

## 벼의 항산화성분

문형인\* · 민병선 · 이형규 · 지옥표<sup>1</sup>

한국생명공학연구원 면역제어연구실, <sup>1</sup>성균관대학교 약학대학

### Antioxidant Compounds of *Oryza sativa* L

Hyung In Moon\*, Byung Sun Min, Hyeong Kyu Lee, and Ok Pyo Zee<sup>1</sup>

Immunomodulator Research Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600,

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract** – In search for the plant-derived antioxidant compound, it was found that the EtOAc, BuOH extracts obtained from the leaves parts of *Oryza sativa* L. which exhibited a significant antioxidant activity from 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical cleavage. Activity-guided fractionation on the basis of the inhibitory activity upon the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical cleavage. and repeated column chromatography afforded several antioxidant compounds from *Oryza sativa* L. The structures and stereochemistry of these compounds were established on the basis of analysis of spectra and some chemical transformations as follows: 5,7-dihydroxy- 8-methoxyflavone, acacetin-7-O- $\beta$ -rutinoside, pectolinarigenin-7-O- $\beta$ -rutinoside. At antioxidant activity test for isolated three compounds, antioxidant activity was showed too.

**Key words** – *Oryza sativa*, antioxidant activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical cleavage. 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone, acacetin-7-O- $\beta$ -rutinoside, pectolinarigenin-7-O- $\beta$ -rutinoside

벼(*Oryza sativa* L)는 벼과(Gramineae)에 속하는 1년생 초본으로 주요식량자원에 속하는 작물이다.<sup>1)</sup> 벼에 대한 연구는 많은 농업적 연구가 되어 있으나 벼 전초의 활성성분에 대한 연구는 거의 전무한 수준이므로<sup>2)</sup> 이에 식물 화학적 성분의 연구와 생리활성연구의 필요성을 인식하고 항산화 성분을 추적한 결과 벼의 MeOH 추출물의 EtOAc층에서 3종의 항산화 성분을 분리하였고, 이들의 이화학적 성상 및 spectral data로부터 그 구조를 확인, 동정하였기에 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 벼잎(추청벼)은 2000년 8월에 농촌진흥청 작물시험장 포장에서 농약의 잔류성이 없는 것을 대상으로 하여 채취하였으며, 정확한 감정을 거친 후에 음건하여 분말화한 후 실험에 사용하였으며, 식물표본은 성균관대학교 약학대학 표본실(OR-SA-20-08-14)에 보관되어 있다.

**시약 및 기기** – 추출, 분획 및 TLC용매는 EP급 용매를 재증류하여 사용하였다. Column packing용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Art 9385 and 7734, Merck)를 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 packing material은 sephadex LH 20(Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> precoated plate (Art. 5552. Merck)와 RP-18 plate(Merck)를 사용하였으며, LPLC용 column은 Lobar-A Lichrorep. Si 60 (Merck) 및 RP-18 Lichrorep. (Merck)을 사용하였다. 발색시약으로는 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(in EtOH)과 anisaldehyde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 시약을 사용하였으며, UV로 254, 365 nm detection을 병행하였다. 사용한 기기는 mp (Gallenkamp melting point apparatus), FT-IR(Nicolet model 205), UV Spectrophotometer(Shimadzu UV 240), <sup>1</sup>H-NMR(Varian Inova(500MHz)), FAB-MS, EI-MS (Jeol JMS-AX505WA), LPLC(DURAMAT 80pump)이다.

**추출 및 분리** – 신선한 벼잎을 음건세절하여 건조 중량 약 5 kg을 MeOH로 추출한 추출물 175.3 g을 물에 다시 녹인 후 Hexane층을 제거한 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH층을 각각 3.5 g, 4.2 g, 2.6 g을 얻었으며, 각 용매층을 미리 DPPH법<sup>3)</sup>

\*교신저자(E-mail) : himun@kribb.re.kr

으로 항산화 screening를 행한 결과, EtOAc층에서 항산화활성이 나타나 성분분리를 행하였다. EtOAc분획을 Si column chromatography(cc), sephadex LH-20 및 RP cc등을 반복 실시하여 화합물을 단리하였다. EtOAc분획 3.5 g을 CHCl<sub>3</sub> : MeOH = (9:1 - 8:2) 비율의 gradient solvent system으로 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 subfraction으로 분획하였다.

**화합물 1** - 4개의 subfraction중 fraction 2,3,4가 비슷한 TLC chromatogram양상이 나타나 합하여, sephadex LH-20(MeOH)에서 용출하여 2개의 subfraction을 얻었으며, 이중 subfr 2을 sephadex LH-20(MeOH)에서 용출시키고, CHCl<sub>3</sub>:MeOH(4:1)의 비율로 Si cc를 실시하여, 약간의 불순물이 함유되어 있는 것을 MeOH로 -4°C에서 재결정하여 미백색 분말상 물질인 화합물 1(50 mg)을 얻었다.

white yellow powder, TLC: Rf = 0.4 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1), mp. 198~201°C, Mg/HCl, Zn/HCl test:red, FeCl<sub>3</sub> solution: darkgreen, FABMS: *m/z* 284[M]<sup>+</sup>, 269, 229, UV λ<sub>max</sub>(MeOH)nm 249, 278, 320; with NaOMe 247, 279, 315; with AlCl<sub>3</sub> 231sh, 245sh, 287sh, 296, 332; with AlCl<sub>3</sub> + HCl 230sh, 245sh, 290sh, 298, 336; with NaOAc 246, 268sh, 284, 378; with NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 243, 269sh, 287, 375; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz, ppm) δ: 8.06 (2H, m, H-2' and H-6'), 7.60 (3H, m, H-3', 4' and H-5'), 6.81 (1H, s, H-3), 6.31 (1H, s, H-6), 3.95 (3H, m, OCH<sub>3</sub>)

**화합물 2** - subfr 1을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(9:1)의 비율로 Si cc를 실시하고, 다시 MeOH:Water(9:1)의 비율로 RP18 cc를 실시하여 연노랑색의 분말인 화합물 2(18 mg)를 얻었다.

pale yellow amorphous powder, TLC: Rf = 0.62 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 4:1), mp. 273~275°C, Mg/HCl, Zn/HCl test:red, FeCl<sub>3</sub> solution:dark green, FABMS: *m/z* 605[M+CH]<sup>+</sup>, 545 [M-CH<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, UV λ<sub>max</sub>(MeOH)nm; 268, 326; with NaOMe 292, 370sh; with AlCl<sub>3</sub> 277, 299, 347, 380sh; with AlCl<sub>3</sub> + HCl 278, 298, 343, 380sh; with NaOAc 268, 327; with NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 268, 328; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, ppm) δ: 8.10 (2H, d, *J*=9.0Hz, H-2' and H-6'), 7.22 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.91 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.63 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, *J*=7.5 Hz, anomeric H of glc.), 4.82 (1H, s, anomeric H of rha.), 3.94 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.70~3.43 (sugar H), 1.27 (3H, d, *J*=6.0 Hz, rhamnosyl CH<sub>3</sub>).

**화합물 3** - fraction 1 분획을 MeOH:Water(1:1:3:2)의 비율로 RP18 cc를 실시하여 연노랑색의 분말인 화합물 3 (18 mg)을 얻었다.

pale yellow amorphous powder, TLC : Rf=0.58 (CHCl<sub>3</sub>:

MeOH = 4:1), mp. 250~253°C, Mg/HCl, Zn/HCl test:red, FeCl<sub>3</sub> solution:dark green, FABMS: *m/z* 606 [M-O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, UV λ<sub>max</sub>(MeOH)nm 275, 335; with NaOMe 273, 382; with AlCl<sub>3</sub> 286sh, 299, 353; with AlCl<sub>3</sub> + HCl 285sh, 298, 349; with NaOAc 270, 337sh, 387; with NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 274, 331, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, ppm) δ: 8.05 (2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2' and H-6'), 7.18 (2H, d, *J*=9.0 Hz, H-3' and H-5'), 6.98 (1H, s, H-8), 6.79 (1H, s, H-3), 5.17 (1H, d, *J*=7.5 Hz, anomeric H of glc.), 4.49 (1H, s, anomeric H of rha.), 3.93 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.91 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.85 ~3.42 (sugar H), 1.16 (3H, d, *J*=6.0 Hz, rhamnosyl CH<sub>3</sub>).

**화합물 2, 3의 산 가수분해** - 화합물 2, 3를 TLC에 점적하여 c-HCl chamber에 하루간 방치하여 가수분해 시킨 후 표품당(Aldrich co.)과 Co-TLC를 행하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:water(9:3:1)로 전개시킨 후 aniline phthalate시약으로 발색 시켰으며 그 결과 조성당이 glucose와 rhamnose임을 확인하였다.

**항산화 활성 검색** - 각 분획 및 단일 성분 3 mg을 취해 MeOH로 25 ml로 정용한 후 각각의 농도를 480 μg/4 ml, 320 μg/4 ml, 160 μg/4 ml, 80 μg/4 ml, 40 μg/4 ml, 20 μg/4 ml, 10 μg/4 ml로 희석한 용액 4 ml와 1.5 × 10<sup>-4</sup> M/ml 농도의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액 1 ml씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하였다. 항산화 효과는 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(EC<sub>50</sub>)로 표시하였다.<sup>3)</sup>

## 결과 및 고찰

화합물 1은 황색의 부정형 고체물질로 mp. 198~201°C이고, Mg/HCl, Zn/HCl test와 FeCl<sub>3</sub> solution에 양성반응을 나타내었으며, shift reagent에 의한 UV 흡수 spectrum의 이동을 살펴보면 NaOMe에 의해 band I의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였고, AlCl<sub>3</sub>와 AlCl<sub>3</sub>+HCl에 의해 band I, II의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였으며, NaOAc와 NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>에 의해 band I, II의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였다. 따라서 이 화합물을 flavone계 화합물로 추정하였다.<sup>12)</sup> 이 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum data에서 δ 3.95에서 methoxy peak가 관찰되었으며, δ 6.81과 6.31에 나타나는 두 개의 singlet peak는 A ring의 proton으로, δ 6.81은 H-3으로 δ 6.31은 H-6으로 추정할 수 있었으며, δ 8.06와 7.60에 나타나는 multiplet peak는 ortho, meta coupling을 하는 B ring의 proton으로 δ 8.06은 H-2와 H-6로 δ 7.18은 H-3', H-4와

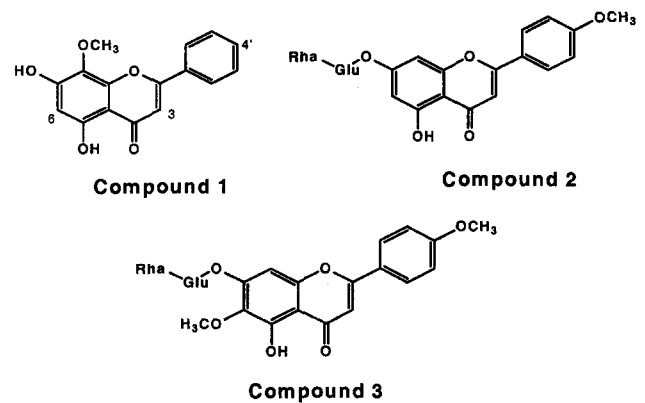
H-5'로 추정할 수 있었다. 또한 Positive FAB-Mass spectrum에서  $[M+1]^+$ 의 peak가  $m/z$  284로 확인되었고, 이상의 결과를 기존 문헌 data<sup>4,6)</sup>와 비교하여 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone 즉 wogonin으로 그 구조를 결정하였다. 화합물 2는 미황색의 부정형 고체물질로 mp. 273–275°C이고, Mg/HCl, Zn/HCl test와 FeCl<sub>3</sub> solution에 양성반응을 나타내었으며, shift reagent에 의한 UV 흡수 spectrum의 이동을 살펴보면 NaOMe에 의해 band I의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였고, AlCl<sub>3</sub>와 AlCl<sub>3</sub>+HCl에 의해 band I, II의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였다. 따라서 이 화합물을 flavone계 화합물로 추정하였다.<sup>14)</sup> 이 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum data에서  $\delta$  3.93에서 methoxy peak가 관찰되었으며,  $\delta$  5.24와  $\delta$  4.82에서 2 mole의 당에 의한 anomeric proton peak가 나타나는데 이 중  $\delta$  5.24는 coupling constant가  $J=7.5$  Hz인 doublet peak로 당이  $\beta$ 결합을 하고 있음을 추정할 수 있었다. 그리고  $\delta$  1.27에서는 coupling constant가  $J=6.0$  Hz인 rhamnosyl CH<sub>3</sub> peak가 관찰되었다. 또한  $\delta$  6.90과 6.63에 나타나는 coupling constant가  $J=2.0$  Hz인 2개의 doublet peak는 meta coupling을 하는 A ring의 proton으로,  $\delta$  6.90은 H-8로  $\delta$  6.63은 H-6으로 추정할 수 있었으며,  $\delta$  8.10과 7.22에 나타나는 coupling constant가 각각  $J=9.0, 8.5$  Hz인 2개의 doublet peak는 ortho coupling을 하는 B ring의 proton으로  $\delta$  8.10은 H-2'와 H-6'로  $\delta$  7.22은 H-3'와 H-5'로 추정할 수 있었다. 그리고  $\delta$  6.91에서 나타나는 coupling constant가  $J=6.0$  Hz인 doublet peak는 C ring의 H-3로 추정할 수 있었다. 또한 Positive FAB-Mass spectrum에서  $[M+CH]^+$ 의 peak가  $m/z$  605로 확인되었다. 또한 TLC를 이용한 산 가수분해 실험에 의해서 aglycone이 glucose와 rhamnose임을 확인하였다. 이상의 결과와 기존 문헌 data<sup>7,9)</sup>를 비교하여 acacetin-7-O- $\beta$ -rutinoside 즉 linarin으로 그 구조를 결정하였다. 화합물 3은 미황색의 부정형 고체물질로 mp. 250–253°C이고, Mg/HCl, Zn/HCl test와 FeCl<sub>3</sub> solution에 양성반응을 나타내었으며, shift reagent에 의한 UV 흡수 spectrum의 이동을 살펴보면 NaOMe에 의해 band I의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였고, AlCl<sub>3</sub>와 AlCl<sub>3</sub>+HCl에 의해 band I, II의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였으며, NaOAc와 NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>에 의해 band I, II의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였다. 따라서 이 화합물을 flavone계 화합물로 추정하였다.<sup>14)</sup> 이 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum data에서  $\delta$  3.93과 3.91에서 두 개의 methoxy peak가 관찰되었으며,  $\delta$  5.17와 4.49에서 2 mole의 당에 의한 anomeric proton peak가 나타나는데 이 중  $\delta$  5.17는 coupling constant가  $J=7.5$  Hz인 doublet peak로 당이  $\beta$ 결합을 하고 있음을 추정할 수 있었다. 그리고  $\delta$  1.16에서는 coupling constant가  $J=6.0$  Hz인 rhamnosyl CH<sub>3</sub>

peak가 관찰되었다. 또한  $\delta$  6.98과 6.79에 나타나는 두 개의 singlet peak는 A ring의 proton으로  $\delta$  6.98은 H-8로  $\delta$  6.79은 H-3으로 추정할 수 있었으며,  $\delta$  8.05와 7.18에 나타나는 coupling constant가  $J=9.0$  Hz인 2개의 doublet peak는 ortho coupling을 하는 B ring의 proton으로  $\delta$  8.05은 H-2'와 H-6'로  $\delta$  7.18은 H-3'와 H-5'로 추정할 수 있었다. 또한 Positive FAB-Mass spectrum에서  $[M-O_2]^+$ 의 peak가  $m/z$  606으로 확인되었고, TLC를 이용한 산 가수분해 실험에 의해서 aglycone이 glucose와 rhamnose임을 확인하였다. 이상의 결과와 기존 문헌 data<sup>7,10-13)</sup>를 비교하여 pectolinarigenin-7-O- $\beta$ -rutinoside 즉 pectolinarin으로 그 구조를 결정하였다. DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성 검색에서는 Table 1에서 보는 바와 같이 항산화 활성을 나타낸 EtOAc 분획(IC<sub>50</sub> = 63.9  $\mu$ g/ml)을 성분분리하여 3종의 플라보노이드 화합물을 분리하였으며, 그중 화합물 1, 2가 항산화 작용을 나타내었다.

**Table 1.** Scavenging effects of flavonoid compounds from *Oryza sativa* L. on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

Sample	IC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> ( $\mu$ g/ml)
MeOH extract	231.5
Hexane fraction	> 480.0
Chloroform fraction	> 480.0
Ethylacetate fraction	63.9
Butanol fraction	98.7
Compound 1	12.5
Compound 2	38.5
Compound 3	73.3
L-ascorbic acid	9.6

<sup>a)</sup>The values indicate 50% decrease of DPPH radical and are the means of triplicate data.



**Fig. 1.** Isolated compounds from the leaves of *Oryza sativa* L.

## 결 론

벼잎의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc분획을 Si cc, Sephadex LH-20 및 RP-18 cc등을 반복 실시하여 3종의 화합물들을 분리하였고, 이화학적 성상과 spectral data를 기초로 하여 그 화학구조를 동정한 결과, 화합물 1은 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone, 화합물 2는 acacetin-7-O- $\beta$ -rutinoside, 화합물 3은 pectolinarigenin-7-O- $\beta$ -rutinoside으로 확인, 동정하였으며, DPPH radical 소거기작에 의한 항산화 활성을 검색한 결과 화합물 1, 2에서 항산화 작용이 나타났다.

## 인용문헌

1. 이창복(1989) 대한식물도감, 107. 향문사, 서울.
2. Perez, R. P., Hamilton, T. C., Ozoles R. F. and Young, R. C. (1993) Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**: 1571-1580.
3. Yoshida, T. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: p1919-1921.
4. M. Goudard, J. F. Bonvin, P. Lebreton et J. Chopin. (1978) Differentiation des Dihydroxy-5,7 methoxy-6 ou 8 Flavones, Flavonols et Methyl-3 Flavonols par Spectrometrie de Masse; *Phytochemistry*, **17**: 145-146.
5. I. Inagaki, S. Hisada and K. Shima. (1971) Studies on the Constituents of Anodendron affine Durce. I. Isolation of Wogonin, Dambonitol, Sucrose and Some Other Components from Stems; *Yakugaku Zasshi*, **91**: 1133-1136.
6. M. Takido, M. Aimi, S. Takahashi, S. Yamanouchi, H. Torii and S. Dohi. (1975) Studies on the Constituents in the Water Extracts of Crude Drugs. I. On the Roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi (Wogon)(1); *Yakugaku Zasshi*, **95**: 108-113.
7. H. B. Lee, J. H. Kwak, O. P. Zee and S. J. Yoo. (1994) Flavonoids from *Circum hinoceros*; *Arch. Pharm. Res.*, **17**: 273-277.
8. J. C. Do, J. Y. Chai and J. K. Son. (1991) Studied on the Constituents of *Lycopus lucidus* (II); *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**: 166-170.
9. V. M. Chari, M. Jordan, H. Wagner and P. W. Thiest. (1977) A 13C-NMR Study of the Structure of an Acyl-linarin from *Valeriana wallichii*; *Phytochemistry*, **16**: 1110-1112.
10. J. C. Do, K. Y. Jung and K. H. Son. (1991) Isolation of Pectolinarin from the Aerial Parts of *Cirsium nipponicum*; *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**: 73-75.
11. C. H. Lin, M. Arisawa, M. Shimizu and N. Morita. (1978) The Constituents of *Cirsium japonicum* D.C. var. *takaoense* Kitamura; *Chem. Pharm. Bull.*, **26**: 2036-2039.
12. T. Nakaoki and N. Morita. (1960) Studies on the Medicinal Resources. XIV. Flavonoids of *Cirsium* Plants (Compositae) in Japan. (2). Components of the Leaves of *Cirsium kagamontanum* Nakai, *C. inundatum* Makino and *C. Matsumurae* Nakai var. *pubescens* Kitamura; *Yakugaku Zasshi*, **80**: 1296-1297.
13. H. Ishida, T. Umino, K. Tsuji and T. Kosuge. (1987) Studies on Antihemorrhagic Substances in Herbs Classified as Hemostatics in Chinese Medicine. VII. On the Antihemorrhagic Principle in *Cirsium Japonicum* DC.; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 861-864.
14. K. R. Markham. (1982) Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London.

(2002년 3월 28일 접수)