

복분자 열매에서 항산화활성을 지닌 quercetin의 분리 및 동정

윤 인 · 위치향 · 문재학¹ · 안태희² · 박근형*

전남대학교 식품공학과 및 농업과학기술연구소

¹건국대학교 응용생물화학과 · 농업자원개발연구소, ²오뚜기식품 중앙연구소

Isolation and Identification of Quercetin with Antioxidative Activity from the Fruits of *Rubus coreanum* Miquel

In Yoon, Ji-Hyang Wee, Jae-Hak Moon¹, Tae-Hoe Ahn² and Keun-Hyung Park*

Department of Food Science and Technology and Institute of Agricultural Science and Technology,
Chonnam National University

¹Department of Applied Biology and Chemistry, The Research Institute of Agricultural Resources Development,
Konkuk University

²Research Center, Ottogi Food Co., Ltd.

The methanol (MeOH) extracts from the fruits of *Rubus coreanum* showed antioxidative activity. The antioxidative substance in MeOH extracts was successively purified with solvent fractionation, adsorption chromatography, and gel filtration. The purified active substance was isolated by HPLC and identified as quercetin by EI-MS, and ¹H-NMR analyses. The amount of quercetin was 0.25 mg per 100 g in fresh fruits of *Rubus coreanum* Miquel.

Key words: fruits of *Rubus coreanum* Miquel, antioxidative activity, quercetin

서 론

자유라디칼 혹은 활성산소에 의한 생체 내 산화는 암, 각종 성인병 및 노화의 주원인이 된다고 잘 알려져 있다⁽¹⁾. 모든 호기적인 조건의 생명체들은 활성산소에 대한 자기방어 기전을 가지고 있으나 일부의 활성산소에 의해 자유라디칼 반응이 야기되어 지질의 산화, 단백질의 변성, DNA의 절단 등으로 의해 생체막과 유전자 손상이 일어나고 더 나아가서 성인병, 발암, 노화 등이 일어나게 된다^(2,3). 자유라디칼 또는 활성산소에 의한 산화를 억제하는 항산화물질은 산화에 의한 질병예방 및 노화억제에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있어 최근 이들 항산화제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다^(4,5). 일반적으로 사용되고 있는 BHA와 BHT 등은 탁월한 항산화력과 경제성 때문에 널리 이용되고 있으나 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발시키는 등 안전성 여부가 논란이 되면서 소비자의 기피 현상이 두드러지고 있

다⁽⁶⁾. 이에 천연에 존재하는 생물자원으로부터 항산화력이 우수한 물질의 개발이 매우 활발하게 진행되고 있으며, 아울러 이들 성분의 응용연구 또한 시도되어지고 있다^(7,8).

복분자(*Rubus coreanum*) 나무는 장미과의 낙엽 관목이며 6월에 검붉은 열매가 수확된다. 복분자는 식용으로 이용되고 있을 뿐만 아니라 예로부터 한방에서 약재로 사용되어지고 있어⁽⁹⁾ 다양한 기능성 물질이 함유되어 있을 것으로 생각된다. 복분자 나무에 관한 연구로는 잎과 줄기로부터 tannin 및 flavonoids 화합물 등이 보고된 바 있으며⁽¹⁰⁻¹²⁾, 미숙 복분자 열매에서 gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose, sanguinaria 보고⁽¹³⁾된 바 있다. 그러나 가식부인 복분자 열매의 항산화물질에 관한 연구는 빈약한 실정이다. 이에 저자들은 복분자 열매를 기능성 식품소재로 활용하는데 도움이 되고자 복분자 열매에 함유된 항산화물질로 5종의 phenolic acids와 2종의 유기산을 보고한 바 있다⁽¹⁴⁾. 본 연구에서는 복분자 열매에 함유된 항산화활성 물질 1종을 구명하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 복분자 열매(fruits of *Rubus coreanum*

*Corresponding author : Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2143
Fax: 82-62-530-2149
E-mail: khpark@chonnam.ac.kr

Miquel)는 전라북도 고창군에서 재배된 것으로 6월에 채취하여 -40°C에서 냉동보관한 것을 시료로 사용하였다.

활성물질의 추출 및 용매분획

복분자(2 kg)를 homogenizer(BM-2 Nisseibio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki LTD., Tokyo, Japan)로 분쇄하면서 2,000 mL의 MeOH로 추출하였다. 추출물을 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였으며, 여과잔사는 1,000 mL의 MeOH로 재추출하여 동일한 방법으로 여과하였다. 얻어진 여액을 38°C에서 감압농축하여 용매가 완전히 제거된 복분자 열매 MeOH 추출물을 얻고, 이를 Kuk 등⁽¹⁵⁾의 방법에 의해 ethyl acetate(EtOAc)와 buffer 용액(5% sodium bicarbonate, pH 8.0)으로 분배하여 수용성획분과 EtOAc가용 중성획분(EtOAc-soluble neutral fraction)으로 분획하였다. 수용성획분은 1.0 N HCl로 pH 3으로 조절한 뒤, EtOAc로 분배하여 EtOAc가용 산성획분(EtOAc-soluble acidic fraction)을 얻었다.

Sephadex LH-20에 의한 흡착 chromatography

Lu 등⁽¹⁶⁾의 방법을 이용하여 Sephadex LH-20(70~230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 H₂O로 24시간 팽윤시킨 후, column(2.5×11 cm)에 충진하였다. 용출용매는 H₂O로부터 MeOH의 농도를 단계적으로 10%씩 증가시키는 step-wise 방법으로 각 단계별 100 mL씩 용출하여 분획하였다.

Sephadex LH-20에 의한 gel filtration

Park 등⁽¹⁷⁾의 방법으로 Sephadex LH-20(70~230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH:CHCl₃(4:1, v/v)의 용매계로 24시간 동안 팽윤시킨 다음, column(2×52 cm)에 충진하고 동 용매계로 용출분획하였다.

High performance liquid chromatography

HPLC는 MeOH/H₂O/trifluoroacetic acid(50:50:0.03, v/v, pH 2.6) 용매계의 octadecylsilane(ODS) column(4.6×150 mm, TSK gel ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)을 이용하여 분당 1 mL(Model 2480 solvent delivery system, Waters, USA)로 용출하였으며, 검출은 UV detector(370 nm; Dual UV/VIS absorbance detector, Waters, USA)를 이용하였다.

Mass spectrometry

MS 분석은 Waters integrity system의 thermabean mass detector(Milford MA, USA)를 이용하여 직접도입방식의 electron impact mass spectrometry(EI-MS) 분석을 실시하였고, 이 때 ionizing voltage는 70 eV, 그리고 ion source temperature는 200°C에서 행하였다.

¹H-NMR

¹H-NMR 분석은 ^{uni}INOVA 500(500 MHz, Varian, Walnut Creek, CA, USA) 기기를 사용하였다. 용매는 CD₃OD를 사용하였으며, 내부표준물질은 사용용매(δ =3.31)를 기준점으로 하였다.

Quercetin 정량 분석

복분자 열매(25 g, 수분 함량: 83.3±1.0%)를 MeOH(250 mL)로 추출하여, HPLC로 정량하였다. HPLC 분석은 전술한 HPLC 조건에서 이동상만을 달리하여 3회 반복하였다. 이동상으로 A 용매계는 MeOH/H₂O/acetic acid(5:93:2, v/v/v)를, B 용매계는 60% MeOH을 사용하였으며, A에서 B로 55분간 linear gradient로 용출한 후 15분간 isocratic으로 B를 용출하였다. Standard quercetin(Sigma, MO, USA)은 이조건에서 57.77 min에 용출되며, 작성된 검량선에 의해 3회 반복하여 정량하였다.

항산화활성 측정

DPPH radical-scavenging activity test는 Abe 등⁽¹⁸⁾의 방법에 의해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH; Sigma, MO, USA) ethanol 용액(100 μM) 900 μL와 시료 MeOH 용액 100 μL를 시험관에 넣고 30초간 진탕한 후 암소에서 10분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response 곡선으로부터 50%의 DPPH 자유라디칼 소거능(50% scavenging concentration; SC₅₀)값을 구하였다. 비교구로 α-tocopherol(Sigma, MO, USA)을 사용하였다.

분리·정제 과정 중 항산화활성 검정은 Takao 등⁽¹⁹⁾의 DPPH-TLC 방법에 의해 시료를 TLC plate(silica gel, 0.2 mm, Merck)에 spotting하여 benzene-acetone-acetic acid(6:4:0.1, v/v) 용매계로 전개한 후 DPPH 용액(200 μM in ethanol)을 plate에 분무하여 적색이 탈색되면 항산화활성 양성으로 판정하였다.

결과 및 고찰

MeOH 추출물의 항산화활성

복분자 열매 2 kg에서 얻어진 MeOH 추출물(3.6 g)을 용매 분획하여 EtOAc가용 중성획분(1.7 g)을 얻었다. 이 획분을 대상으로 DPPH radical-scavenging에 의한 항산화 활성을 측정한 결과, 50% DPPH 자유라디칼 소거능 값(SC₅₀)은 α-tocopherol이 10 μg, 복분자 MeOH 추출물은 117 μg이었으며, 이 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc가용 산성획분은 60 μg⁽¹⁴⁾, EtOAc가용 중성획분은 186 μg으로 나타났으며 수용성획분은 거의 활성을 보이지 않았다. EtOAc가용 산성 및 중성획분에 항산화활성 물질의 존재가 시사되었다.

EtOAc가용 중성획분에 함유된 활성물질의 정체 및 분리

항산화활성을 나타낸 EtOAc가용 중성획분을 대상으로, Sephadex LH-20 흡착 column chromatography를 실시한 결과, 30% MeOH(284.1 mg), 60% MeOH(52.2 mg), 그리고 90% MeOH(584.8 mg) 용매계로 용출된 획분에 항산화활성이 인정되었으나, 90% MeOH 획분이 가장 강한 항산화활성을 보였다. 90% MeOH 용출획분을 더욱 정제하기 위해 molecular sieve 효과에 의한 Sephadex LH-20 column을 이용한 gel filtration을 실시하였다. 그 결과, total volume에 대한 elution volume의 비(Ve/Vt)가 1.91~2.16 획분(151.0 mg)에서 항산화활성이 나타났고, 이 활성획분을 MeOH 용매로 흡수

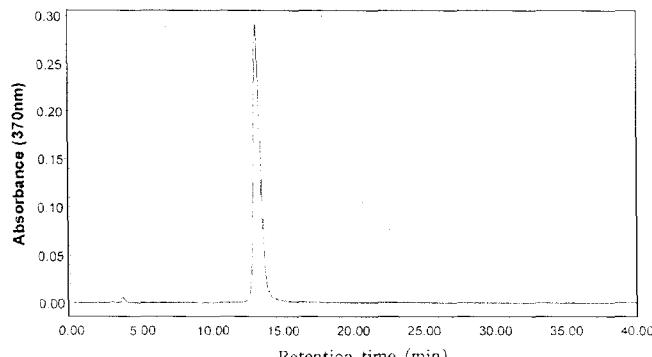


Fig. 1. HPLC chromatogram of the antioxidative compound from the fruits of *Rubus coreanum* Miquel.

극대를 조사한 결과, 370 및 254 nm에서 흡수극대를 보였다. 따라서 Ve/Vt 1.91~2.16 획분을 50% MeOH(pH 2.6)을 이동상으로 한 HPLC 분석을 실시한 결과(Fig. 1), 활성물질은 13.24 min에서 단일 peak로 분리되었다. 미황색 분말로 단리된 활성물질은 DPPH-TLC 방법(R_f 0.54)에 의해 활성이 확인되었다.

MS 및 $^1\text{H-NMR}$ 분석에 의한 동정

상기방법에 의해 단리된 활성획분을 직접도입방식에 의한 EI-MS 분석을 행한 결과(Fig. 2), molecular ion(M^+)이 m/z 302에 나타났으며, 특징적인 fragment ion으로 m/z 193 [$\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$] $^+$, 153 [$\text{M}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$] $^+$, 109 [$\text{M}-\text{C}_9\text{H}_5\text{O}_5$] $^+$ 등이 관찰되었다. 이 spectrum으로 Wiley6 library 검색을 행한 결과, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone(quercetin)의 EI-MS spectrum과 일치하여, 이 화합물은 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ 의 분자식을 가지며 분자량이 302인 quercetin으로 판단되었다. 이를 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 실시한 결과, 5개의 proton의 sp^2 carbon 유래의 signal[δ 7.74 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2'), 7.64 (1H, dd, J = 2.3, 8.5 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6)]이 검출되었다. 이 proton들의 chemical shift, 분열 패턴 및 coupling constant 값으로부터 이 화합물은 quercetin으로 동정되었으며, Peng 등⁽²⁰⁾의 $^1\text{H-NMR}$ data와도 일치하였다. 이상의 MS 및 NMR 분석 결과로부터 단리된 항산화활성을 갖는 물질은 quercetin으로 동정되었다.

복분자에 함유된 quercetin의 함량

HPLC 분석에 의한 복분자에 함유된 quercetin의 함량은 복분자 열매 100 g 당 약 0.25 ± 0.02 mg이었다. 같은 *Rubus* 속 식물들의 함량과 비교하면 William 등⁽²¹⁾의 *R. idaeus* L.보다 약 10배 정도 많은 양이며 Hakkinen 등⁽²²⁾의 *R. idaeus* Ottawa와 비교했을 때는 약 60% 정도 적은 양이어서 같은 *Rubus* 속 간에도 quercetin 함량에 있어서 차이를 나타냈다.

이상과 같이 복분자 열매에 함유된 항산화활성 물질로 quercetin을 분리·동정 및 정량하였다. Quercetin은 berry^(21,22), 양파⁽²³⁾, 어성초⁽²⁴⁾, 두충나무⁽²⁵⁾, 참당귀⁽²⁶⁾, rooibos tea⁽²⁷⁾ 등의 식물체에 aglycone 또는 배당체의 형태로 존재하면서 항산화 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다. Moon 등⁽²⁶⁾은 flavonoid

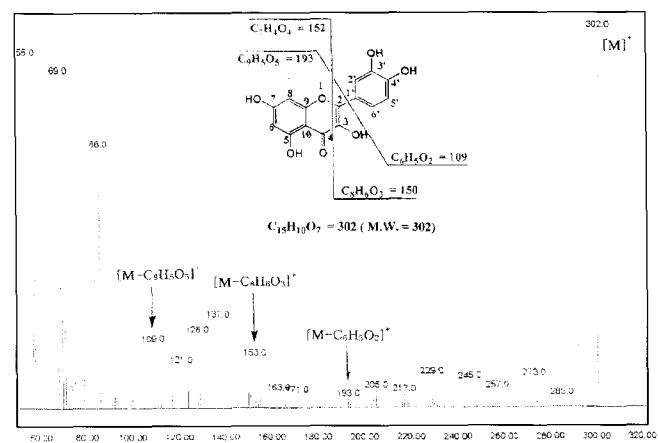


Fig. 2. EI-MS spectrum and fragmentation pattern of the antioxidative compound from the fruits of *Rubus coreanum* Miquel.

화합물의 DPPH radical-scavenging 활성(EC_{50})을, quercetin ($4.5 \mu\text{g/mL}$)이 kaempferol($12.0 \mu\text{g/mL}$), luteolin($15.6 \mu\text{g/mL}$) 또는 L-ascorbic acid($9.6 \mu\text{g/mL}$)보다 강한 항산화활성을 갖는 것으로 보고한 바 있으며, quercetin은 항산화활성이 이외에도 항암⁽²⁸⁾, 항돌연변이 활성⁽²⁹⁾, 항바이러스 작용⁽³⁰⁾, 그리고 지질 산화반응 억제⁽³¹⁾ 등의 효과를 가지고 있는 것으로도 알려져 있다.

우리나라에서 자생 및 재배되는 복분자 열매(fruits of *R. coreanum* Miq.)에서 quercetin이 분리, 동정된 것은 첫 보고로 생각된다. 향후 quercetin 이외의 항산화성분이 구명되길 기대하며, 복분자 열매는 항산화활성을 갖는 기능성소재로서 이용가치가 있을 것으로 판단된다.

요약

복분자 열매에 함유된 항산화활성 물질을 탐색하기 위하여 MeOH로 추출하고, 이 추출물을 용매분획하여 EtOAc가 용 중성획분을 얻었다. 이 획분에 함유된 항산화활성 물질을 흡착성과 분자체 효과를 이용한 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하고, HPLC에 의해 1종의 항산화활성 물질을 단리하였다. 분리된 활성물질의 구조 해석을 위해 EI-MS와 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 실시하여, 활성물질은 구조식이 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ 이며 분자량이 302인 quercetin으로 동정되었다. 또한 항산화활성 물질 quercetin은 HPLC에 의해 복분자 열매 100 g 중에 0.25 ± 0.02 mg이 함유되어 있는 것으로 분석되었다.

감사의 글

이 논문은 오투기재단 학술연구 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문헌

- Halliwell, B.H. and Gutteridge, J.M.C. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85 (1990)

2. Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. Antioxidants in Nutrition, Health and Disease, pp. 1-62. Oxford University Press, UK (1994)
3. Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C. and Arouoma, O.I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219 (1987)
4. Moon, J.H. and Park, K.H. Functional components and physiological activity of tea. *J. Korean Tea Soc.* 1: 175-191 (1995)
5. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci.* 6: 75-82 (1995)
6. Branen, A.L. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63 (1975)
7. Cho, J.Y., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid with antioxidative and antimicrobial activity from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and conformation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1403-1408 (2000)
8. Wee, J.H. and Park, K.H. Isolation of 4-hydroxycinnamic acid, 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from peanut (*Arachis hypogaea*) shell. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 551-556 (2001)
9. Kim, T.J. Korean Resources Plants II, p. 140. Publishing Department of Seoul University, Seoul, Korea (1996)
10. Lee, Y.A. and Lee, M.W. Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 26: 27-30 (1995)
11. Lee, M.W. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 39: 200-204 (1995)
12. Kim, M.S., Pang, G.C. and Lee, M.W. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 41: 1-6 (1997)
13. Pang, G.C., Kim, M.S. and Lee, M.W. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 27: 366-370 (1996)
14. Yoon, I., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Wee, J.H., Jang, M.Y., Ahn, T.H. and Park, K.H. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 898-904 (2002)
15. Kuk, J.H., Ma, S.J., Moon, J.H., Kim, K.Y., Choi, S.H. and Park, K.H. Antibacterial and antifungal activities of a naphthoquinone derivative isolated from the fruits of *Catalpa ovata* G. D'ON. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 858-863 (2002)
16. Lu, Y. and Foo, L.Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chem.* 59: 187-194 (1997)
17. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T. Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 224-2243 (1994)
18. Abe, N., Nemoto, A., Tsuchiya, Y., Hojo, H. and Hirota, A. Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 306-333 (2000)
19. Takao, T., Kitatani, F. and 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)
20. Peng, Z.F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, K.N., Chia, T.F., Tan, S.N. and Chia, L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* 62: 219-228 (2003)
21. William, M., Amanda, J.S., Michael, E.J.L., Peter, G., Garry, G.D. and Alan, C. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5197-5201 (1999)
22. Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkonen, H.M. and Torronen, A.R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2274-2279 (1999)
23. Formica, J.V. and Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061-1080 (1995)
24. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Shon, G.M., Lee, H.J. and Heo, H.S. Comparison of quercetin and soluble tannin in *Houttuynia cordata* THUNB. according to growth stages and plants parts. *Korean J. Med. Crop Sci.* 10: 12-16 (2002)
25. Ham, I.H., Lee, S.J., Kim, H.H., Kang, I.H., Jin, H.O. and Whang, W.K. Standardization and seasonal variation of quercetin glycoside in *Eucommiae Folium*. *Korean J. Pharmacogn.* 33: 194-199 (2002)
26. Moon, H.I., Ahn, K.T., Lee, K.R. and Zee, O.P. Flavonoid compounds and biological activities on the aerial parts of *Angelica gigas*. *Yakhak Hoeji* 44: 119-127 (2000)
27. Gadow, A.V., Joubert, E. and Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 45: 632-638 (1997)
28. Markaverich, B.M., Roberts, R.R., Alejandro, M.A., Johnan, G.A., Middleditch, B.S. and Clark, J.M. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and growth inhibition. *J. Steroid Biochem.* 30: 71-78 (1998)
29. Edenhader, R. and Tang, X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compound. *Food Chem. Toxicol.* 35: 357-372 (1996)
30. Veckenstedt, A., Beladi, I. and Musci, I. Effect of treatment with certain flavonoids on mengo virus-induced encephalitis in mice. *Arch. Virol.* 57: 255-260 (1978)
31. Younes, M. and Siegers, C.P. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica.* 43: 240-244 (1981)

(2003년 3월 29일 접수; 2003년 6월 5일 채택)