

## 가자 항산화성 물질의 분리 및 확인

김정숙 · 이기동 · 권중호 · 윤형식

경북대학교 식품공학과

**초록** : 달지 가자(*Terminalia chebula* Retz)에서 추출, 분리된 페놀성 항산화 물질의 화학구조를 MS 및 H-NMR을 이용하여 분석하였다. 가자의 유리형 페놀산 추출물에는 ferulic acid, vanillic acid 및 *p*-coumaric acid, 용성 에스테르형 페놀산에는 caffeic acid, vanillic acid 및 *p*-coumaric acid, 불용성 페놀산에는 caffeic acid, phloroglucinol 및 pyrogallol이 주된 항산화성 물질로 확인되었다(1993년 2월 5일 접수, 1993년 5월 24일 수리).

식용유지나 유지식품은 불포화 지방산의 존재로 인하여 가공, 조리 및 저장중에 산패가 일어나게 된다.<sup>1-3)</sup> 산패된 유지는 생체내에서 유해한 것으로 알려져 있으므로<sup>4)</sup> 유지의 산패를 억제하기 위하여 항산화 효과와 관련된 새로운 항산화 물질과 상승제에 관한 연구가 행해지고 있다.<sup>5,6)</sup> 그 중에서도 천연물 중에는 항산화 작용을 가진 여러 성분이 존재하는데, 특히 생약중의 여러 phenol 성분들은 수소공여능이 강하여 항산화 효과가 큰 것으로 알려지고 있다.<sup>7,8)</sup> 전보<sup>9)</sup>에서 탈지된 산사와 가자로부터 페놀성 물질을 추출하여 이들의 항산화 효과를 측정하였던 바 합성 항산화제(BHA, BHT)보다 항산화 효과가 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 가자 에테르 추출물에서 항산화성 성분인 페놀성 물질의 분리, 동정을 시도하였다.

### 방 법

Column chromatography에 의한 페놀성 물질의 분리 Krygier<sup>10)</sup>의 방법에 의해 추출된 가자의 유리형, 용성 에스테르형 및 불용성 페놀산 분획에 대하여, TLC 및 column chromatography에 의한 분리 및 분석시료의 조제방법은 전보<sup>11)</sup>와 동일하게 실시하였다.

### NMR와 MS에 의한 페놀성 물질의 구조 분석

Proton-NMR은 tetramethylsilane(TMS)을 내부 표준 물질로 사용하였고, MS 분석은 direct probe 방식으로 전보<sup>11)</sup>와 동일한 조건으로 실험하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유리형 페놀산의 구조 확인

가자의 유리형 페놀산은 TLC상에서 세개의 spot였으므로(Fig. 1), 이를 column chromatography로 분리하여 얻은 세 compound의 구조를 MS와 NMR로 분석하였다. 가자의 유리형 페놀산으로부터 분리된 compound 1은 TLC의 R<sub>f</sub>치가 0.90이며, column chromatography로 분획한 후 농축하여 ether로 재결정하여 얻어진 백색의 침상 결정 60 mg을 MS와 NMR 분석시료로 하였다.

MS spectrum에서 m/z 194가 분자량이며, 179(M-CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 163(M-OCH)<sup>+</sup>, 148(M-COH-COOH)<sup>+</sup>, 136(M-CH-COOH)<sup>+</sup>, 108(136-CO)<sup>+</sup>로 생각되었다. H-NMR로 분석한 결과 두 개의 olefinic proton과 aromatic proton이 관찰되었다. 또한 Fig. 2에서 두 개의 olefinic proton은 7.52 ppm과 6.23 ppm에서 두 개의 doublet을 보였다. 7.04 ppm에서의 doublet은 C-6 proton과 서로 영향을 미치는 C-2 proton 때문인 것으로 나타났다. 6.99 ppm과 6.83 ppm에서 나타난 두 개의 doublet은 C-6과 C-5 proton에 기인하는 하나의 proton을 합한 것이었다. 6.99 ppm의 doublet은 C-6 proton과 C-2 proton 사이의 상호작용에 의한 doublet으로 나타났다. C-3 위치에서 한 개의 methoxyl group은 3.87 ppm에서 세 개의 proton을 합한 singlet으로 밝혀졌다. 이상의 결과에서 볼 때 compound 1은 ferulic acid로 확인되었다.

가자의 유리형 페놀산으로부터 분리된 compound 2는 TLC상에서 R<sub>f</sub>치가 0.68이며, column chromatography로

분획한 후 농축하고 acetone으로 재결정하여 얻어진 백색의 침상 결정 70 mg을 MS와 NMR 분석시료로 하였다. Fig. 3의 spectrum에서  $M^+$  168, 153(M-CH)<sup>+</sup>, 139(M-HCO)<sup>+</sup>, 125(M-CH-CO)<sup>+</sup>, 97(M-CH-CO-CO)<sup>+</sup> 등으로 나타났다. H-NMR의 분석결과는 세 개의 aromatic proton과 한 개의 methoxyl group을 나타내었다. 세 개의 proton이 합쳐져 나타난 3.59 ppm에서의 singlet은 C-3 위치에 있는 한 개의 methoxyl group에 의한 것이다. 세 개의 aromatic proton은 7.35 ppm과 6.95 ppm에서 두 개의 doublet을 형성하고 있었다. 9.84 ppm에서 나타난 넓은 singlet은 한 개의 proton과 hydroxyl group에서

나타난 proton이 합쳐진 것으로 분석되었다. 위의 결과로 미루어 compound 2는 vanillic acid로 동정되었다.

가자의 유리형 페놀산으로부터 분리된 compound 3은 TLC상에서 R<sub>f</sub>치가 0.40이며, column chromatography로 분획한 후 농축하고 H<sub>2</sub>O-methanol로 재결정하여 얻어진 미황색의 침상 결정 50 mg을 MS와 NMR 시료로 하였다. MS spectrum상에서  $M^+$  164, 147(M-OH)<sup>+</sup>, 134(M-HCO-H)<sup>+</sup>, 119(M-COOH)<sup>+</sup>, 91(M-COOH-CO)<sup>+</sup>로 분석되었다. Fig. 4의 H-NMR spectrum에서는 네 개의 aromatic proton과 두 개의 olefinic proton이 관찰되었다. C-3 및 C-5의 proton과 C-2 및 C-6의 proton이 coupling하여 6.80과 7.41 ppm에서 각각 doublet으로 나타났고 CH=CHCOOH의 두 olefinic proton은 6.21과 7.41 ppm에서 각각의 doublet으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 compound 3은 *p*-coumaric acid로 동정되었다.

이같이 확인된 구성성분은 생약 산사의 유리 페놀산 중의 향산화성 물질과는 상이한 것으로 나타났다.

**용성 에스테르형 페놀산의 구조 확인**

가자의 용성 에스테르형 페놀산은 TLC상에서 세 개의 spot였으므로(Fig. 1), 이를 분리하여 얻은 세 compound의 구조를 분석하였다. 가자의 용성 에스테르형 페놀산으로부터 분리된 compound 1은 TLC상에서 R<sub>f</sub>

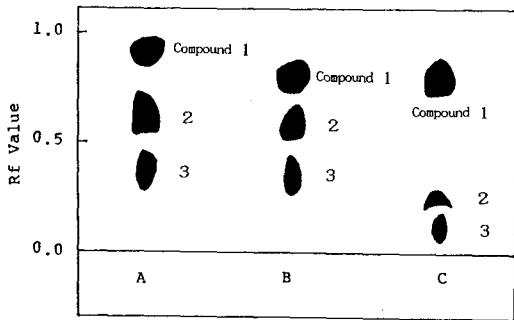


Fig. 1. Thin layer chromatogram of free(A), soluble ester(B), insoluble bound phenolic acids(C) in *Chebulae Fructus*.

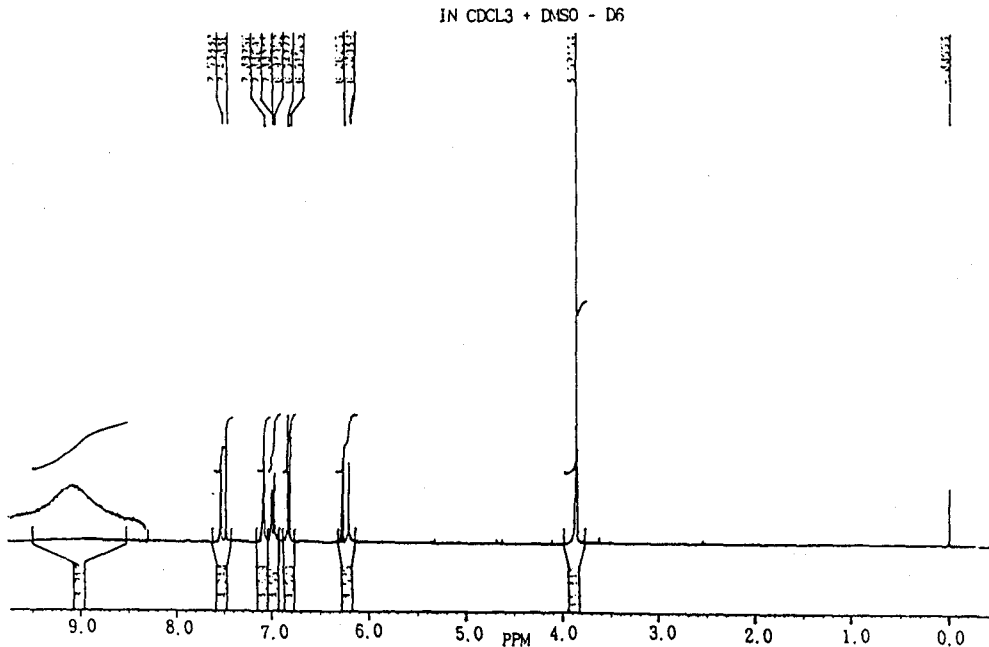


Fig. 2. H-NMR spectrum of compound 1 of free phenolic acid in *Chebulae Fructus*.

치가 0.83이며, column chromatography로 분획한 후 MS와 NMR 분석을 하였다. Mass spectrum에서 m/z 180이 분자량이며, 163(M-OH)<sup>+</sup>, 136(M-COOH+H)<sup>+</sup>, 120(M-CH<sub>3</sub>COOH)<sup>+</sup>, 106(M-COOH-HCO)<sup>+</sup>로 나타났다. H-NMR로 분석한 결과 세 개의 aromatic proton과 두 개의 olefinic proton이 관찰되었다. 6.43과 6.46 ppm에서 C-5와 C-6의 proton이 coupling하여 나타났으며, C-2 proton은 7.62 ppm인 것으로 생각되었다. CH=CH-COOH에서 두 개의 olefinic proton은 6.15 및 6.62 ppm에서 doublet 및 singlet으로 나타났다. 이상의 결과에서 compound 1은 caffeic acid로 동정되었다.

Compound 2는 MS 분석결과 분자량이 168로 나타났으며, H-NMR 분석에서 세 개의 aromatic proton과 한 개의 methoxyl group이 확인되었으므로 vanillic

acid로 동정되었다. Compound 3은 MS 분석결과 분자량이 164로 나타났으며, H-NMR 분석에서는 네 개의 aromatic proton과 두 개의 olefinic proton이 관찰되었기에 *p*-coumaric acid로 동정되었다.

**불용성 페놀산의 구조 확인**

가자의 불용성 페놀산은 TLC상에서 세 개의 spot으로 전개되었기에 이를 분리하여 얻은 세 compound의 구조를 분석하였다. Compound 1은 MS 분석결과 분자량이 180으로 나타났으며, H-NMR에서는 세 개의 aromatic proton과 두 개의 olefinic proton이 확인되어 caffeic acid로 동정되었다. 가자의 불용성 페놀산으로부터 분리된 compound 2는 TLC상에서 R<sub>f</sub>치가 0.26이며, column chromatography로 분획한 후 MS와 NMR로 분석한 결

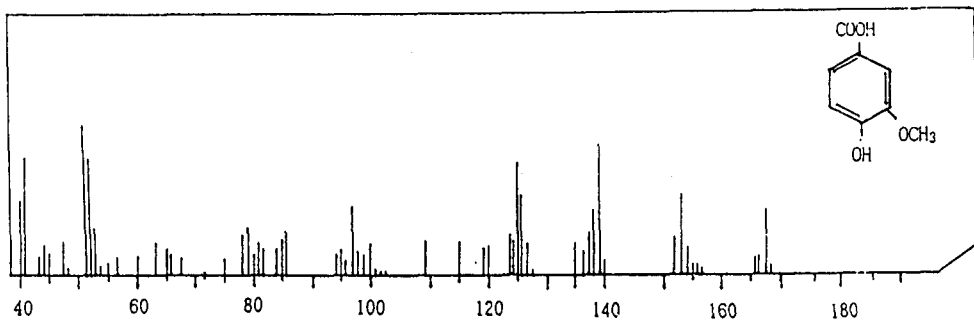


Fig. 3. MS spectrum of compound 2 of free phenolic acid in Chebulae Fructus.

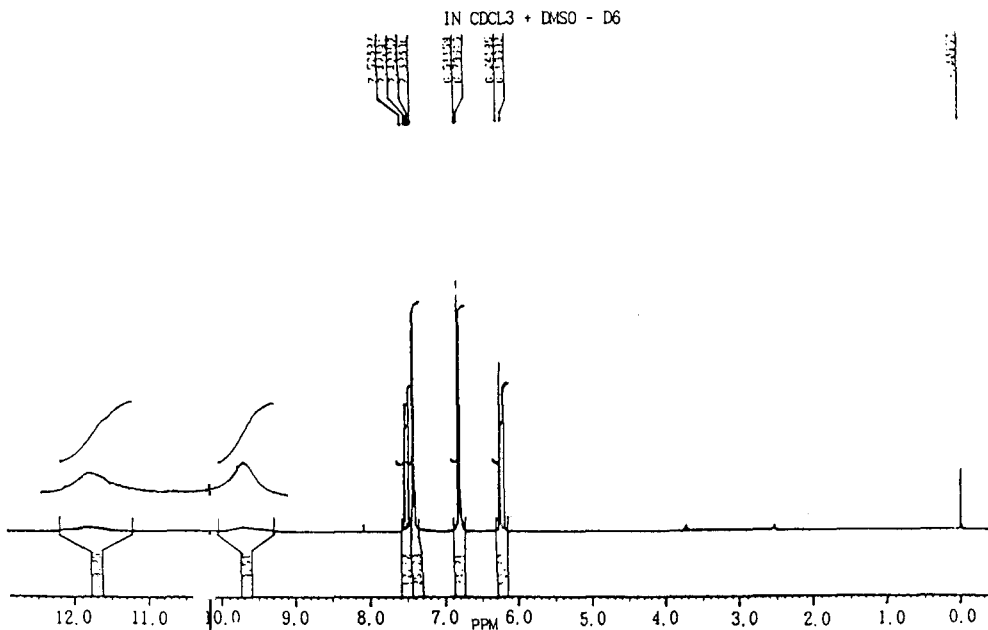


Fig. 4. H-NMR spectrum of compound 3 of free phenolic acid in Chebulae Fructus.

과, MS spectrum에서는  $m/z$  126이 분자량이며 여기에서 물 한 분자가 떨어져  $m/z$  108,  $91(108-OH)^+$ ,  $81(M-HCO-O)^+$ ,  $74(91-OH)^+$ 로 보아 phloroglucinol로 확인되었다.

가자의 불용성 페놀산으로부터 분리된 compound 3은 TLC상에서  $R_f$ 치가 0.13이며 column chromatography로 분획한 후 농축하였다. MS spectrum에서  $m/z$  126이 분자량을 알 수 있었고, 물 한 분자가 떨어져  $m/z$  108이 base peak로 나타났으며, hydroxyl기가 떨어져  $m/z$  91, 다시  $m/z$  74 이온이 생성된 것으로 해석되어 이를 pyrogallol로 동정하였다. NMR spectrum에서는 benzene ring의 proton 세개와 C-3, 4, 5번 hydroxyl기의 세 proton이 확인되었다. 6.13 ppm의 doublet과 6.81 ppm의 multiplet은 3-H, 4-H, 및 5-H로 밝혀졌으며, 7.10 ppm과 7.41 ppm의 doublet은 1-, 2-, 3-OH의 proton으로 나타나 pyrogallol로 분석되었다.

이상의 결과에서 볼 때 가자에서 추출된 유리형, 용성 에스테르형 및 불용성 페놀산의 column chromatography에서는 hexane과 ethyl acetate 4 : 1 및 2 : 1 분획에서는 ferulic acid와 caffeic acid, 1 : 1 분획에서는 vanillic acid, 1 : 2와 ethyl acetate 분획에서는 *p*-coumaric acid, ethyl acetate 분획에서는 phloroglucinol, ethyl acetate와 methanol 분획에서는 pyrogallol이 각각 분리 용출됨이 확인되었다.

Wu 등<sup>12)</sup> 및 Houlihan 등<sup>13,14)</sup>은 향신료의 일종인 rosemary 잎으로부터 항산화 성분인 carnosol, rosmaridiphenol 및 rosmariquinone 등을 분리하여 lard에 첨가하고 저장한 후 일주일 간격으로 항산화 효과를 측정한 결과, carnosol은 BHA 및 BHT보다 항산화 효과가 우수하였고, rosmaridiphenol은 BHA보다 우수하나 BHT와는 거의 유사하며, 또한 rosmariquinone은 BHA보다 항산화 효과가 우수하고 BHT보다는 약한 것으로 보고한 바 있는데, 이들 성분의 구조도 역시 기존의 항산화제와 마찬가지로 phenol성 hydroxyl기를 가지고 있음이 알려진 바 있어 본 실험의 결과와 일치함을 알 수 있다.

이상에서 가자의 유리형 페놀산에는 caffeic acid, vanillic acid 및 *p*-coumaric acid, 불용성 페놀산에는 caffeic

acid, phloroglucinol 및 pyrogallol이 확인되어 주된 항산화성 물질을 사용한 항산화 효과 시험이 계속되고 있다.

### 감사의 글

이 논문은 1992년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로서 깊은 감사를 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Privett, O. S. and Blank, M. L.: J. Am. Oil Chem. Soc., 39 : 465(1962)
2. Kazzuos, M. and Tour, T.: J. Am. Oil Chem. Soc., 63 : 1380(1986)
3. Colemans, J. E. and Hampson, J. W.: J. Am. Oil Chem. Soc., 41 : 347(1964)
4. Pryorsw, A., Stanley, J. P. and Blair, E.: Lipids, 11(5) : (1976)
5. Hudson, B. J. F. and Mahgoub, S. E. O.: J. Sci. Food Agric., 32 : 208(1981)
6. Hudson, B. J. F. and Mahgoub, S. E. O.: J. Sci. Food Agric., 31 : 646(1980)
7. Rhee, K. I., Yolanda, A. Z. and Rhee, K. C.: J. Food Sci., 46 : 75(1981)
8. Kozłowska, H. and Zadernowski, R.: J. Am. Oil Chem. Soc., 60 : 1119(1983)
9. 김정숙, 이기동, 권중호, 윤형식: 한국농화학회지, 36 : 203(1993)
10. Krygier, K.: J. Agric. Food Chem., 30 : 330(1982)
11. 김정숙, 이기동, 권중호, 윤형식: 한국농화학회지, 36 : 154(1993)
12. Wu, J. W., Chi-T. H. and Chang, S. S.: J. Am. Oil Chem. Soc., 59 : 339(1982)
13. Houlihan, C. M., Chi-T. H. and Chang, S. S.: J. Am. Oil Chem. Soc., 61 : 1036(1985)
14. Houlihan, C. M., Chi-T. H. and Chang, S. S.: J. Am. Oil Chem. Soc., 62 : 96(1985)

**Identification of phenolic antioxidative components in *Terminalia Chebula* Retz**

Jeong-Sook Kim, Gee-Dong Lee, Joong-Ho Kwon and Hyung-Sik Yoon(Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

**Abstract** : Chemical structures of phenolic antioxidative components of defatted *Terminalia chebula* R. were elucidated by used MS and H-NMR. The results showed that the phenolic antioxidative components were identified as ferulic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid in free-acid extracts, and caffeic acid, vanillic acid and *p*-coumaric acid in soluble-acid extracts, and caffeic acid, phloroglucinol and pyrogallol in insoluble-bound extracts, respectively.