

## 밤나무 잎으로부터 항산화 활성물질의 분리

최용화\*·김진호\*·김명조\*\*·한성수\*\*\*·임요섭\*\*\*\*

### Antioxidative Compounds in Leaves of *Castanea crenata* S. et Z.

Yong Hwa Choi\*, Jin Ho, Kim\*, Myong Jo Kim\*\*,

Seong Soo Han\*\*\* and Yo Seob Rim\*\*\*\*

**ABSTRACT** : Two antioxidative compounds in leaves of *Castanea crenata* were isolated by a bioassay using a DPPH free radical. They were identified as quercitrin, isoquercitrin on the basis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR and MS data. The DPPH radical scavenging activity (RC<sub>50</sub> : 12 μg) of two compounds was similar to that of α-tocopherol (12 μg) and BHA (14 μg).

**Key words** : *Castanea crenata*, antioxidant, DPPH radical, flavonoid.

## 緒 言

노화와 성인병 질환에 활성산소종(reactive oxygen species)이 깊숙이 관여한다는 연구결과가 발표된(Packer & Glazer, 1993; Niki 등, 1994) 이래 이들 활성산소종을 조절할 수 있는 물질인 항산화제의 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 항산화제에는 superoxide dismutase, peroxidase, catalase 등의 항산화 효소와

tocopherol, ascorbate, carotenoid, glutathione 등의 천연물유래의 저분자 항산화 물질이 밝혀졌으며 그 기능에 대해서도 많은 연구가 진행되었다(Alscher & Hess, 1993; Chang 등, 1977; Hammerschmidt & Pratt, 1977; Pratt & Watts, 1964). 이외에도 BHT, BHA, Troxol C 등과 같은 합성 항산화제가 개발되어 의약품과 식품분야에서 이용되고 있다(Kitahara 등, 1992; Hatano, 1995; Masaki 등, 1995). 그러나 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항

\* 상주대학교 식물자원학과 (Dept. of Plant Resources, Sangju National University, Sangju, Kyungbuk, Korea)

\*\* 강원대학교 식물응용과학부 (Division of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Korea)

\*\*\* 원광대학교 농과대학 농화학과 (Dept. of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

\*\*\*\* 순천대학교 농업생명과학대학 (Dept. of Agricultural Chemistry, Suncheon National University, Suncheon, Korea)

< 2000. 10. 16 접수 >

산화제가 대량으로 투여된 동물실험에서 발암성이 보고되고 있어 합성 항산화제의 사용이 점점 제한되고 있다(Branen, 1975). 이로 인하여 천연 항산화제의 개발이 시급히 요구되고 있으나, 현재까지 연구 보고된 천연 항산화제는 효력, 비용면에서 합성 항산화제인 BHT와 BHA를 능가하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 효력이 탁월하고 보다 안전한 새로운 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다. 식물체는 많은 종류의 항산화 물질의 존재가 보고되어 왔고 현재에도 효과적인 항산화 활성물질의 탐색연구의 대상이 되고 있다.

저자들은 자생식물 자원으로부터 천연 항산화 활성물질을 개발하기 위하여 국내 자생식물을 대상으로 항산화 활성 검정을 실시한 결과, 밤나무의 MeOH 추출물이 강한 항산화 활성을 나타냄을 알 수 있었다 (투고 중).

따라서 본 연구에서는 밤나무를 대상으로 항산화 활성물질의 규명을 목적으로 DPPH free radical 소거법(Choi 등, 1993)을 지표로 하여, 2종의 항산화 활성물질을 분리하여 그 구조를 밝히고 이들 화합물이 갖는 항산화능을 조사하였다.

## 材料 및 方法

### 실험재료

본 연구에 사용된 밤나무(*Castanea crenat*)는 1997년 11월 대전시 소재 충남대학교 교내에서 채취하였다.

### 시약 및 기기

DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와  $\alpha$ -tocopherol은 Sigma사 제품을, BHA (butylated hydroxytoluene)는 Kanto사 제품을 사용하였다. 흡광도는 Varian DMS 200 spectrometer를 사용하여 측정하였다.  $^1\text{H}$ -

NMR (300 MHz) 및  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz) spectrum는 Bruker DRX-300 spectrometer를, FAB-MS spectrum은 Concept-1S (KRATOS)를 사용하였다. Column chromatography (c. c.)는 silica gel (70-230 mesh, Merck), ODS gel (70-230 mesh, YMC)를 사용하였다. HPLC는 YMC C<sub>18</sub> column (250 x 20 mm)을 연결한 Gilson 303 (France)을 사용하였다.

### 추출 및 분획

음지 실온에서 건조시킨 식물체의 지상부(건물중 600g)를 100% MeOH 10 l로 2회 추출, 농축 건조시켜 MeOH 추출물(97g)을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수(H<sub>2</sub>O)에 현탁시켜 n-hexane, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), 및 n-butanol (BuOH)을 사용하여 순차적으로 용매분획하여, hexane 분획 18.7g, CHCl<sub>3</sub> 분획 10g, EtOAc 분획 4g, BuOH 분획 15g과 H<sub>2</sub>O 분획 49.3g을 얻었다.

### 항산화물질의 분리

밤나무의 MeOH 추출물을 용매분획하여 항산화 활성이 강하게 나타난 EtOAc 분획을 DPPH free radical 소거법을 지표로 항산화 활성물질을 분리하였다. EtOAc 분획을 silica gel (200g) c. c.에 충전시킨 후 CHCl<sub>3</sub>-MeOH의 용매계로 순차 용출 (step-wise)시켰다. 활성분획 (30-40% MeOH in CHCl<sub>3</sub>)으로 2.4g을 얻어, ODS gel (100g) c. c. (용매 : MeOH-H<sub>2</sub>O)을 실시하여 활성분획 (30-40% MeOH in H<sub>2</sub>O) 0.9g을 얻었다. 45% MeOH 용매계로 YMC C<sub>18</sub> column (250 x 20 mm)을 사용한 HPLC (유속 10 ml/min)로 화합물을 용출하여, 활성물질 compound 1 (31.2 mg)과 compound 2 (24.1 mg)을 순수 단일 화합물로 분리하였다.

## Compound 1

FAB-MS  $m/z$  449  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (300MHz,  $CD_3OD$ );  $\delta$  7.32(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 7.30(1H, dd,  $J=1.8, 7.8$  Hz, H-6'), 6.90(1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.36(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 6.19(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 5.34(1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-1''), 4.20(1H, dd,  $J=1.2, 3.3$  Hz, H-2''), 3.73(1H, dd,  $J=3.3, 9.3$  Hz, H-3''), 3.44-3.39(1H, m, H-4''), 3.35-3.31(1H, m, H-5''), 0.93(3H, d,  $J=5.7$  Hz, H-6'');  $^{13}C$ -NMR (75.5MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  179.6(C-4), 165.8(C-7), 163.2(C-9), 159.3(C-5), 158.5(C-2), 149.8(C-4'), 146.4(C-3'), 136.2(C-3), 123.0(C-6'), 129.9(C-1'), 116.9(C-5'), 116.4(C-2'), 105.9(C-10), 103.5(C-1''), 99.8(C-6), 94.7(C-8), 73.3(C-4''), 72.1(C-3''), 72.0(C-2''), 71.9(C-5''), 17.6(C-6'').

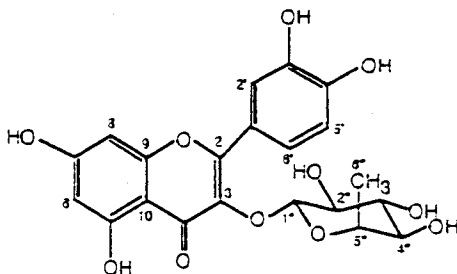
## Compound 2

FAB-MS  $m/z$  465  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (300MHz,  $DMSO-d_6$ );  $\delta$  7.66(1H, d  $J=1.8$  Hz, H-2'), 7.54(1H, dd,  $J=1.8, 8.1$  Hz,

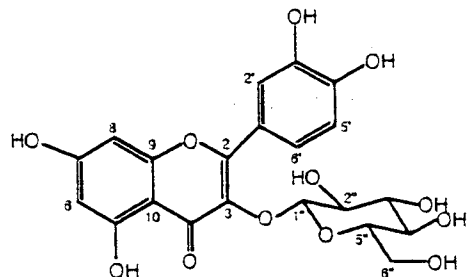
H-6'), 6.81(1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5'), 6.39(1H, brd, H-8), 6.19(1H, brd, H-6), 5.37(1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'');  $^{13}C$ -NMR (75.5MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  177.4(C-4), 164.2(C-7), 161.2(C-9), 156.3(C-5), 156.1(C-2), 148.4(C-4'), 144.8(C-3'), 133.3(C-3), 121.9(C-6'), 121.0(C-1'), 116.1(C-5'), 115.2(C-2'), 103.8(C-10), 100.8(C-1''), 98.7(C-6), 93.5(C-8), 75.8(C-3''), 74.1(C-4''), 69.9(C-2''), 67.9(C-5''), 60.1(C-6'').

## DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성

각 정제과정에서 얻어지는 분획들을 최 등 1993)의 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 4 ml의 MeOH에 녹여,  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 (in MeOH) 1 ml를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 ( $\mu g$ )을  $RC_{50}$ 으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA와 비교하였다.



Compound 1



Compound 2

Fig 1. The structures of antioxidative compounds isolated from leaves of *Castanea crenata*.

## 結果 및 考察

밤나무 지상부의 MeOH 추출물을 증류수 500ml에 현탁시켜 hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH로 용매분획하여 각각의 분획을 대상으로 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성을 조사하였다. 그 결과 EtOAc 분획에서 강한 항산화 활성 (RC<sub>50</sub> : 34 μg)을 나타냈으며, hexane과 CHCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O 분획에서는 낮은 활성을 나타내었다 (Table 1). 활성이 높았던 EtOAc 분획을 대상으로 항산화 활성물질을 규명하였다. 이 분획을 silica gel, ODS gel, HPLC에 의하여 순차적으로 정제하여 최종적으로 compound 1과 compound 2을 단일물질로 각각 분리하였다.

Table 1. DPPH free radical scavenging activities of methanol extracts from leaves of *Castanea crenata* and their solvent fractions

Fractions	RC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> (μg)
MeOH extract	42
Hexane fraction	> 100
CHCl <sub>3</sub> fraction	> 100
EtOAc fraction	34
BuOH fraction	> 100
H <sub>2</sub> O fraction	> 100

<sup>a)</sup> Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min.

Compound 1은 <sup>1</sup>H-NMR에서 7.32-6.19 ppm에 proton signal이 관찰되어 quercetin의 존재가 확인되었으며, 5.35 ppm의 anomeric proton ( $J=1.5$  Hz)과 4.20-3.31 ppm에 rhamnose에 귀속되어지는 전형적인 proton signal이 관찰되었고, <sup>13</sup>C-NMR의 data 및 문헌치를 비교한 결과 quercitrin (quercetin-3-

$\alpha$ -L-rhamnoside)으로 동정하였다 (Park 등, 1990).

Compound 2는 <sup>1</sup>H-NMR상 5.37 ppm의 anomeric proton ( $J=7.8$  Hz)과 3.65-3.17 ppm의  $\beta$ -glucose에 귀속되어지는 일련의 proton signal 및 7.66-6.19 ppm의 aglycon에 상당하는 flavone 유래의 signal에 더하여 <sup>13</sup>C-NMR의 data와 문헌치 (Young 등, 1987)를 비교한 결과, quercetin의 3위에  $\beta$ -D-glucose가 결합된 isoquercitrin (quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside)으로 추정되었으며, 표준품과 비교 검토한 결과 spectrum이 일치하여 isoquercitrin인 것으로 판명되었다 (Kang 와 Woo, 1984).

이상과 같이 밤나무의 지상부로부터 2종의 항산화 활성물질을 분리·동정하였다. 이들 두 화합물은 모두 기존에 밝혀진 화합물이며 DPPH 소거법에 의한 항산화 활성을 Table 2에 나타내었다. 밤나무에는 이 두 화합물 외에도 수종의 DPPH 소거법에 의한 항산화 활성을 나타내는 물질이 존재할 것으로 추정되나, 본 연구에서 밝힌 두 화합물이 주요 항산화 활성물질일 것으로 판단되었다. 두 화합물의 항산화 활성 (RC<sub>50</sub> : 12 μg)은 천연 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA과 대동소이한 것으로 나타났다.

Table 2. DPPH free radical scavenging activity of compounds isolated from leaves of *Castanea crenata*

Compound	RC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> (μg)
Compound 1	12
Compound 2	12
BHA	14
$\alpha$ -Tocopherol	12

<sup>a)</sup> Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min.

## 摘 要

밤나무 (*Castanea crenat*) 의 지상부를 대상으로 DPPH free radical 소거법을 이용하여 2종의 항산화 활성물질을 분리하였다. 분리된 활성물질은 NMR과 mass 분석에 의하여 quercitrin, isoquercitrin으로 밝혀졌다. 두 화합물의 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성(RC<sub>50</sub> : 12 $\mu$ g)은 BHA (14  $\mu$ g)와  $\alpha$ -tocopherol (12  $\mu$ g) 과 비슷하였다.

## LITERATURE CITED

- Alscher, R. G. and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, pp 1-174.
- Branen, A. L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS 52 : 59-63.
- Chang, S. S., B. Ostric-Matijasevice, A. I. Hsieholiver, and C. L. Hyung. 1977. Natural antioxidants from rosmaroy and sage. J. Food Sci. 42 : 1102-1110.
- Choi, J. S., J. H. Lee, H. J. 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 davidiana*. Kor. J. Pharmacogn. 24 : 299-303.
- Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt. 1977. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 43 : 556-561.
- Hatano, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species -Tannins and related polyphenols. Natural Medicines 49 : 357-363.
- Kang, S. S. and W. S. Woo. 1984. Flavonol glycosides from the leaves of *Zizyphus jujuba*. Kor. J. Pharmacogn. 15 : 176-178.
- 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. Atsumi, and H. Sakurai, 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. Biol. Pharm. Bull. 18 : 162-166.
- Niki, E., H. Shimasaki, and M. Mino. 1994. Antioxidants : Free Radicals and Biological Defense. Japan Scientific Societies Press, Inc., Tokyo. pp 1-332.
- Packer, L. and A. N. Glazer. 1993. Oxygen Radicals in Biological Systems : Oxygen Radicals and Antioxidants. Academic Press, Inc., New York. pp 1-855.
- Park, J. C., B. W. Kim, and H. S. Young. 1990. Further study on the flavonoids from the leaves of *Machilus thunbergii* in Korea. Kor. J. Pharmacogn. 21 : 197-200.
- Pratt, D. E. and B. W. Watts. 1964. The antioxidant activity of vegetable extracts, I. Flavone aglycones. J. Food Sci. 29 : 17-24.
- Young, H. S., J. C. Park, and J. S. Choi. 1987. Isolation of (+)-catechin from the roots of *Rosa rugosa*. Kor. J. Pharmacogn. 18 : 177-179.