

구척의 항산화 활성 및 지표성분 동정

김소화 · 김은영 · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학

(Received September 23, 2014; Revised September 29, 2014; Accepted September 29, 2014)

Anti-oxidant Activities and Identification of Standard Compounds from Cibotii Rhizoma

So-Hwa Kim, Eun-Young Kim and Wan-Kyunn Whang[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Cibotii Rhizoma, the dried rhizome of *Cibotium barometz* J. Smith (*C. barometz*), has long been used to treat bone or nervous system disorders. In this regard, we isolated three main phenolic compounds, onitin-4-O-β-D-glucopyranoside (1), irisdichototins E & F epimeric mixture (2), and protocatechuic acid (3) from *C. barometz* methanol extract. In addition, we screened their antioxidative activities by DPPH, ABTS radical, and superoxide scavenging assays. Among these three compounds, irisdichototins E & F and protocatechuic acid showed strong antioxidant activities. Also, the antioxidant activities of the *C. barometz* extracts were proportional to the contents of irisdichototins E & F and protocatechuic acid, thus these two phenolic compounds could be main active compounds of *C. barometz*. In addition, onitin-4-O-β-D-glucopyranoside is considered as a marker compound of *C. barometz* because this compound is specifically contained in *C. barometz* which belongs to Pteridophyta order. A rapid analysis method for the simultaneous determination of phenolic compounds was also developed by UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Using the developed method, the two active compounds (irisdichototins E & F and protocatechuic acid) and a marker compound (onitin-4-O-β-D-glucopyranoside) were successfully quantified in 14 commercial samples that were collected from different regions.

Keywords □ Cibotii Rhizoma, onitin-4-O-β-D-glucopyranoside, irisdichototins E & F epimeric mixture, protocatechuic acid, antioxidative activity, UPLC

구척(狗脊, Cibotii Rhizoma)은 구척과(Dicksoniaceae)에 속하는 다년생 양치식물인 금모구척 *Cibotium barometz* J. Smith의 뿌리줄기로 약재의 모양이 개의 척추와 비슷하고 황금색의 털이 달려있다고 하여 붙여진 이름이다. 주로 베트남, 중국 남부, 일본 남부, 대만, 인도네시아 등의 고산지대의 햇빛이 잘 드는 산지의 경사면이나 계곡에 자생하는 열대성 식물로서 우리나라는 수입품에 의존하고 있다.¹⁾

구척은 전통의학과 민간에서 보익약에 속하여 풍한, 부종, 마비증, 허리와 등의 동통, 류마티즘, 좌골신경통, 요통, 다뇨증, 여성의 백태과다 등의 치료에 쓰여 왔으며 주로 뼈와 관절 질환의

치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

최근에는 구척을 이용한 항산화²⁾ 및 항염 효과,³⁾ 발치 후 지혈,⁴⁾ 흰귀의 장골 길이성장,⁵⁾ 신경세포의 재생 및 회복,⁶⁾ 파골세포 형성 억제⁷⁾ 등의 활성연구가 이루어지고 있다. 또한 수백 년간 동양에서 디스크 등 척추질환 치료를 위해 사용되어온 생약 복합제 GCSB-5(청파전)는 구척을 제재로 쓰고 있으며 동물실험과 세포실험을 통해 신경재생 효과가 입증되었다.⁸⁾

이와 같이 활성 연구가 다수 보고 되어 있음에도 불구하고 주성분의 구조분석과 이를 이용한 품질관리를 위한 분석방법은 국내외 공정서에 기재되어 있지 않으며, 시도는 있었으나 한 가지 성분만을 이용해 분석하여 매우 제한적으로 이루어진 상태이다.⁹⁾ 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 항산화에 대한 activity-guided fractionation 을 통하여 구척의 활성성분이며 주성분인 성분을 분리, 구조 동정하였으며 유통되는 구척을 산지별로 수집하여 UPLC를 이용하여 성분패턴 및 함량분석을 실시하였다.

[#]Corresponding Author

Wan-Kyunn Whang

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Tel.: 02-820-5611 Fax.: 02-825-5611

E-mail: whang-wk@cau.ac.kr

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 실험에 사용한 금모구척 시료는 2013년 2월 경 동시장에서 구입하여 중앙대학교 약품자원식물학실에서 기원 및 형태학적 감정을 거친 후 연구의 재료로 사용하였다. 또한 패턴 및 함량 분석을 실시하기 위해 시중에 유통되는 베트남, 중국산 금모구척을 중국 약재시장 및 국내 약재시장, 온라인 한약재 시장 등에서 구입하여 감정을 거친 후 분석에 사용하였다.

실험기기 및 시약

본 연구의 실험에 사용한 기기로는 UV/VIS spectrophotometer (Human TU-1800PC, Korea, Optizen 2120 UV, Korea), FAB-MS spectrometer(JMS-600W/JMS-700, JEOL, Tokyo, Japan), ¹H-NMR spectrometer(Varian Gemini 2000, 600 MHz, Varian, Palo Alto, U.S.A.), ¹³C-NMR spectrometer(Varian Gemini 2000, 125 MHz, Varian, Palo Alto, U.S.A.) 등이 있으며, Column chromatography 충전제로는 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co., Japan), Sephadex LH-20(25~100 μm, Pharmacia, Sweden), ODS gel(400~500 mesh, Waters, U.S.A.), Silica gel (70~230 mesh, Merck, Germany), MCI gel CHP20P(75~150 μm, Mitsubishi, Japan)를 사용하였다. 추출 및 분획과정에서는 Methanol, Ethanol, Acetonitrile, Chloroform, Water, Formic acid, Acetic acid(J.T. Baker, HPLC grade, U.S.A.) 등을 사용하였다. UPLC 분석에 사용한 기기로는 Acquity UPLC BEH C18 column(2.1×50 mm, 1.7 μm), quaternary solvent manager (pump), sample manager(auto sampler), photodiode array (PDA) detector, Waters Acquity UPLC system(Milford, MA, USA), Empower 2 software(Waters, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하였고 항산화활성 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), L-ascorbic acid, Xanthine oxidase Grade IV : From milk, Hypoxanthine, Ethylenediaminetetra acetic acid-2Na(EDTA), ABTS(2, 2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfate acid ammonium salt), Potassium persulfate, Trolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, 97%), Allopurinol은 Sigma Aldrich(Milw., WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 흡광도는 ELISA reader(TECAN, Salzburg, Austria)로 측정하였다.

추출 및 분리

베트남산 금모구척 뿌리 3 kg를 분쇄기를 이용하여 세절한 후 시료에 methanol 10 l를 넣고 3일 동안 추출 후 여과하였으며 이 과정을 3회 반복 후 감압 농축하여 추출물 452 g을 증류수 2 l에

현탁한 후 분액 깔때기에서 chloroform을 가하여 진탕 반복추출하고 수층을 분취하여 chloroform 분획과 water 분획으로 각각 나누어 chloroform 분획 55 g을 얻었으며 water 분획을 diaion HP-20을 이용하여 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol로 각각 용출시켜 각각 water 분획 159 g, 30% methanol 분획 27 g, 60% methanol 분획 45 g, 100% methanol 분획 15 g을 얻었다. 그 중 60% methanol층을 silica gel(이동상 chloroform : methanol : water=90 : 20 : 2), sephadex LH-20(이동상 40% methanol), MCI(50% methanol)를 이용해 onitin-4-O-β-D-glucopyranoside(17.7 mg)를 분리하였다. 또한, 30% methanol층에 대해서는 sephadex LH-20(이동상 30% methanol), ODS(이동상 30% methanol), MCI(이동상 10% methanol)를 이용하여 irisdichototins E & F(34.4 mg)와 protocatechuic acid (17 mg)를 분리하였다.

Onitin-4-O-β-D-glucopyranoside

갈색의 가루

Positive FAB-MS: m/z 411[M+H]⁺

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 1.16(6H, s, H-11, 12), 2.33(3H, s, H-15), 2.57(3H, s, H-13), 3.20(1H, dd, $J=7.8, 9.0$ H-glc-2'), 3.26(1H, dt, $J=5.4, 0.9$ H-glc-4'), 3.30(1H, m, H-glc-6'), 3.36(1H, dd, $J=8.8, 0.8$ H-glc-3'), 3.66(1H, dd, $J=12.0, 5.4$ H-glc-5'), 4.32(1H, d, $J=7.8$, H-glc-1')

¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O): δ 11.6(C-12), 11.9(C-11), 24.5(C-13,15), 29.1(C-3), 38.1(C-14), 45.2(C-2), 61.2(C-Glc-6'), 67.9(C-Glc-4'), 70.1(C-4), 73.7(C-Glc-2'), 76.5(C-Glc-3'), 76.7(C-Glc-5'), 103.0(C-Glc-1'), 128.8(C-10), 130.4(C-9), 131.2(C-7), 136.1(C-6), 137.2(C-5), 150.0(C-8), 213.2(C-1)

Irisdichototins E & F

보라색 oil 형태

Positive FAB-MS: m/z 317[M+H-CH₂]⁺

¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.78~1.73(m, glucose), 2.92~2.82(m, glucose), 3.30(m, OCH₃), 4.13(1H, d, $J=8.0$, H-glc-1', β-form), 4.7(1H, d, $J=8.4$, H-glc-1', α-form), 6.90(2H, dd, $J=12.0, 3.0$, H-5"), 7.23(2H, d, $J=2.7$, H-2"), 7.49(2H, dd, $J=4.2, 1.8$, H-6")

¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O): α form, β form δ 118.4(C-5), 118.5(C-2), 119.7(C-1), 126.5(C-6), 146.6(C-3), 152.7(C-4), 57.2(MeO-3)

Protocatechuic acid

흰색 무정형 분말

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 6.74(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.35(1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, H-6), 7.38(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2); ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD): δ 115.4(C-5), 117.8(C-2), 123.4(C-6), 127.5(C-1), 145.6(C-3), 150.0(C-4), 173.4(C-7)

항산화활성측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 항산화능 측정

DPPH assay는 Hatano의 방법(Hatano *et al.*, 1989)¹⁰⁾을 참고하여 실시하였다. 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 μ l(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% ethanol) 1.9 ml을 가하였고, 각 시료는 5가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid를 5가지 농도로 조제하여 측정하였으며, 각 시료의 항산화능은 IC₅₀로 나타내었다.

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 이용한 항산화능 측정

ABTS assay는 Arnao MB의 방법(Arnao *et al.*, 2001)¹¹⁾을 참고하여 실시하였다. 4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate을 혼합한 용액을 12시간 차광 방치하였고 이 용액을 stock solution으로 하여 ethanol을 이용하여 732 nm에서 흡광도 0.8~1.2 범위에 들어오도록 희석하였다. 이 후 농도 별로 제조된 시료의 stock solution 50 μ l와 희석된 ABTS⁺ 양이온 radical solution 950 μ l을 혼합하여 실온(24°C)에서 5분 차광 방치 한 후, 최종적으로 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 732 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 양성 대조 약물로는 trolox를 이용하였고, 5가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC₅₀로 나타내었다.

Hypoxanthine/xanthine oxidase system을 이용한 항산화능 측정

Hypoxanthine/xanthine oxidase system은 (McCune *et al.*, 2002)¹²⁾의 방법에 따라 xanthine oxidase 활성을 측정하였다. 먼저 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 10 mM K-EDTA, 30 mM hypoxanthine, 10 mM nitrotetrazolium blue chloride를 혼합한 후 3차 증류수로 부피를 맞추어 reaction mixture를 만들었다. 96 well에 시료 20 μ l와 xanthine oxidase 20 μ l를 소분하고 앞서 제조한 reaction mixture 160 μ l를 가한 뒤 37°C에서 10분 간 incubation 시켰다. 그 후 상온에서 2분 간 방치하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 억제제로 알려진 allopurinol을 양성 대조 약물로 하여 효소반응 여부를 확인하였고, superoxide 소거능은 IC₅₀로 나타내었다.

UPLC 분석을 위한 전처리 및 분석조건

검액 및 표준액 조제 - 산지별로 수집한 총 14개 구척 시료를 분쇄기를 이용하여 세절한 후 50호(300 μ m)체로 균질화하고, 이를 2 g씩 정밀하게 취한 후 메탄올 50 ml를 가하였다(Table I). 30분 동안 실온에서 초음파 추출한 후 원심분리기를 이용하여 3,500 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 0.2 μ m

Table I - Sample list of *C. barometz*

No.	Samples	Country of origin	Obtained region
1	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
2	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
3	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
4	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
5	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
6	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
7	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	Vietnam	Korea
8	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	Korea
9	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	Korea
10	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	China, Guizhou
11	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	China
12	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	China
13	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	Korea
14	<i>Cibotium barometz</i> J. Smith	China	Korea

membrane filter로 여과하여 이 중 0.7 μ l를 UPLC(ultra-performance liquid chromatography) system에 주입하였다.

구척 추출물로부터 분리된 3종의 화합물 onitin-4-O- β -D-glucopyranoside, irisdichototins E & F, protocathechuic acid는 표준액으로 사용하였으며 각각 1 mg씩 정밀히 달아 에탄올 1 ml에 녹인 후, 1 mg/ml의 standard stock solution을 만들어 모두 4°C에서 냉장보관하고 사용 전에 희석하여 사용하였다.

각각의 standard stock solution은 모두 에탄올로 희석하여 onitin-4-O- β -D-glucopyranoside는 125, 62.5, 12.5, 2 μ g/ml, irisdichototins E & F는 500, 250, 125, 62.5, 12.5 μ g/ml, protocathechuic acid는 125, 62.5, 12.5, 6.25 μ g/ml의 농도가 되도록 조제하였다. 각 표준물질 혼합용액은 연속희석법을 이용하여 희석하였으며, 준비된 각 표준액을 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 UPLC 분석에 사용하였다. 이를 이용하여 검량선

Table II - Analysis condition of *C. barometz* extracts

Detector	UV 260 nm		
Column	Acquity UPLC BEH C18 (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m)		
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 0.1% formic acid in water		
	Time (min)	Solvent A	Solvent B
Gradient profile	0	2	98
	2	5	95
	5	5	95
	7	10	90
	10	20	80
	11	22	79
	15	30	70
Wavelength	260 nm		
Flow rate	0.3 ml/min		
Injection volume	0.7 μ l		

을 작성하였으며, 검량선의 직선성은 상관계수(R^2)를 구하여 확인하였다.

UPLC 분석조건 - 고정상은 Acquity UPLC BEH C18(2.1×50 mm, 1.7 μm) 칼럼을 사용하였으며, 이동상은 Acetonitrile과 0.1% formic acid를 사용하였다. 용리 조건은 이동상 조성을 시간에 따라 변화시켜가는 기울기 용리를 사용하였다(Table II). 검출파장은 260 nm을 구척 추출물 및 표준품을 분석하기 위한 분석 파장으로 선택하여 각 시료의 패턴 및 함량 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

구척의 주성분이며 항산화 활성 성분의 구조를 밝히기 위하여 methanol로 추출하고 chloroform 분획과 water 분획으로 각각 나누어 chloroform 분획층을 얻었고, water 분획을 diaion HP-20을 이용하여 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol로 각각 분획하였다. 분획물의 항산화 효능을 스크리닝하여 높은 활성을 나타낸 30% methanol과 60% methanol 분획층을 대상으로 Sephadex LH-20와 ODS-B gel column chromatography를 통하여 3종의 페놀성 화합물을 분리하였다. 이화학적 성상 및 1H , ^{13}C -NMR, MS spectrum data를 기준 문

헌과 비교하여 구조를 규명하였다. 분리된 성분은 onitin-4-O-β-D-glucopyranoside, irisdichototins E & F와 protocatechuic acid로 최종 구조 동정하였다(Fig. 1).

DPPH를 이용한 항산화능 측정

구척의 methanol 추출물을 chloroform으로 탈지한 뒤 diaion HP-20을 이용하여 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol로 각각 용출시켜 얻은 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol 분획 별로 5가지의 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml)로 조제하여 실험한 결과 60% methanol 분획층의 radical scavenging activity가 가장 우수하였으며, 60% methanol>30% methanol>100% methanol>CHCl₃>water 분획 순으로 효능을 확인하였다. 그 중에서도 60% methanol 분획은 IC₅₀ 23.3 μg/ml로 구척의 분획층 중 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었으며 양성 대조 약물인 ascorbic acid의 IC₅₀ 6.2 μg/ml와 비교하였을 때 우수한 항산화능을 가진 것으로 나타났다(Table III).

구척의 활성 분획인 60% methanol, 30% methanol층으로부터 분리된 성분 3종을 대상으로 농도 별로(6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) 조제하여 실험한 결과 3종의 모든 화합물에서 radical scavenging activity을 확인하였다. 각 화합물의 효능은 Irisdichototins E & F>protocatechuic acid>onitin-4-O-β-D-glucopyranoside 순으로 확인하였고 특히 Irisdichototins E & F와 protocatechuic acid의 경우 양성 대조군인 ascorbic acid, trolox와 비슷하거나 더 우수한 경향을 보여 강력한 radical

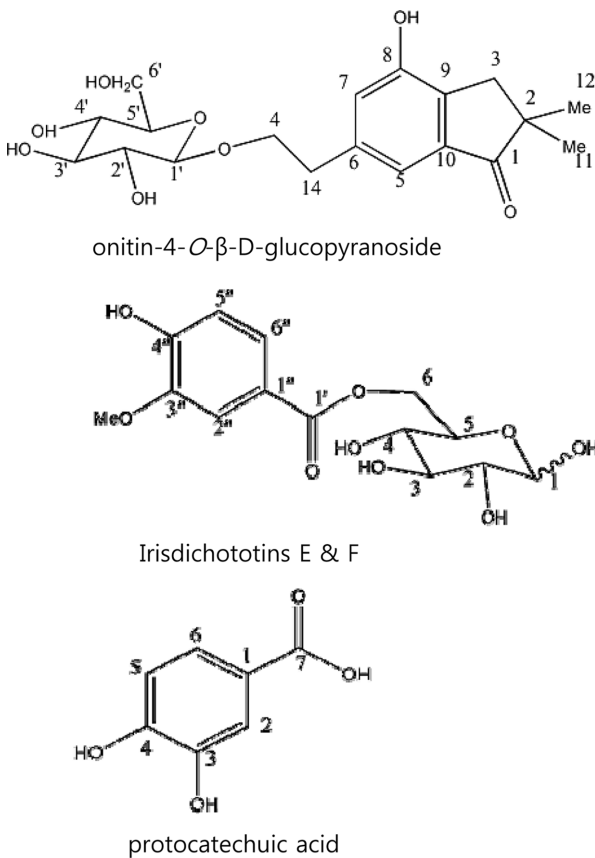


Table III – DPPH radical scavenging activity IC₅₀ of *C. barometz* extract and fractions

Fractions	IC ₅₀ (μg/ml)
Extract	74.94±3.8
Water Fr.	207.9±155.8
30% Methanol Fr.	54.5±1.3
60% Methanol Fr.	23.3±1.5
100% Methanol Fr.	74.4±1.3
CHCl ₃ Fr.	144.7±10.8
Ascorbic acid	6.2±2.1
Trolox	10.3±3.1

Table IV – DPPH radical scavenging activity IC₅₀ of compounds from *C. barometz*. onitin-4-O-β-D-glucopyranoside (CB-I), Irisdichototins E & F (CB-II), protocatechuic acid (CB-III)

Fractions	IC ₅₀ (μg/ml)
CB-I	126.4±7.1
CB-II	0.9±0.6
CB-III	19.8±0.1
Ascorbic acid	5.0±0.3
Trolox	10.3±3.1

Fig. 1 – Structure of compounds.

scavenging activity을 확인할 수 있었다(Table IV).

이는 구조적으로 hydroxyl기가 free radical을 소거하기 때문인 것으로 생각되며, 이는 주로 phenolic 화합물에서 항산화능이 높게 관찰되는 현상과 일치하는 결과이다.

ABTS를 이용한 항산화능 측정

구척의 methanol 추출물을 chloroform으로 탈지한 뒤 diaion HP-20을 이용하여 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol로 각각 용출시켜 얻은 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol 분획을 농도 별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 조제하여 실험한 결과 60% methanol 분획 층의 radical scavenging activity가 가장 우수하였으며, 60% methanol > 100% methanol > 30% methanol > CHCl_3 > water 분획 순으로 효능을 확인하였다. 그 중에서도 60% methanol 분획은 IC_{50} 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 구척의 분획층 중 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었으며 양성 대조 약물인 trolox 의 IC_{50} 값 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 비교하였을 때 비교적 우수한 항산화능을 가진 것으로 나타났다(Table V).

구척의 활성 분획인 60% methanol, 30% methanol층으로부터 분리된 성분 3종을 대상으로 농도 별로(6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) 조제하여 실험한 결과 모든 3종의 화합물에서 radical scavenging activity을 확인하였다. 각 화합물의 효능은 Iridichototins E & F > protocatechuic acid > onitin-4-O- β -D-glucopyranoside 순으로 확인하였고 특히 Iridichototins E & F 와 protocatechuic acid의 경우 양성 대조군인 trolox와 비슷하거나 더 우수한 경향을 보여 강력한 radical scavenging activity를 갖고 있음을 알 수 있었다(Table VI).

Table V – ABTS scavenging activity IC_{50} of *C. barometz* extract and fractions

Fractions	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Extract	71.3 \pm 0.2
Water Fr.	2468.0 \pm 523.6
30% Methanol Fr.	35.8 \pm 0.3
60% Methanol Fr.	20.0 \pm 0.1
100% Methanol Fr.	26.1 \pm 0.2
CHCl_3 Fr.	108.7 \pm 1.0
Trolox	14.1 \pm 0.1

Table VI – ABTS scavenging activity IC_{50} of compounds from *C. barometz*. onitin-4-O- β -D-glucopyranoside (CB-I), Iridichototins E & F (CB-II), protocatechuic acid (CB-III)

Fractions	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CB-I	55.8 \pm 6.4
CB-II	10.2 \pm 0.5
CB-III	23.5 \pm 0.3
Trolox	27.6 \pm 0.4

이러한 활성결과는 DPPH를 이용한 radical scavenging activity 실험 결과와 일치하는 결과이며 phenolic 화합물의 free radical scavenging activity에 대해 다시 한번 확인할 수 있었다.

Hypoxanthine/Xanthine oxidase를 이용한 항산화능 측정

구척의 methanol 추출물을 chloroform으로 탈지한 뒤 diaion HP-20을 이용하여 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol로 각각 용출시켜 얻은 water, 30% methanol, 60% methanol, 100% methanol 분획을 농도 별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 조제하여 실험한 결과 60% methanol 분획의 radical scavenging activity가 우수하였으며, 60% methanol > 30% methanol > 100% methanol > CHCl_3 > water 분획순으로 항산화 효능을 확인하였다. 그 중에서 60%, 30% methanol 분획은 각각 IC_{50} =0.7 \pm 0.3와 3.7 \pm 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로서 양성 대조군인 allopurinol(IC_{50} =13.3 \pm 0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 우수한 항산화 활성을 보였다(Table VII).

구척의 활성 분획인 60% methanol, 30% methanol층으로부터 분리된 성분 3종을 대상으로 농도 별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM)로 조제하여 실험한 결과 3종의 모든 화합물에서 superoxide scavenging activity을 확인하였다. 각 화합물의 효능은 Iridichototins E & F > Protocatechuic acid > Onitin-4-O- β -D-glucopyranoside 순으로 확인하였고 특히 Iridichototins E & F 와 Protocatechuic acid의 경우 각각 IC_{50} =29.7 \pm 3.1과 34.6 \pm 1.8 μM 로 양성 대조군인 allopurinol(IC_{50} =0.52 \pm 0.02 μM)과 비교적 비슷한 superoxide 소거능을 보여 우수한 항산화능을 갖고 있음을 재확인 할 수 있었다(Table VIII).

이러한 활성결과는 DPPH와 ABTS를 이용한 free radical

Table VII – Superoxide scavenging activity IC_{50} of *C. barometz* extract and fractions

Fractions	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Extract	40.0 \pm 3.3
Water Fr.	197.7 \pm 23.3
30% Methanol Fr.	3.7 \pm 0.4
60% Methanol Fr.	0.7 \pm 0.3
100% Methanol Fr.	12.8 \pm 0.4
CHCl_3 Fr.	51.7 \pm 4.1
Allopurinol	13.3 \pm 0.0

Table VIII – Superoxide scavenging activity IC_{50} of compounds from *C. barometz*. onitin-4-O- β -D-glucopyranoside (CB-I), Iridichototins E & F (CB-II), protocatechuic acid (CB-III)

Fractions	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CB-I	68.6 \pm 3.2
CB-II	29.2 \pm 3.1
CB-III	34.6 \pm 1.8
Allopurinol	0.3 \pm 0.0

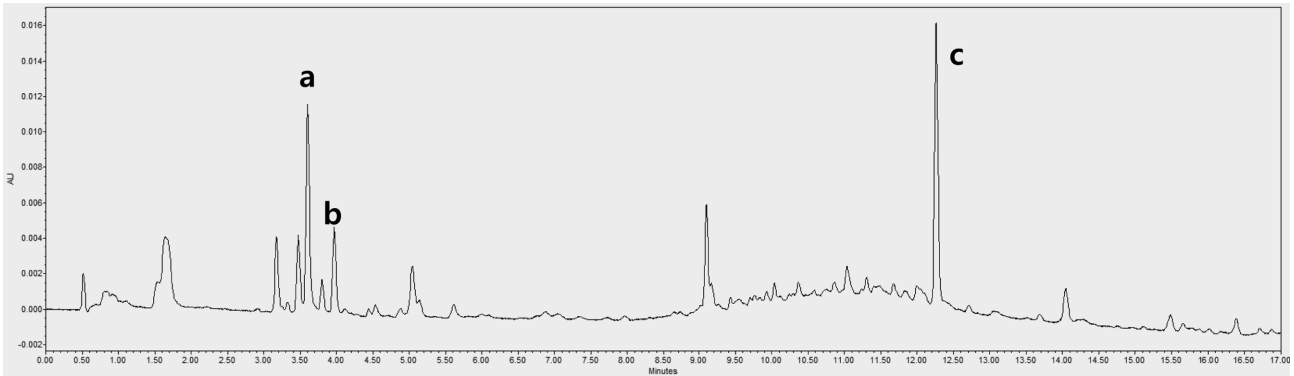


Fig. 2 – A representative chromatogram of *C. barometz* extract. irisdichototins E & F mixture (a), protocatechuic acid (b), onitin-4-O-β-D-glucopyranoside (c).

scavenging activity 실험 결과와 대체로 일치했으며 앞의 두 가지 항산화 작용기전과는 다른 pathway를 가지는 Hypoxanthine/xanthine oxidase system 에서도 구척에서 분리된 화합물이 유

의미한 radical(superoxide) scavenging activity를 갖고 있다는 결과에 대해 다시 한번 확인할 수 있었다.

UPLC를 이용한 함량 분석

14개의 구척 추출물의 UPLC 크로마토그램을 바탕으로 함량 분석을 실시하였다(Fig. 2). 3가지 주요 페놀성분에 대하여 onitin-4-O-β-D-glucopyranoside은 2~125 μg/ml, irisdichototins E & F mixture는 12.5~500 μg/ml, protocatechuic acid는 6.25~125 μg/ml의 농도 범위에서 검량선을 작성한 결과, 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수(R²)가 0.999 이상의 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 획득한 크로마토그램들로부터 각 성분들의 피크 면적을 구하고, 이를 미리 작성한 검량선에 대입하여 각 성분의 함량을 구하였다(Table IX). 산지에 따라 주요 페놀성분의 함량이 조금씩 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 대체로 베트남산 구척에서 주요 페놀성분 함량이 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 전체적인 성분 패턴은 대체로 유사하게 나타났으나 몇 가지 피크의 함량차이가 나타났다. 특히 구척에서 분리된 3가지 성분 irisdichototins E & F mixture, protocatechuic acid, onitin-4-O-β-D-glucopyranoside의 피크 면적 및 함량이 산지별로 큰 차이로 확인되었다. 이는 국내에 수입되어 유통되는 구척의 산지별 유통경로를 이화학적으로 구분할 수 있는 기준점이 될 수 있을 것으로 생각되지만 (b) irisdichototins E와 F의 mixture 피크는 glucose α form과 β form이 함께 검출이 되어 두 개의 피크로서 검출되었으며, 두 성분의 함량 차이가 있는 것으로 관찰되었으므로 epimeric 구조에 대한 정확한 규명과 함량 검토가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 국내에 가장 많이 유통되는 베트남산 금모구척을 대상으로 활성분획에 대한 성분분리를 실시하여 3종의 화합

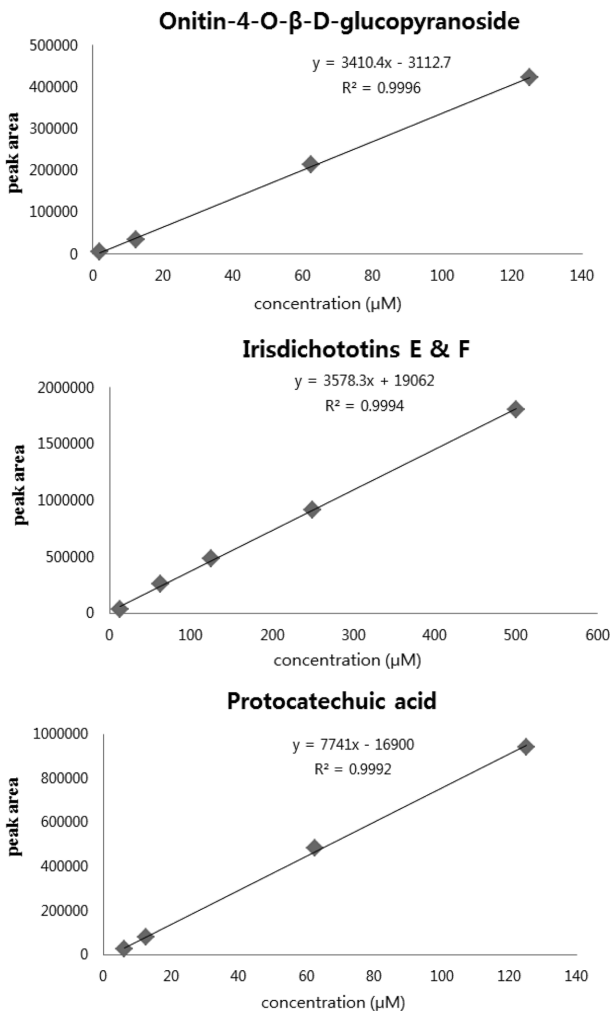


Fig. 3 – Calibration curve of standards.

Table IX – Contents of onitin-4-O-β-D-glucopyranoside, Iridichototins E & F, protocatechuic acid in 14 *C. barometz* samples

Samples	Contents (w/w, %)						
	Onitin-4-O-β-D-glucopyranoside		Iridichototins E & F		Protocatechuic acid		Total
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	
1	0.016	1.151	0.053	2.349	0.022	1.356	0.091
2	0.011	5.077	0.061	0.466	0.027	1.586	0.099
3	0.005	3.273	0.025	8.600	0.016	1.005	0.047
4	0.013	4.627	0.033	5.591	0.015	1.666	0.060
5	0.008	4.667	0.019	4.376	0.012	0.664	0.038
6	0.017	5.623	0.103	1.566	0.041	1.916	0.161
7	0.008	0.660	0.032	0.276	0.015	1.819	0.055
8	0.008	2.510	0.010	9.221	0.011	1.833	0.030
9	0.013	2.161	0.032	1.708	0.010	1.289	0.055
10	0.025	3.111	0.037	4.771	0.018	0.796	0.079
11	0.027	7.361	0.038	7.562	0.015	1.919	0.080
12	0.007	1.714	0.012	3.240	0.009	2.486	0.028
13	0.014	6.947	0.049	2.578	0.021	4.563	0.084
14	0.039	0.894	0.021	6.901	0.010	2.507	0.071
Mean	0.015	3.556	0.037	4.229	0.014		0.066

물을 분리하였으며 각종구조분석을 통하여 onitin-4-O-β-D-glucopyranoside (1), iridichototins E & F mixture (2), protocatechuic acid (3)으로 동정하였다.

특히 iridichototins E & F는 구척에서는 처음으로 분리보고된 물질이며 여러 기기분석을 통하여 전형적인 phenolic 성분으로 2가지 형태(α , β form)의 당이 결합된 화합물로 α -glucose가 결합되었을 때와 β -glucose가 결합되었을 때 성분의 구조적 차이가 미세하여 본 연구에서는 두 물질이 완전히 분리가 되지 않은 혼재된 형태로 함량 분석을 실시하였다.

분리된 3종의 성분을 대상으로 DPPH, ABTS, Hypoxanthine/xanthine oxidase system의 세 가지 antioxidant assay를 실시한 결과, iridichototins E & F와 protocatechuic acid는 양성 대조약물과 비교하였을 때 세 가지 기전의 antioxidant assay 모두에서 우수한 항산화능을 보였다. 이를 통해 iridichototins E & F와 protocatechuic acid의 함량은 구척의 약효와도 관련될 가능성이 있다.

또한 구척의 합리적인 유통체계와 품질관리를 위하여 UPLC-UV system을 이용해 15분 내에 구척의 성분패턴 분석이 가능한 분석법을 개발하였으며 그 결과 함량 및 구척의 대표적인 fingerprint를 제시하였다. 대체로 베트남산 구척에 3종의 주성분이 많이 함유된 것을 확인하였지만 베트남산과 중국산 구척 유통품의 차이점을 구분하기에는 어려웠다. 이는 주로 야생에서 자라는 금모구척은 일정한 온도, 습도 등의 환경조절이 어렵다는 사실을 고려하였을 때, 이러한 일정하지 않은 재배 환경 등이 다양한 성분 패턴과 함량결과에 반영된 것으로 사료된다. 따라서 추후 연구에서는 더욱 다양한 산지와 많은 시료를 수집하여 추가적인 함량 및 패턴분석이 필요한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 구척의 품질을 객관적이고 과학적으로 평가할

수 있도록 활성분획의 항산화 화합물 3종의 지표성분을 제시하였으며, 이를 통해 골 관련 질환을 비롯한 천연물 신약, 기능성 화장품 등의 원료로써 구척을 사용할 경우 구척에 대한 품질관리를 위한 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전처에서 지원하는 '생약의 TLC를 이용한 확인시험법 개발 연구(II)(13172천연물407)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 1) 胡熙明, 張文康, 朱慶生. (1999). 中華本草.
- 2) Ryu, M. and Lee, I. : Antioxidant constituents from the rhizomes of *Cibotium barometz*. *Planta Medica* **74**, 221 (2008).
- 3) 이지영, 고성훈, 이용재, 이세연, 박호준, 신태용, 전훈 : IFN- γ 와 LPS로 자극된 쥐의 복강 대식세포에서 구척 메탄올 추출물의 항염증 효과. *생약학회지* **41**, 108 (2010).
- 4) Zhou, R. J. : Prevention and treatment of hemorrhage after tooth extraction by using the dry alum powder of *Cibotium barometz*. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi=Chinese Journal of Modern Developments in Traditional Medicine/Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Yan Jiu Hui (Chou), Zhong Yi Yan Jiu Yuan, Zhu Ban* **5**, 452 (1985).
- 5) 임강현, 김명규, 김호현, 박선영, 이동환, 부영민, 김호철 : 구척 분획물의 성장기 흰쥐 장골 길이 성장에 대한 효과. *대한본초학회지(본초분과학회지)* **18**, 153 (2003).
- 6) 김상태, 한용남, 손연경, 장형석, 김수장, 신준식 : 구척으로부터 신경계생 효능 성분 분리. *약학회지* **46**, 398 (2002).

- 7) Cuong, N. X., Minh, C. V., Kiem, P. V., Huong, H. T., Ban, N. K., Nhiem, N. X. and Kim, S. : Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of *Cibotium barometz*. *Journal of Natural Products* **72**, 1673 (2009).
- 8) Kim, T., Yoon, S., Lee, W., Kim, J., Shin, J., Lee, S. and Lee, S. : Protective effect of GCSB-5, an herbal preparation, against peripheral nerve injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **136**, 297 (2011).
- 9) 차배천, 이은희 : 생약복합제 GCSB-5 의 품질 표준화를 위한 구척의 지표성분 탐색 및 HPLC 분석. *생약학회지* **41**, 48 (2010).
- 10) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **37**, 2016 (1989).
- 11) Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. : The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* **73**, 239 (2001).
- 12) McCune, L. M. and Johns, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the north American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology* **82**, 197 (2002).