

조구등 (*Uncaria rhynchophylla* Miq.) 줄기의 항산화활성물질, Hyperin

한재택 · 오성준 · 김해영 · 박영두 · 백남인*

경희대학교 산업대학 생명과학부 및 생명과학연구원

(1999년 12월 2일 접수, 2000년 1월 19일 수리)

서 론

천연자원으로부터 인체에 해가 없는 항산화물질을 개발하려는 연구가 꾸준히 시도되어 왔다. 지금까지 다양한 구조를 갖는 많은 천연 항산화 물질이 보고되었으나, 아직까지는 α -tocopherol 등만이 일부 이용되고 있다.^{1,2)} 저자 등은 300 여종 식물의 methanol (MeOH) 추출물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였으며, 그 중에서 뚜렷한 활성을 보인 조구등으로부터 항산화물질을 분리하고자 하였다.

조구등(*Uncaria rhynchophylla* Miq.)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 덩굴성 목본식물로 가시가 달린 가지를 한방에서는 생약재로 사용하는데, 진경 및 진정효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 고혈압에 의하여 유발된 현기증과 두통 등에 널리 사용되어져 왔다.³⁾ 조구등의 주성분으로서 rhynchophyllin 등 수종의 oxyindole계 알카로이드 화합물이 분리, 보고되었다.⁴⁾

재료 및 방법

시료, 기기 및 시약

조구등은 1998년 경동시장에서 구입하여 동정한 후 사용하였다. NMR은 JEOL JNM-LA400(Tokyo, Japan)으로 측정하였고, 시약은 일급 또는 특급을 사용하였다.

주요 성분의 분리

조구등(3 kg)을 80% MeOH 수용액(10 l)으로 실온에서 2회 추출하였고, 여과 농축한 후 물과 ethyl acetate (EtOAc)로 분배 추출하였으며, 불층을 다시 *n*-butanol (*n*-BuOH)로 추출하였다. 각 층을 농축하여 얻어진 세 분획에 대하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 EtOAc 층에서 높은 활성이 확인되었다.

EtOAc 농축물에 EtOAc-acetone-H₂O 혼합용매 (5:5:1) 1 l를 가하고 50°C로 가온하였다. Ice bath에서 냉각시킨 후 생성된 침전을 glass filter로 여과하고, 침전물을 취하여 화합물 1을 2.4 g 분리하였다.

찾는말 : 조구등, 항산화, Hyperin, Ursolic acid, DPPH 라디칼 소거활성

*연락처 : Tel : 0331-201-2661, Fax : 0331-204-8116

E-mail : nibaek@nms.kyunghee.ac.kr

화합물 1 : White powder, ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δ) 5.48 (1H, br. s, H-12), 3.45 (1H, dd, $J=6.8, 9.0$ Hz, H-3), 2.63 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18), 1.24, 1.18, 1.04, 1.01 (each 3H, s, H-23, 27, 26, 24), 0.99 (3H, d, $J=5.8$ Hz, H-30), 0.94 (3H, d, $J=5.8$ Hz, H-29), 0.87 (3H, s, H-25). ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N, δ c) 179.89 (C-28), 139.24 (C-13), 125.62 (C-12), 78.09 (C-3), 55.79 (C-18), 53.51 (C-5), 48.02 (C-17), 48.02 (C-9), 42.47 (C-14), 39.93 (C-4), 39.46 (C-20), 39.38 (C-19), 39.36 (C-8), 39.04 (C-1), 37.43 (C-22), 37.25 (C-10), 33.55 (C-7), 31.05 (C-15), 28.79 (C-23), 28.66 (C-21), 28.10 (C-11), 24.89 (C-2), 23.89 (C-30), 23.60 (C-16), 21.41 (C-27), 18.76 (C-6), 17.51 (C-29), 17.43 (C-24), 16.57 (C-25), 15.66 (C-26).

위의 여액을 감압농축한 후, silica gel column chromatography(c. c.) (EtOAc-acetone-H₂O=6:4:1)를 실시하여 4개의 분획으로 나누었다. 그 중 2번 분획에 대하여 silica gel c. c. (EtOAc-acetone-H₂O=6:4:1)하여 5개의 분획으로 나누었고, 다시 그 중의 3번 분획에 대하여 Sephadex LH-20 c. c. (MeOH)를 실시하여 화합물 2(76.5 mg)를 순수하게 분리하였다.

화합물 2 : Brown powder, ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δ) 13.14 (1H, br. s, C₅-OH), 8.41 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 8.11 (1H, dd, $J=8.3, 1.9$ Hz, H-6), 7.23 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-8), 6.61 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-6), 6.06 (1H, d, $J=7.6$ Hz, anomeric-H). ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N, δ c) 178.72 (C-4), 165.85 (C-7), 162.56 (C-5), 157.70 (C-2), 157.44 (C-9), 150.63 (C-4), 146.61 (C-3'), 135.86 (C-3), 122.74 (C-1'), 122.18 (C-6), 117.68 (C-2'), 116.16 (C-5'), 105.29 (C-10), 105.01 (C-1"), 99.69 (C-6), 94.45 (C-8), 77.54 (C-5"), 75.32 (C-3"), 73.25 (C-2"), 69.66 (C-4"), 61.77 (C-6").

DPPH를 이용한 전자공여능 (Electron donating ability, EDA) 측정

감압 농축하고 vacuum oven에서 수분을 제거한 각 시료를 150 μ g, 300 μ g, 450 μ g 씩 취한 후 MeOH 1 ml로 용해시켰다. 각 시료 용액중 160 μ l를 시험관에 취하고 1.5 \times 10⁻⁴ M DPPH MeOH 용액 5 ml씩을 가하여 반응시켰다. 실온에서 30 분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 간격으로 517 nm에서의 흡광

도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 조사하였다. 대조구는 각 시료용액 대신에 MeOH 160 μl를 취하고 동일한 방법으로 실험하였다. EDA는 시료첨가구와 무첨가구와의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

$$EDA (\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{실험구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

EtOAc 분획 주요성분의 구조 동정

EtOAc 분획물에 대하여 silica gel TLC 를 이용하여 구성성분을 검색하였을 때, 2가지 물질이 주요성분으로 판명되었다. 그 중 상대적으로 비극성인 물질(화합물 1)에 대해서는 재결정 방법을 이용하여 0.4%수율로 분리정제하였다. 상대적으로 극성인 물질(화합물 2)에 대해서는 silica gel과 Sephadex LH-20 c.c.를 반복하여 0.0025%의 수율로 분리, 정제하였다.

화합물 1은 흰색의 분말상의 물질로, ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N)에서 olefinic methine signal (δ 5.48)과 hydroxyl methine signal (δ 3.45)이 관측되었고, 0.87~1.24 ppm에서 5개의 singlet 및 2개의 doublet methyl signal이 관측되었다. 그밖에 고자장 영역에서의 다수의 methine과 methylene signal 들이 관측된 점으로 볼 때 이 화합물은 triterpenoid 화합물로 추정되었다. ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N)에서는 모두 30개의 signal 이 관측되었으며, carbonyl (δc 179.89), olefine quaternary (δc 139.24) 및 methine (δc 125.62) 탄소 signal이 관측되었다. 또한 1개의 hydroxyl methine (δc 78.09)과 고자장영역에서 7개의 methyl (δc 28.79, 23.89, 21.41, 17.51, 17.43, 16.57, 15.66), 9개의 methylene, 5개의 methine 및 5개의 4급 탄소가 관측되었다. 이를 종합해 보면 이 화합물은 triterpenoid 화합물 중 ursane 골격으로 판단되었다. 이 화합물의 chemical shift를 만족시키는 화합물의 문헌 값과⁵⁾ 비교한 결과 화합물 1은 ursolic acid로 결정하였다.(Fig. 1)

화합물 2는 갈색 분말상의 물질로서, silica gel TLC에서 전개하고 UV램프로 쬐었을 때 강한 UV흡수 특성을 보였으며, 황산 분무 후, 가열 시 황색으로 발색되었고, Rf값으로부터 판단한 극성의 정도로부터 flavonoid 화합물로 추정되었다. ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N)을 보면 aromatic proton signal 5개와, 당에서 기인하는 전형적인 signal인 1개의 hemiacetal

signal, 다수의 oxygenated methine 및 methylene signal이 관측되어 이 화합물은 flavonoid 배당체임을 암시하고 있다. δ 8.41 (1H, d, J=1.9 Hz), δ 7.23 (1H, d, J=8.3 Hz) 및 δ 8.11 (1H, dd, J=8.3, 1.9 Hz) signal들의 coupling constant로 볼 때 flavonoid의 B환의 C-3'과 C-4'가 치환되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 δ 6.66 (1H, d, J=1.7 Hz)과 δ 6.61 (1H, d, J=1.7 Hz)으로부터 A환에서 meta-coupling하고 있는 것으로 판명되었다. 또한 anomeric proton δ 6.06 (1H, d, J=7.6 Hz) 및 당부 signal들이 관측되어 화합물 2는 5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavonol (quercetin)에 당 1분자가 결합한 배당체임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N)에서도 aglycone은 quercetin에 해당하는 chemical shift의 signal들을 보였다. 당은 chemical shift로부터 D-galactopyranose로 판명되었다. 당의 결합부위는 quercetin의 ¹³C-NMR 값과 비교한 결과 3번 탄소의 chemical shift가 저자장으로 이동하여 3번 수산기로 결정하였다. ¹H-NMR에서의 anomeric proton coupling constant (J=7.6 Hz)로부터 당이 β결합하고 있음을 확인하였다. 따라서, 화합물 2는 hyperin (quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside)⁶⁾로 결정되었다.(Fig. 1)

DPPH radical 소거 활성

지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical을 소거함으로써 항산화제로 작용하는 물질은 free radical인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 hydrazine 형태로 환원시키는 능력을 조사함으로써 검색할 수 있다. 300 여종의 식물체의 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거활성을 검색한 결과 조구등에서 활성이 나타났다. 따라서 조구등으로부터 항산화물질의 본체를 구명하기 위하여 MeOH 추출물을 EtOAc, n-BuOH과 H₂O로 용매분획하였고, 각 분획에 대하여 활성을 측정 한 결과 EtOAc 분획에 활성이 집중되었다. EtOAc 분획에 대하여 silica gel TLC를 했을 때, 2개의 뚜렷한 spot가 관측되어, 이 물질들(ursolic acid, hyperin)을 분리하였고, DPPH에 대한 free radical 소거활성을 측정하였다.(Table 1)

두 화합물의 free radical 소거활성을 측정한 결과 ursolic acid는 DPPH 라디칼 소거활성은 나타내지 않았다. 반면,

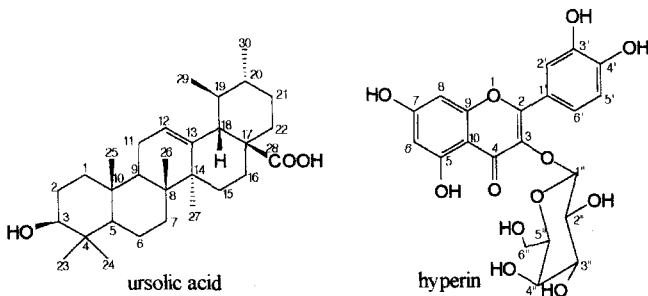


Fig. 1. The chemical structures of ursolic acid and hyperin isolated from the branch of *Uncaria rhynchophylla*.

Table 1. Electron donation ability of ursolic acid and hyperin isolated from the branch of *Uncaria rhynchophylla* (Unit : %)

sample*	conc. (μg/ml)	Treatment time (hr)				
		0.5	1	2	3	4
BHA	4.65	44.8	53.6	60.7	64.2	61.7
	9.30	67.8	80.4	86.1	89.6	89.9
	14.0	81.6	88.6	89.4	92.4	92.2
ursolic acid	4.65	0.1	0.2	0.6	2.3	1.4
	9.30	1.0	1.7	2.1	3.7	2.2
	14.0	1.9	2.3	2.5	4.8	4.2
hyperin	4.65	30.7	38.1	41.3	45.6	46.5
	9.30	55.1	67.3	75.8	79.5	80.9
	14.0	71.7	83.8	90.1	91.8	92.0

*The absorbance of control solution was observed to be 1.673 at 517 nm.

hyperin은 농도가 높아지고 시간이 경과함에 따라 흡광도의 감소가 뚜렷이 나타남으로 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다. 상용 항산화제인 BHA와 hyperin을 비교해 볼 때 평균 80% 정도의 효과를 나타내고 있고, 농도가 높아지고 시간이 지남에 따라 거의 동일한 수준의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내고 있어 BHA에 필적할만한 활성으로 판정할 수 있다.

본 연구의 결과로 조구등에서 free radical 소거작용을 나타내는 항산화활성의 본체는 flavonoid 배당체인 hyperin으로 규명되었다. 이 성분의 다른 여러 가지 항산화 관련 활성검정을 진행중이다.

감사의 글

본 연구는 BK21 사업과 관련하여 교육부로부터 지원받은 연구비로 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Matsuzki, T. and Koiwai, A. (1988) Antioxidative β -diketones in stigma lipids of tobacco. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2341-2345.
2. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983) Antioxidative

- effect of the constituents of rosemary and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 521-524.
3. Tang, W. and Eisendrand, G. (1992) In 'Chinese Drugs of Plant Origin', Springer-Verlag, Berlin. 997.
 4. Aimi, N., Yamanaka, E., Fujiu, M., Kurita, J., Sakai, S. and Haginawa, J. (1977) Studies of plant containing indole alkaloids. IV. Minor bases of *Uncaria rhynchophylla* MIQ. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 2067-2077.
 5. Seo, S., Tamita, Y. and Tori, K. (1975) Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue culture. *Tetrahedron Lett.* **20**, 7-9.
 6. Markham, K. R., Ternai, B., Stanly, B., Geiger, H. and Marbry, T. J. (1978) Carbon-13 NMR studies of flavonoids II. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **34**, 1389-1390.
 7. Bang, M. -H., Song, J. -C., Lee, S. -Y., Park, N. -K. and Baek, N. -I. (1999) Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. *Hanguk Nongwhahak Hoechi* **42**, 170-175.
 8. Bang, M. -H. (1999) Isolation and identification of new natural antioxidants from plant resources, MS Thesis, Kyunghee University, Suwon.

Hyperin, Antioxidant Compounds Isolated from the Branch of *Uncaria rhynchophylla* Miq.

Jae-Taek Han, Seung-Jun Oh, Hae-Yeong Kim, Young-Doo Park and Nam-In Baek*(*Kyung Hee University, Department of Life Sciences & Institute of life sciences, Suwon 449-701, Korea*)

Key words : *Uncaria rhynchophylla* Miq., antioxidation, DPPH radical scavenging activity, hyperin, ursolic acid

*Corresponding author