

작두콩의 메탄올 추출물로부터 항산화 활성 화합물의 분리 및 동정

김종필 · 이향희 · 문제학¹ · 하동룡 · 김은선 · 김진환² · 서계원*

광주광역시보건환경연구원, ¹전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터, ²전남대학교 응용화학공학부

Isolation and Identification of Antioxidants from Methanol Extract of Sword Bean (*Canavalia gladiata*)

Jong-Pil Kim, Hyang-Hee Lee, Jae-Hak Moon¹, Dong-Ryong Ha, Eun-Sun Kim, Jin-Hwan Kim², and Kye-Won Seo*

Health and Environment Research Institute of Gwangju

¹Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University

²Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University

Abstract The ethyl acetate (EtOAc) layer of *Canavalia gladiata* (sword bean) methanol extracts showed higher 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity than other layers. Four phenolic compounds were isolated from the EtOAc layer by silica gel column chromatography and prep-HPLC using a guided DPPH radical-scavenging assay. The isolated compounds were identified as methyl gallate (1), gallic acid (2), 1,6-di-*O*-galloyl β-D-glucopyranoside (3), and 1,4,6-tri-*O*-galloyl β-D-glucopyranoside (4) based on MS and NMR analyses. Among the four compounds, no. 4 was isolated from this plant for the first time. Their DPPH radical-scavenging activities based on SC₅₀ decreased in the following order: 4 (6.9 μM) > 3 (8.3 μM) > 2 (10.0 μM) > 1 (10.3 μM).

Keywords: *Canavalia gladiata*, sword bean, 1,4,6-tri-*O*-galloyl β-D-glucopyranoside, galloyl glucoside, gallic acid derivative

서 론

유리 라디칼(free radical)은 노화나 성인병의 주된 원인들 중의 하나로 작용함이 알려져 최근 많은 연구가 행해지고 있다(1). 유리 라디칼은 생체막에 존재하는 불포화 지방산을 산화시켜 막의 유동성을 저하시키고, 효소와 receptor의 활성을 손상시키며, 막 단백질에 상해를 입혀 결국에는 세포의 기능을 불활성화시킴으로써 노화 및 각종 질병발생의 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(2). 유리 라디칼은 생체 내에서 superoxide anion (O₂⁻), hydroperoxide (H₂O₂), hydroxyl radical (·OH) 및 singlet oxygen (¹O₂)과 같은 활성 산소종의 산화적 대사 부산물로서 생성된다(3). 생체 내에서 생성유도된 이들은 반응성이 높아 생체를 구성하는 다양한 성분들과 무작위로 반응함으로써 다양한 위해요소로 작용한다. 이와 같은 활성산소종 및 유리 라디칼종을 불활성화시키는 화합물을 항산화제라 총칭하며, 보다 효과적이면서 안전성이 높은 항산화제를 확보하기 위해 식품소재 및 천연자원으로부터 유용한 항산화제의 탐색에 관한 연구들이 전 세계적으로 매우 활발히 진행되고 있다.

식품에 존재하는 대표적인 항산화 화합물들로 ascorbic acid (vitamin C), carotenoid, tocopherol류(vitamin E) 및 flavonoid를

포함한 다양한 polyphenol류 등을 들 수 있다(3). 이와 같은 천연 항산화제는 주로 식물에 많이 분포되어 있는데, 녹차(4), 감잎차(5), 백작약(6), 황기(7), 복분자(8), 매실(9) 등을 들 수 있으며, 널리 알려진 항산화 화합물로는 녹차의 catechin류(4), 강황의 curcumin(10), 당근의 carotene(11), 포도의 anthocyanin(12), 생강의 gingerol(13) 등이 있다.

작두콩(*Canavalia gladiata*)은 콩과 한해살이 덩굴성 식물로 동남아시아 열대지방이 원산지이며, 그 모양이 작두를 닮았다고 하여 작두콩 혹은 도두(刀豆)라 부르기도 한다(14). 작두콩에는 urease, hemagglutinine, canavanine, canavalia gibberellin I과 II 등의 약용성분을 함유하고 있으며, 민간요법에서는 축농증, 치질, 종기 등 화농성 염증을 다스리는데 사용되어 왔다(15). 중국에서 작두콩을 발효시켜 개발한 “진화 851 구복액”이라는 음료가 건강보조제로 국내에 소개된 적이 있고, 일본에서는 작두콩에 질경이, 울무, 산치자, 예덕나무를 배합해 만든 건강차인 “도두파워”가 제품으로 판매되기도 하였다(16). 반면, 국내에서는 극히 일부 지역에서 제한적으로 생산되고 있으며, 국내에서의 작두콩의 생산량과 소비량에 대한 공식적인 통계는 아직 집계된 바 없다. 그럼에도 불구하고 작두콩에 대한 연구들이 꾸준히 행해져 암(17), 염증, 만성신장염과 빈혈 등의 예방에 효과적이라고 보고(18)된 바 있으며, 그 외에도 항산화(19), 항균작용(20) 및 항당뇨(21) 등에도 효능이 있다고 보고된 바 있다. 하지만 이러한 효능들을 발현하는 활성분체에 관한 연구는 아직 매우 미흡한 실정이다. 그래서 작두콩에 대한 보다 폭넓은 자료 확보가 필요하다고 판단되어 선행연구(22)를 통해 작두콩 추출물을 대상으로 그 특성을 검토한 바 있다. 그 결과, 대두나 검정콩 등으로부터는 daidzin, genistin, daidzein 및 genistein과 같은 flavonoid류가 검출되었음에

*Corresponding author: Kye-Won Seo, Health and Environment Research Institute of Gwangju, Gwangju 502-837, Korea
Tel: 82-62-613-7690
Fax: 82-62-655-7549
E-mail: skin6690@korea.kr
Received June 30, 2013; revised August 22, 2013;
accepted October 15, 2013

반해 작두콩으로부터는 그들이 검출되지 않는 등, 작두콩의 함유 성분이 일반콩과 다른 화학적 조성을 지니고 있을 뿐만 아니라 항산화 활성이 상대적으로 매우 높음을 확인한 바 있다. 본 연구에서는 선행연구 결과를 바탕으로 작두콩의 메탄올 추출물을 대상으로 항산화활성에 초점을 맞추어 생리활성 화합물을 분리·동정하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 작두콩(*Canavalia gladiata*)은 2011년에 광주광역시에서 재배된 것을 분쇄 후 methanol (Merck, Darmstadt, Germany)로 추출하여 실험에 이용하였으며, 분석용 용매 및 기타 시약은 analytical grade를 사용하였다.

Methanol 추출 및 용매분획

건조된 시료를 분쇄기(DA-280 Gold.A. Daesung Artlon. Co. Ltd., Seoul, Korea)로 분쇄한 후 표준망체(Standard testing sieve, Aperture 850 μ m, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용해 균질한 입자의 시료를 얻었다. 추출물의 제조는 작두콩 분말 5 kg을 취해 methanol (MeOH, 15 L \times 2)을 가한 후, 실온에서 24시간 추출하고 여과 및 농축하였다. 이 추출물을 증류수(2 L)로 현탁하여 극성이 다른 용매인 *n*-hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), 그리고 *n*-butanol (BuOH)로 순차 용매분획하였다(Fig. 1). 얻어진 각 획분을 vacuum evaporator (Rotavapor R-II, Büchi, Flawil, Switzerland)를 사용하여 38°C에서 감압 농축하여 각각의 용매분획물을 얻었다. 분획물을 얻기 위해 사용한 용매는 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

DPPH radical-scavenging 활성 평가

MeOH 추출물, 용매분획물 및 분리된 화합물들의 free radical-scavenging 활성은 안정한 radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 대한 환원력을 평가(23)함으로써 제시하였다. 즉, 농도를 달리한 시료 1 mL와 에탄올에 녹인 400 μ M DPPH 용액 1 mL에 에탄올 용매 2 mL를 첨가하여 최종 4 mL가 되도록 처리하였다. 공시험은 시료 대신 90% 메탄올 1 mL를 넣고 행하였다. 실온에서 30분 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 각 시료의 농도(SC₅₀, 50% Scavenging Concentration)로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 α -tocopherol을 positive control로 사용하였다.

한편, 항산화 활성 화합물의 정제 과정에 있어 얻어진 각 획분의 항산화 활성 검정은 TLC-DPPH법(24)을 이용하였다. 즉, 시료를 TLC plate (silica gel, 0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting한 후, DPPH 용액(200 μ M in ethanol)을 TLC plate에 분무하여 보라색이 탈색되면 항산화활성 양성으로 판정하였다.

Silica gel column chromatography에 의한 항산화 활성 물질의 정제

EtOAc 층에서 얻어진 획분을 대상으로 silica gel column chromatography를 실시하였다. Silica gel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)을 100% CHCl₃ 중에서 24시간 팽윤시킨 후, column (3.5 \times 73 cm)에 충전하고, CHCl₃/EtOAc/MeOH (10:0:0 (1-8), 8:2:0 (9-16), 6:4:0 (17-24), 4:6:0 (25-32), 2:8:0

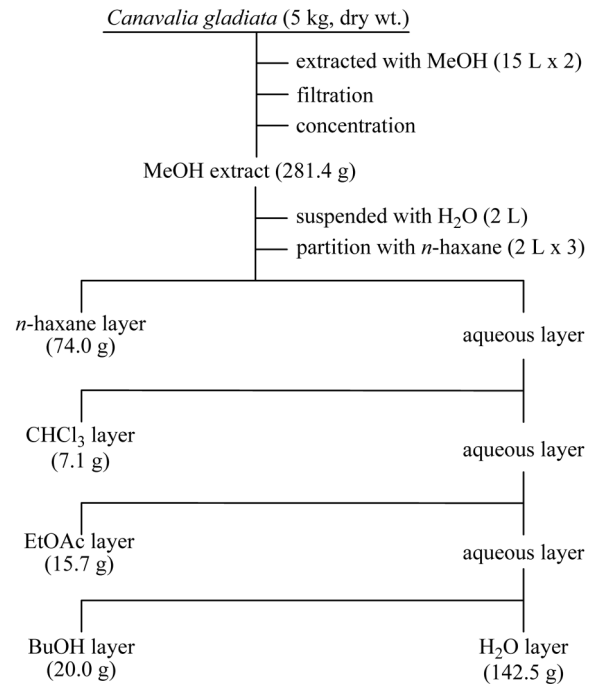


Fig. 1. Extraction procedure with various solvents of methanol extract of *Canavalia gladiata*.

(33-40), 0:10:0 (41-48), 0:8:2 (49-56), 0:6:4 (57-64), 0:4:6 (65-72), 0:2:8 (73-80), 0:0:10 (81-88), v/v/v) 용매계를 이용하여 step-wise 용출방법에 의해 각 단계별로 800 mL씩 용출·분획하였다(Fig. 2).

High performance liquid chromatography (HPLC)에 의한 정제

Silica gel column chromatography 후의 활성획분에 대한 HPLC 정제는 Zorbax Eclipse XDB-C18 column (9.4 \times 250 mm, 5 μ m, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 3.0 mL/min의 유속으로 254 nm의 검출과장에서 행하였다. 이동상은 H₂O와 MeOH을 사용하여 gradient 조건(MeOH:H₂O=(10:90)-(30:70))으로 용출·분획하였다(Fig. 2). 본 연구에서 행한 HPLC에 의한 정제는 모두 동일조건을 이용하였다.

분리 화합물의 기기분석

분리된 활성 화합물의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR, 그리고 2D-NMR spectra는 FT-NMR 기기(¹H-NMR: INOVA 500, Varian, Walnut Creek, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석용매는 CD₃OD (Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA)를, 그리고 사용용매의 피크를 기준점으로 이용하였다.

Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) 분석은 질량분석기(Waters Synapt, Milford, MA, USA)를 사용하여 수행하였으며, capillary (kV) 3.10, source temperature 120, desolvation temperature 150의 조건에서 행하였다.

화합물 1: white powder; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.04 (2H, s, H-2, 6), 3.81 (3H, s, -OCH₃); ESI-MS (negative) *m/z* 183.0 [M-H]⁻.

화합물 2: white needle; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.05 (2H, s, H-2, 6); ESI-MS (negative) *m/z* 169.0 [M-H]⁻.

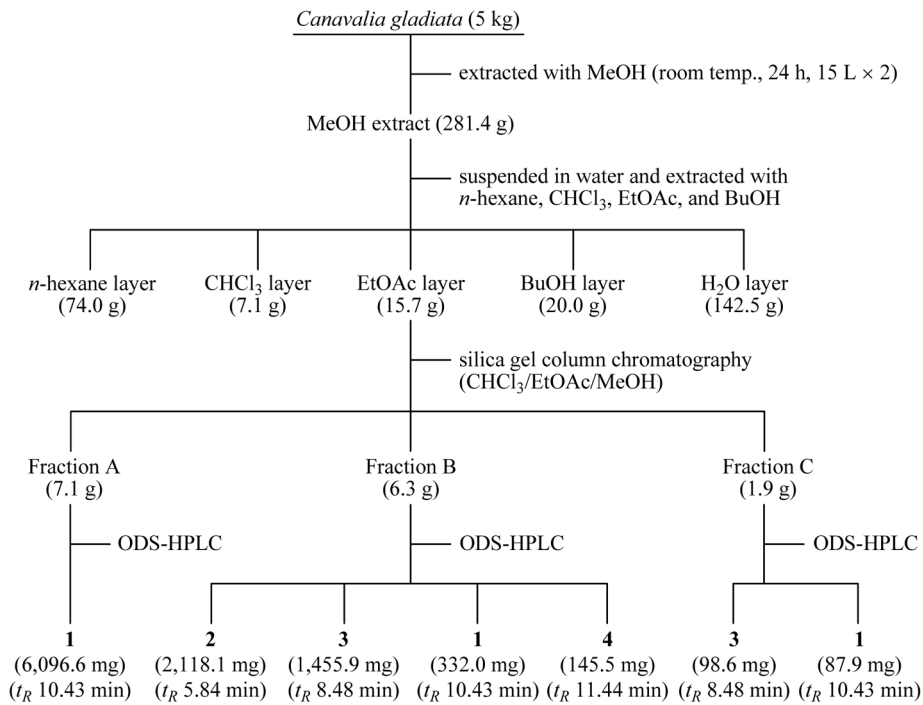


Fig. 2. The purification procedure of isolated compounds from MeOH extracts of *Canavalia gladiata*.

결과 및 고찰

작두콩의 추출 및 용매분획

작두콩 분말(5 kg, 건조중량) MeOH 추출물(281.4 g)의 H₂O 현탁액을 용매분획하여 n-hexane층 74.0 g, CHCl₃층 7.1 g, EtOAc층 15.7 g, BuOH층 20.0 g 및 H₂O층 142.5 g을 각각 얻었다(Fig. 1).

작두콩의 MeOH 추출물 및 용매분획물들의 DPPH radical-scavenging 활성

MeOH 추출물 및 각 용매분획물을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 비교하였다(Fig. 3). MeOH 추출물 및 모든 용매분획물들의 활성은 일정 범위 내에서 농도 의존적임을 알 수 있었다. 그래서, 이 농도 의존성이 인정되는 범위 내에서 각 시료의 SC₅₀ 값을 구한 결과, 비교구로 사용한 α-tocopherol의 SC₅₀ 값은 7.9 µg/mL였으며, MeOH 추출물은 23.2 µg/mL, n-hexane층은 32.6 µg/mL, CHCl₃층은 19.5 µg/mL, EtOAc층은 2.6 µg/mL, BuOH층은 4.5 µg/mL, 그리고 H₂O층은 48.6 µg/mL였다. 작두콩의 MeOH 추출물은 비교구로 사용한 대표적인 지용성 항산화 화합물인 α-tocopherol보다 약간 낮은 활성을 보였으나, 그 용매 분획물들 중 EtOAc층과 BuOH층은 α-tocopherol보다 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 작두콩의 MeOH 추출물에 함유된 주요 항산화 활성 화합물들이 주로 EtOAc층과 BuOH층에 존재하고 있음을 시사하는 결과라 판단되었다. 또 TLC-DPPH법을 이용하여 각 층에 함유된 화합물들의 존재 경향 및 항산화 활성을 비교한 결과 (data not shown), EtOAc층에 보다 다양한 항산화 화합물들이 존재하는 것으로 판단되었다. 이에 본 연구에서는 EtOAc층을 대상으로 항산화 화합물의 분리·정제를 행하였다.

항산화 활성 화합물의 분리

EtOAc층을 대상으로 silica gel column chromatography를 행하여 얻어진 획분들 중 TLC-DPPH법에 의해 항산화 활성 화합물

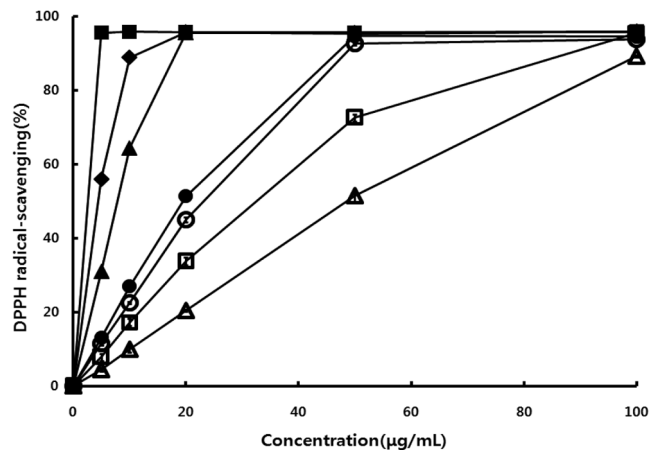


Fig. 3. DPPH radical-scavenging activity of the MeOH extract of *Canavalia gladiata* and its fractions after solvent fractionation. ■, EtOAc layer; ◆, BuOH layer; ▲, α-Tocopherol; ●, CHCl₃ layer; ○, MeOH extract; □, n-hexane layer; △, H₂O layer. Values are mean±SD (n=3).

들의 존재 경향을 비교하여 활성이 인정된 3개의 획분(획분 A, 23-33; 획분 B, 34-61; 획분 C, 62-88)을 대상으로 용액 중에서의 DPPH radical-scavenging 활성을 비교하였다(Fig. 4). 각 획분의 SC₅₀ 값을 기준으로, 획분 A (2.6 µg/mL) > 획분 B (3.4 µg/mL) > 획분 C (13.3 µg/mL)의 순으로 높은 활성을 보였다. 이 결과로부터 3개의 획분 모두에 유용한 항산화 화합물의 존재가 시사되어 순차적으로 그들 각각을 대상으로 항산화 화합물의 분리를 행하였다.

먼저 획분 A (7.1 g)를 대상으로 HPLC를 행하여 화합물 1 (t_R 10.43 min, 6096.6 mg)을 분리하였다. 이어 획분 B (6.3 g)를 대상으로 HPLC를 행한 결과, 4종의 화합물(fr. B-1 (t_R 5.84 min, 화합

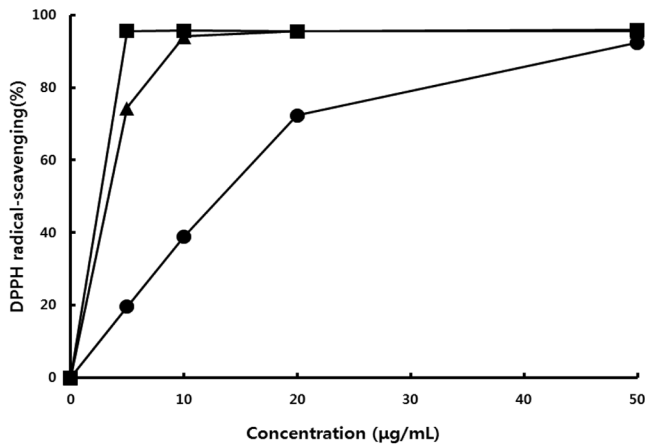


Fig. 4. DPPH radical-scavenging activity of main active fractions obtained after silica gel column chromatography of EtOAc layer of *Canavalia gladiata* MeOH extract. ■, EtOAc-fr. A; ▲, EtOAc-fr. B; ●, EtOAc-fr. C. Values are mean±SD (n=3).

물 2), 2118.1 mg; fr. B-2 (t_R 8.48 min, 화합물 3), 1455.9 mg; fr. B-3 (t_R 10.43 min, 화합물 1), 332.0 mg; fr. B-4 (t_R 11.44 min, 화합물 4), 145.5 mg)를 분리하였다. 그리고 획분 C (1.9 g) 또한 동일 조건에서 HPLC를 이용한 정제를 행하여 2종의 화합물(fr. C-1 (t_R 8.48 min, 화합물 3), 98.6 mg; fr. C-2 (t_R 10.43 min, 화합물 1), 87.9 mg)을 분리하였다. 본 화합물들의 정제과정을 Fig. 2에 정리하였으며, 분리된 각 화합물들은 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 2D-NMR, 그리고 MS 분석을 통해 구조해석을 행하였다.

화합물 1의 구조해석

화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 500 MHz)으로부터 1종의 methoxyl proton signal (d 3.81, 3H, s, $-\text{OCH}_3$)에 대하여

2H에 해당하는 1종의 sp^2 carbon proton 유래의 singlet signal (δ 7.04, 2H, H-2, 6)이 관찰되었다. 그래서 화합물 1은 methyl group이 gallic acid와 ester 결합을 하고 있는 methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (methyl gallate)인 것으로 시사되었다. 더욱이 화합물 1의 MS (negative) spectrum으로부터 m/z 183 $[\text{M-H}]^-$ 의 signal이 관찰되어 이 결과가 예상 화합물의 분자량(184)과 정확히 일치함이 확인되었다. 그리고 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 용안 (*Dimocarpus longan* Lour)의 씨에서 분리한 methyl gallate의 그것과 비교한 결과, 상호 일치성이 확인되었다(25). 그래서 화합물 1은 methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (methyl gallate)로 동정되었다 (Fig. 5).

목단피에서 분리된 methyl gallate는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증매개물질을 유의적으로 억제함으로써 항염증 효과를 발현한다고 보고(26)된 바 있으며, 신나무로부터 분리된 methyl gallate를 대상으로 세포독성과 항암활성에 관한 연구에 있어 구강암 세포의 증식과 분화 및 전이를 억제하는 효과가 있음이 보고된 바 있다(27). 그 외에도 methyl gallate는 붉나무 수피(28), 부티아꽃(29), 오스베키아 향나무(30) 및 안개나무(31) 등으로부터도 항산화 활성을 발현하는 화합물로 분리·동정되기도 하였다.

화합물 2의 구조해석

화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) spectrum으로부터 1종의 sp^2 carbon proton signal (δ 7.05, 2H, s, H-2, 6)만이 관찰되었다. 즉 화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum과 비교하였을 때, 화합물 1로부터 검출되었던 methoxyl proton signal이 검출되지 않은 것 외에는 매우 유사한 경향이 관찰되었다. 그래서 이 화합물은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid)일 가능성이 강하게 시사되었다. 더욱이 화합물 2의 MS (negative) spectrum으로부터 m/z 169 $[\text{M-H}]^-$ 이 관찰되어 예상 화합물의 분자량(170)과 정확히 일치함을 확인하였다. 또한 화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 동백꽃에서 분리된 gallic acid의 그것과 비교한 결과, 상호 일치성이

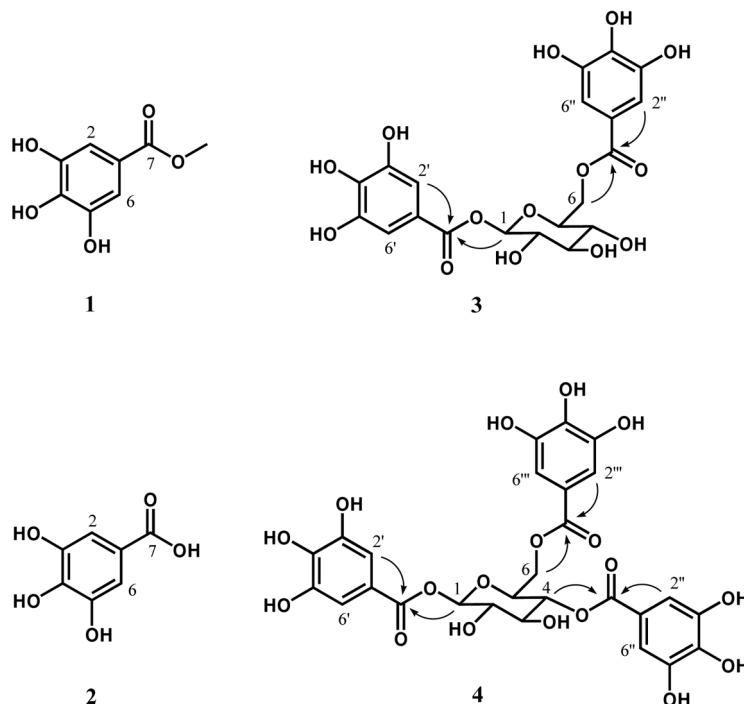


Fig. 5. Structure of compounds 1-4 and important HMBC correlations (arrows).

Table 1. ¹H- (500 MHz) and ¹³C- (125 MHz) NMR data of Compounds 3 and 4 in CD₃OD

Position	3		4	
	δ_{H} (int., mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Int., Mult., J in Hz)	δ_{C}
1	5.68 (1H, d, 8.0)	96.1	5.78 (1H, d, 8.0)	96.0
2	3.49-3.53 (1H, m, overlapped with H-3 and 4)	74.2	3.65 (1H, dd, 8.0, 9.0)	74.4
3	3.49-3.53 (1H, m, overlapped with H-2 and 4)	78.1	3.84 (1H, dd, 9.0, 9.0)	76.1
4	3.49-3.53 (1H, m, overlapped with H-2 and 3)	71.3	5.22 (1H, dd, 9.0, 9.0)	72.0
5	3.72 (1H, m)	76.6	4.06 (1H, m)	74.6
6a	4.55 (1H, dd, 12.0, 2.0)	64.6	4.44 (1H, dd, 12.0, 2.0)	63.8
6b	4.40 (1H, dd, 12.0, 5.0)		4.22 (1H, dd, 12.0, 5.0)	
1'	-	120.7	-	119.5
2', 6'	7.13 (2H, s)	110.7	7.15 (2H, s)	110.7
3', 5'	-	146.7	-	146.8
4'	-	140.6	-	141.0
7'	-	167.1	-	167.1
1''	-	121.4	-	120.9
2'', 6''	7.07 (2H, s)	110.3	7.10 (2H, s)	110.5
3'', 5''	-	146.6	-	146.7
4''	-	140.0	-	140.5
7''	-	168.5	-	167.6
1'''	-	-	-	121.1
2''', 6'''	-	-	7.06 (2H, s)	110.4
3''', 5'''	-	-	-	146.6
4'''	-	-	-	140.2
7'''	-	-	-	168.2

확인되었다(32). 이에, 화합물 2는 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid)로 동정되었다(Fig. 5).

Gallic acid는 갈산 혹은 몰식자산이라 불리며, 백작약으로부터 분리된 gallic acid는 세포내에서 산화적 스트레스에 의한 DNA의 손상을 경감시키는 효과가 우수함이 보고(33)된 바 있다. 또한 이 화합물은 도토리(34)와 산수유(35)의 항산화 활성 화합물로도 분리된 바 있으며, 천연에 널리 존재하는 화합물이다.

화합물 3의 구조해석

화합물 3의 ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) spectrum으로부터 화합물 1과 2의 ¹H-NMR spectra에서 관찰되었던 것과 매우 유사한 2종의 gallic acid 유래의 *sp*² carbon proton signal들(δ 7.13 (2H, s, H-2', 6'), 7.07 (2H, s, H-2'', 6''))이 관찰되었다. 또 ¹H-NMR spectrum에서 1종의 anomeric proton signal (δ 5.68 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1))과 그 외 6H의 당 proton signal들(δ 4.55-3.53 (3H, m, H-2~H-6))이 관찰되어 1종의 당의 존재가 추가적으로 시사되었다. 그리고 당 유래의 proton signal들의 coupling constant (*J*) 값이 7.0-9.0 Hz로 검출되어 이 화합물의 당은 β -D-glucose인 것으로 해석되었다. 그에 더하여 화합물 3의 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) spectrum으로부터 2종의 gallic acid에 귀속되는 2종의 carbonyl carbon (δ 167.1 (C-7'), 168.5 (C-7''))과 12종의 *sp*² carbon signal들(δ 146.6-110.3)이 관찰되었으며, 당 유래의 6종의 carbon signal들(δ 96.1-64.6)이 관찰되어, ¹H-NMR spectrum과 일치성이 확인되었다(Table 1). 이상의 1D-NMR spectra로부터 화합물 3은 2종의 gallic acid가 당과 결합한 tannin계 화합물로 시사되었다. 화합물 3의 보다 정확한 구조 해석을 위해 HSQC 및 HMBC 등의 2D-NMR 분석을 실시하였다. HSQC spectrum에서 one-bond의 proton-carbon들 간의 correlation을 확인한 다음, HMBC spectrum (Fig. 5, arrows)에서 long range proton-carbon

들 간의 correlation을 검토하였다. 이들 결과로부터 화합물 3의 부분구조는 2종의 gallic acid와 glucose로 구성되어 있음이 재차 확인되었다. 특히 HMBC spectrum으로부터 δ 5.68 (H-1)과 δ 167.1 (C-7') 간에 cross peak가 관찰되어 1종의 gallic acid는 glucose의 1위에 ester 결합되어있음을 알 수 있었다. 또한 당의 6위 proton signal들[δ 4.55 (H-6a), 4.40 (H-6b)]과 δ 168.5 (C-7'')의 carbon signal들 간에 상관관계가 확인되어 다른 1종의 gallic acid는 glucose의 6위에 ester 결합되어있음이 확인되었다. 그래서 화합물 3은 1,6-di-*O*-galloyl β -D-glucopyranoside로 해석되었다. 더욱이 화합물 3의 MS (positive) spectrum에서 *m/z* 507 [M+Na]⁺이 관찰되어 예상 화합물의 분자량(484)과 정확히 일치함이 확인되었다. 또한 화합물 3의 ¹H-과 ¹³C-NMR spectra는 캐롭(*Ceratonina siliqua*)으로부터 분리동정된 1,6-di-*O*-galloyl β -D-glucopyranoside의 그것들과 정확하게 일치하였다(36). 따라서 화합물 3은 틀림없는 1,6-di-*O*-galloyl β -D-glucopyranoside로 동정되었다(Fig. 5). 이 화합물은 *Baseonema acuminatum* 잎에서 분리되어 보고된 바 있다(37).

화합물 4의 구조해석

화합물 4의 ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) spectrum (Fig. 6)은 gallic acid 유래의 *sp*² carbon proton signal (δ 7.10, 2H, s, H-2'', 6'') 1종이 화합물 3보다 추가적으로 더 관찰된 것을 제외하고 화합물 3의 그것과 매우 유사하였다. 그래서 화합물 4는 3종의 gallic acid가 glucose에 결합된 trigalloyl 배당체 화합물인 것으로 시사되었다. 또한 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) spectrum (Fig. 7)으로부터 관찰된 21종의 *sp*² carbon signal들(δ 168.2-110.4)과 당 유래의 6종의 carbon signal들(δ 96.0-63.8)을 포함하여 총 27종의 carbon signal들이 관찰되어 ¹H-NMR spectrum으로부터 추정된 구조식과 일치성이 확인되었다(Table 1). 그에 더하여 ¹H-¹H COSY

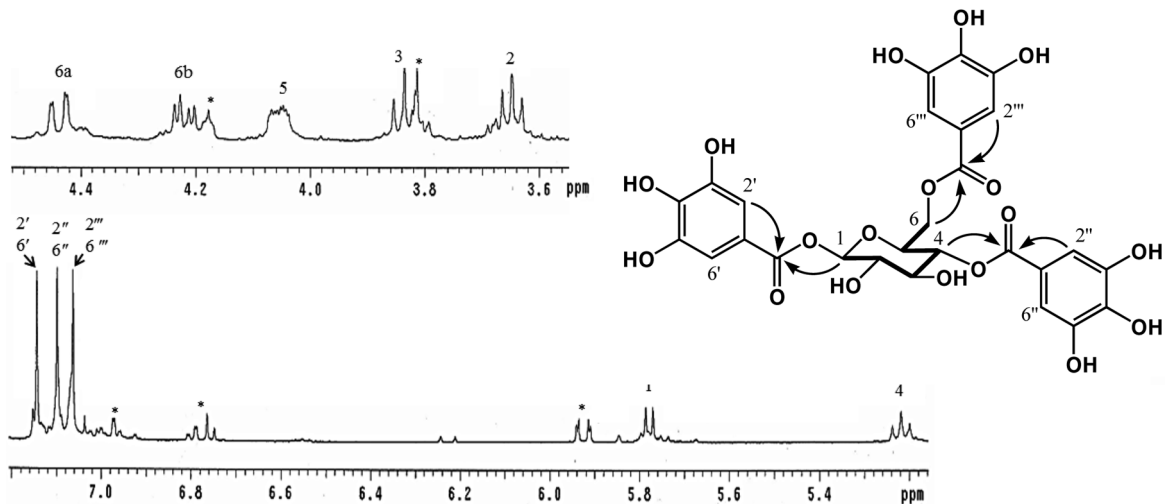


Fig. 6. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) spectra of compound **4** in CD_3OD . *: Impurity.

spectrum에서 당의 H-1~H-6의 proton들 간에 상호 cross peak들이 관찰되어 그 당 proton들의 일련의 연결성이 확인되었으며, 그 $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로부터 관찰된 그들의 J 값(7.0-9.0 Hz)으로부터 화합물 **4**의 당은 $\beta\text{-D-glucose}$ 임이 명확하게 확인되었다. 또 화합물 **4**의 HMBC spectrum (Fig. 5와 6, arrows)으로부터 proton-carbon 간의 cross peak들을 확인함으로써 화합물 **4**의 부분구조는 1종의 glucose에 2종의 galloyl기가 결합된 화합물 **3**의 구조를 취하고 있음이 확인되었다. 그에 더하여 HMBC spectrum에서 proton δ 5.22 (H-4)와 carbon δ 167.6 (C-7'')의 signal들 간에 상관관계가 관찰되어 다른 1종의 gallic acid가 추가적으로 glucose의 4위에 ester 결합을 형성하고 있음이 확인되었다. 또한 화합물 **4**의 MS (positive) spectrum으로부터 m/z 659 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 이 관찰되어 예상 화합물의 분자량(636)과 정확히 일치함이 확인되었다. 따라서 화합물 **4**는 최종적으로 1,4,6-tri- O -galloyl $\beta\text{-D-glucopyranoside}$ 로 동정되었다(Fig. 5). 이 화합물은 라플레시아(*Rafflesia kerrii*) 꽃과 석류나무(*Punica granatum*) 잎에서 분리되어 보고된 적이 있으나 (38,39), 작두콩에서는 처음 분리·동정되었다.

분리동정된 화합물의 DPPH radical-scavenging 활성

작두콩 MeOH 추출물의 EtOAc층으로부터 분리된 4종의 화합물을 대상으로 시료의 농도에 따른 DPPH radical-scavenging 활성을 평가하였다. 시료의 농도별 DPPH radical-scavenging 활성으로부터 SC_{50} 값을 구한 결과, 화합물 **4** (6.9 μM) > 화합물 **3** (8.3 μM) > 화합물 **2** (10.0 μM) > 화합물 **1** (10.3 μM) 순으로 높게 나타났다(Table 2). 화합물 **1** (methyl gallate)을 비롯한 분리된 4종의 화합물은 대표적인 지용성 항산화 화합물로 잘 알려진 α -tocopherol (18.3 μM)보다 더 높은 활성을 보였다. 특히 2분자와 3분자의 galloyl group을 갖는 화합물 **3**과 화합물 **4**가 1분자의 galloyl group을 갖는 화합물 **1**과 **2**보다 더 높은 DPPH radical-scavenging 활성을 나타냈다. 이는 phenolic acid에 결합된 OH기의 수가 많을수록 항산화 활성이 높은 경향을 보인다고 보고된 실험 결과 (40)와 일치하였다. 이에, 동일 농도를 기준으로 하였을 때, 화합물 **3**과 **4**는 작두콩의 항산화 활성에 화합물 **1**과 **2**보다 더 높은 radical-scavenging 활성을 나타냄을 의미하는 것으로 해석할 수 있다. 또, 흥미롭게도 carboxylic acid group이 유리형인 화합물 **2**가 methyl ester화된 화합물 **1**보다 약간 더 높은 활성을 보였다. 이는 페놀성 수산기뿐만 아니라 carboxylic acid의 수산기 또한 미

Table 2. DPPH radical-scavenging activity of the isolated compounds from *Canavalia gladiata*

Compounds	SC_{50} (μM)
Methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (1)	10.3
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (2)	10.0
1,6-Di- O -galloyl $\beta\text{-D-glucopyranoside}$ (3)	8.3
1,4,6-Tri- O -galloyl $\beta\text{-D-glucopyranoside}$ (4)	6.9
α -Tocopherol	18.3

약하나 radical scavenging에 관여함을 시사하는 결과라 판단된다. 그리고 분리된 화합물들의 양적인 측면을 고려하여하였을 때, 작두콩 분말 5 kg의 MeOH 추출물(281.4 g)로부터 각 화합물의 총 함량은 화합물 **1** (6516.5 mg) > 화합물 **2** (2118.1 mg) > 화합물 **3** (1554.5 mg) > 화합물 **4** (145.5 mg)의 순으로 존재함을 알 수 있었다. 정제 과정에서 일부 손실된 양의 비율에 차이가 있을 수 있다고 판단되나 화합물 **1**이 다른 화합물들의 함량에 비해 약 3-45배 높게 함유되어 있음은 2-3분자씩의 galloyl group이 결합된 화합물 **3**과 **4**에 비해 화합물 **1**이 작두콩의 항산화 활성에 기여도가 결코 낮지 않을 것임을 시사하는 바라 판단된다.

화합물 **1**, **2**, **3**은 Li 등(41)에 의해 작두콩으로부터 분리되어 보고된 바 있으나 작두콩의 항산화 활성 본체임을 밝힌 것은 본 연구 결과가 처음이며, 화합물 **4** (1,4,6-tri- O -galloyl $\beta\text{-D-glucopyranoside}$)는 본 연구를 통해 작두콩으로부터는 처음 분리·동정된 바 있다. 본 연구로부터 확인된 작두콩 중의 galloyl계 화합물들은 위에서도 서술한 바와 같이 다른 종류의 다양한 식물들로부터도 분리동정된 바 있다. 그 몇 예를 살펴보면, 안개나무 건조중량 100 g으로부터 화합물 **1**과 **2**가 각각 1.4 mg과 3.54 mg 분리된 바 있으며(31), 산수유 건조중량 100 g으로부터 157 mg의 화합물 **2**가 얻어진 바 있다(35). 그리고 carob fiber 생체중량 100 g으로부터 화합물 **1**, **2** 및 **3**이 각각 4.1, 164, 그리고 15.7 mg씩이 각각 함유되어 있음이 확인된 바 있으며(36), *Baseonema acuminatum* 잎의 건조중량 100 g으로부터 화합물 **3**이 2.5 mg (37), 그리고 라플레시아 꽃 신선중량 100 g으로부터 화합물 **4**가 0.2 mg 분리된 바 있다(38). 그리고 본 연구에 있어 작두콩 건조중량 100 g으로부터 화합물 **1-4**가 각각 130.3, 42.4, 31.1, 그리고 2.9 mg 정도씩 분리되었다. 타 식물들을 대상으로 한 기존의 결과들과

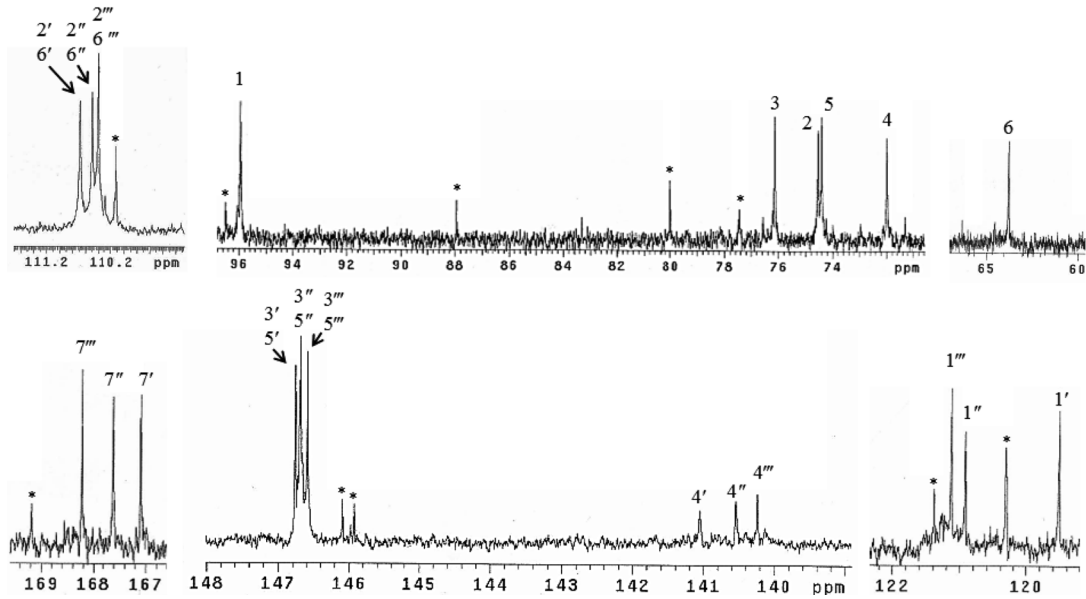


Fig. 7. ¹³C-NMR (125 MHz) spectra of compound 4 in CD₃OD. *: Impurity.

본 연구 결과들 모두 계통적인 정량분석을 행한 것이 아니기 때문에 정제 과정에서 손실된 양 등이 전혀 고려되어 있지 않아 정확한 함량 비교는 곤란하다고 판단되나, 화합물 2-4는 대체로 다른 식물들에 함유된 함량과 큰 차이를 보이지는 않는 듯하나 화합물 1의 경우는 다른 식물들에 비해 작두콩에 있어 비교적 함량이 높을 가능성이 있음이 시사되었다. 본 연구 결과들을 기초로 보다 자세한 관련 연구들이 행해져 작두콩의 유용성과 응용에 필요한 정보들이 보다 적극적으로 확보되길 기대한다.

요 약

본 연구는 항산화 활성이 뛰어난 작두콩의 메탄올 추출물을 대상으로 극성차를 이용한 용매분획을 행하여 n-hexane층, CHCl₃층, EtOAc층, butanol층, 그리고 H₂O층을 얻었다. 그중 활성이 가장 높은 EtOAc층을 대상으로 silica gel column chromatography 및 HPLC를 행하여 4종의 활성 화합물을 분리하고, MS 및 NMR 분석을 통하여 구조해석을 행하였다. 그 결과 화합물 1-4는 methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (methyl gallate, 화합물 1), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid, 화합물 2), 1,6-di-O-galloyl β-D-glucopyranoside (화합물 3), 그리고 1,4,6-tri-O-galloyl β-D-glucopyranoside (화합물 4)로 각각 동정되었다. 그리고 분리 화합물들의 DPPH radical-scavenging 활성은 화합물 4>화합물 3>화합물 2>화합물 1 순으로 평가되었다. 또 분리된 양을 기준으로 하였을 때, 화합물 1과 2는 작두콩 중에 다른 화합물들에 비해 다량으로 존재할 것으로 시사되었으며, 이들 화합물이 작두콩의 항산화 활성에 상당부분 기여하고 있는 것으로 판단되었다. 또한 화합물 4는 본 연구를 통해 작두콩으로부터는 처음 분리·동정되었다.

감사의 글

본 논문은 광주광역시 보건환경연구원 연구개발비에서 지원하여 수행된 연구과제입니다.

References

- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. P. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922 (1993)
- Dean RT, Gieseg S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. Trends Biochem. Sci. 18: 437-441 (1993)
- Hong YH. Food physiological active substance science. Chonnam National University Press, Gwangju, Korea. pp. 26-200 (2009)
- Cha JY, Cho YS. Studies on antioxidative activity of green tea extracts in medilite-extraction water. Korean J. Life Sci. 13: 168-174 (2003)
- Jung KM, Kang GH, Kwon MK, Song IK, Cho DH, Chou YD. Chemical components and antioxidant activity of persimmon (*Diospyros Kaki Thunb*) leaves. Korean J. Food Preserv. 11: 175-181 (2004)
- Kim YE, Lee YC, Kim HK, Kim CJ. Antioxidative effect of ethanol fraction for several Korean medicinal plant hot water extracts. Korean J. Food Nutr. 10: 141-144 (1997)
- Kwon SC, Choi GH, Hwang JH, Lee KH. Physicochemical property and antioxidative activity of hot-water extracts from enzyme hydrolysate of *Astragalus membranaceus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 406-413 (2010)
- Kim SJ, Lee HJ, Park KH, Rhee CO, Lim IJ, Chung HJ, Moon JH. Isolation and identification of low molecular phenolic antioxidants from ethylacetate layer of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) wine. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 129-134 (2008)
- Han JT, Lee SY, Kim KN, Baek NI. Rutin, antioxidant compound isolated from the fruit of *Prunus memu*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 44: 35-37 (2001)
- Lee YL, Weng CC, Mau JL. Antioxidant properties of ethanolic and hot water extracts from the rhizome of *Curcuma aromatica*. J. Food Biochem. 31: 757-771 (2007)
- Teixeira LJQ, Serrano IO, Fortuny RS, Ramos AM, Belloso OM. Comparative study on antioxidant properties of carrot juice stabilised by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. J. Sci. Food Agr. 89: 2636-2642 (2009)
- Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chem. 120: 599-606 (2010)
- El-Ghorab AH, Nauman M, Anjum FM, Hussain S, Nadeem M.

- A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *J. Agr. Food Chem.* 58: 8231-8237 (2010)
14. Joo SJ, Choi KJ, Kim KS, Lee JW, Park SK. Characteristics of yogurt prepared with 'Jinpum' bean and sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 8: 308-312 (2001)
 15. Cho YS, Bae YI, Shim KH. Chemical components in different parts of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 6: 475-480 (1999)
 16. Kim SS, Kim KT, Hong HD. Development of chunggukjang adding the sword beans. *Korea Soybean Dig.* 18: 33-50 (2001)
 17. Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from *Canavalia gladiata*, dietary legume. *Biochem. Bioph. Res Co.* 330: 1268-1274 (2005)
 18. Ekanayake S, Skog K, Asp NG. Canavanine content in sword bean (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food Chem Toxicol.* 45: 797-803 (2007)
 19. Kim KA. Screening of Antioxidants from *Canavalia gladiata* DC. MS thesis, Konkuk University, Seoul, Korea (2001)
 20. Park JH. Separation and purification of the antifungal antibiotic from *Canavalia gladiata*. MS thesis, Kangwon National University, Chuncheon, Korea (2005)
 21. Nimenibo-Uadia R. Effect of aqueous extract of *Canavalia ensiformis* seeds on hyperlipidaemia and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biokemistri* 15: 7-15 (2003)
 22. Kim JP, Yang YS, Kim JH, Lee HH, Kim ES, Moon YW, Kim JY, Chung JK. Chemical properties and DPPH radical scavenging ability of sword bean (*Canavalia gladiata*) extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 441-446 (2012)
 23. Singh N, Rajini PS. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem.* 85: 611-616 (2004)
 24. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Bioch.* 58: 1780-1783 (1994)
 25. Sudjaroen Y, Hull WE, Erben G, Wurtele G, Changbumrung S, Ulrich CM, Owen RW. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. *Phytochemistry* 77: 226-237 (2012)
 26. Park YK, Min JY, Lee JH. The effect of methyl gallate isolated from *Paeonia suffruticosa* on inflammatory response in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Herbology.* 24: 181-188 (2009)
 27. Han DS, Lee SR, Jung WY. Studies on the cytotoxicity and anti-neoplastic activity of methyl gallate. *Korean J. Anat.* 34: 131-139 (2001)
 28. Oh JY, Choi U, Kim YS, Shin DH. Isolation and Identification of antioxidative components from bark of *Rhus javanica* Linne. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 726-732 (2003)
 29. Gupta SR, Rarindranath B, Seshadri TR. The glucosides of *Butea monosperama*. *Phytochemistry* 9: 2231-2235 (1970)
 30. Su JD, Osawa T, Kawakishi S, Namiki M. Tannin antioxidants from *Osbeckia chinensis*. *Phytochemistry* 27: 1315-1319 (1988)
 31. Westenburg HE, Lee KJ, Lee SK, Fong HHS, Van Breemen RB, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus cogglygria*. *J. Nat. Prod.* 63: 1696-1698 (2000)
 32. Lee HH. Isolation and identification of antioxidative compounds from *Camellia japonica* flower and its application products. PhD thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea (2011)
 33. Jeong IY, Lee JS, Oh H, Jung UH, Park HR, Jo SK. Inhibitory effect of hot-water extract of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active compounds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 739-744 (2003)
 34. Lee MH, Jeong JH, Oh MJ. Antioxidative activity of gallic acid in acorn extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 693-700 (1992)
 35. Jang M, Kim YJ, Min JW, Yang DC. Optimisation of extraction method for the quantitative analysis of gallic acid from *Cornus officinalis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 498-502 (2009)
 36. Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalter B, Bartsch H, Haber B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1727-1738 (2003)
 37. De Leo M, Braca A, De Tommasi N, Norscia I, Morelli I, Battinelli L, Mazzanti G. Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves: Isolation and antimicrobial activity. *Planta Med.* 70: 841-846 (2004)
 38. Kanchanapoom T, Kamel MS, Picheansoonthon C, Luecha P, Kasai R, Yamasaki K. Hydrolyzable tannins and phenylpropanoid from *Rafflesia kerrii* Meijer (Rafflesiaceae). *J. Nat. Med.* 61: 478-479 (2007)
 39. Nawwar MAM, Hussein SAM, Merfort I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry* 36: 793-798 (1994)
 40. Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 898-904 (2002)
 41. Li N, Li X, Feng Z, Masayuki Y. Chemical constituents from *Canavalia gladiata*. *J. Shenyang Pharm. Univ.* 24: 676-678 (2007)