

## 산돌배나무(*Pyrus ussuriensis* Maximowicz) 열매의 항산화 물질 분리 및 구조

김명조\*·임요섭\*\*·송원섭\*\*·김이훈\*·유창연\*

### Purification and Identification of Antioxidative Components from the Fruits in *Pyrus ussuriensis* Maximowicz

Myong Jo Kim\*, Yo Sup Rim\*\*, Won Seob Song\*\*, E-Hun Kim\* and Chang Yeon Yu\*

**ABSTRACT** : Three antioxidative compounds were isolated from the EtOAc extract of the fruits of *Pyrus ussuriensis*. On the basis of spectroscopic evidences, the structures of these compounds were established as 1, 4-dibenzenediol, chlorogenic acid and quercitrin. The DPPH free radical scavenging activities of 1, 4-dibenzenediol (RC<sub>50</sub> : 0.4μg) and chlorogenic acid (RC<sub>50</sub> : 4μg) were more effective than those of BHA (RC<sub>50</sub> : 14μg) and α-tocopherol (RC<sub>50</sub> : 12μg)

**Key words** : antioxidative compounds, *Pyrus ussuriensis*, 1, 4-dibenzenediol, chlorogenic acid

### 緒 言

산돌배나무 (*Pyrus ussuriensis*)는 장미과 (Rosaceae)에 속하는 낙엽교목으로서 어린가지는 갈색이며 처음에는 털이 있으나 점차 없어진다. 잎은 호생하고 원형 또는 난상 원형이며 점첨두(漸尖頭)이고 원저(寬底)이며 양면에 털이 없고 침상(針狀)의 톱니가 있다. 4~5월에 꽃이 피고 10월에 열매가 성숙되며 이과(梨果)는 둥글고 지름이 3~4cm이며 황색으로 익는다. 민간에서는 열매를 토사(吐瀉), 개선(疥癬), 해열등의 약으로 쓰여왔으며(김태정, 1996) 예로부터 조상들이 즐겨먹는 과일의 한종류로서 잘 알려져 있다. 이 식물의 성

분에 대하여는 Chojnacki등 (Chojnacki, and Vogyman, 1984)은 잎으로부터 isoprenoid alcohol류와 polyprenol을 분리하여 보고한바가 있으며, Pavlii과 Makarova는(Pavlii and Makarova, 1968) 줄기로부터 flavonoid를 분리하여 보고한바가 있으나 산돌배나무 과일을 대상으로 성분에 관한 연구는 아직 찾아보지 못하였다.

최근 노화와 성인병 질환의 원인이 생체 내에서 발생하는 하이드록실라디칼( $\cdot OH$ ), 슈퍼옥사이드라디칼( $\cdot O_2^-$ ), 과산화수소( $H_2O_2$ ) 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 산화적 대사 부산물이 중요한 원인이 된다는 확신이 있으며(Wiseman, 1996), 또한 활성 산소종이 당백질, 생체막, DNA등에 유해한 작용을 하게 됨에 따라

\* 강원대학교 농업생명과학대학  
\*\* 순천대학교 농과대학

활성 산소종을 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Chang et al., 1977). 활성산소종을 제거하는 생체내 항산화물질로는 superoxide dismutase, peroxidase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소와 tocopherol, ascorbate, carotenoid, flavonoid 등의 많은 종류의 저분자 항산화물질이 있으며 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며 (Hammerschmidt & Pratt, 1977; Kitahara et al., 1992a) BHT, BHA, Trolox C 등의 합성 항산화제도 많이 개발되어 의약품과 식품분야 등에서 이용되고 있다 (Masaki et al., 1995a).

항산화 효과가 있는 물질은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성의 물질들이다 (Shin, 1997). 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 인공합성 항산화제가 많이 이용되어 왔으나 안전성에 대한 논란 뿐만 아니라 (Ito et al., 1983) 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항산화제가 대량으로 투여된 동물실험에서 발암성이 보고되고 있어 (Frankel, 1996), 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다. 이로 인하여 효력이 탁월하고 보다 안전한 새로운 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다.

이에 저자들은 산돌배나무 식물의 열매를 대상으로 DPPH free radical 소거법을 지표로 항산화 활성 화합물을 분리하기 위하여 본 연구에 착수하였다. 그결과 EtOAc층에서 1,4-dibenzenediol, chlorogenic acid 및 quercitrin 등의 항산화 활성 물질을 분리구명 하였기에 보고한다.

## 材料 및 方法

### 실험재료

실험에 사용한 산돌배나무 (*Pyrus ussuriensis*)의 열매는 1997년 10월 중순 강원도 홍천군에서 채집, 사용하였으며 표본은 강원대학교 농업생명과학대학 식물생리학교실에 보관중이다.

기기-음점은 Fisher-Johns의 melting point apparatus를 사용하였으며 온도는 보정하지 않았다. Infrared spectrum은 Bio-Red FTS-7

spectrophotometer를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였고, UV spectrum은 Hitachi U-2000 spectrophotometer를 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR은 Varian Gemini-200 및 Bruker DPX-400을 이용하여 측정하였다. FAB-MS spectrum은 Concept-1S (KRATOS)를, EI-MS spectrum은 MS-engine 5989A (Hewlett Packard)를 사용하였다.

### 시약

각 분획의 추출용매 및 칼럼 크로마토그래피용 용매는 일급용매를 재증류하여 사용하였다. TLC 전개용매 및 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였고, TLC plate는 Merck의 precoated Kieselgel 60F<sub>254</sub>, RP-18 F<sub>254s</sub>를 사용하였으며, TLC plate의 발색 시약 으로는 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 칼럼 크로마토그래피의 충진제로는 Merck의 Kieselgel 60 (No. 7734, 9385) 및 Pharmacia Biotech의 Sephadex LH-20을 사용하였다.

### 추출 및 분리

잘익은 돌배나무 열매에 MeOH를 가하고 실온에서 1주일간 냉침 추출을 2회 반복하여 메탄올 농축물을 얻었으며, 이 메탄올 농축물을 증류수에 현탁시켜 hexane (376mg), EtOAc (4.25g), BuOH (7.6g) 및 H<sub>2</sub>O (35.0g) 순으로 추출분획하여 각 분획에 대한 항산화 활성 예비 실험을 한 결과 EtOAc 분획이 가장 활성이 높은 (RC<sub>50</sub>: 8 µg) 것으로 나타나 EtOAc 분획 4.25g을 대상으로 benzene : acetone = 6 : 4를 용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 9개의 분획을 얻었으며 이중 분획 7을 대상으로 benzene 100%에서 benzene : acetone = 4 : 6까지 linear gradient column chromatography를 실시하여 화합물 1 (57mg)을 얻었고, 분획 8 (620mg)을 대상으로 10% MeOH에서 95% MeOH까지 ODS linear gradient column chromatography를 실시하여 30개의 분획을 얻었으며 이중 분획 7에서 11을 모아 (110mg) 60% MeOH로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 화합물 2 (36.9mg)와 화합물 3 (14mg)을 얻었다.

## DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

각 정제단계의 분석은 최 (Choi et al., 1993) 등의 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 4ml의 MeOH에 녹여,  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH MeOH 용액 1ml를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 ( $\mu\text{g}$ )을  $\text{RC}_{50}$ 으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA와 비교하였다.

## 結果 및 考察

화합물 1과 2는 MS, IR, UV,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  등의 data와 문헌 (Wright et al., 1991; Mihopoulos et al., 1999; Skushima et al., 1985; Tomas et al., 1987; Nishibe et al., 1990) 을 비교하여 화합물 1은 1,4-dibenzenediol (hydroquinone) 으로 화합물 2는 chlorogenic acid로 그 구조 (Fig. 1) 를 동정하였다. 화합물 3의 UV spectrum에서 215nm와 280nm에서 흡수 극대가 나타나고, IR spectrum에서는  $3400\text{cm}^{-1}$ 의 -OH, 1620, 1520,  $1460\text{cm}^{-1}$ 의 이중결합에 의한 흡수대가 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 flavan계열의 화합물임을 측정할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum의 5.36ppm의 aromatic proton ( $J=1.6\text{Hz}$ ) 과 4.24~3.4ppm에 rhamnose에 귀속되어지는 전형적인 proton signal이 관찰되었고  $^{13}\text{C-NMR}$ 의 data 및 문헌치 (Chung et al., 1996; Choi et al., 1998) 를 비교한 결과 quercitrin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside) 으로 그 구조 (Fig. 1) 를 동정하였다.

## 화합물 1

백색 침상결정; mp 174~175;  $\text{IR}_{\text{max}}\text{KBr cm}^{-1}$  3179 (OH), 1515 (aromatic); EI-MS  $m/z$  110( $[\text{M}]^+$ );  $^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ 7.72 (2H, s), 6.67 (4H, s);  $^{13}\text{C NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ 116.6, 151.2.

## 화합물 2

mp 211~213°C;  $\text{IR}_{\text{max}}\text{KBr cm}^{-1}$  3470-3353 (OH), 2927, 1727 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1687 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1601 (aromatic), 1458 (cycloalkane), 1189 (phenol);  $\text{UV}_{\text{max}}$  MeOHnm216, 242, 300 (sh), 326; FAB-MS  $m/z$  453( $[\text{M-H}]^-$ );  $^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ 7.57 (1H, d,  $J=15.9$ , H-7'), 7.05 (1H, d,  $J=2.0$ , H-2'), 6.94 (1H, dd,  $J=8.2$ , 2.0, H-6'), 6.78 (1H, d,  $J=8.2$ , H-5'), 6.29 (1H, d,  $J=15.9$ , H-8'), 5.38 (1H, ddd,  $J=11.2$ , 6.2, 5.0, H-5), 4.11 (1H, dd,  $J=6.2$ , 3.0, H-3), 3.67 (1H, dd,  $J=10.0$ , H-6), 2.15 (1H, dd,  $J=14.7$ , 3.1, H-2), 2.07 (1H, dd,  $J=14.7$ , 2.1, H-6(ax)), 2.01 (1H, dd,  $J=14.7$ , 3.1, H-2(eq));  $^{13}\text{C NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ 181.0 (s, C-7), 169.2 (s, C-9'), 149.5 (s, C-4'), 146.9 (d, C-7', 3'), 127.9 (s, C-1'), 123.0 (d, C-6'), 116.6 (d, C-8'), 115.6 (d, C-2'), 115.2 (d, C-5'), 77.8 (s, C-1), 75.3 (d, C-4), 73.2 (d, C-5), 72.7 (d, C-3), 40.7 (C-6), 39.3 (C-2).

## 화합물 3

mp FAB-MS  $m/z$  449( $[\text{M+H}]^+$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ 7.35 (1H, d,  $J=2.0$ , H-2'), 6.92 (1H, d,  $J=8.3$ , H-5'), 6.37 (1H, d,  $J=2.1$ , H-8'), 6.21 (1H, d,

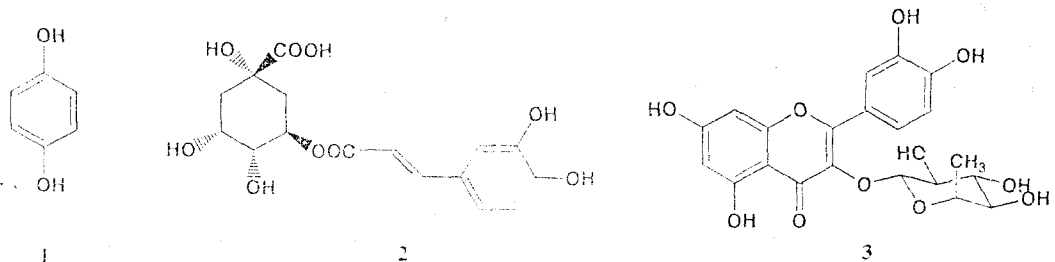


Fig. 1. The structures of three antioxidative compounds isolated from the fruits of *Pyrus ussuriensis*

$J=2.1, H-6), 5.36(1H, d, J=1.6, H-1''), 4.23(1H, dd, J=1.8, 3.3, H-2''), 3.74(1H, dd, J=3.3, 9.18, H-3''), 3.48-3.39(1H, m, H-4''), 3.36-3.31(1H, m, H-5''), 0.97(3H, d, J=5.9, H-6''); ^{13}C NMR (CD_3OD) \delta 180(C-4), 166.4(C-7), 163.5(C-9), 160(C-5), 158.7(C-4'), 147.0(C-3'), 136.4(C-3), 123.1(C-6'), 129.8(C-1'), 117.3(C-5''), 116.8(C-2'), 106.0(C-10), 103.9(C-1''), 100(C-6), 94.8(C-8), 73.5(C-4''), 72.5(C-3''), 72.2(C-2''), 72.0(C-5''), 17.7(C-6'').$

구조가 결정된 1, 2 및 3을 대상으로 DPPH free radical scavenging method를 이용하여 항산화활성을 측정 한 결과 table 1에서와 같이 화합물 1과 2의  $RC_{50}$  값은 각각  $0.4\mu g, 4\mu g$  으로 대조구인  $\alpha$ -tocopherol 이나 BHA보다도 강한 항산화 활성을 보였으나 화합물 3은 대조구인  $\alpha$ -tocopherol 이나 BHA보다 낮은 항산화 활성 ( $RC_{50}=20\mu g$ ) 을 보였다.

최근 인체의 질병의 대부분이 독성이 강한 활성 산소종이 직·간접적으로 관여한다고 한다. 본 연구의 결과로 밝혀진 항산화 물질을 다량으로 함유하고 있는 산들배는 예로부터 조상들이 즐겨먹던 식품으로 건강식품, 의약품등의 소재로 활용이 기대된다.

Table 1. DPPH free radical scavenging activities of compounds isolated from the fruits of *Pyrus ussuriensis*.

Compounds	$RC_{50}^{\dagger} (\mu g)$
Compound 1	0.4
Compound 2	4
Compound 3	20
$\alpha$ -Tocopherol	12
BHA	14

<sup>†</sup> Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min

## 摘 要

예로부터 식품으로 사용되어온 산들배나무 (*Pyrus ussuriensis*) 열매를 대상으로 항산화 활성 성분을 찾기 위하여 그 MeOH추출물의 EtOAc분

획을 대상으로 column chromatography를 실시하여 1,4-dibenzenediol, chlorogenic acid 및 quercitrin등 세종의 화합물을 분리하고 DPPH free radical소거법을 이용하여 항산화활성을 측정하였다. 이중 quercitrin은  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA보다 낮은 활성 ( $RC_{50}=20\mu g$ ) 을 보였으나 1,4-dibenzenediol( $RC_{50}=0.4\mu g$ ) 와 chlorogenic acid ( $RC_{50}=4\mu g$ ) 는 강한 활성을 보였다.

## LITERATURE CITED

- Chang, S. S., B. Ostric-Matijasevice, A. I. Hsieholiver and C. L. Hyung. 1977. Natural antioxidants from rosmary and sage. *J. Food Sci.* 42 : 1102-1110.
- Choi, J. S., J. H. Park, H. G. Kim, H. S. Young and S. I. Mun. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor. J. Pharmacology* 24 : 299-303.
- Choi, Y. H., M. J. Kim, H. S. Lee, B. S. Yun, C. Hu and S. S. Kwak. 1998. Antioxidative compounds in aerial part of *Potentilla fragarioides*. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(2) : 79-85.
- Chojnacki, T. and T. Vogyman. 1984. The occurrence and seasonal distribution of C50-C60-polyprenols and of C100-and similar long-chain polyprenols in leves of plants. *Acta. biochim. Pol.* 31(1) : 115-126.
- Chung, T. Y., M. A. Kim and A. D. Jones. 1996. Antioxidative activity of flavonoids isolated from Jindalrae flowersws. *Kor. Agri. Chem. Biotec.* 39(4) : 320-326.
- Frankel, E. N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. *Food Chemistry.* 57 : 51-54.
- Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt. 1977. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.* 43 : 556-561.
- Ito, N., S. Fukushima, A. hasegawa, M. Shibata and O. T. Ogis. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy antisole in F344 rats. *J. Nat. Cancer Inst.*

- 70 : 343-347.
- Kitahara, K., Y. Matsumoto, H. Ueda and R. Ueoka, 1992. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of  $\gamma$ -irradiated methyl linoleate. *Chem. Pharm. Bull.* 40 : 2208-2209.
- Masaki, H., S. Sakaki, T. Atumi and H. Sakurai. 1995. Active- oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 162-166.
- Mihopoulos, N., C. Vagias, I. Chinou, C. Roussakis, M. Scoulios, C. Harvala and V. Roussis. 1999. Antibacterial and cytotoxic natural and synthesized hydroquinones from sponge *Ircinia spinosula*. *Z. Naturforsch (c)* 54(5-6) : 417-423.
- Nishibe, S., H. Kinoshita, H. Taketa and G. Okano. 1990. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem. Pharm. Bull.* 38(6) : 1763-1765.
- Pavlii, O. L. and G. V. Makarova. 1968. Studies of flavonoids of sorbus pendula L. 3. chemical studies of substances GP-1, GP-3. *Farm. Zh.* 23(6) : 67-72.
- Shin, D. H. 1997. The study course and movement of natural antioxidants. *Kor. Food Sci. & Tech.* 30 : 14-18.
- Skushima, A., S. Hisada, S. Nishibe and H. Brandenberger. 1985. Application of fast atom bombardment mass spectrometry to chlorogenic acid. *Phytochemistry.* 24(2) : 325-328.
- Tomas, A., C. Jorge and C. L. Juan. 1987. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl<sub>4</sub> toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Natu. Prod.* 50(4) : 612-617.
- Wiseman, H. 1996. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. *Nutritional Biochemistry* 7 : 2-6.
- Wright, A. E., S. A. Rueth and S. S. Cross. 1991. An antiviral sesquiterpene hydroquinone from the marine sponge *Strongylophora hartmani*. *J. Nat. Prod.* 54(4) : 1108-1111.
- 김태정, 1996. 한국의 자원식물 II. 서울대학교출판부, 삼성문화안쇄. 186p.