

## 추황배(*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Chuhwangbae) 과피로부터 3종의 저분자 화합물의 단리 · 동정

이유진<sup>1</sup> · 조정용<sup>1</sup> · 김찬미<sup>1</sup> · 정향연<sup>1</sup> · 이동이<sup>1</sup> · 김수로<sup>1</sup> ·  
이상현<sup>2</sup> · 김월수<sup>2,3</sup> · 박근형<sup>1</sup> · 문제학<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터, <sup>2</sup>전남대학교 배 수출사업단, <sup>3</sup>전남대학교 원예학과

### Isolation and Identification of 3 Low-molecular Compounds from Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Chuhwangbae) Fruit Peel

Yu Geon Lee<sup>1</sup>, Jeong-Yong Cho<sup>1</sup>, Chan-Mi Kim<sup>1</sup>, Hang-Yeon Jeong<sup>1</sup>, DongI Lee<sup>1</sup>, Soo Ro Kim<sup>1</sup>,  
Sang-Hyen Lee<sup>2</sup>, Wol-Soo Kim<sup>2,3</sup>, Keun-Hyung Park<sup>1</sup>, and Jae-Hak Moon<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University

<sup>2</sup>Korea Pear Research Organization Chonnam National University

<sup>3</sup>Department of Horticulture, Chonnam National University

**Abstract** Three low-molecular compounds were isolated from methanol extracts of pear (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Chuhwangbae) fruit peels using solvent fractionation, various types of column chromatography (Diaion HP-20, Sephadex LH-20, and silica gel), and high performance liquid chromatography with an assay guided by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activity. The isolated compounds were identified as 2-carboxyl-4(1H)-quinolinone (kynurenic acid, **1**) from butanol fraction, *cis-p*-coumaric acid (**2**) from ethyl acetate-acidic fraction, and vanillin (**3**) from the ethyl acetate-phenolic fraction, respectively. These isolated compounds were confirmed on the basis of the spectroscopic data of electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. This is the first time that compounds **1-3** were isolated and identified in pear.

**Keywords:** *Pyrus pyrifolia*, pear, kynurenic acid, *cis-p*-coumaric acid, vanillin

배(*Pyrus* spp.)는 사과, 포도, 복숭아를 포함하여 우리나라에서 재배되고 있는 4대 과실 중의 하나로 수분이 풍부하고 당도가 높아 생과는 물론 가공품으로도 소비되고 있다(1). 또 배는 갈증 해소 및 기관지의 기능장애, 가래·기침, 숙취의 해소, 그리고 이뇨 작용 및 변비 등을 개선하는 등의 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 예로부터 민간요법의 소재로도 많이 이용되어왔으며(2), 한 방에서는 변비, 이뇨 및 기침 등의 치료를 위한 소재로도 이용되고 있다(2). 그러나 이처럼 다양한 배의 효능이 예로부터 널리 알려져 왔음에도 불구하고 그 원인에 대해서는 아직 명확한 근거가 제시되지 못하고 있다. 뿐만 아니라 배의 생리활성에 대한 단편적인 정보들이 일부 보고되고 있으나 그 근거는 여전히 매우 미흡한 실정이다(3). 이와 같은 현상의 배경에는 배에 함유된 유용성분에 관한 연구가 구체적으로 행해지지 않은 것이 중요한 요인 중의 하나로 작용했다고 판단된다.

사과, 포도, 감, 귤 등과 같은 대부분의 과실류들은 그들 각각의 특징적인 맛과 색상을 유지하고 있다. 특히 과실류에 함유된

특징적인 색소성분들이 생리활성을 발현하는 원인물질임이 메스컴 등을 통해 널리 홍보되어 있어 일반적으로 특징적인 색상을 지닌 과실류들이 건강에 유익할 것이라는 긍정적인 이미지가 강하다. 그에 반해 배는 일반적으로 식용으로 하지 않는 과피가 연한 황색을 띠고 있을 뿐 주로 식용으로 하는 과육이 독특한 색상을 지니고 있지 않음은 물론, 단맛 외에 특징적인 향미를 지니고 있지 않아 소비자들은 배에 유용성분이 함유되어 있지 않을 것이라는 선입관을 지니고 있는 듯하다. 이러한 선입관이 작용한 탓인지 대부분의 과실류에 함유된 화학성분에 관한 연구(4-6)는 매우 자세히 수행되어 왔던 반면, 배 함유성분에 관한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다(7). 그와는 달리 서양배의 경우 기능성 성분에 대한 연구가 동양배에 비해 상대적으로 더 자세히 이루어져 왔다(7). 그러나 HPLC나 LC-MS를 이용하여 표준품과의 비교를 통한 동정 연구가 행해져 왔을 뿐 체계적인 성분연구는 행해진 바 없다. 물론, 동양배의 경우에도 있어서도 일부 성분연구가 진행된 사례가 있기는 하나 그 연구들 또한 매우 한정적인 몇 종류의 성분만을 동정하는 수준이었다(8). 그러나 이러한 연구들을 행하는 과정에 있어 동양배에도 매우 다양한 성분들이 함유되어 있음은 이미 제시되어 왔다(9-11). 그럼에도 불구하고 동양배와 서양배를 막론하고 분자수준에 있어 함유성분에 대한 연구는 체계적으로 행해지지 않았다.

최근 우리는 배의 효능을 과학적으로 밝히기 위해서는 먼저 배에 함유된 화합물들을 분자수준에서 밝힐 필요가 있다고 판단하여 배에 함유된 유용성분의 구조해명 연구를 수행해 왔다. 그 결

\*Corresponding author: Jae-Hak Moon, Department of Food Science and Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Tel: 82-62-530-2141  
Fax: 82-62-530-2149  
E-mail: nutrmoon@jnu.ac.kr  
Received February 15, 2013; revised March 11, 2013;  
accepted March 12, 2013

과 7종의 hydroxycinnamoyl malic acid 및 그 methyl ester류(9), 8종의 페놀성 화합물 또는 그 배당체(10), 그리고 14종의 coumaroyl quinic acid 유도체 및 flavonoid류(12)를 배로부터 단리·정제 및 구조결정하여 배에도 매우 다양한 화합물들이 존재함을 밝혀왔다. 이와 같은 배 함유성분 구명에 관한 우리의 일련의 연구 과정에 있어 3종의 화합물이 추가적으로 단리·동정되었다. 이에 그 화합물들의 배에 있어서의 존재를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

본 실험에 이용한 추황배(*P. pyrifolia* Nakai cv. Chuhwangbae)는 전남 나주에서 2008년 9월에 수확한 것으로, 김월수 교수(전남대학교, 원예학과)에 의해 그 품종이 정확히 동정되었으며, 수확 직후의 신선한 상태에서 과피를 약 3 mm 두께로 분리하여 바로 methanol (MeOH) 추출물 조제에 이용하였다. 추출 및 용매분획에 사용된 MeOH, ethyl acetate (EtOAc), 그리고 *n*-butanol (*n*-BuOH)은 Duksan Pure Chemical Co., Ltd. (Ansan, Korea) 제품을 사용하였으며, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Wako사 (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 그리고 Methanol-*d*<sub>4</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였으며, 그 외의 실험에 사용된 모든 시약 및 용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

### 추출 및 용매분획물의 조제

신선 추황배 과피 15 kg에 MeOH 24.3 L를 가하고 homogenizer (HG-92G, Taitec, Koshigaya, Japan)로 균질화한 후, 흡입여과(No. 2, Whatman, Maidstone, England)하여 여과액과 잔사를 분리하였다. 잔사에 재차 MeOH 10.5 L를 가하여 균질화와 여과를 반복하여 얻어진 여과액을 합한 후 진공농축하였다. 얻어진 MeOH 추출물(3708.67 g)을 대상으로 헤리성을 이용한 용매분획을 실시하였다. 즉 MeOH 추출물(3708.67 g)을 pH 3.0의 buffer 용액(0.2 M glycine-0.2 M HCl)으로 현탁액(6 L)을 조제하여 EtOAc(6 L)로 3회 용매분획하여 EtOAc층을 얻었다. H<sub>2</sub>O층에 water-saturated *n*-butanol (BuOH, 6L)을 가하여 3회 반복 용매분획한 후 BuOH층을 얻었다. 얻어진 EtOAc층은 pH 8.0의 buffer 용액(0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6L)과 함께 용매분획하여 H<sub>2</sub>O층과 EtOAc층으로 분리하였다. 여기에서 얻어진 H<sub>2</sub>O층은 1.0 N HCl 용액을 이용하여 pH 3.0으로 조정된 후, 6 L의 EtOAc로 3회 반복하여 용매분획함으로써 H<sub>2</sub>O층-2와 EtOAc-산성획분을 얻었다. 이어 EtOAc-중성획분을 pH 12.0의 buffer 용액(0.2 M KCl-0.2 M NaOH, 6L)과 함께 용매분획하여 H<sub>2</sub>O층과 EtOAc-중성획분을 얻었다. 남은 H<sub>2</sub>O층은 1.0 N HCl용액으로 pH 6.0으로 조정된 후, 6 L의 EtOAc로 3회 반복 용매분획하여 H<sub>2</sub>O층-3과 EtOAc-페놀성획분을 얻었다.

### 정제과정에서 항산화활성 평가

MeOH 추출물의 용매분획 후 얻어진 각 획분의 항산화 활성 검정은 thin layer chromatography (TLC) plate (aluminium sheets, silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt)에 DPPH ethanol 용액(200 μM)을 분무하는 방법(13)을 이용하였다. 즉 용매분획물 일정량을 TLC plate에 spotting하여 BuOH/acetic acid/H<sub>2</sub>O (4:1:1, v/v/v) 용액으로 전개한 후, 전개된 TLC plate에 DPPH ethanol 용액을 분무하여 보라색이 탈색되어진 획분이나 물질을 항산화활성 양성으로 판정하였다. TLC plate에 DPPH 용액을 분무하여 항산화활성 화합물의 존재를 확인하는 본 방법을 TLC-DPPH법이라 칭하였다. 또한 DPPH 분무 후의 TLC plate에 cerium sulfate

hydrate 발색시약을 추가로 분무한 후, hot plate 상에서 가열하여 함유성분을 추가로 검출하였다.

### BuOH 획분으로부터 화합물 1의 단리

배 과피 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 BuOH 획분은 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Industrial, Tokyo, Japan) column chromatography를 행하여 정제하였다. 즉, BuOH 획분(31.51 g)을 Diaion HP-20이 충전된 column (9.0×90 cm)에 charge시켜 H<sub>2</sub>O/EtOH=100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 그리고 0:100(v/v)의 용액을 이동상으로 한 step-wise법(각 8 L)에 의해 순차적으로 용출시켰다. 용출된 획분들 중 획분 B (18.2 g)를 Shim-pack prep-ODS (H) KIT column (20×250 mm, 5 μm, Shimadzu, Kyoto, Japan)이 장착된 HPLC system을 이용하여 분획하였다. 이때 사용된 이동상은 H<sub>2</sub>O/MeOH=100:0 (v/v, pH 2.65 by trifluoroacetic acid, A)과 H<sub>2</sub>O/MeOH=0:100 (v/v, B)을 이용하였으며, A용액을 출발 용출용매로 하여 30분 후 B가 60%가 되도록 한 다음, 45분까지 B가 100%가 되게 하여 50분까지 유지시키는 용출계를 이용하였다. 그리고 254 nm (SPD-M20A, Shimadzu)의 파장과 유속 9.9 mL/min (LC-6AD, Shimadzu)의 조건에서 분취를 행하였다.

### EtOAc-산성 획분으로부터 화합물 2의 단리

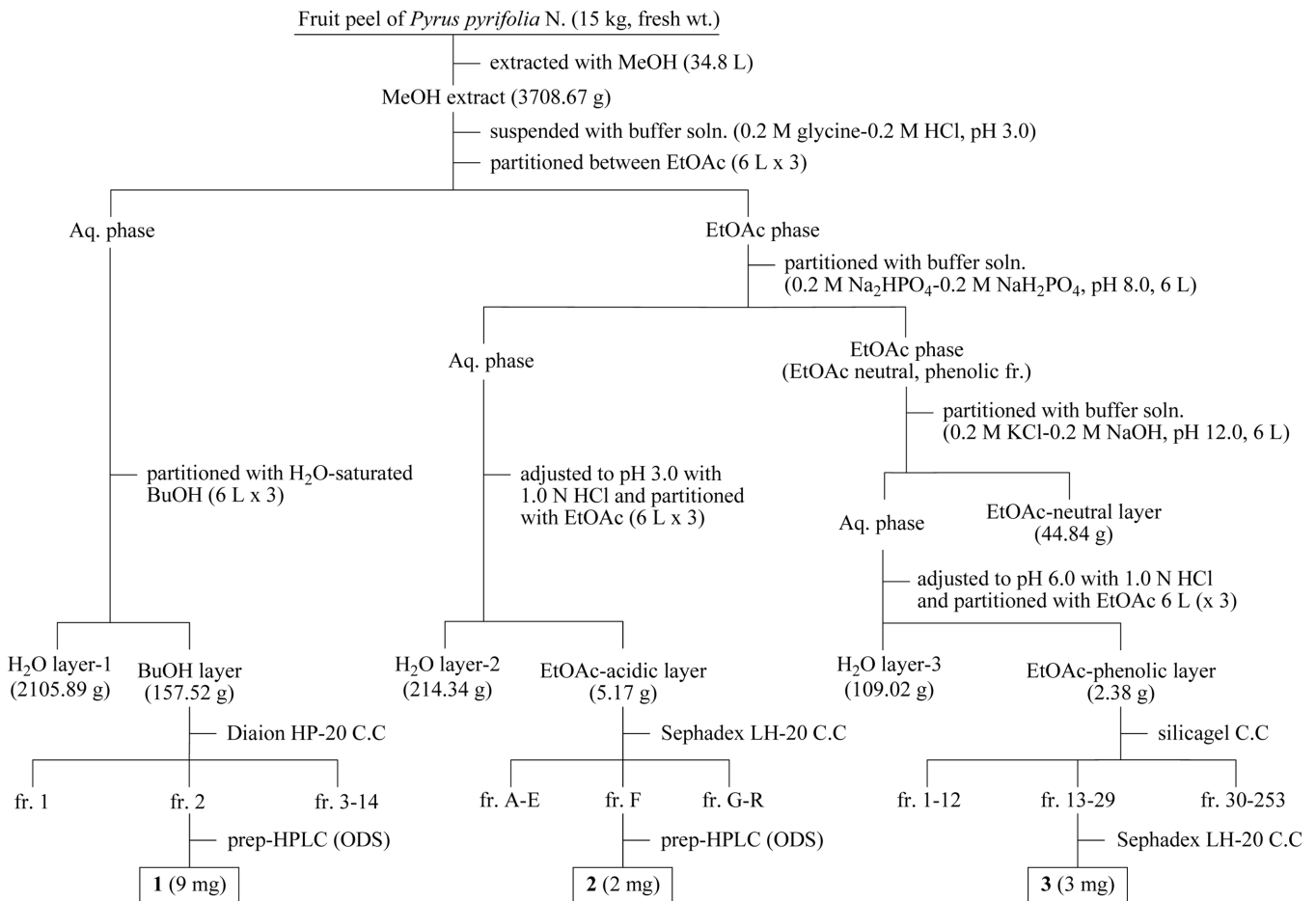
배 과피 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc-산성 획분은 Sephadex LH-20 (70-230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden) column chromatography를 행하여 정제하였다. 즉, EtOAc-산성 획분(2.63 g)을 Sephadex LH-20이 충전된 column (3.3×82 cm)에 charge시킨 후, 80% MeOH을 이동상으로 하여 용출·분획(5 mL/fraction)하였다. Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻어진 획분 F (70.5 mg)는 Shim-pack prep-ODS (H) KIT column (20×250 mm, Shimadzu)이 장착된 HPLC system을 이용하여 추가적인 분리를 행하였다. 사용된 이동상은 H<sub>2</sub>O/MeOH=85:15 (v/v, pH 2.65 by trifluoroacetic acid, A)와 H<sub>2</sub>O/MeOH=30:70 (v/v, B)을 이용하였으며, A용액을 출발 용출용매로 하여 65분 후 B가 45%가 되도록 한 다음, 75분까지 B가 100%가 되도록 하였다. 그리고 254 nm (SPD-M20A, Shimadzu)의 파장과 유속 9.9 mL/min (LC-6AD, Shimadzu)의 조건에서 분취를 행하였다.

### EtOAc-페놀성 획분으로부터 화합물 3의 단리

배 과피 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc-페놀성 획분은 silica gel (70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) column chromatography를 행하여 정제하였다. EtOAc-페놀성 획분(2.38 g)을 silica gel이 충전된 column (2.8×38 cm)에 charge시켜 *n*-hexane/EtOAc/MeOH=6:4:0, 4:6:0, 2:8:0, 0:10:0, 0:9:1, 0:8:2, 0:7:3, 0:6:4, 0:5:5, 그리고 0:0:10 (v/v/v)의 용액을 이동상으로 하여 step-wise법을 이용하여 용출시키면서 200 mL씩 분획하였다. 분획한 획분들 중 획분 13-29 (154 mg)를 농축하여 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 재차 정제하였다. 즉, Sephadex LH-20이 충전된 column (2.0×40 cm)에 시료를 charge한 다음, MeOH/BuOH=50:50(v/v)을 용매계로 하여 분획·정제하였다. 이상의 배 과피 MeOH 추출물의 용매분획 과정 및 화합물 1-3의 단리과정을 Fig. 1에 제시하였다.

### NMR 및 MS 분석

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra는 INOVA 500 spectrometer (500 MHz, Varian Walnut Creek, CA, USA) 분석에



**Fig. 1. Isolation procedure of antioxidants from MeOH extract of pear (*Pyrus pyrifolia* N.) fruit peels.** C.C, Column chromatography; Aq., aqueous; fr., fraction.

의해 얻었다. 분석용매는  $CD_3OD$ ,  $DMSO-d_6$  및  $CDCl_3$ 를 사용하였으며, 이들은 내부 표준물질로 tetramethylsilane (TMS,  $\delta=0$ )을 함유하였다. 또한 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 분석은 질량분석기(Shimadzu LCMS-IT-TOF)가 장착된 LC Solution 3.0 Software (Shimadzu)를 사용하여 수행하였다.

**화합물 1:** pale green powder;  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  11.73 (1H, s, H-1), 8.08 (1H, br. d,  $J=7.5$  Hz, H-5), 7.95 (1H, br. d,  $J=8.0$  Hz, H-8), 7.68 (1H, br. t,  $J=6.5$  Hz, H-7), 7.35 (1H, br. t,  $J=6.5$  Hz, H-6), 6.63 (1H, s, H-3);  $^{13}C$ -NMR ( $DMSO-d_6$ , 125 MHz)  $\delta$  139.1 (C-2), 109.3 (C-3), 177.9 (C-4), 124.8 (C-5), 123.8 (C-6), 132.31 (C-7), 119.7 (C-8), 140.1 (C-9), 125.6 (C-10), 163.5 (C-11); ESI-MS (negative)  $m/z$  187.9  $[M-H]^-$ .

**화합물 2:** yellow powder;  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$  7.69 (1H, d,  $J=13.0$  Hz, H-7), 7.46 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2, 6), 6.58 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3, 5), 6.35 (1H, d,  $J=13.0$  Hz, H-8).

**화합물 3:** white powder;  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  9.82 (-CHO) 7.43 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2), 7.43 (1H, dd,  $J=6.5$  Hz, 1.5 Hz, H-6), 7.04 (1H, d,  $J=6.5$  Hz, H-5), 3.97 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>).

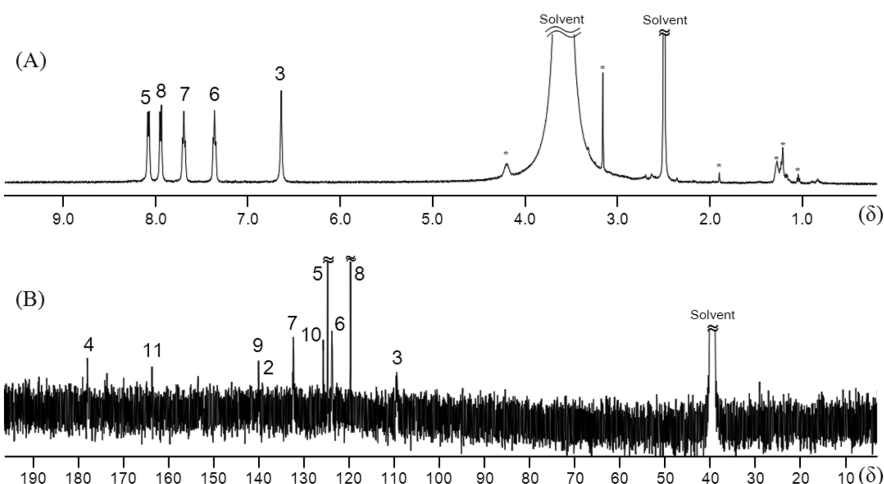
## 결과 및 고찰

### 항산화 활성물질의 분리

신선 추황배 과피 15 kg을 대상으로 MeOH 추출물을 조제한

결과, 3708.67 g의 추출물이 얻어졌다. 얻어진 MeOH 추출물을 용매분획하여 H<sub>2</sub>O 획분(2429.25 g), BuOH 획분(157.52 g), EtOAc-산성 획분(5.17 g), EtOAc-중성 획분(E, 44.84 g), 그리고 EtOAc-페놀성 획분(2.38 g)을 얻었다. 용매분획 후 얻어진 각 획분들을 대상으로 DPPH (final concentration 250  $\mu$ M) radical-scavenging 활성을 검정하였다. 본 결과는 선행연구(9)를 통해 보고된 바 있어 여기에서는 제시하지 않았으나 용매분획물들 중 EtOAc-산성 획분이 가장 높은 활성을 나타냈고, 그 다음으로는 EtOAc-페놀성 획분, BuOH 획분, EtOAc-중성 획분 순이었으며, H<sub>2</sub>O 획분은 거의 활성을 나타내지 않았다. 이어 얻어진 각 획분들을 대상으로 TLC-DPPH법에 의해 각 획분에 존재하는 화합물들의 존재경향을 확인하였다. 그 결과(9), 배 과피에는 다양한 항산화 활성 화합물들이 존재되어 있음이 확인되었으며, 함유 성분들이 용매분획에 의해 효과적으로 분리되었음을 알 수 있었다. 서론에서 제시한 바와 같이 선행연구(9,10,14)를 통해 배 과피 MeOH 추출물이 EtOAc-산성 획분으로부터 7종의 hydroxycinnamoyl malic acid (9) 및 8종의 페놀성 화합물(10), EtOAc-페놀성 획분으로부터 6종의 triterpenoid계 유도체들(14)을 단리·구조해석하여 보고한 바 있다. 선행연구에 이어 본 연구에서는 배 과피 MeOH 추출물의 BuOH 획분, EtOAc-산성 획분 및 EtOAc-페놀성 획분 각각을 대상으로 추가적인 분리를 행하였다.

먼저 배 과피 BuOH 획분을 대상으로 Diaion HP-20 column chromatography를 행한 후, 얻어진 각 획분들을 대상으로 prep-HPLC를 이용하여 정제하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O/EtOH=100:0 (v/v)



**Fig. 2.** NMR spectra of compound 1. A, <sup>1</sup>H-NMR spectrum (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz); B, <sup>13</sup>C-NMR spectrum (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz); \*, impurity.

용출획분의 HPLC chromatogram 상에서 retention time (*t<sub>R</sub>*) 23.2 min에 용출된 화합물(화합물 1, 9 mg)을 분리하였다.

또한 배 과피 MeOH 추출물의 EtOAc-산성 획분을 대상으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 얻어진 각 획분들에 함유된 화합물들의 존재경향을 TLC-DPPH법을 통해 비교하였다. TLC 상에서 유사한 경향을 보인 획분들끼리 grouping 하여 18개(A-R)의 획분으로 나누었다. 이중 향산화활성을 보인 획분 F (Ve/Vt 1.00-1.10, 70.5 mg)를 대상으로 prep-HPLC (ODS)를 행하여 *t<sub>R</sub>* 49.7 min에 용출된 peak를 반복 분취하여 화합물 2 (2 mg)를 단리하였다.

그리고 배 과피 MeOH 추출물의 EtOAc-폐놀성 획분을 대상으로 *n*-hexane/EtOAc/MeOH 용매계를 이용하여 silica gel column chromatography를 행한 후, 얻어진 각 획분들을 대상으로 TLC-DPPH법에 의해 향산화활성을 검정하였다. 그 결과, 향산화 활성을 나타낸 획분 13-29 (*n*-hexane/EtOAc=40:60, v/v, 159 mg)를 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 재차 정제하였다. 이어 얻어진 획분들을 대상으로 TLC-DPPH법에 의해 향산화활성을 검정한 결과, 획분 20-22 (Ve/Vt 0.80-0.92)에서 단일물질로 판단되는 spot (*R<sub>f</sub>* 0.4)이 관찰되어 이 획분들을 합하여 농축함으로써 화합물 3 (3 mg)을 분리하였다.

**단리 화합물의 구조해석**

화합물 1의 ESI-MS (negative) spectrum으로부터 pseudomolecular ion peak *m/z* 187.9 [M-H]<sup>-</sup>이 검출되어 이 화합물의 분자량은 189로 확인되었으며, 이 분자량으로부터 화합물 1은 질소가 함유된 alkaloid계 화합물인 것으로 시사되었다. 또한 *m/z* 143.1의 fragment ion peak가 관찰되어 이 화합물은 carboxylic acid group을 함유하고 있을 가능성이 강하게 시사되었다. 또 화합물 1의 <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) spectrum (Fig. 2)으로부터도 1종의 carboxylic acid group으로 추정되는 carbon signal [163.5 (C-11)]이 관찰되어 MS data로부터 추정되었던 carboxylic acid group의 존재가 확인되었다. 그리고 1종의 carbonyl carbon signal [δ 177.9 (C-4)]과 8종의 *sp*<sup>2</sup> carbon signal들[δ 140.1-109.3]을 포함하여 총 10종의 carbon signal들이 관찰되었다. 그리고 <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) spectrum (Fig. 2)으로부터 -NH- group에 귀속되는 1종의 proton signal [δ 11.73 (1H, s, H-1)]이 관찰되었다. 또 4종의 *sp*<sup>2</sup> carbon proton signal들[δ 8.08 (1H, br. d, *J*=7.5 Hz, H-5), 7.95 (1H, br. d, *J*=8.0 Hz, H-8), 7.68 (1H, br. t, *J*=6.5 Hz, H-7), 그리고 7.35

(1H, br. t, *J*=6.5 Hz, H-6)]이 관찰되었으며, 그들의 분열패턴 및 coupling constant 값들로부터 *ortho* 치환체 benzene의 존재가 확인되었다. 그에 더하여 1종의 singlet *sp*<sup>2</sup> carbon proton signal [δ 6.63 (1H, s, H-3)]이 추가적으로 관찰되었다. 이상의 MS 및 1D-NMR data로부터 이 화합물 1은 carboxylic acid group을 포함하는 quinolinone계 화합물로 시사되었다. 이어 화합물 1의 보다 더 정확한 구조해석을 위해 HMBC 분석을 행하였다. HMBC spectrum (Fig. 3, 화살표)에서 H-5 (δ 8.08)의 proton과 carbonyl carbon (δ 177.9, C-4) 간의 cross peak가 관찰되어 화합물 1의 기본 골격은 quinolin-4(1H)-one임을 확인하였다. 특히 H-3 (δ 6.63)의 proton signal과 carboxylic acid carbon signal (δ 163.5, C-11) 간의 상관관계가 관찰되어 quinolin-4(1H)-one의 C-2위에 carboxylic acid group이 결합되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 화합물 1의 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR spectra는 *Ephedra transitoria*(15)로부터 동정된 2-carboxyl 4(1H)-quinolinone의 그것들과도 정확히 일치하였다. 그래서 화합물 1은 틀림없는 2-carboxyl 4(1H)-quinolinone (kynurenic acid)으로 동정되었다.

화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum으로부터 전형적인 *para*-substituted benzene ring에 귀속되는 AA'BB'계의 proton signal들[δ 7.46 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2, 6), 6.58 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3, 5)]이 관찰되었다. 또한 등가의 olefinic double bond proton signal들[δ 7.69 (1H, d, *J*=13.0 Hz, H-7), 6.35 (1H, d, *J*=13.0 Hz, H-8)]이 관찰되었고, 이들의 coupling constant (*J*) value가 13.0 Hz로 나타나 이 olefinic double bond는 *cis* form으로 해석되어 화합물 2는 *cis-p*-coumaric acid로 시사되었다. 그래서 화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 *Baccharis myrsinites*로부터 분리된 *cis-p*-coumaric acid의 그것과 비교한 결과(16), 상호 일치성이 확인되었다. 따라서 화합물 2는 *cis-p*-coumaric acid (Fig. 3)로 동정되었다.

화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum으로부터 tri-substituted aromatic carbon proton 유래로 추정되는 3종의 proton signal들[δ 7.43 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-2), 7.43 (1H, dd, *J*=6.5 Hz, 1.5, H-6), 그리고 7.04 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-5)]이 관찰되었다. 그리고 aldehyde group에 귀속되는 1종의 proton signal [δ 9.82 (1H, s)]과 methoxyl group에 귀속되는 1종의 proton signal [δ 3.97 (3H, s)]이 관찰되었다. 그래서 화합물 3은 3-methoxyl-4-hydrobenzyl aldehyde(vanillin)일 가능성이 강하게 시사되었다. 그리고 화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 vanillin의 표준시약(Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 그것과 비교를 통해 상호 일치성을 확인

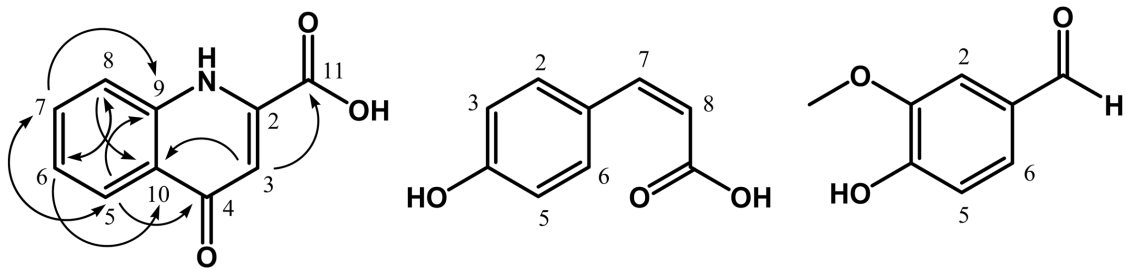


Fig. 3. Structure of the isolated compounds and important correlations (arrows) observed in the HMBC spectrum of compound 1.

하였다. 이에 화합물 3은 vanillin(Fig. 3)으로 동정되었다.

배 과피의 MeOH 추출물로부터 단리된 3종의 화합물은 2-carboxyl 4(1H)-quinolinone (kynurenic acid, 화합물 1), *cis-p*-coumaric acid (화합물 2), 그리고 vanillin(화합물 3)으로 각각 동정되었다(Fig. 3). 이들 중 화합물 1은 chest honey에서 기 동정된 바 있으며, tryptophan의 대사물로 알려져 있다(17). 특히 화합물 1은 excitoxin 아미노산에 의한 뇌손상 저해 효과(18)가 보고된 바 있으며, 화합물 1을 포함한 그 유도체들은 *E. coli*의 생육억제효과가 있음도 보고된 바 있다(19). 또 화합물 1은 free radical에 의한 liposome산화에 대해 억제능을 발현함이 보고(20)되었으며, FeSO<sub>4</sub>에 의해 유도된 지질산화에 대한 억제능을 발현함도 보고된 바 있다(21).

그리고 화합물 2는 일반적으로 자연계에 널리 분포되어있는 phenylpropanoid계 화합물로 *Cinnamomum subavenium* (22), *Leucaena leucocephala* (23), 그리고 *Psidium guajava* (24)으로부터 단리된 바 있다. 특히 한국의 오죽(*Phyllostachys nigra*)으로부터 단리된 화합물 2는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도산화에 의한 신경세포(RGC-5 cell) 사멸 억제효과를 갖는다고 보고된 바 있다(25). 본 연구그룹의 선행연구(10)를 통해 배 과피 MeOH 추출물로부터 화합물 2의 이성질체인 *trans-p*-coumaric acid가 동정된 바 있다. 이러한 olefinic double bond를 갖는 phenylpropanoid계 화합물들은 빛 등의 외부 자극에 의해 쉽게 이성질화되는 경향이 있음이 잘 알려져 있다(26). 즉, 본 연구에서 단리된 화합물 2는 본래 배에 함유되어 있었던 화합물일 가능성과 단리과정 중에 *trans* form으로부터 이성질화되어 유도되었을 가능성도 있다고 판단된다.

그리고 화합물 3은 *Cudrania tricuspidata* (27), *Annona squamosa* L. (28), 그리고 *Sasa borealis* (29)로부터 단리된 바 있으며, 바닐라의 주요 향기성분 중의 하나로 식품 향료로도 널리 이용되고 있다(30). 이와 같은 향기성분이 배로부터 단리·동정된 것은 배의 품질평가 측면에 있어 큰 의미가 있다고 판단된다. 즉, 이 화합물 3은 배의 향에 중요한 영향을 미칠 가능성이 시사되는 바 배의 품질 평가 지표로서 추후 그 활용성이 기대된다. 그리고 *Annona squamosa* L.에서 단리된 화합물 3은 *in vitro* 실험에서 DPPH radical-scavenging, ferric-reducing antioxidant power, 그리고 *N,N*-dimethyl-*p*-phenyldiamine radical-scavenging 활성평가에서 강한 항산화능을 발현함이 보고된 바 있다(28). 또 화합물 3의 쥐 투여 실험에 있어 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)에 의해 유도되는 산화적 스트레스를 경감시키는 효과가 있음도 보고된 바 있다(31).

이상 단리된 화합물 1-3(Fig. 3)은 앞서 설명한 바와 같이 다른 식물군에서도 동정된 바 있으나, 배에 있어 그 존재가 확인된 것은 본 연구가 처음이다. 그리고 화합물 1-3에 대한 항산화활성 평가는 전술한 바와 같이 기존의 선행 연구(20,21,25,28,31)들에

의해 다양하게 행해진 바 있어 본 연구에서는 추가적인 활성평가를 행하지는 않았다. 그러나 본 연구에 의해 단리된 화합물 1-3 또한 기존의 연구결과들로부터 추측하였을 때, 배의 항산화능에 기여하는 성분들일 것으로 판단된다.

배를 대상으로 함유성분의 연구가 일부 수행된 바 있기는 하나 종래의 연구들은 체계적이지 못하거나 정확성이 결여된 경우가 많았다. 뿐만 아니라 분자수준에서의 배 함유 성분들에 대한 정보가 불충분하여 배의 섭취에 따른 *in vivo* 수준에서의 연구성과는 물론, 체내의 metabolomics에 관련된 연구성과 또한 전무한 실정이다. 이에 본 연구그룹에서는 배에 함유된 유용성분을 계통적으로 밝히는 연구를 체계적으로 수행해왔다(9,10,12,14). 이와 같이 배에 함유된 성분연구가 체계적으로 이루어짐으로써 배의 기능성을 홍보할 수 있는 기초자료가 확보되는 물론 저급품, 낙과, 가공부산물 등을 적극 활용할 수 있는 과학적 근거가 제시될 수 있다고 판단된다. 뿐만 아니라 배의 육종을 포함하여 재배방법, 품종별 특성, 보존방법, 가공식품의 개발 및 배의 기능성 평가 등의 다양한 응용적 측면에 있어서도 중요한 기초자료로 활용됨은 물론, 한국배의 우수성 및 차별성을 제시함으로써 수출증대 측면에 있어서도 신뢰성이 확보된 과학적 홍보자료로 활용되길 기대한다.

## 요 약

본 연구에서는 동양배에 함유된 유용성분을 분자수준에서 밝히고자, 우리나라에서 가장 많이 섭취되고 있는 품종 중의 하나인 추황배를 대상으로 배 과피의 MeOH 추출물을 해리성을 이용하여 용매분획하였다. 얻어진 획분들을 대상으로 항산화 활성에 초점을 맞추어 open column chromatography와 high performance liquid chromatography를 행하여 3종의 항산화 화합물을 단리하였다. 그 결과, BuOH 획분으로부터 화합물 1을, EtOAc-산성 획분으로부터 화합물 2를, 그리고 EtOAc-폐쇄성 획분으로부터 화합물 3을 단리하고, 각각 NMR 및 MS 분석을 행하여 구조해석을 행하였다. 그 결과, 화합물 1-3은 각각 2-carboxyl 4(1H)-quinolinone (kynurenic acid, 화합물 1), *cis*-coumaric acid (화합물 2), 그리고 vanillin(화합물 3)으로 동정되었다. 이 3종의 화합물 모두 본 연구에 의해 배로부터 처음 동정되었다. 본 연구결과가 배의 유용성 및 기능성 연구를 위한 기초자료로 활용되길 기대한다.

## 감사의 글

이 논문은 농림수산식품부의 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다. MS 및 NMR은 한국기초과학지원연구원(KBSI) 광주센터에서 분석하였다.

## 문헌

- Choi C. Studies on investigation into biologically activated substances from Korean pear and development of versatile processing technology for value added pear product. The R&D Annual Report, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (2002)
- Cui T, Nakamura K, Ma L, Li JZ, Kayahara H. Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear. *J. Agr. Food Chem.* 53: 3882-3887 (2005)
- Andreottia C, Costa G, Treutter D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. *Sci. Hort. Amsterdam.* 109: 130-137 (2006)
- Karaman S, Tuetem E, Soezgen Baskan K, Apak R. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chem.* 120: 1201-1209 (2010)
- Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.* 21: 589-598 (2008)
- Li C, Gu H, Dou H, Zhou L. Identification of flavanones from peel of *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang, by HPLC-MS and NMR. *Eur. Food Res. Technol.* 225: 777-782 (2007)
- Lin LZ, Harnly JM. Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (*Pyrus* spp.). *J. Agr. Food Chem.* 5: 9094-9101 (2008)
- Huang LJ, Gao WY, Li X, Zhao WS, Huang LQ, Liu CX. Evaluation of the in vivo anti-inflammatory effects of extracts from *Pyrus bretschneideri* Rehd. *J. Agr. Food Chem.* 58: 8983-8987 (2010)
- Lee KH, Cho JY, Lee HJ, Ma YK, Kwon J, Park SH, Lee SH, Cho JA, Kim WS, Park KH, Moon JH. Hydroxycinnamoylmalic acids and their methyl esters from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit peel. *J. Agr. Food Chem.* 59: 10124-10128 (2011)
- Lee KH, Cho JY, Lee HJ, Park KY, Ma YK, Lee SH, Cho JA, Kim WS, Park KH, Moon JH. Isolation and identification of phenolic compounds from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit peel. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 1539-1545 (2011)
- Li X, Jhang J, Gao W, Wang H. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Food Chem. Toxicol.* 50: 3673-3679 (2012)
- Lee YG, Cho JY, Kim CM, Lee SH, Kim WS, Jeon TI, Park KH, Moon JH. Coumaroyl quinic acid derivatives and flavonoids from immature pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit. *Food Sci. Biotechnol.* in press (2013)
- Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1783 (1994)
- Kim CM. Isolation and structural elucidation of triterpenoid derivatives from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Chuhwangbae) fruit peels and their antioxidative activities. MS thesis. Chonnam National University, Gwangju, Korea (2013)
- Suleiman AK, Ahmad A, Dawud EE, Asfar AS. Transthorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria*. *J. Nat. Prod.* 61: 262-263 (1997)
- Li CJ, Ahmed AA, Arias ADC, Mabry TJ. Clerodane diterpenoids, long chain esters of coumaric acid and other compounds from *Baccharis myrsinites*. *Phytochemistry* 45: 571-574 (1996)
- Beretta G, Caneva E, Facino RM. Kynurenic acid in honey from arboreal plants: MS and NMR Evidence. *Planta. Med.* 73: 1592-1595 (2007)
- Fukushima T, Mitsuhashi S, Tomiya M, Iyo M, Hashimoto K, Toyo'oka T. Determination of kynurenic acid in human serum and its correlation with the concentration of certain amino acids. *Clin. Chim. Acta* 377: 174-178 (2007)
- Shilabin AG, Dzhekieva L, Misra P, Jayaram B, Pratt RF. 4-Quinolones as noncovalent inhibitors of high molecular mass penicillin-binding proteins. *ACS Med. Chem. Lett.* 3: 592-595 (2012)
- Chrosten S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2506-2510 (1990)
- Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzón E, Ortiz-Islas E, López T, García E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaría A, Pérez-De La Cruz V. On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol. Teratol.* 33: 538-517 (2011)
- Chen, CY, Wang YD. A novel sesquiterpenoid from the leaves of *Cinnamomum subavenium*. *Chem. Nat. Comp.* 47: 215-217 (2011)
- Chen CY, Wang YD. Polyprenol from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. *J. Environ. Protect.* 1: 70-72 (2010)
- Wu H, Li X, Li R, Li, L, Wang N. Study on anti-oxidative components from leaves of *Psidium guajava*. *Zhongcaoyao* 41: 1593-1597 (2010)
- Kim KA, Kang KD, Lee EH, Kim CY, Um BH, Jung SH. The compound isolated from the leaves of *Phyllostachys nigra* protects oxidative stress-induced retinal ganglion cells death. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1721-1727 (2010)
- Dugave C. *Cis-trans* isomerization in biochemistry. Wiley VCH, Weinheim (2006)
- Ko KH, Nam SH. Antioxidant activities of volatile aroma components from *Cudrania tricuspidata* (Carr.) bureau extracts. *Korean Soc. Food Nutr.* 41: 1493-1501 (2012)
- Jagtap UB, Bapat VA. Antioxidant activities of various solvent extracts of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit pulp. *Nutrafoods* 11: 137-144 (2012)
- Jeong YH, Lee J, Kwon YJ, Seo EK. Reverse-phase HPLC method for identification of diastereomeric constituents from *Sasa borealis*. *Yakhak Hoechi* 50: 21-25 (2006)
- Maruenda H, Lujan Vico MD, Ethan Householder J, Janovec JP, Cañari C, Naka A, Gonzalez AE. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chem.* 130: 161-167 (2013)
- Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, Garoui EM, Barkallah M, Marouani C, Kallel C, Zeghal N. Erythrocyte oxidative damage in rat treated with CCl<sub>4</sub>: protective role of vanillin. *Toxicol. Ind. Health* 28: 908-916 (2012)