

연자육으로부터 식물호르몬 Dihydrophaseic Acid의 분리 및 동정

서지희 · 최연희 · 유미영 · 홍경식 · 이병희 · 연구환 · 김영섭 · 김영균¹ · 유시용*

한국화학연구원 생약화학연구실, ¹국민대학교 삼림과학대학

Isolation of Dihydrophaseic Acid from Seed Extract of *Nelumbo nucifera*

Jee Hee Seo, Yeon Hee Choi, Mi Young Yoo, Kyung-Sik Hong, Byung Hoi Lee,

Gyu Hwan Yon, Young Sup Kim, Young-Kyoon Kim¹ and Shi Yong Ryu*

Phytochemistry Research Lab, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

¹College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract – Phytochemical investigation of the seed extract of *Nelumbo nucifera* Gaerth (Nymphaeaceae) resulted in the isolation of a plant hormone, dihydrophaseic acid (**1**), a abscisic acid derivative. The chemical structure of **1** was elucidated by 2D-NMR spectroscopic analysis, COSY, DEPT, HMQC and HMBC.

Key words – *Nelumbo nucifera* Gaerth, Nymphaeaceae, abscisic acid, dihydrophaseic acid

연자육 (蓮子肉)은 수련과 (Nymphaeaceae)에 속하는 다년생 수생식물 연꽃 (*Nelumbo nucifera* Gaertner)의 성숙한 열매의 껍데기 부분을 제거한 종자로서 연밥 혹은 연자 (蓮子)로 불리우며 예부터 한방 및 민간에서 약재 혹은 식용으로 널리 사용되어져왔다. 연꽃은 사용부위에 따라 명칭을 달리하는데 잎은 하엽 (荷葉), 뿌리는 우절 (藕節), 과방 (果房)은 연방 (蓮房), 암술을 연수, 종자 안의 녹색 배아를 연자심 (蓮子心)이라 한다.¹⁾ 연자육은 한방에서 주로 지혈, 어혈제거, 해혈, 토혈, 혈뇨, 혈변을 치료하는데 사용되고 있으며,²⁾ 지사,³⁾ 이뇨,⁴⁾ 해열,⁵⁾ 항균⁶⁻⁸⁾ 및 항당뇨,⁹⁾ 항산화효능¹⁰⁻¹³⁾ 등의 효능이 보고되고 있다.

지금까지 보고된 연자육 (蓮子肉)에 대한 성분연구로는 주로 alkaloid성분에 대한 연구가 집중적으로 행하여졌으며 nuciferine, *N*-normuciferine, *O*-normuciferine, roemerine 등의 aporphine계 alkaloid¹⁴⁾와 liensinine, isoliensinine, neferine 등의 phenolic alkaloid¹⁵⁾ 및 (+)-1(R)-coclaurine, (-)-1(S)-norcoclaurine 등 benzylisoquinoline alkaloid¹⁶⁾ 성분들이 보고되고 있다. 그밖에 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, quercetin, kaempferol 등의 flavonoid 화합물¹⁷⁾ 및 tryptophan, aspapagin, tyrosine 등 amino acid 성분 등이 보고되고 있다.

한편 저자 등은 연자육의 MeOH 추출물의 주요 약리활

성성분으로 주목받고 있는 각종 alkaloid 성분들을 확보하고자 추출물의 대량분리정제를 수행하던 중 지금까지 본 식물 추출물로부터 분리 보고된 바 없는 abscisic acid 계 식물호르몬 dihydrophaseic acid (**1**)의 분리에 성공하였기에 간략히 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기 – 본 연구에 사용된 시약은 모두 특급(GR) 및 1급(EP)급 시약을 사용하였다. 용접은 Haakebuchler 미량용점 측정기를 이용하여 측정하였으며 측정치는 따로 보정하지 아니하였다. UV-VIS측정은 Shimadzu UV-265를 사용하였고 선광도는 JASCO DIP-4 digital polarimeter를 사용하였으며 Low resolution MS (70 eV)는 JEOL사의 JMS-DX 303 mass spectrometer, 각종 proton 및 carbon NMR spectra는 Bruker의 AM-300 및 AMX-500을 이용하여 측정하였다. 특별히 기재하지 않은 한, 사용한 용매의 peak를 기준 peak로 사용하여 chemical shift치를 정하였으며 δ (ppm)으로 표시하였다. Column chromatography는 silica gel (70-230 mesh, Merck), Lichroprep RP-18 (40-63 μ , Merck)를 사용하였다.

실험재료 – 본 실험에 사용된 연자육은 2005년 3월 대전광역시 소재 한약재시장에서 구입하여 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 한국화학연구원에 보관되어 있다.

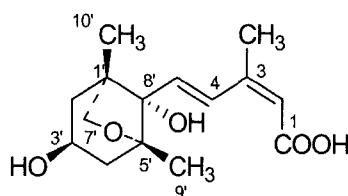
*교신저자(E-mail) : syryu@kricf.re.kr
(FAX) : 042-860-7160

추출 및 분리 – 잘 건조된 연자육 12 kg을 MeOH에 7일 간 냉침시킨 후 감압 농축하여 methanol (MeOH) extract 1500 g을 얻었다. 이 MeOH extract를 증류수 20 L에 현탁시킨 후 methylene chloride (MC), ethylacetate (EtOAc) 및 *n*-butanol (BuOH)의 순으로 단계적으로 추출한 결과 MC 분획 24.0 g, EtOAc 분획 2.2 g 및 BuOH 분획 30.1 g을 얻었다. BuOH 분획 30.1 g을 RP-18 column chromatography (MeOH/H₂O = 0~50%, MeOH)를 실시하여 6개의 분획 (M1~M6)으로 나누었으며 이중 M4 (800 mg) 분획을 재차 30% MeOH/H₂O를 유출 용매로 사용하여 MCI column chromatography를 수행하여 네 개의 소분획 (M41~M44)으로 나누었다. 이 중 소분획 M42 (430 mg)을 silica gel column chromatography (MC:MeOH=10:1~5:1)를 시행하여 무색 무정형분말 (화합물 1) 32 mg을 얻었다.

화합물 1 – amorphous powder; C₁₅H₂₂O₅; UV (MeOH), 259 nm (ϵ 15500); $[\alpha]_D^{20}$: -1009.4 (c 1.0, MeOH), EI-MS (m/z 282 [M]⁺ (15%), 206 (100%), 192 (55%); ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HMBC data (see Table I).

결과 및 고찰

화합물 1은 백색 무정형 분말로서, EI-MS ([M]⁺, 282) 및 ¹H-NMR, ¹³C-NMR data를 통해 분자식을 C₁₅H₂₂O₅으로 추정할 수 있었다. 또, δ 5.78, δ 6.47 및 δ 7.94 ppm에서 나타난 3개의 olefinic proton signal 들의 coupling pattern 및 258 nm에서 흡수극대치를 나타내는 UV spectrum 정보를 통하여 화합물 1은 conjugated dienone 부분구조를 가지고 있음을 예측할 수 있었다. 한편 화합물 1의 ¹³C-NMR spectrum



dihydrophaseic acid (1)

Table I. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT-NMR, and ^{2,3}J-HC long-range correlations for compound 1 in MeOH-d₄

Position	C	DEPT	H	HMBC (H→C)
1	170.8	C		
2	121.0	CH	5.78 (s)	C-6, C-4
3	149.7	C		
4	132.2	CH	7.94 (d, $J=16$ Hz)	C-3, C-2, C-8', C-6, C-5
5	134.4	CH	6.47 (d, $J=16$ Hz)	C-3, C-4, C-8'
6	21.3	CH ₃	2.06 (s)	C-3, C-4, C-2
1'	49.9	C		
2'ax	44.7	CH ₂	1.85 (ddd, $J=13.5, 7.0, 2.0$ Hz)	C-8', C-3', C-1', C-4', C-10'
2'eq			1.66 (ddd, $J=13.5, 11.0, 2.0$ Hz)	C-1', C-3'
3'	66.3	CH	4.11 (m)	
4'ax	46.2	CH ₂	2.04 (ddd, $J=13.5, 7.0, 2.0$ Hz)	C-5', C-8', C-3', C-2', C-9'
4'eq			1.74 (dd, $J=13.5, 10.5$ Hz)	C-3'
5'	87.9	C		
7'ax	77.4	CH ₂	3.81 (dd, $J=7.0, 2.0$ Hz)	C-3, C-1', C-2', C-10'
7'eq			3.71 (d, $J=7.0$ Hz)	C-2', C-8', C-5'
8'	83.4	C		
9'	19.8	CH ₃	1.15 (s)	C-4', C-3', C-8', C-5'
10'	16.5	CH ₃	0.93 (s)	C-2', C-1', C-3', C-7', C-8'

에서는 3개의 methyl (δ 16.5, 19.8, 21.4 ppm), 3개의 methylene (δ 44.7, 46.1, 77.4 ppm) 및 4개의 methine carbon signal (δ 121, 132.2, 134.4, 66.3 ppm)과 5개의 quaternary carbon signal (δ 170.8, 149.7, 49.9, 87.9, 83.4 ppm)이 관찰되었으며 이 중 δ 83.4 및 δ 87.9 ppm의 carbon signal로부터 2개의 tertiary alcohol 혹은 ether 부분구조가 존재함을 추정할 수 있었다. 이와 같은 정보를 기반으로 하여 HMQC 및 HMBC spectrum 등 화합물 1의 NMR spectrum을 면밀히 검토하여 화합물 1의 화학구조를 결정하였으며 아울러 화합물 1의 모든 proton 및 carbon signal을 전부 해석할 수 있었으며 그 결과를 Table I에 정리하였다. 화합물 1의 화학구조는 식물호르몬의 일종인 abscisic acid의 대사산물로 알려진 dihydrophaseic acid로 최종 확인, 동정하였다.¹⁸⁾

Abscisic acid (ABA)는 탄소 15개인 sesquiterpene 계 화합물로서 식물 성장에 결정적으로 영향을 미치는 식물호르몬의 일종으로 알려져 있다. 현재까지 식물호르몬으로 인정받고 있는 화합물로는 auxin류, gibberellin류, cytokinin류, ethylene 및 abscisic acid 계 속하는 화합물들이 있으며 이 중 abscisic acid계 화합물들은 주로 식물의 발아촉진, 발근촉진, 줄기신장 촉진, 과실의 성장 등을 관장하고 있는 auxin, gibberellin, cytokinin, ethylene 등의 식물호르몬과는 달리 탈리현상 촉진, 휴면야기, 수분증산 방지 (기공폐쇄) 노화촉진, 낙엽촉진 등을 유발하므로써 auxin, gibberellin류의 식물 성장 호르몬에 대한 길항작용을 나타내며 냉해, 한해, 염해 (salt stress)와 같은 환경적인 스트레스가 증가 될수록 abscisic acid (ABA)의 함량도 증가된다고 알려져 있다.^{19,20)} 지금까지 보고된 abscisic acid계 화합물로는 abscisic acid (ABA)를 비롯하여 trans-abscisic acid, phaseic acid, xanthoxin, dihydrophaseic acid 등이 알려져 있으며 abscisic acid (ABA)를 제외한 나머지 abscisic acid계 화합물들은 모두 abscisic acid (ABA)의 대사산물로 알려져 있다. 한편, dihydrophaseic acid는 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*),²¹⁾ 옥수수 (*Zea mays*),²²⁾ 아보카도 (avocado seeds),²³⁾ 시금치 (*Spinacia oleracea*),²⁴⁾ 동부 (*Vigna unguiculata*),²⁵⁾ 배나무 (*Pyrus communis*),²⁶⁾ 유채 (*Brassica napus* cv.)²⁷⁾ 등의 식물로부터 추출 분리된 바 있으며 *Vigna unguiculata* 의 종자 등으로부터 GC-MS 혹은 LC-ESI-MS-MS 등을 통하여 그 존재가 확인된 바 있으나 아직껏 연자육 혹은 연꽃으로부터 분리된 사례는 보고된 바 없다. 또, 본 화합물의 화학구조를 동정하고자 문헌 검색을 수행하여 본 결과 dihydrophaseic acid의 NMR data 등 구체적인 spectral data 정보를 찾아볼 수가 없었다. 본보에서는 연자육의 MeOH 추출물로부터 분리 정제한 dihydrophaseic acid의 COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC spectrum 등 2D NMR spectral data를 종합 검토하여 화합물의 모든 proton 및 carbon 정보를 full assign하였다.

사 사

이 연구는 과학기술부 나노바이오 연구사업 및 농촌진흥청 바이오그린 21 연구사업의 연구비 지원을 받아 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다

인용문헌

1. 안덕균 (1999) Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs, 684 교학사.
2. Bensky, D., Gamble, A. (1993) Chinese Herbal Medicine; Materia Medica revised edition, Eastland press, 262.
3. Mukherjee, P. K., Das, J., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M. and Saha, B. P. (1995) Antidiarrhoeal evaluation of *Nelumbo nucifera* rhizome extract. *Indian Journal of Pharmacology*. **27**: 262-364.
4. Mukherjee, P. K., Das, J., Saha, K., Pal, M. and Saha, B. P. (1996) Diuretic activity of the rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Phytotherapy Research*. **10**: 424-425.
5. Mukherjee, P. K., Saha, K., Das, J., Pal, M. and Saha, B. P. (1996) Antipyretic activity of *Nelumbo nucifera* rhizome extract. *Indian Journal of Experimental Biology*. **32**: 274-276.
6. Mukherjee, P. K. (2002) Quality control of Herbal Drugs- An Approach to Evaluation of Botanicals, 1st ed. Business Horizons, New Delhi, India. 604-608.
7. Mukherjee, P. K., Giri, S. N., Saha, K., Pal, M. and Saha, B. P. (1995) Antifungal screening of *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian Journal of Microbiology*. **35**: 327-330.
8. Mukherjee, P. K., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M. and Saha, B. P. (1995) Antibacterial efficiency of *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian Drugs*. **32**: 274-276.
9. Mukherjee, P. K., Pal, S. R., Saha, K. and Saha, B. P. (1995) Hypoglycemic activity of *Nelumbo nucifera* rhizome (methanolic extract) in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*. **9**: 522-524.
10. Wu, M. J., Weng C. Y. and Yen, J. H. (2003) Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *The American Journal of Chinese Medicine*. **31**: 687-398.
11. Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. C. (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*. **10**: 544-551.
12. Hu, M. and Skibsted, L. H. (2002) Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry*. **76**: 327-333.
13. Jung, H. A., Kim, J. E., Chung, H. Y. and Choi, J. S. (2003)

- Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 279-285.
14. Luo, X., Yao, S. *et al.* (2005) Simultaneous analysis of N-normuciferine, O-normuciferine, nuciferine, and roemerine in leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* **538**: 129-133.
 15. Wu, S., Pan, Y. *et al.* (2004) Preparative counter-current chromatography isolation of liensinine and its analogues from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn using upright coil planet centrifuge with four multilayer coil connected in series. *J. Chromatogr A.* **1041**: 153-162.
 16. Kashiwada, Y., Aoshima, A., Ikeshiro, Y., Chen, Y. P., Furukawa, H., Itoigawa, M., Fujioka, T., Mihashi, K., Cosentino, L. M., Morris-Natschke, S. L. and Lee, K. H. (2005) Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 443-448.
 17. Kim, J. S., Cho, S. M., Kim, J. H. and Lee, M. W. (2001) Phenolic compounds from the Node of Lotus Rhizome. *Yakhak Hoeji.* **45**: 599-603.
 18. Hirai, N. and Koshimizu, K. (1983) A New Conjugate of Dihydrophaseic acid from Avocado Fruit. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 365-371.
 19. Hirai, N., Kondo, S. and Ohigashi, H. (2003) Deuterium-labeled Phaseic acid and Dihydrophaseic acid acids for internal standards. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2408-2415.
 20. Zaharia, L. I., L., Galka, M. M., Ambrose, S. J. and Ambrams, S. R. (2005) Preparation of deuterated abscisic acid metabolites for use in mass spectrometry and feeding studies. *J. Label Compd Radiopharm.* **48**: 435-445.
 21. Zeevaart, J. A. D. and Milborrow, B. V. (1976) Metabolism of abscisic acid and the occurrence of *epi*-dihydrophaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry.* **15**: 493-500.
 22. Hedden, P., Phinney, B. O., Heupel, R., Fujii, D., Cohen, H., Gaskin, P., Macmillan, J. and Graebe, J. E. (1982) Hormones of young tassels of *Zea mays*. *Phytochemistry.* **21**: 391-393.
 23. Ramos, D., Jerz, G., Villanueva, S., López-Dellamary, F., Waibel, R. and Winterhalter, P. (2004) Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). *Phytochemistry.* **65**: 955-962.
 24. Hartung, W., Gimmler, H., Heilmann, B. and Kaiser, G. (1980) The site of abscisic acid metabolism in mesophyll cells of *Spinacia oleracea*. *Plant Science Letters.* **18**: 359-364.
 25. Adesomoju, A. A., Okogun, J. I., Ekong, D. E. U. and Gaskin, P. (1980) GC-MS identification of abscisic acid and abscisic acid metabolites in seed of *Vigna unguiculata*. *Phytochemistry.* **19**: 223-225.
 26. Martin, G. C., Dennis Jr, F. G., Gaskin, P. and Macmillan, J. (1977) Identification of gibberellins A₁₇, A₂₅, A₄₅, abscisic acid, phaseic acid, and dihydrophaseic acid in seeds of *Pyrus communis*. *Phytochemistry.* **16**: 605-607.
 27. Zhou, R., Squires, T. M., Ambrose, S. J., Abrams, S. R., Ross, A. R. and Cutler, A. J. (2003) Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* **1010**: 75-85.

(2006년 10월 2일 접수)