

芸香科(운향과) 植物 種實의 抗酸化性 物質에 관한 研究

金成眞 · 金智修 · 趙鏞桂

東亞大學校 食品營養學科

Studies on the Antioxidative Substances in the Seeds of the *Rutaceae* Family

Kim, Seong-Jin · Kim, Ji-Soo · Joh, Yong-Goo

Dept. Food Science & Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

(Received May 30, 1994)

ABSTRACT

Some seeds of the *Rutaceae* family, *Zanthoxylum piperitum*, *Z. schinifolium*, *Evodia officinalis*, *Poncirus trifoliata*, *Citrus unshiu*, were investigated to clarify their antioxidative components. Finely powdered samples were extracted by hexane, followed by dichloromethane and then 70% methanol in a hot bath. Its unsaponifiables containing α - and γ -tocopherol with trace amount of β - and δ -tocopherol, also showed comparatively weak activity, although the hexane fraction itself had no significant antioxidative effect on lard. Levels of total tocopherols in the samples averages 42.24~154.11 mg/100g total extractives. The dichloromethane- and 70% methanol extractives showed strong antioxidative activity, from which antioxidative substances were purified with benzene-acetone (6:5, V/V) on a silica gel column, and with a solvent mixture of acetonitrile-methanol-H₂O (40:40:20, V/V/V) on a Sep-Pak C₁₈ hydrolyzed by 5% KOH-ethanol. The recovered unsaponifiables were, then, separated on a column of high performance liquid chromatography. The unsaponifiables produced by hydrolysis of the isolates from dichloromethane extractives has epi-catechin (40.0~57.1%) and (+)-catechin (19.1~24.4% to total phenolic substances, on area base) as major component, accompanied by chlorogenic acid, gallic acid(?), *trans-p*-coumaric acid and *trans-p*-ferulic acid including some unknown components, and those derived from 70% methanol extractives also comprise (+)-catechin (31.3~39.6% to total components, on area base), epi-catechin (20.2~36.4%), *trans-p*-coumaric acid (8.4~15.3%) and *trans-p*-ferulic acid (7.7~14.1%) as predominant component with some minor components, but the fraction supposed to be gallic acid(?) is not present. The antioxidative activities of the phenolic components isolated in this work were in order of epi-catechin > catechin > chlorogenic acid > *trans-p*-ferulic acid > *trans-p*-coumaric acid.

* 본 논문은 1991년도 주식회사 미원 부설 한국음식문화연구원의 연구비의 일부로 이루어졌음을 밝혀둔다.

I. 序 論

油脂酸化로 生成된 過氧化物과 그 分解產物은 食品의 風味나 營養價를 떨어뜨리고, 심한 毒性을 나타내어¹⁻³⁾ 肝組織의 壞死, 細胞膜의 破壞로 인한 細胞障導를 가져오기도 하며,⁴⁻⁶⁾ 또 mitochondria의 여러 酵素를 不活性化하여 老化를 促進한다고 한다.⁷⁻¹⁰⁾

최근 油脂를 原料한 加工食品이 늘어남에 따라, 製品의 貯藏性을 높이기 위하여 抗氧化劑의 使用이 急激히 增加하고 있는데, 그 大部分이 BHA, BHT 및 TBHQ와 같은 人工 抗氧化劑이다. 人工 抗氧化劑는 實驗動物의 體重減少와 肝의 肥大症을 일으키고 過量投與時는 發癌과 畸形兒 形成 因子가 될 수 있다고 하여,¹¹⁻¹⁵⁾ 그 使用量을 嚴格히 規制하고 있다. 따라서 食品油脂의 安全性을 높이고 同時에 人體에 아무런 害를 미치지 않는 抗氧化劑의 開發이 要求되고 있다.

Vitamin E¹⁶⁾가 발견된 이래, gossypol, sesamol, quercetin, chlorogenic acid와 같은 抗氧化劑가 植物體에서 分離되었고, 最近에는 Fusio²⁰⁾가 食品의 調味料로 利用되는 nutmeg, thyme, clove의 精油成分에 抗氧化性이 강한 物質이 存在한다고 하였고, Fenton²¹⁾은 油菜粕에서 caffeic acid와 같은 抗氧化性 polyphenol化合物을 分離하였다. 木村²²⁾는 唇形科 植物인 rosemary와 sage에 강한 抗氧化劑가 存在한다고 報告하였다. Brieskorn²³⁻²⁵⁾은 sage(*Salvia officinalis* L.) 잎에서 carnosol, carnosic acid 및 royleanone과 같은 抗氧化劑를 分離하였고, Inatani 등^{26, 27)}은 rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.)에서 carnosol, rosmanol, rosemadial을 分離하였다. 또 Houlihan²⁸⁾도 rosemary에서 rosemariquinone과 rosmaridiphenol을 分離·同定하여 강한 抗氧化性이 있음을 確認하였다. Hayase²⁹⁾는 고구마에서 phenolic 抗氧化成分인 caffeic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid와 4-o-caffeoylquinic acid를 分離하였으며, Hirose³⁰⁾는 葡萄씨에서 catechin類를 分離하였는데 이들은 모두 강한 抗氧化性을 가졌다고 하였다. 金等³¹⁾ 冬栢 및 오차씨의 70% methanol 및 dichloromethane 抽出物에서 抗氧化力을 가진

epi-catechin, (+)-catechin, *p*-coumaric acid, *p*-ferulic acid와 chlorogenic acid를 分離한 바 있다.

芸香科 植物로는 초피, 산초, 머귀, 쉬나무, 오수유, 탕자, 橘, 柚子 등을 들 수 있으며, 우리나라에는 15種 棲息한다고 한다. 이 植物의 잎과 열매는 健胃, 通風, 解毒劑로 漢方에서 利用되는 것이 많고, 또 香辛料로도 利用되고 있다. 香辛料에는 抗氧化性 物質이 存在하는 경우가 많고, 芸香科 植物種子에서 抽出한 粗脂質에, 種類에 따라 差異는 있으나 linoleic acid와 같은 不飽和脂肪酸이 相當量 含有되어 있으며, 長期間 貯藏하여도 그 組成에는 變化가 없었다고 한다.³²⁾ 이러한 事實로 미루어 이들 種子에 강한 抗氧化成分이 存在가 豫測되나, 산초³³⁾를 除外한 芸香科 種子들의 抗氧化成分에 관한 研究는 意外로 적다.

著者は 芸香과 植物 중 산초, 초피, 오수유, 탕자와 夏橘 種子의 抗氧化性에 관한 몇가지 實驗을 遂行하였으므로, 그 結果를 여기에 報告하고자 한다.

II. 材料 및 實驗方法

1. 材 料

산초, 오수유, 탕자씨와 초피는 1991년 1월에 釜山 凡一洞 漢藥 材料商에서 購入하였고, 夏橘씨는 같은 해 7월에 濟州市 南門市場에서 購入한 夏橘에서 摘出하여 乾燥한 後 實驗材料로 使用하였다.

2. 試 藥

抽出溶媒와 column chromatography用 溶媒로는 東洋化學工業社(株)(서울)의 1級品을 本 實驗室에서 再蒸溜한 것을, HPLC用 溶媒는 Merck社 HPLC-grade의 것을 使用하였다. α -tocopherol, γ -tocopherol은 Sigma社에서, β -tocopherol과 δ -tocopherol은 Merck社에서 각각 購入하여 使用하였다. Polyphenol 標準品인 caffeic acid, chlorogenic acid, *trans-p*-coumaric acid, *trans-p*-ferulic acid 및 (+)-catechin과 BHT는 Fluka社에서 購入하여 使用하였고, epi-catechin은 冬栢油에서 分離한 것을 利用하였다.³¹⁾ 抗氧化性 實驗에 使用한 基質油인 lard는 市販되는 豚脂에서 column chromatography로 精製한 triglyceride를 代用하였다.³⁰⁾

3. 實驗方法

1) 試料의 水分含量과 抗酸化成分의 抽出^{30, 31)}

試料의 水分含量은 moisture analyzer(Sartorius 社, Model MA50)로 測定하였고, 抗酸化成分의 抽出은 Fig. 1에 表示한 方法에 따라 實施하였다. 즉, 試料(400~480g)를 hexane으로 3回 抽出하여 그 抽出物을 모은 다음 溶媒를 rotary vacuum evaporator로 除去한 後(Fr. A), 眞空 desiccator에 넣어 眞空 pump로 殘存 溶媒를 完全히 없애고, 그 一部는 抗酸化 成分의 存在 有無 test에 使用하고 나머지는

5% KOH-ethanol 溶液으로 加水分解하였다. 이 加水分解物을 分液 釜에 옮겨 蒸溜水와 hexane을 가하여 shaking한 後 不溶物을 hexane層으로 回收하여 減壓 濃縮하였고(Fr. A₁), 또 水層에 3N 鹽酸을 가하여 酸性化한 後 diethyl ether로 溶劑를 抽出하여 溶媒를 除去하였다(Fr. A₂). 各 分割의 一部를 취하여 그 抗酸化力을 調査하였고, 抗酸化 成分이 存在하는 分割을 hexane에 녹여 Sep-Pak silica cartridge로 1次 精製 後 50ml/容 volumetric flask에 定容한 다음, normal-phase column을 裝着한 HP-LC로 分析하였다. Tocopherol 定量은 Fig. 2에 나타

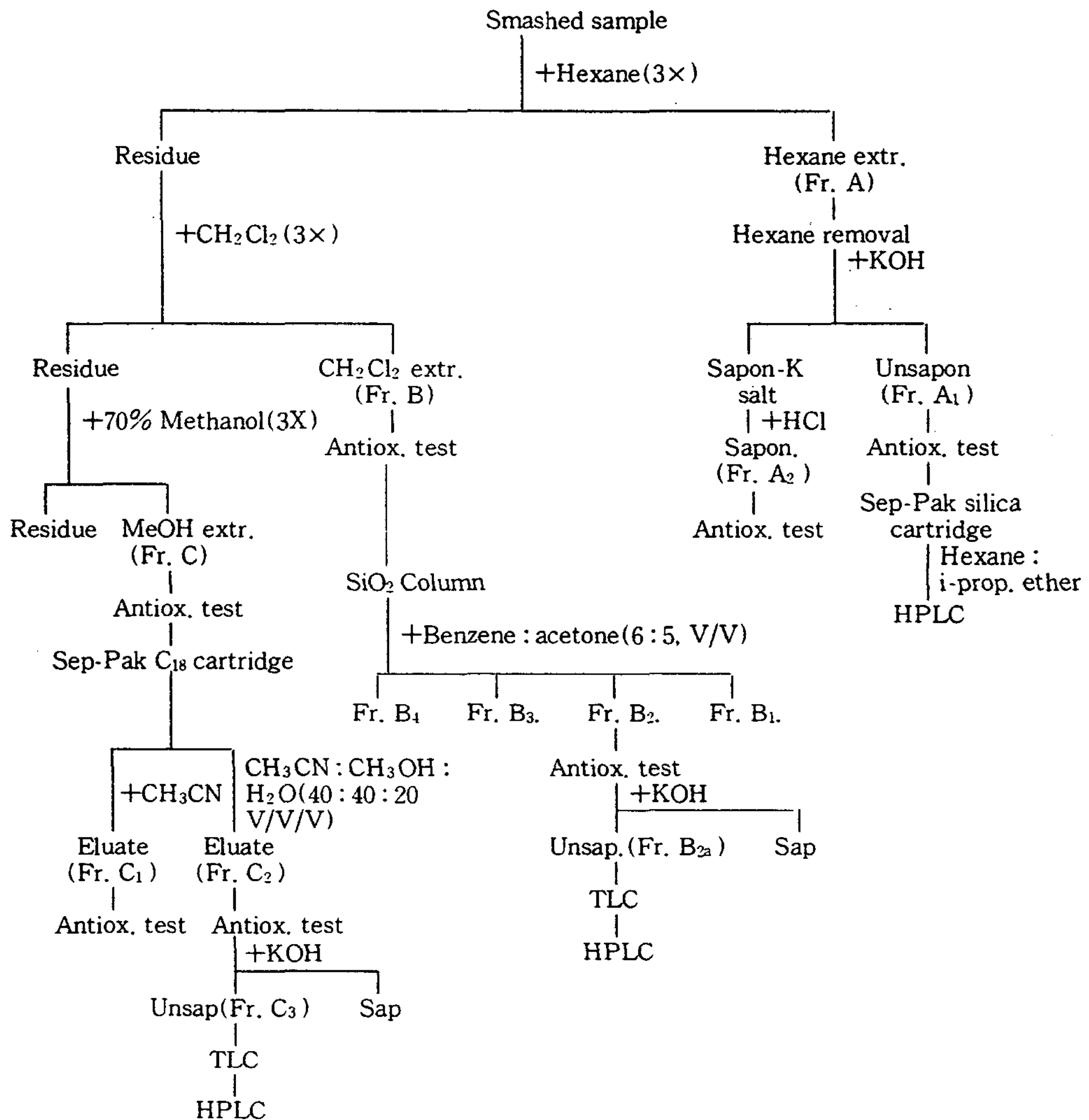


Fig. 1. Isolation Procedure of Antioxidants from the Samples.

낸檢量線에準하여實施하였다.³⁴⁾ Hexane抽出後 남은殘渣에 dichloromethane을가하여2日間冷藏庫에保管하면서抗酸化成分이滲出토록하였다(3回反復)(Fr. B). 이殘渣에3倍量의70% methanol을가하여70℃의water-bath에서2時間加熱하여methanol抽出물을얻었다(3回反復)(Fr. C) 이렇게하여얻은dichloromethane分劃과methanol分劃도rotary vacuum evaporator로溶媒를除去한 다음,眞空 desiccator로殘存溶媒를 완전히 없앤後,各分劃에서一部를 취하여抗酸化力を調査하였다.

各試料의餘分의dichloromethane分劃에서약2~3g을 취하여平衡을이룬 silica gel column(column size:1.8×29cm, Silica Gel 60:35g)에吸着시켜 benzene-acetone(6:5, V/V)混合溶媒로展開하면서20mL씩分取하여4分劃(Fr. B₁~B₄)을 얻어 그抗酸化力を調査하였다. 또70% methanol抽出物(500mg以下)을 Sep-Pak C₁₈ cartridge(Waters社)에吸着시켜 acetonitrile 30mL가하여 Fr. C₁를 acetonitrile:methanol:H₂O(40:40:20, V/V/V)混合液30mL로吸着된 나머지物質을溶出시켰다(Fr. C₂). 얻어진2分劃의溶媒를 완전히除去한後各分劃에서一部 취하여抗酸化性有無를調査하였다. Dichloromethane과 methanol抽出物의分劃中抗酸化成分이存在하는分劃을5% KOH-ethanol溶液으로加水分解하여 hexane으로不溶化物를回收하여 polyphenol 標準品과 TLC상에 co-running하여 polyphenol 化合物의存在를確認하고, 이化合物들을 HPLC의 reverse-phase column으로相互分離하였다.

2) 各分劃의酸化力比較實驗³⁰⁻³¹⁾

POV가 2meq./kg以下인 lard 2~12g을 POV測定用試驗管(20×2.5cm)에 옮기고 여기에各分劃物을基質油에 대하여0.01%, 0.02%, 0.1%가 되도록添加하여70℃로調節된 oil bath상에서濾過·除濕된空氣를20mL/min.로(廢 gas-liquid chromatography 裝置의流路를利用)72時間供給하였다.實驗始作後4時間間隔으로1g前後의基質油를正確히稱量하여250mL容마개달린3角 flask에 옮긴 다음 CH₃COOH-chloroform(3:2, V/V)溶液25mL로溶解시켰다. 여기에 KI 飽和水溶液0.25mL

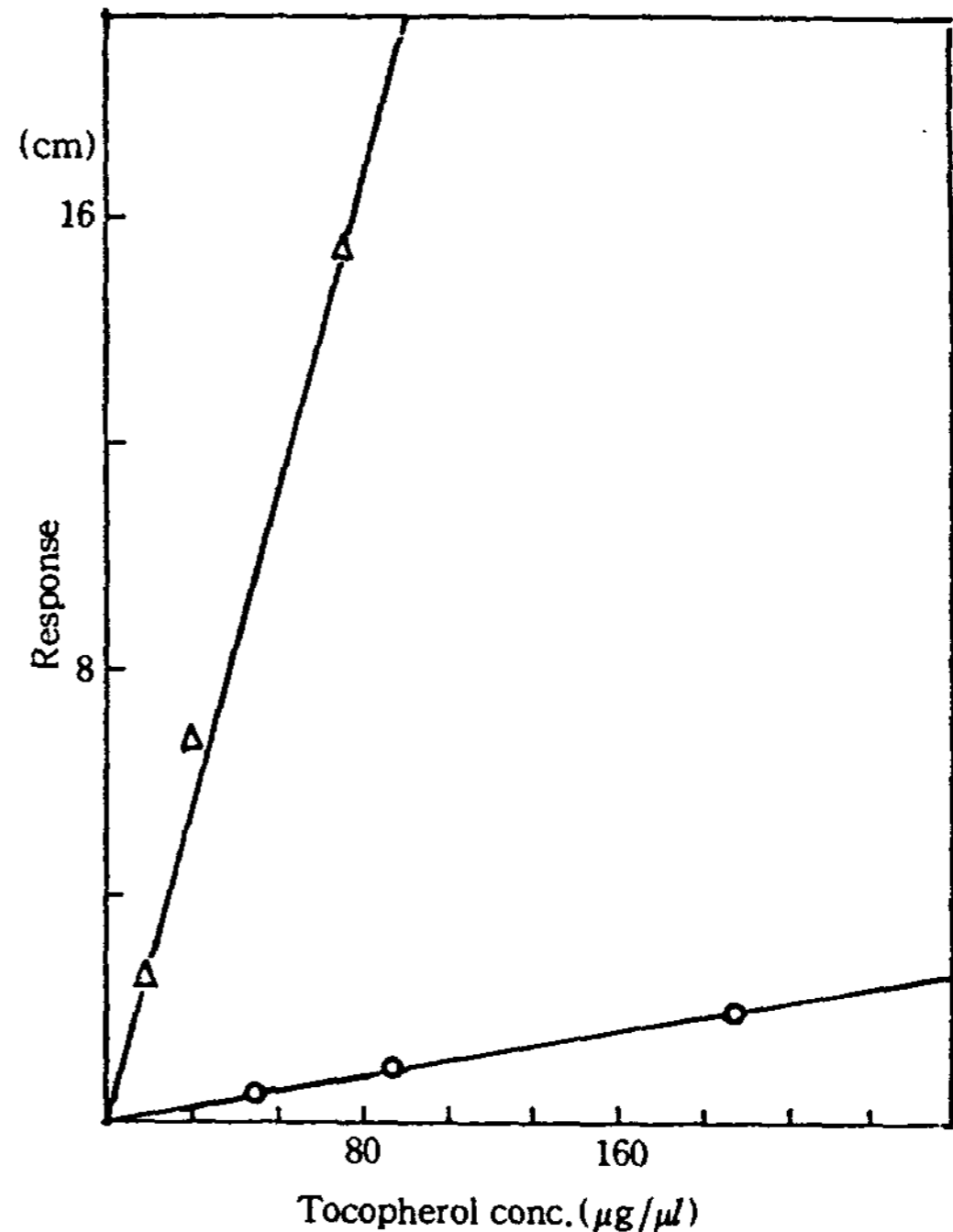


Fig. 2. Standard Curve of α - and γ -tocopherol on HPLC Δ - Δ : α -tocopherol, \circ - \circ : γ -tocopherol HPLC condition is given in Table 2.

를 넣어 잘 혼든後蒸溜水150ml와0.1%澱粉指示藥1~2방을가하여, 0.01N Na₂S₂O₃로無色이될때까지滴定하였다. Control과BHT를添加한比較實驗도並行하였다. POV가100meq./kg에到達할때까지의時間을誘導期로하였다.

3) Thin-layer chromatography (TLC)³¹⁾

使用한 TLC plate는 Silica Gel 60 F₂₅₄(coated on DC-Alufolien, thickness:0.2mm)였으며, 展開溶媒로는 toluene-ethyl formate-formic acid(40:50:5, V/V/V)混合液을使用하였다.

4) 高速液體 크로마토그래피(HPLC)

裝置는 Waters社의 HPLC Model 440을使用하였고, 分析條件은 아래와 같다.

Hexane抽出物의抗酸化成分의分析³⁴⁾:

Column: LiChrosorb SI 60(5 μ m), 25cm×4.0mm(i.d.)

Detector: Fluorescence detector(exci.250nm, emis. 340nm)

Gain: ×4

Mobile phase : Hexane-isopropyl ether(99.8:0.2, V/V)

Flow rate : 0.5mL/min.

Chart speed : 5mm/min.

Dichloromethane 및 methanol抽出物의 抗酸化成分의 分析³¹⁾ :

Column : μ Bondapak C₁₈, 30cm×3.9mm(i.d.)

Detector : UV detector(at 280nm)

Gain : ×16

Mobile phase : Methanol-0.33M potassium phosphate-acetic acid(40:59:1, V/V, pH 3.0)

Flow rate : 0.5mL/min.

Chart speed : 5mm/min.

III. 結果 및 考察

1. 各 溶媒에 의한 可溶成分의 抽出

試料의 水分含量은 초피, 탕자와 夏橘의 境遇는 各 各 21.5%, 20.3%와 24.1%였으나, 산초와 오수유의 境遇는 35.6%와 32.3%로 分析한 다른 試料에 比하여 많았다.

試料의 hexane, dichloromethane 및 70% methanol 抽出物 含量은 Table 1에 나타낸 바와 같이, 總 抽出物을 보면 탕자의 境遇는 試料의 42.6%로 全體 試料중 最 多였으며, 그 중 hexane 抽出物이 總 抽出物의 60%를 차지하고 있다. 나머지 試料에서는 總 抽出物이 7.9~11.7%에 지나지 않았으며, 초피와 夏橘과 같이 水分含量이 적은 試料의 境遇는 hexane 抽出物이 50% 以上이었으나, 反面 산초와 오수유와 같이 水分含量이 많은 試料에는 hexane 抽出物이 약 12%에 不 過하였다.

2. 各 溶媒抽出 分割의 抗酸化力 比較

Hexane 抽出物(Fr. A)은 中性脂質이 大部分 차지하고 있으므로, alkali 加水分解하여 不 皂化物(Fr. A₁)과 皂化物(Fr. A₂)로 나누어, dichloromethane, 70% methanol 抽出物과 함께 抗酸化力을 調査하였다. 皂化物인 Fr. A₂를 除外한 不 皂化物(Fr. A₁), dichloromethane 抽出物(Fr. B)과 70% methanol 抽出物(Fr. C)의 3分割物 모두에 抗酸化力이 認定되었으며, 이 중 hexane分割物의 不 皂化物의 抗酸化力이 最 低였다(Fig. 3).

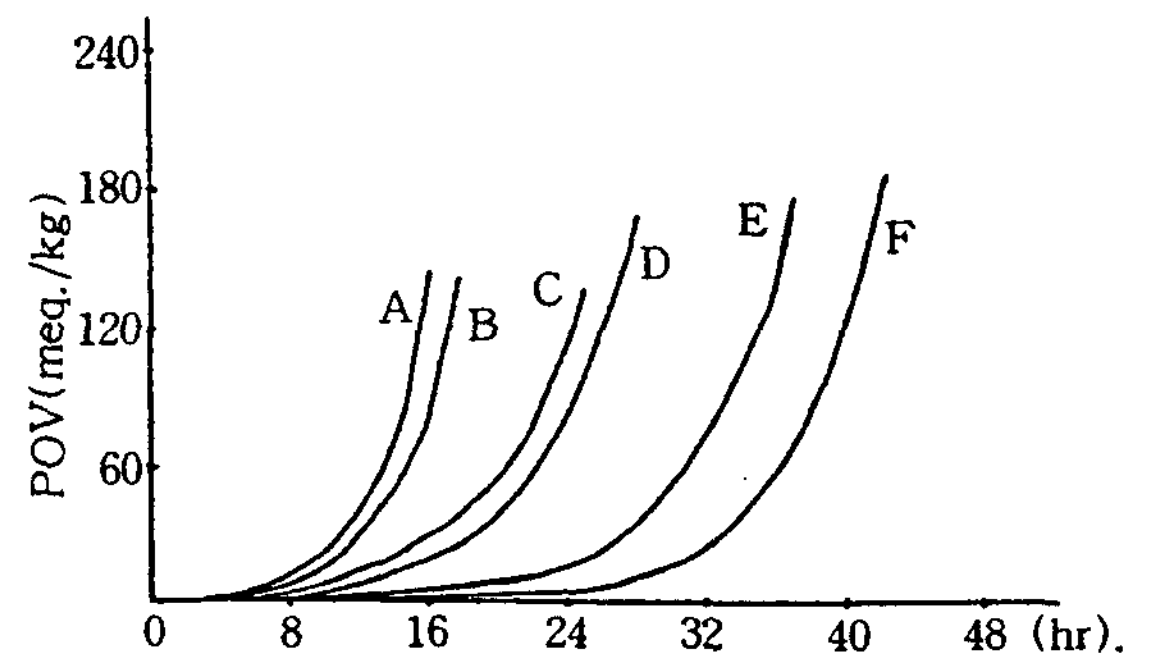


Fig. 3. Antioxidative Activity of Extractives from the Seed of *Poncirus trifoliata* on Lard

- A: control
 - B: saponifiables of hexane extractives(Fr. A₂)
 - C: α -tocopherol
 - D: unsaponifiables of hexane extractives (Fr. A₁)
 - E: 70% methanol extractives(Fr. C)
 - F: CH₂Cl₂ extractives(Fr. B)
- 0.1% of each extractives were added to lard

3. 抗酸化 成分의 精製^{30,31)}

Hexane 抽出物의 不 皂化物(Fr. A₁)을 Silica Gel

Table 1. Contents of Extractives from Seeds of the *Rutaceae* Family by Organic Solvents

Sample Solvent	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	<i>Z. schinifolium</i>	<i>Evodia officinalis</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Citrus unshiu</i>
hexane	8.2*(70.4)**	0.9(12.8)	1.0(12.3)	25.7(60.3)	4.0(50.4)
dichloromethane	1.7(14.6)	2.4(33.9)	3.5(43.1)	9.8(23.1)	2.5(31.6)
methanol	1.8(15.0)	3.8(53.3)	3.6(44.6)	7.1(16.7)	1.4(18.1)
total	11.7(100.0)	7.1(100.0)	8.1(100.0)	42.6(100.0)	7.9(100.1)

* per sample 100g

** percentage to total extractives

60 F₂₅₄을 coating한 TLC에 spotting하여 toluene/ethyl formate/formic acid(40:50:5, V/V/V)로 展開하였더니, α -와 γ -tocopherol로 여겨지는 spot가 檢出되었다(Fig. 4). Rf值 1.00 近處에서 나타나는 spot를 긁어모아 diethyl ether로 抽出하여 다시 silica gel TLC plate에 spotting하여 hexane-diethyl ether(80:20, V/V)로 展開한 結果 Rf值가 0.90~0.98이고, 50% sulfuric acid의 噴霧로 pink 色으로 發色되는 것으로 보아 Rf值 1.00의 spot는 hydrocarbon으로 생각된다.¹⁷⁾ Fr. A₁을 hexane에 녹여 Sep-Pak silica cartridge에 通過시켜 Li-Chrosorb SI 60 column이 裝着된 HPLC로 分析하였더니, Fig. 5와 Table 2에 나타낸 結果를 얻었다. 全 試料에 α -와 γ -tocopherol만 檢出되고, β -와 δ -tocopherol은 痕迹에 不過하였다. 牛乳, butter, 달

걍과 魚類와 같은 動物性 脂質¹⁸⁾에는 α -tocopherol이 總 tocopherol의 90% 以上 차지하고 γ -tocopherol이 10% 以內라고 하며, 反面에 보리, 귀, 밀과 같은 穀類에는 β -tocopherol도 存在한다고 하나¹⁹⁾ 대개의 植物性 油脂^{35, 36)}에는 α -tocopherol과 γ -tocopherol이 主要한 isomer로 棉實油, 해바라기油, safflower油에는 α -tocopherol이, 大豆油, 옥수수 기름, meadow foam 種實油³⁷⁾에는 γ -tocopherol이 相對적으로 많다고 하며, 또 땅콩 기름에는 2 isomer가 거의 同量 含有되어 있다고 한다.

本 實驗에서는 초피, 탕자와 夏橘에는 γ -tocopherol이 相對적으로 많았고, 산초에는 2 isomer의 含量이 거의 差異가 없었으나 오수유의 境遇는 α -tocopherol의 含量이 γ -tocopherol의 그것보다 약간 많았다.

植物油의 tocopherol의 組成과 그 含量에 관한 研究 data가 그렇게 많지 않아 植物油의 種類와 tocopherol 組成과의 關係를 지우기에는 매우 어려우

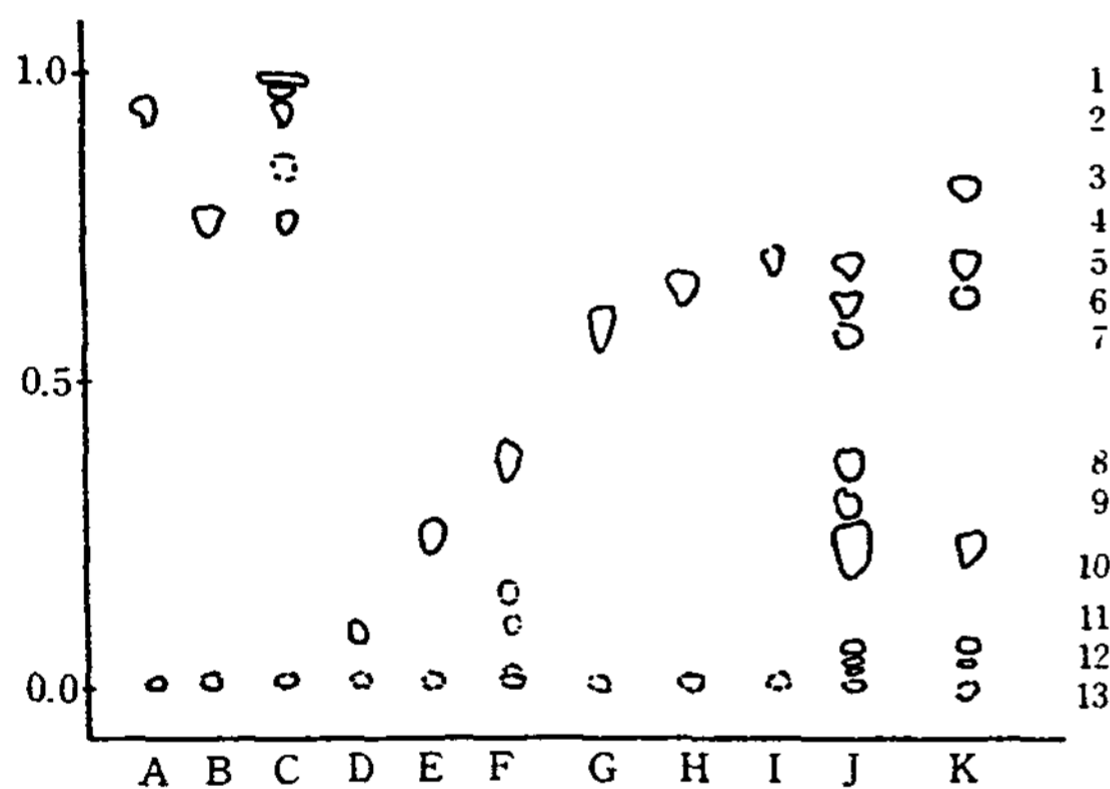


Fig. 4. TLC of Fr. A₁, Fr. B_{2a} and Fr. C₃ Classified from Solvent Extractives of *Poncirus trifoliata* Seeds

Adsorbent : silica gel 60F₂₅₄
 Developing : toluene/ethyl formate/formic acid
 Solvent(40:50:5, V/V/V)

A: α -tocopherol	1: hydrocarbon(?)	12 } un-
B: γ -tocopherol	2: DL- α -tocopherol	13 } known
C: Fr. A ₁	3: unknown	
D: chlorogenic acid	4: γ -tocopherol	
E: (+)-catechin & epi-catechin	5: p -ferulic acid	
F*: gallic acid	6: p -coumaric acid	
G: caffeic acid	7: caffeic acid	
H: p -coumaric acid	8: gallic acid	
I: p -ferulic acid	9: unknown	
J: Fr. B _{2a}	10: (+)-catechin & epi-catechin	
K: Fr. C ₃	11: chlorogenic acid	

* obtained from the tea seed(not pure)

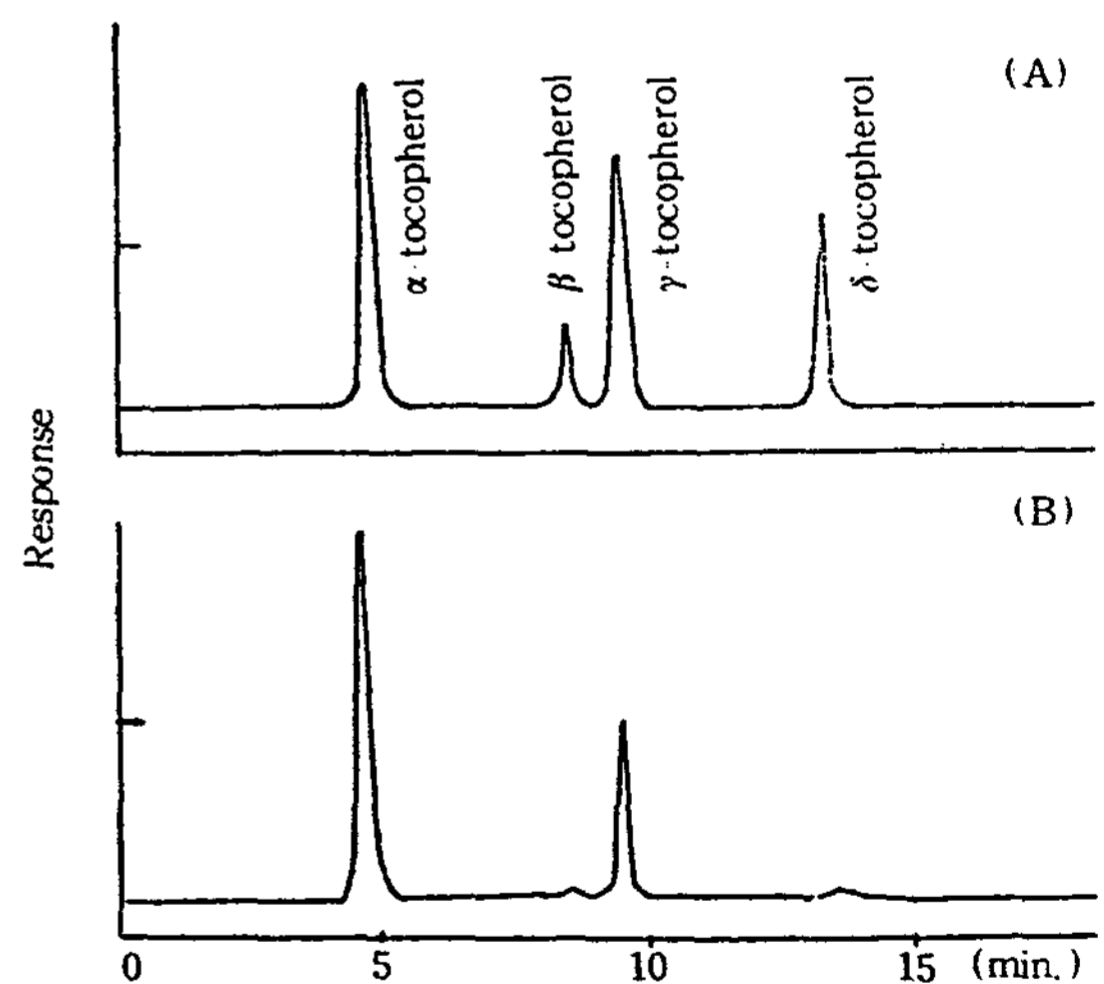


Fig. 5. HPLC of Standard Tocopherol Isomers(A) and Tocopherols in Unsaponifiables of Hexane Extractives from *Poncirus trifoliata* Seed(B)

Instrument : Waters HPLC Model 440
 Column : Lichrosorb SI 60(5 μ m)
 Detector : Fluorescence Detector excitation 250nm, emission 340nm
 Attenuation : $\times 4$
 Solvent : Hexane-isopropyl ether(99.8:0.2, V/V)
 Flow rate : 0.5ml/min
 Chart Speed : 5mm/min

나, Janiszowska & Pennock³⁸⁾는 植物의 잎과 줄기에 含有되어 있는 tocopherol에 관한 研究에서 成長이 빠른 植物의 境遇는 α -tocopherol이 相對적으로 매우 적고, 成長이 느린 常綠樹의 境遇는 α -tocopherol 含量이 높으며, γ -tocopherol은 어느 境遇나 그 含量이 比較的 一定하다고 하였다.

Chow等¹⁸⁾에 의하면 主要한 食用油의 總 vitamin E(tocopherol+tocotrienol)가 olive油에 5~15mg/100g oil, 땅콩油에 20~32mg/100g oil, safflower油

에 25~49mg/100g oil, palm seed oil에 33~73mg/100g oil, 棉實油에 30~81mg/100g oil, 옥수수 기름에 53~162mg/100g oil 그리고 大豆油에 56~160 mg/100g oil 存在한다고 한다.

本 實驗의 結果를 보면 夏橘의 總 tocopherol 含量은 脂溶性 成分 100g당 154.11mg으로 試料 중 제일 높았고, 다음이 산초와 초피로 그 含量이 各各 108.42와 91.00mg였으며, 오수유와 탕자의 境遇는 42.24~42.93mg으로 그 含量이 前者 3 試料의 折半 以下였으나, 대체로 이들의 tocopherol 濃도가 위에 言及한 食用油의 그것과 비슷하였다.

Table 2. Tocopherol Levels in the Seeds of the Rutaceae Family

Seed	tocopherol isomer	level(mg)	
		per seed 100g	per total extractives 100g
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	α -tocopherol	2.50	31.20
	β -tocopherol	tr.*	tr.
	γ -tocopherol	4.79	59.8
	δ -tocopherol	tr.	tr.
	total	7.29	91.00
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	α -tocopherol	5.66	47.17
	β -tocopherol	tr.	tr.
	γ -tocopherol	7.35	61.25
	δ -tocopherol	tr.	tr.
	total	13.01	108.42
<i>Evodia officinalis</i>	α -tocopherol	1.66	23.68
	β -tocopherol	tr.	tr.
	γ -tocopherol	1.30	18.56
	δ -tocopherol	tr.	tr.
	total	2.96	42.24
<i>Poncirus trifoliata</i>	α -tocopherol	0.33	4.06
	β -tocopherol	tr.	tr.
	γ -tocopherol	3.15	38.87
	δ -tocopherol	tr.	tr.
	total	3.40	42.93
<i>Citrus unshiu</i>	α -tocopherol	13.95	33.71
	β -tocopherol	tr.	tr.
	γ -tocopherol	49.85	120.40
	δ -tocopherol	tr.	tr.
	total	63.80	154.11

* trace

Dichloromethane 抽出物인 Fr. B에서 劃分한 Fr. B₁, B₂, B₃와 B₄의 4分割의 抗酸化力을 調査한 結果 Fr. B₂에서만 抗酸化性이 認定되었다(data생략). 또 dichloromethane의 抽出後 남은 殘渣에서 methanol 抽出로 얻은 Fr. C에도 抗酸化性 物質이 存在하므로, 이 分割을 acetonitrile에 녹여 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 acetonitrile을 通過시켜, Fr. C₁을, 다음에 acetonitrile-methanol-water(40:40:20, V/V/V)로 Fr. C₂를 얻었으며, 抗酸化性이 後者에서만 認定되었다.

Fr. B₂와 Fr. C₂를 劃分하던 중 fraction collector의 UV-monitor에 強한 吸收 peak를 보이므로, 여기에 phenolic 抗酸化 成分의 存在가 豫想되어³⁰⁾ 이 分割들을 加水分解하여 hexane으로 回收하여 얻은 Fr. B_{2a}와 Fr. C₃를 TLC상에 展開하였더니 Fig. 4(탕자 抽出物)에서 보는 바와같은 結果를 얻었다. Fr. B_{2a}에서 chlorogenic acid, (+)-catechin, gallic acid, caffeic acid, *trans-p*-coumaric acid, *trans-p*-ferulic acid의 R_f值와 一致하는 spot가 檢出되었고³¹⁾, Fr. C₃에 chlorogenic acid, (+)-catechin, *trans-p*-coumaric acid, *trans-p*-ferulic acid로 推測되는 spot가 存在하였다.

Fr. B_{2a}, Fr. C₃에 어떤 抗酸化性 物質이 存在하는가를 보다 明確히 하고자 이들을 reverse-phase인 μ Bondapak C₁₈(30cm×3.9mm) column이 裝着된 HPLC로 分析하였더니, 모든 試料의 Fr. B_{2a} 分割에서 12個의 peak가 分離되었는데(Fig. 6), peak 1, 2, 6, 7, 9와 10은 caffeic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, epi-catechin, *trans-p*-coumaric acid와 *trans-p*-ferulic acid로 同定할 수 있었으며, peak 5

Table 3. Levels of Phenolic Components of Fr. B_{2a} and Fr. C₃ Separated by HPLC(area %)

Component	Sample	1		2		3		4		5	
	Fraction	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
1. caffeic acid		tr.*	1.2	0.9	1.1	0.5	1.0	1.2	1.0	tr.	0.5
2. chlorogenic acid		8.5	5.1	7.7	4.3	4.1	3.3	3.2	2.6	7.2	1.5
3. unknown		2.1	1.3	3.4	1.2	0.4	1.0	1.0	1.1	1.5	1.0
4. unknown		1.0	1.0	2.5	0.5	0.5	0.8	4.0	5.2	3.2	8.8
5. gallic acid(?)		3.5		3.0		4.5		6.5		5.7	
6. (+)-catechin		22.9	31.3	21.4	35.2	24.4	33.6	19.1	39.6	21.9	38.1
7. epi-catechin		53.7	20.2	53.4	36.4	57.1	26.5	48.7	27.4	40.0	26.6
8. unknown		0.5	10.4	0.7	5.2	0.7	6.5	3.0	2.5	2.7	2.4
9. <i>trans-p</i> -coumaric acid		3.2	15.3	2.8	8.4	4.1	14.2	8.2	9.4	6.1	10.3
10. <i>trans-p</i> -ferulic acid		1.6	14.1	1.5	7.7	1.5	13.1	3.0	10.2	9.5	10.1
11. unknown		1.9	tr.	1.8		1.0	tr.	0.9	1.0	0.9	0.5
12. unknown		1.0	tr.	0.9		1.2	tr.	1.2	tr.	1.2	0.2

Each component was added in the ratio of 10mg to 100g lard.

Experimental conditions are described in Material and Experimental

* tr. : trace amount

1 : *Zanthoxylum piperitum*, 2 : *Zanthoxylum schinifolium*, 3 : *Evodia officinalis*

4 : *Poncirus trifoliata*, 5 : *Citrus unshiu*

B : Fraction B_{2a}, C : Fraction C₃

는 gallic acid로推定된다. TLC상에서相互分離되지 않았던 (+)-catechin과 이것과 flavanol核의 3位置에結合한 OH의 conformation이 서로 다른 epi-catechin이 깨끗이 서로分離되었다. Kim 등³¹⁾도 차나무와冬栢種實에서 HPLC를 사용하여 epi-catechin을純粹分離하여 NMR로 그構造를同定한바 있다. Fr. C₃의境遇는試料에 따라組成의差異가 약간 있었으나, 重要な成分은 역시 (+)-catechin과 epi-catechin이었으며, *trans-p*-ferulic acid와 *trans-p*-coumaric acid가 그 다음으로 많았고, caffeic acid와 chlorogenic acid도檢出되었으나 Fr. B_{2a}에存在하는 gallic acid로 여겨지는 peak는 나타나지 않았다. 本實驗에서는 epi-catechin의純品을求하기 어려워各 polyphenol 成分의定量的인分析은 하지 못하고, 各 peak의面積比만 Table 3에表示하였다.

이와 같이抗酸化力이 있는 2分割에共通成分이 많이存在하는 것은 다른要因보다 polyphenol 化合物이 Fr. B₂와 C₂에 각기 다른結合形態로存在하기

때문으로 여겨진다.

4) HPLC에서分割된各 polyphenol 化合物의抗酸化力

芸香科種實油의 polyphenol系抗酸化成分으로 (+)-catechin, epi-catechin, chlorogenic acid, *trans-p*-ferulic acid와 *trans-p*-coumaric acid을 들 수 있다. Table 4는 탕자種實에서 얻은 polyphenol 化合物과 BHT, α -tocopherol을 lard에 0.01%, 0.02% 添加하여抗酸化力을比較한結果를 나타낸 것으로 epi-catechin, (+)-catechin과 chlorogenic acid는 BHT나 α -tocopherol보다優秀한抗酸化力을 보이고, 또 *trans-p*-coumaric acid나 *trans-p*-ferulic acid도 tocopherol보다 약간 낮은抗酸化性을 나타내므로 이成分들이芸香科種實의抗酸化作用에 중요한役割을 하리라 생각된다. 이結果는 Hirose³⁰⁾와 金等³¹⁾의研究結果와도一致한다. 또 Naito 등³⁹⁾은 cacao 껍질에서 얻은 *trans-p*-ferulic acid와 *trans-p*-coumaric acid는 BHT보다 짧으나 α -tocopherol과

Table 4. Antioxidative Activity of Some Phenolic Components Isolated from Dichloromethane- and 70% Methanol-Extractives of Seeds of the Rutaceae Family

Component	Induction	
	0.01%	0.02%
Control	2.5	
BHT	10.5	20.5
α -tocopherol	9.0	13.5
chlorogenic acid*	17.5	36.0
chlorogenic acid	18.5	37.5
(+)-catechin*	23.5	43.5
(+)-catechin	23.0	42.0
Epi-catechin	26.5	48.0
<i>trans-p</i> -coumaric acid*	9.5	16.0
<i>trans-p</i> -coumaric acid	9.0	16.5
<i>trans-p</i> -ferulic acid	11.5	20.5

* authentic standard

Experimental conditions are described in Material and Experimental

비슷한 誘導期를 나타내었다고 報告한 바 있다. 한편 Hayase²⁹⁾는 고구마에서 分離한 chlorogenic acid는 抗酸化性이 弱하나, 아미노酸-polyphenol 化合物이 存在할때 synergyst 效果를 나타낸다고 하였으며, Pratt⁴⁰⁾는 大豆에서 얻은 chlorogenic acid에도 抗酸化 效果가 없다고 하였으나, 이⁴¹⁾는 脫脂한 들깨粕에 存在하는 chlorogenic acid에 抗酸化 效果가 있다고 報告하였다. 이러한 差異는 抗酸化力 測定方法과 抗酸化 成分의 純度等에 起因하는 것으로 생각된다.

문 헌

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 Paoietti, R. and Kritchevsky, D) Academic Press, New York, pp. 173~249(1980).
6. Tappel, A. L. : *Fed. Proc.*, 32, 1870(1973).
7. Rice-Evans, C. and Hochstein, P. : *Biochem.*

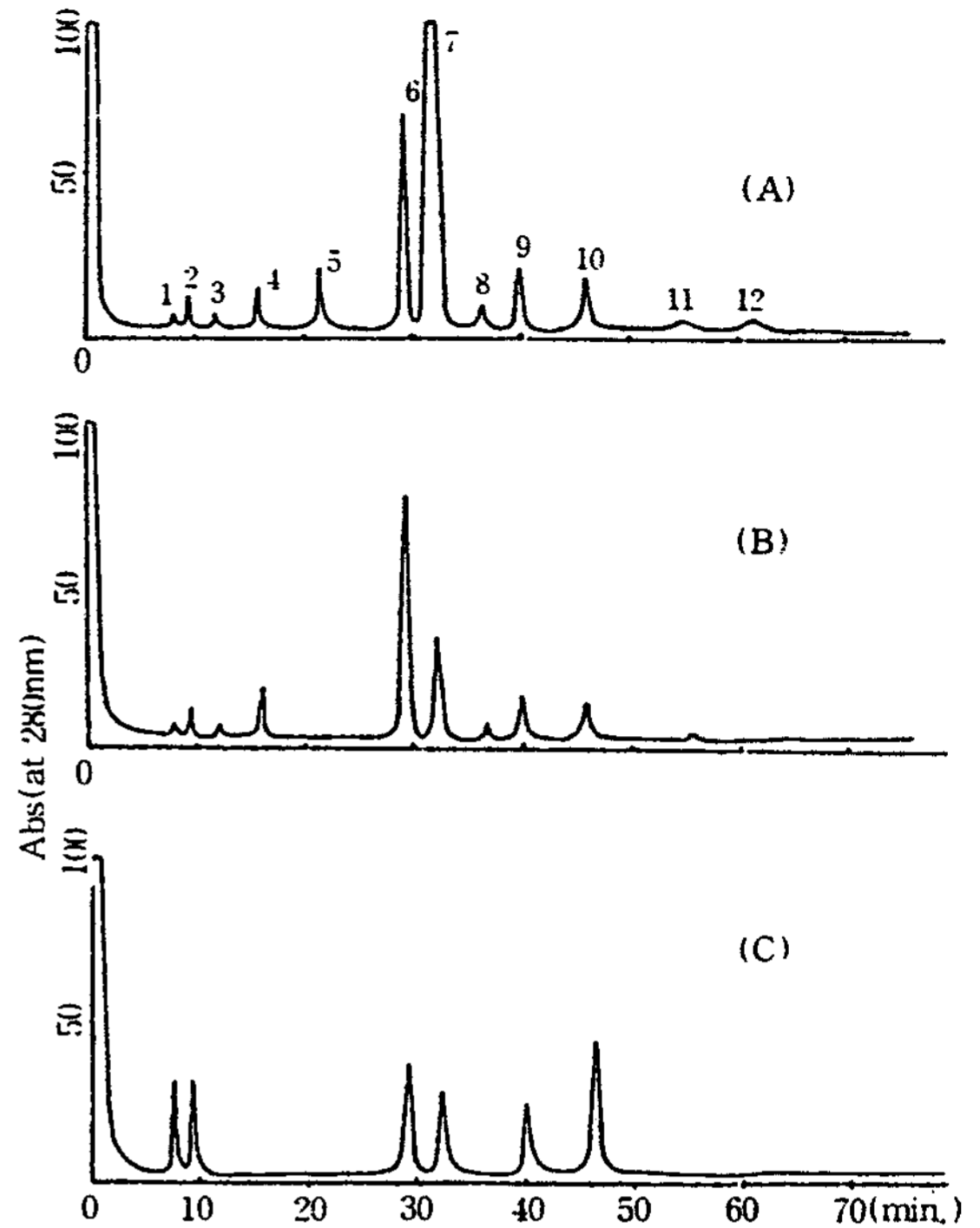


Fig. 6. HPLC of Fraction B_{2a} and Fraction C₃ Derived from the Seed of *Poncirus trifoliata*

A: Fraction B_{2a} B: Fraction C₃ C: Standard
 1: caffeic acid 7: epi-catechin
 2: chlorogenic acid 8: unknown
 3: unknown 9: *trans-p*-coumaric acid
 4: unknown 10: *trans-p*-ferulic acid
 5: gallic acid(?) 11: unknown
 6: (+)-catechin 12: unknown
 HPLC conditions are described in Material and Experimental

Biophys. Res. Comm., 100, 1537(1981).

8. Little, C and O'Brien, P.L. : *Biochem. J.*, 83, 106(1968).
9. Lewis, S. E. and Willis, 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, 金田尚志 : 油化學, 23, 321(1974).
13. 日本藥學會 : 衛生實驗法註解, 金原出版社, 東京, p. 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: 油脂食品の劣化とその防止, 幸書房, 東京, pp. 118~126(1977).
 17. 趙鏞桂, 佐藤美和, 土屋靖彦: 日本水産學會 東北支部會報, 23, 1(1972).
 18. Chow, C. K.: *World Rev. Nutr. Diet.*, 45, 133 (1985).
 19. Cort, W. M., Vicente, T. S., Waysek, E. H. and Williams, B. D.: *J. Agr. Food Chem.*, 31, 1330(1983).
 20. Fusio, H.: *New Food Industry*, 11(8), 25(1969)
 21. Fenton, T. W., Leung, J. and Clandin, D. R.: *J. Food Sci.*, 45, 1702(1980).
 22. 木村雄吉, 湯上進, 齊藤浩: 食品工業, 14(2), 57(1971).
 23. Brieskorn, C. H., Fuchs, A., Bridenberg, J. B., McChenseney, J. D. and Wenkert, E.: *J. Org. Chem.*, 29, 2293(1964).
 24. Brieskorn, C. H. and Doemling. H. J.: *Zeit. Lebensm. Unter. Forsch.*, 141, 10(1969).
 25. Brieskorn, C. H. and Doemling. H. J.: *Arch. der Pharmazie*, 302, 641(1969).
 26. Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. and Seto, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1661(1982).
 27. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 521(1983).
 28. Houlihan, C. M., Ho, C. T. and Chang, S. S.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 62, 96(1985).
 29. Hayase, F. and Kato, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 37(1984).
 30. Hirose, Y. and Iwama, F.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 33, 435(1984).
 31. 金成眞, 崔銀眞, 林希玲, 金泰淑, 趙鏞桂: 韓國油化學會誌, 8, 35(1991).
 32. 趙鏞桂: 韓國油化學會誌(投稿 중).
 33. 유준식: 가열산화유에 관한 연구, 한국 식품공업 협회 식품연구소 편, 서울, 239~258(1988).
 34. Van Nierkerk, P. J.: *HPLC in Food Analysis* (ed. by Macrae, R.), Academic Press, London, p. 151(1988).
 35. Marquard, R., Schuster, W. and Seibel, K. H.: *Fette. Seifen Anstrich.*, 79, 137(1977).
 36. Stump, D. D. and Gilbert, H. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 435, 497(1984).
 37. Purdy, H.: *J. Am Oil Chem. Soc.*, 64, 1493 (1987).
 38. Janiszowska, W. and Pennock, J. F.: *Vitamins Hormones*, 34, 77(1976).
 39. Naito, S., Yamaguchi, N. and Yokoo, Y.: *J. Jp. Soc. Food Sci. Technol.*, 29, 529(1982).
 40. Pratt, D. E.: *J. Food Sci.*, 39, 737(1965).
 41. 이기영: 한국식품과학회지, 25, 9(1993).