KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 35, No. 4, pp. 726~732 (2003)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

# 붉나무 수피로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

오지영[1] · 최 웅[2] · 김용석[3] · 신동화*
[1](주)두산 식품 BG/김치연구소, [2]서해대학교
[3]전북대학교 바이오식품 소재 개발 및 산업화 연구센터
전북대학교 응용생물공학부 및 농업과학기술연구소

# Isolation and Identification of Antioxidative Components from Bark of *Rhus javanica* Linne

**Ji Young Oh[1], Ung Choi[2], Yong Suk Kim[3] and Dong Hwa Shin***
[1]*Kimchi Research Center, Food Business Group, Doosan Co.*
[2]*Department of Hotel Culinary Arts and Nutrition, Sohae College*
[3]*Research Center for Industrial Development of Biofood materials, Chonbuk National University*
*Faculty of Biotechnology (Food Science and Technology Major), Chonbuk National University*

**The crude extracts from *Rhus javanica* Linne showed comparatively strong antioxidative activity in test oils. Antioxidative components were isolated and identified by column chromatography, thin layer chromatography, UV, and NMR. These antioxidative components were added to several oils to compare antioxidative activity with several commercial antioxidants, such as BHA, BHT, and tocopherol. After the sixth column chromatography, one fraction (R-18-9-3-2-4-2) was separated from chloroform layer of *Rhus javanica* Linne. The R-18-9-3-2-4-2 fraction was identified as methyl gallate by $^{1}$H-NMR and $^{13}$C-NMR and confirmed with methyl gallate standard as authentic. The R18-9-3-2-4-2 fraction from chloroform layer of *Rhus javanica* Linne showed stronger activity than that of the α-, δ-tocopherol, BHT, and BHA at the same concentration.**

**Key words:** *Rhus javanica* Linne, antioxidant, natural antioxidant, methyl gallate

## 서 론

유지함유 식품의 가공 또는 저장 중에 일어나는 유지의 산패는 이취(off-flavor)를 내고 필수지방산과 지용성 비타민의 손실을 일으켜 식품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 산패에 의해 생성되는 여러 종류의 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등의 산화생성물들이 생체 내에서 DNA를 손상시키거나 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다[1]. 따라서 유지식품의 가공에서는 유지 산패를 억제시키기 위한 여러 가지 조치가 취해지고 있다. 산화를 방지하기 위한 처리[2]로는 진공포장, MA포장, 냉장, 냉동 등 여러 가지 방안이 제시되고 있으며 이 방법과 더불어 산화를 지연시키는 기능을 갖는 항산화제를 대상 식품에 첨가하여 가공하는 방법이 더 일반적으로 사용되기도 한다.

*Corresponding author : Dong Hwa Shin, Faculty of Biotechnology (Food Science and Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin Dong, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-2570
Fax: 82-63-270-2572
E-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

식품 첨가물로서의 산화방지제의 개발을 위한 연구는 유지 식품의 산패 억제뿐만 아니라 최근 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 이들 원인물질에 관여하는 항산화제를 질병억제 및 치료제로서의 용도를 확인하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 지금까지 개발되어 사용되고 있는 항산화제로는 phenol성 화합물, flavone 유도체, tocopherol류, carotenoid, ascorbic acid, peptide, 아미노산, 셀레늄[3,4] 등의 천연 항산화제와 *tert*-butylated hydroxytoluene(BHT), *tert*-butylated hydroxyanisol(BHA), propyl gallate(PG), *tert*-butyl hydroquinone(TBHQ) 등의 합성 항산화제가 있다. BHT 및 BHA 같은 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 널리 사용되고 있으나 열안정성이 떨어지며, 발암[1]과 기형의 위험성[5,6]이 제기되면서 합성 항산화제의 안전성에 대한 법적 사용규제가 더욱 강화됨에 따라 안전성이 확보된 천연 항산화제에 대한 관심이 고조되고 있다. 그러나 tocopherol과 같은 대부분의 천연 항산화제는 안전하나 활성이 낮으며 고가이어서 그 용도에 한계가 있다[7]. 따라서, 보다 안전하면서도[8] 강한 항산화 활성을 가진 물질을 천연물[9,10] 또는 미생물 대사산물[11]로부터 탐색하려는 연구가 현재 활발히 수행

되고 있다. 또한 생약재 및 식용식물로부터 항산화 효과뿐만 아니라 천연 항균성 물질[12], 항암 물질[13]을 개발하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

옻나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 붉나무(*Rhus javanica* Linne, 일명: 오배자나무)[14,15]는 우리 나라 각처의 산기슭 및 산골짜기에서 생육하는 낙엽 소교목이며 일본, 중국, 만주, 대만, 히말라야, 인도차이나에 분포한다[15]. 이 나무의 충영(蟲瘿)은 오배자(五倍子)라 하여 한방에서 이질, 설사 등의 수렴 지사제로 사용되고 있으며, 줄기 껍질은 염부수백피(鹽膚樹白皮)라고 하여 혈리, 종독, 창개, 악창을 치료하는데 사용되고 있다[16,17].

붉나무(*R. javanica*)에 대한 연구로는 Matsuda[18]가 잎의 성분으로써 ellagic acid, gallic acid, shilimic acid, quercitrin, myricitrin 그리고 gallotannin을 보고하였다. 또 Chung 등[19]은 붉나무의 수피에서 phenol성 화합물(gallic acid, methyl gallate, 1, 2, 3, 4, 6-penta-*o*-galloyl-β-D-glucose, orcinol, orcinol-β-D-glucoside)과 2종의 coumarin계 화합물(scopoletin, scopolin)을 분리, 동정하였다.

본 실험에서는 여러 가지 효능과 함께 민간에서도 널리 식용하고 있는 붉나무로부터 항산화 활성을 갖는 물질을 용매분획, column chromatography, thin layer chromatography (TLC) 등을 통하여 활성물질을 분리하였다. 분리된 단일 물질에 대하여 UV spectrophotometer 및 NMR 등의 각 자료를 해석하여 활성 원인물질의 구조를 동정하였으며 다른 상업용 항산화제와 항산화 효과를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

붉나무는 전북 부안군 소재 전북대학교 연습림에서 2000년 6월경에 채취하여 껍질을 벗긴 수피를 음건한 후 마쇄하여 사용하였다. 항산화 실험에 사용한 유지는 항산화제가 첨가되지 않은 팜유와 돈지를 (주)농심에서 제공받아 냉동(−60 °C) 보관하면서 사용하였다.

### 사용시약

추출용매로는 메탄올(Duksan Pharmaceutical Co., Ltd., Kyung Gi, Korea) 1급을 증류수로 희석한 80% 메탄올을 사용하였다. α-, δ-tocopherol, tert-butylated hydroxyanisole (BHA), *tert*-butylated hydroxytoluene(BHT)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품, methyl gallate는 Aldrich사(Milwaukee, WI, USA) 제품, TLC plate(silica gel 60 $F_{254}$, RP 18 $F_{254s}$), PTLC plate(silica gel 60 $F_{254}$, 2 mm), silica gel 60 (70~230 mesh), 및 silica gel RP 18(25~40 μm)은 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을, 그리고 분석용 용매 및 기타 시약은 특급 또는 1급품을 사용하였다.

### 유효성분 추출[20]

둥근바닥플라스크(1,000 mL)에 곱게 분쇄한 붉나무 껍질 75 g에 4배 정도의 80% 메탄올을 첨가하여 환류냉각관을 부착하였다. 이들을 수욕상(78±2°C)에서 3시간 가열, 추출 후 여과(Whatman No. 2)하고, 그 여액을 45°C에서 감압농축기

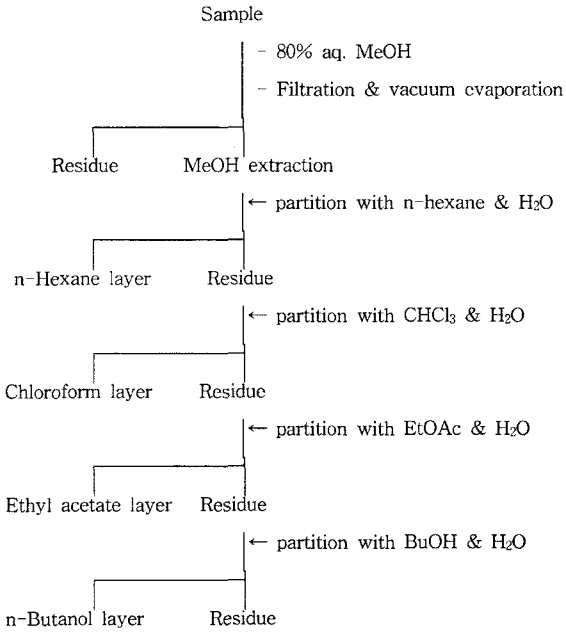


**Fig. 1. Flow diagram of solvent fractionation of the 80% methanol extract prepared from *Rhus javanica* Linne.**

(EYELA, Japan)로 감압농축 하였다. 에탄올 추출물 중의 가용성 고형분 함량은 농축물 1 mL를 105°C에서 건조하고, 증발 잔사의 양으로부터 계산하였다.

### 용매 추출물의 분획[21]

붉나무로부터 얻은 80% 메탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 분획하였다. 즉 용매의 극성 정도에 따라 4배량의 헥산을 가하고 소량의 증류수를 첨가, 진탕(20 min, 250 rpm)하여 헥산 분획물을 얻고(3회 반복), 물층을 다시 동일한 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 감압농축기와 진공건조기(New Power Engineering Co., Korea)를 사용하여 각각 45°C에서 용매를 완전히 제거한 후 메탄올에 녹여 항산화활성 실험에 사용하였다.

### Rancimat을 이용한 유도기간 측정[8,22,23]

각 용매별 추출물의 항산화 정도를 측정하기 위해 Rancimat 679(Metrohm AG, CH-9100 Herisau, Switzerland)를 사용하였다. 즉 반응용기에 해당 기질유지 2.5 g을 취한 후, 조 추출물을 각각 1,000 ppm씩 첨가한 후 voltex mixer를 사용하여 기질유지에 충분히 분산(3 min)시켜 120±0.1°C의 aluminum heating block상에서 시간당 20 L의 공기를 주입하여 산화시켰다. 이때 발생하는 휘발성 산화생성물을 70 mL의 증류수가 들어있는 absorption vessel에 이행시켜 double platinum foil electrode와 recorder에 의해 conductivity 정도를 측정, 자동 기록된 chart에서 반응 개시의 conductivity로부터 conductivity가 급격히 증가되는 시점까지를 유도기간(induction period, IP)으로 계산하여 각 추출물의 항산화 정도를 측정하였고, 동시에 추출물을 첨가하지 않은 것을 대조구로 하여 항산화 활성을 비교, antioxidant index(AI)로 표시하였다.

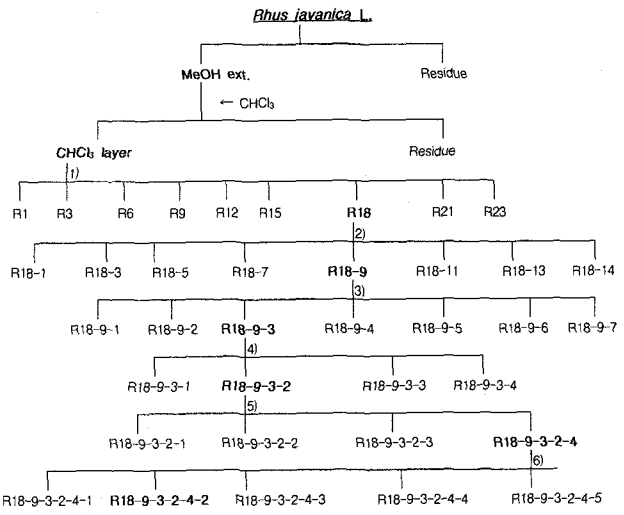


**Fig. 2. Isolation of the antioxidative compounds from *Rhus javanica* Linne.**
Silica gel column chromatography; [1]n-Hexane : $CHCl_3$ : EtOAc = 5:9:1 1:9:12 MeOH, [2]$CHCl_3$ : MeOH : HOAc = 30:1:0.1 1:1:0.1. [3]n-Hexane : $CHCl_3$ : MeOH = 2:11:1 MeOH, [4]n-Hexane : $CHCl_3$ : MeOH : HOAc = 1:7.5:1:0.1 MeOH, [5]n-Hexane : $CHCl_3$ : MeOH : HOAc = 2:16:2.5:0.1 MeOH, [6]MeOH : $H_2O$ = 1.5:8.5 MeOH (reverse phase).

$$AI = \frac{\text{항산화제 첨가 유지의 유도기간(시간)}}{\text{표준 유지의 유도기간(시간)}}$$

### Silica gel column chromatography에 의한 항산화 활성 물질의 분리[24,25]

붉나무 수피 80% 메탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하여 항산화 활성을 확인한 결과, 항산화 효과가 높은 것으로 나타난 클로로포름 분획층으로부터 Fig. 2의 순서에 따라 항산화 활성물질을 분리하였다.

즉, 클로로포름 분획물(33.78 g)을 두 번에 나누어 silica gel (500 g, 70~230 mesh, Merck)이 헥산 : 클로로포름 : 에틸아세테이트(5 : 9 : 1, v/v/v) 용매로 현탁, 충전된 column(5.5×40 cm)에 흡착시킨 후 극성을 높이면서 용출시키고 TLC로 확인하여 23개의 소획분(R1~R23)을 얻었다. 이 중에서 항산화 활성이 우수한 R18~R20을 합친 획분 R18(4.74 g)을 2차 column(180 g, 3.5×35 cm)에서 클로로포름 : 메탄올 : 초산 (30 : 1 : 0.1, v/v/v) 용매계로 용출시켜서 15개의 소획분(R18-1~R18-15)을 얻었다. 이 중 항산화 활성이 높았던 R18-9~R18-10을 합친 R18-9(2.01 g)를 3차 column(200 g, 4.5×20 cm)에서 헥산 : 클로로포름 : 메탄올(2 : 11 : 1, v/v/v) 용매계로 메탄올의 비율을 증가시키면서 용출시켰다. 총 7개의 소획분 중 항산화 활성이 우수한 R18-9-3(0.74 g) 획분을 4차 column (200 g, 4.5×18 cm)에서 헥산 : 클로로포름 : 메탄올 : 초산 (2 : 15 : 2 : 0.1, v/v/v/v) 용매계로 용출시켜 4개의 획분을 얻었고, 활성이 큰 R18-9-3-2(0.52 g) 획분을 헥산 : 클로로포름 : 메탄올 : 초산(2 : 16 : 2.5 : 0.1, v/v/v/v) 용매계로 preparative TLC(silica gel 60, 2 mm)하여 4개의 소획분을 얻었다. 이 중 항산화 효과가 인정된 R18-9-3-2-4(0.24 g)를 역상 silica gel(Lichroprep RP 18, 25~40 μm)로 재분리 하였다. 이 획분을 6차 column(90 g, 3.5×16 cm)에서 메탄올 : 물(1.5 : 8.5, v/v)을 용매계로 하여 극성을 낮추며(역상) 용출시켰다. 최종적으로 항산화 활성이 크고 정제도가 우수한 R18-9-3-2-4-2(0.13 g) 소획분을 취하여 단일물질로 하여 화학구조를 동정하였다.

**Table 1. Yield and antioxidant activity of each solvent extract from *Rhus javanica* Linne on lard and palm oil**

| Extract solvent | Yield (%)[1] | AI[2] | |
|---|---|---|---|
| | | Lard | Palm oil |
| n-Hexane | 2.9 ± 0.1 | 3.33 | 1.38 |
| 75% Ethanol | 12.3 ± 0.2 | 6.73 | 1.22 |
| 80% Methanol | 10.5 ± 0.1 | 7.49 | 2.13 |
| 95% Methanol | 15.6 ± 0.2 | 3.13 | 1.32 |

[1]Based on 1 mL of solvent extract of *Rhus javanica* Linne for each solvent. Values are mean standard deviation of triplicate.
[2]AI (antioxidant index) was expressed as induction period of oil containing each fraction/induction period of natural oil. Induction period of oil was determined by Rancimat method at 120°C, 20 L (air)/hr.

### TLC에 의한 항산화 활성 물질의 분리

Silica gel column chromatography하여 분리된 각 획분은 silica gel 60 $F_{254}$ TLC plate와 RP 18 $F_{254s}$ TLC plate에 spotting한 후 column chromatography에서 사용한 용출용매와 같은 용매계로 전개하여 UV(254 nm, 365 nm) 흡수양상 및 20% 황산용액을 분무하여 발색시 나타나는 spot의 $R_f$값에 따라 column chromatography 용출물을 분취하여 항산화 활성을 측정하였다.

### 항산화 활성물질의 구조동정[26]

순수 분리된 물질의 구조동정을 위하여 Electron Impact/Mass(ZEOL JMS-AX505WA, Japan), $^1$H-NMR(400 MHz, XEOL JNM-LA400, Japan), $^{13}$C-NMR(100 MHz, XEOL JNM-LA400, Japan)을 사용하였다.

### 분리물과 상업용 항산화제와 활성 비교

붉나무 수피에서 분리 동정된 R18-9-3-2-4-2 획분과 methyl gallate 표준물질을 가지고 200 ppm 농도[27]에서 다른 상업용 항산화제와 비교 실험을 하였다. 비교 실험은 Racimat method[8,22,23]를 사용하여 항산화활성을 비교하여 AI로 표시하였으며, 사용된 항산화제는 천연 항산화제로 α- 및 δ-tocopherol을, 합성 항산화제로는 BHA와 BHT를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출 용매별 항산화 효과

붉나무 수피를 추출용매를 달리하면서 추출하여 각 추출용매별로 수율과 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 보면 75% 에탄올, 80% 메탄올, 95% 메탄올을 추출용매로 사용하였을 때 수율이 각각 12.30%, 10.50%, 15.60%로 모두 높았으며, 80% 메탄올을 추출용매로 사용하였을 때 AI가 돈지와 팜유에서 각각 7.49 및 2.13으로 다른

**Table 2. Yield and antioxidant activity of each fraction of 80% methanol extract from *Rhus javanica* Linne on lard and palm oil**

| Solvent | Yield (%)[1)] | AI[2)] | |
|---|---|---|---|
| | | Lard | Palm oil |
| Crude extract | 10.5 ± 0.1 | 7.49 | 2.13 |
| n-Hexane | 1.3 ± 0.5 | 1.59 | 1.13 |
| Chloroform | 1.4 ± 0.2 | 9.61 | 2.80 |
| Ethyl acetate | 5.2 ± 0.3 | 4.74 | 2.42 |
| n-Butanol | 1.4 ± 0.4 | 1.13 | 1.02 |
| Water | 1.3 ± 0.3 | 1.84 | 1.42 |

[1,2)]Refer to the footnote of Table 1.

용매를 사용하였을 때 보다 더 높았다. 이 결과는 95% 메탄올을 붉나무의 추출용매로 사용하였을 때 수율이 14.53%이고 항산화 효과가 인정된다는 Lee 등[28]의 실험 결과와 비슷하였다.

대상 식물에 따라 추출용매에 따른 항산화 효과는 상당히 차이가 있는 것으로 알려져 있으며 많은 식물성 항산화제 분리 실험에서 메탄올을 사용하고 있는데[29] 본 실험도 수율과 항산화 효과가 높았기 때문에 이후 실험에서는 붉나무의 추출용매로 80% 메탄올을 사용하였다.

## 용매 분획물의 항산화 효과

붉나무의 80% 메탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 등의 용매로 순차 분획하여 각각 돈지와 팜유에 첨가하여 Rancimat 방법으로 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보면 붉나무의 각 용매별 분획물의 항산화효과는 두 유지에서 모두 클로로포름 > 에틸아세테이트 > 물 > 헥산 > 부탄올 순으로, 클로로포름 분획물의 AI가 돈지와 팜유에서 각각 9.61, 2.80으로 가장 높았다. 이 결과는 Choi 등[30]이 보고한 붉나무의 항산화 활성이 높은 분획이 에틸아세테이트 > 클로로포름 > 물 > 부탄올 순이라는 결과와는 차이가 있었다. 그러나 그 차이는 미미하였으며 본 실험에서 클로로포름과 에틸아세테이트 분획물의 AI가 돈지에서 각각 9.61, 4.74로 산화지연 효과가 인정되었고 팜유에서도 비슷한 경향을 나타내어 두 분획물 모두 항산화 활성을 나타내었다. 또한 붉나무의 조 추출물(80% 메탄올 추출물)보다 분획하였을 때 더 항산화 활성이 높아짐을 확인할 수 있었다.

## 분획물의 항산화 효과

붉나무 수피 80% 메탄올 추출물의 항산화 활성이 확인된 클로로포름 분획물로부터 항산화 활성물질을 분리하기 위하여 먼저 TLC상에서 분리능이 우수한 용매조건을 탐색한 후에 선택된 용매조건에서 단계별로 silica gel column chromatography를 실시하여 분획물을 얻었다. 진공건조 후 메탄올에 용해시킨 획분을 1000 ppm 수준으로 돈지와 팜유에 첨가하여 Rancimat 방법으로 각 획분별 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보면 첫 번째 column chromatography에서 돈지에 대하여 AI 10 이상의 활성을 나타내는 획분은 3개(R18~R20)로 확인되었고(다른 결과는 나타내지 않음), 이들 획분의 AI는 각각 12.73, 11.38, 10.59로서 클로로포름 분획물 1000 ppm을 첨가하였을 때(AI 9.61)보다 더 높은 항산화 활성을 나타내었다. 팜유에서도 마찬가지로 이들 획분의 AI는 각각 3.22, 3.28, 2.46으로 우수한 항산화 활성을 나타내었다. R18~R20까지의 획분이 모두 연속적으로 돈지와 팜유에서 우수한 항산화 활성을 나타내어 이들 획분을 합친 R18(4.74 g)을 2차 분리용 시료로 선정하였다. R18 획분을 2차 column chromatography한 결과 14개의 소획분(R18-1~R18-14)을 얻었으며, 이 중 R18-9 획분의 AI가 돈지와 팜유에서 각각 13.07과 3.35, 그리고 R18-10 획분이 14.41과 3.02로 다른 획분보다 우수한 항산화 활성을 나타내었고 두 획분을 R18-9(2.01 g)로 합하여 3차 분리용 시료로 사용하였다. 3차 column chromatography 결과 7개의 소획분(R18-9-1~R18-9-7)을 얻었고, 이중 R18-9-3 획분(0.74 g)이 돈지와 팜유에서 AI가 14.31과 3.20으로 가장 높았다. 4차 column chromatography 결과 4개의 소획분(R18-9-3-1~R18-9-3-4)으로 분리하였으며. R-18-9-3-2 획분(0.52 g)의 AI가 돈지와 팜유에서 각각 14.36과 3.94로 항산화 활성이 가장 높았다. 5번째 단계에서는 시료의 양이 적어 preparative thin layer chromatography(silica gel 60, 2 mm)하여 4개의 소획분을 얻었으며, 이 중에서 돈지와 팜유에서 항산화 활성이 각각 10.5와 2.18로 가장 높았던 R18-9-3-2-4 획분(0.24 g)을 6차 분리용 시료로 선정하였다. R18-9-3-2-4 및 R18-9-3-2-4-2 획분은 R18-9-3-2 획분에 비해 항산화 활성이 감소되었는데, 이는 섬바디[31]와 예덕나무 추출물[32]의 항균활성 시험에서 단일 물질로 분리될수록 여러 물질이 복합적으로 작용하는 상승효과가 제거됨으로써 항균 활성이 감소하였다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

**Table 3. Antioxidative activity of fraction obtained with the steps of column chromatography of chloroform layer (33.78 g) from *Rhus javanica* Linne on lard and palm oil**

| Column | Fraction No.[1)] | Yield (g) | AI[2)] | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Lard | Palm oil |
| 1st column | R18 | | 12.73 | 3.22 |
| | R19 | 4.74 | 11.38 | 3.28 |
| | R20 | | 10.59 | 2.46 |
| 2nd column | R18-9 | 2.01 | 13.07 | 3.35 |
| | R18-10 | | 14.42 | 3.73 |
| 3rd column | R18-9-3 | 0.74 | 14.31 | 3.20 |
| 4th column | R18-9-3-2 | 0.52 | 14.36 | 3.94 |
| 5th column | R18-9-3-2-4 | 0.24 | 10.50 | 2.18 |
| 6th column | R18-9-3-2-4-2 | 0.13 | 13.01 | 3.06 |

[1)]Elution conditions of silica gel column chromatography are refer to Fig. 2.
[2)]Refer to the footnote of Table 1.

순상 TLC plate(silica gel 60 $F_{254}$)에서는 분리되지 않았던 R18-9-3-2-4 획분을 역상 TLC plate(RP 18 $F_{254s}$)를 이용하여 분리능이 우수한 용매계(메탄올 : 물 = 1.5 : 8.5, v/v)로 흡착된 역상 silica gel(RP 18 $F_{254s}$, 25~40 μm) column chromatography를 실시하였다. 그 결과 총 6개의 소획분들 중 R18-9-3-2-4-2 획분(0.13 g)이 돈지와 팜유에서 AI가 각각 13.04, 3.06으로 항산화 활성이 가장 우수하였고, TLC를 통하여 단

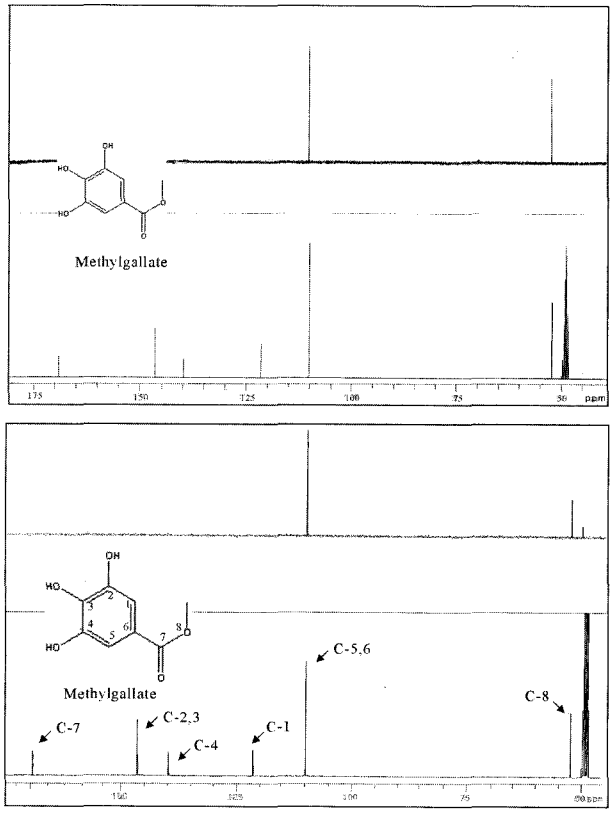


**Fig. 3. $^1$H-NMR (upper part) and $^{13}$C-NMR (bottom part) spectra of methyl gallate (authentic, upper) and R18-9-3-2-4-2 fraction (bottom) isolated from chloroform layer of *Rhus javanica* Linne (400 MHz, $CD_3OD$).**

일 spot으로 확인되었다. R18-9-3-2-4-2는 UV 365 nm에서 암적색을, 254 nm에서 갈색을, 20% 황산용액으로 발색시 자주색을 나타내었다. 붉나무의 클로로포름 층에서 항산화 활성을 나타내는 단일 물질로 분리된 R18-9-3-2-4-2 획분을 구조동정하기 위하여 사용하였다.

## 붉나무 추출물의 항산화 활성물질의 구조동정

Column chromatography를 6차에 걸쳐 실시하여 분리된 단일 물질 R18-9-3-2-4-2는 $^{13}$C-NMR(400 MHz, $CD_3OD$)에서 모두 6개의 signal이 관측되었는데(Fig. 3), 그 중에 2개의 signal은 각각 2개씩이 겹쳐진 것으로 추정되었다. 각 signal의 다중도는 DEPT 135를 측정하여 결정하였다. δ169.01에서 관측된 signal로부터 carbonyl기의 존재가 확인되었고, δ146.44, δ110.03에서 6개에 해당하는 signal이 관측되어 벤젠고리가 존재하는 것을 알 수 있었다. 각 signal의 다중도로부터 4치환 benzene인 것을 알 수 있었으며, 또한 chemical shift로부터 3개는 산소가 결합하고 있고 δ146.44 (×2), δ139.71 1개는 다른 탄소가 결합하고 있는 것으로 추정되었다. 한편 δ52.25 (q) signal로부터 methyl ester 또는 methoxyl기의 존재도 판명되었다(Table 4).

위의 결과를 종합하면 R18-9-3-2-4-2는 gallic acid의 carboxyl기에 methyl기가 ester 결합한 methyl gallate로 그 구조가 추정되었다. $^1$H-NMR(400 MHz, $CD_3OD$)에서도 methyl gallate의 singlet 수소 signal(δ7.04, 1H 2, H-2, H-6)이 관측되었고, methyl ester에서 유래한 singlet methyl signal도 δ3.80(3H, s) 관측되어 위의 사실을 확인할 수 있었다.

따라서 붉나무에서 단일물질로 분리된 항산화 활성을 나타내는 물질은 methyl gallate로 동정되었고 이를 확정하기 위하여 methyl gallate(authentic)를 가지고 $^1$H-NMR 및 $^{13}$C-NMR 분석을 하였다(Fig. 3). 자료를 분석한 결과 methyl gallate(authentic)의 peak와 붉나무에서 단일 물질로 분리된 R18-9-3-2-4-2와 peak가 일치함을 알 수 있었으며 R18-9-3-2-4-2는 methyl gallate로 최종 확정되었다. 붉나무 이외에도 부티아꽃[33], 오스베키아 향나무[34], 안개나무[35]에서 항산화 활성을 나타내는 물질로 methyl gallate가 분리, 동정되기도 하였다.

**Table 4. $^1$H-NMR and $^{13}$C-NMR data of R18-9-3-2-4-2 isolated from chloroform layer of *Rhus javanica* Linne (400 MHz, $CD_3OD$)**

| No | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
|---|---|---|
| 1 | 121.415(s) | 7.04(1H×2, s) |
| 2 | 110.029(d) | 7.04(s) |
| 3 | 146.438(s) | |
| 4 | 139.712(s) | |
| 5 | 146.438(s) | |
| 6 | 110.029(d) | 7.04(1H×2, s) |
| 7 | 169.005(s) | |
| 8 | 52.254(q) | 3.80(3H, s, $CH_3$) |

**Table 5. The comparison of antioxidative activity of R18-9-3-2-4-2, methyl gallate (authentic), and different antioxidants on lard and palm oil**

| Antioxidant (200 ppm) | AI[1] | |
|---|---|---|
| | Lard | Palm oil |
| R18-9-3-2-4-2 | 5.97 ± 0.14[2] | 1.97 ± 0.03 |
| Methyl gallate (authentic) | 8.32 ± 0.09 | 2.21 ± 0.01 |
| α-Tocopherol | 3.23 ± 0.18 | 1.01 ± 0.01 |
| δ-Tocopherol | 4.42 ± 0.06 | 1.19 ± 0.01 |
| BHA | 1.96 ± 0.01 | 1.00 ± 0.03 |
| BHT | 3.15 ± 0.08 | 1.02 ± 0.01 |

[1]Refer to the footnote No. 2 of Table 1. 200 ppm of each antioxidant was used in 2.5 g of oil.
[2]Values are mean standard deviation of duplicate.

## 상업용 항산화제와 붉나무 추출물의 항산화 활성 비교

붉나무에서 단일물질로 분리, 동정된 R18-9-3-2-4-2와 methyl gallate(authentic)를 다른 상업용 항산화제에 비교하였을 때 항산화 활성의 차이를 알아보기 위하여 각 항산화제를 200 ppm 첨가하여 유지상에서 Rancimat을 이용하여 AI를 측정해 본 결과는 Table 5와 같다.

Table 5에서 보면 돈지와 팜유 모두에서 methyl gallate > R18-9-3-2-4-2 > δ-tocopherol > α-tocopherol > BHT > BHA 순으로 항산화 활성을 나타내었다. 붉나무에서 분리, 동정된 R18-9-3-2-4-2의 AI는 돈지와 팜유에서 각각 5.97과 1.97로, Kim 등[36]이 보고한 옻나무에서 분리, 동정된 항산화 활성물질보다 같은 농도(200 ppm)에서 더 높은 항산화 효과를 나

타내었다. R18-9-3-2-4-2보다 methyl gallate가 돈지와 팜유 모두에서 더 높은 AI 값을 나타내었는데 그 이유는 R18-9-3-2-4-2가 단일물질로 분리되었다고 하더라도 화학적으로 합성된 methyl gallate에 비하여 순도 면에서 약간 뒤떨어지는 것 때문으로 추정되었다.

Food model과 *in vitro* system에서 Su 등[34]이 *Osbeckia chinensis*에서 분리한 methyl gallate를 가지고 다른 항산화제와 비교실험을 하였는데, TBARS방법을 이용하여 food model에서 항산화 활성을 측정한 결과 BHA > methyl gallate > α-tocopherol 순으로 항산화 활성을 나타내어서 위의 붉나무에서 분리된 항산화 활성물질 보다 항산화능이 낮음을 알 수 있었다. Su 등[34]과 Mitsuo[37]는 이밖에도 *in vitro* system에서 α-tocopherol이 *Osbeckia chinensis*에서 분리한 methyl gallate와 methyl gallate 화합물보다 더 나은 항산화 활성을 나타내었다고 보고하였다.

## 요 약

항산화 활성이 우수한 붉나무 수피 추출물을 대상으로 항산화 활성을 팜유와 돈지를 기질로 하여 Rancimat 방법으로 확인하였고, 클로로포름 추출물을 column chromatography, thin layer chromatography 및 NMR 등을 통하여 물질을 분리, 동정하였다. 또한 이들 분리물을 각종 유지에 첨가하여 상업용 항산화제와 그 활성을 비교하였다. 붉나무 수피로 부터 80% 메탄올을 추출용매로 사용하여 얻은 추출물은 높은 항산화 활성과 추출 수율이 높았고 용매 분획시 클로로포름 분획물이 돈지와 팜유에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 붉나무 수피에서 항산화 활성을 나타내는 물질로 회분 R18-9-3-2-4-2가 단일물질로 분리되었고 이 물질의 AI는 돈지와 팜유에서 각각 13.01과 3.06으로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다. 단일물질로 분리된 R18-9-3-2-4-2는 $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR에 의해 methyl gallate로 동정되었으며, $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR 분석 결과 methyl gallate 표준물질과 일치하는 것을 확인하였다. 획분 R18-9-3-2-4-2과 methyl gallate (authentic)는 α-, δ-tocopherol, BHA, BHT보다 돈지와 팜유에서 강한 항산화 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 붉나무 수피 에탄올 추출물의 클로로포름 분획물에서 분리한 물질은 현재 항산화제로 사용 중인 BHA, BHT, tocopherol 보다 그 항산화 효과가 우수하여 새로운 천연 항산화제로서의 가능성이 있다고 평가되었다.

## 문 헌

1. Branen, A.L. Toxicological and biochemistry of buthylated hydroxytoluene, buthylated hydroxyanisole. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)
2. Allen, J.C. and Hamilton, R.J. Rancidity in Foods, 3rd ed., p. 85. Blackie Academic & Professional Pub., New York, USA (1994)
3. Fukuda, Y. and Nagata, M. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil and the effect of using the oil for frying. Agric. Biol. Chem. 50: 857-861 (1986)
4. Hudson, B. and Lewis, J. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oil phospholipid as synergist. Food Chem. 19: 537-541 (1987)
5. Richard, D. Fats and Oils. Technomic Pub., Lancaster, USA (1998)
6. Katiyar, S.K. Protection against TPA-induced inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction of green tea. Carcinogenesis 14: 361-370 (1993)
7. Hudson, B.J.F. Food Antioxidants, pp. 253-307. Elsevier Applied Science, New York, USA (1990)
8. Hahm, T.S., King, D.L. and Min, D.B. Food antioxidants. Food Sci. Biotechnol. 2: 1-16 (1993)
9. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 142-148 (1992)
10. Kim, S.Y., Kim, J.H., Kim, S.K., Oh, M.J. and Jung, M.Y. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 633-640 (1994)
11. Yen, G.C. and Lee, C.A. Antioxidant activity of extracts from mold. J. Food Prot. 59: 1327-1330 (1996)
12. Han, D.C. and Kyung, K.H. Antimicrobial activity of autoclaved cabbage juice. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 74-79 (1995)
13. Paek, J.D., Lee, Y.H., Baek, N.I., Kim, S.I. and Ahn, B.Z. Isolation of antitumor agent from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. Korean J. Pharmacogn. 26: 323-326 (1995)
14. Lee, Y.N. A Colored Book of the Korean Plants, pp. 444-445. Kyo-Hak Pub., Seoul, Korea (1996)
15. Bae, K.H. The Medical Plants of Korea, p. 300. Kyo-Hak Pub., Seoul, Korea (2000)
16. Lee, C.B. A Colored Book of the Korean Plants, p. 514. Hyangmun Pub., Seoul, Korea (1980)
17. The Society of Pharmacognosy Research. Modern Pharmacognosy, pp. 235-236. Hakchang Pub., Seoul, Korea (1992)
18. Matsuda, H. Studies on the constituents of the leaves of *Rhus* and some species of related genera in Japanese Chem. Pharm. Bull. 14: 877-883 (1966)
19. Chung, S.C., Hwang, B.Y., Oh, G.J., Kang, S.J., Kim, M.J., Choi, W.H., Lee, K.S. and Ro, J.S. Chemical components from stem bark of *Rhus javanica* L. Korean J. Pharmacogn. 30: 295-300 (1999)
20. Han, J.S., Shin, D.H. and Baek, N.I. Identification of growth inhibitory substance on food-borne microorganisms from *Commiphora molmol* Engl. and its application to food products. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 401-408 (2001)
21. Lim, D.K., Choi, U. and Shin, D.H. Antioxidative activity of some solvent extracts from *Caesalpinia sappan* L. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 77-82 (1996)
22. Maria, C.N., Monica, A. and Lara, M. Oil stability and antioxidant properties of an oil tomato food system as affected by processing. Adv. Food Sci. 21: 10-14 (1999)
23. Michael, H.G. and Eltigani, M. A comparison of oil stability based on the metrohm rancimat with storage at 20°C. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 649-651 (1994)
24. Woo, W.S. Research Method of Natural Products Chemistry, 2nd ed., pp. 1-59. Seoul University Pub., Seoul, Korea (1997)
25. Richard, J.P. Natural Products Isolation, pp. 111-140. Humana Press Inc., New Jersey, USA (1998)
26. Donald, L.P., Gary, M.L. and George, S.K. Introduction to Spectroscopy, 2nd ed., pp. 105-157. Freedom Academy Pub., Seoul, Korea (1998)
27. Ministry of Health and Welfare. Food Code, pp. 223-230. Korean Food & Drug Administration Pub., Seoul, Korea (2000)
28. Lee, Y.J. Shin, D.H., Chang, Y.S. and Kang, W.S. Antioxidative effect of *Rhus javanica* Linne extract by various solvents. Korean J. Food Sci. Technol. 25: 677-682 (1993)
29. Banias, C., Oreopoulou, V. and Thomopoulus, C.D. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. J. Am. Oil Chem. Soc. 68: 520-524 (1992)
30. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I. Antioxidant activity of ethanol extract from *Rhus javanica* Linne on edible oil. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 320-325 (1992)

31. Oh, J.A., Shin, D.H. and Baek, N.I. Isolation and identification of growth inhibition substance on *L. monocytogenes* from *Dystaenia takesimana* Kitagawa. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 984-993 (1999)
32. Ahn, Y.S., Shin, D.H., Baek, N.I., Seong, R.S. and Woo, G.J. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 271-277 (2001)
33. Gupta, S.R., Rarindranath, B. and Seshadri, T.R. The glucosides of *Butea monosperama*. Phytochemistry 9: 2231-2235 (1970)
34. Su, J.D. and Osawa, T. Tannin antioxidants from *Osbeckia chinensis*. Phytochemistry 27: 1315-1319 (1988)
35. Westenburg, H.E., Lee, K.J., Lee, S.K., Fong, H.H.S., Van Breemen, R.B., Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D. Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*. J. Nat. Prod. 63: 1696-1698 (2000)
36. Kim, I.W., Shin, D.H. and Chang, Y.S. Identification of antioxidative components from ethanol extracts of *Rhus verniciflua* STOKES. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1654-1660 (1999)
37. Mitsuo, N. Antioxidants/antimutagens in food. Food Sci. Nutr. 29: 273-291 (1990)

(2003년 4월 14일 접수; 2003년 7월 9일 채택)