

욱나무 (*Rhus verniciflua*) 목질부에서 분리한 화합물의 항산화활성

안은미 · 박상재¹ · 최원철² · 최석훈³ · 백남인^{4,*}

대구한의대학교 한방식품약리학과, ¹(주)에이지, ²경희대학교 동서신의학병원 암센터, ³미시건 대학, ⁴경희대학교 생명공학원 식물대사연구센터

Antioxidant Activity of Isolated Compounds from the Heartwoods of *Rhus verniciflua*

Eun-Mi Ahn, Sang-Jae Park¹, Won-Cheol Choi², Suk-Hoon Choi³ and Nam-In Baek^{4,*}

Department of Herbal Foodceutical, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

¹AZI Co. Ltd., Chuncheon 198-53, Korea

²Cancer center, East-West Neo Medical Center, KyungHee University, Seoul 130-701, Korea

³Cranbrook 12 grade Michigan 48303, USA

⁴Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

Received November 6, 2007; Accepted 19, 2007

The heartwoods of *Rhus verniciflua* was extracted with H₂O and the concentrated extract was partitioned with CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH and H₂O, successively. From the EtOAc and *n*-BuOH fractions, four compounds were isolated through the repeated silica gel, ODS and Sephadex LH-20 column chromatographies. They were determined as sinapyl aldehyde (1), 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2), 2,4-dihydroxybenzoic acid (3) and 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4) on the basis of spectroscopic data, respectively. Among the isolated compounds, sinapyl aldehyde (34.7 ± 0.6%) and 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (43.8 ± 0.9%) showed the strong antioxidative activity than artificial antioxidant BHT (14.4 ± 0.3%) in DPPH radical scavenging activity.

Key words: *Rhus verniciflua*, phenolic compound, DPPH, antioxidative activity

서 론

욱나무과(Anacardiaceae)에 속하는 율나무는 중국, 일본 등 동북아시아에서 많이 자라는 낙엽교목으로 이 수액을 율 또는 건칠(*Rhus verniciflua* Stokes)이라 하여 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비 등의 약재로 사용되며, 그 외에도 도료, 및 공업용으로 사용 된다.¹⁾ 율나무의 주요 화학성분으로는 fisetin, fustin 등이 알려져 있고, gum 추출물에서 분리한 urushiol은 독성을 가지고 있어 토끼의 혈압을 낮추고 사람의 피부에 patch-test에서 양성반응을 일으킨다고 알려져 있다.²⁾ 최근의 연구 결과로는 율나무에서 분리된 gallic acid, protocatechuic acid, butein, quercetin, sulfuretin 및 fisetin 등의 phenolic 화합물들의 항산화 활성 및 골종양에 관한 연구가 보고 되어 있다.³⁻⁵⁾ 이와 같이, 여러 가지 효능과 함께 민간에서도 널리 식용으로 이용되는 율나무 추출물에서 4종의 화합물을 분리, 동정하였으며 이 중 3종은 율나무에서 처음으로 분리된 화합물이다. 이들 화합

물들의 항산화 활성을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에서 사용한 율나무(*Rhus verniciflua*)는 Azi. Co. Ltd.에서 제공받아 사용하였으며 표본시료는 대구한의대학교 한방식품약리학과 천연소재연구실에 보관되어 있다.

시약 및 기기. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기 용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Merck(Germany)사에서 생산한 silica gel 60(63~200 μm)을 사용하였고, octadecyl silica gel (ODS)은 Merck 사에서 생산한 Lichroprep RP-18(40~63 μm)을 사용하였으며, Sephadex LH-20은 시그마사에서 생산한 제품을 사용하였다. Thin layer chromatography(이하 TLC라고 함)는 Merck에서 생산한 silica gel F₂₅₄를 사용하였고, octadecyl silica gel TLC는 Merck사에서 생산한 DC-Fertigplatten RP-18 F_{254S}를 사용하였으며 TLC 상의 물질 검출에는 UV lamp와 10% aq. H₂SO₄를 사용하였다. NMR 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR spectrometer(Varian Inova AS 400, Varian, USA)로 측정하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)와 BHA (butylated

*Corresponding author
Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), L-ascorbic acid 는 Sigma(st. Louis, USA) 제품을 사용하였고 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 분석에 이용된 UV-Visible spectrophotometer는 Shimadzu(Japan) UV-1601을 사용하였다.

추출 및 분획. 옻나무의 목질부를 건조하여 수분함량이 5%(w/w) 이하가 되도록 한 다음 무게 1 kg에 대하여 물 5 l를 가하고 95°C에서 3시간 동안 추출하였다. 추출액을 Advantec filter paper No. 5C로 여과하여 불용성 물질을 제거하고 진공 농축한 후 동결건조 하여 40 g의 진갈색의 분말을 얻었다. 이를 80%(v/v)메탄올 200 ml에 녹인 후 여과하여 불용성 물질을 제거하고, 얻어진 여액을 진공농축하여 메탄올을 제거하였다. 얻어진 농축물을 200 ml의 물에 녹인 다음 동일 부피의 CHCl₃, EtOAc 및 *n*-BuOH을 이용하여 각각 순차적으로 2회 분획하여 용매별 분획을 얻었고, 이를 진공 농축하여 CHCl₃ 가용분획(2.4 g), EtOAc 가용분획(15.6 g), *n*-BuOH 가용분획(2.5 g) 및 불분획(4.5 g)을 각각 얻었다.

화합물의 분리. CHCl₃ 가용분획 1.8 g을 *n*-hexane-CHCl₃-MeOH 혼합용매를 용출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography(c.c.)를 실시하여 총 5개의 분획(RVC1~RVC5)으로 나누었으며, RVC2(1.23 g) 분획에 대하여 90% MeOH을 사용하여 Sephadex LH-20 c.c. 를 실시하여 총 3개의 소분획(RVC2-1~RVC2-3)을 얻었다. 소분획 RVC2-2(639 mg)을 ODS c.c.(MeOH-H₂O = 1 : 1)로 정제하여 화합물 1(25 mg, SiO₂ TLC, *n*-hexane-EtOAc = 1 : 1, R_f 0.40)을 얻었다. 소분획 RVC4(32 mg)을 SiO₂ c.c.(CHCl₃-MeOH = 20 : 1)로 정제하여 화합물 2(8.8 mg, SiO₂ TLC, CHCl₃-MeOH = 20 : 1, R_f 0.20)을 분리하였다. *n*-BuOH 분획(1.72 g)을 SiO₂ c.c.(CHCl₃-MeOH-H₂O = 15 : 3 : 1)을 사용하여 총 15개의 소분획(RVB-1~RVB-15)을 얻었다. 소분획 RVB-11를 SiO₂ c.c.(CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10)을 사용하여 총 9개의 소분획(RVB-11-1~RVB-11-9)을 얻었고, 그 중 소분획 RVB-11-2는 화합물 3(48 mg, SiO₂ TLC, CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10, R_f 0.70)으로 확인하였다. 소분획 RVB-11-5는 Sephadex LH-20(CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10)을 이용하여 column chromatography 하여 화합물 4(29 mg, SiO₂ TLC, CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10, R_f 0.65)을 분리하였다.

DPPH를 이용한 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정. DPPH에 대한 전자 공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois⁶⁾ 방법에 따라 측정하였다. 감압 농축하여 vacuum oven에서 수분을 제거한 각 시료를 각각 1 mg씩 취하여 EtOH 1 ml로 용해하여 사용하였다. 각 시료 용액 100 μl를 시험관에 첨가한 후 0.4 mM DPPH용액(99.8% EtOH에 용해) 3.8 ml와 EtOH 150 μl를 가하여 vortex mixer로 10초간 교반하여 실온에서 30분간 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 음성 대조군 실험은 시료 대신에 EtOH 100 μl를 취하여 실험하였고 양성 대조군 실험은 상용항산화제인 BHT, BHA, L-ascorbic acid를 이용하여 동일한 방법으로 실시하였다. EDA는 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차를 백분율로 표시하였다.

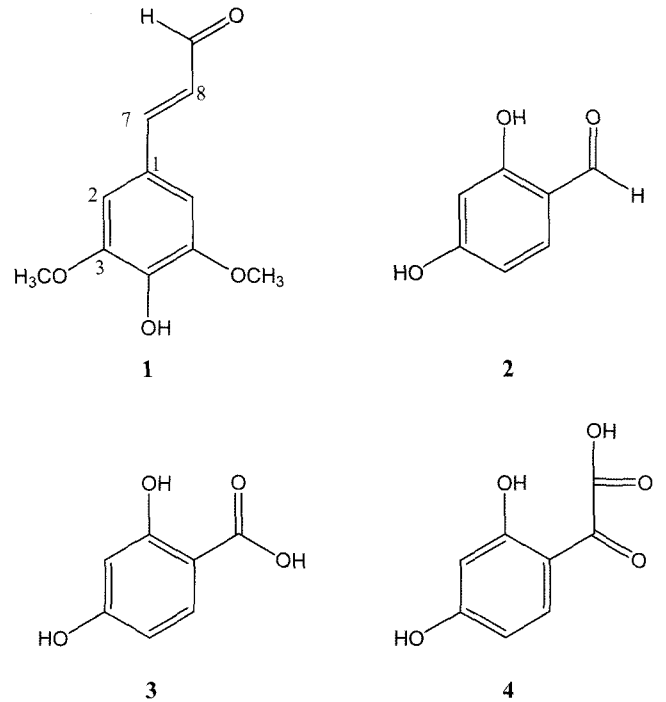


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-4 from the heartwood of *Rhus verniciflua*.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

화합물 1. (sinapyl aldehyde) ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 9.57 (d, *J* = 7.6 Hz, H-9), 7.57 (d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 6.99 (2H, s, H-2, 6), 6.67 (dd, *J* = 16.0, 7.6 Hz, H-8), 3.89 (OCH₃ × 2), ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 195.89 (C-9), 156.32 (C-7), 149.40 (C-3, 5), 126.96 (C-4, 8), 126.38 (C-1), 107.42 (C-2, 6), 56.83 (OCH₃).

화합물 2. (2,4-dihydroxybenzaldehyde) ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 9.69 (s, H-7), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, H-6), 6.42 (dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, H-5), 6.25 (d, *J* = 2.0 Hz, H-3), ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 195.34 (C-7), 167.13 (C-4), 165.39 (C-2), 136.62 (C-6), 116.05 (C-1), 109.82 (C-5), 103.14 (C-3).

화합물 3. (2,4-dihydroxybenzoic acid) ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅, δ_H) 8.42 (d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 6.98 (d, *J* = 1.6 Hz, H-3), 6.73 (dd, *J* = 1.6, 8.8 Hz, H-5), ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅, δ_C) 175.85 (C-7), 165.26 (C-4), 163.53 (C-2), 133.00 (C-6), 111.41 (C-1), 107.04 (C-5), 103.29 (C-3).

화합물 4. (2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid) ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅, δ_H) 8.33 (d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 6.72 (d, *J* = 1.6 Hz, H-3), 6.56 (dd, *J* = 1.6, 8.8 Hz, H-5), ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅, δ_C) 197.76 (C-7), 170.82 (C-

8), 167.02 (C-4), 166.77 (C-2), 136.86 (C-6), 122.85 (C-1), 109.52 (C-5), 104.08 (C-3).

결과 및 고찰

옻나무의 목질부로부터 얻어진 물 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 CHCl_3 , EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O 로 순차 분획하고 각 분획은 감압 농축하여 4개의 분획을 얻었다. CHCl_3 및 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하여 총 4개의 화합물을 분리하였다.

화합물 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(400 MHz, CD_3OD)으로부터 1개의 aldehyde signal이 δ_{H} 9.57(1H, d, $J=7.6$ Hz)에서 관측되었고, 두 개의 olefinic methine proton이 δ_{H} 7.57(1H, d, $J=16.0$ Hz) 및 6.67(dd, $J=16.0, 7.6$ Hz)에서 관측되었으며, 결합상수($J=16.0$ Hz)로부터 trans 배치인 것이 확인되었다. δ_{H} 6.99(2H, s)에서 두 개의 olefinic methine proton을, δ_{H} 3.89(OCH_3 , s)에서 두개의 methoxy를 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(100 MHz, CD_3OD)에서는 δ_{C} 56.83에서 2개의 methoxy carbon signal 외에 9개의 carbon signal이 관측되었다. 한 개의 aldehyde(δ_{C} 195.89), 두 개의 olefinic methine(δ_{C} 156.32, 126.96) signal이 관측되었다. 또한 δ_{C} 107.42에서 두 개의 aromatic methine signal이 관측되었고, δ_{C} 149.40에서 두 개의 signal이 겹친 peak와 δ_{C} 126.96에서 산소와 결합되어 있는 3개의 aromatic quaternary carbon signal이, δ_{C} 126.38에서 1개의 aromatic quaternary signal로부터 phenol의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 1은 sinapyl aldehyde로 구조를 추정하였고, 기존의 문헌을 비교하여 구조를 확인 동정하였다.⁷⁾

화합물 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(400 MHz, CD_3OD)으로부터 하나의 aldehyde signal이 δ_{H} 9.69에서 관측되었고, aromatic signal의 ABX pattern을 보여주는 signal이 δ_{H} 7.47(d, $J=8.2$ Hz), 6.42(dd, $J=2.0, 8.2$ Hz) 및 6.25(d, $J=2.0$ Hz)에서 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(100 MHz, CD_3OD)에서는 한 개의 aldehyde signal(δ_{C} 195.34), 두 개의 aromatic methine signal(δ_{C} 109.82, 103.14)이 관측되었고, δ_{C} 167.13, 165.39에서 산소가 결합되어 있는 2개의 aromatic quaternary carbon signal이, δ_{C} 116.05에서 1개의 aromatic quaternary signal로부터 phenol의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 2는 2,4-dihydroxybenzaldehyde로 구조를 추정하였고, 기존의 문헌을 비교하여 구조를 확인 동정하였다.⁸⁾

화합물 3 ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 화합물 2와 유사한 양상을 보였으며 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 carboxyl carbon을 δ_{C} 175.85에서 확인하여 화합물 2의 구조에서 7번 proton 대신 hydroxyl group이 치환된 2,4-dihydroxybenzoic acid로 추정하였고, 기존의 문헌과 비교하여 구조를 확인 동정하였다.⁹⁾

화합물 4 ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 화합물 3과 유사한 양상을 보였으며 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 ketone carbon signal인 δ_{C} 197.76과 carboxyl carbon인 δ_{C} 170.82가 관측되

Table 1. Electron donating ability of isolated compounds from *Rhus verniciflua*

Compounds ^{a)}	EDA (%)
Vitamin C (L-ascorbic acid)	97.3 ± 0.8
BHA	87.3 ± 0.5
BHT	14.4 ± 0.3
sinapyl aldehyde (1)	34.7 ± 0.6
2,4-dihydroxybenzaldehyde (2)	16.0 ± 0.4
2,4-dihydroxybenzoic acid (3)	8.4 ± 0.7
2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4)	43.8 ± 0.9

^{a)}100 µg of each compound was used.

었다. 이러한 스펙트럼 데이터를 종합하여 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid로 그 구조를 추정하였고, 기존의 문헌과 비교하여 구조를 확인 동정하였다.¹⁰⁾

옻나무 목질부로부터 4종의 화합물을 분리하여 구조를 확인 동정하였으며, 이들 성분 중 sinapyl aldehyde (1), 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2) 및 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4)는 본 식물에서는 처음 분리된 화합물이다.

한편, 옻나무 목질부에서 분리한 화합물들을 현재 널리 사용되고 있는 천연 항산화제인 Vitamin-C와 합성항산화제인 BHT 및 BHA와 그 활성을 비교하였다. 각 물질의 DPPH 전자 공여능을 측정 한 결과, sinapyl aldehyde (1)은 34.7 ± 0.6%, 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4)는 43.8 ± 0.9%의 활성을 나타내었다. 이는 상용항산화제인 vitamin C, BHA보다는 활성이 낮았으나, 합성항산화제인 BHT(14.4 ± 0.3%) 보다 높은 활성을 나타내었다. 앞으로 이들 화합물에 대한 다양한 생리적 및 약리적 활성을 검토함으로써 건강기능성 식품 또는 더 나아가 의약품의 소재로서의 충분한 가치가 있다고 여겨지며, 추후 이의 활용과 관련된 연구가 활발히 추진 될 것으로 기대된다.

초 록

옻나무 목질부를 열수 추출하고, 얻어진 추출물을 CHCl_3 , EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O 로 용매 분획하였다. 이중 EtOAc와 *n*-BuOH분획으로부터 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하여 4개의 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터를 해석하여, sinapyl aldehyde (1), 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2), 2,4-dihydroxybenzoic acid (3) 및 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4)으로 동정하였다. 이 화합물들 중 2-4은 옻나무목질부에서 처음 분리된 화합물이다. 이들 화합물 중 sinapyl aldehyde (1)와 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid (4)의 DPPH radical 소거작용이 34.7 ± 0.6%와 43.8 ± 0.9%로 나타나 합성항산화제인 BHT(14.4 ± 0.3%) 보다 높게 나타났다.

Key words: *Rhus verniciflua*, phenolic compound, DPPH, antioxidative activity

참고문헌

1. Shin, M. K. (1986) Coloured Limsangbonchohak. Nam-San Dang. Seoul, Korea, pp. 165-718
2. Chae, Y. B., Kim, W. J., Ji, O. P., Ahn, M. J. and No, Y. J. (1988) Comprehensive Korea useful plants resources. Korean Research Institute of Chemical Technology. Seoul, Korea.
3. Kim, J. B. (2003) Identification of antioxidative component from stem bark of *Rhus verniciflua*. *Korean J. Food & Nutr.* **16**, 60-65.
4. Lee, J. C., Lim, K. T., Jang, Y. S. (2002) Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1570**, 181-191.
5. Lim, K. T., Hu, C., Kitts, D.D. (2001) Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 229-237.
6. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **181**, 1199-1200.
7. Lim, E. K., Jackson, R. G, Bowles, D. J. (2005) Identification and characterization of Arabidopsis glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *Febs Lett.* **579**, 2802-2806.
8. Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra (1992), 2nd, pp. 117C (NMR).
9. Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra (1992), 2nd, pp. 1115B; 1117A; 1258A; 1259C (NMR).
10. Eustaquio, A. S., Luft, T., Wang, Z. X., Gust, B., Chater, K. F., Li, S. M., Heide, L. (2003) Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch. Microbiol.* **180**, 25-32.