

高等植物中の Polyphenol 成分에 관한 연구(III)

朴 秀 善 · 金 敬 順

숙명여자대학교 약학대학

Studies on Polyphenols in Higher Plants (III)

Soo Sun P_{ARK} and Kyung Soon K_{IM}

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul, Korea

In *Cnidium officinale* MAKINO and *Platycodon grandiflorum* A. DE CANDOLE, chlorogenic acid was identified by R_f values, color reactions on paper chromatograms and UV-absorption spectra of the eluate of phenolic spots. And isochlorogeni acid-like substance was also found in the former.

l-Phenylalanine-U-C¹⁴ and sodium acetate-2-C¹⁴ were fed to both plants and their incorporation ratio to chlorogenic acid and isochlorogenic acid-like substance was compared. Phenylalanine was better precursor for chlorogenic acid in both plants than acetate. But acetate showed higher incorporation ratio to isochlorogenic acid-like substance in *Cnidium officinale* than that of phenylalanine.

서 론

Chlorogenic acid는 polyphenol성분으로 식물계에 널리 분포되어 있으며,^{1,2)} 식물생리에 중요한 위치를 차지하고 있고^{3,4)} 동물생리에도 영향을 미치고 있다.⁵⁾ chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid가 ester결합을 하여 형성된 것으로 식물체중에 그 isomer와 공존하고 있는 예가 많다. ^{3,4,6)} 그 생합성에 관해서 TAMARI⁷⁾는 벼의 묘(苗)에 glucose-1 phosphatepyruvate, acetate를 흡수시켜 chlorogenic acid가 sedoheptulose-1,7-diphosphate, 5-dehydroquinic acid, shikimic acid, phenylpropane체를 거쳐 형성됨을 추정하였다. GEISSMANN과 SWAIN⁸⁾은 phenylalanine-2-C¹⁴을 tobacco (*Nicotiana tabacum*)의 어린 식물체에 흡수시켜 caffeic acid에 phenylalanine의 phenylpropane체가 그대로 이행됨을 보고하였다. 차⁹⁾은 C¹⁴표식화합물을 모밀에 흡수시켜 chlorogenic acid, isomer 및 rutin이 상호전환될까 caffeic acid가 이 전환의 기초물질임을 보고하였다. 저자는 고등식물종의 polyphenol 성분을 조사하기 위하여 도라지 및 천궁의 methanol 추출액을 paper chromatography로 검색한 결과 chlorogenic acid와 유사한 물질이 존재함을 알고 이

를 분리확인 하였으며 또한 동일한 화합물이 이종식물체에서 동일한 경로로 합성되는가를 검토하기 위하여 C¹⁴ 표식화합물로 처리하여 그 생합성을 검토하였다.

실 험

1. 실험재료

도라지 *Platycodon grandiflorum* A. DE CANDOLE 및 토천궁 *Cnidium officinale* MAKINO를 숙대약초원에서 개화기에 채집하였다.

2. Polyphenol 물질의 분리확인

추출 : 도라지 및 천궁의 신선한 지상부약 5g을 조절하고 10배량의 열 methanol을 가하여 50°C의 수욕상에서 30분간 추출냉각한 다음 여과하였다.

분리 : 분리는 paper chromatography (PPC) 및 thin-layer chromatography (TLC) 법으로 하였다. PPC는 Whatman No.1 filter paper에 도라지와 토천궁의 methanol 추출액을 점적하여 n-butanol: acetic acid water (4 : 1 : 5)를 전개제로 하여 상승법으로 전개시켰다. 이 paper를 건조시킨 후 UV light에서 chlorogenic acid 특유의 청색형광을 발하고 ammonia 증기에 의해서 황록으로 변하는 phenolic spot를 올려내어 세정한 후 metha-

anol로 강하게 진탕하여 추출하였다. 이 phenolic spot의 methanol 추출액을 n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 5); 70% ethanol, isobutanol: water (6 : 4), 2% acetic acid, 80% phenol, ethyl acetate: pyridine: water (5 : 2 : 5), ethylacetate: ormic acid: water (10 : 2 : 3)을 전개제로 하여 전개시켜 Rf치를 측정하였다. 이들 chromatogram상에 각종시액 즉 1% FeCl₃의 methanol용액, 1% phosphomolybdic acid의 0.5N-KOH-methanol용액 ammonical silver nitrate용액, 10% basic lead acetate 용액, 및 Hoefner's reagent를 분무하여 발색시켰다. TLC는 silica gel G (Merck)를 Shandon Unoplan으로 250μ의 박층을 만들어 활성화시킨 후 도라지 및 토천궁의 phenolic spot의 methanol추출액을 점적하여 n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 5)로 전개시켜 5% FeCl₃의 methanol용액으로 phenolic spot를 발색시켰다.

UV absorption spectrum: 도라지 및 토천궁의 methanol 추출액을 2차원 PPC(1차전개체로 n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 5) 2차전개체로 2% acetic acid를 사용)를 행하여 phenolic spot를 분리하였다. 이 paper를 완전히 건조시킨 후 phenolic spot를 올려내어 세절하여 methanol로 추출하고 이액을 여과하여 여액을 Beckman Model DU Spectrophotometer로 250mμ에서 340mμ까지 흡광도를 측정하였다.

3. C¹⁴ 표지화합물의 흡수

흡수: 도라지 및 토천궁을 수중에서 예리한 칼로 경부를 지르고 곧 l-phenylalanine-U-C¹⁴ 50μ Ci, sodium acetate-2-C¹⁴ 50μ Ci (Radiochemical Center Amersham, Buckinghamshire England에서 구입)을 각각 2cc로 한 시험관에 흡수시킨 후 계속 소량의 증류수를 가하여 흡수시켰다. 흡수가 끝난 후 증류수가 들어있는 다른 beaker에 옮겨 24시간 생합성 시켰다.

Phenolic spot의 분리: 24시간 생합성 시킨 후 전술한 방법으로 methanol추출액을 만들어 2차원 PPC로 phenolic spot를 분리하였다.

Radioactivity의 측정: strip paper counting method로 측정하였다. 즉 분리한 phenolic spot를 올려내어 세절한 후 특수 placet에 넣어 scintillator 15ml를 넣고 LSC-601 Aloka Liquid Scintillation Counter로 20분간 2회 연속하여 radioactivity를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Polyphenol물질의 분리 확인

polyphenol물질을 분리하기 위하여 PPC, TLC를 행한 결과 도라지에서 1개의 phenolic spot(spot I이라 함)을

볼 수 있었으며 천궁에서는 2개의 phenolic spot(spot I 및 spot II라 함)을 볼 수 있었다. TLchromatogram상의 각 spot의 위치는 Fig. 1과 같다.

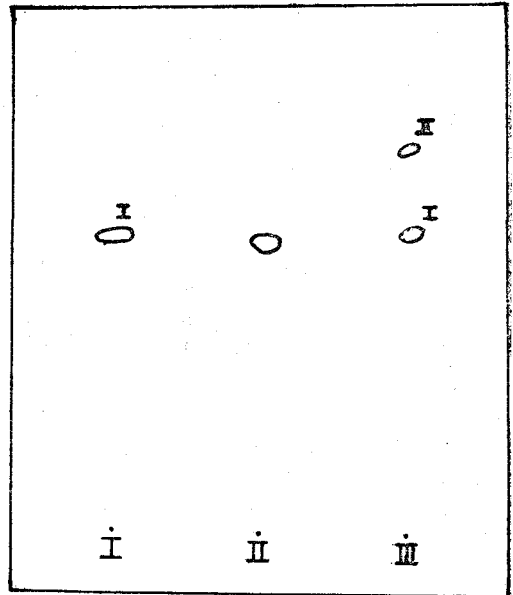


Fig 1. Thin-layer chromatogram of polyphenols in materials and chlorogenic acid. Developing solvent: n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 5) coloring reagent: 5% FeCl₃ alcoholic solution I: *Platycodon grandiflorum* II: Authentic chlorogenic acid III: *Cnidium officinale*.

천궁의 spot I은 authentic chlorogenic acid와 같은 위치의 spot를 말한 것이고 천궁의 spot II는 authentic chlorogenic acid의 위치보다 높은 위치의 spot를 지칭한 것이다.

각 spot와 authentic chlorogenic acid의 각종 전개제에 의한 Rf치 및 각종시액을 분무한 정색결과는 Table I 및 Table II와 같다.

도라지의 spot I과 천궁의 spot I은 authentic chlorogenic acid와 그 Rf치가 거의 일치하였고 그 정색반응은 동일하였다.

천궁의 spot II는 authentic chlorogenic acid의 Rf치와 차이가 있으나 정색반응은 동일하였다. 각 spot의 methanol 추출액과 authentic chlorogenic acid의 methanol용액의 UV absorption spectrum을 측정할 결과는 Fig. 2와 같다.

Table I. R_f values of polyphenols in materials

Solvent	<i>Platycodon grandiflorum</i>	<i>Cnidium officinale</i>		Authentic chlorogenic acid
	spot I	spot I	spot II	
n-Butanol:Acetic acid:Water (4 : 1 : 5)	0.64	0.62	0.82	0.64
Ethylacetate:Formic acid:Water (10 : 2 : 3)	0.92	0.91	0.81	0.93
70% Ethanol	0.63	0.64	—	0.63
Isobutanol:Water (6 : 4)	0.12	0.12	0.39	0.12
2% Acetic acid	0.53	0.54	—	0.56
80% Phenol	0.54	0.56	0.39	0.55
Ethyl acetate:Pyridin:Water (5 : 2 : 5)	0.78	0.80	0.70	0.75

Table II. Color reactions of polyphenols in materials

Reagent	<i>Platycodon grandiflorum</i>	<i>Cnidium officinale</i>		Authentic chlorogenic acid
	spot I	spot I	spot II	
FeCl ₃	grey green	grey green	grey green	grey green
UV-Fluorescence	blue	blue	blue	blue
UV-Fluorescence with NH ₃	yellowish green	yellowish green	yellowish green	yellowish green
Hoefner's	red brown	red brown	red brown	red brown
Ammonical silver Nitrate	brown	brown	brown	brown
Phosphomolybdic acid	yellow	yellow	yellow	yellow
Basic Lead Acetate	yellow	yellow	yellow	yellow

Table III. Comparison of C¹⁴-labeled compounds as precursors of polyphenols in materials

materials	compound administered	amount administered per gr. of fresh plant dpm/gr	activity of isolated polyphenol per gr. of fresh plant		percent recovered	
			spot I	spot II	spot I	spot II
<i>Platycodon grandiflorum</i>	phenylalanine-U-C ¹⁴	1.83 × 10	19.0 × 10 ⁴	1.04	0.055	
	sodium acetate-2-C ¹⁴	1.84 × 10	1.02 × 10 ⁴			
<i>Cnidium officinale</i>	phenylalanine-U-C ¹⁴	2.42 × 10	22.7 × 10 ⁴	4.03 × 10 ⁴	0.938	0.116
	sodium acetate-2-C ¹⁴	2.64 × 10	4.59 × 10 ⁴	11.8 × 10 ⁴	0.174	0.424

각 spot의 spectrum과 authentic chlorogenic acid의 spectrum이 유사하였다. 이상의 실험결과로 보아 도라지의 spot I과 천궁의 spot I은 chlorogenic acid라 할 수 있었다. 천궁의 spot II는 chlorogenic acid와 R_f치에는 차이가 있으나 정색반응과 UV absorption spectrum은 동일하였다. 이것으로 천궁의 spot II는 chlorogenic acid의 이성체라고 생각된다.

2. Polyphenol물질의 생합성

도라지 및 천궁에 각각 50μ Ci의 L-phenylalanine-U-C¹⁴

과 50μ Ci의 sodium acetate-2-C¹⁴을 흡수시킨 후 24시간 대사시켜 그 radioactivity가 chlorogenic acid로 이행됨을 비교한 결과가 Table III와 같다.

phenylalanine의 radioactivity는 도라지의 spot I 및 천궁의 spot I에 동일한 정도의 높은 이행율을 보였으며 acetate는 phenylalanine에 비해 비교적 낮은 이행율을 나타냈다. 이와는 대조적으로 천궁의 spot II에서는 phenylalanine보다 acetate의 이행율이 높았다.

GEISSMANN과 SWAIN⁸⁾이 tobacco(*Nicotiana tabacum*)에 phenylalanine-2-C¹⁴을 흡수시켜 그 phenylpropane-

체의 골격이 변화받지 않고 그대로 caffeic acid에 이행됨을 보고하였다. 본실험에서도 phenylalanine의 radioactivity가 chlorogenic acid로의 이행율이 높은 것은 phenylpropane체가 chlorogenic acid의 구성성분인 caffeic acid로 이행되어 높은 이행율을 나타낸 것이라고 생각된다. TAMARI⁷⁾는 glucose -1-phosphate pyruvate, 5-dehydroquinic acid shikimic acid, phenylpropane체를 거쳐 chlorogenic acid가 생성됨을 보고한 것과 같이 acetate로부터 형성되는 것보다도 shikimic acid 합성경로에 의해서 형성되는 것으로 추정된다.

결론

1. 도라지 및 천궁에서 PPC 및 TLC 상의 Rf치와 정색반응 및 UV absorption spectrum에 의해서 chlorogenic acid가 존재함을 확인하였으며 천궁에서는 isochlorogenic acid와 유사한 물질이 존재함을 알았다.

2. phenylalanine이 도라지 및 천궁에서 chlorogenic acid의 양호한 전구물질이라고 생각되며 천궁의 isochlorogenic acid와 유사한 물질에서는 acetate가 phenylalanine보다 더 양호한 전구물질이었다.

<1974.11.20 접수>

문헌

- 1) URITANI, I., and MIYANO, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 29, 151 (1955).
- 2) HERRMANN, K.: *Pharmazie* 11, 443 (1956).
- 3) IMASEKI, H.: *Bot. Mag. Tokyo.* 72, 316 (1959).
- 4) SHIBAOKA, H., and IMASEKI, H.: *Bot. Mag. Tokyo.* 70, 362 (1957).
- 5) CZOK, G.: *Proc. Int. Congr. Nutr.* 7th 5, 830 (1966).
- 6) 朴秀善: 숙대논문집 제2집, 409 (1962).
- 7) TAMARI, K.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 31, 538 (1956).

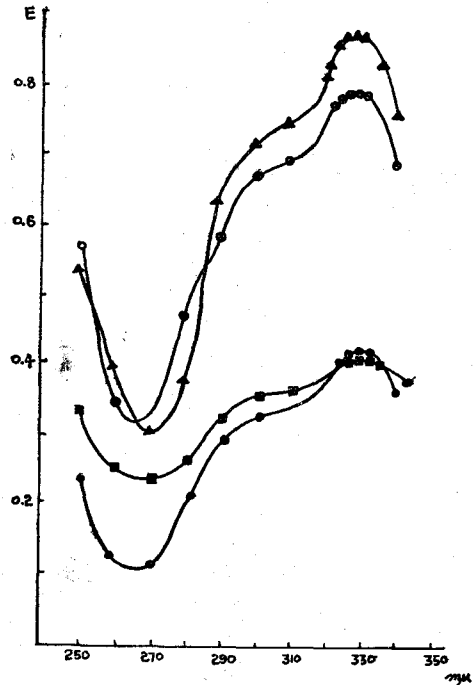


Fig. 2. UV absorption spectra of eluate of spots and chlorogenic acid:

- spot I of *Platycodon grandiflorum*
- spot I of *Cnidium officinale*
- spot II of *Cnidium officinale*
- authentic chlorogenic acid

- 8) GEISSMAN, T.A., and SWAIN, T.: *Chem & Ind.* 984 (1957).
- 9) 朴秀善: 숙대논문집 제4집, 341 (1964).