

메밀 지상부의 DPPH 라디칼 소거작용과 활성 플라보노이드의 분리

김성자, 김현주¹⁾, 박종철

국립순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소, ¹⁾순천청암대학 피부미용학과

Abstract

DPPH Radical Scavenging Effect of the Aerial Parts of *Fagopyrum esculentum* and Isolation of Bioactive Flavonoids

Sung Ja Kim, Hyun Joo Kim¹⁾, Jong Cheol Park

Department of Oriental Medicine Resources and
Research Institute of Korean Oriental Medicine, Suncheon National University,
Department of Cosmetology, Suncheon Chongam College¹⁾

The inhibitory effect of the aerial parts of *Fagopyrum esculentum* on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was examined. The *n*-butanol fraction from the methanol extract of title plant showed stronger inhibitory effect than other fractions on DPPH radical. Two flavonoids were isolated from *n*-butanol fraction having the potent activity and elucidated as quercetin-3-O- α -L-rhamnoside and quercetin-3-O-rutinoside on the basis of spectral evidence. The IC₅₀ values of these

교신저자: 박 종 철

국립순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소

Tel: 061) 750-3662, E-mail : jcpark@suncheon.ac.kr

접수 : 2004/ 5/ 31 수정 : 2004/ 6/ 2 채택 : 2004/ 6/ 5

compounds on DPPH radical were 6.56 μM and 8.37 μM , respectively.

Key Word : *Fagopyrum esculentum.*, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, radical scavenging effect, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-rutinoside

I. 서 론

메밀은 마디풀과 (Polygonaceae)의 한해살이 초본식물로 기원이 바이칼호로부터 만주, 아무르에 걸치는 지역으로 알려져 있다. 우리나라에는 10세기경 이전 중국에서 유입되어 오랜 기간 구황작물로서 그 역할을 하여 왔다¹⁾. 중국과 캐나다 등에서 생산량이 높으며, 식량으로서는 한국, 일본, 네팔 등지에서 소비량이 높다²⁾.

현재 전 세계적으로 재배되고 있는 메밀의 재배종은 *Fagopyrum esculentum* Moench과 *Fagopyrum tataricum* Gaertn이며, 우리나라에서 주로 재배되는 메밀은 *Fagopyrum esculentum* 이다³⁾. 동속식물로는 *Fagopyrum tartaricum*, *Fagopyrum cymosum*, *Fagopyrum vulgare*, *Fagopyrum sagittatum* 등이 있다⁴⁾.

일반적으로 식품으로 사용하는 메밀씨는 한방에서 오맥 (烏麥), 교맥 (蕎麥)으로 불리며 성미 (性味)는 차고 서늘하다. 위를 열고 장을 통하게 (開胃寬腸)하며 기를 내리고 적을 없애고 (下氣消積), 만성설사, 이질, 결핵성 임파선염을 치료한다⁵⁾. 식의본초 (食醫本草)에는 기운을 돋우며 정신을 맑게 하고 오장의 찌꺼기를 훑는다고 하였다. 메밀씨의 영양성분으로는 단백질과 glutamate, arginine, asparagine 등의 아미노산 그리고 성인병과 관계 있는 필수

지방산이 밀이나 보리에 비하여 월등히 좋다고 보고되어 있다^{2,6)}. Ca, Fe, Mg, Mn을 비롯하여 Se 등의 무기물과 비타민 B₁, B₂, P도 함유되어 있다⁷⁾. 메밀씨의 약효성분으로는 salicylamine, 4-hydroxybenzylamine, N-salicylidenesalicylamine, orientin, homoorientin, vitexin, saponaretin, cyanidin, leucoanthocyanin 등이 밝혀져 있다^{5,8)}. 메밀식이가 당뇨대사에 미치는 영향에서 혈중의 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 농도가 일반식이와 비교하여 감소되었으며⁹⁾, hemicellulose가 cholesterol의 증가를 억제하는 효과가 높아 혈압을 낮추고 혈당을 강화하여 insulin 분비를 촉진한다고 보고되었다²⁾. 메밀 껍질에서 분리한 azelaic acid와 3,4-dihydroxybenzoic acid는 항진균 및 항균활성이 발표되었다¹⁰⁾.

메밀 지상부는 식이섬유와 비타민, 무기질이 풍부하여 어린 잎과 줄기는 나물로 이용되며 녹채소로서 식용으로 유용하다⁷⁾. 한방에서는 이를 교맥갈 (蕎麥秸)이라 부르며, 성미 (性味)는 시큼하고 차며 조그마한 중기를 치료하고 출혈을 멎게 한다고 하였다. 지상부는 모세혈관 취약성으로 일어난 각종 출혈증과 비결핵성으로 일어나는 폐출혈도 예방하며 당뇨병으로 생긴 망막염도 치료한다⁸⁾. 메밀 잎의 항돌연변이 작용¹¹⁾ 과 간장 및 혈청의 지질농도 감소 효과도 발표되었다¹²⁾.

식용으로 사용하면서 약용식물인 메밀 지상부인 잎과 줄기를 실험재료로 이용하여 DPPH radical 소거작용을 측정하고 이 식물 부위에서 분리한 플라보노이드의 화학구조를 동정하였기에 보고한다.

II. 실험

1. 식물재료

실험에 사용한 메밀의 지상부는 2002년 6월에 순천대학교에서 직접 재배하여 사용하였으며, 표준품은 순천대학교 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

2. 시약 및 기기

column chromatography를 위한 silica gel은 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, No. 7734 Merck, Germany), Sephadex LH-20 (Parumasia, Sweden)을 사용하였으며 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz) spectra는 Bruker AMX 400 spectrometer (Bruker, Germany)를 사용하였다.

3. 추출 및 분획

활성실험을 위해 메밀 지상부 5 g을 음건 세절하였고, MeOH로 열탕 추출하여 동결 건조한 후 시료로 사용하였다. 성분 분리를 위해서 메밀 지상부 4 kg을 음건 세절한 후 *n*-hexane으로 탈지한 후 MeOH (methanol)로 추출하여 600 g 추출물을 얻었다. 이 MeOH 추출물은 10% MeOH로 현탁 시켜 용매의 극성을 증가시키는 계통분획법에 의해 CH_2Cl_2

(methylene chloride), EtOAc (ethyl acetate), *n*-BuOH (*n*-butanol)로 분획하여 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 및 물 분획물을 각각 330 g, 13 g, 112 g, 110 g 얻었다. *n*-BuOH 가용부 추출물 112 g 중 20 g을 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. 용출용매는 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (5:1:1, 하층), CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (25:8:5, 하층), CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (7:3:1, 하층) 및 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (65:35:10, 하층)의 순서로 혼합용매를 이용하였다. subfraction 285-290 (FEB-A, 1500 mg)에서 결정 (FEB-A1, 950 mg)과 모액 (FEB-A2, 400 mg), 그리고 subfraction 501-520 (FEB-B, 3200 mg)에서 결정 (FEB-B1, 2400 mg)과 모액 (FEB-B2, 700 mg)으로 다시 분리하였다. MeOH의 극성을 100%, 80%, 60%로 증가시키는 용출용매로서 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 FEB-A1에서 compound 1의 210 mg, FEB-B1에서는 compound 2의 750 mg을 순수하게 분리하였다.

5. DPPH radical 소거작용 측정

시약은 DPPH (Sigma chemical Co. USA)와 기타용매는 일급시약, 대조군으로는 L-ascorbic acid (Junsei, Japan)을 사용하였다. 흡광도는 microplate reader (Emax, USA)로 측정하였다. 96 well plate에 실험군과 blank에 시료를 농도별로 100 μL 씩 각각 6개씩 seeding한 다음 실험군에는 60 μM DPPH 100 μL 를 첨가하였다. control에는 시료 대신에 MeOH 100 μL 를 seeding한 다음 DPPH 100 μL 를 첨가하고, blank에는 DPPH 대신에 EtOH

100 μ L를 첨가하였다. 실온에서 30분을 방치한 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도를 조사하였다. 시료첨가구와 대조군의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

DPPH radical 소거활성이 있는 메틸의 지상부에서 두종의 화합물을 분리하였으며, 이들의 화학구조를 결정하기 위해 NMR분석을 실시하였다. compound 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 meta coupling하는 A-ring의 proton signal이 δ 6.36 (1H, d, $J=1.98$ Hz, H-8)과 δ 6.18 (1H, d, $J=1.98$ Hz, H-6)에서 doublet로 나타나고, B-ring의 H-2', H-6' 및 H-5' signal이 δ 7.27 (1H, d, $J=2.0$ Hz), δ 7.22 (1H, dd, $J=2.0$ & 8.0 Hz), δ 6.84 (1H, d, $J=8.0$ Hz)에서 관측되었다. 당의 anomeric proton signal이 δ 5.23 (1H, d, $J=1.2$ Hz)에서 singlet로 그리고 rhamnose의 methyl기로 추정되는 signal은 δ 0.81 (3H, d, $J=6.4$ Hz)에서 관측되므로 당은 L-rhamnose로 추정된다 (Table 1). $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석에서 당부분을 제외하고는 quercetin의 골격과 유사하며, 당은 L-rhamnose 유래의 signal [δ 101.6 (C-1"), 70.0 (C-5"), 70.5 (C-3"), 70.3 (C-2"), 71.1 (C-4"), 17.5 (C-6")]이 관측되었다. 이상의 data로부터 compound 1은 quercetin rhamnoside 화합물이다. 당과 aglycone의

결합위치는 문헌치의 quercetin의 $^{13}\text{C-NMR}$ data¹³⁾와 비교할 때 C-3이 1.8 ppm 고자장 shift함으로써 quercetin C-3 위치에 당이 결합함을 알 수 있다 (Table 2). 그러므로 compound 1은 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (Fig. 1)로 동정하였으며 문헌치¹³⁾와 잘 일치하였다.

compound 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum도 compound 1과 매우 유사하게 나타난다 (Table 1). 그러므로 aglycone은 quercetin이 확실하며, 당은 quercetin의 C-3위치에 결합하고 있다. 당의 anomeric proton signal은 δ 5.31 (1H, d, $J=1.2$ Hz)과 δ 4.36 (1H, d, $J=1.2$ Hz)에서 관측되므로 2 mole의 당이 결합하고 있음을 알 수 있다. compound 1의 당과 마찬가지로 δ 0.97에서 rhamnose의 methyl기에 기인된 peak가 나타난다. 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ data (Table 2)해석에서 당은 rhamnose와 glucose가 포함되어 있음을 알 수 있다. 이 중 glucose는 anomeric proton의 coupling constant가 δ 6.82로서 β -configuration을 하고 있다. 당의 결합위치는 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석에서 isoquercitrin의 문헌치 data¹⁴⁾와 비교할 때 D-glucose의 C-6위치가 6.7 ppm 저자장 쪽으로 이동한다. 따라서 2 mole의 당은 D-glucose의 C-6위치에 L-rhamnose가 결합하고 있음을 알 수 있으므로 이 화합물은 quercetin-3-O-rutinoside (Fig. 1)로 화학구조를 결정하였다.

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ spectral data for compounds 1 and 2^{a)}

Proton No.	Compound	
	1	2
H-6	6.18 (1H, d, J=1.98 Hz)	6.17(1H, d, J=1.9 Hz)
H-8	6.36 (1H, d, J=1.98 Hz)	6.37(1H, d, J=1.9 Hz)
H-2'	7.27 (1H, d, J=2.0 Hz)	7.74(1H, d, J=2.0 Hz)
H-5'	6.84 (1H, d, J=8.0 Hz)	6.82(1H, d, J=8.0 Hz)
H-6'	7.22 (1H, dd, J=2.0 & 8.0 Hz)	7.52(1H, dd, J=2.0 & 8.0 Hz)
H-1''	5.23 (1H, d, J=1.2 Hz, anomeric H)	5.31(1H, d, J=7.0 Hz, anomeric H)
H-1'''		4.36(1H, d, J=1.2 Hz, anomeric H)
-CH ₃	0.81 (3H, J=6.4 Hz)	0.97 (3H, d, J=6.0 Hz)

a) Solvent : DMSO-d₆

Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$ chemical shift of compounds 1 and 2^{a)}

Carbon No.	Compound		Carbon No.	Compound	
	1	2		1	2
2	156.9	157.1	6'	120.5	122.2
3	133.9	133.8	1''	101.6	101.8
4	177.3	177.8	2''	70.3 ^{b)}	74.7
5	160.9	161.6	3''	70.5 ^{b)}	77.1
6	98.5	99.3	4''	71.1	71.2 ^{b)}
7	164.0	164.6	5''	70.0 ^{b)}	76.5
8	93.5	94.2	6''	17.5	67.7
9	156.1	156.9	1'''		101.3
10	103.8	104.6	2'''		71.1 ^{b)}
1'	120.8	121.7	3'''		70.7 ^{b)}
2'	115.2	115.8	4'''		72.5
3'	144.9	145.3	5'''		68.9
4'	148.1	148.9	6'''		18.6
5'	115.4	116.8			

a) Solvent : DMSO-d₆

b) Values with the same symbol may be interchange in the vertical column

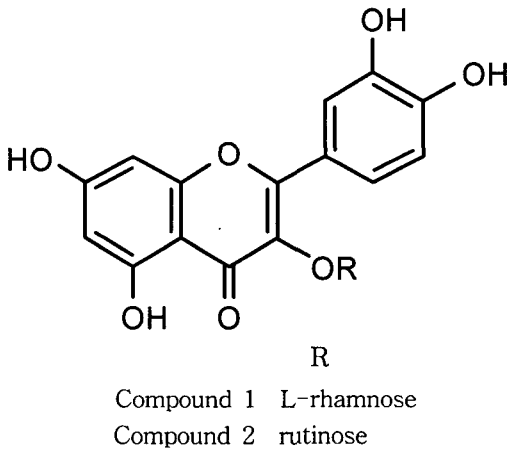


Fig. 1. Structures of compounds 1 and 2 from the aerial parts of *Fagopyrum esculentum*

항산화 활성을 측정하는 실험에는 peroxide value, acid value, carbonyl value, iodine value를 구하는 방법과 DPPH의 환원성을 이용하여 구하는 방법이 있다. 이 중에서 DPPH radical을 이용한 측정법은 비교적 실험방법이 간단하고 재현성이 있으며 실험데이터의 오차가 적기 때문에 항산화활성 실험에 널리 이용되고 있다. DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있다. 항산화 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로서 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있다. DPPH radical법은 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 된다¹⁵⁾.

메밀 지상부의 DPPH radical 소거효과를 관찰하기 위해 MeOH 추출물과 추출물을 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH로 계통분획한

분획물 및 분리한 성분에 대하여 활성을 측정하였다. 메밀 지상부의 MeOH 추출물은 DPPH radical 소거작용은 IC₅₀ 값이 89.58 µg/mL이었다. 이 추출물을 계통분획한 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 IC₅₀ 값은 각각 15.00, 8.41, 8.35 µg/mL로 나타났으며 이중 가장 radical 소거효과가 강한 분획물은 *n*-BuOH 분획물이었다 (Table 3). 활성화합물을 분리하기 위해 radical 소거작용이 강한 *n*-BuOH 분획물에서 두종의 플라보이드 화합물을 분리하였다. 분리된 플라보노이드 화합물인 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside와 quercetin-3-O-rutinoside는 각각 6.56 µM과 8.37 µM에서 IC₅₀ 값이 측정되었으며, 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid보다 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside이 강한 활성을 보였다 (Table 4). 우수한 DPPH radical 소거활성이 관찰된 메밀의 지상부에서 더욱 강력한 생리활성을 나타내는 물질을 분리하기 위해 연구 중이다.

Table 3. The radical scavenging effect of the extract and fractions from the aerial parts of *Fagopyrum esculentum* on DPPH radical

Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ^{a)}
MeOH extract	89.58±2.45 ^{b)}
CH ₂ Cl ₂ fraction	15.00±0.14
EtOAc fraction	8.41±0.10
<i>n</i> -BuOH fraction	8.35±0.18

^{a)}Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical

^{b)}Mean±S.E

Table 4. The radical scavenging effect of compounds 1 and 2 isolated from the aerial parts of *Fagopyrum esculentum* on DPPH radical

Sample	IC ₅₀ (μM/mL) ^{a)}
compound 1	6.56±0.05 ^{b)}
compound 2	8.37±0.13
L-ascorbic acid ^{c)}	8.04±0.32

^{a)}Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical

^{b)}Mean±S.E.

^{c)}Positive control

6.56 μM과 8.37 μM 이었다. 이중 quercetin-3-O-α-L-rhamnoside은 표준품으로 사용한 L-ascorbic acid보다 강한 활성을 보였다.

IV. 결 론

메밀 지상부의 DPPH radical 소거효과를 관찰하기 위해 MeOH 추출물을 측정 한 결과 이의 IC₅₀ 값은 89.58 μg/mL이었다. 활성화합물을 찾기 위해 추출물을 계통분획하였다. CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물을 이용하여 radical 소거작용을 측정 한 결과 *n*-BuOH 분획물의 IC₅₀ 값이 8.35 μg/mL로서 분획물중 가장 강한 활성을 보였다. 이 분획물을 silica gel column chromatography를 실시하여 두종의 플라보노이드 화합물을 분리하였다. NMR 분석에 의해 두 화합물은 quercetin-3-O-α-L-rhamnoside와 quercetin-3-O-rutinoside으로 화학구조를 결정하였으며 이들의 DPPH radical 소거활성은 IC₅₀ 값이 각각

參 考 文 獻

1. 이상영, 메밀 수집종의 이형예현상과 종실 특성에 관한 연구, 원광대학교 생명자원과학연구소, 12, 1-35 (1989).
2. 이상영, 최영순, 함승시, 메밀의 영양학적 성분과 기능, 강원대학교 농업연구소 논문집, 5, 133-148 (1993).
3. 김영순, 메밀 (*Fagopyrum esculentum* Moench)채소의 조리과정중 성분변화 및 SOD 활성에 관한 연구, 명지대 박사학위논문 (1995).
4. 육창수, 한국약용식물도감, 아카데미서적, 서울, p.146 (1990).
5. 안덕균, 원색한국본초도감. 교학사, 서울, p.477 (1998).
6. 심태흠, 이혁화, 이상영, 최용순, 한국산 메밀의 성분, 한국식품과학회지, 30, 1259-1266 (1998).
7. 최병한, 박근용, 박래경, 메밀채소 및 종실용 재배의 중요성, 한국국제농업개발학회지, 3, 71-81 (1991).
8. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균, 중약대사전, 도서출판 정담, 서울, pp.510-513 (1998).
9. 이창선, 메밀식이 당뇨대사에 미치는 영향, 한양대 박사학위논문 (1994).
10. 김혜경, 메밀 껍질의 항미생물 활성물질 탐색에 관한 연구, 전남대 농학 석사학위논문 (2000).
11. 함승시, 최근표, 최용순, 이상영, 메밀 Flavonoids의 항돌연변이원성 및 지질대사 조절기능에 관한 연구-메밀 잎에탄올 추출물의 항돌연변이원성 연구, 한국식품영양과학회지, 23, 698-703 (1994).
12. 최용순, 서정호, 김천호, 김영미, 함승시, 이상영, 흰쥐에 있어서의 메밀채소의 투여가 지질대사에 미치는 효과, 한국영양식량학회지, 23, 212-218 (1994).
13. Markham, K.R., Terniai, B., Stanley, B., Gerger, H. and Mabry T.J., Carbon-13 NMR studies of flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397 (1978).
14. Young, H.S., J.C. Park, H.J. Park, J.H. Lee, J.S. Choi, Phenolic compounds of the leaves of *Eucommia ulmoides*. *Arch. Pharm. Res.* 14, 114-117 (1991).
15. 강미정, 민들레 추출물의 항산화성 및 자유라디칼 소거활성, 영남대 박사학위논문 (2000).