

황촉규 지상부의 성분분리 및 항산화활성

박은영 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received December 30, 2009; Revised March 20, 2010; Accepted March 20, 2010)

Phytochemical Constituents and Antioxidant Activities of the Aerial Parts of *Hibiscus manihot*

Eun Young Park and Ki Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Column chromatographic separation of the MeOH extract from the aerial parts of *Hibiscus manihot* led to the isolation of four compounds. Their structures were characterized to be hentriacontane (1), palmitic acid (2), daucosterol (3) and 3-dihydrocaffeoyl-5-p-coumaroylquinic acid (4) by spectroscopic methods. The compounds (1~4) were for the first time reported from this plant. The solvent fractions were tested for their antioxidant activities by free radical scavenging and superoxide dismutase (SOD).

Keywords □ *Hibiscus manihot*, Hentriacontane, daucosterol, 3-dihydrocaffeoyl-5-p-coumaroylquinic acid

황촉규(*Hibiscus manihot* Linne)는 이욱과(Malvaceae)에 속하는 중국 원산의 식물로서 민간에서 뿌리는 점활제 또는 위염, 위궤양, 인후염치료에 쓰이고 종자는 이노 및 유즙분비 촉진 등에 이용된다. 뿌리에 D-galactose, L-alvinoose, L-rhamnose, xylose, glucose, D-galacturonic acid, aldovionic acid, rhamnogalacturonic acid 등의 당류와 점액질이 풍부하고^{1,2)} 꽃은 flavonoid를 함유하는 것으로 알려져 있다.³⁾

천연물의 항산화 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, ascorbic acid 및 그 유도체, coenzyme Q10 등의 항산화 물질의 ROS 소거능에 관한 연구가 알려졌으며, isoacetosidi, ellagic acid 등의 SOD 활성 억제물질이 보고되고 있다.⁴⁾

본 식물의 지상부는 자원이 풍부하고 예비검색에서 뿌리나 종자보다 항산화작용이 우수하나 거의 연구된 바 없으므로 지상부의 MeOH 추출물을 상법에 의하여 용매분획물을 만들어 항산화작용을 실험하였으며, 컬럼크로마토그래피를 통하여 4종의 화합물을 분리동정 하였다.

실험방법

실험재료

본고 약초원에서 채취하여 음건 후 세말로 한 황촉규의 지상부 3.0 kg을 100% MeOH로 70°C에서 4회 환류냉각 추출 후 여과하고 감압 농축하여 MeOH 추출물 210.0 g을 얻었다. 이 MeOH 추출물에 대하여 용매를 이용한 계통적 추출방법을 실시하여 hexane 분획물 31.0 g, dichloromethane 분획물 1.8 g, ethylacetate 분획물 1.0 g, butanol 분획물 1.6 g 및 물 분획물 2.0 g을 각각 얻었다.

hexan 분획으로부터 화합물 1~3의 분리

hexan 분획 15 g을 silicagel 컬럼 크로마토그래피(CHCl₃ : MeOH=40 : 1~5 : 1)를 실시하여 F1(821 mg), F2(1209 mg), F3(333 mg), F4(324 mg)를 얻었고, F1을 silicagel 컬럼 크로마토그래피를 실시하여(Hexane : Aceton=80 : 1) HM-1(15 mg)를 얻었다. F2를 silicagel 컬럼 크로마토그래피를 실시하여(Hexane : Aceton=1 : 1) HM-2(13 mg)를 얻었으며 F4를 silicagel 컬럼 크로마토그래피를 실시하여(CHCl₃ : MeOH=5 : 1) HM-3(33 mg)을 분리하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) ksyang@sookmyung.ac.kr

디클로로메탄 분획으로부터 화합물 4의 분리

디클로로메탄 분획 7.5 g을 silicagel 칼럼 크로마토그래피 (CHCl₃:MeOH=20:1~5:1)를 실시하고, 다시 silicagel 칼럼 크로마토그래피(Hexane:Aceton=1:1)로 분리한 후, 이 분획을 다시 RP-18 칼럼 크로마토그래피를 실시하여(Acetonitile:H₂O=5:5) 화합물 4(22 mg)를 단리하였다.

DPPH를 이용한 용매분획물의 항산화 활성 측정

각 시료를 농도별로 조제한 후 시료 100 µl에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% 에탄올에 용해) 1.9 ml을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 37°C에서 3분 동안 배양시켰다. 이 후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화 활성을 측정하기 위하여 전자 공여능(electron donating ability, EDA %)에 의한 환원력으로 표시하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 농도별로 용시 조제하여 사용하였으며 각 시료의 항산화 활성을 비교 검토하기 위해서 EDA가 50%에 이르도록 하는 데 필요한 시료의 양(EDA₅₀)을 측정하였다.

SOD 활성의 측정

SOD에 의해 O₂^{·-}가 소거된 정도를 바탕으로 SOD 활성을 간접적으로 측정하였다. 농도별로 시료용액을 가하고 각각 hematoxylin을 넣어 반응시킨 후, 생성된 H₂O₂에 의한 hema-

toxyline의 탈색된 정도를 분광학적 방법으로 측정하였다.

농도별로 조제한 시료를 100 µl씩 취하고 KP buffer 1.37 ml과 5 mM hematoxyline 용액을 가한 후 진탕한다. 실온에 방치하여 0, 5, 10분 후에 spectrophotometer를 이용하여 568 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과는 mean±SD로 나타내었으며 자료 분석은 student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

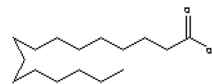
화합물의 확인 동정

HM-1은 white powder로써 EI-Mass spectrum에서 m/z 436에서 molecular ion peak[M⁺]를, m/z 421에서 CH₃가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. 실험결과 및 문헌과의 비교로 HM-1을 분자량 436, 분자식 C₃₁H₆₄의 hentriacontane으로 확인 동정하였다.⁵⁾

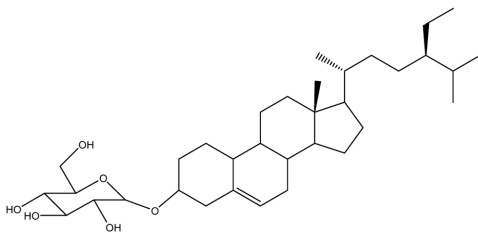
HM-2는 EI-Mass spectrum에서 m/z 256에서 molecular ion peak[M⁺]를, 그리고 m/z 213, 129에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. HM-2는 분자량 256, 분자식 C₁₆H₃₂O₂인 palmitic acid로 확인 동정하였다.⁶⁾



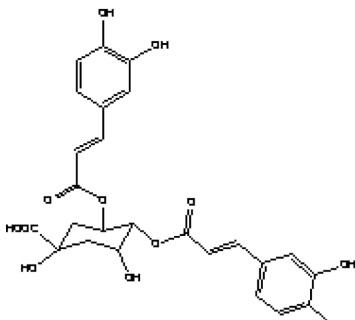
HM-1: hentriacontane



HM-2: palmitic acid



HM-3: daucosterol



HM-4: 3-dihydrocaffeoyl-5-p-coumaroylquinic acid

Fig. 1 – Structures of the compound 1~4 from *Hibiscus manihot*.

HM-3은 EI-Mass spectrum에서 m/z 576에서 molecular ion peak[M⁺]를, 그리고 m/z 396에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. HM-3을 분자량 576, 분자식 C₃₅H₆₀O₆의 sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside인 daucosterol로 확인 동정하였다.⁶⁾

HM-4은 EI-Mass spectrum에서 m/z 516에서 molecular ion peak[M⁺]를, 그리고 m/z 195에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. HM-4을 분자량 516, 분자식 C₂₅H₂₄O₁₂의 3-dihydro-caffeoyl-5-p-coumaroylquinic acid로 확인 동정하였다⁶⁾(Fig. 1).

화합물 1의 물리화학적 성상

White powder, C₃₁H₆₄ (M.W 436)

¹H NMR(CDCl₃, 500MHz) δ

0.81(s, 3H, CH₃), 1.23(m, J=7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.96(m, J=4.95 Hz, 2H, CH₃CH₂)

¹³C NMR(CDCl₃, 125MHz) δ

13.84(CH₃), 20.54(C-2,30 CH₂), 22.48(C-3,29 CH₂), 29.16 (C-4,28 CH₂), 31.74(C-5,27 CH₂), 38.71(C-6,26 CH₂), 38.88 (C-7,25 CH₂), 39.05(C-8,24 CH₂), 39.21(C-9,23 CH₂), 39.38 (C-10,22 CH₂), 39.55(C-11,21 CH₂)

화합물 2의 물리화학적 성상

White powder, C₁₆H₃₂O₂ (M.W 256)

¹H NMR(CDCl₃, 500MHz) δ

0.88(s, 3H, CH₃), 1.63(m, 2H, CH₂), 1.63(m, 2H, COCH₂CH₂), 2.34(t, J=7.5 Hz, 2H, COCH₂)

¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ

19.81(CH₃), 28.67(C-15), 28.83(C-14), 28.93(C-13), 31.45 (C-2), 173.28(C-1)

화합물 3의 물리화학적 성상

White powder, C₃₅H₆₀O₆ (M.W 576)

¹H NMR(pyridine-d₅, 500MHz) δ

0.68(s, 3H, H-18), 0.88(d, J=6.96 Hz, 3H, H-26), 0.89(d, J=2.8 Hz, 3H, H-27), 0.91(t, J=9.33 Hz, 3H, H-29), 0.92(d, J=3.15 Hz, 3H, H-29), 0.93(s, 3H, H-19), 4.01(m, J=5.39 Hz, 1H, H-5'), 4.09(m, 1H, H-3), 4.31(t, J=4.17 Hz, 1H, H-2'), 4.33(t, J=3.75 Hz, 1H, H-3'), 4.46(t, J=5.25 Hz, 1H, H-4'), 4.58(dd, J=2.01 Hz, 5.95, 1H, H-6'), 5.09(d, J=7.72 Hz, 1H, H-1'), 5.37(d, J=2.3 Hz, 1H, H-6)

¹³C NMR(pyridine-d₅, 125 MHz) δ

12.48(C-18), 12.66(C-29), 19.52(C-21), 19.72(C-19), 19.92 (C-26), 20.48(C-27), 21.79(C-11), 23.9(C-28), 25.01(C-15), 26.91(C-23), 29.04(C-16), 30.09(C-25), 30.47(C-2), 32.57(C-8), 32.68(C-7), 34.72(C-22), 36.89(C-20), 37.43(C-10), 37.99(C-1),

39.85(C-4), 40.46(C-12), 42.99(C-13), 46.56(C-24), 50.86(C-9), 56.76(C-17), 57.34(C-14), 63.35(C-6'), 72.22(C-4'), 75.84(C-2'), 78.62(C-5'), 78.98(C-3'), 79.11(C-3), 103.09(C-1'), 122.42(C-6), 141.42(C-5)

화합물 4의 물리화학적 성상

White power, C₂₅H₂₄O₁₂ (M.W 516)

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ :

1.96(m, 2H, H-18), 2.6(m, 2H, H-19), 4.19(1H, H-3), 4.6 (1H, H-4), 4.85(1H, H-29), 6.31(d, 1H, H-8"), 6.62(d, H-5"), 6.66(dd, H-5"), 6.89(dd, H-6"), 7.03(d, H-2'), 7.26(d, H-2"), 7.59(d, H-72")

¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ :

30.42(C-2), 31.91(C-6), 63.98(C-3), 65.0(C-4, 5), 86.0(C-1), 114.99(C-8',8"), 115.21(C-2',2"), 116.14(C-5',5"), 123.51(C-6',6"), 130.2(C-7',7"), 147.26 (C-4',4"), 167.11(C-1'), (167.19(C-1"), 167.7(C-9',9").

항산화능에 미치는 영향

노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 체내에서 활성산소를 조절하는 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 효소에 대한 연구와 천연 항산화제인 셀레늄, 토코페롤, 아스코르빈산, 베타카로틴, 글루타치온 및 합성 항산화제인 BHA, BHT 등 많은 항산화제의 개발 연구가 보고 되어 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 천연물로서 양과,¹¹⁾ nut류¹²⁾ 등과 같은 식용으로 쓰이는 식물을 비롯하여 물냉이,¹³⁾ 오가피,¹⁴⁾ 박하 등¹⁵⁾ 약용으로 이용되는 다양한 추출물에 대한 연구가 알려져 있다. 시료를 첨가하지 않은 0.1 mM DPPH 용액 1.9 ml을 50% 환원 시키는데 필요한 시료의 양(EDA%)을 측정한 결과는 다음과 같다(Fig. 2, Fig. 3).

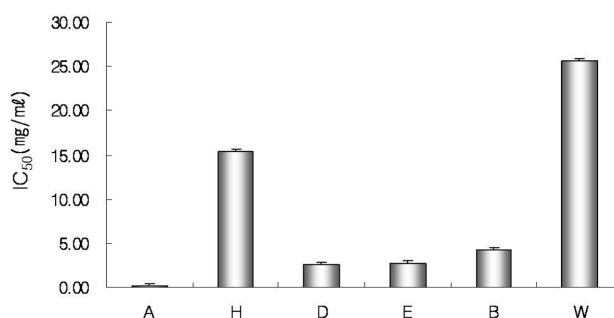


Fig. 2 – The radical scavenging effects of solvent fractions from *Hibiscus manihot* (A: ascorbic acid, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H₂O) Each value represents the mean \pm S.D (n=3). IC₅₀: Required sample amount (μ g) for 50% reduction of 0.1 mM DPPH solution 1.9 ml.

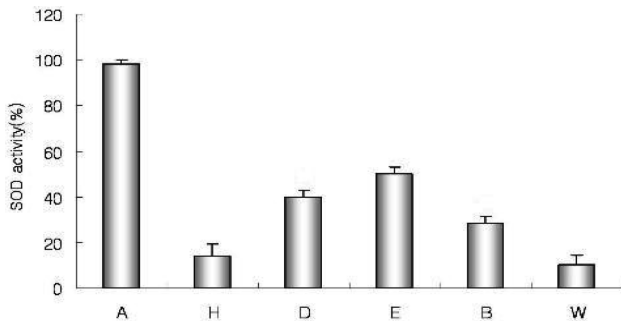


Fig. 3 – The SOD activities of solvent fractions from *Hibiscus manihot* (A: ascorbic acid, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H₂O). Each value represents the mean±S.D (n=3).

항산화제로 잘 알려진 아스코르빈산의 ED₅₀은 131.6 µg으로 우수한 항산화능을 보였으며, 황촉규의 디클로로메탄 분획은 ED₅₀ 1815.4 µg, 에틸아세테이트 분획은 ED₅₀ 2897.4 µg 항산화능을 보여 아스코르빈산에 비해 그다지 효과를 나타내지 못하였다. 또한 SOD에 의해 O²가 소거된 정도를 바탕으로 SOD 활성을 간접적으로 측정하였다.

강력한 항산화제인 아스코르빈산을 비교물질로 하여 SOD활성을 측정 한 결과, 아스코르빈산의 활성을 100%로 할 때, 디클로로메탄분획 40%, 에틸아세테이트 분획 50.3%의 활성을 나타내었다.

결 론

황촉규 hexane 분획으로부터 hentriacontane(1), palmitic acid(2), daucosterol(3) 그리고 dichloromethane 분획으로부터 3-dihydrocaffeonyl-5-p-coumaroylquinic acid(4)를 분리하였으며 이들 성분들은 본 식물에서는 처음으로 보고하였다. 메탄올 추출물을 hexane, ethyl acetate, BuOH 및 Water 분획으로 나누어 유리기소거작용, SOD 활성을 통한 항산화활성을 측정한 결과 유리기소거작용은 별로 크지 않았으나 에틸아세테이트 분획에서 가장 큰 SOD 활성을 나타냄을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 SRC여성질환연구센터 지원(2009)으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 배기환 : 한국의 약용식물, (주)교학사, 333 (2003).
- 2) 한국 약용식물학 연구회 : 종합 약용식물학, 학창사, 231 (2004).
- 3) Qiu, Y : Extraction and determination of total flavones content in *Hibiscus manihot* flower. *J. Herbal Normal University Natural Science* **30**, 713 (2006).
- 4) Choi, J. Y., Kim, K. D., Park, J. K. and Kim, N. I. : Effects of green tea (-)epigallocatechin-3-gallate and polyphenol on the proliferation and apoptosis of cultured human keratinocytes, melanocytes, fibroblasts, endothelial Cells, and human epidermoid carcinoma cells. *Kor. J. Dermatol.* **40**, 375 (2002).
- 5) Golebiowski, M., Malinski, E., Nawrot, J., Szafranek, J. and Stepnowski, P. : Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **147**, 288 (2007).
- 6) 국가한약재평가기술과학화연구소 : 한약재성분 분광분석 자료집. 도서출판 우림. 64, 67, 73, 118 (2007).
- 7) 柳善彦 : 活性酸素と病氣. 化學同人, Japan (1989).
- 8) 유진 : 활성산소(유해산소)가 질병의 원인이었다. 이화문화출판사. (1997).
- 9) Ray, G., Batra, S., Shukla, N. K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S. and Husain, S. A. : Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **59**, 163 (2000).
- 10) 정혜영 : Free radical에 의한 노화 및 발암기전. 한국노화학회지 **2**, 1 (1992).
- 11) 정명현, 이병주, 김경완 : 양파(*Allium cepa* L.)의 항고지혈 및 항산화활성에 관한 연구. 생약학회지 **28**, 198 (1997).
- 12) 차배전, 이해원, 최무영 : Nut류의 항산화 및 항균효과, 생약학회지 **29**, 28 (1998).
- 13) Ozen, T. : Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. *Acta. Pol. Pharm.* **66**, 187 (2009).
- 14) Sithisarn, P. and Jarikasem, S. : Antioxidant activity of *Acanthopanax trifoliatum*. *Med. Princ. Pract.* **18**, 393 (2009).
- 15) Gursoy, N, Sihoglu, T. A. and Tepe, B. : Determination of in vitro antioxidative and antimicrobial properties and total phenolic contents of *Ziziphora clinopodioides*, *Cyclotrichium niveum*, and *Mentha longifolia* var. *typhoides*. *J. Med. Food* **12**, 684 (2009).