

연잎에서 DPPH 라디칼 소거활성을 가지는 페놀성 화합물의 분리

박찬흠 · 허종문 · 송경식¹ · 박종철*

국립순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소, ¹경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Phenolic Compounds from the Leaves of *Nelumbo nucifera* Showing DPPH Radical Scavenging Effect

Chan Hum Park, Jong Moon Hur, Kyong Sik Song¹, and Jong Cheol Park*

Department of Oriental Medicine Resources and Research Institute of Korean Oriental Medicine, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Republic of Korea

¹Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

Abstract – *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) has been widely used in a traditional oriental medicine to treat bleeding, fever, diarrhea, hemorrhoid, sunstroke, dysentery and dizziness. The leaves of this plant were refluxed with methanol, and then fractionated with organic solvents to screen the antioxidant activity using DPPH radical. Ethyl acetate and *n*-butanol fractions showed good DPPH radical scavenging effects and were carried out column chromatographies to isolate nine compounds. Their chemical structures were characterized as *p*-hydroxybenzoic acid (1), uracil (2), luteolin (3), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (4), rhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (5), isorhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (6), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (7), quercetin 3-*O*- β -D-xylofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (8), and adenine (9) by comparison NMR spectral data and with those in references. Compounds 1, 2, 5 and 9 were firstly isolated from this plant. Compounds 1, 3 and 4 showed potent DPPH radical scavenging activity. Especially, compound 3, luteolin showed the higher effect than ascorbic acid used as a positive control.

Key words – *Nelumbo nucifera*, flavonoid, luteolin, DPPH

다양한 요인에 의해 생성된 free radical이 세포의 성분이나 세포막에 다량 존재하는 불포화 지방산에 작용하여 세포막의 손상이나 세포괴사 등의 독성을 유발한다.¹⁾ 이러한 free radical에 의한 손상으로부터 인체를 보호할 수 있는 내인성 방어계로 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소와 ceruloplasmin, latoferrin, transferrin, albumin, α -tocopherol, ascorbic acid, uric acid, bilirubin 등의 비효소계 항산화 물질이 생체에 존재하고 있다.²⁻⁴⁾ 그러나 어떤 원인에 의해 조직의 free radical 제거계의 활성이 저하되거나 free radical 생성계의 촉진으로 이들 간의 균형이 깨어졌을 때 조직손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등이 발생한다. 항산화제는 경제성 등의 이유로 합성 항산화제가 널리 사용되고 있으나, 발암 가능성이 제기되면서 천연항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다.^{5,6)} 식물에 함

유된 flavonoid, carotenoid 등의 천연 항산화 물질은 free radical로 인한 각종 암과 노화를 비롯한 많은 성인병의 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 밝혀짐에 따라 식용 및 약용식물을 대상으로 활발한 항산화 활성 탐색이 진행되고 있다.

국내에 자생하는 수련과 (Nymphaeaceae)의 다년생 수생 초본으로는 순채 (*Brasenia schreberi*), 개연꽃 (*Nuphar japonicum*), 왜개연꽃 (*Nuphar pumilum*), 가시연꽃 (*Euryale ferox*), 수련 (*Nymphaea tetragona* var. *angusta*) 및 연꽃 (*Nelumbo nucifera*) 등이 있다.⁷⁾ 특히, 연꽃 (*N. nucifera*)은 근경은 짧고 수염뿌리를 많이 내며 잎은 뿌리에서 나와 수면에 뜨며, 난상 심형이고 꽃은 6~7월에 피는데, 백색, 남색, 붉은색, 자주색 등 갖가지 색채로 핀다.⁸⁾

전통의학에서 연꽃의 과실 및 종자를 연자(蓮子)라 하며, 양심(養心), 익신(益腎), 보비(補脾), 삼장(腸), 강장(強壯), 지사(止瀉)의 효능이 있어 야침다몽(夜寢多夢), 유정(遺精), 구리(久痢), 부인붕루체하(婦人崩漏下) 등의 치료에 사용하고,

*교신저자 (E-mail): icpark@suncheon.ac.kr
(FAX): 061-752-8551

근경인 우절(藕節)은 지혈(止血), 산어(散瘀)의 효능이 있어 토혈(吐血), 비출혈(鼻出血), 혈뇨(血尿), 혈변(血便) 등의 치료에, 잎의 기부를 하엽체(荷葉)라 하고 청서거습(淸暑祛濕), 화혈(和血) 및 안태(安胎)의 효능이 있어 혈리(血痢), 하리(下痢), 임신태동불안(妊娠胎動不安) 등을 치료하는데 사용한다.⁹⁾ 그리고 연꽃의 수술을 연수(蓮鬚)라 하며, 청심(淸心), 익신(益腎), 지혈(止血), 삽정(精)의 효능이 있어 자궁출혈(子宮出血), 토혈(吐血), 비출혈(鼻出血) 등의 치료에, 종피인 연의(蓮衣)는 수렴(收斂), 습열사리(濕熱瀉利)의 효능으로 인해心和胃의 부화(浮火)를 다스리고腸의濕熱을瀉利한다. 또한, 녹색의 배아를 연자심(蓮子心)이라 하며 청심(淸心), 거열(祛熱), 지혈(止血), 삽정(精)의 효능이 있어 심번(心煩), 구갈(口渴), 토혈(吐血), 목적중통(目赤腫痛) 등의 치료에 사용한다. 그리고 연꽃의 잎을 흔히 연잎이라 하고, 전통의학에서는 하엽(荷葉)이라 하여 청서이습(淸暑利濕), 淸陽의 기(氣)를 승발(升發)시키며 지혈하는 효능이 있어 서습(暑濕)에 의한 하비(下秘), 수기부종(水氣浮腫), 토혈(吐血) 등의 치료에 각각 사용한다. 동의보감(東醫寶鑑)에서는 연잎이 ‘갈증을 멎게 하고 태반을 나오게 하며 버섯으로 인한 심독(毒)을 풀어 주고 혈창(血脹)으로 배가 아픈 것을 치료한다.’고 기록되어 있다.¹⁰⁾

연잎에서 분리된 생리활성 성분으로는 nelumboside, nuciferine, coclaurine 등의 alkaloid류, gallic acid와 methyl gallate 등의 aromatic acid류 및 quercetin, isoquercitrin, hyperoside, rutin, kaempferol 등의 flavonoid류가 있으며,¹¹⁻¹³⁾ 항산화, 지질저하, 항비만, 포도당 자극 인슐린 분비촉진 효과 등의 생리활성 효과가 있다고 한다.¹⁴⁻¹⁷⁾

본 연구는 연잎의 건강기능성 식품소재로서의 효능과 화합물의 조성에 관한 연구의 일환으로 DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 활성을 측정하였으며, 9종의 화합물을 분리하여 화학구조를 동정하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기 - 실험에 사용한 연잎은 2005년 8월 전남 무안에서 직접 채제한 것을 구입 음건하여 사용하였으며 표준품 (NM-NN-200508)은 순천대학교 한약자원학과 표본실에 보관 중이다.

시약 및 기기 - 분리한 화합물의 NMR 분석은 Bruker사의 AMX-400 spectrophotometer (Germany)를 사용하였다. Column chromatography용 충전제로는 손상 silica gel 60 (70-230 mesh, No. 7734, Merck, Germany), 역상 ODS gel (140C₁₈-OPN, Cosmosil, Japan) 및 Sephadex LH-20 (25-100 μ, Sigma, U.S.A)을 사용하였다. TLC plate는 Merck사 (Germany)의 Kiesel gel 60 F₂₅₄ (No. 5735)와 RP-18 F₂₅₄ (No. 115683)를 사용하였다.

추출 및 분획 - 음건 세절한 연잎 4.5 kg을 MeOH에 4시간 동안 3회 반복 환류냉각 열탕추출하여 얻은 용액을 여과한 후, 감압농축기로 용매를 제거하여 추출물 765 g을 얻었다. 이 MeOH 추출물에 10% MeOH을 가해 현탁시킨 후, 분액여두를 이용하여 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 순으로 계통분획하고 CH₂Cl₂ 분획물 237 g, EtOAc 분획물 34 g, *n*-BuOH 분획물 53 g, H₂O 분획물 352 g을 얻었다.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 효능검색 - 연잎 MeOH 추출물, 유기용매 분획물 및 분리한 6종 화합물을 농도별로 MeOH에 희석한 용액 1 ml와 0.1 mM DPPH (Sigma, U.S.A.) EtOH 용액 1 ml를 96-well plate에서 혼합하여 실온에서 빛을 차단하고 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Emax, U.S.A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였다. Control은 MeOH와 DPPH 용액의 흡광도로 하였으며, positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다. 항산화 효능은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능 (IC₅₀)으로 표시하였으며, 다음의 계산식을 사용하였으며 5회 반복 실험하여 데이터를 구하였다.

Inhibition activity (%)

$$= \left\{ 1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{비첨가군의 흡광도}} \right\} \times 100$$

화합물 분리 - 연잎 EtOAc 분획물 (30 g)을 silica gel (560 g) column (6.3 × 79 cm) chromatography를 행하여 용출용매로 CH₂Cl₂와 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매 (5:1:1, 25:8:5, 7:3:1, 65:35:10, 하층)를 사용하여 점차적으로 극성을 증가시키면서 용출하여 TLC 패턴에 따라 10개의 subfraction으로 나누었다 (NNE1~10). NNE2 fraction을 용출용매로 acetone을 사용한 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 화합물 1을 단일물질로 분리하였으며, NNE3 fraction은 CH₂Cl₂로 재결정을 유도하여 화합물 2를 얻었다. NNE4 fraction에 대하여 acetone으로 용출한 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 화합물 3이 단일물질로 분리되었다. 또한 NNE-6 fraction을 H₂O-CH₃CN 혼합용매 (6:1, 4:1, 2:1)로 용출한 ODS column chromatography를 하여 3개의 fraction을 얻었다 (NNE6A~C). 이 중 NNE6B fraction에서 화합물 6이 단일물질로 분리되었으며, NNE6C fraction을 다시 H₂O-CH₃CN 혼합용매 (4:1, 2:1)로 용출하는 ODS column chromatography를 반복하여 fraction 4개를 얻었으며 (NNE6C1~4), NN6C3 fraction에서 화합물 5를 순수히 분리하였다. 화합물 4는 NNE-8 fraction에 대량으로 분리되었으며, NNE9 fraction을 NNE6 fraction과 마찬가지로 H₂O-CH₃CN 혼합용매 (6:1, 4:1, 2:1)로 용출한 ODS gel column chromatography를 실시하여 4개의 fraction을 얻었다 (NN9A~D). 이 중 NN9B fraction에서 화합물 7을, NN9C fraction에서 화합물 8을 각각 순수하게 얻었다. 그리

고 *n*-BuOH 분획물 (40 g)을 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매 (25:8:5, 7:3:1, 65:35:10, 하층)로 용출하는 silica gel (630 g) column (7 × 76.5 cm) chromatography를 하여 fraction 4개를 얻었다(NNB1~4). 얻은 4개 fraction 중, NNB2 fraction을 용출용매로 acetone을 사용한 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 3개의 fraction으로 나누었다(NNB2A~C). 화합물 9는 NNB2B fraction에서 순수한 단일물질로 분리되었다.

화합물 1(*p*-hydroxybenzoic acid) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.79 (2H, d, *J*=8.75 Hz, H-2 & H-6), 6.82 (2H, d, *J*=8.75 Hz, H-3 & H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.1 (-COOH), 161.5 (C-4), 115.1 (C-3 & C-5), 131.5 (C-2 & C-6), 121.4 (C-1).

화합물 2(uracil) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.38 (1H, d, *J*=7.62 Hz, H-5), 5.44 (1H, d, *J*=7.62 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.8 (C-1), 151.9 (C-3), 142.6 (C-5), 100.7 (C-6).

화합물 3(luteolin) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.42 (1H, dd, *J*=8.26 & 2.20 Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, *J*=2.20 Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, *J*=8.26 Hz, H-5'), 6.68 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, *J*=2.04 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J*=2.04 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.6 (C-4), 164.1 (C-2), 163.9 (C-7), 161.4 (C-5), 157.2 (C-9), 149.7 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.5 (C-1'), 118.9 (C-6'), 116.0 (C-5'), 113.3 (C-2'), 103.6 (C-10), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8).

화합물 4(quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.58 (1H, dd, *J*=2.14 & 8.99 Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, *J*=2.14 Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, *J*=8.99 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J*=2.10 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J*=2.10 Hz, H-6), 5.46 (1H, d, *J*=7.52 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.4 (C-4), 164.2 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-9), 156.2 (C-2), 148.5 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.2 (C-2'), 115.2 (C-5'), 104.0 (C-10), 100.9 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.5 (C-8), 77.6 (C-5'''), 76.5 (C-3'''), 74.1 (C-2'''), 69.9 (C-4'''), 60.1 (C-6'').

화합물 5(rhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.63 (1H, d, *J*=2.09 Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd, *J*=8.52 & 2.09 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J*=8.52 Hz, H-5'), 6.72 (1H, d, *J*=2.09 Hz, H-8), 6.38 (1H, d, *J*=2.09 Hz, H-6), 5.49 (1H, d, *J*=7.16 Hz, H-1''), 3.87 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.5 (C-4), 165.0 (C-7), 160.9 (C-5), 156.5 (C-2), 156.2 (C-9), 148.8 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.5 (C-3), 121.6 (C-6'), 120.9 (C-1'), 116.3 (C-2'), 115.2 (C-5'), 104.9 (C-10),

100.8 (C-1''), 97.8 (C-6), 92.1 (C-8), 77.6 (C-5'''), 76.5 (C-3'''), 74.1 (C-2'''), 69.9 (C-4'''), 60.9 (C-6''), 56.1 (-OCH₃).

화합물 6(isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.95 (1H, d, *J*=2.06 Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, *J*=8.52 & 2.06 Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, *J*=8.52 Hz, H-5'), 6.45 (1H, d, *J*=1.83 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, *J*=1.83 Hz, H-6), 5.57 (1H, d, *J*=7.42 Hz, H-1''), 3.85 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.3 (C-4), 164.7 (C-7), 161.2 (C-5), 156.4 (C-2), 156.1 (C-9), 149.4 (C-4'), 146.9 (C-3'), 132.9 (C-3), 103.8 (C-10), 122.0 (C-6'), 121.1 (C-1'), 115.2 (C-5'), 113.4 (C-2'), 100.8 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8), 77.4 (C-5'''), 76.4 (C-3'''), 74.3 (C-2'''), 69.8 (C-4'''), 60.6 (C-6''), 55.6 (-OCH₃).

Compound 7(quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.24 (1H, d, *J*=1.87 Hz, H-2'), 7.37 (1H, dd, *J*=1.87 & 8.37 Hz, H-2'), 6.83 (1H, d, *J*=8.37 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=1.56 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J*=1.56 Hz, H-6), 5.16 (1H, d, *J*=7.08 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.6 (C-4), 172.4 (C-6''), 165.4 (C-7), 160.9 (C-5), 157.5 (C-2), 156.6 (C-9), 148.5 (C-4'), 144.8 (C-3'), 134.1 (C-3), 120.7 (C-6'), 120.4 (C-1'), 117.9 (C-2'), 115.4 (C-5'), 103.4 (C-10), 103.2 (C-1''), 99.1 (C-6), 93.9 (C-8), 76.7 (C-4'''), 74.1 (C-5'''), 74.0 (C-2'''), 71.8 (C-3''').

화합물 8(quercetin 3-O-β-D-xylofuranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.77 (1H, dd, *J*=8.55 & 2.18 Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, *J*=2.20 Hz, H-2'), 6.83 (1H, d, *J*=8.55 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J*=1.94 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J*=1.97 Hz, H-6), 5.71 (1H, d, *J*=7.64 Hz, H-1''), 4.56 (1H, d, *J*=7.28 Hz, H-1'''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.4 (C-4), 164.0 (C-7), 161.2 (C-5), 156.2 (C-2), 155.2 (C-9), 148.5 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.0 (C-3), 121.3 (C-1'), 121.1 (C-6'), 115.7 (C-5'), 115.2 (C-2'), 104.6 (C-1'''), 103.8 (C-10), 98.6 (C-6), 98.3 (C-1''), 93.3 (C-8), 79.8 (C-2''), 76.2 (C-3'''), 75.9 (C-5'''), 73.9 (C-2'''), 73.6 (C-3'''), 69.4 (C-4'''), 67.7 (C-4''), 65.6 (C-5'''), 59.9 (C-6'').

화합물 9(adenine) – ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.11 (1H, s, H-8), 7.06 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 156.3 (C-6), 152.9 (C-2), 150.7 (C-4), 139.2 (C-7), 119.0 (C-5).

결과 및 고찰

MeOH 추출물과 분획물의 DPPH radical에 대한 소거

Table I. The DPPH radical scavenging activities of MeOH extract and its fractions of the *Nelumbo nucifera* leaves

Sample	IC ₅₀ (μg/ml) ^{a)}
MeOH ext.	12.43
CH ₂ Cl ₂ fr.	18.56
EtOAc fr.	2.28
<i>n</i> -BuOH fr.	5.36

^{a)}Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical, Mean (n=5)

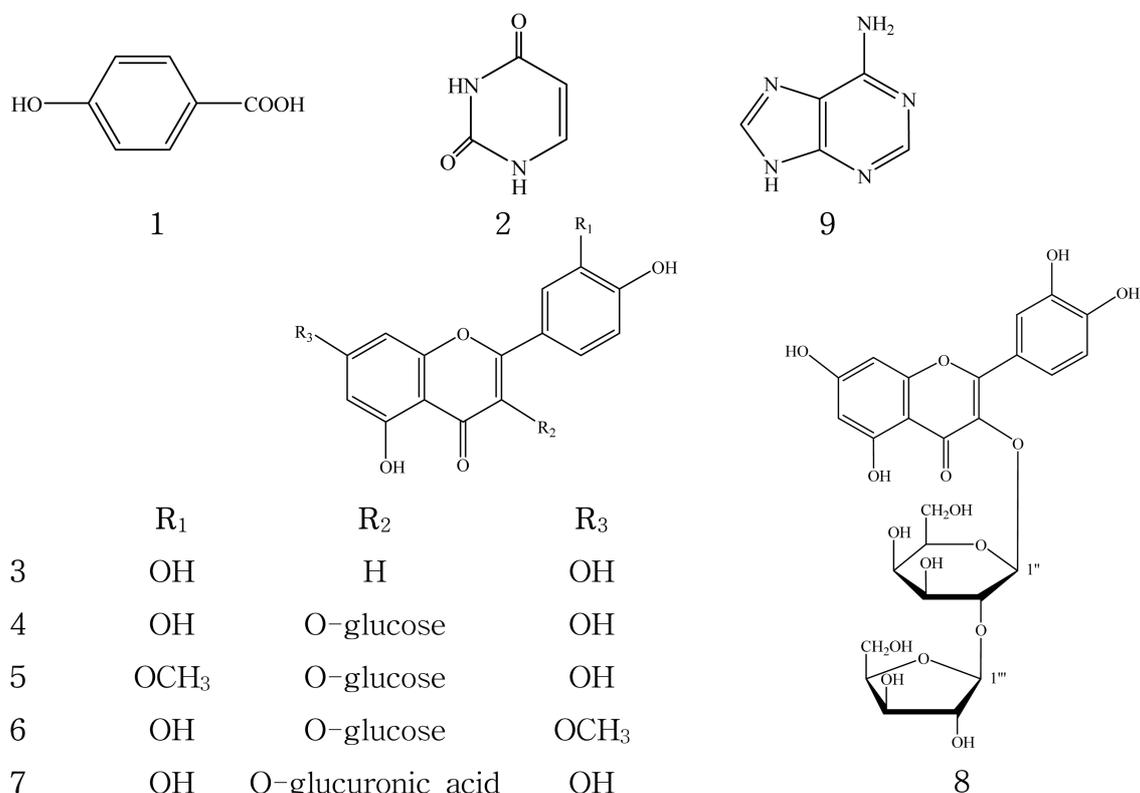
능 - 연잎의 MeOH 추출물과 분획물(CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH)을 대상으로 DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 효능을 검색하였다(Table I). 실험결과, MeOH의 IC₅₀ 값이 12.43 μg/ml로 우수한 DPPH radical 소거능을 보였다. CH₂Cl₂ 분획물은 18.56 μg/ml, EtOAc 분획물은 2.28 μg/ml 그리고 *n*-BuOH 분획물은 5.36 μg/ml로서 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물이 우수한 항산화 효능을 보여 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20을 사용한 column chromatography를 이용하여 9종 화합물을 분리하였다.

분리한 화합물의 구조동정 - NNE2 fraction에서 분리된 화합물 1은 ¹H-NMR spectrum에서 전형적인 benzene ring의 자기등가에 의한 *ortho* coupling이 δ 7.79 (2H, d, *J*=8.75 Hz, H-2 & H-6)와 δ 6.82 (2H, d, *J*=8.75 Hz, H-3

& H-5)에서 doublet peak로 나타났으며, ¹³C-NMR spectrum 분석에서는 carboxyl기에 기인한 peak가 δ 167.1에서 관측되어 benzoic acid 유도체임을 알 수 있었으며, 문헌치¹⁸⁾와 비교하여 화합물 1을 *p*-hydroxybenzoic acid로 구조결정하였다(Fig. 1).

화합물 2는 ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.38 (1H, d, *J*=7.62 Hz, H-5)와 δ 5.44 (1H, d, *J*=7.62 Hz, H-6)에서 *ortho* coupling하는 peak만 되었으며, ¹³C-NMR spectrum에서는 pyrimidine계 화합물의 C-1과 C-3에 결합한 ketone기에 의한 peak가 δ 164.8과 δ 151.9에서 관측되었으며 기존의 문헌치¹⁹⁾와 비교한 결과 잘 일치하여 화합물 2를 uracil로 구조결정하였다.

화합물 3은 50% 황산을 이용한 정성반응에서 황색으로 발색되어 flavonoid 화합물로 추정할 수 있었으며, ¹H-NMR spectrum은 flavonoid의 전형적인 peak 양상으로 δ 7.42 (1H, dd, *J*=8.26 & 2.20 Hz, H-6'), δ 7.40 (1H, d, *J*=2.20 Hz, H-2'), δ 6.90 (1H, d, *J*=8.26 Hz, H-5')에서 B-ring의 *ortho*와 *meta* coupling에 의한 3개의 proton peak가 관측되었고, A-ring의 methine기에 의한 *meta* coupling peak가 δ 6.45 (1H, d, *J*=2.04 Hz, H-6)와 δ 6.20 (1H, d, *J*=2.04 Hz, H-8)에서 각각 관측되었다. 또한, δ 6.68 (1H, s, H-3)에서 flavone 골격의 H-3에 의한 singlet peak도 관측되었다. 그리고 ¹³C-NMR spectrum에 나타난 모든 peak들은 luteolin

**Fig. 1.** Chemical structures of compounds isolated from the leaves of *Nelumbo nucifera*.

문헌치²⁰⁾와 잘 일치하여 화합물 3을 luteolin으로 결정하였다.

화합물 4는 50% 황산 등을 이용한 정성반응에서 양성을 나타내었다. 그리고 ¹H-NMR spectrum에서 화합물 3과 마찬가지로 flavonoid의 전형적인 peak로 δ 7.58 (1H, dd, $J=8.99$ & 2.14 Hz, H-6'), δ 7.57 (1H, d, $J=2.14$ Hz, H-2'), δ 6.85 (1H, d, $J=8.99$ Hz, H-5')에서 B-ring의 ABX system에 의한 *ortho*와 *meta* coupling하는 proton peak 3개가 관측되었고, δ 6.40 (1H, d, $J=2.10$ Hz, H-8)과 δ 6.20 (1H, d, $J=2.10$ Hz, H-6)에서 A-ring의 *meta* coupling하는 proton peak가 관측되었다. 또한 δ 5.46 (1H, d, $J=7.52$ Hz, H-1")에서 β -form인 당의 anomeric proton에 의한 doublet peak가 관측되어 배당체 화합물임을 알 수 있었다. 화합물 4의 ¹³C-NMR spectrum을 문헌치²¹⁾와 비교하여 quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 구조를 결정하였다.

화합물 5는 50% 황산을 이용한 정성반응에서 양성을 보였고, ¹H-NMR spectrum에서 methoxyl기에 의한 peak가 δ 3.87 (3H, s, -OCH₃)에서 관측되고, ¹³C-NMR spectrum에서도 methoxyl기에 의한 peak가 δ 56.1에서 관측된 것을 제외한 모든 data가 화합물 4와 잘 일치하였다. 화합물 4에 methoxyl기가 결합한 화합물의 문헌치²²⁾와 비교하여 화합물 5를 화합물 4의 C-7에 methoxyl기가 결합한 rhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 구조를 결정하였다.

화합물 6도 화합물 5와 마찬가지로 ¹H-NMR spectrum의 δ 3.85 (3H, s, -OCH₃)와 ¹³C-NMR spectrum의 δ 55.6에서 관측된 methoxyl기 (-OCH₃)에 의한 peak를 제외한 모든 data가 화합물 4와 거의 일치하였다. 문헌치²³⁾와 비교한 결과, quercetin의 C-3'에 methoxyl기가 결합한 isorhamnetin의 data와 잘 일치하여 화합물 6을 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 화학구조를 동정하였다.

화합물 7의 ¹H-NMR spectrum 역시 화합물 4의 spectrum과 거의 유사하여 quercetin 골격의 배당체 화합물임을 알 수 있었으며, ¹³C-NMR spectrum도 당부를 제외하고는 quercetin에 의한 peak와 잘 일치하였다. 그리고 δ 172.4 (C-6")와 δ 76.7~71.8에서 나타난 5개의 peak를 통해 당은 glucuronic acid임을 알 수 있었으며, 문헌치²⁴⁾와 비교하여 화합물 7을 quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 구조를 결정하였다.

화합물 8 또한 ¹H-와 ¹³C-NMR spectrum에서 당부를 제외하고는 화합물 4와 거의 동일하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 5.71 (1H, d, $J=7.64$ Hz, H-1")과 δ 4.56 (1H, d, $J=7.28$ Hz, H-1")에서 β -form인 2 mole 당에 의한 anomeric proton이 관측되었으며, ¹³C-NMR spectrum에서 2 mole의 당은 6탄당인 galactose와 5 탄당인 xylose임을 알 수 있었다. 문헌치²⁵⁾와 비교하여 화합물 8을 quercetin 3-O- β -D-xylofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside로 결정하였다.

Table II. The DPPH radical scavenging activity of the isolated compounds from the *Nelumbo nucifera* leaves

Compound	IC ₅₀ (μ g/ml) ^{a)}
1	36.16
2	>200
3	1.32
4	13.42
6	>200
9	>200
L-ascorbic acid ^{b)}	2.17

^{a)}Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical, Mean (n=5)

^{b)}Positive control

화합물 9는 ¹H-NMR spectrum에서 δ 8.11 (1H, s, H-8)과 δ 7.06 (1H, s, H-2)에서 singlet peak 2개가 관측되었으며, ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 156.3에서 purine 계의 NH₂가 인접해 있는 C-6의 peak가 관측되었고 benzene ring에 기인한 peak가 4개 관측되었으며 문헌치²⁶⁾와 일치하여 화합물 9를 adenine으로 동정하였다.

분리한 화합물의 항산화 효과 - 분리한 9종 화합물 중, 6종 화합물을 대상으로 DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 효과를 검색하였다(Table II). 실험결과, 화합물 1인 *p*-hydroxybenzoic acid는 IC₅₀ 값이 36.16 μ g/ml, 화합물 3 (luteolin)은 1.32 μ g/ml, 화합물 4(quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside)는 13.42 μ g/ml로 우수한 항산화 효과를 나타냈으나, 화합물 2(uracil), 화합물 5(rhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside) 그리고 화합물 9(adenine)는 DPPH radical 소거능에 별다른 영향을 주지 못하였다. 특히 화합물 3인 luteolin은 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 보다 강력한 DPPH radical 소거능을 보였다.

분리한 9종 화합물 중, rhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside, isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- β -D-xylofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside를 제외하고는 자연계에 널리 분포하는 화합물로 이들 화합물에 대한 많은 연구결과가 보고되어 있다. Rhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside는 물냉이(*Nasturtium officinale*) 등에서 분리되었으며, 히스타민 억제효과가 있다고 하며,^{22,24)} quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside는 항산화 효과와 혈관신생 억제 효과가 있다고 한다.^{27,28)} 또한, isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside는 소염활성, 면역조절효과 등이 있다고 한다.^{29,30)} 그러나 quercetin 3-O- β -D-xylofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside는 보고된 활성연구 결과가 거의 없었다.

연잎의 MeOH 추출물의 항산화 활성은 DPPH radical 소거능이 가장 우수한 luteolin에 의한 것임을 알 수 있었으며, 활성연구가 거의 보고되어 있지 않은 rhamnetin 3-O- β -D-

glucopyranoside를 비롯한 flavonoid 배당체 화합물에 대한 많은 활성관련 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

수련과에 속하는 연꽃의 잎을 흔히 연잎이라 하며, 전통 의학에서는 하엽(荷葉)이라 하여 청서이습(淸暑利濕), 지혈의 효능이 있어 수기부종(水氣浮腫), 토혈(吐血) 등의 치료에 사용하고 있으며, 연잎으로 만든 차를 백련차 또는 연잎차라 하여 시판되고 있다. 최근에 건강 기능성 차로 각광을 받고 있는 연잎의 효능을 규명하기 위해 MeOH 추출물과 유기용매 분획물을 대상으로 DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 효능을 검색한 결과 EtOAc와 *n*-BuOH 가용부가 우수한 효과를 나타내었다.

DPPH radical에 대한 우수한 소거능을 보인 EtOAc와 *n*-BuOH 가용부를 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수회 반복하여 9종 화합물을 순수히 분리하였다. 9종의 화합물은 NMR 분석을 통해 *p*-hydroxybenzoic acid (1), uracil (2), luteolin (3), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (4), rhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (5), isorhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (6), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (7), quercetin 3-*O*- β -D-xylofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (8) 및 adenine (9) 으로 동정하였으며, 특히 *p*-hydroxybenzoic acid, uracil, rhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside 및 adenine은 연잎에서 처음 분리된 화합물이다.

그리고 분리한 9종 화합물 중 6종 화합물을 대상으로 DPPH radical 소거능을 검색한 결과, *p*-hydroxybenzoic acid (1), luteolin (3) 및 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (4)가 우수한 항산화 효과를 나타냈으며, 특히 luteolin은 대조군으로 사용한 ascorbic acid보다 강력한 DPPH radical 소거능을 보였다. 향후, rhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (5)를 비롯한 화합물의 효능검색과 연꽃의 다른 부위에 대한 성분 및 효능 검색에 관한 연구가 필요하다 하겠다.

사 사

본 연구는 2006년도 농림기술개발연구과제 (106010-02-2-CG000)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Slater, T. F. (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**: 1-15.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine. 105-245. Oxford University Press, New York.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**: 44-84.
- Arrigo, A. P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 936-944.
- Chapple, I. L. C. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.*, **24**: 287-296.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**: 222-230.
- 이창복 (1993) 대한식물도감. 339-340. 향문사, 서울.
- 김창민 (1998) 중약대사전. 4623-4624. 정담, 서울.
- 정보섭 (1990) 도해 향약대사전(식물편). 514-517. 영림사, 서울.
- 허준 (2004) 原本東醫寶鑑. 710. 南山堂, 서울.
- Furukawa, H. (1966) On the alkaloids of *Nelumbo nucifera* Gaertn. . alkaloids of Loti Embryo. *Yakugaku Zasshi*, **86**: 75-77.
- 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.
- 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 benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**: 443-448.
- 이양숙 (2006) 싸리 추출물의 폴리페놀 함량과 생리활성. *한국식품저장유통학회지*, **13**: 612-622.
- 김성빈, 노승배, 류동영, 김동욱 (2005) 고지혈증 및 동맥경화 감응 Bio F1B 햄스터에서 연잎 (*Nelumbo nucifera*)의 지질저하 효과. *생약학회지*, **36**: 229-234.
- Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S. and Ohizumi, Y. (2006) Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, **106**: 238-244.
- 고병섭, 전동화, 장진선, 김주호, 박선민 (2006) *In vitro*에서 조릿대, 연근과 연잎이 인슐린 작용 및 분비에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **38**: 144-120.
- 권오근, 김성환, 천병열, 박채규, 손건호 (1999) 목단피로부터 항균활성 성분의 분리. *생약학회지*, **30**: 340-344.
- Lee, S. H., Kang, S. S. and Shin, K. H. (2002) Coumarins and a pyrimidine from *Angelica gigas* roots. *Natural Product Sciences*, **8**: 58-61.
- Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Rashed, K., Statti, G. A., Hufner, A. and Menichini, F. (2007) Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ail-*

- anthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother. Res.*, **21**: 32-36.
21. Kim, S. J., Cho, J. Y., Wee, J. H., Jang, M. Y., Kim, C., Rim, Y. S., Shin, S. C., Ma, S. J., Moon, J. H. and Park, K. H. (2005) Isolation and characterization of antioxidative compounds from the aerial parts of *Angelica keiskei*. *Food Sci. Biotechnol.*, **14**: 58-63.
 22. Goda, Y., Kaore Hoshino, K., Ishikawa, T., ABE, Y., Nakamura, H., Otsuka, H., Takeda, Y., Tanimurq, A. and Toyoda, M. (1999) Constituents watercress: inhibitors of histamine release from RBL-2H3 cells induced by antigen stimulation. *Bio. Pharm. Bull.*, **22**: 1319-1326.
 23. Lim, S. S., Jung, Y. J., Hyun, S. K., Lee, Y. S. and Choi, J. S. (2006) Rat Lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. *Phytother. Res.*, **20**: 825-830.
 24. Miliuskas, G., Beek, T. A., Venskutonis, P. P., Linssen, J. P. H. and Sudhölter, E. J. R. (2004) Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa*. *J. Sci. Food Agric.*, **84**: 1997-1999.
 25. 허중문, 이종호, 최종원, 황기욱, 정신교, 김문성, 박중철 (1998) 서양고추냉이 추출물과 분리한 kaempferol 배당체들의 브로모벤젠 처리 환경에서 *in vitro* 지질과산화억제 효과. *생약학회지*, **29**: 231-236.
 26. Moriyama, H., Iizuka, T., Nagai, M. and Hoshi, K., (2003) Adenine, an inhibitor of platelet aggregation, from the leaves of *Cassia alata*. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**: 1361-1364.
 27. Donnini, S., Finetti, F., Lusini, L., Morbidelli, L., Cheynier, V., Barron, D., Williamson, S., Waltenberger, J. and Ziche, M. (2006) Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *Br. J. Nutr.*, **95**: 1016-1023.
 28. Moon, J. H., Tsushida, T., Nakahara, K. and Terao, J. (2001) Identification of quercetin 3-O-β-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasm after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**: 1274-1285.
 29. Akbay, P., Basaran, A. A., Undeger, U. and Basaran, N. (2003) *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother. Res.*, **17**: 34-37.
 30. Ahmed, M. S., El Tanbouly, N. D., Islam, W. T., Sleem, A. A. and El Senousy, A. S. (2005) Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. *Phytother. Res.*, **19**: 807-808.

(2007년 7월 23일 접수)