

쑥의 에탄올 추출물에 함유된 Flavonoid들의 분리 및 동정과 이들의 항산화 효과

이상준 · 정하열* · 이인경 · 유익동
생명공학연구소, *국립한경대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Flavonoids from Ethanol Extracts of *Artemisia vulgaris* and Their Antioxidant Activity

Sang-Jun Lee, Ha-Yull Chung*, In-Kyoung Lee and Ick-Dong Yoo

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Daejeon 305-600, Korea

*The Department of Food Science & Technology Hankyong National University, Ansung, Korea

Abstract

Twenty one flavonoids were isolated from ethyl acetate layer of aqueous EtOH extracts of *Artemisia vulgaris* and identified as tricetin, jaceosidine, eupafolin, diosmetin, chrysoeriol, homoeriodictyol, isorhamnetin, apigenin, eriodictyol, luteolin, luteolin 7-glucoside, kaempferol 3-glucoside, kaempferol 7-glucoside, kaempferol 3-rhamnoside, kaempferol 3-rutinoside, quercetin, quercetin 3-glucoside, quercetin 3-galactoside, quercetin, quercetin 7-glucoside, rutin, and vietxin. The inhibitory activity for all purified flavonoids were examined against lipid peroxidation in rat liver microsome. All examined flavonoids showed considerable antioxidant activity. Among them, IC₅₀ value of apigenin, luteolin, isorhamnetin, quercetin, and eriodictyol were showed higher than that of vitamin E used as positive control. And methoxylated flavonoids, tricetin, eupafolin, jaceosidine, diosmetin, and isorhamnetin showed considerable antioxidant activity. Each IC₅₀ values were shown at 0.9, 1.0, 1.4, 1.0, and 0.7 µg/ml, respectively.

Key words: *Artemisia vulgaris*, mugwort, flavonoids, methylated flavonoids, antioxidant activity, lipid peroxidation, rat liver microsome

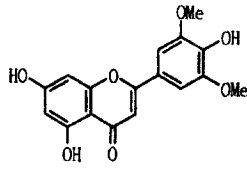
서 론

참쑥(*Artemisia vulgaris*)은 우리 나라 전역에 걸쳐 자생하는 다년생 식물로서 국화과에 속한다. 쑥은 예로부터 한방에서 중요한 약용식물로서 간주해 소화, 만성위장염, 하복부통, 지혈, 구충, 악취제거 등에 유효함이 알려져 왔으며⁽¹⁾, 특히 우리 나라뿐만 아니라 유럽, 아시아 등 의 여러 국가에서 여성 호르몬과 관계가 있는 여러 가지 부인병에 특효를 보이는 민간요법의 소재로서 알려져 있다^(2,3). 또한 쑥은 독특한 향과 맛으로 인해 우리 나라를 포함한 여러 나라에서 떡, 케이크, 차, 음료등 여러 형태로 식품에 이용되어 왔다⁽⁶⁾. 최근 들어서 쑥의 향미 첨가물로서의 가치뿐만 아니라 쑥이 가지고있는 고유한 생리활성을 이용해 식품

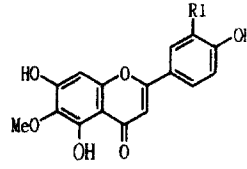
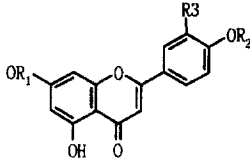
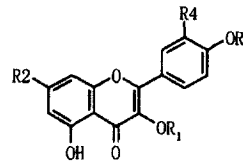
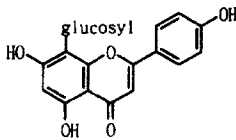
에 응용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고있다.

쑥의 주요성분으로 acetylene, sesquiterpene lactone, 휘발성 정유들이 보고되어왔으나⁽⁷⁾ 일반적으로 *Artemisia* 속의 식물로부터 많이 보고되는 flavonoid들을 포함한 다양한 페놀류 화합물의 연구는 많지 않다. *Artemisia* 속의 식물들은 다양한 flavonoids를 함유하고 있으며 화학 구조적으로 특징적인 것은 6-methoxy flavonoids 등이 공통적으로 발견되어 화학적인 분류학에 있어서도 매우 중요하게 간주된다. 현재까지 쑥으로부터 보고된 flavonoid들은 ayanin, kaempferol 3-glucoside, rutinoside 그리고 quercetin 3-glucoside 와 rutinoside 정도이다^(8,9). 본 연구에서는 참쑥으로부터 에스트로겐 유사활성 화합물을 규명하고자 하는 연구 중 21가지의 flavonoid들을 분리, 구조결정을 하였다⁽¹⁰⁾. Flavonoid들의 다양한 생리활성중 항산화효과는 매우 중요한 활성으로 알려져 있으며, 여러 가지 flavonoid들이 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화를 효과적으로 억제할

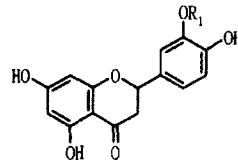
Corresponding author: Sang-Jun Lee, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea



1. Tricin

2. R₁=OH, Eupafolin
3. R₁=OCH₃, Jaceosidine4. R₁=R₂=R₃=H, Apigenin
5. R₁=H, R₃=OH, R₂=CH₃, Diosmetin
6. R₁=R₂=H, R₃=OCH₃, Chrysoeriol
7. R₁=R₂=H, R₃=OH, Luteolin
8. R₁=glucosyl, R₂=H, R₃=OH, Luteolin-7-glucoside9. R₁=R₂=R₃=H, R₄=OCH₃, Isorhamnetin
10. R₁=R₃=R₄=H, R₂=glucoside, Kaempferol-7-glucoside
11. R₁=glucose, Kaempferol-3-glucoside
12. R₁=rhamnoside, Kaempferol-3-rhamnoside
13. R₁=rutinoside, Kaempferol-3-rutinoside
14. R₁=R₂=R₃=H, R₄=OH, Quercetin
15. R₁=glucoside, Quercetin-3-glucoside
16. R₁=galactoside, Quercetin-3-galactoside
17. R₁=rhamnoside, Quercitrin
18. R₁=Rutinoside, Rutin

19. Vitexin

20. R₁=H, Eriodictyol
21. R₁=CH₃, HomoeriodictyolFig. 1. Chemical structure of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris*.

다고 보고 되었다. 자연계에 많이 존재하는 quercetin, taxifolin, rutin 등은 쥐의 간으로부터 분리된 마이크로솨에 대해 높은 지질과산화 억제효과를 나타낸다고 보고 되었으며⁽¹⁾, catechin, rutin, quercetin, leuteolin, morin, kaempferol 등은 linoleic acid와 methyl linoeate의 자동 산화의 강력한 저해제로서 알려져 왔다⁽²⁾. 문헌에 의하면 우리 나라 쪽 추출물에 대한 항산화활성이 보고된 바 있다⁽³⁾. 산쪽으로부터 물 추출물과 에테르 추출물 및 불용성 폐놀산을 추출하여 시판용 식용대우유를 기 질로 하여 과산화물기와 TBA값을 측정하여 항산화 효과를 측정한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 쪽으로부터

터 분리된 21가지의 flavonoid들이 항산화효과가 기대 되어 쥐의 간에서 추출한 마이크로솨에 대해 항 지질 과산화효과를 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 쪽은 1996년 4월에 경상남도 삼 천포지역에서 자생하는 것을 채취하였으며 40°C에서 풍건한후 25°C 이하의 어둡고 건조한 저장실에 보관 하였다.

기기 및 시약

화합물의 동정에는 UV-spectrophotometer (Kontron Uvicon 930), NMR spectrometer (Bruker AM-500), FAB-MS (Finnigan MAT 90 mass spectrometer)를 사용하였다. 화합물은 실리카겔 (Kieselgel 60, 230~400 mesh), Polyclar AT (GAF Co.), Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemical Co.)을 사용하여 분리하였으며, TLC분석에 사용된 전개용매는 TBA (t-BuOH-HOAc-H₂O, 3:1:1); n-BAW 상층액 (n-BuOH-HOAc-H₂O, 4:1:5), BPA (C₆H₅-pyridine-HCO₂H, 36:9:5)를 사용하였다. Flavonoid들의 구조결정에 사용된 정성반응 시약으로서 AlCl₃, boric acid, acetic acid sodium salt (Aldrich Co.)를 사용하였으며, 반응시약은 문헌에 따라 조제하였다⁽⁴⁴⁾.

추출 및 분리

건조된 쑥의 전초 2 kg을 세절한 후 80% aq. 에탄올 2 L에 5일 동안 침지시킨후 추출하였다. 2 L의 추출액을 감압하에 용매를 제거하고 n-헥산 1 L, 클로로포름 1 L 그리고 에틸아세테이트 1 L로 각각 순차적으로 3회씩 추출하였다. 각각의 추출용매는 감압하에 농축하여 오일상의 추출물로 각각 7, 8, 10 g를 얻었다. 클로로포름 추출물을 헥산-에틸아세테이트(20:1)를 시작으로 에틸아세테이트 100%로 전개하여 실리카겔 컬럼(8×25 cm)을 이용하여 A에서 H까지 8개로 분획하였다. 이들 분획중에서 마지막 분획 H를 sephadex LH20 컬럼을 사용하여 정제하여 미량의 폐놀계 화합물을 얻었다.

에틸아세테이트 추출물은 클로로포름-에틸아세테이트 20:1 혼합물로부터 100% 에틸아세테이트 용매를 사용하여 실리카겔 컬럼(8×25 cm)을 사용하여 A부터 H까지 8개로 분획하였다. 대부분의 flavonoid aglycone들은 A, B, C, D 분획층에 존재하는 것으로 검출되었으며, D, G, H 분획층에서는 flavonoid 배당체들이 검출되었다. 이들 flavonoids화합물들은 Sephadex LH20 컬럼을 이용하여 정제하였다. Flavonoid aglycone들의 경우 용매조건은 메탄올 100%를 사용하였으며, 배당체의 경우는 80% 메탄올을 사용하여 순수 정제하였다. 분리된 화합물의 양은 다음과 같다: 화합물 1 (3 mg), 2 (4 mg), 3 (2 mg), 4 (7.2 mg), 5 (5 mg), 6 (1.2 mg), 7 (39 mg), 8 (2.3 mg), 9 (2.1 mg), 10 (6 mg), 11 (10 mg), 12 (6.1 mg), 13 (6 mg), 14 (11 mg), 15 (10 mg), 16 (8.2 mg), 17 (3.1 mg), 18 (8.5 mg), 19 (3.1 mg), 20 (40 mg), 21 (6.3 mg).

지질과산화 저해활성 측정

지질과산화 저해 활성은 이미 보고된 비효소적측정

방법의 하나인 Fe²⁺/ascorbate법⁽⁴⁵⁾에 의해 조사하였다. 위의 간으로부터 마이크로솜의 분리는 Hogeboom 등의 방법⁽⁴⁶⁾을 이용하였으며, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 현탁하여 사용하였다. 먼저 마이크로솜(1 mg protein/mL)현탁액 10 µL에 메탄올을 녹인 각 농도의 시료 500 µM FeSO₄ 용액 25 µL, 100 mM Tris-HCl buffer 0.5 mL, 증류수 0.45 mL을 혼합한 후 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 3M TCA:2.5 N HCl을 1:1로 섞은 혼합용액 0.3 mL을 가하여 반응을 중지시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액 1 mL을 취하였다. 이를 0.67% TBA용액 0.3 mL과 섞은 후 100°C에서 5분간 가열하고 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의하여 지질과산화 저해율(%)을 계산하였다. 양성 대조구로는 비타민 E를 사용하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{A - C}{A - B} \times 100$$

- A: 저해제를 넣지 않은 것의 흡광도
- B: 저해제와 마이크로솜을 넣지 않은 것의 흡광도
- C: 저해제를 넣은 것의 흡광도

배당체의 가수분해

4 mL의 2 N 염산 용액에 각각의 flavonoids시료 3 mg을 넣은 후 100°C에서 50분간 반응시킨다. 반응후 감압하에 건조 시킨 후 4 mL 에틸아세테이트와 4 mL의 증류수를 첨가한 후 작은 분액깔대기를 이용하여 분획하였다. flavonoid aglycone들이 존재하는 에틸아세테이트층은 Na₂SO₄로 수분을 제거하고 감압하에 건조시켜 목적하는 flavonoid aglycone들을 얻었다. Flavonoids 배당체로부터 가수분해하여 얻은 당화합물은 셀룰로오스 TLC를 이용하여 분석하였다. 이때 사용되는 용매조건은 피리딘 : 에틸아세테이트 : 초산 : 물 (36:36:7:21)을 사용하였으며 각각의 당 표준시료와 함께 TLC에 전개하였다. 전개된 TLC 판은 건조후 aniline phthalate 발색시약을 분무하고 110°C 오븐에서 15분간 구운후 나타난 갈색 점의 Rf치를 당표준시료와 비교하여 분석하였다.

Flavonoid들의 ¹H-NMR과 EI-MS data

화합물 1: EIMS 70eV, m/z (rel. int.) 330(100)[M]⁺, 329(12)[M-H]⁺, 315(2)[M-15]⁺, 301(5)[M-CHO]⁺, 287(3)[M-COMe]⁺, 181(7)[B2]⁺, 178(3)[B1]⁺, 152(17)[A1]⁺, 151[B2]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.32 (s, H-2'), 7.32 (s,

H-6'), 6.96 (s, H-3), 6.56 (d, $J=2.0$, H-8), 6.21 (d, $J=2.0$, H-6), 3.95 (6H, s, OCH₃).

화합물 2: EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) 316(100)[M]⁺, 315(14)[M-H]⁺, 301(76)[M-Me]⁺, 298(53)[M-18]⁺, 287(8)[M-HCO]⁺, 273(81)[M-COMe]⁺, 167(17)[A1-Me]⁺, 139 (23), 134(13)[B1]⁺, 137[B2]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.35 (d, $J=9.0$, H-6'), 7.35 (d, $J=9.0$, H-2'), 6.85 (d, $J=9.0$, H-5'), 6.85 (d, $J=9.0$, H-3') 6.50 (s, H-8), 6.27 (s, H-3), 3.72 (s, OCH₃).

화합물 3: EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) 330(100)[M]⁺, 329(1)[M-H]⁺, 315(74)[M-Me]⁺, 312(53)[M-18]⁺, 301(8)[M-HCO]⁺, 287(13)[M-COMe]⁺, 167(19)[A1-Me]⁺, 139 (24) [A1-MeCO]⁺, 148(8)[B1]⁺, 151(8)[B2]⁺; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.60~7.50 (m, H-2'), 7.60~7.50 (m, H-6'), 6.92 (d, $J=9.0$, H-5'), 6.86 (s, H-3), 6.52 (s, H-8), 3.88 (s, OCH₃), 3.75 (s, OCH₃).

화합물 4: ¹H-NMR (CD₃OD); δ 7.94 (d, $J=8.2$, H-6'), 7.94 (d, $J=8.2$, H-2'), 6.98 (d, $J=8.2$, H-5'), 6.98 (d, $J=8.2$, H-3'), 6.78 (s, H-3), 6.54 (d, $J=2.1$, H-8), 6.2 (d, $J=2.1$, H-6).

화합물 5: EIMS 70 eV, m/z (rel. int) 300(100)[M]⁺, 299(15)[M-H]⁺, 282(11)[M-18]⁺, 271(11)[M-CHO]⁺, 257(7)[M-COMe]⁺, 151(3)[B2]⁺, 148(17)[B1]⁺; ¹H-NMR: δ 7.57 (dd, $J=2.1$, 8.6, H-6'), 7.45 (d, $J=2.1$, H-2'), 7.13 (d, $J=8.6$, H-5'), 6.81 (s, H-3), 6.77 (d, $J=2.0$, H-8), 6.47 (d, $J=2.0$, H-6), 3.89 (s, OCH₃).

화합물 6: EIMS 70 eV, m/z (rel. int) 300(100)[M]⁺, 299(11)[M-H]⁺, 282(9)[M-18]⁺, 271(12)[M-CHO]⁺, 257(11)[M-COMe]⁺, 152(15)[A1]⁺, 151[B2]⁺, 148(17)[B1]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD): 7.61 (m, H-6'), 7.61 (m, H-2'), 7.0 (d, $J=8.5$, H-5'), 6.51 (d, $J=2.0$, H-8), 6.22 (d, $J=2.0$, H-6), 3.85 (s, OCH₃).

화합물 7: ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.57 (dd, m, H-6'), 7.56 (d, $J=2.0$, H-2'), 6.96 (d, $J=8.8$, H-5'), 6.87 (s, H-3), 6.51 (d, $J=2.0$, H-8), 6.22 (d, $J=2.1$, H-6), 3.90 (s, OCH₃).

화합물 8: FAB-MS m/z (rel intensity) 447(11)[M-H]⁺, 285(2)[M-H-hexose].

화합물 9: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.92 (d, $J=2.0$, 2'), 7.49 (dd, $J=8.9, 2$, H-6'), 6.90 (d, $J=8.9$, H-5'), 6.43 (d, $J=2.0$, H-8), 6.20 (d, $J=2.0$, H-6).

화합물 10,11,12,13: 각각의 가수분해에서 생성된 aglycone을 ¹H-NMR 분석했을 때 공통적으로 kaempferol의 signal들을 갖는다. 가수분해 산물중 당부분은 각각의 표준시료와 함께 TLC 분석하여 확인하였다.

화합물 14: (DMSO-*d*₆) δ 7.69 (d, $J=2.1$, H-2'), 7.55

(dd, $J=2.1$, 8.5, H-6'), 6.90 (d, $J=8.5$, H-5'), 6.42 (d, $J=2.1$, H-8), 6.20 (d, $J=2.1$, H-6).

화합물 15,16,17,18: 각각의 가수분해에서 생성된 aglycone을 ¹H-NMR분석했을 때 공통적으로 quercetin의 signal들을 갖는다. 가수분해 산물중 당부분은 각각의 표준시료와 함께 TLC분석 하였다.

화합물 19: ¹H-NMR (D₂O): δ 8.30 (d, $J=8.7$, H-3', 6'), 8.03 (d, $J=8.7$, H-2'), 6.90 (d, $J=8.7$, H-3',5'), 6.77 (s, H-3), 6.27 (s, H-6), 4.9 (d, $J=4.2$, glucosyl H-1"), 4.3 (dd, H-2"), 3.7~3.2 (glucose 5H).

화합물 20: ¹H-NMR (CD₃OD): δ 6.87 (dd, $J=2.1$, 9.0, H-2'), 6.90 (s, H-6'), 6.90 (s, H-5'), 5.90 (s, H-8), 5.90 (s, H-6), 5.34 (dd, $J=3.0$, 12.0, H-2), 3.10 (dd, $J=12.0$, 17.2, H-3), 2.62 (dd, $J=3$, 17.2, H-2).

화합물 21: ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.1 (d, $J=2.1$, H-2'), 6.9 (m, H-6'), 6.75 (d, $J=8.1$, H-5'), 6.1 (br s, H-6, 8), 5.4 (dd, $J=3$, 12, H-2), 3.85 (s, OCH₃), 3.2 (dd, $J=12$, 17, H-3), 2.7 (dd, $J=17$, 3, H-2)

결과 및 고찰

화합물의 분리 및 구조동정

쑥의 80% 에탄올 추출물로부터 크로로포름 추출액과 에틸아세테이트 추출액을 얻었다. 클로로포름 층으로부터는 이전에 쑥으로부터 얻어진 쿠마린계통의 화합물을 얻었다. 분리된 화합물들은 ¹H-NMR로서 쉽게 동정하고 이들의 물리, 화학적인 특징을 기존의 문헌⁽¹⁷⁾과 비교하여 동정하였다. 대부분의 flavonoids화합물은 에틸아세테이트층에 존재함을 전통적인 2-D paper chromatography방법을 통하여 확인하였으며⁽¹⁴⁾ 분리된 flavonoids들의 기본골격의 화학구조는 ¹H-NMR로 확인하였으며, TLC Rf치와 EI-MS 및 UV 스펙트럼을 기존의 문헌과 비교하여 확인하였다⁽¹⁸⁾. 따라서 화합물 4는 apigenin, 7은 luteolin, 화합물 19는 vitexin, 그리고 화합물 20은 eriodictyol임이 확인되었으며, 배당체 8번 화합물의 aglycone은 eriodictyol, 10~13 화합물의 aglycone은 kaempferol, 14~18 화합물의 aglycone은 quercetin임이 확인되었다.

얻어진 flavonoids중 메틸기나 당으로 치환된 flavonoids들의 치환된 위치는 Table 1에서 같이 몇 가지의 진단시약을 사용하여 스펙트럼이 이동되는 경향을 보고 해석하였다⁽¹⁹⁾. 1번 화합물의 ¹H-NMR에서 δ 6.96 ppm의 singlet signal, 6.56 ppm과 6.2 ppm에서 나타나는 2개의 doublet signals는 전형적인 5, 7 수산기의 flavone의 A와 C 환의 proton signal들 값이며, δ 3.95 ppm 위

Table 1. UV Data (λ_{max}, nm) with diagnostic reagents for methylated flavonoids and flavonoid glycosides from *Artemisia vulgaris*

Flavonoid	MeOH	NaOMe	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃
Tricin	352,299sh 270,212	419,328 263,214	391,364sh 307,277	388,362 302,278	414,321 276sh,264	482,422sh 350,304sh
Eupafolin	346,270 257,213	399,330 278,208	421,300 275,215	364,300sh 281,216	401,330 273,211	428,365 269
Jaceosidine	344,275 214	399,336sh 267,208	376,296sh 284,261	366,290 259	401,324sh 274	348,263
Diosmetin	344,291sh 267,252	386,303 270	390,362 296,273	383,351 295,276	367,322 275	348,268 253sh
Chrysoeriol	347,269 249,241	405,329 275,264	390,296 273,261	385,353 294,276	395,320 270	349,268
Homoeriodictyol	323sh,287 229,211	323,248 215	374,310 224,208	374,308 223,208	322,288 211	288,211
Isorhamnetin	370,326sh 266sh,253	(dec.) 435,328 271,240sh	431,361sh 304,264	428,357 302sh,262 242sh	(dec.) 393,320 274,260sh	377,326sh 306sh 270sh,255
Kaempferol-7-O-glucoside	364, 323 266, 253	425,335sh 267, 245	424,353 299sh,266 259	422,350 300sh,266 258sh,244	419sh,385 323,261	370,325sh 265sh
Quercetin-3-O-glucoside	362,299sh 269,257	407, 327 272	438,331sh 305sh,275	405,365sh 299sh,268	380,324 274	377,324sh 274
Quercitrin	305,301sh 265sh,256	393, 326 270	430, 333 304sh,276	401, 353 303,272	372,322sh 272	367,300sh 260
Rutin	395,299sh 266sh,259	410, 327 272	433,361sh 304sh,264	402,364sh 300, 271	393, 325 271	387, 298 262
Luteolin 7-glucoside	348,267 255	394, 300 263	432,329 298,274	387,358 294,273	405,365sh 266sh,259	372,259

치의 2개의 methoxy signals와 δ 7.32 ppm에서 나타나는 2개의 singlet proton signal은 flavonoids의 B 환의 methoxy치환체가 3', 5'에 대칭되게 존재함을 보여준다. 이상과 같은 결과는 Table 1의 UV 스펙트럼에서 띠 1의 352 nm파장이 NaOMe 첨가시 $\Delta+67$ bathochromic 이동됨으로써 5번의 수산기와 4'-수산기가 존재하는 flavone임을 확인하였으며, AlCl₃ 와 AlCl₃/HCl 첨가시 각각 띠 1의 피크가 391 nm가 388 nm로 큰 변화가 없는 것으로 보아서 B-환의 3'과 5'의 위치에 치환되어 있음을 확인하였다.

2번, 3번 화합물은 EI-MS에서 공통적으로 5, 7-수산기, 6-메톡시기의 flavone들의 전형적인 m/z 301[M-

Me]⁺와 315[M-Me]⁺의 피크들이 나타났으며, 또한 공통적으로 m/z 167[A1-Me] 피크가 나타나 이들 화합물들이 *Artemisia*속으로부터 많이 보고되는 6-methoxy flavonoids임을^(19,20) 확인하였다. 또한 [B1] 피크가 각각 m/z 134 피크와 148피크에서 나타나는 것으로 2번 화합물의 B 환에 2개의 수산기가 3번 화합물의 B 환에는 1개의 메톡시기와 1개의 수산기가 존재함을 보여준다(Fig. 1). 이러한 결과는 각각의 ¹H-NMR data와도 일치한다. 3번 화합물의 경우 ¹H-NMR에서 δ 3.89 ppm에서 한 개의 methoxy기가 존재함이 나타난다. Table의 UV data에서 344 nm의 띠 1 피크가 NaOMe 첨가시 $\Delta+55$ nm bathochromic으로 이동하며, AlCl₃와

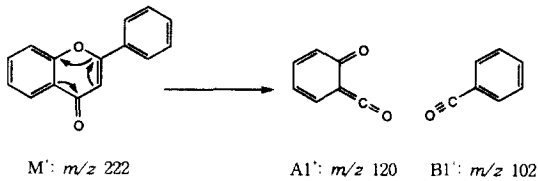


Fig. 2. Pathway of the most important fragmentation pattern by retro-Diels Alder for flavonoids.

AlCl_3/HCl 첨가시 락 1의 피크 변화가 없으므로 보아서 B 락의 3' 위치에 존재함을 확인할 수 있다.

화합물 5번은 ¹H-NMR 스펙트럼과 EI-MS의 분자이온 피크에 의해 apigenin의 기본골격에 있는 하나의 수산기가 메틸기로 치환되어 있는 구조이다. Methoxy기의 위치는 Table 1에서 $\Delta+42$ nm bathochromic으로 이동하며 강도가 크게 증가하지 않는 것으로 보아서 4'에 위치하는 것으로 확인된다. 화합물 6번은 ¹H-NMR과 EI-MS 스펙트럼에서 5번 화합물과 methoxy기의 위치만이 차이를 보이는데 NaOMe 첨가시 강도가 증가되면서 $\Delta+48$ nm bathochromic으로 이동하여 화합물 5번과는 달리 3'에 methoxy기가 위치함을 보여준다.

Flavonoids의 7-수산기에 대한 락의 치환여부는 NaOAc와 NaOAc/ H_3BO_3 시약을 사용하여 확인할 수 있었다. 8번 화합물과 10번 화합물의 메탄올용액에 NaOAc를 첨가시 UV 스펙트럼에서 락 II의 피크는 각각 259, 261 nm로 나타났으며, 이들 시료에 H_3BO_3 을 첨가하였을 때 각각 259, 263 nm로 그대로이거나 아주 작은 변화만이 나타났다. 이러한 결과는 flavonoids aglycone의 7번 위치에 락이 결합하고 있음을 보여준다. 이상과 같은 방법으로 Table 1에서와 같이 10~18번 flavonoids의 배당체의 락의 치환 위치를 확인하였다. 화합물 19는 UV 스펙트럼의 락 1의 피크가 336 nm, NaOMe 첨가시 락 1의 피크가 Δ +bathochromic으로 이동하며, AlCl_3/HCl 에서 락 1의 피크가 383 nm로 bathochromic으로 이동된 상태이다. 그리고 역시 NaOAc와 NaOAc/ H_3BO_3 시약을 사용할 때 락 II의 피크가 각각 279, 274 nm로 나타난 것을 보아서 화합물 8번이 flavone으로서 4', 5, 7번에 수산기가 존재하는

것으로 나타내며, ¹H-NMR에서 A 락의 proton signal이 6.27에서 하나로 나타나는 것으로 락이 A 락의 탄소에 직접 치환되어 있는 것으로 나타난다. 글루코오스의 치환 위치는 C-6 또는 C-8번에 존재할 수 있으며, 이 두 가지의 경우에서 ¹H, ¹³C NMR, UV 스펙트럼상의 차이로는 구분이 불가능하며, 종이 chromatography에서 15% HOAc 용매를 사용하여 전개하였을 때 C-8에 치환되어 있는 경우는 Rf 0.29 그리고 C-6에 치환되어 있는 경우는 Rf 0.55의 큰 차이를 나타냄으로 최종 확인하였다.

Flavonoid들의 지질과산화 억제활성

지질과산화 억제활성을 측정하기 위하여 사용되는 지질로는 불포화지방산을 다량으로 함유하고 철(Fe^{2+})이온에 의하여 산화가 용이하게 일어나 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)를 잘 생성하는 쥐의 미크로솜을 분리하여 사용하였다.

본 연구에서는 이미 항산화활성이 보고된 일반적인 flavonoids들의 항산화효과 이외에 쑥으로부터 분리된 flavonoid들중 몇 가지의 methoxylated flavonoid들이 쥐의 미크로솜에 대하여 항 지질과산화효과가 있음을 확인하였다. Table 2에서와 같이 이미 강력한 항산화효과가 있음이 확인된 apigenin, luteolin, quercetin 그리고 isorhamnetin 등의 화합물은 본 연구에서 미크로솜에 대한 지질과산화 저해효과(IC_{50})가 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.3, 0.3, 0.7에서 나타남으로 양성대조군인 비타민 E와 비교할 때 강한 활성을 보였다. Table 1에서 보듯, chrysoeriol⁽⁶⁾ 화합물을 제외하고는 대부분의 methoxylated flavonoid들은 높은 지질과산화억제효과를 보이고 있다. tricetin⁽¹⁾, eupafolin⁽²⁾, jaceosidine⁽³⁾, diosmetin⁽⁵⁾, isorhamnetin⁽⁹⁾ 등의 IC_{50} 값은 0.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 범위에서 나타난다. 이 농도범위는 대조군으로 사용된 비타민 E와 비교할 때 다소 높거나 비슷한 정도의 활성을 나타낸다. Fig. 2에서와 같이 이들 methoxylated flavonoid들은 실험에 사용된 모든 농도구간에서 농도의존적으로 활성을 나타내고 있으며, 사용된 양성대조군 비타민 E와 비교하였을 때 높은 활성을 보여준

Table 2. Inhibition activity (IC_{50}) of the flavonoids from *Artemisia vulgaris* against lipid peroxidation in rat liver microsomes

Comp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
IC_{50} g/	0.9	1	1.4	0.3	1.0	8	0.3	7.5	0.7	1.0	5.6
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Vitamin E	
6.1	4.5	0.9	2.5	3.0	11.2	15	15	0.9	15	1.5	

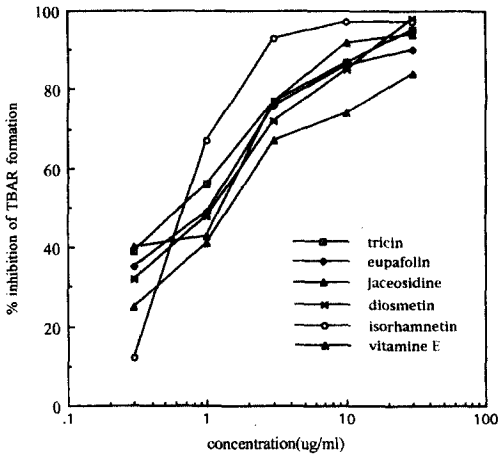


Fig. 3. The inhibitory effect of methylated flavonoids, triclin, eupafolln, jaceosidine, diosmetin, isorhamnetin, against lipid peroxidation in rat liver.

다. 특히 isorhamnetin의 경우 1 µg/mL의 농도에서 지질과산화억제효과가 flavonoid가 포함되지 않은 대조구에 비하여 66%정도 억제하고 있으며, 3 µg/mL농도에서는 거의 90% 이상의 저해효과를 나타내었다. 이러한 항산화효과는 기존의 강한 항산화물질로 알려진 apigenin, quercetin, luteolin 등과 비교하였을 때에도 대등함을 보여준다. 반면에 flavonoid glycosides 10~21 화합물들은 각각의 aglycone화합물인 quercetin과 kaempferol에 비하여 항산화효과가 현저하게 낮아짐을 보여준다. 특별히 diglycoside가 치환된 rutin⁽¹⁸⁾, 그리고 C-glycoside인 vitexin⁽¹⁹⁾은 IC₅₀값이 15 µg/ml이상이므로 나타나 이 실험에서 분리된 flavonoid들중 homoeriodictyol과 함께 가장 낮은 항산화효과를 나타냈다.

요 약

우리 나라 전역에 자생하는 쑥(*Artemisia vulgaris*)의 전초의 수용성 에탄올추출물로부터 21가지의 flavonoids를 분리하였다. 이들 화합물의 동정은 ¹H-NMR, mass, UV-스펙트럼을 이용하여 동정하였으며, 동정된 flavonoids들은 triclin, jaceosidine, eupafolln, diosmetin, chrysoeriol, homoeriodictyol, isorhamnetin, apigenin, eriodictyol, luteolin, luteolin 7-glucoside, kaempferol 3-glucoside, kaempferol 7-glucoside, kaempferol 3-rhamnoside, kaempferol 3-rutinoside, quercetin, quercetin 3-glucoside, quercetin 3-galactoside, quercetin, quercetin 7-glucoside, rutin 그리고 vitexin으로 동정 되었다. 이들 분리된 각 flavonoids들에 대하여 쥐의 간에서 추출한

마이크로솜에 대하여 지질과산화 효과를 살펴보았다. 이들 flavonoids화합물들의 항산화효과는 비타민 E와 비교하였을 때 높은 활성이 나타났다. 이미 강력한 항산화물질로 잘 알려진 quercetin, apigenin, eriodictyol 등의 화합물의 IC₅₀ 값은 각각 0.9, 0.3, 0.3 µg/mL로 나타났으며, methoxylated flavonoids인 eupafolln, jaceosidine, diosmetin 등의 화합물도 IC₅₀ 값이 1.0, 1.4, 1.0 µg/mL로 나타나 비타민 E에 비교할 때 높은 활성을 나타냈다.

감사의 글

NMR과 Mass spectrometer기기 사용에 도움을 주시고, flavonoids표준시료를 제공하여주시신 Texas대학 (Austin, U.S.A.)의 Tom J. Mabry교수에게도 감사드립니다.

문 헌

1. Yoshikawa, M., Shimada, H., Matsuda, H., Yamahara, J. and Murakami, N.: Bioactive constituents of Chinese natural medicine 1, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**(9), 1656-1662 (1996)
2. Albert-Puleo, M.: Mythobotany, pharmacology, and chemistry of thujone-containing plants and derivatives. *Economic Botany*, **32**, 65-74 (1978)
3. Saha, J.C. Savini, E.C. and Kasinathan, S.: Ecobolic properties of Indian medicinal plant. *Ind. Jour. Med. Res.*, **49**, 130-151 (1961)
4. Duke, J.A.: Handbook of Medicinal Herbs: CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp.69-70 (1985)
5. Malpass, G.N.: Century old botanicals. *Amer. J. Pharm.*, **117**, 298-318 (1945)
6. Tanaka, T.: Tanaka's Cyclopedia of Edible Plants of the World; Keigaku Pub. Co., ToKyo, (1976)
7. Marco, T.J. and Barbara, O.: *In studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 7, Atta-ur-Rahman, Ed., Elsevier: Amsterdam, pp. 201-264 (1990)
8. Stefanovic, M., Dermanovic, M. and Verencevic, M.: Chemical investigation of the plant species of *Artemisia vulgaris* L. (Compositae). *Glas. Hem. Drus. Beograd.*, **47**, 7 (1982)
9. Hoffmann, B.Z. and Herrmann, K.: Flavonol glycosides of wormwood (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) and absinthe (*Artemisia absinthium* L.). *Z. Lebensm. Unters-Forsch.*, **174**, 211 (1982)
10. Lee, S.J., Chung, H.Y., Maier, C. G-A., Wood, A.R., Dixon, R.A. and Mabry, T.J.: Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. *J. of Agric. Food Chem.*, **46**, 3325-3329 (1998)
11. Bindoli, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N.: Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsome. *Biochem. Pharmacol.*,

- 26, 2405 (1977)
12. Afanase'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A. and Potapovitch, A.I.: Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutine and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1763 (1989)
 13. Lee, K.D., Kim, J.S., Bae, J.O. and Yoon, H.S.: Antioxidant effectiveness of water extract and ether extract in wormwood (*Artemisia montana* Pampan) (in Korean), *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(1), 17-22 (1992)
 14. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag: Berlin (1970)
 15. Halliwell, B. and Cuttridge, J.M.C.: Lipid peroxidation: a radical chain reaction, pp. 188-276, In Free radicals in biology and medicine. 2nd ed., Clarendon Press, Oxford (1989)
 16. Hogeboom, G.H.: General methods for the isolation of liver cell components: Fraction of cell components of animal tissues. *Meth. Enzymol.*, **1**, 16-19 (1965)
 17. Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P.: Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, **25**, 383 (1986)
 18. Harborne, J.B.: The Flavonoids: Advances in Research; Chapman & Hall, London (1986)
 19. Kingston, D.G.I.: Mass spectrometry of organic compounds IV. electron impact spectra of flavonoid compounds. *Tetrahedron*, **27**, 2691 (1971)
 20. Lee, H.H. and Tan, C.H.: Synthesis of sudachitin and demethoxysudachitin. *J. Chem. Soc.*, 2743 (1965)
-
- (1998년 5월 25일 접수)