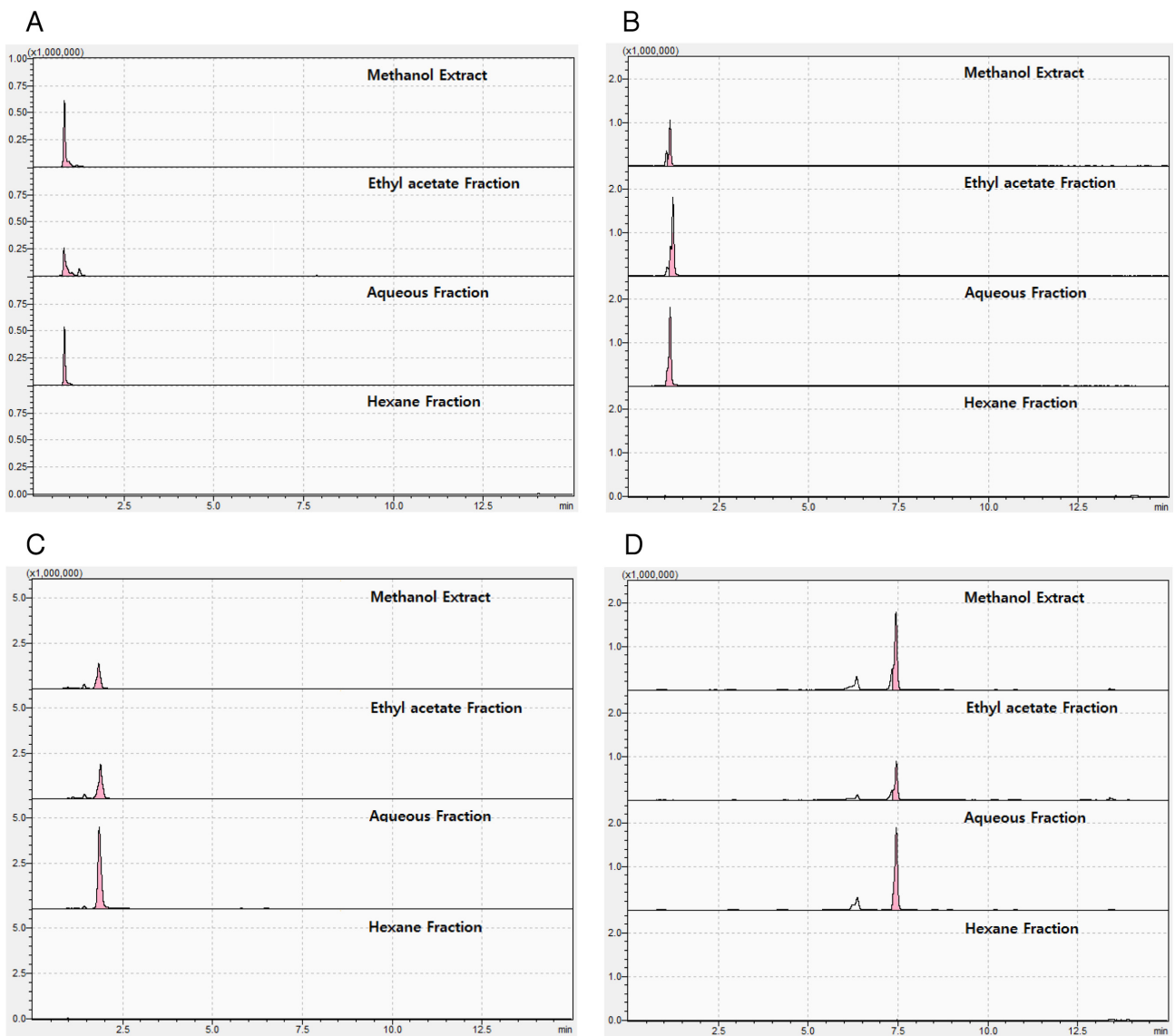
**Table II.** DPPH radical scavenging abilities of the extract and fractions from Corni fructus

|                             | SC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>1)</sup> | Relative activity(%) <sup>2)</sup> |
|-----------------------------|--|------------------------------------|
| Methanol extract            | 2.075 ± 0.052 <sup>3)bc</sup>          | 8.87                               |
| <i>n</i> -Hexane fraction   | 16.508 ± 0.172 <sup>d</sup>            | 1.11                               |
| Ethyl acetate fraction      | 3.658 ± 0.069 <sup>c</sup>             | 5.03                               |
| Aqueous fraction            | 1.257 ± 0.061 <sup>b</sup>             | 14.63                              |
| Ascorbic acid <sup>4)</sup> | 0.184 ± 0.012 <sup>a</sup>             | 100.00                             |

<sup>1)</sup>SC<sub>50</sub>: concentration of each samples for scavenging 50% of DPPH radical. <sup>2)</sup>Relative activity: a ratio of SC<sub>50</sub> value compared to positive control. <sup>3)</sup>Values are mean ± SD (n=3) without relative activity. Different superscript letters in the same column show significant differences at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. <sup>4)</sup>Positive control.



**Fig. 2.** MRM chromatograms of phenolic acids and loganin by LC-MS/MS.



**Fig. 3.** MRM chromatograms of the extract and fractions from Corni fructus. (A) chlorogenic acid, (B) gallic acid, (C) caffeic acid, (D) loganin.

**Table III.** Contents of phenolic acids and loganin of the extract and fractions from Corni fructus

| Retention time (min) | Compounds        | Contents (mg/g)            |                          |                          |                           |
|----------------------|------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                      |                  | Methanol extract           | Ethyl acetate fraction   | Aqueous fraction         | <i>n</i> -Hexane fraction |
| 0.83                 | Chlorogenic acid | 0.79 ± 0.02 <sup>1)a</sup> | 0.28 ± 0.01 <sup>c</sup> | 0.67 ± 0.01 <sup>b</sup> | - <sup>2)d</sup>          |
| 1.26                 | Gallic acid      | 0.33 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.59 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.61 ± 0.03 <sup>a</sup> | - <sup>c</sup>            |
| 1.82                 | Caffeic acid     | 1.30 ± 0.17 <sup>b</sup>   | 1.49 ± 0.11 <sup>b</sup> | 3.72 ± 0.12 <sup>a</sup> | - <sup>c</sup>            |
| 7.48                 | Loganin          | 0.92 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 0.75 ± 0.04 <sup>b</sup> | 1.05 ± 0.06 <sup>a</sup> | - <sup>c</sup>            |

<sup>1)</sup>Values are mean ± SD (n=3). Different superscript letters in the same compound show significant differences at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. <sup>2)</sup>Not detected.

## 결 론

본 연구에서는 산수유 methanol 추출물의 용매별 분획을 대상으로 항산화 활성과 관련성이 높을 것으로 추정되는 활성성분의 분석을 실시하였다. 항산화 활성의 비교를 위한 DPPH radical 소거능 측정에서 aqueous 분획 > methanol 추출물 > ethyl acetate 분획 > *n*-hexane 분획 순으로 활성이 높게 나타났다. 이는 항산화 활성과 관련성이 높은 것으로 알려진 총 polyphenol 함량 측정 결과에서 methanol 추출물과 aqueous 분획이 거의 동일한 수준으로 높은 함량을 나타내었으며, ethyl acetate 분획이 그 다음 수준의 함량을 가지는 것과 유사한 경향임을 알 수 있었다. 항산화 활성과 관련된 성분을 확인하기 위해 LC-MS 분석을 실시한 결과에서 활성을 나타내는 주요 성분으로서 caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid와 같은 phenolic acid 성분과 산수유의 대표적인 활성 성분으로 알려진 lognin이 확인되었으며, 추출물 및 용매별 분획의 항산화 활성 및 총 polyphenol 함량과 연관성이 있는 것으로 판단되는 수준임을 알 수 있었다. 특히 aqueous 분획의 항산화 활성에 caffeic acid와 같은 phenolic acid의 기여도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 기존에 알려진 성분들을 중심으로 분석을 수행한 것이므로 이후 추가적인 연구를 통해 활성 기여 성분에 대한 자료를 보완함으로써 관련된 분야에 기초 자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 인용문헌

- Seo, Y. B., Kil, G. J., Lee, Y. K. and Lee, Y. C. (2002) Study on the effects of corni fructus about the anti-allergic action. *Korean J. Herbology* **17**: 1-11.
- Kim, Y. D., Kim, H. K. and Kim, K. J. (2003) Antimicrobial activity of solvent fraction from *Cornus officinalis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 829-832.
- Kim, O. K. (2005) Antidiabetic and antioxidative effects of corni fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Oil Chemists Soc.* **22**: 157-167.
- Park, Y. K., Whang, W. K. and Kim, H. I. (1995) The antidiabetic effects of extracts from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **9**: 5-11.
- Kim, Y. J. and Son, D. Y. (2016) Antioxidant activity and suppression of pro-inflammatory mediator of Corni fructus extracts in activated RAW 264.7 macrophage. *Korean J. Food Preserv.* **23**: 876-882.
- Kim, T. M., Jung, H. K., Jang, J. H., Sim, M. O., Lee M. J., Cho, J. H. and Cho, H. W. (2016) Effect of Corni fructus on testosterone deficiency syndrome in *In vitro* and *In vivo*. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**: 264-272.
- Jang, M., Kim, Y. J., Min, J. W. and Yang, D. C. (2009) Optimization of extraction method for the quantitative analysis of gallic acid from *Cornus officinalis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**: 498-502.
- Kim, Y. D., Kim, H. K. and Kim, K. J. (2003) Analysis of nutritional components of *Cornus officinalis*. *J. Korean Sci. Nutr.* **32**: 785-789.
- Otto, F. and Denis, W. (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biological Chemistry* **12**: 239-243.
- Bondent, V., Brand-Williams, W. and Bereset, C. (1997) Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**: 609-615.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 230S-242S.
- Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011). Antioxidative, antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 238-245.
- Ki, B. H., Lee, E. B., Kim, J. H., Yang, J. H., Kim, D. K. and Kim, Y. S. (2017) Anti-oxidative effects of *Allium hookeri* leaves in *Caenorhabditis elegans*. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 141-147.
- Jeon, Y. H., Kim, M. H. and Kim, M. R. (2008) Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. *J. Korean Sci. Nutr.* **37**: 1-7.
- Kim, J. H., Wang, Q., Lee, S. H. and Cho, E. J. (2015) Antioxidant activity and protective effect of caffeic acid against oxidative stress induced by amyloid beta and LPS in C6 glial cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 109-115.

(2017. 9. 4 접수; 2017. 9. 18 심사; 2017. 9. 20 게재확정)