

산사 항산화성 물질의 분리 및 동정

김정숙 · 이기동 · 권중호 · 윤형식

경북대학교 식품공학과

초록 : 탈지 산사(*Crataegus pinnatifida* Bunge)에서 추출된 에테르 추출물의 항산화성이 확인됨에 따라, 각 페놀성 추출물, 즉 유리형, 용성 에스테르형 및 불용성 물질의 분리 및 동정이 TLC, gel column chromatography, MS 및 H-NMR에 의해서 시도되었다. 시료의 유리형 페놀산 추출물에서는 caffeic acid, protocatechuic acid 및 pyrogallol, 용성 에스테르형 페놀에서는 caffeic acid 및 phloroglucinol, 불용성 페놀산에서는 protocatechuic acid, phloroglucinol 등이 각각 동정되어 산사의 주된 항산화성 물질임이 확인되었다(1993년 2월 5일 접수, 1993년 5월 24일 수리).

유지 및 유지식품의 가공 및 저장 중에는 지방질 성분의 산화로 인해 생성된 과산화물과 그 2차 산물들은 생체내에서 유해한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.^{1,2)} 따라서 최근에 천연물 및 식품의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행됨에 따라^{3,4)} 생약재인 산사추출물의 항산화성을 탐색한 결과 그 항산화 효과는 합성 항산화제보다 우수한 것으로 밝혀졌다.⁵⁾ 천연물로부터 분리된 항산화 성분인 페놀계 화합물은 이들 물질들이 갖는 수산기가 유지의 산화물 중 유리기 수용체로서 산패의 초기단계에 안정된 resonance hybrid를 형성하므로 산화억제작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} 그러나 천연 항산화제 중 널리 알려진 토코페롤은 단독으로는 산화연쇄반응 저지능력이 낮기 때문에⁸⁾ 천연활성물질로서 보다 효과적인 산화방지 효과를 갖는 다른 항산화 물질의 개발이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 추출된 각 페놀성 물질의 항산화 효과가 함유된 페놀 성분의 종류에 따라 차이가 있을 것으로 생각되어 우선 산사에서 추출된 항산화 성분의 분리, 동정을 시도하였다.

재료 및 방법

Column chromatography에 의한 페놀성 물질의 분리

Krygier⁹⁾의 방법에 의해 추출된 산사의 유리형, 용성 에스테르형 및 불용성 페놀산 분획에 대하여 TLC(sol-

vent; hexane : ethylacetate, 1 : 1, v/v) 및 column chromatography를 행하였다. 이때 column(2.5×95.0 cm)에는 hexane으로 활성화한 silica gel 60(70~230 mesh, No. 7734)를 충전하여 유속 0.8~1.2 ml/min로 용출시켰고, 8 ml/씩 분획하였다. 용매 조건은 hexane과 ethyl acetate (4 : 1→2 : 1→1 : 1→1 : 2) 용액에서 ethyl acetate로, 다시 acetate와 methanol(9 : 1, 1 : 1) 용액으로 용출시켰다. 용리된 각 분획은 TLC(silica gel 60 F 254, No. 5721) 및 HPLC(Water Associates, USA)로 검색하였으며,⁵⁾ 용리액을 evaporator로 감압 농축한 후 재결정하고 진공 건조시켜 NMR 및 MS 분석용 시료로 사용하였다.

MS와 NMR에 의한 페놀성 물질의 구조분석

MS(Shimadzu Qp 1,000A, Japan) 측정은 direct probe 방식으로서 고체시료 1 mg을 가열, 기화시켜 측정하였으며, 250~300°C에서 질량분석을 하였다. Proton-NMR(Bruker FT-300, USA)은 tetramethylsilane(TMS)을 내부 표준 물질로 사용하여 chemical shift는 ppm으로 표시하였다. 측정시 NMR tube는 Wilmad사 제 507-99번 tube에 시료 5 mg을 chloroform-d₃와 DMSO-d₆에 5% (w/v) 비율로 용해시켜 측정하였으며, DMSO-d₆ 용매는 1% TMS가 함유된 것으로 사용하였다.

결과 및 고찰

페놀성 성분의 분리

Key words : *Crataegus pinnatifida* Bunge, phenolic compounds, chemical identification
Corresponding author : H. S. Yoon

산사에서 추출된 유리형, 가용성 에스테르형 및 불용성 페놀산에 대하여 TLC를 실시한 결과, Fig. 1과 같이 각각 2~3개의 spot가 선명하게 분리됨을 확인 하였고, 이들 화합물의 Rf값을 고려해 볼 때 각 회분에 동일한 성분이 존재 할 것으로 생각되었다. 이는 전보⁵⁾의 HPLC chromatogram과 동일한 패턴임을 알 수 있었다. 한편 용매를 달리 하면서 column chromatography를 실시하여 얻은 용리액에 대하여 TLC와 HPLC에 의해 분리해 본 결과, 각 회회에서 2~3개의 단일 물질이 존재함을 확인하였다.

유리형 페놀산의 구조확인

산사의 추출물 중 항산화 효과가 가장 높았던⁵⁾ 유리형 페놀산은 TLC상에서 3개의 spot이므로 이를 column chromatography로 분리하여 얻은 3개 compound의 구조를 MS와 NMR로 분석하였다. 산사의 유리형 페놀산 으로부터 분리한 compound 1은 TLC상의 Rf치가 0.83이며, column chromatography로 분획한 후 농축하여 ether로 재결정하고 얻어진 미황색의 침상 결정 90 mg으로 MS와 NMR 분석을 하였다. Fig. 2에서 m/z 180이 분자량이며 163(M-OH)⁺, 136(M-COOH+H)⁺, 120(M-

CH₃COOH)⁺, 106(M-COOH-HCO)⁺로 나타났다. H-NMR로 분석한 결과 세개의 aromatic proton과 두개의 olefinic proton이 관찰되었다. 6.43과 6.46 ppm에서 C-5와 C-6의 proton이 coupling되어 나타났으며, C-2 proton은 7.62 ppm인 것으로 생각되었다. CH=CH-COOH의 두개의 olefinic proton은 6.15 및 7.62 ppm에서 doublet 및 singlet으로 나타났다. 이상의 결과에서 compound 1은 caffeic acid로 동정되었다. 유리형 페놀산 으로부터 분리한 compound 2는 TLC상의 Rf치가 0.36이며 column chromatography에 의해 분획한 후 농축하고 acetone으로 재결정하여 얻어진 미갈색의 침상결정 50 mg으로서 MS와 NMR 분석을 하였다. MS분석 결과는 m/z 154가 분자량을 나타내고, 물 한 분자가 떨어져 m/z 136이 base peak로 나타났으며 124(M-HCO-H)⁺, 108(M-HCOOH)⁺로 나타났다. 또한 base peak에서 CO기가 떨어진 108로 보아 protocatechuic acid로 분석되었다. Fig. 3의 H-NMR spectrum상에서 세개의 benzene ring의 proton과 두개의 hydroxyl기의 proton이 관찰되었다. 6.79, 7.35, 7.40 ppm에서 나타난 doublet들은 aromatic proton으로서 2-H, 4-H, 5-H를 나타내었으며, 9.15 ppm 부근에서 넓게 나타난 peak는 C-3 OH와 C-4 OH의 proton들로 분석되어 protocatechuic acid임이 확인되었다.

또한 유리형 페놀산으로부터 분리된 compound 3은 TLC상에서 Rf치가 0.13이며 column chromatography로 분획한 후 농축하여 H₂O-methanol로 재결정하여 얻어진 백색의 침상 결정 30 mg으로서 MS와 NMR 분석을 하였다. Fig. 4의 MS spectrum에서 m/z 126이 분자량임을 알 수 있었고, 물 한 분자가 떨어져 m/z 108이 base peak로 나타났으며 hydroxyl기가 떨어져 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, 5-

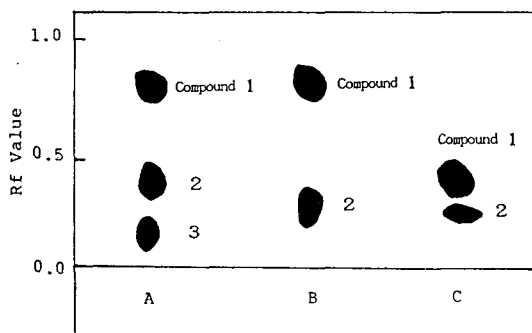


Fig. 1. Thin layer chromatogram of free (A), soluble ester (B), insoluble bound phenolic acids (C) in *Crataegi Fructus*.

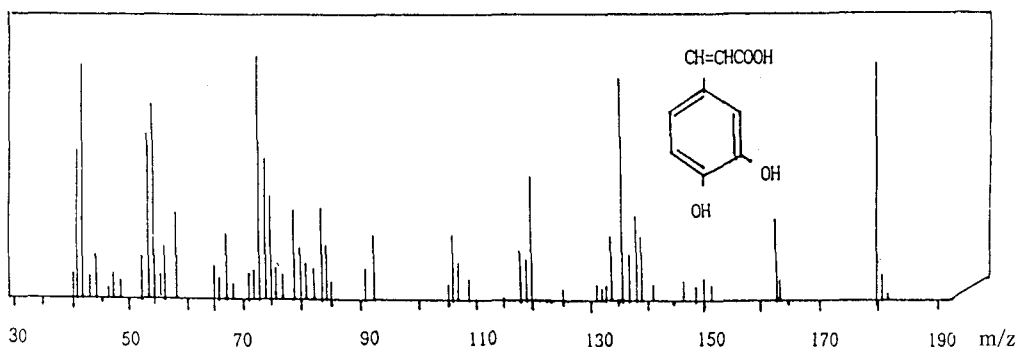


Fig. 2. Mass spectrum of compound 1 of free phenolic acid in *Crataegi Fructus*.

H로 밝혀졌으며, 7.01 ppm과 7.41 ppm의 doublet은 1,2, 3-OH의 proton으로 나타나 pyrogallol로 확인되었다.

용성 에스테르형 페놀산의 구조확인

산사의 용성 에스테르형 추출물은 TLC상에서 전개시킨 결과 두개의 spot으로 나타나 이를 분리하여 얻은 두 compound의 구조를 분석하였다. Compound 1은 MS분석결과 분자량이 180으로 나타났으며, H-NMR 분석에서는 세개의 aromatic proton과 두개의 olefinic proton이 확인되어 caffeic acid로 동정되었다. Compound 2는 TLC상에서 Rf치가 0.26이며 column chromatography로 분획한 후 농축하여 H₂O-methanol로 재결정하여 얻어진 백색의 침상 결정 30 mg으로서 MS와 NMR 분석한 결과, 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 추정되었다. NMR spectrum상에서 5.72 ppm의 singlet은 2, 4, 6위치의 세 aromatic proton으로 확인되었고, 8.63 ppm의 singlet은 C-1, 3, 5위치의 세 hydroxyl기들의 proton으로 분석되어 phloroglucinol로 확인되었다.

불용성 페놀산의 구조확인

산사의 불용성 페놀산은 TLC상에서 두개의 spot으로 나타나 이를 분리하여 얻은 두 compound의 구조를 분석하였다. Compound 1은 MS 분석결과 분자량이 154였으며, H-NMR 분석에서는 세개의 benzene ring proton과 두개의 hydroxyl proton이 관찰되었으므로 protocatechuic acid로 동정되었다. Compound 2는 MS 분석

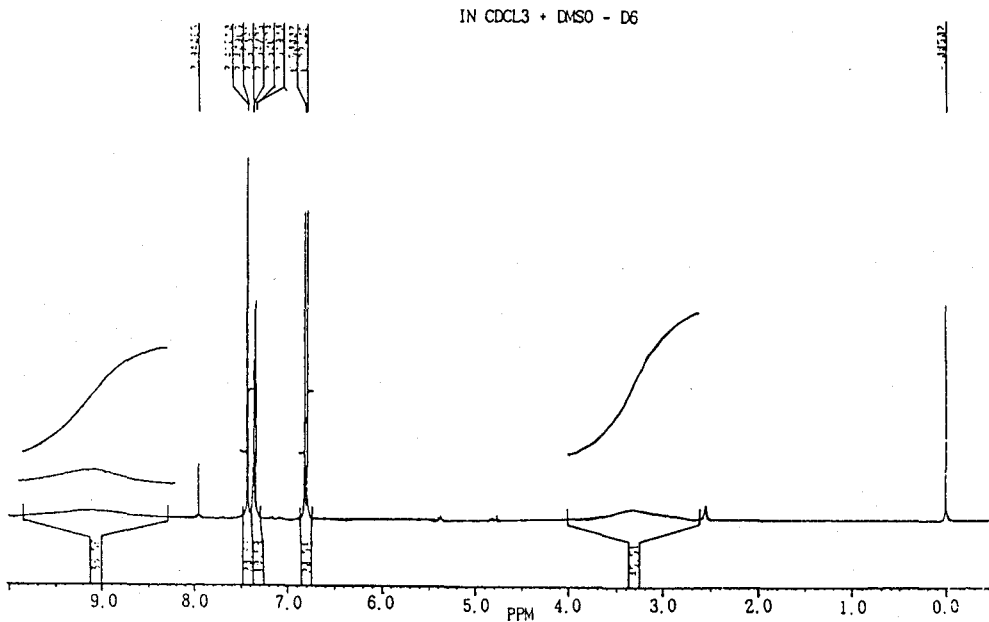


Fig. 3. H-NMR spectrum of compound 2 of free phenolic acid in *Crataegi Fructus*.

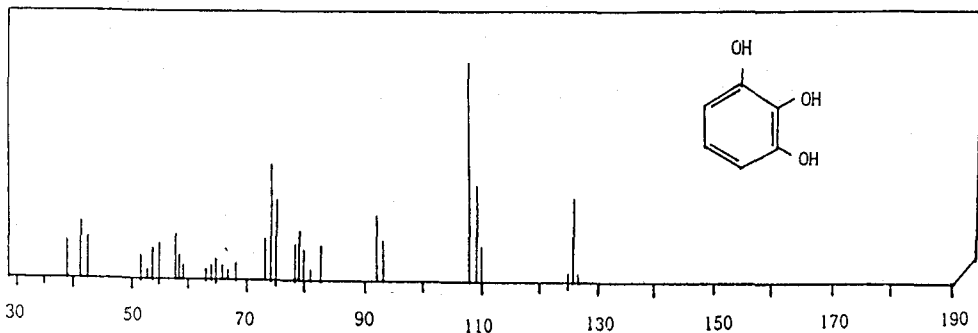


Fig. 4. MS spectrum of compound 3 of free phenolic acid in *Crataegi Fructus*.

결과 분자량이 126이었으며, H-NMR 분석에서는 세계의 aromatic proton이 확인되었으므로 phloroglucinol로 동정되었다. 이상의 결과에서 볼 때 silica gel column chromatography에서의 각 성분의 분리는 hexane과 ethyl acetate 4:1과 2:1 분획에서는 caffeic acid, 1:1과 1:2 분획에서는 phloroglucinol 및 ethyl acetate와 methanol 1:1 분획에서는 pyrogallol이 분리됨을 알 수 있었다.

Wee 등¹⁰⁾은 인삼의 항산화 활성성분 중에서 ether 및 ethyl acetate 추출분획에 존재하는 여러 페놀산을 분리하여 여러 hydroxy-benzoic acids(HBA)의 지질 과산화 억제효과를 서로 비교해 본 결과, 3, 4, 5-HBA(gallic acid) > 2, 5-HBA(gentisic acid) > 3, 4-HBA > 3, 5-HBA > 2, 4-HBA > 2, 6-HBA 순으로 hydroxyl기의 수 및 치환 위치에 따라 활성의 차이가 있었다고 하였으며, 효과는 gallic acid > protocatechuic acid > ferulic acid > syringic acid의 순이었다고 한다. 한편 Pratt¹¹⁾는 대두 중 여러 페놀산의 α -carotene과 linoleic acid에 대한 산화억제 효과를 비교한 결과 caffeic acid는 ferulic acid 및 p-coumaric acid보다 항산화 활성이 더 컸으며, chlorogenic acid(3-caffeoylquinic acid)와 더불어 대두의 주요 항산화 성분임을 보고하였다.

이상에서 산사의 페놀성 성분을 분석한 결과, 산사의 유리형 페놀산에는 caffeic acid, protocatechuic acid 및 pyrogallol, 용성 에스테르형 페놀산에는 caffeic acid 및 phloroglucinol, 불용성 페놀산에는 protocatechuic acid 및 phloroglucinol이 주된 항산화성 물질임이 확인되어 이들 항산화성 물질들의 항산화 효과시험이 진행 중에

있다.

감사의 말

이 논문은 1991년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로서 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Junji, T. and Setsuro, M.: Agric. Biol. Chem., 39 (10): 2027(1975)
2. Junji, T. and Setsuro, M.: Agric. Biol. Chem., 41 (12): 2401(1977)
3. Shigezo, N.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 28: 291(1981)
4. Avena, S.L. and Hinoat, L.V.: J. Food Sci., 42: 551 (1977)
5. 김정숙, 이기동, 권중호, 윤형식: 한국농화학회지, 36 (3): 203(1993)
6. Mshonry, J.R.: J. Food Sci., 51: 1293(1986)
7. Frankel, E.N.: J. Am. Oil Chem. Soc., 61: 1908 (1984)
8. Cillard, J.: J. Am. Oil Chem. Soc., 61(9): 1466(1984)
9. Krygier, K.: J. Agric. Food Chem., 30: 330(1982)
10. Wee, J. J., Park, J.D. and Kim, M.W.: J. Korean Agric. Chem Soc., 32(1): 44(1989)
11. Pratt, D.E.: J. Food Sci., 37: 1720(1979)

Identification of Phenolic Antioxidative Components in *Crataegus pinnatifida* Bunge

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 : Based upon the antioxidative effectiveness of ether extracts of defated *Crataegus pinnatifida* B., phenolic antioxidative components were separated by gel column chromatography and identified by MS and H-NMR. Two or three individual compounds were found in free, soluble and insoluble bound phenolic acids, respectively and they were identified as caffeic acid, protocatechuic acid, phloroglucinol and pyrogallol.