冬栢을 위시한 차나무科 植物 種實에 含有된 抗酸化劑에 관한 研究*

金成眞・崔銀眞・林希玲・金泰淑・趙鏞桂

東亞大學校 食品營養學科

Studies on the Antioxidative Substances in the Seeds of Some *Theaceae* Family

Kim, Seong-Jin・Choi, Eun-Jin・Lim, Hee-Ryeong・Kim, Tae-Sook・Joh, Yong-Goe

Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University

(Received March. 20, 1991)

ABSTRACT

Dried seeds of *Camellia japonica* and *Thea sinensis* were investigated to determine the nature of their antioxidative activity. Activity was measured by the induction period in the coupled oxidation of a substrate lard and extracts or isolates to be tested. 70% methanol and dichloromethane extracts were found to be antioxidative abilities. Their unsaponifiables revealed weak antioxidative activity, although hexane extracts did not show antioxidative effect on lard. Column chromatography for dichloromethane extracts gave 4 fractions(only 2 fractions were potent).

HPLC was used in isolating potent antioxidative components from the column fractions and the precolumn-passed methanol extracts. They were separated into 7 and 8 components, respectively. The column fractions obtained from both seeds comprised trans-p-coumaric acid, trans-p-ferulic acid and an unknown component with minor components such as chlorogenic acid and catechin. On the other hand, the most prominent components in the methanol extracts were an unidentified component, trans-p-coumaric acid, trans-p-ferulic acid, catechin and chlorogenic acid. The unknown compound isolated from the column fractions and methanol extracts was identified as epicatechin by ^{1}H-and ^{13}C-NMR. The antioxidative activities of these components were epicatechin 〉 catechin 〉 chlorogenic acid 〉 trans-p-ferulic acid 〉 trans-p-coumaric acid.

I. 序 論

油脂는 自動酸化에 의하여 過酸化物을 비롯한 여러 形態의 酸化物을 生成하는데, 이들은 食物의 風味나 營養的 價値를 떨어뜨리며, 심지어 毒性을 나타낼 때도 있다.[1~4] 또 過酸化 脂質은 各種 疾患과 老化에 관계한다는 報告도 많다. 즉 生體內에서 不飽和 脂肪酸의 過

* 이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음

酸化物이 生體膜을 破壞하여 細胞障害를 일으킨다고 하며[5~7], 또 mitochondria內에 存在하는 여러 酵素와 複合體를 形成하여 酵素를 不活性化 함으로 老化를 일으킨다고 한다.[8~12]

最近에는 高度 不飽和 脂肪酸이 多量含有된 保存 加工食品이 늘어남에 따라, 油脂의 酸化는 食品의 風味와 色澤을 劣化시키고, 나아가 消費者의 營養 및 健康에 심각한 威脅이 되고 있다. 이런 問題를 해결하기 위하여 食品에 抗酸化劑를 添加하는데, 이들 대부분이 BHA, BHT와 같은 人工 抗酸化劑이다. 이러한 人工 抗酸化劑는 動物 實驗[13~15]에서 體重의 增加 抑制, 肝의 重量增加등 動物體에 有害한 症狀이 發生하므로 人工合成 抗酸化劑의 使用이 法的으로 嚴格히 規制되고 있는 實情이어서, 油脂 食品의 安全性을 向上시킴과 동시에 人體에 無害한 天然 抗酸化劑의 開發이 절실히 要求된다.

天然 抗酸化劑[16]는 1910년代에 비타민 E가 開發된 이래 gossypol, sesamol, flavonol誘導體인 quercetion, polyphenol化合物인 chlorogenic acid, caffeci acid와 같은 抗酸化性 物質이 分離되었다. 最近에는 Fusio[17]가 食品의 調味料로 利用되는 nutmeg, thyme, clove의 精油成分에 抗酸化性 物質이 存在한다고 하였고, 木村[18]도 香辛料로 쓰이는 rosemary와 sage에 강한 抗酸化劑가 存在한다고 報告한 바 있다. Brieskorn[19~21]은 sage(*Salvia officinalis* L.)잎에서 carnosol, carnosic acid 및 royleanone과 같은 抗酸化劑를 分離하였고, Inatani등[22~24]은 rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.)에서 carnasol, rosmanol, rosemadial을 分離하였다. 또 Houlihan[25]도 rosemary에서 rosemariquinone과 rosmaridiphenol을 分離 同定하여 강한 抗酸化性이 있음을 確認하였다.

冬栢[26~28]은 우리나라의 南海岸에 分布하는 常綠橋木으로 그 種實에서 얻은 기름은 西洋에서는 olive油 代用으로, 또는 paste와 軟膏의 基劑, 強心劑로 利用되고 있다고 하며, 東洋에서는 머리기름, 化粧品, 利尿劑로 널리 쓰이고 있다.

冬栢種實油[29]는 올레산을 위시하여 高度 不飽和 脂肪酸을 含有하고 있으나, 그 誘導期가 올레산의 그것보다 훨씬 긴 것을 觀察할 수 있었다. 이런 事實은 冬栢種實油에 抗酸化性 物質의 存在를 意味하나, 여기에 관한 硏究는 찾아볼 수 없다. 著者는 차科 植物인 冬栢과 오차 種實에서 抗酸化性이 認定되는 物質을 分離 同定하여 그 結果를 여기에 報告한다.

Ⅱ. 材料 및 實驗方法

1. 材　料

冬栢種實은 1989년 10~11월에 걸쳐 慶南 巨濟郡 海金剛 附近에 自生하는 冬栢林에서, 오차種實은 1990년 11월에 慶南 河東郡 辰橋에서 收集하였다. 이렇게 모은 種實을 그늘에서 약 1개월 乾燥시킨 후 脫殼 磨碎하여 實驗 材料로 使用하였다.

2. 試　藥

抽出溶媒는 東洋化學社(서울)의 1級品을, TLC 및 column展開用 溶媒는 純正化學社(東京)의 特級品을, HPLC用 溶媒는 American Burdick & Jackson社의 HPLC grade의 것을 使用하였다. Precoated TLC plate와 column用 silica gel은 Merck社의 것을 使用하였으며, polyphenol 標準品인 caffeic acid, chlorogenic acid, trans-p-coumaric acid, trans-p-ferulic acid 및 (+)-catechin과 BHT는 Fluka社의 것을 使用하였고, dl-α-tocopherol은 Sigma社의 것을 使用하였다. 基質油로는 市販 돼지기름을 column chromatography로 精製한 lard를 使用하였다.

抗酸化成分의 分割[22,23] phenol性 抗酸化 成分의 分割은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 행하였다. 즉 磨碎한 試料를 3각 플라스크에 옮겨 試料의 10倍量의 hexane을 가하여 2일간 常温에 放置하여 抽出하였다(3회 反復). 그 殘渣에 CH_2Cl_2를 가하여 2일간 保管한 후 抽出・濾過하였다(3회 反復). 여기서 얻어진 殘渣에 다시 70% methanol을 가하여 50℃의 水槽에서 3시간동안 抽出하였다. 각 抽出物에 질소가스를 注入하면서 rotary evaporator로 溶媒를 除去하였다. 특히 hexane과 CH_2Cl_2 抽出物을 濃縮 후 다시 眞空 데시케이터에 넣어 殘留溶媒를 완전히 除法하였다(Fr. H 및 Fr. C). Hexane 抽出物의 一部를 alkali로 加水分解하여 불감화물을 얻었다(Fr. H).

65g의 silica gel 60을 benzene-acetone(6 : 5, v/v)으로 slurry를 만들어 3.1×60cm유리컬럼에 채워 活性化시킨 다음, 3g 전후의 CH_2Cl_2 抽出物을 benzene-acetone(6 : 5, v/v)混合液으로 展開하면서 250ml씩 4

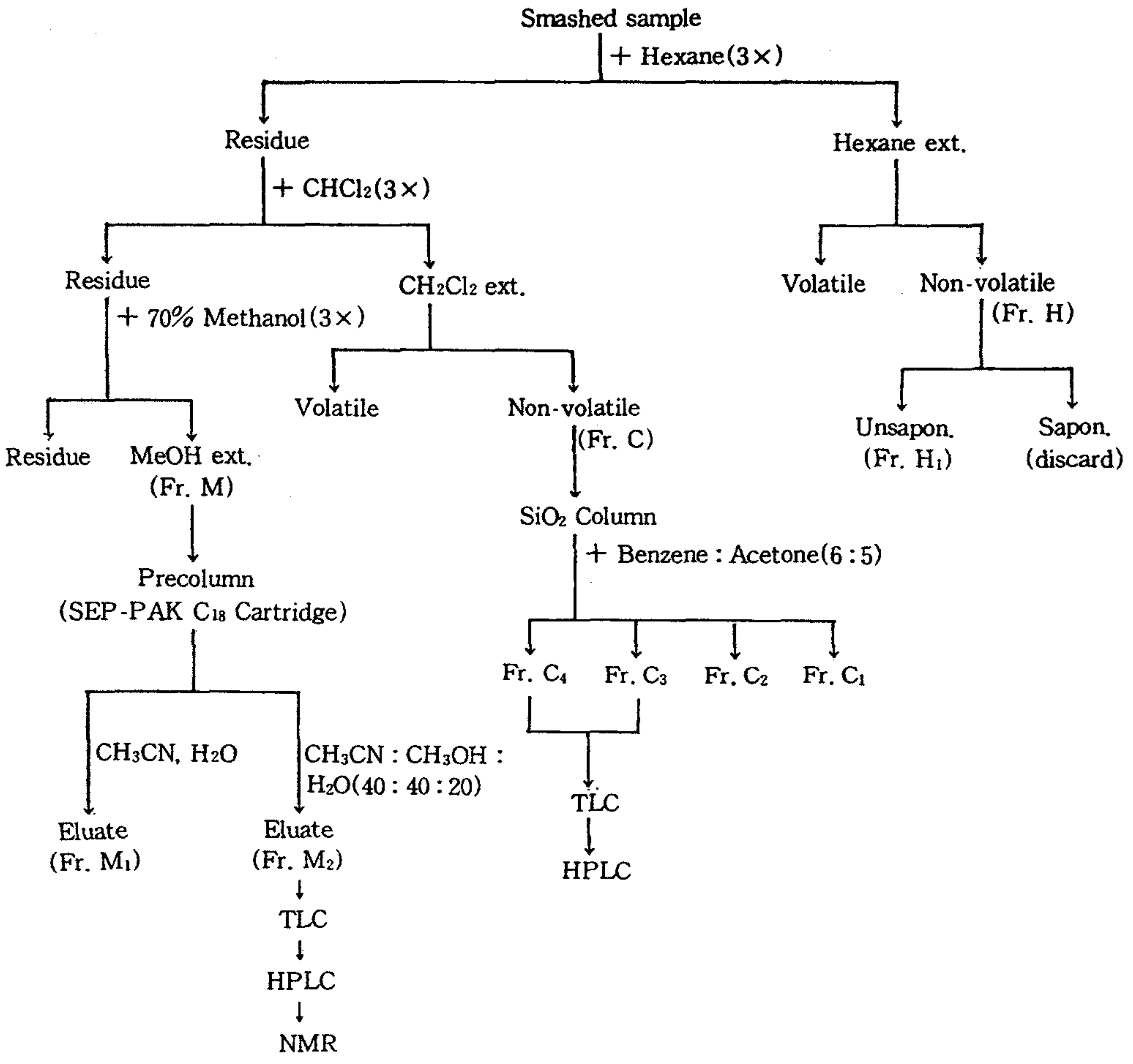

Fig. 1. Isolation procedure of phenolic antioxidants from the samples.

分割 (Fr. C_1, Fr. C_2, Fr. C_3, Fr. C_4)을 얻어 溶媒除去 후 그 抗酸化力을 調査하였다. 抗酸化性이 認定되는 分割은 다시 HPLC로 分析하였다.

70% methanol 抽出物을 SEP-PAK C_{18} Cartridge (Waters사)에 吸着시켜 CH_3CN과 H_2O로 反復하여 不純物을 除去(Fr. M_1)한 후 $CH_3CN : MeOH : H_2O$ (40 : 40 : 20, v/v/v)로 吸着된 物質을 溶離시켜(Fr. M_2) 溶媒除去 후 HPLC로 分析하였다.

3. 抗酸化力의 測定[34]

抗酸化力의 測定은 AOM(active oxygen method)으로 實施하였으며, 實驗裝置는 Kroll方法[35]에 따라 著者가 製作하였다. POV가 2meq/kg以下인 lard(18~20 g)을 POV 測定用 實驗管(2.8×30cm)에 옮기고 여기에 각 抽出物, 分割을 基質油에 대하여 0.01%, 0.02%, 0.1%가 되도록 添加하여 98.0℃의 oil bath상에서 2ml/sec의 깨끗한 壓縮空氣를 40時間 供給하였다. 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 그리고 33時間이 經過한 후, 이 基質油 1g을 정확히 취하여 200ml 共栓 3각 flask에 옮겨, CH_3COOH-chloroform(3 : 2, v/v)溶液 25 ml로 溶解시킨다. 다음에 KI 飽和 水溶液 0.25ml를 넣어 잘 흔든 후 증류수 500ml와 0.1% starch 指示藥 1~2방울을 가한다음 0.01N $Na_2S_2O_3$로 適定하였다. Control과 BHT를 添加한 比較實驗도 행하였다. POV가 100meq/kg에 到達하는 時間을 誘導期로 하였다.

Thin Layer Chromatography. 使用한 TLC plate는 Kieselgel 60 F_{254}(coated on DC-Alufolien, thickness 0.2mm)였으며, toluene-ethylformateformic acid(40

: 50 : 10, v/v/v)混合液으로 展開하였으며, I_2 chamber에 넣거나 또는 50% H_2SO_4로 噴霧 炭化하여 發色시켰다.

高速 液體 크로마토그래피(HPLC). 裝置는 Waters Model 4000을 使用하였고, 分析條件은 아래와 같다.

Column size : μ Bondapak C_{18}, 30cm×3.9mm(I.D)
Mobile phase : MeOH-0.33M Potassium phos phate-Acetic acid (40 : 59 : 1, pH 3.0)
Folw rate : 0.5ml/min
Detector : UV detector (at 280nm)

4. ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR

NMR 裝置는 Brücker AM-300(300MHz)이며, ^{13}C-NMR 測定時 使用한 溶媒는 DMSO-d_6였으며 이 溶媒의 δ_C 39.5ppm, δ_H2.5ppm을 基準으로 하여 각 signal의 δ_C와 δ_H를 나타내었다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 抗酸化 物質의 抽出

試料 種實의 hexane, dichloromethane 그리고 70% methanol 抽出物의 重量 %와 그 抗酸化力은 Table 1의 結果와 같다. 冬栢의 경우는 hexane 抽出物이 69.3%로 제일 많았고, 다음이 dichloromethane抽出物로 17.3%였으며, 70% methanol 抽出物은 6.3%로 제일 적었다. Hexane 抽出物이 全體 抽出物의 74.6%로 大部分을 차지한 것은 中性脂質이 冬栢 種實에 많이 含有되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 반면에 차나무 種實에서 上記 3溶媒로 抽出된 總 抽出物은 불과 7.4%에 지나지 않았다. 이 경우도 hexane 抽出物이 總 抽出物의 66.0% 제일 많았으며, dichloromethane 抽出物과 70% methanol 抽出物이 각각 27.5%, 6.5%였다.

각 抽出物을 基質油에 0.1%되게 添加하여 抗酸化力을 control과 比較하였더니, 70% methanol 抽出物과 dichloromethane 抽出物에는 抗酸化性이 認定되었으나, hexane 抽出物은 有意的인 抗酸化性을 나타내지 못하였다.

2. 抗酸化性 成分의 分劃

抗酸化性이 認定되지 않았던 hexane 抽出物(Fr. H)에 10% KOH-ethanol로 加水分解하여 감화물과 불감화물을 얻었는데, 감화물이 大部分이고 불감화물은 1.9~3.4%에 지나지 않았다. 이 불감화물을 基質油에 0.02%되게 가하여 抗酸化性을 調査하였더니 Table 2에서 보는 바와 같이 불감화물 部分(Fr. H_1)에 抗酸化性이 認定되었다.

Table 1. Antioxidative activity of the extracts from the seeds(0.1% to lard)

Extracts	Yield(%)		Induction period(hr.)	
	C[a]	T	C	T
Control			3.6	
Hexane(Fr. H)	69.3[b](74.6)	4.8(66.0)	3.9	4.0
CH_2Cl_2(Fr. C)	17.3 (18.6)	2.1(27.5)	6.4	8.3
70% MeOH(Fr. M)	6.3 (6.8)	0.5(6.5)	15.2	16.7
	(100 %)	(100 %)		

a) C, *Camellia japonica*
T, *Thea sinensis*
b) % to sample Wt

Dichloromethane 抽出物(Fr. C)을 silica gel column에 吸着시켜 benzene-acetone(6 : 5)混合液으로 展開하여 Fr. C_1, Fr. C_2, Fr. C_3와 Fr. C_4의 4分劃을 얻었다. 어느 種實의 抽出物에서나 Fr. C_2가 차지하는 比率이 39.8%, 32.7%로 4分劃중 제일 높았고, Fr. C_4는 11.5%와 6.5%로 제일 적었다. 抗酸化力은 Fr. C_3와 Fr. C_4分劃에서는 認定되었으나, Fr. C_1와 Fr. C_2에서는 전연 없었다(Table 2).

抽出物중 제일 抗酸化性이 강한 70% methanol 抽出物을 SEP-PAK C_{18} Cartridge에 注入하여 20ml의 acetonitrile과 H_2O로 反復 溶出시키고(Fr. M_1), 다음에 acetonitrile-methanol-H_2O(40 : 40 : 20)로 溶出시켜 Fr. M_2를 얻었다. Table 2에서 보는 바와 같이 pre-column을 通過한 recovery는 冬栢의 경우는 45.0%, 오차 種實의 경우는 61.0%였고 어느 경우에서나 抗酸化成分은 Fr. M_2에서 存在하였고, 그 抗酸化力이 오차 種實에서 보다 높았다.

3. 抗酸化性 分劃의 TLC

Fig. 2는 오차 種實의 抽出物에서 얻은 抗酸化性 分劃의 TLC gram이다. Fr. H_1은 Rf 0.98과 0.81의 2개 spot로 나누어졌는데, 前者는 中性脂質인 脂肪酸이나 sterol로 여겨지며 後者는 그 Rf치가 標準品인 dl-α-

Table 2. Level and antioxidative activity of some fractions classified from the seed extracts

	Yield				Introduction period(hr.)[e]	
	C. japonica Wt.(g)	%	*T. sinensis* Wt. (g)	%	*C. japonica*	*T. sinensis*
Control					3.6	
Fr. H_1[a]	0.95	1.9[d]	0.68	3.4	7.3	8.8
Fr. C_1[b]	0.76	21.9	0.54	18.6	3.5	-
C_2	1.38	39.8	0.95	32.7	3.7	3.6
C_3	0.53	15.3	0.71	24.4	12.1	9.3
C_4	0.40	11.5	0.19	6.5	11.3	10.5
Recovery	3.07	88.5	2.39	82.2		
Fr. M_1[c]	0.11	9.2	0.09	9.0	3.8	-
M_2	0.43	35.8	0.52	52.0	18.7	22.3
Recovery	0.54	45.0	0.61	61.0		

a) Level of unsaponifiable fraction recovered from the hydrolyzates of hexane extracts (500g for *C. japonica*, 20g for *T. sinensis*)
b) Column size ; 3.1 × 60cm, silica gel 60 amount ; 65g, Level of dichloromethane extracts mounted to column ; 3.47g for *C. japonica*, 1.0g for *T. sinensis*
c) Level of 70%-methanol extract loaded on column ; 1.2g for *C. japonica*, 1.0g for *T. sinensis*
d) Wt. % to applied amounts of each extract fraction
e) Level of the fractions added to lard is 0.02%

tocopherol의 그것과 一致하므로 tocopherol 混合體로 생각된다. Fr. C_3+C_4에서는 6개의 spot가 얻어졌는데, 4개 spot는 그 Rf치가 (+)-catechin, p-coumaric acid 그리고 p-ferulic acid의 그것과 一致하였고 Rf치가 0.70과 0.09인 spot는 同定할 수 없었다. Fr. M_1에서는 Rf치가 catechin과 一致하는 成分이 제일 많았으며, p-coumaric acid, chlorogenic acid 및 p-ferulic acid도 檢出되었다. 中川[37]은 paper chromatography로 오차잎 抽出物에서 catechin異性體를 包含하여 12종의 polyphenol을 分離한 바 있다.

冬栢의 경우에서도 Fr. C_3+C_4에서 chlorogenic acid, catechin, p-coumaric acid 그리고 p-ferulic acid의 Rf치와 一致하는 成分이 檢出되었으며, Fr. M_1에서는 위의 4成分외에 Rf 0.09와 0.06에 該當하는 2成分도 存在하였다.

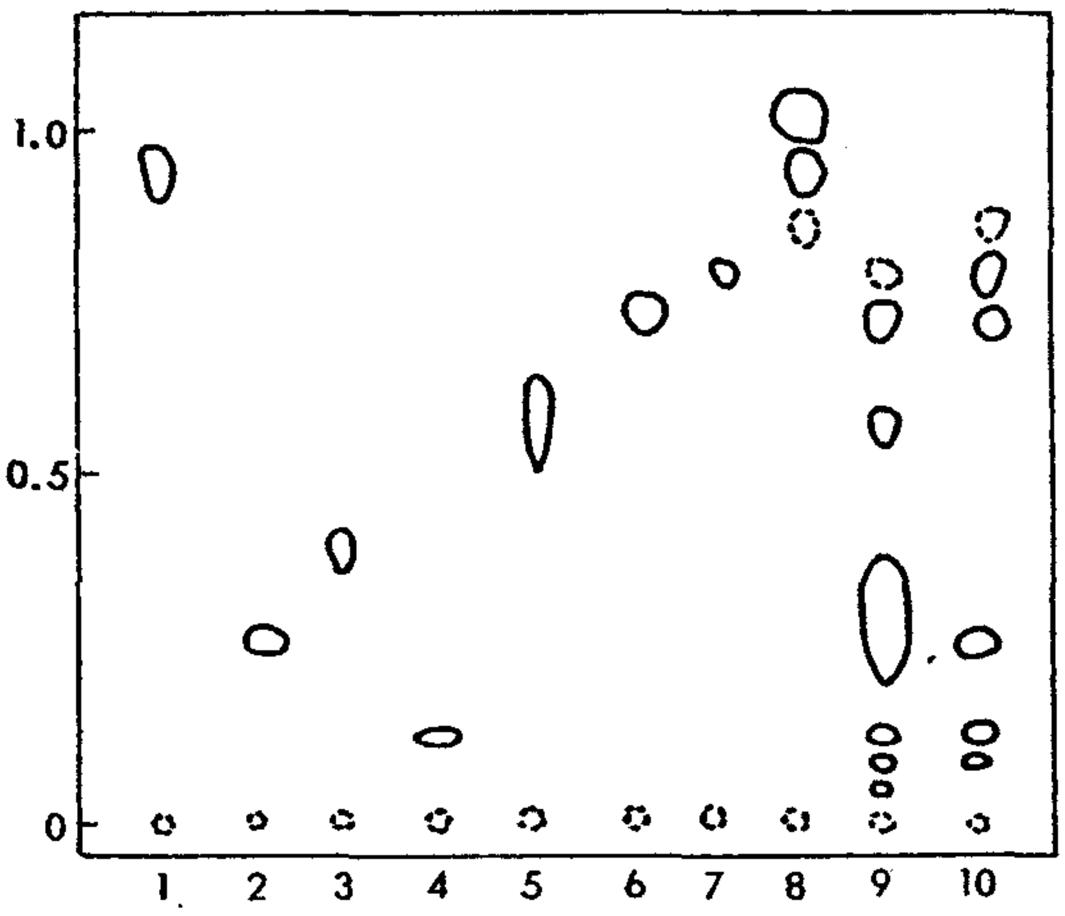

Fig. 2. TLC of Fr. H_1, Fr. C_3+C_4 and Fr. M_2 obtained from the extracts of *Thea sinensis*.

Plate : Kiesel gel 60 F_{254}(coated on DC-Alufolien, 0.2mm)
Solvent : Toluene / Ethylformate / Formic acid (40 : 50 : 20, v / v / v)

1. Dl-α-tocopherol
2. (+)-catechin
3. Gallic acid
4. Chlorogenic aicd
5. Caffeic acid
6. p-coumaric acid
7. p-ferulic aicd
8. Fr. H_1
9. Fr. M_2
10. Fr. C_3+C_4

4. 抗酸化性分의 HPLC

Fr. M_2를 HPLC로 分析하였더니 Fig. 3에서 보는 바와 같이 8개의 peak가 分離되었다. Peak 1, 2, 5, 7 및 8은 각각 caffeic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, trans-p-coumaric acid와 trans-p-ferulic acid

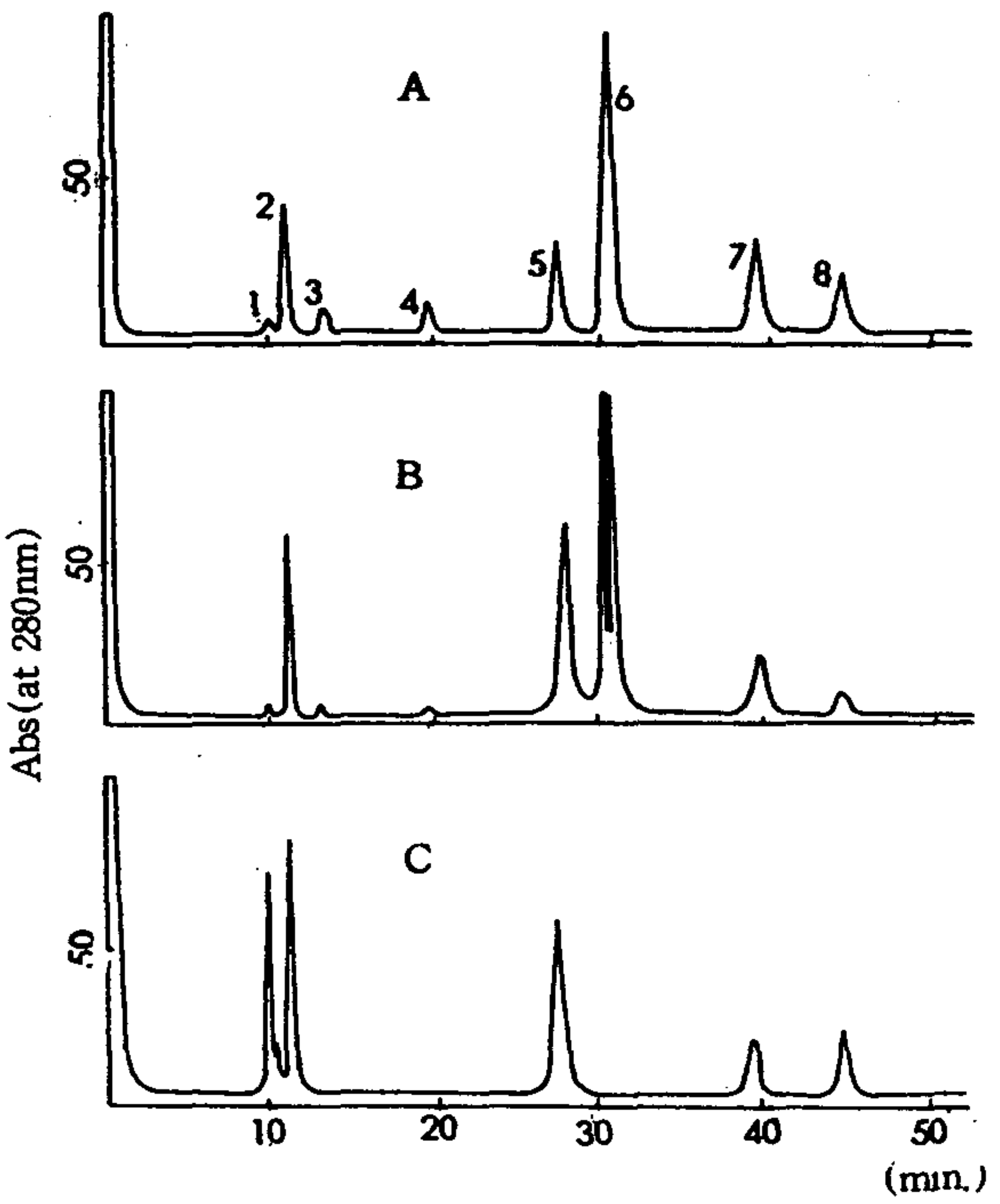

Fig. 3. HPLC of Fr. M_2 obtained from the seeds of *Camellia japonica* and *Thea sinensis*.

A : *C. japonica* B : *T. sinensis* C : *Authentic*

1. Caffeic acid
2. Chlorogenic acid
3. 4-0-Caffeoylquinic acid (?)
4. Isochlorogenic acid
5. (+)-Catechin
6. ?
7. Trans-p-coumaric acid
8. Trans-p-ferulic acid

로 여겨지며, Peak 3, 4는 4-*o*-caffeoylquinic acid와 isochlorogenic acid로 생각되나 이 以上의 同定은 할 수 없었다. 含量이 가장 많은 peak 6의 分劃을 모아 溶媒 除去 후 benzene, chloroform으로 再結晶하여 NMR로 그 構造를 決定하였다. 한편 Fr. C_3+C_4에서는 7개의 peak가 檢出되어, 그 構成成分이 Fr. M_2의 그것과 비슷하였으나 caffeic acid는 전연 存在하지 않았다.

Table 3은 抗酸化性 分劃의 HPLC上에 나타난 각 peak를 分取하여 그 組成을 重量比로 나타낸 것이다. Fr. M_2의 組成을 보면 peak 6인 未同定 成分이 오차 種實에서 52.7%로 제일 많았고, (+)-catechin이 21.8%, trans-p-coumaric acid가 11.0% 그리고 chlorogenic acid가 10.2%였다. 한편 冬栢 種實에서도 peak 6이 33.1%로 제일 많았으며, trans-p-coumaric acid와 trans-p-ferulic acid가 17.4%와 15.8%로 서로 비슷하게 含有되어 있었고, (+)-catechin이 12.7% 存在하여 2種實間에 組成上의 差異가 뚜렷하였다. 2種實의 Fr. C_3+C_4의 成分組成을 보면 trans-p-coumaric acid와 trans-p-ferulic acid가 약 70~84%로 大部分을 차지하였다.

이러한 結果로 보아 Fe. M_2가 Fr. C_3+C_4에 비하여 抗酸化性이 뛰어난 것은 未同定 物質인 peak 6의 含量이 많은 것 때문이 아닌가 생각된다.

Table 3. Content of each component separated on HPLC

Peak component No.	Content			
	C. japonica		*T. sinensis*	
	Fr. C_3+C_4 mg %	Fr. M_2 mg %	Fr. C_3+C_4 mg %	Fr. M_2 mg %
1. Caffeic acid	tr.[c]		tr.	
2. Chlorogenic acid	16.8 (9.3)	12.15(10.5)	1.5[b] (0.6)	15.1(10.2)
3. 4-ō-Caffeoyl quinic acid(?)	tr.	4.0 (3.4)	tr.	tr.
4. Isochlorogenic acid(?)	tr.	5.1 (4.3)	5.6(2.3)	tr.
5. (+)-Catechin	15.4(8.5)	15.1(12.7)	14.3(5.9)	32.3(21.8)
6. Unknown	22.6(12.5)	39.4(33.1)	17.7(7.3)	78.0(52.7)
7. Trans-P-coumaric acid	67.0(37.0)	20.7(17.4)	111.3(45.8)	16.3(11.0)
8. Trans-P-ferulic acid	59.2(32.7)	18.8(15.8)	92.6(38.1)	6.4(4.3)
	181.0(100)	115.6(100)	243.0(100)	148.1(100)

a) Applied amount ; 223.5mg for Fr. C_3+C_4, 144.3mg for Fr. M_2
b) Applied amount ; 307.6mg for Fr. C_3+C_4, 189.4mg for Fr. M_2
c) Tr. ; trace

5. 未同定 物質 NMR[30,32)]

Fig. 4와 Table 4는 未同定物 peak 6의 ^{1}H-와 ^{13}C-NMR의 data이다. 이 ^{1}H-와 ^{13}C-NMR의 data에서 이 物質은 $C_{15}H_{14}$-Y임을 쉽게 알 수 있다. ^{13}C-NMR에서 δ_c 144.0과 δ_c 144.2ppm에서 singlet로 나타난 共鳴 signal은 benzene環에 –OH 또는 –O–가 ortho位置로 結合한 2개의 炭素에 의한 것이고, 또 δ_c 155.3, 155.9와 156.1ppm에서의 singlet는 –OH 또는 –O–가 meta trisubstituted한 benzene 炭素의 resonance signal이므로 이 物質은 적어도 2개의 benzene環을 가지고 있음을 쉽게 생각할 수 있다. δ_H 7.70~8.12ppm에서 broad하게 共鳴하는 4H는 D_2O로 置換하면 그 signal이 消失되므로 이 proton들은 benzene環에 置換되어 있는 –OH基의 proton으로 생각할 수 있으며, δ_H 5.78~6.62 ppm(4H)는 benzene環의 =CH–에 의한 것이며, δ_H 3.53ppm에서 共鳴하는 signal도 –OH의 proton에 의한 것이다.

δ_H 4.01과 4.69ppm에 共鳴하는 signal에서 2개의 –O–CH–基의 存在를 推定할 수 있으며, 또 δ_c 64.2와 77.5ppm에서의 共鳴 signal이 doublet로 나타나므로–O–CH–의 存在는 確實하다. δ_H 2.43과 2.64ppm의 proton의 共鳴 signal은 상당히 큰 coupling constant (J=16.5)로 생각되므로 이 2 proton은 geminal proton으로 생각되며, 이 proton 둘은 다시 각각 J=4.4와 J=3.0으로 再 splitting되는데 이것은 δ_H 4.01ppm에서 共鳴하는 proton의 coupling 때문인 것으로 생각할 수 있다.

δ_H 6.62ppm에서 共鳴하는 2개의 proton은 그 coupling constant(J=8.1)로 보아 benzene環에 ortho 位置

Table 4. Assignment of ^{1}H- and ^{13}C-NMR signals to H- and C-atom of the unknown antioxidative compound (peak 6)

Location	δ H[a)]	δ C[b)]
2	4.69 (d, 1H, J=1.3)	77.5(d)
3	4.01 (sext, 1H, J=4.4, 3.0, 1.3)	64.2(d)
4	2.43 (q, 1H, J=16.5, 4.4)	27.8(t)
	2.64 (q, 1H, J=16.5, 3.0)	
		156.1(s)
6	5.91 (d, 1H, J=2.3)	94.7(d)
7		155.9(s)
8	5.78 (d, 1H, J=2.3)	93.7(d)
9		155.3(s)
10		97.9(s)
1'		130.1(s)
2'	6.87 (d, 1H, J=2.1)	114.3(d)
3'		144.2(s)
4'		144.0(s)
5'	6.62 (d, 1H, J=8.1)	114.5(d)
6'	6.62 (q, 1H, J=8.1, 2.1)	117.3(d)
	3.53 (–OH)	
	7.70 – 8.12[broad, 4X(–OH)]	

a,b) Chemical shifts are shown relative to an internal standard(DMSO-d_6)

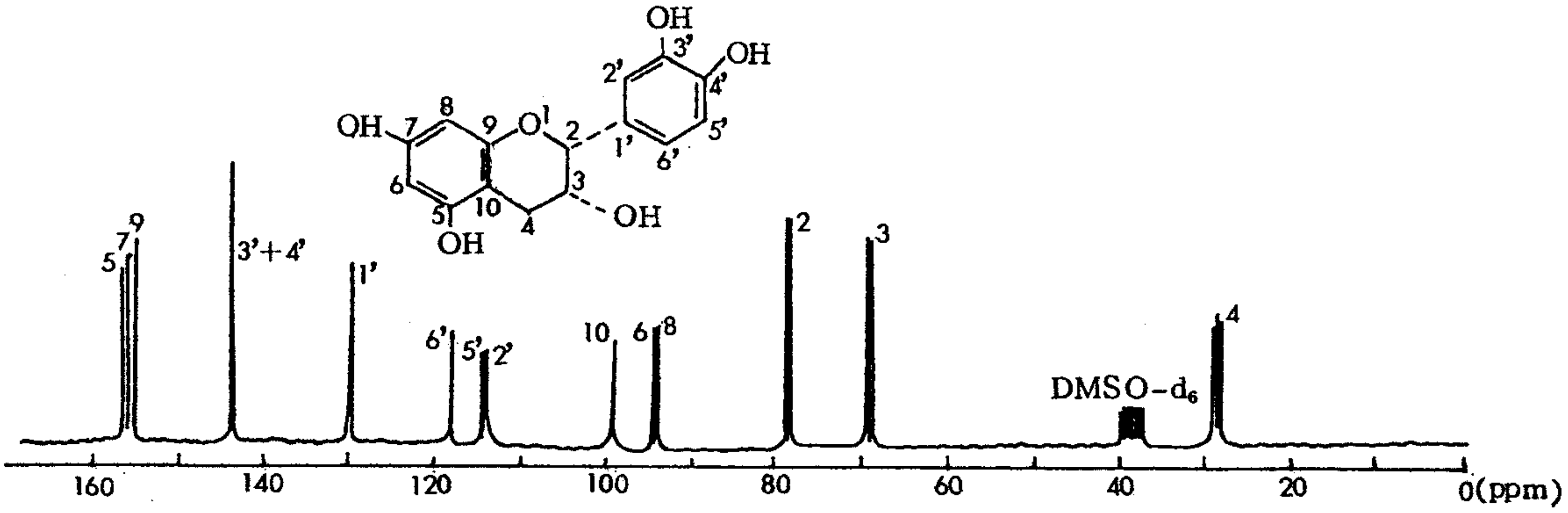

Fig. 4. ^{13}C-NMR spectra of a unknown antioxidative compound from the seed of *T. sinensis*.

The spectrum was measured with a Brücker AM-300 at 75.5MHz
Solvent : Dimethyl sulfoxide-d_6(DMSO-d_6)

로 存在하며, 이 共鳴 signal은 다시 J=2.1로 splitting 하므로 그중 어느 하나의 proton이 δ_H 6.87(J=2.1)에서 共鳴하는 proton과 meta位置에 있다는 것을 알 수 있다. 또 δ_H 5.78과 5.91ppm에서 共鳴하는 proton은 서로의 chemical environment가 相異하며, 2 proton 모두가 J=2.3으로 splitting하므로 서로가 meta位置에 存在함을 알 수 있다.

δ_H 4.01ppm에서 共鳴하는 proton은 J=4.4로 splitting되므로 δ_H 2.43ppm의 proton(J=4.4)과 coupling하고 δ_H 4.01과 δ_H 4.69ppm의 proton도 coupling constant(J=1.3)가 서로 같으므로 相互 coupling하고 있음을 알 수 있다. 따라서 이 3 proton은 δ 4.01ppm에서 共鳴하는 proton을 사이에 두고 서로 隣接하고 있음을 알 수 있다.[31] Vicinal位置에 있는 δ_H 4.01과 δ_H 4.69 ppm에서 共鳴하는 2개의 proton의 coupling constant (J=1.3)가 매우 작으므로 Karplus equation[31]에 따라 이 proton들은 axial-equatorial conformation에 가깝게 orient되어 있다고 생각된다.

以上의 結果로 부터 peak 6의 未同定物質은 Fig. 4에 題示한 바와 같은 構造를 가지는 epicatechin으로 推定된다. peak 3, 4는 그 構造를 同定하지 못하겠다.

6. 抗酸化 成分의 抗酸化力

冬栢과 차나무 種實의 重要한 抗酸化 成分은 (+)-catechin, epicatechin, chlorogenic acid, p-ferulic acid 및 p-coumaric acid라고 볼 수 있다. 冬栢 種實에서 얻은 抗酸化 成分들과 産業的으로 널리 實用되고 있는 BHT, dl-α-tocopherol을 lard에 添加하여 AOM法으로 그 抗酸化力을 比較한 結果는 Table 5와 같다.

Epicatechin, catechin과 chlorogenic acid는 BHT나 dl-α-tocopherol보다 훨씬 뛰어난 效果를 나타내었으며, epicatechin이 catechin보다 優秀하였다. 이러한 結果는 Hirose[34]의 結果와 비슷하였다.

Hayase[33]는 고구마중에 存在하는 chlorogenic acid는 抗酸化力이 매우 弱하며, 고구마의 強한 抗酸化性은 chlorogenic acid, isochlorogenic acid와 같은 遊離 狀態의 polyphenol 成分이 아니고, 다른 어떤 抗酸化 成分이 아니면 아미노酸과 結合한 polyphenol類의 synergyst 效果 때문이라 하였다. 또 Pratt도 1965년에 發表한 報告[38]에서 大豆에서 얻은 chlorogenic acid는 抗酸化 效果가 없다고 하였다. 그러나 그는 1976년의 論文[39]에서는 認定할 만한 抗酸化力이 있었다고 하였고, 또 Naito等[40]은 cacao껍질에서 얻은 chlorogenic acid는 catechin과 함께 強한 抗酸化 效果가 있다고 報告하였다. 이런 差異는 相異한 抗酸化 測定方法, 基質油에 添加하는 量의 差異와 抗酸化 成分의 純度 등에 起因하는 것으로 생각된다.

P-ferulic acid와 p-coumaric acid는 BHT보다 抗酸化力이 낮았으나 dl-α-tocopherol과 비슷하였으며, p-ferulic acid가 p-coumaric acid의 抗酸化力보다 약간 높았다.

Table 5. Comprision of antioxidative activity of the main components separated on HPLC(Fr. M_2 from *C. japonica* seed)

Component	Induction period(hr.)	
	0.01%[a]	0.02%
Control	3.6	
BHT[b]	19.5	23.8
Dl-α-tocopherol[b]	9.8	10.1
Chlorogenic acid[b]	23.4	43.7
Chlorogenic acid from, the seed	22.9	43.1
(+)-Catechin[b]	25.0	46.2
Catechin from the seed	24.6	45.8
Epicatechin from the seed	28.7	50.1
Trans-p-coumaric acid[b]	10.8	17.5
Trans-p-coumaric acid from the seed	10.0	17.3
Trans-p-ferulic acid[b]	12.3	21.4
Trans-p-ferulic acid from the seed	11.7	20.9

a) Amount added to lard
b) Authentic

文 獻

1. 太田靜行 : 油化學, **14**, 748(1965)
2. 太田靜行 : 油化學, **17**, 1(1968)
3. 加藤秋男 : 油化學, **19**, 620(1970)
4. 宮川高明 : 油化學, **14**, 662(1965)
5. Vladimirov, E. : *Advanced Lipid Research*(ed. by Paoletti, R. and Kritchevsky), Academic Pre-

ss, New York, 173~249(1980)

6. Tappel, A.L. : *Fed. Proc.*, **32**, 1870(1973)
7. Rice-Evans, C. and Hochstein, P. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **100**, 1537(1981)
8. Little, C and O'Brien, P.L. : *Biochem. J.*, **83**, 106(1968)
9. Lewis, S.E and Wills, E.D. : *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 901(1962)
10. Schauenstein, E. : *J. Lipid Res.*, **8.**, 417(1967)
11. Adam-Vizi, V. and Seregi, A. : *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2231(1982)
12. 吉岡倭子・金田尙志 : 油化學, **23**, 321(1974)
13. 日本藥學會 : 衛生試驗法注解, 金原出版社, 東京, **345**(1980)
14. Kramer, R.E. : *J. Am. Oil. Soc.*, **62**(1), 111 (1985)
15. 石川行弘・守本京三・井關重康 : 油化學, **33**(12), 35(1984)
16. 太田靜行 : 油脂食品の劣老化とその防止, 幸書房, 東京, **118~126**(1977)
17. Fusio, H. : *New Food Industry*, **11**(8), 25(1969)
18. 木村雄吉・湯上 進・齊藤 浩 : 食品工業, **14**(2), 57(1971)
19. Brieskorn, C. H., Fuchs, A., Bridenberg, J. B., McChesney, J. D. and Wenkert, E. : *J. Org. Chem.*, **29**, 2293(1964)
20. Brieskorn, C. H. and Doemling, H.J.: *Zeit. Lebensm. Unter. Forsch.*, **141**, 10(1969)
21. Brieskorn, C. H. and Doemling, H.J. : *Arch. der Pharmazie*, **302**, 641(1969)
22. Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. and Seto, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1661(1982)
23. Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 353(1983)
24. Nakatani, N. and Inatani, R. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 353(1983)
25. Houlihan, C.M., Ho, C.T. and Chong, S.S. : *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **62**, 96(1985)
26. 임경빈 : 특용수 재배학, 향문사, 서울, 286~287 (1983)
27. Izawa, B. : *Illustrated Cyclopedia of Medicinal Plants of Japan*, Seibundo-Shinkosha, Tokyo, 159~160(1980)
28. 송주택・정현배・진희성 : 한국 자원식물, 미도문화사, 서울, 650~651(1983)
29. Hee Ryeng Lim, Eun Jin Choi, Seong Jin Kim and Yong Goe Joh : *J. Korean Oil Chem. Soc.*, (in press)
30. Silverstein, R. M., Bassler, G, C., and Morill, T.C. : *Spectrometric Identification of Organic Compounds*(4th ed.), John Wiley & Sons, New York, 181~238(1981)
31. Williams, D.H., and Fleming, I. : *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, McGraw-Hill, London, 104~108(1966)
32. Günther, H. : *NMR Spectrosocopy*, John Wiley & Sons, New York, 359~379(1980)
33. Hayase, F. and Kato, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 37(1984)
34. Hirose, Y. and Iwama, F. : *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*, **33**, 435(1984)
35. Pardum, H. and Kroll, E. : *Fette. Seifen Anstrichmittel*, **76**, 336(1972)
36. Egger, K. : *Thin Layer Chromatography*(ed. by Stahl. E), Springer-Verlag, Berlin, 694~699 (1969)
37. 中川致之 : 茶試硏報, **6**, 65(1970)
38. Pratt, D, E. : *J. Food Sci.*, **39**, 737(1965)
39. Pratt, D.E. : *Autoxidation in Food* and *Biological Systems*(ed. by Simic, M.G.), Plenum Press, New York, **288**(1979)
40. Naito, S., Yamaguchi, N. and Yokoo, Y. : *J. Jp. Soc. Food Sci. Technol.*, **29**, 529(1982)