

방동사니 전초의 항산화 페놀성 성분

이사임 · 최 훈 · 전 훈 · 백남인¹ · 김성훈² · 김희자³ · 조종현⁴ · 안효초 · 양재현 · 채병숙 ·
임종필 · 은재순 · 김대근*
우석대학교 약학대학, ¹경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ²경희대학교 한의과대학,
³오성제과, ⁴전북농업기술원

Antioxidant Phenolic Components from the Whole Plant Extract of *Cyperus amuricus* Max.

Sa Im Lee, Hoon Choi, Hoon Jeon, Nam-In Baek¹, Sung-Hoon Kim², Hee Ja Kim³, Chong Hyeon Cho⁴,
Hyo-Cho Ahn, Jae-Heon Yang, Byeong Suk Chae, Jong Pil Lim, Jae Soon Eun and Dae Keun Kim*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

¹Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea

²College of Oriental Medicine, KyungHee University, Seoul 131-701, Korea

³O Sung Co. LTD, Kimje 576-962, Korea

⁴Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-140, Korea

Abstract – In order to find the antioxidative components, fractionation of *Cyperus amuricus* (Cyperaceae) methanol extract was performed by measuring the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging effect. Three compounds, 3,4-dimethoxy benzoic acid (1), 4-hydroxybenzoic acid (2), and piceatannol (3) were isolated from the active ethylacetate soluble fraction of *C. amuricus* through repeated silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography. Among them, compound 3 showed the significant antioxidative effect on DPPH free radical scavenging test. These compounds are reported for the first time from this plant.

Keywords – *Cyperus amuricus*, Cyperaceae, DPPH, piceatannol

세포의 노화와 각종 성인병의 발병이 활성산소와 관련되어 있어 활성산소를 조절할 수 있는 물질인 항산화제에 대한 연구가 최근 활발히 연구되어 오고 있다.¹⁻³⁾ 현재 ascorbic acid, tocopherol, carotenoid 및 glutathione 등의 저분자 천연물 유래 항산화물질이 이용되고 있으나, 합성 항산화제인 BHT, BHA, Trolox C 등을 능가하지는 못하고 있다. 그러나 이들 합성 항산화제는 발암성등의 부작용 우려가 있어 항산화 활성이 우수하고 보다 안전한 새로운 항산화제의 개발이 필요하다.⁴⁾ 저자 등은 수종의 국내 자생식물로부터 항산화 물질을 연구하는 과정 중에 방동사니의 MeOH 추출물이 항산화활성이 있음을 확인하였다.

방동사니 *Cyperus amuricus* Max.는 사초과 (Cyperaceae)에 속하는 1년초로서 들이나 밭 근처에 흔히 나며 일본, 대

만, 중국 등에 널리 분포한다. 방동사니는 선형의 잎을 가지며, 줄기가 세모지고 60 cm까지 자란다. 꽃은 8-10월에 적갈색으로 피고 꽃의 인편은 넓은 도란형이며, 원두이고 끝이 약간 뒤로 젖혀지고 뾰족하다.^{5,6)}

방동사니에 대한 약리활성과 식물 화학적 성분 연구는 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구는 방동사니의 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻은 항산화활성이 강한 EtOAc분획에서 3종의 화합물을 분리하고, 이화학적 성상과 기기분석을 통하여 구조를 규명하고 분리된 성분들의 DPPH radical 소거효과에 기인한 항산화활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 방동사니는 2007년 8월에 전북 완주군에서 채취하였으며, 정확히 감정한 후에 음건세

*교신저자 (E-mail): dkkim@mail.woosuk.ac.kr
(FAX): 063-290-1812

절하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - 실험에 사용한 기기로는 용점에 Electro-thermal melting point apparatus (Denmark)를 UV는 Shimadzu UV-1601 UV-Visible spectrophotometer (Japan)를 사용하여 측정하였으며, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer (Japan)를 이용하여 확보하였다. 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 1급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Art. 1.07734, 230-400 mesh, Merck)이며, molecular sieve column chromatography용 packing material은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ precoated plate (Art. 1.07752, Merck)를 사용하였다. 발색시약으로는 10% H_2SO_4 (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV의 검색은 254, 365 nm에서 하였다.

추출 및 분리 - 신선한 방동사니 전초를 음건 세절한 다음 건조하여 얻은 시료 약 600 g을 MeOH로 가끔 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 2회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 MeOH 엑스 약 55 g을 얻었으며, 이 MeOH 엑스에 증류수로 헹타시키고 상법에 따라 동량의 CH_2Cl_2 , EtOAc 및 *n*-BuOH의 순으로 용매 분획하여 12.0, 5.2 및 12.4 g의 분획물을 각각 얻었다. 이들 중 항산화 활성이 가장 강한 EtOAc분획을 DPPH free radical 소거법을 지표로 항산화 활성물질을 분리하였다. EtOAc분획을 CH_2Cl_2 :EtOAc:MeOH (7:1:1)을 유출용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 TLC 양상에 따라 6개의 분획(E1-E6)으로 나누었다. 이 중 주요 반점을 나타낸 E1과 E2에서 물질분리를 시도하였다. E1을 CHCl_3 :EtOAc:MeOH (12:1:1) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 3개의 소분획(E11-E13)으로 나누고 이중 E11과 E13을 Sephadex LH-20 (MeOH)로 정제하여 화합물 1 (15 mg)과 2 (13 mg)를 각각 얻었다. E2를 CHCl_3 :EtOAc:MeOH (7:1:1) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 2개의 소분획(E21-E22)으로 나누고 이중 E21을 Sephadex LH-20 (MeOH)으로 정제하여 화합물 3 (65 mg)을 얻었다.

화합물 1 - mp 180-181°C; $^1\text{H-NMR}$, (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, dd, $J=8.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.32 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.82 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 3.88, 3.87 (each 3H, s, 3, 4- OCH_3).

화합물 2 - mp 211-212°C; $^1\text{H-NMR}$, (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.86 (2, d, $J=8.8$ Hz, H-2, 6), 6.80 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3, 5). $^{13}\text{C-NMR}$, (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.2 (COO), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.8 (C-1), 115.8 (C-3, 5).

화합물 3 - mp 221~222°C; UV, λ_{max} (MeOH) 321, 220;

$^1\text{H-NMR}$, (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.98 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H- α), 6.83 (2H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H- β), 6.74 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.46 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H-2, 6), 6.15 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-4). $^{13}\text{C-NMR}$, (100 MHz, CD_3OD) δ : 159.4 (C-3, 5), 146.3 (C-3', 4'), 141.2 (C-1), 131.0 (C-1'), 129.6 (C- β), 126.9 (C- α), 120.2 (C-2'), 116.4 (C-6'), 113.8 (C-5'), 105.8 (C-2, 6), 102.6 (C-4).

DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성⁷⁾ - 96 well plate에 시료를 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 1.5×10^{-4} M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (EtOH)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid와 BHA (butylated hydroxy anisole)를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 검체의 농도(IC₅₀)로 표시하였다. 각 시료에 대한

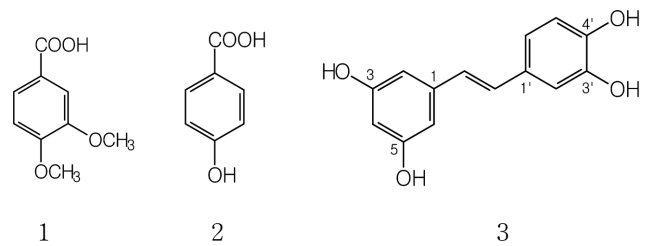


Fig. 1. Structures of compounds 1-3

Table I. Radical scavenging effects on DPPH radical of the methanol extract, and its subsequent fractions from the whole plants of *C. amuricus*

Samples	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}
MeOH extract	18.3
CH_2Cl_2 fraction	>60
EtOAc fraction	11.2
<i>n</i> -BuOH fraction	43.7
H_2O layer	39.9
BHA	3.25

^{a)}50% scavenging concentration

Table II. Radical scavenging effects on DPPH radical of the isolated compounds from the whole plants of *C. amuricus*

Samples	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}
Compound 1	>100
Compound 2	>100
Compound 3	2.89
L-ascorbic acid	1.67
BHA	3.13

^{a)}50% scavenging concentration

DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

결과 및 고찰

화합물 1은 mp 180-181°C의 백색 분말상 고체로 얻어졌으며, ¹H-NMR spectrum에서 aromatic 영역에서 3개의 peak가 δ 7.55 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, H-6), 7.32 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.82 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5)에서 전형적인 ABC coupling 값을 나타냈다. δ 3.88과 3.87 (each 3H)에서 2개의 methoxy peak가 또한 확인되었다. 이상의 결과를 검토한 결과 화합물 1은 3치환된 aromatic 화합물임을 추정할 수 있었으며, 기존 문헌⁸⁾과 비교하여 2,4-dimethoxybenzoic acid로 확인·동정하였다.

화합물 2는 mp 211~212°C의 백색 분말상 고체로 얻어졌다. ¹H-NMR spectrum에서는 aromatic 영역에서 δ 7.86 (2, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, 6), 6.80 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, 5)에서 4개의 proton signal이 전형적인 A²B² coupling system으로 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 총 7개의 carbon signal을 관찰할 수 있었는데, δ 170.2의 signal은 carbonyl carbon으로 나머지 peak는 aromatic 영역의 carbon로 확인되었다. 이상의 결과를 검토한 결과 화합물 2는 carbonyl기 1개를 포함하여 2치환된 aromatic 화합물임을 추정할 수 있었으며, 기존 문헌⁹⁾과 비교하여 4-hydroxybenzoic acid로 확인·동정하였다.

화합물 3은 mp 221-222°C의 갈색 분말로 얻어졌으며, UV spectrum에서 321과 220 nm에서 흡수가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum은 δ 6.98 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.83 (2H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5')에서 ABX coupling system으로 관찰되었고, δ 6.46 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2, 6), 6.15 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-4)에서 aromatic ring에 *meta*-, *meta*'에 치환된 형태의 3개의 proton peak가 확인되었다. 또한 δ 6.89 (H, d, *J* = 16.0 Hz, H-α)와 6.74 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-β)에서 trans coupling하고 2개의 2중결합 proton peak가 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 모두 14개로 추정되는 carbon signal을 관찰되었다. 이상의 결과로 화합물 3은 2개의 aromatic ring과 ethylene을 가지고 있는 화합물인 stilbene 화합물로 추정하였으며, 기존문헌 data¹⁰⁾와 비교하여 3,3',4',5'-tetrahydroxy-stilbene인 piceatannol로 확인·동정하였다.

이상과 같이 방동사니 전초의 MeOH추출물 중 EtOAc 분획에서 항산화 활성물질 3종을 분리하여 그 구조를 동정하였으며, 이들 화합물은 본 식물에서 처음 보고되는 성분이다. 이들 화합물의 항산화활성은 Table II에 나타난 바와 같이 stilbene 유도체인 화합물 3이 IC₅₀ 2.89 μg/ml로 BHA와 유사한 정도의 free radical scavenging effect를 보여 주었으며, 화합물 1과 2는 거의 효과가 나타나지 않았다. 이상의

결과를 살펴보면 방동사니의 MeOH 추출물 중의 항산화활성은 주로 EtOAc분획물에 존재하는 화합물에 기인한 것으로 생각되며, 그 중에서도 주성분으로 보이는 stilbene계 화합물에 의한 것으로 사료된다. 화합물 3은 apoptosis,¹¹⁾ stat3 inhibition,¹²⁾ osteoblast differentiation,¹³⁾ NF-κB activation,¹⁴⁾ tyrosine kinase inhibition¹⁵⁾ 등 다양한 활성이 보고 되어 있으므로 방동사니는 piceatannol 함유 천연자원으로 활용할 만한 가치가 있을 것으로 보인다.

결 론

방동사니 전초의 MeOH추출물 중 EtOAc분획에서 3종의 화합물을 분리하였으며, 이들의 물리화학적 성상과 spectral data로부터 구조를 확인한 결과 3,4-dimethoxybenzoic acid (1), 4-hydroxybenzoic acid (2) 및 piceatannol (3)로 각각 확인. 이 화합물들은 모두 본 식물로부터 처음 분리·보고 되는 화합물이며, piceatannol이 가장 강한 DPPH radical 소거 효능을 보여 주었다.

사 사

이 논문은 2008년 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (지방거점사업단육성사업/헬스케어기술개발사업단)이며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Ma, Y. Q., Ye, X. Q., Fang, Z. X., Chen, J. C., Xu, G. H. and Liu, D. H. (2008) Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *J. Agric. Food Chem.* **56**(14): 5682-5690.
2. Dembinska-Kiec, A., Mykknen, O., Kiec-Wilk, B. and Mykknen, H. (2008) Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.* **99** E Suppl 1: ES 109-117.
3. Li, D. L., Li, X. M., Peng, Z. Y. and Wang, B. G. (2007) Flavanol derivatives from *Rhizophora stylosa* and their DPPH radical scavenging activity. *Molecules*, **12**(5): 1163-1169.
4. Brannen, A. L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **52**: 59-63 (1975).
5. 이창복 (1986) 대한식물도감, 178, 향문사, 서울.
6. 이우철 (1996) 원색한국기준식물도감, 468, 아카데미서적, 서울.
7. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem.*

- Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
8. Katherine, N. S. (1972) Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 8564-8568.
 9. Yazaki, K., Fukui, H. and Tabata, M. (1986) Accumulation of p-O- β ,-D-glucosylbenzoic acid and its relation to shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell cultures. *Phytochemistry*, **25**: 1629-1632.
 10. Kobayashi, K., Ishihara, T., Khono, E., Miyase, T. and Yoshizaki, F. (2006) Constituents of stem bark of *Callistemon rigidus* showing inhibitory effects on mouse α -amylase activity. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1275-1277.
 11. Kim, H. J., Lee, K. W., Kim, M.-S. and Lee, H. J. (2008) Piceatannol attenuates hydrogen-peroxide- and peroxynitrite-induced apoptosis of PC12 cells by blocking down-regulation of Bcl-XL and activation of JNK. *J. Nutr. Biochem.* **19**: 459-466.
 12. Cicinmati, V. R., Kang, J., Klein, C. G. Broelsch, C. E. Gerken, G. and Beckebaum, S. (2007) Effect of stat3 inhibitor piceatannol on human dendritic cell homeostasis and growth of hepatocellular carcinoma *in vitro*. *J. Hepatol.* **46**: Supplement 1, S137.
 13. Chang, J.-K., Hsu, Y.-L., Teng, I.-C. and Kuo, P.-L. (2006) Piceatannol stimulates osteoblast differentiation that may be mediated by increased bone morphogenetic protein-2 production. *Eur. J. Pharmacol.* **551**: 1-9.
 14. Jin, C.-Y., Moon, D.-O., Lee, K.-J., Kim, M.-O., Lee, J.-D., Choi, Y. H., Park, Y.-M. and Kim, G.-Y. (2006) Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and NF- κ B-related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol. Res.* **54**: 461-467.
 15. Seow, C.-J., Chue, S.-C. and Fred Wong, W. S. (2002) Piceatannol, a Syk-selective tyrosine kinase inhibitor, attenuated antigen challenge of guinea pig airways *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* **443**: 189-196.

(2008년 8월 5일 접수)