

## 신선초에서 페놀성 화합물의 분리 및 이들의 DPPH 라디칼 소거활성

조현우, 박종철\*

국립순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소

### Phenolic Compounds Isolated from the Leaves of *Angelica keiskei* Showing DPPH Radical Scavenging Effect

Hyun Woo Jo and Jong Cheol Park\*

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

**Abstract** – From the leaves of *Angelica keiskei* (Umbelliferae), luteolin, protocatechuic acid, guaijaverin, hyperoside and cynaroside were isolated and characterized by spectral data. Luteolin and protocatechuic acid showed potent DPPH radical scavenging activity.

**Key words** – *Angelica keiskei*, luteolin, protocatechuic acid, antioxidant, DPPH

신선초(*Angelica keiskei*)는 미나리과에 속하는 다년생 초목이다. 원산지인 일본의 하지조우 섬(八丈島) 사람들은 명일엽(明日葉)으로서 아시타바(ashitaba) 라고 부른다.<sup>1)</sup> 중국 명나라 때 이시진이 쓴 본초강목에는 도관초(都官草)라는 이름으로 기록되어 있으며 시중에서는 신선초, 선삼초, 신립초, 선약초 또는 겉모양이 당귀와 비슷하여 매일당귀라고도 불리고 있다.<sup>2)</sup>

1970년대 말에 처음 들어와서 제주도를 비롯하여, 전라도, 서울근교, 강원도 등지에서 대량으로 재배되고 있다.<sup>3)</sup> 신선초는 예로부터 고혈압, 간질환, 신경통 등 각종 만성질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 신선초 녹즙에는 흰쥐의 간 기능을 개선하는 효과, 혈장 콜레스테롤을 감소시키는 효과, 돌연변이를 탁월하게 억제하는 효과 또한 보고되어 있다.<sup>5)</sup> 그리고 carotenoid와 플라보노이드 등의 성분도 알려져 있다.<sup>6)</sup> 신선초의 잎을 이용한 기능성 식품 개발 연구의 일환으로서 신선초에서 수종의 페놀성 화합물을 분리하고 이들의 DPPH 소거활성을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

**실험재료 및 기기** – 실험에 사용한 신선초 잎은 2006년

5월 제주도에에서 재배한 것을 구입, 음건하여 사용 하였으며 표준품(NM-AKE-0605)은 순천대학교 한약자원학과 표본실에 보관 중이다.

**시약 및 기기** – NMR은 Bruker사의 AMX-400 spectrophotometer(Germany)를 사용하여 400 MHz(<sup>1</sup>H-NMR)와 100 MHz (<sup>13</sup>C-NMR)에서 측정하였다. Column chromatography용 충전제로는 silica gel 60(70-230 mesh, No. 7734, Merck, Germany)과 Sephadex LH-20(25-100 μ, Sigma, USA), TLC plate는 Merck사의 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub>(No. 5735, Germany)를 사용하였다.

**추출 및 분획** – 음건 세절한 신선초 잎 2.5 kg을 MeOH에 4시간 동안 3회 추출하여 500 g의 추출물을 얻었다. 이 추출물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O 순으로 계통분획하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물 100 g, EtOAc 분획물 30 g, n-BuOH 분획물 50 g, H<sub>2</sub>O 분획물 320 g을 얻었다.

**DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 효능검색** – 신선초 잎 MeOH 추출물, 분획물 및 분리 화합물을 농도별로 MeOH에 희석한 용액 1 ml와 0.1 mM DPPH(Sigma, USA) EtOH 용액 1 ml를 96-well plate에서 혼합하여 실온에서 빛을 차단하고 30 분간 반응시킨 후, microplate reader (Emax, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 측정하였다. Control은 MeOH와 DPPH 용액의 흡광도로 하였으며, positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다. 항산화 효능은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능(IC<sub>50</sub>)

\*교신저자(E-mail) : jcpark@sunchon.ac.kr  
(FAX) : 82-61-752-8551

으로 표시하였으며, 다음의 계산식을 사용하였으며 5회 반복 실험하여 데이터를 구하였다.

$$\text{Inhibition activity (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{비첨가군의 흡광도}} \right\} \times 100$$

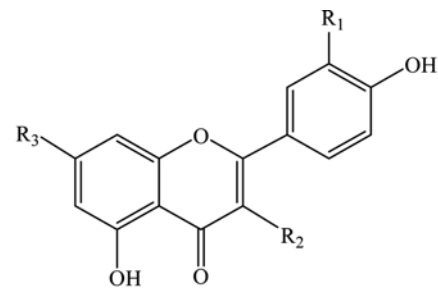
**화합물 분리** - 신선초 잎의 MeOH 추출물의 EtOAc 분획물(30 g)을 silica gel(70-230 mesh, 560 g) column(6.3x79 cm) chromatography를 행하여 용출용매로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 혼합용매(5:1:1, 25:8:5, 7:3:1, 65:35:10, 하층)를 사용하여 7개의 subfraction으로 나누었다(AKE1~7). AKE2 fraction을 용출용매로 acetone과 MeOH을 사용한 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 화합물 1을 분리하였으며, AKE3 fraction을 acetone을 사용한 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 화합물 2를 단일물질로 분리하였고, AKE3과 4 fraction에서 MeOH로 재결정을 유도하여 화합물 3과 4를, AKE6 fraction에서는 화합물 5를 단일물질로 분리하였다.

**화합물 1(luteolin)** - <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 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); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 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 2(protocatechuic acid)** - <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.43(1H, dd, *J*=1.9 & 7.6 Hz, H-6), 7.41(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-5), 6.81(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.42(-COOH), 151.43(C-4), 146.05(C-3), 123.85(C-1), 123.43(C-6), 117.74(C-2), 115.73(C-2).

**화합물 3(quercetin 3-O-α-L-arabinopyranoside)** - <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.65(1H, dd, *J*=2.2 & 8.4 Hz, H-6'), 7.51(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 6.84(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.40(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.20(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.27(1H, d, *J*=5.16 Hz, H-1"); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 177.5(C-4), 164.1(C-7), 161.2(C-5), 156.1(C-9), 156.1(C-2), 148.5(C-4'), 144.9(C-3'), 133.7(C-3), 122.0(C-6'), 120.8(C-1'), 115.6(C-2'), 115.3(C-5'), 103.7(C-10), 101.3(C-1"), 98.7(C-6), 93.5(C-8), 71.6(C-3"), 70.7(C-2"), 66.0(C-4"), 64.2(C-5").

**화합물 4(quercetin 3-O-β-D-galactopyranoside)** - <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.66(1H, dd, *J*=2.2 & 8.4 Hz, H-6'), 7.52(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 6.81(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.40(1H, d, *J*=2.02 Hz, H-8), 6.19(1H, d, *J*=2.02 Hz, H-6), 5.37(1H, d, *J*=7.69 Hz, H-1"); <sup>13</sup>C-



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	OH	H	OH
3	OH	O-arabinose	OH
4	OH	O-galactose	OH
5	OH	H	O-glucose

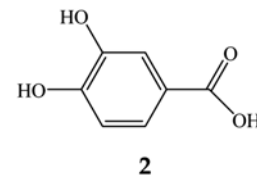


Fig. 1. Structures of compounds 1-5.

NMR(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 177.4(C-4), 164.1(C-7), 161.1(C-5), 156.2(C-9), 156.2(C-2), 148.4(C-4'), 144.7(C-3'), 133.4(C-3), 121.9(C-1'), 121.0(C-6'), 115.9(C-5'), 115.1(C-2'), 103.8(C-10), 101.7(C-1"), 98.7(C-6), 93.5(C-8), 75.8(C-5"), 73.1(C-3"), 71.1(C-2"), 67.8(C-4"), 60.1(C-6").

**화합물 5(luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside)** - <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.45(1H, dd, *J*=2.2 & 8.3 Hz, H-6'), 7.42(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 6.90(1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.75(1H, s, H-3), 6.79(1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.45(1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 5.07(1H, d, *J*=7.16 Hz); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 181.8(C-4), 164.4(C-2), 162.9(C-7), 161.1(C-5), 156.9(C-9), 149.8(C-4'), 145.7(C-3'), 121.3(C-1'), 119.1(C-6'), 115.9(C-5'), 113.5(C-2'), 105.3(C-10), 99.8(C-1"), 99.5(C-6), 94.7(C-8), 77.1(C-5"), 76.3(C-3"), 73.1(C-2"), 69.5(C-4"), 60.5(C-6").

## 결과 및 고찰

신선초 잎에서 분리한 화합물 1은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 meta coupling하고 있는 두 aromatic signal [δ6.45(1H, d, *J*=2.04 Hz), δ6.20(1H, d, *J*=2.04 Hz)]과 서로 ortho, meta coupling하는 peak [δ7.42(1H, dd, *J*=8.26 & 2.20 Hz), δ7.40(1H, d, *J*=2.20 Hz), δ6.90(1H, d, *J*=8.26 Hz)]가 관측된다. 그리고 δ6.68(1H, s)의 singlet는 C-3에 결합하고

**Table 1.** DPPH radical scavenging activities of MeOH extract and its fractions of the leaves of *Angelica keiskei*.

Sample	IC <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>a)</sup>
MeOH ext.	66.26
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fr.	> 100
EtOAc fr.	13.11
<i>n</i> -BuOH fr.	13.97

<sup>a)</sup>Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical

**Table 2.** DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from the leaves of *Angelica keiskei*.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a)</sup>
1	5.5
2	6.8
3	17.3
4	13.1
5	17.2
L-ascorbic acid	14.1

<sup>a)</sup>Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical

있는 proton의 signal로 추정된다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에 나타난 모든 peak들은 luteolin 문헌치<sup>7)</sup>와 잘 일치하여 화합물 1은 luteolin로 확인하였다.

화합물 2는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 서로 ortho, meta coupling하는 [7.43(1H, dd, *J*=1.9 & 7.6 Hz), 7.41(1H, d, *J*=7.6 Hz), 6.81(1H, d, *J*=1.9 Hz)] signal들이 관측되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 δ 151.06~112.69 까지 6개의 singnal은 벤젠 peak이며, 167.16(-COOH)등을 문헌치<sup>8)</sup>와 비교할 때 이 화합물은 protocatechuic acid(3,4-dihydroxy benzoic acid)로 동정하였다.

화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 meta coupling하고 있는 두개의 peak [δ6.40(1H, d, *J*=2.0 Hz), δ6.20(1H, d, *J*=2.0 Hz)]와 ortho, meta coupling하는 peak[δ7.65(1H, dd, *J*=2.2 & 8.4 Hz), δ7.51(1H, d, *J*=2.2 Hz), δ6.84(1H, d, *J*=8.4 Hz)]외에 δ5.27(1H, d, *J*=5.16 Hz)의 anomeric proton으로 이 화합물은 quercetin에 1 mole의 당이 결합하는 배당체임을 알 수 있다. 당은 <sup>13</sup>C-NMR data에서 arabinose [101.3(C-1"), 71.6(C-3"), 70.7(C-2"), 66.0(C-4"), 64.2(C-5")]임을<sup>9)</sup>확인하였다. 이상의 결과를 문헌치<sup>10)</sup>와 비교하여 화합물 3은 quercetin 3-O-α-L-arabinopyranoside(guaijaverin)으로 그 구조를 확인하였다.

화합물 4의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum 양상은 화합물 3과 유사하였으므로 비교 분석에서 aglycone은 quercetin으로 확인하였다. δ5.37(1H, d, *J*=7.69 Hz)에서 관측된 proton signal은 당이 β-form으로 결합하고 있음을 알 수 있으며, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 1 mole의 당은 galactose [101.7(C-1"),

75.8(C-5"), 73.1(C-3"), 71.1(C-2"), 67.8(C-4"), 60.1(C-6")]임을 확인하였다. 따라서 화합물 4는 문헌치<sup>11)</sup>와 비교해서 quercetin 3-O-β-D-galactopyranoside(hyperoside)로 동정했다.

화합물 5의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 algycone은 화합물 1과 유사하여 luteolin임을 알 수 있으며, δ5.07(1H, d, *J*=7.16 Hz)에서 관측되는 proton signal은 당이 β-form으로 결합하고 있음을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum 분석에서 당은 glucose[99.8(C-1"), 77.1(C-5"), 76.3(C-3"), 73.1(C-2"), 69.5(C-4"), 60.5(C-6")]임을 알 수 있고, 결합위치는 C-7이 약 1.4ppm 정도 고자장 이동하므로 luteolin의 C-7에 당이 결합함을 알 수 있다. 문헌치<sup>11)</sup>와 비교하여 화합물 5는 luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside(cynaroside)로 결정하였다. 이중 화합물 1과 2는 신선초에서는 처음으로 분리한 성분이다.

신선초 잎의 MeOH 추출물과 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH)을 대상으로 DPPH radical 소거능을 측정하였다 (Table 1). MeOH 추출물은 66.45 μg/ml의 IC<sub>50</sub> 값으로 DPPH radical 소거능을 보였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 분획물은 각각 100 μg/ml 이상, 13.57 μg/ml 및 13.97 g/ml로서 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물이 우수한 활성을 보였다. 이 분획물에서 분리한 5종 화합물을 대상으로 DPPH radical 소거능을 관찰하였다(Table 2). 화합물 1과 2는 IC<sub>50</sub> 값이 각각 5.5 μM, 6.8 μM로서 양성대조군으로 사용한 L-ascorbic acid 보다 강한 DPPH radical 소거능을 보였다. 화합물 3, 4 및 5도 다소 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다.

## 결론

신선초 잎의 MeOH 추출물의 EtOAc 분획물에서 5종의 화합물을 분리하였으며 분광학적 분석을 통해 luteolin(1), protocatechuic acid(2), guaijaverin(3), hyperoside(4), cynaroside(5)로 동정하였다. 화합물 1, 2는 신선초에서는 처음으로 분리된 성분이며, DPPH 라디칼 소거활성 검색에서도 강한 활성을 보였다.

## 인용문헌

- Enoki, T., Ohnogi, H., Nagamine, K., Kudo, Y., Sugiyama, K., Tanabe, M., Kobayashi, E., Sagawa, H. and Kato, I. (2007) Antidiabetic activities of chalcones isolated from a japanese herb, *Angelica keiskei*, *J. Agri. Food Chem.* **55**(15): 6013-6017.
- 송주택 (1994) 한국자원식물, 220, 미도문화사, 서울.
- 박은령, 이해정, 이명렬, 김경수 (1997) 신선초의 식용부위별 향기성분, *한국식품과학회지* **29**(4): 641-647.
- 김소중, 조정용, 위지향, 장미영, 임요섭, 김철, 신수철, 문제학, 박근형 (2005) 신선초에 함유된 항산화물질

- Psoralen 유도체들의 단리 및 동정, *한국식품과학회지* **37**(4): 656-659.
5. Park, J. C., Park, J. R., Chung, S. K., Yu, Y. B., Ha, J. O. and Park, K. Y. (1997) Antimutagenic activity of the methanol extract and compounds of *Angelica keiskei* in the Salmonella assay system, *Kor. J. Pharmacogn.* **28**(2): 80-83.
  6. 박정로, 박석규, 조영숙, 진순실, 최성희, 박종철 (1997) *Angelica keiskei* 가 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향, *한국식품영양과학회지* **26**(2): 308-313.
  7. 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 *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae), *Phytother. Res.*, **21**(1):32-36.
  8. 문성필, 구창섭 (2006) Characterization of low molecular weight polyphenols from *Pinus radiata* Bark, *Food Sci. Biotechnol.* **15**(3): 424-430.
  9. 권용수, 인고길, 김창민 (2000) 강활의 활성성분, *생약학회지* **31**(3): 284-287.
  10. Fraisse, D., Heitz, A., Carnat, A. and Lamaison, J. L. (2000) Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*, *Fitoterapia* **71**(4): 463-464.
  11. 박종철, 유영범, 이종호, 최명락, 옥광대 (1996) *Angelica keiskei* 지상부의 화학성분, *생약학회지* **27**(1): 80-82.
  12. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199-1200.
  13. Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**(11): 317.
  14. Choi, J. S., Han, S. Y., Park, J. C., Choi, J. H and Woo, W. S. (1986) Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*, *Arch. Pharm. Res.* **9**(4): 233-236.
  15. 임현우, 강성진, 박민, 윤정혜, 한병훈, 최선은, 이민우 (2006) Antioxidative and nitric oxide production inhibitory activities of phenolic compounds from the fruits of *Actinidia arguta*, *Nat. Prod. Sci.* **12**(4): 221-225.
  16. 정창호, 배영일, 심기환, 최진상 (2004) 질경이 추출물의 DPPH 라디칼 소거효과 및 항균활성, *한국식품영양과학회지* **33**(10): 1601-1605.
  17. Hatano, T. (1995) Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species tannins and related polyphenols. *Natural Medicines.* **49**(14): 357-363.
  18. Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Ogata, A., Shima, Y., Fujimoto, M., Yamadori, T., Ohkawara, T., Kuwabara, Y., Kawai, M., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Maezaki, N., Tanaka, T., Kawase, I. and Tanaka, T. (2006) Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**(1): 1-7.
  19. Kim, H. J., Kim, E. J., Seo, S. H., Shin, C. C., Jin, C. B., Lee, Y. S. (2006) Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from gardeniae fructus, *J. Nat. Prod.* **69**(4): 600-603.

(2008년 5월 21일 접수)