

통통마디에서 항산화 물질의 분리 및 동정

박시형* · 김관수

목포대학교 생물산업학부 생약자원전공

(2003년 9월 24일 접수, 2003년 10월 22일 수리)

통통마디(*Salicornia herbacea* L.) MeOH 추출물로부터 2종의 화합물을 분리하고 DPPH 라디칼 소거 반응을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. UV-Vis 흡수 스펙트럼과 MS와 NMR 스펙트럼으로부터 물질 1과 2는 quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside와 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 동정하였다. 분리된 화합물 1과 2의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 1은 quercetin, rutin과 비슷한 활성을 나타내었으며, B-ring의 hydroxyl 그룹이 methoxyl 그룹으로 치환된 화합물 2는 이보다 약한 활성을 나타내었다. 화합물 1과 2는 통통마디에서는 처음으로 분리되어 보고되는 화합물이다.

Key words: 통통마디(*Salicornia herbacea*), flavonoid, DPPH, 항산화

서 론

통통마디(*Salicornia herbacea* L.)는 명아주과(Chenopodiaceae)에 속하는 한해살이 초본 식물로서 칠면초, 나문재, 해홍나물 등과 함께 우리 나라 서해안 갯벌에 군락을 이루고 있는 대표적인 염생식물이다. 잎은 없으며 통통한 가지에 마디가 많이 있어서 통통마디라고 불린다.¹⁾ 통통마디는 염류 농도가 높은 갯벌에서 자라기 때문에 삼투압을 견디기 위해 식물체내에 육상 식물보다 높은 염류를 저장한다. 최근 보고에 의하면 Na 성분 뿐만 아니라 Ca, K, Mg, Fe, Zn 성분들이 통통마디에 고농도로 존재하는 것으로 알려졌다.²⁾ 민간에서는 이러한 성질 때문에 함초(鹹草)라고도 불리며, 식용으로도 사용되어 왔다. 또한 통통마디는 민간 의약적으로 시력저하, 소화불량, 위장병, 간염, 신장병 등에 사용되어 왔으나 약효를 입증할만한 과학적 근거는 없었다. 최근에는 변비 개선 효과 및 다이어트 목적의 기능성 식품으로 개발하려는 시도가 있었다. 통통마디의 약리효과에 관한 연구로는 MeOH 추출물을 실험 동물에 투여했을 때 혈중 콜레스테롤 및 혈중 지질이 감소하였다는 보고가 있다.³⁾ 또한 통통마디 추출물의 항산화 효과에 대한 보고도 있다.⁴⁾ 그러나 이미 보고된 무기성분 및 아미노산 함량에 대한 보고 이외에 통통마디에 포함되어 있는 성분에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 통통마디의 식물 화학적 성분에 관한 연구의 일부로서 통통마디에 포함된 flavonoid 성분을 분리, 동정하였다. 또한 분리된 물질과 더불어 quercetin, rutin을 대상으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 flavonoid 구조와 항산화 활성사이의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에서 사용한 통통마디는 전라남도 무안군

해안가에서 2001년 9월에 채취하여 음건한 후 분쇄하여 사용하였다. 증거 표본은 목포대학교 생약자원전공 식물 표본실에 보관되어있다.

기기 및 시약. 용점은 Mel-Temp(USA)를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. 비선광도는 Autopol III(USA)를 사용하여 측정하였고, UV spectrum은 Beckman DU650 spectrophotometer(Germany)를 사용하였다. Mass spectrum은 Finnigan LCQ(USA)를 사용하여 측정하였고, NMR spectrum은 Bruker Avance 400(Germany)을 이용하여 측정하였다. MPLC는 Eycla(Japan) VSP-3050 펌프와 UV-D2 검출기를 사용하였다. 사용된 용매는 1급 및 특급 시약을 사용하였고, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), quercetin, rutin은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분리. 그늘에서 건조시킨 통통마디 지상부 1.5 kg을 분쇄한 뒤 MeOH 5 l씩 3회에 걸쳐 추출하였다. MeOH 추출액을 감압 농축하여 302 g의 잔류물을 얻었으며 여기에 증류수 1.5 l를 첨가하여 현탁 용액을 만들었다. 물 현탁 용액에 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 1 l씩 첨가하여 극성에 따른 용매 분획을 제조하여 각 분획별로 27.2 g, 4.7 g, 2.4 g, 17.0 g의 조추출물을 얻었다. Ethyl acetate 조추출물(2.4 g)은 C-18 silica gel로 충전된 칼럼(2.5×50 cm)으로 분리하였다. 용매는 H₂O:MeOH(2:1)로 시작하여 MeOH의 함량을 100%까지 증가시켰다. 용출된 물질을 TLC로 확인하여 5개의 분획으로 나누고 이중 2번 분획(0.5 g)을 Sephadex LH-20 칼럼(2×100 cm)을 이용하여 분리하였다. 용매는 MeOH 단일 용매계를 사용하였다. 용출된 분획을 TLC하여 UV 254 nm에서 형광을 나타내는 분획 중 일부(50 mg)를 모아서 MPLC로 분리하여 화합물 1(25 mg)과 2(20 mg)를 얻었다. 용매의 유속을 5 ml/min으로 하였을 때, 화합물 1은 75분에 용출되었고 화합물 2는 60분에 용출되었다. MPLC에 사용된 칼럼은 1.0×30 cm였으며, 용매는 H₂O:MeOH(3:2)였고, 충전제는 YMC-gel ODS-A(75 μ m, pore size 12 nm, Japan)이었다.

Free radical 소거 활성 측정. 각 화합물들의 free radical

*연락처

Phone: 82-61-450-2662; Fax: 82-61-450-6443

E-mail: shp@mokpo.ac.kr

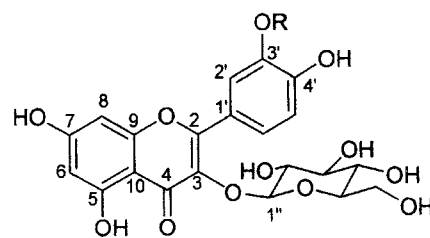
소거 활성은 DPPH 방법으로 측정하였다.⁵⁾ DPPH를 MeOH에 녹여 만든 0.1 mM 용액에 1 mM 농도의 측정할 시료를 넣어 3 mL로 만든 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 최종농도는 5, 10, 50, 100 μM이 되도록 하였으며, 30초 간격으로 흡광도를 측정하여 20분까지 측정하였다.

구조동정. Quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside(1): yellow solid; mp. 231-233°C; $[\alpha]_D^{25} -10.5^\circ$ (c=0.05, MeOH); IR v (KBr, cm^{-1}): 3400, 1660, 1600, 1495, 1360, 1300, 1200; LC-MS m/z (ESI, rel. int.): 487([M+Na]⁺, 100), 457(25), 429(45), 385(54), 303(38); ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.58(1H, d, J=8.8Hz, H-6'), 7.57(1H, s, H-2'), 6.83(1H, d, J=8.8Hz, H-5'), 6.39(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.19(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.45(1H, d, J=6.8Hz, H-1''), 3.58(1H, dd, J=5.5, 11.7Hz, Ha-6''), 3.30(1H, m, Hb-6''), 3.22(2H, m, H-2'',3''), 3.18(2H, m, H-4'',5''); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ: 177.3(C-4), 164.1(C-7), 161.2(C-5), 156.4(C-2), 156.1(C-9), 148.5(C-3'), 144.9(C-4'), 133.3(C-3), 121.6(C-6'), 121.1(C-1'), 116.1(C-2'), 115.2(C-5'), 103.7(C-10), 100.9(C-1''), 98.8(C-6), 93.6(C-8), 77.6(C-5''), 76.5(C-3''), 74.1(C-2''), 69.9(C-4''), 61.0(C-6'')

Isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside(2): yellow solid; mp. 179°C; $[\alpha]_D^{25} -21.5^\circ$ (c=0.02, MeOH); IR v (KBr, cm^{-1}): 3600, 1650, 1600, 1500, 1440, 1360, 1080; LC-MS m/z (ESI, rel. int.): 501([M+Na]⁺, 90), 479(15), 429(15), 385(10), 317(100); ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 7.95(1H, s, H-2'), 7.50(1H, d, J=8.4Hz, H-6'), 6.92(1H, d, J=8.4Hz, H-5'), 6.45(1H, d, J=1.9Hz, H-8), 6.21(1H, d, J=1.9Hz, H-6), 5.57(1H, d, J=7.0Hz, H-1''), 3.84(3H, s, -OCH₃), 3.59(1H, dd, J=5.5, 11.7Hz, Ha-6''), 3.38(1H, m, Hb-6''), 3.22(2H, m, H-2'',3''), 3.11(2H, m, H-4'',5''); ¹³C-NMR(100MHz, DMSO-d₆) δ: 177.4(C-4), 164.2(C-7), 161.2(C-5), 156.4(C-2), 156.3(C-9), 149.4(C-4'), 146.9(C-3'), 132.9(C-3), 122.0(C-6'), 121.1(C-1'), 115.2(C-5'), 113.5(C-2'), 104.1(C-10), 100.8(C-1''), 98.7(C-6), 93.7(C-8), 77.5(C-5''), 76.4(C-3''), 74.3(C-2''), 69.8(C-4''), 60.6(C-6''), 55.7(-OCH₃)

결과 및 고찰

구조분석. 화합물 1, 2의 구조는 UV-Vis 스펙트럼, 질량 분석, NMR 스펙트럼을 이용하여 분석하였다. 화합물 1은 TLC 결과 노란색을 나타내었으며, 254 nm 자외선 하에서 형광을 나타내었다. 이 결과로 화합물 1을 flavonoid 계열 화합물로 추정하고 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 화합물 1을 MeOH에 녹인 후 흡수 스펙트럼을 측정한 결과, 257 nm(band I)와



1 : R = H
2 : R = CH₃

Fig. 1. Chemical structures of the flavonol glycoside from *Salicornia herbacea* L.

357 nm(band II)에서 최대 흡광도를 보이는 전형적인 flavonol의 흡수 스펙트럼을 보였다(Table 1). Band II가 quercetin의 373 nm보다 16 nm 감소한 357 nm에서 나타났는데 이는 3-OH 위치에 치환기가 부착되어있음을 의미한다. 화합물 1의 다른 수산기에 치환기가 부착되어 있는지를 알아보기 위해 NaOH, AlCl₃, NaOAc, NaOAc와 H₃BO₃ 혼합물을 각각 첨가하여 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 이 결과 band I과 band II가 각각 고유의 파장만큼 이동되는 것으로 나타나 다른 수산기에는 치환기가 없는 것으로 결론 지었다. 화합물 1의 분자량은 LC-MS를 이용하여 측정하였다. 질량 분석 결과 가장 큰 m/z 값은 487로 나타났으며, 이를 [M+Na]⁺로 생각하여 분자량을 464로 추정하였으며, NMR 측정에서 나타난 결과와 종합하여 화학식을 C₂₁H₂₀O₁₂로 결정하였다. 화합물 1의 정확한 분자 구조를 확인하기 위하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC 실험을 수행하였다. ¹³C-NMR에서는 전형적인 flavonol의 탄소 신호가 나타났으며, 1개의 6탄당 탄소 신호도 함께 나타났다. Anomeric 탄소 신호가 나타난 δ100.9 및 δ77.6, 76.5, 74.1, 69.9, 61.0의 탄소 신호는 D-glucopyranose로 결정되었다. ¹H-NMR에서 6탄당의 anomeric 수소의 신호는 δ5.45에서 나타났으며, coupling constant가 6.8 Hz인 doublet인 것으로 보아 β 형태로 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 ¹H-NMR에서는 특징적인 singlet 1개(δ7.57), 인접한 수소의 coupling에 의한 doublet 2개(δ7.58, δ6.83, J=8.8Hz), long range coupling에 의한 doublet 2개(δ6.39, δ6.19, J=2.0Hz)가 나타났다. 이 결과는 aglycone 부분이 quercetin임을 의미한다. 이상의 결과로부터 화합물 1의 구조는 quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside로 결정되었다(Fig. 1).

화합물 2도 TLC 패턴과 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 분석한 결과 flavonol glycoside로 추정되었다. 화합물 2의 UV-Vis 흡수 band II는 356 nm로서 화합물 1과 동일하게 3-OH에 치환기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. NaOH, AlCl₃, NaOAc를 각각 첨가하여 흡수 스펙트럼을 측정하였을 때도 band II의 이동이

Table 1. Effect of shift reagents on UV absorption spectra of flavonoid

Flavonoid	Peak wavelength (nm)				
	MeOH	MeOH+NaOH	MeOH+AlCl ₃	MeOH+NaOAc	MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃
Compound 1	257, 357	270, 406	271, 426	268, 375	261, 379
Compound 2	254, 356	271, 411	268, 402	273, 371	254, 356

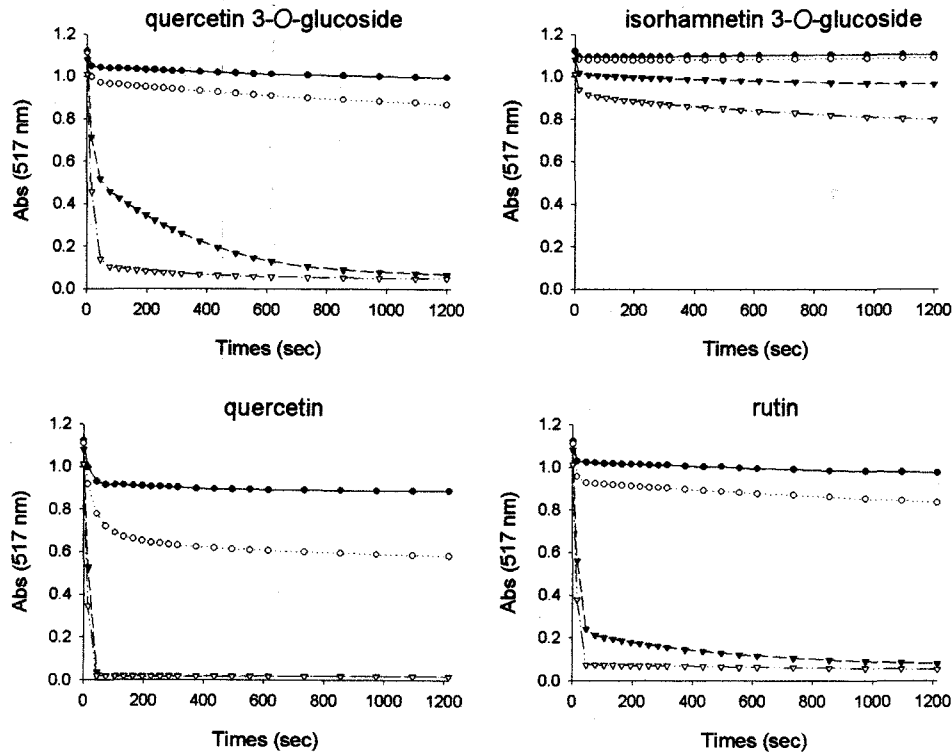


Fig. 2. Radical scavenging of DPPH by quercetin 3-*O*-glucoside (1), isorhamnetin 3-*O*-glucoside (2), quercetin and rutin, 5 μ M (closed circle), 10 μ M (open circle), 50 μ M (closed triangle) and 100 μ M (open triangle).

나타나 5, 7, 4' 위치의 수산기에 치환기가 결합하고 있지 않음을 알 수 있었다. 그러나 NaOAc와 H_3BO_3 를 동시에 첨가하고 흡수 스펙트럼을 측정된 결과에서는 최대 흡광도가 254 nm (band I)와 356 nm (band II)에서 나타나 흡수 band의 이동이 나타나지 않았다 (Table 1). 이 결과는 3', 4'-OH 중 한곳에 치환기가 결합되어 있다는 것을 의미하며, NaOH 첨가시 band II가 이동한 결과(356 nm \rightarrow 411 nm)를 함께 고려할 때 3'-OH 위치에 치환기가 존재함을 의미한다. 화합물 2를 LC-MS로 분석한 결과 m/z 501에서 $[M+Na]^+$ 신호가 나타났으며, 이 결과로 분자량을 478로 결정하였다. 이 값은 화합물 1보다 14가 큰 값으로 화합물 2는 화합물 1의 hydroxyl 그룹 대신에 methoxyl 그룹이 1개 도입된 것으로 추정하였다. 이상의 결과로부터 화합물 2는 3-OH와 3'-OH 위치에 당 또는 methoxyl 그룹이 각각 결합된 것으로 생각되었으며, 정확한 구조를 결정하기 위해 NMR 스펙트럼을 측정하였다. 1H -NMR과 ^{13}C -NMR 결과는 화합물 1과 유사한 패턴을 보였으나, 추가적으로 methoxyl 그룹의 존재(1H -NMR: δ 3.84, ^{13}C -NMR: δ 55.7)를 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR에 나타난 6탄당의 신호는 화합물 1에서 나타난 신호와 동일하였으며, 1H -NMR에 나타난 anomeric 수소(δ 5.57)의 coupling constant도 7.0 Hz인 것으로 나타나 β -D-glucopyranose가 결합된 flavonoid인 것으로 생각되었다. HMBC 스펙트럼에서 C-3(δ 132.9)와 당의 anomeric 수소 H-1"가 상관관계를 나타낸 것은 당이 3-OH 위치에 치환된 것을 의미한다. 또한 C-3'(δ 146.9)는 methoxyl 그룹의 수소(δ 3.84)와 상관관계를 나타내어 methoxyl 그룹이 3'-OH에 치환되어 있음을 증명하였다. 이상의 결과 화합물 2는 quercetin의 3-OH에 glucose가

결합되어 있고 3'-OH이 methoxyl 그룹으로 치환된 isorhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside로 결정되었다 (Fig. 1).

항산화 활성. DPPH 라디칼을 이용하여 통통마디에서 분리된 flavonoid와 시판되는 flavonoid인 quercetin과 rutin의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 시험 대상인 flavonoid가 없는 상태에서 DPPH 용액의 흡광도는 실험 기간동안(60분 이상) 변하지 않았다. DPPH 용액에 flavonoid를 첨가하자 흡광도(517 nm)가 급격히 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2). 당이 결합하지 않은 flavonol 구조를 가진 quercetin을 첨가하였을 때 흡광도가 가장 급격히 감소하였으며, 이러한 경향은 농도 의존적으로 나타났다. Quercetin의 최종 농도가 100, 50 μ M인 경우에는 1분 이내에 흡광도는 최저점에 도달하였다. Quercetin의 3-OH 위치에 glucose 1분자가 치환된 화합물 1과 glucose와 rhamnose가 치환된 rutin의 경우 100 μ M 농도에서는 quercetin과 비슷한 경향을 보였으나, 50 μ M 이하에서는 quercetin 보다 라디칼 소거 능력이 약한 것으로 나타났다. 화합물 2의 경우에는 다른 3종의 flavonoid와는 확연히 다른 흡광도 변화 패턴을 보였다. 화합물 2는 시험대상인 다른 flavonoid와 달리 flavonoid B-ring의 3'-OH 위치가 methoxyl 그룹으로 치환된 구조를 가지는데, 100 μ M 농도에서도 quercetin 10 μ M 농도보다 라디칼 소거 능력이 약하게 나타났다. 이러한 경향은 반응시간을 길게 하여도 동일하게 나타나서 2시간 이상 반응시킨 후에도 흡광도가 0.6 이하로 감소하지 않았다 (결과 미제시).

이상의 결과를 종합하면 flavonoid가 DPPH 라디칼을 소거시키는 활성은 치환기의 위치에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다. Flavonol 구조를 가진 quercetin이 가장 강력한 라디칼 소거

참고문헌

활성을 나타내며, flavonol의 3번 위치에 당이 결합한 glycoside는 이 보다 조금 약한 활성을 보인다. 이때 당의 종류는 라디칼 소거 활성에 큰 영향을 미치지 않는다. 그러나 flavonoid B-ring에 methoxyl 그룹이 결합할 경우에는 라디칼 소거 활성이 급격히 감소하는 경향을 보인다.

Day 등은 quercetin glucuronide를 이용하여 flavonoid 구조와 생물활성 사이의 상관관계에 관한 연구를 수행한바 있다.⁶⁾ Day 등의 보고에서는 quercetin의 3, 7, 3', 4'-OH에 각각 glucuronic acid가 치환된 flavonoid로 xanthine oxidase와 lipoxygenase 활성 저해 효과를 시험하였다. 이 결과에서는 B-ring의 3' 또는 4'-OH 위치에 glucuronic acid가 존재할 때 quercetin과 비슷한 효소 저해 활성이 나타났으며, 3 또는 7-OH 위치에 치환기가 존재할 때는 효소 저해 활성이 낮게 나타났다. 이 결과는 본 연구에서 수행한 DPPH 라디칼 소거 활성과는 반대의 상관 관계를 보여준다.

감사의 글

본 연구는 2001학년도 목포대학교 연구소 학술연구비 지원 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

1. Lee, T. B. (1989) In *Illustrated Flora of Korea*. (4th ed.) Hyang Mun Sa, Seoul.
2. Min, J. G., Lee, D. S., Kim, T. J., Park, J. H., Cho and T. Y., Park, D. I. (2002) Chemical composition of *Salicornia herbacea* L. *J. Food Sci. Nutr.* **7**, 105-107.
3. Jo, Y. C., Ahn, J. H., Chon, S. M., Lee, K. S., Bae, T. J. and Kang, D. S. (2002) Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J. Med. Crop Sci.* **10**, 93-99.
4. Min, J. G., Son, K. T., Kim, J. H., Kim, T. J. and Park, J. H. (2002) Physiological and functional properties of *Salicornia herbacea* leaf extracts. *Nutraceut. Food* **7**, 261-264.
5. Dufall, K. G., Ngadjui, B. T., Simeon, K. F., Abegaz, B. M and Croft, K. D. (2003) Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the west african medicinal plant *Dorstenia mannii*. *J. Ethnopharmacol.* **87**, 67-72.
6. Day, A. J., Bao, Y., Morgan, R. A. and Williamson, G. (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effects on biological activity. *Free Rad. Biol. Med.* **29**, 1234-1243.

Isolation and Identification of Antioxidant Flavonoids from *Salicornia herbacea* L.

Si-Hyung Park* and Kwan-Su Kim (*School of Biotechnology and Resources, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea*)

Abstract: Two flavonoids were isolated from the aerial parts of *Salicornia herbacea* L. by column chromatography. The structures of the flavonoid compound **1** and **2** were identified as quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside and isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside, respectively. The antioxidant activity of compound **1** was similar to those of quercetin and rutin, and the activity of compound **2**, which contained methoxyl group at flavonoid B-ring, was lower than that of compound **1**. The two compounds **1** and **2** were the first to be reported in this plant.

Key words: *Salicornia herbacea*, flavonoid, DPPH, antioxidant

*Corresponding author