

Short Communication



CrossMark

Open Access

잘피 게바다말로부터 폴리페놀 물질(MP-1)의 분리 및 동정

김해선¹, 박년호¹, 석호영², 유상권³, 우정희^{1*}

¹환동해산업연구원, ²영남대학교 자연과학대학 생명과학과, ³강릉원주대학교 생명과학대학 해양식품공학과

Identification of Polyphenol Substances (MP-1) from Seagrass, *Phyllospadix Japonica* Makino

Hae-Seon Kim¹, Nyun-Ho Park¹, Ho-young Suk², Sang-guan You³ and Jung-Hee Woo^{1*} (¹Marine Industry Research Institute for East sea rim, Uljin 36315, Korea, ²Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea, ³Department of Marine Food Science and Technology, College of Life Sciences, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea)

Received: 10 March 2022/ Revised: 23 March 2022/ Accepted: 24 March 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Hae-Seon Kim

<https://orcid.org/0000-0001-7087-4772>

Nyun-Ho Park

<https://orcid.org/0000-0002-0768-034X>

Ho-Young Suk

<https://orcid.org/0000-0002-5338-3362>

Sang-Guan You

<https://orcid.org/0000-0002-8785-7167>

Jung-Hee Woo

<https://orcid.org/0000-0003-4971-7558>

Abstract

BACKGROUND: *Phyllospadix japonica* Makino is a perennial plant belonging to the family Zosteraceae. This species is native to the eastern coast of the Korean Peninsula, and it is found attached to rocks on the seashore. As with all seagrass species, *P. japonica* is also known to play a major role in protecting the marine environment, and studies on its physiological activities suggestive of its antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory potentials have been reported. In this study, purification and structural analysis were performed to identify the polyphenol substances derived from *P. japonica*.

METHODS AND RESULTS: An polyphenol substance MP-1 was purified from the 70% aqueous methanol ex-

tract of *P. japonica* using Diaion® HP-20 column chromatography, ODS column chromatography, and medium-pressure liquid chromatography (MPLC). The purified MP-1 was identified as rosmarinic acid having a molecular weight of 360 and a molecular formula of C₁₈H₁₆O₈ through electrospray ionization (ESI)-mass and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic analysis.

CONCLUSION(S): This study highlights the processes used for the identification of the polyphenol substance derived from *P. japonica*. Rosmarinic acid, the polyphenol derived from *P. japonica* identified by this study, is a kind of bioactive substance mainly present in plants. These findings provide an important starting point and are valuable for future studies on bioactive substances in seagrass.

Key words: *Phyllospadix japonica* Makino, Polyphenol, Rosmarinic acid, Seagrass

* Corresponding author: Jung-Hee Woo

Phone: +82-54-780-3454; Fax: +82-54-780-3469;

E-mail: jhwoo@mire.re.kr

서 론

게바다말(*Phyllospadix japonica* Makino)은 현화식물문(division), 백합강(class), 나자스말목(order), 거마리말과(family), 새우말속(genus)에 속하는 다년초이다. 물속에 완전히 잠겨있거나 간조 시 노출되는 바닷가 암석에 부착, 서식하며 주로 우리나라 동해안에 자생한다. 게바다말은 광합성을 통해 바닷물에 녹아있는 이산화탄소를 흡수하고 산소를 공급하는 기능을 하며, 게바다말의 군락지는 다양한 해양생물 종들에게 적절한 서식지를 제공해준다. 게바다말은 국제자연보존연맹(IUCN)에서 지정한 멸종위기종으로서 2007년 국내 해양수산부에서 보호대상해양생물로 지정하였다. 게바다말을 비롯한 잘피류의 군집분석, 성장 특성 등 주로 생태학적 접근을 근간으로 하는 연구가 주를 이룬다[1, 2]. 잘피류 중 중 하나인 애기거머리말 추출물에 대한 항암, 항산화 등 생리활성 연구가 최근 수행된 바 있으며[3, 4], 게바다말에 함유된 플로보노이드 분석을 수행한 연구도 있다[5].

폴리페놀은 주로 식물에 존재하는 방향족 알코올 화합물의 일종으로 분자 하나에 페놀 그룹이 두 개 이상 있는 작용기로 여러 개의 수산기를 갖고 있는 것이 특징이다. 폴리페놀은 항균, 항알레르기, 항산화, 항암, 당뇨 예방 효과 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다[6].

본 연구는 게바다말 유래의 폴리페놀 물질을 분리 및 정제하고 구조분석을 통하여 물질을 동정하는 것을 목표로 수행되었다.

재료 및 방법

시험재료

시험재료인 게바다말은 2020년 5월 26일 경상북도 포항

시 방석리 연안에서 채취·수집하였다(Fig. 1). 채취된 게바다말은 수돗물로 깨끗이 세척하여 염 및 이물질을 제거한 후, 동결 건조하였고, 건조된 게바다말은 분쇄 과정을 거쳐 분말 형태로 전환되었다.

추출 및 분리

게바다말 건조 분말 3 kg을 70% 메탄올(25 리터)로 60°C에서 3시간씩 2회 추출하였다. 추출물을 감압 농축하여 메탄올을 제거한 뒤 증류수로 희석하여 20 리터로 맞춘 후, Diaion HP-20 resin 2 리터를 넣어 2시간 동안 교반하며 흡착시켰다. 흡착 후 resin을 column에 충전시키고, 30%, 70%, 100% 메탄올 수용액과 acetone을 순차적으로 부가하여 각 8 리터 씩 용출시켰다. 활성 분획은 농축한 후 flash reversed-phase (C18) column chromatography를 수행하였으며, 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올 수용액을 순차적으로 사용하여 용출시켰다. 활성 분획에 대하여 0 - 30% 메탄올 gradient를 용출용매로 하여 ODS MPLC를 수행하였다. 마지막으로 50% 메탄올을 용출용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 활성물질을 정제하였다(Fig. 2).

구조분석

정제한 화합물의 분자량 측정을 위하여 negative 및 positive mode에서 electrospray ionization (ESI) mass (QTRAP-3200 mass spectrometer, Applied Biosystems, USA)를 측정하였다. 또한, 화학구조를 규명하기 위하여 정제된 물질을 DMSO-d₆에 녹여 nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum (JNM-ECZ500R 500 MHz FT-NMR spectrometer, JEOL, Japan)을 측정하였다. ¹H NMR spectrum은 500 MHz, ¹³C NMR spectrum은 125 MHz에서 측정하였으며, chemical shift 값은 내부표준물질로



Fig. 1. *Phyllospadix japonica* Makino.

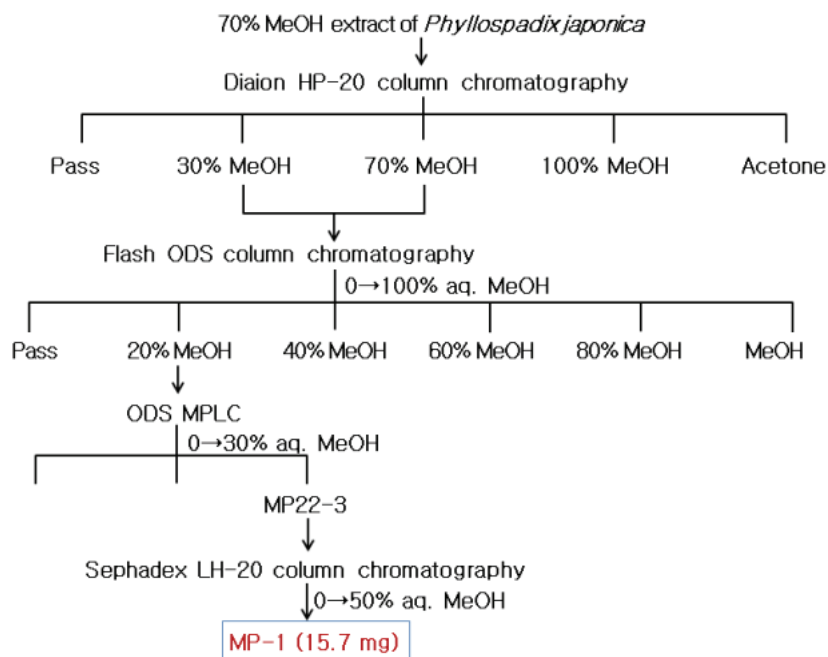


Fig. 2. Isolation procedures of MP-1.

tetramethylsilane을 사용하여 ppm(δ)으로 나타내었다. ^1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 포함한 1차원 NMR spectrum과 더불어 ^1H - ^1H correlation spectroscopy (^1H - ^1H COSY), heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) 등의 2차원 NMR spectrum을 측정하여 최종 해석하였다.

결과 및 고찰

분리 및 정제

계바다말 건조 분말 3 kg을 70% 메탄올로 추출한 후 추출물을 감압 농축하여 메탄올을 제거한 뒤 Diaion HP-20 resin 흡착하였다. 흡착 후 resin을 column에 충전시키고, 30%, 70%, 100% 메탄올 수용액과 acetone을 순차적으로 부가하여 용출한 결과 50%, 70% 메탄올 용출 분획에서 활성을 나타내었다. 활성 분획은 농축한 후 flash reversed-phase column chromatography를 수행한 결과 20% 메탄올 수용액에서 활성을 나타내었으며, 이를 농축한 후 ODS MPLC를 수행하였다. 마지막으로 활성 분획을 농축한 후 50% 메탄올을 용출용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 결과 활성물질 MP-1 15.7 mg을 얻었다.

화학구조 분석

정제된 MP-1에 대하여 ESI-MASS spectrum을 positive mode와 negative mode로 측정한 결과 각각 m/z 383.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 와 m/z 359.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 로 관찰되어 분자량을 360으로 확인하였다.

^1H NMR spectrum의 측정 및 해석: 7.05 (^1H , d, $J=1.5$ Hz), 6.99 (^1H , dd, $J=8.0, 1.5$ Hz), 6.77 (^1H , d, $J=8.0$ Hz), 6.68 (^1H , d, $J=1.5$ Hz), 6.63 (^1H , d, $J=8.0$ Hz), 6.52 (^1H , dd, $J=8.0, 1.5$ Hz) ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 6개의 aromatic methine proton, 7.44 (^1H , d, $J=16.0$ Hz), 6.22 (^1H , d, $J=16.0$ Hz) ppm에서 trans 결합한 이중결합에 기인하는 2개의 proton이 관찰되었다. 또한 3.00 (^1H , dd, $J=14.5, 3.5$ Hz), 2.87 (^1H , dd, $J=14.5, 8.5$ Hz) ppm에서 한 개의 비등가 methylene proton과 5.00 (^1H , dd, $J=9.0, 4.0$ Hz) ppm에서 한 개의 methine proton이 관찰되었다(Table 1).

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: 171.1, 165.9 ppm에 2개의 carbonyl carbon, 148.5, 145.5, 144.8, 143.8 ppm에 oxygenated sp^2 carbon, 145.5, 121.4, 119.9, 116.6, 115.8, 115.4, 114.9, 113.6 ppm에 sp^2 methine carbon, 127.8, 125.4 ppm에 sp^2 quaternary carbon, 73.4 ppm에 methine 및 36.4 ppm에 methylene carbon이 관찰되었다(Table 1).

^1H - ^1H COSY spectrum의 측정 및 해석: 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene을 포함한 4개의 부분구조를 규명하였다(Fig. 3(A)).

HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMQC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 모든 proton-bearing carbon을 규명할 수 있었다. 또한, HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 7.44 ppm의 methine proton으로부터 125.4, 121.4, 114.9 ppm의 carbon에, 7.44, 6.22 ppm의 methine proton으로부터 165.9 ppm의 carbonyl carbon에, 3.00/2.87 ppm의 methylene proton으로부터

Table 1. ¹H NMR and ¹³C NMR chemical shifts of MP-1.

No.	δ _C	δ _H	No.	δ _C	δ _H
1	127.8		1'	125.4	
2	116.6	6.68(¹ H, d, <i>f</i> =1.5 Hz)	2'	113.6	7.05(¹ H, d, <i>f</i> =1.5 Hz)
3	145.5		3'	144.8	
4	143.8		4'	148.5	
5	115.8	6.63(¹ H d, <i>f</i> =8.0 Hz)	5'	115.4	6.77(¹ H, d, <i>f</i> =8.0 Hz)
6	119.9	6.52 (¹ H, dd, <i>f</i> =8.0, 1.5 Hz)	6'	121.4	6.99 (¹ H, dd, <i>f</i> =8.0, 1.5 Hz)
7a,b	36.4	3.00(¹ H, dd, <i>f</i> =14.5, 3.5 Hz), 2.87(¹ H, dd, <i>f</i> =14.5, 8.5 Hz)	7'	145.5	7.44(¹ H, d, <i>f</i> =16.0 Hz)
8	73.4	5.00(¹ H, dd, <i>f</i> =9.0, 4.0 Hz)	8'	114.9	6.22(¹ H, d, <i>f</i> =16.0 Hz)
9	165.9		9'	171.1	

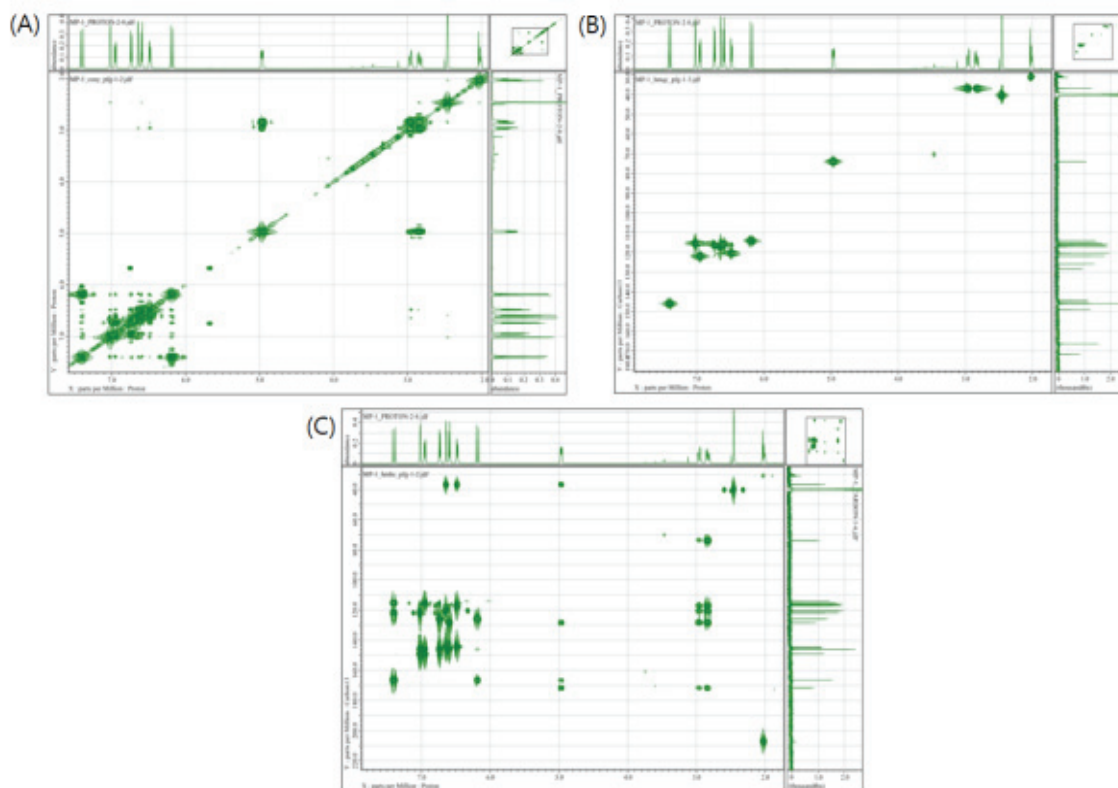


Fig. 3. ¹H-¹H COSY(A), HMQC(B) and HMBC(C) spectra of MP-1.

127.8, 119.9, 116.6 ppm의 carbon에, 5.00 ppm의 methine proton으로부터 171.1, 165.9 ppm의 carbonyl carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 이들 HMBC correlation으로부터 본 화합물의 화학구조를 Fig. 3과 같이 결정하였으며, 이는 앞의 질량분석 결과와 일치하였다. 화학구조를 기반으로 database를 검색한 결과, 본 화합물을 로즈마린산(Rosmarinic acid)으로 동정하였다(Fig. 3(B, C)).

게바다말 유래의 폴리페놀 화합물인 MP-1의 NMR 분석 결과는 레몬밤 유래의 로즈마린산을 ¹H, ¹³C 및 HMBC NMR로 분석한 결과와 동일하여 MP-1을 로즈마린산으로 다시 한

번 확인하였다[7].

또 다른 잘피류인 거머리말에서도 로즈마린산이 발견된 바 있으나, 본 연구결과는 국내 자생종인 게바다말로부터 플라보노이드 이외의 페놀 화합물인 로즈마린산을 처음으로 동정한 결과로 의미가 있다[5, 8]. 천연 폴리페놀 물질인 로즈마린산은 주로 꿀풀과 식물에 많이 존재하는 성분 중 하나로 강한 항산화, 항염, 항균, 항바이러스, 미백 등의 효과가 뛰어나다고 알려져 있다[9, 10]. 로즈마린산은 기능성 소재로서 건강보조식품, 기능성 화장품, 의약품 등 산업적으로 다방면에 활용 가능성이 있음을 시사한다.

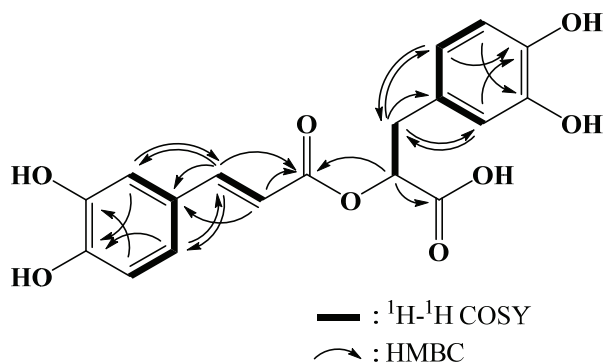


Fig. 4. Two-dimensional NMR correlations of compound MP-1.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the supports of R&D program (Project No. FTIS 2021407D10-2125-0101) provided by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea Forest Service (Korea Forestry Promotion Institute) and Gyeongsangbuk-do R&D project.

References

- Shin JD, Ahn JK, Kim YH, Lee SB, Kim JH, Chung IK (2008) Community structure of benthic marine algae at daejin and Jukbyeon on the mid-east coast of Korea. *Algae*, 23(3), 231-240. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2008.23.3.231>.
- Shin JD, Ahn JK, Kim YH (2011) Structure of the subtidal marine plant community on the east coast of Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(1), 85-94. <https://doi.org/10.5657/kfas.2011.44.1.085>.
- Jung ME, Hong JW, Lee JI, Kong CS, Chang JS, Seo YW (2012) Inhibitory effect of *Zostera japonica* on growth of human cancer cells. *Ocean and Polar Research*, 34(4), 385-394. <https://doi.org/10.4217/OPR.2012.34.4.385>.
- Kwak MK, Kim DS, Oh KS, Seo YW (2014) Antioxidant activity of the seagrass *Zostera japonica*. *KSBB Journal*, 29(4), 271-277. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2014.29.4.271>.
- Takagi M, Funahashi S, Ohta K, Nakabayashi T (1979) Flavonoids in the sea-grass, *Phyllospadix japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(11), 2417-2418. <https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863833>.
- Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3963-3966. <http://doi.org/10.1021/jf990347p>.
- Akoury E (2019) Isolation and structural elucidation of rosmarinic acid by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *American Research Journals of Chemistry*, 1(1) 17-23. <http://doi.org/10.21694/2577-5898.17003>.
- Lee YR, Lee YJ, Row KH (2014) Extraction of caffeic acid and rosmarinic acid from *Zostera marina* based on ionic liquids and deep eutectic solvent. *Korean Chemical Engineering Research*, 52(4), 481-485. <https://doi.org/10.9713/kcer.2014.52.4.481>.
- Luo C, Zou L, Sun H, Peng J, Gao C, Bao L, Ji R, Jin Y, Sun S (2020) A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 153. <http://doi.org/10.3389/fphar.2020.00153>.
- Petersen M, Simmonds MS (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125. [http://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00513-7](http://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00513-7).