

고등식물 중의 Polyphenol 성분에 관한 연구(II)

朴 秀 善

숙명여자대학교 약학대학

Studies on Polyphenols in Higher Plants(II)

Soo Sun P_{ARK}

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

In *Peucedanum japonicum* and *Aster tataricus* L. chlorogenic acid was identified by methods of P.P.C. and T.L.C.

L-Phenylalanine-U-¹⁴C and sodium acetate-2-¹⁴C were administered to *Peucedanum japonicum*, L-Tyrosine-U-¹⁴C to *Aster tataricus* and caffeic acid-carboxyl-¹⁴C and L-tyrosine-U-¹⁴C to *Fagopyrum esculentum* MOENCH. The incorporation of each compound into chlorogenic acid was compared.

L-Phenylalanine-U-¹⁴C showed higher incorporation to chlorogenic acid than sodium acetate-2-¹⁴C in *Peucedanum japonicum*. Caffeic acid-carboxyl-¹⁴C was higher to chlorogenic acid than L-tyrosine-U-¹⁴C in *Fagopyrum esculentum*. L-Tyrosine-U-¹⁴C was comparatively low in *Aster tataricus*.

서 론

著者は 모밀 *Fagopyrum esculentum* MOENCH 植物體中에서 C₆C₈部分을 그 構成成分으로서 共通의으로 가지고있는 rutin 과 chlorogenic acid의 代謝에 關한 實驗結果를 報告한바 있다⁽¹⁾. chlorogenic acid는 그 異性體와 混在하여 植物界에 널리 分布되어 있으며^{2,3)} 이物質은 polyphenoloxidase와 같은 酵素에 의하여 容易하게 酸化되어 quinone으로 되고 이것이 蛋白質의 Amino基와 結合하여 褐色物質이 形成된다고 推定하고 있다⁽⁴⁾. 특히 罹患植物의 組織에 chlorogenic acid의 蓄積이 일어난다는것은 病原菌에 對한 強한 抵抗性인 것으로 解釋되고있다. 植物體의 罹患組織에서 chlorogenic acid의 生成機作은 pentose phosphate cycle에 依한 代謝가 旺盛하여 3,4-dioxy-cinnamic acid의 生成이 增加되고 chlorogenic acid의 蓄積이 일어난다^{4,5)}. TAMARI 등은 稻苗를 使用하여 chlorogenic acid의 生合成에 關한 實驗結果에서 chlorogenic acid는 shikimic acid의 經路에 依해 形成됨을 推定하였고 URITANI 등은 高구마 組織의 切片에 phenylcarboxylic acid-2-¹⁴C을

吸收시켜 chlorogenic acid의 生成過程을 밝힌바 있다^(6,7). 著者は 高等植物中의 polyphenol成分을 調査하는 일의 一端으로서 P.P.C. 및 T.L.C.法으로 갯기름나무 *Peucedanum japonicum*, 개미취 *Aster tataricus* L.의 兩植物體中에서 chlorogenic acid를 分離 確認하였다. 또한 同一한 化合物이 異種植物體에서 同一한 經路로 生成되는가를 檢討하기 爲하여 모밀 *Fagopyrum esculentum* MOENCH 및 방풍 *Peucedanum japonicum*, 자원 *Aster tataricus* L.를 ¹⁴C-標識化合物로 處理하여 chlorogenic acid의 生合成 經路에 對한 實驗結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

실 험

材料 및 抽出

溲大 藥草園에서 新鮮한 갯기름나무 *Peucedanum japonicum* 및 개미취 *Aster tataricus* L.의 地上部 5g을 各各 粗切하고 10倍量의 熱 methanol을 加하여 50°C의 水浴上에서 30分間 抽出 冷却한 다음 濾過하여 試料로 使用하였다.

P.P.C. 및 T.L.C.에 의한 Polyphenol의分離 및 確認

上記 抽出液을 一次元 또는 二次元 上昇法으로 paper chromatography 하였다. 종이는 Whatman No. 1을 使用하였다.

一次元 時의 展開劑로는 n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2), (4 : 1 : 5), ethylacetate : formic acid : water (10 : 2 : 3), 6% acetic acid 로 展開하였다.

二次元 時의 展開劑로는 n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2)로서 展開한 후 二次로 6% acetic acid 로서 展開하였다.

종이를 風乾한 후 紫外線下에서 觀察하면 chlorogenic acid 類似物質은 靑色螢光을 나타내며 鮮明하게 分離되었다. 이 部分을 spot I 이라고 하고 chromatogram 上에 各種試藥을 噴霧하여 그 呈色으로 各 spot 를 確認하였다.

T.L.C.는 cellulose 薄層에 위의 各 試料를 點滴하여 n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2), ethylacetate : formic acid : water (10 : 2 : 3)으로 展開시켜 P.P.C.와 同一한 方法으로 確認하였다.

紫外線 吸收 Spectrum

二次元 P.P.C.에서 얻은 chromatogram 을 充分히 風乾시킨 후 紫外線下에서 靑色螢光을 나타내는 部分 即 各 spot I의 Rf值에 該當하는 部分을 各各 切取하여 이것을 methanol 로서 抽出하고 濾過하였다. 이 濾液을

Beckman spectrophotometer DU 型으로 그 吸光度를 測定하였다.

植物에 對한 ¹⁴C-標識化合物의 處理

各* 植物體를 根이 붙은 狀態로 水中에서 그 莖部를 에리한 칼로 切斷하고 곧 ¹⁴C-標識化合物을 約 2cc 의 蒸溜水에 溶解시킨 비카에 옮겨서 吸收시킨다.

그 吸收가 다 끝날때 少量의 蒸溜水를 加하여 계속 吸收시킨 다음 蒸溜水가 들어있는 다른 비카에 옮겨 24 時間 生合成 시켰다.

放射能測定

生合成 시킨 후 위의 方法으로 methanol 抽出液을 만들어 二次元 P.P.C.로 spot I을 分離하여 strip paper counting method로 測定하였다. 即 分離한 spot I을 으려내어 細切한 후 特殊 plancet 에 넣어 Scintillator를 넣고 Schimidzu LSG-13 Liquid Scintillation Counter 로 radioactivity 를 測定하였다.

결과 및 고찰

Table I에서와 같이 chlorogenic acid와 各 植物體의 spot I은 各種 展開溶媒에서 거의같은 Rf值를 보여 주며 Rc 值도 거의 1 이다.

Table II에 表示한바와 같이 前記 三者는 FeCl₃에서 綠色을 나타내며 HÖPFNER 試藥에 依해 赤褐色으로 呈色되며 紫外線下에서 呈色反應도 chlorogenic acid와 同一하다.

Fig. 1.에서와 같이 各 植物體의 spot I의 吸收 spectra

TABLE I. (A) Rf values of polyphenols in materials (P.P.C)

solvent	<i>Peucedanum japonicum</i> spot I		<i>Aster tataricus</i> Linne spot I		Authentic chlorogenic acid	
	Rf	Rc	Rf	Rc	Rf	Rc
Butanol-acetic acid-water	0.63	1	0.63	1	0.63	1
Butanol-acetic acid-water	0.63	1	0.67	0.99	0.68	1
Ethylacetate-formic acid-water	0.86	1	0.85	0.99	0.86	1
6% HAc	0.50	0.98	0.51	1	0.51	1

(B) Rf values of polyphenols in materials (T.L.C)

solvent	<i>Peucedanum japonicum</i> spot I		<i>Aster tataricus</i> Linne spot I		Authentic Chlorogenic acid	
	Rf	Rc	Rf	Rc	Rf	Rc
Butanol-acetic acid-water	0.87	1	0.86	0.99	0.87	1
Ethylacetate-formic acid-water	0.90	0.99	0.91	1	0.91	1

* (개미취 갯기름나무 모밀은 숙대 약초원에서 재배한 것임)

TABLE II. Color reactions of polyphenols in materials.

Reagent	<i>Peucedanum japonicum</i> Spot I	<i>Aster tataricus</i> L. Spot I	Authentic chlorogenic acid
FeCl ₃	green	green	green
UV-Fluorecence	blue	blue	blue
UV-Fluorecence with NH ₃	yellowish green	yellowish green	yellowish green
HÖPFNER'S reagent	red brown	red brown	red brown

도 chlorogenic acid 의 그것과 아주 비슷하며 다같이 $\lambda_{max}=324m\mu$ 이다. 따라서 각 spot I 은 chlorogenic acid 인 것으로 確認된다.

Table III 은 ¹⁴C 標識化合物을 植物體에 吸收시켜 各植物體에서 生合成된 chlorogenic acid 의 specific activity 를 比較한 것이다. 그 結果를 보면 갯기름나물 *Peucedanum japonicum* 中에 chlorogenic acid 의 specific activity 는 L-phenylalanine-U-¹⁴C 로 부터 生成되는 境遇가 sodium acetate-2-¹⁴C 로 부터 生成되는 境

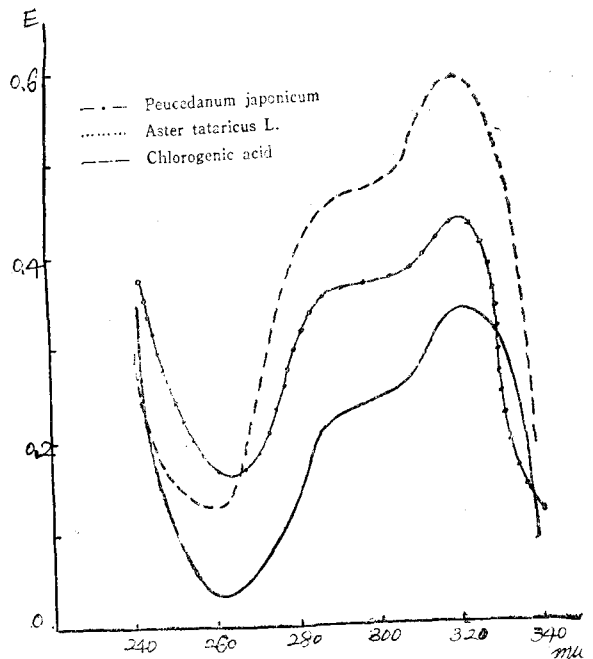


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of eluate of spots and Chlorogenic acid

TABLE III. Incorporation of radioactivity of ¹⁴C compounds into chlorogenic acid in materials

Materials	Compounds administered	Radioactivity of administered compounds (c.p.m)	Isolated compounds % fresh wt. % (mg/g)	Specific activity isolated compounds (cpm/ μ M)
<i>Peucedanum japonicum</i>	L-3-Phenylalanine-u- ¹⁴ C	3.663×10^7	4.4	112.496×10^3
<i>Peucedanum japonicum</i>	Sodium Acetate-2- ¹⁴ C	3.663×10^7	8.23	3.503×10^3
<i>Aster tataricus</i> L.	L-Tyrosine-u- ¹⁴ C	3.663×10^7	13.3	2.445×10^3

TABLE IV. Incorporation of radioactivity of ¹⁴C compounds into chlorogenic acid and rutin in *Fagopyrum esculentum*

Precursor administered to plants	Specific activity (cpm/ μ M)	
	Chlorogenic acid	Rutin
Caffeic acid carboxyl ¹⁴ C	133.8×10^3	11.66×10^3
L-Tyrosine-U- ¹⁴ C	8.997×10^3	1.501×10^3

遇보다 顯著하게 높다. 개미취 *Aster tataricus* L. 中의 chlorogenic acid 의 specific activity 는 갯기름나물 *Peucedanum japonicum* 의 sodium acetate-2-¹⁴C 로부

더 生成되는 境遇보다 더 낮은 數値를 나타내고있다. 이와같이 植物體는 다르나 chlorogenic acid 의 specific activity 는 L-phenylalanine-U-¹⁴C, sodium acetate-2-¹⁴C, L-tyrosine-U-¹⁴C 의 順序로 낮아진다. 이 實驗結果를 考察해 보건대 L-phenylalanine-U-¹⁴C 이 chlorogenic acid 에 가장 良好한 先驅物質임이 分明한바 이 事實은 chlorogenic acid 의 生合成 過程이 shikimic acid 의 經路에 依해서 形成된 芳香族 amino acid 가 phenyl pyruvic acid 를 거쳐 形成된다고 하는 從前의 推定에 對한 하나의 實驗의 根據를 提示하는 것으로 여겨진다 (6,8). 그러나 sodium acetate-2-¹⁴C 및 L-tyrosine-U-¹⁴C 에서도 chlorogenic acid 의 形成의 可能性이 있는

것으로 생각된다. NEISH 등은 모밀 *Fagopyrum tataricum* 植物體中에서는 C_6C_3 炭素骨格을 가지고 있는 化合物中에서 p-oxy-cinnamic acid는 $C_6C_3C_6$ 化合物의 良好한 先驅物質이 된다고 하였으나 dioxy 化合物인 caffeic acid는 不適當한 것이라고指摘하였다.

NEISH 등은 quercetin의 B環의 o-dioxy 決定은 C_6C_3 C_6 의 骨格이 形成된 後에 이루어지는 것으로 推定하였다.⁹⁾ 그러나 Table IV에 表示한 바와같이 모밀 *Fagopyrum esculentum* 植物體를 使用한 著者の 實驗結果에 依하면 caffeic acid는 tyrosine 보다 chlorogenic

acid에서 chlorogenic acid는 그 構成成分인 C_6C_3 部分의 o-dioxy 決定 後에 quinic acid와 結合하는 生成過程도 可能한것으로 推定된다.

caffeic acid의 良好한 先驅物質임을 보여주고있다. 그러므로 C_6C_3 酸이 構成成分인 chlorogenic acid는 모밀 植物體中에서는 C_6C_3 酸의 o-dioxy 決定後에도 形成되는 것으로 生覺된다. 이事實은 URITANI 등이 고구마의 組織片에 phenylcarboxylic acid- ^{14}C 등을 吸收시켜서 實施한 實驗結果에서 chlorogenic acid의 生合成 經路는 p-coumaroyl derivative를 經由하는 過程과 그 다른 하나

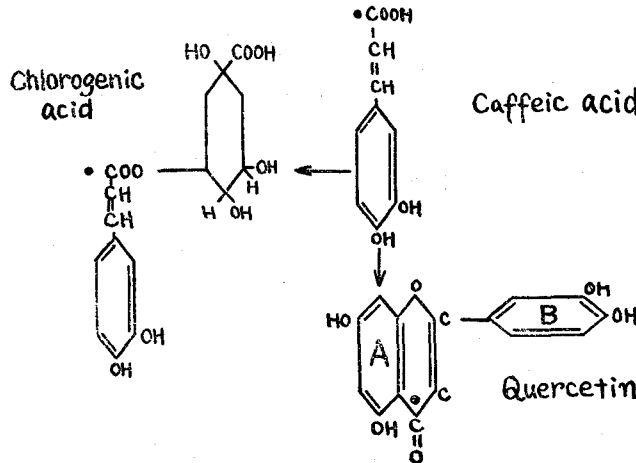


Fig. 2. The possible route of incorporation of caffeic acid-carboxyl- ^{14}C into chlorogenic acid and quercetin in *Fagopyrum esculentum*.

Fig. 2는 모밀 *Fagopyrum esculentum* 植物體中에서 caffeic acid-carboxyl- ^{14}C 는 SWAIN 등이指摘한 바와 같이 C_6C_3 部分이 그대로 chlorogenic acid 및 quercetin의 B環에 導入되는것을 나타낸 것이다. NEISH 등이 tyrosine은 *Chlamydomonas*에서는 quercetin의 良好한 先驅物質이 되나 *Fagopyrum tataricum*에서는 不適當한 것은 脫 amino 化反應이 困難한 때문인 것으로 解釋하고 있다.

著者の 實驗結果에서도 tyrosine이 개미취 *Aster tataricus* L.나 모밀 *Fagopyrum esculentum* 植物에서 다같이 chlorogenic acid의 良好한 先驅物質이 아닌것은 tyrosine이 위의 兩植物體에서도 Neish 등이 推定한것과 같이 亦是 脫 amino 化反應이 困難한 때문인 것으로 解釋된다.

이러한 事實로서 갯기름나무 *Peucedanum japonicum* 中에서 chlorogenic acid는 shikimic acid 經路에 의해서 形成될 可能性이 크며 모밀 *Fagopyrum esculentum*는 p-coumarate에서 caffeate를 經由하여 chlorogenic

acid가 生成된다고 推定한것과 一致되는 것으로 生覺된다.⁷⁾ <1973년 5월 20일 접수>

문헌

- 1) 朴秀善: 淑大論文集 第4集, 341 (1964).
- 2) HERRMANN, K.: Pharmazie. 11, 443 (1956).
- 3) SONDHEIMER, E.: Arch. Biochem. Biophys. 74, 131 (1956).
- 4) IMASEK, H.: Bot. Mag. Tokyo 72, 853 (1959).
- 5) 鈴木直治, 豊田 榮: 農技研報告, C8, 131 (1957).
- 6) TAMARI, K., and KAJI, J.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 29, 151 (1955).
- 7) URITANI, I., KOJIMA, M., MINAMIKAWA, T., and HYODO, H.: Plant and Cell Physiol. 10, 471-474 (1969).
- 8) GGISSMAN, T.A., and SWAIN, T.: Chem. & Ind., 1957, 984
- 9) UNDERHILL, E.W., WATKIN, J.E., and NEISH A.C.: Can. J. Biochem. Physiol. 35, 219 (1957).