

## 제주산 개가시나무(*Quercus gilva*) 줄기로부터 DPPH 라디칼 저해활성 성분의 분리 및 동정

문미연, 백종석, 오태현, 이남호

제주대학교 자연과학대학 화학과

### 요 약

제주산 개가시나무(*Quercus gilva*)의 줄기 에탄올 추출물에서 DPPH 라디칼 저해활성을 확인 하였으며, 활성성분으로 catechin 및 epicatechin을 동정하였다.

### 서 론

우리는 음식물의 산화반응을 이용하여 대사하며 열량을 얻고 생명을 유지하고 있다. 이 때 사용되는 산소 중의 1~3%는 활성산소가 되어 체내 세포 중의 지질, 단백질, 핵산 등을 공격하고 있다. 지질의 산화는 주로 자유라디칼에 의한 연쇄반응으로 진행되어 과산화물 및 산화 분해된 카르보닐 화합물 등을 생성하게 된다. 반응성이 큰 과산화물들의 라디칼은 생체 내 단백질 또는 아미노산과 반응하여 기능기를 파괴시키거나 다른 물질들과 가교 결합을 형성하여 여러 조직에서 세포막의 변화를 일으킬 뿐만 아니라 효소활성의 감소 및 DNA손상과 퇴행성 장애를 일으킨다.

생체에는 superoxide dismutase, catalase, glutathione, 비타민 등의 항산화제가 존재하여 대사과정에서 생성되는 라디칼 화합물을

제거하여 체내 항상성을 유지한다. 그러나, 나이가 들거나 면역력이 저하되어 있는 경우, 생체 내 산화조절 시스템이 붕괴되어 세포는 산화적 공격을 적절히 방어하기가 어렵게 된다. 따라서, 이러한 경우 외부에서 항산화제를 보충하여 산화/항산화의 항상성을 유지해 주어야 한다.

현재 가장 많이 사용하고 있는 항산화제로는 천연 항산화제인 tocopherol류, flavonoid류(그림 1)와 합성 산화제인 propyl gallate, BHA, BHT, TBHQ등이 있다.<sup>1-3</sup> 이들 항산화제는 산소 존재나 고온 조건에서 기질의 자유라디칼 생성을 지연시키거나 활성을 저해함으로써 지방질의 산화를 억제시키고 있다. 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나 이들의 인체에 대한 안정성에 문제가 있으며<sup>4</sup>, 천연 항산화제로 널리 알려진 tocopherol은 안전하기는 하나 단독으로는 산화연쇄반응 저지 능력이

낮고 가격이 비싼 단점이 있다.

따라서, 새로운 타입의 천연 항산화제의 개발에 관심이 고조되고 있다<sup>5</sup>. 특히, 식물 플라보노이드는 항염, 항궤양, 항동맥경화, 항암 등의 생리활성과 더불어 상당한 항산화효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 천연항산화제의 개발을 목표로 소태나무, 동백나무, 아왜나무 및 개가시나무 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 저해 활성을 검색하였다. 이중에서 개가시나무 추출물에서 가장 강력한 활성을 확인하였다.

개가시나무(*Quercus gilva*)는 상록교목으로 저지대의 이차림 숲속에 매우 드물게 자라며, 한국의 제주도, 일본, 타이완, 중국의 난대지방에 분포하고 있으며, 조경수로써 이용되고 있다. 개가시나무의 화학성분에 관한 연구는 꽃으로부터 분리한 triterpene의 보고되어 있으나,<sup>6,7</sup> 다른 성분에 관한 연구는 보고되어진 바 없다. 본 연구에서는 제주도 개가시나무의 줄기에서 항산화성분으로 catechin 및 epicatechin의 구조를 동정하고 이들 물질

의 항산화능력을 조사하였다.

## 실험재료 및 방법

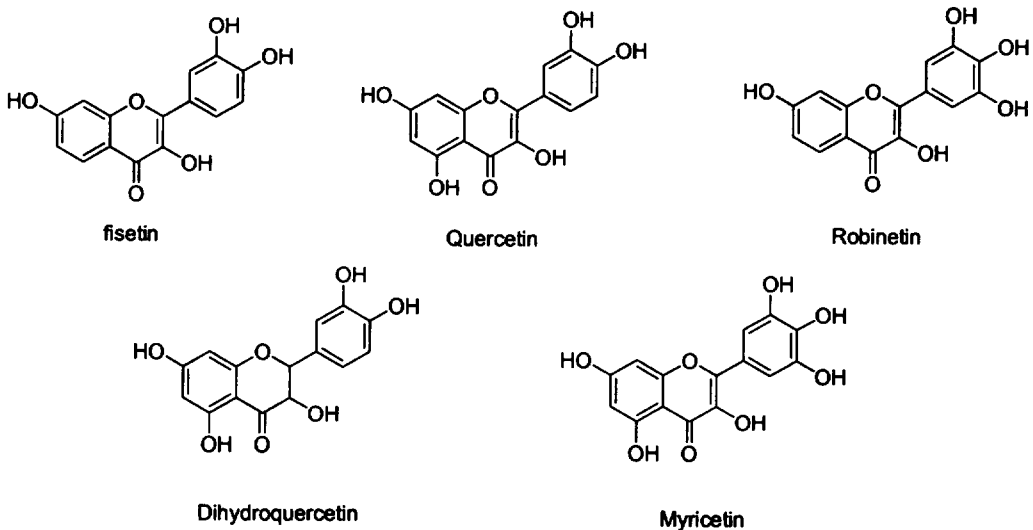
### 실험재료

본 연구에서는 제주도 소태나무, 동백나무, 아왜나무 및 개가시나무의 가지를 채집하여 음건, 세절하여 사용하였다. 개가시나무의 동정은 한라산 연구소에서 이루어졌다.

### 시약 및 기기

추출 및 컬럼 크로마토그래피에 사용한 용매는 시약용 1급을 사용하였으며, 분리과정에서 사용된 TLC는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F254, 0.2 mm, Merk)를 사용하였고,

컬럼크로마토그래피에 사용된 충전제로는 reverse phase silica gel RP-C<sub>18</sub>(Merk)을 사용하였고, 항산화 활성 검색에 biochrom사의



<그림 1> 몇 가지 종류의 항산화성 flavonoid의 구조

Libra S22 UV를 사용하였다. NMR은 JEOL 사의 LAMBDA를 사용하였다.

### 시료의 추출

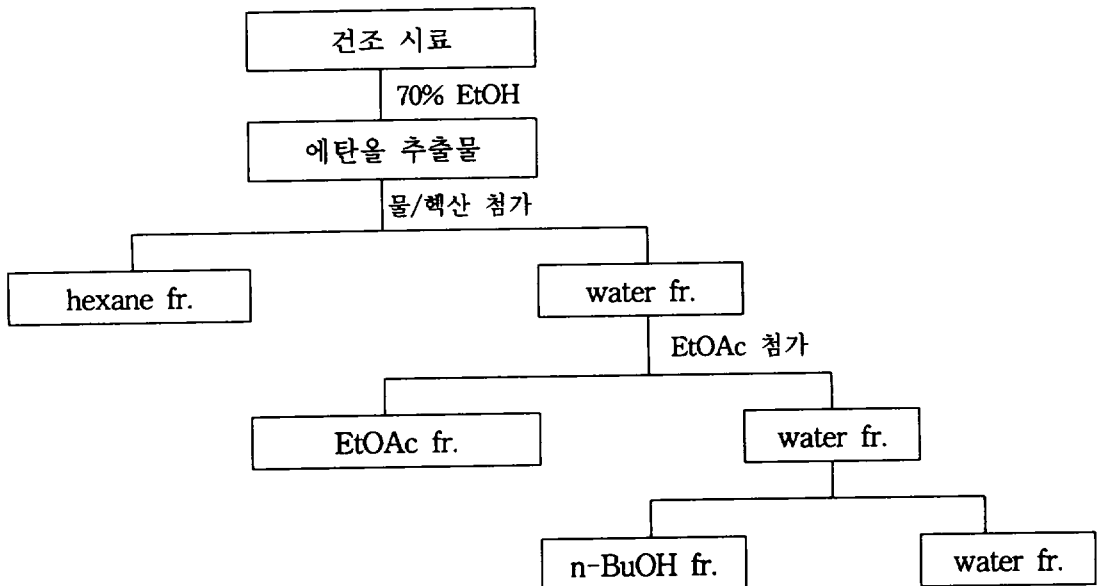
통풍이 잘되는 곳에서 음건된 원료들 중 일부 원료들은 부위별로 나누어 각각 실험에 사용하였다. 추출은 건조무게(705 g)의 10배량의 70%(v/v) 함수에탄올에 침지하였고, 24 시간 방치 후 상층액을 취한 다음 잔사에 10 배량의 용매를 넣어 재 추출하였다. 추출된 용매는 whatman여과지(No.5)를 이용하여 여과하고, 여과액은 감압농축기를 이용하여 40 ℃에서 농축하였다. 추출물(22 g)은 용매 분획 방법에 의하여 분획하였다. 즉 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 hexane, ethyl acetate, n-butanol을 이용하여 차례대로 용매 분획한 후 각각의 분획물을 농축하고 동결 건조시켜 분말상의 추출물을 얻었다(그림 2).

### 활성성분의 분리

활성이 우수한 에틸아세테이트 분획물 22 g을 역상 실리카겔(SiO<sub>2</sub>) 컬럼을 수행하였다. 이때 용리액으로는 순차적으로 20% 메탄올에서 100% 메탄올을 통과시켜 총 9개의 fraction을 얻어내었고 이 중 분획물 2(725.2 mg)와 분획물 3(359.8 mg)이 TLC상으로 확인한 결과 단일 spot으로 확인되었다.

### 분획물의 항산화활성 검색

분리된 시료의 항산화 효능을 측정하기 위해서는 DPPH라디칼 소거 활성법을 사용한다. 추출 건조된 시료에 대한 자유라디칼 소거 효과를 하기와 같은 방법으로 측정하였다. 즉 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 1 ml에 각각의 시료를 농도별로 2 ml씩 첨가하고, 상온에서 10분간 반응시킨 다음, 517 nm에서 최대 흡광도를 측정하여 자유라디칼 소거 효과(%)를 구하였다. 이



<그림 2> 용매 추출 및 분획물 제조 방법

때, 대조군은 메탄올을 사용하였으며, 실험군과 동일한 농도의 시료 2 mL를 첨가하였다.

자유라디칼 소거 활성(RC<sub>50</sub>)은 DPPH 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(μg/ml)로 나타내었다. 각각의 시료의 농도별 자유라디칼 소거 활성 대한 SC<sub>50</sub> 측정되며, 소거율의 계산은  $[(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] \times 100$ 으로 계산된다.

## 연구결과 및 고찰

### DPPH radical 소거 활성

제주도에서 식물군 4종을 채집하여 시료로 사용하였다. 각 식물 추출물의 항산화 효능이 어떤지 비교하기 위해서 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 시약과 EtOH를 이용해서 0.2mM의 DPPH 용액을 만들었다. 0.2 mM DPPH 시약을 만들어서 반응이 일어나지 않게 빛을 차단하고 저온에 보관한다. 각 sample을 제조하고 용매로 70% EtOH를 사용 시험관에 DPPH 용액과 함께 첨가한 후 UV-VIS 흡광광도계를 이용하여 525 nm의 파장을 쏘여주고 최대 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼

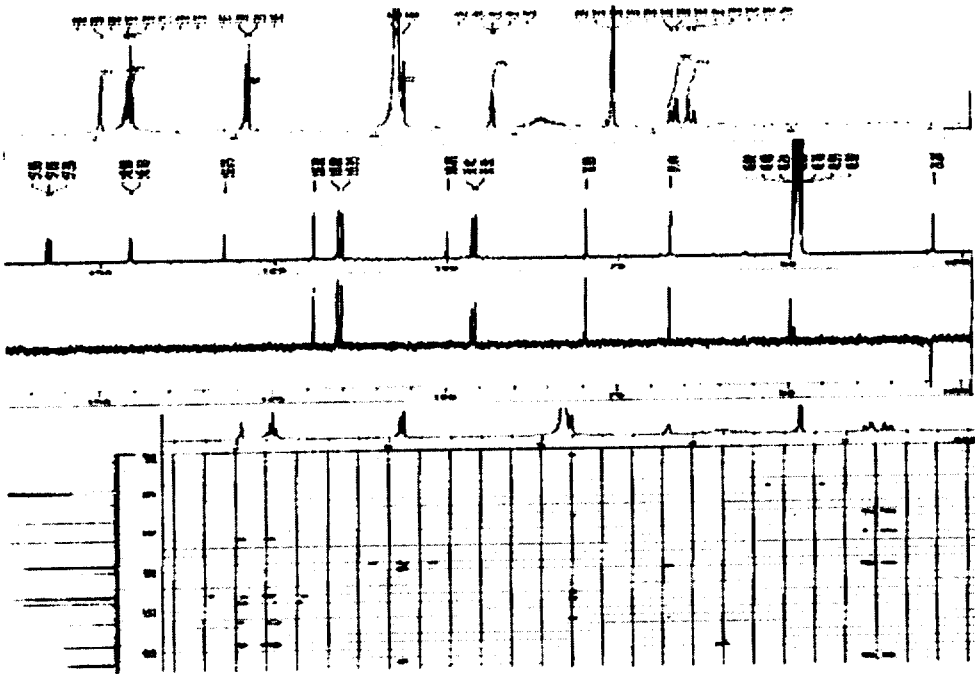
제거 실험 결과 4개의 추출물 중 개가시나무 추출물이 가장 뛰어난 활성을 보였다(표 1). 소태나무, 동백나무, 개가시나무, 아왜나무 추출물의 SC<sub>50</sub>은 각각 330.3, 73.1, 55.8, 138.9 μg/mL이었다. 이에 개가시나무 줄기 705 g을 이용하여 위의 실험과정(그림 2)을 따라 70% 에탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고, 헥산(hexane), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(butanol)로 차례대로 용매 분획하여 최종 4개의 분획을 얻었다. 활성 성분이 들어있는 분획을 찾기 위해 다시 DPPH 실험을 수행한 결과, 에틸아세테이트 층에서 좋은 결과를 보였다(SC<sub>50</sub> 13.5 μg/mL).

### 활성성분 규명 및 항산화활성

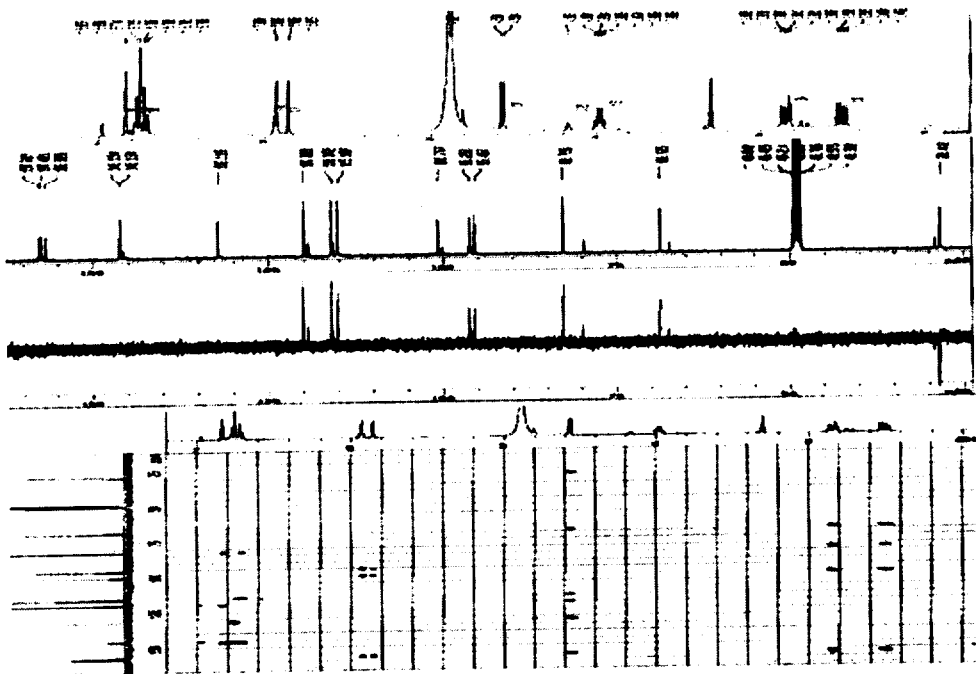
화합물 1, 2의 구조를 확인하기 위하여 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼, DEPT, HMBC를 측정하여 표 2에 나타내었다. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 확인한 결과 화합물 1, 2가 전형적인 플라보노이드 패턴을 보였다. 표 4에서 보면 두 화합물 모두 1개의 메틸렌 수소(H-4)가 관측되었고, 5개의 올레핀 수소가 관측되었는데 커플링 상수값으로 보아 올레핀 수소 5개 중 2개는 ortho커플링을 하고 있으며, 나머지 3개의 수소는 meta커플링을

<표 1> 여러 가지 식물 추출물 및 개가시나무 EtOAc층의 DPPH 소거 활성 효과

sample name	추출부위	DPPH inhibition(%)					SC <sub>50</sub> (μg/mL)
		500 (μg/mL)	250 (μg/mL)	125 (μg/mL)	62.5 (μg/mL)	31.25 (μg/mL)	
소태나무	가지	54.381	48.205	45.120	42.567	43.141	330.3
동백나무	잎	78.103	64.524	55.934	49.066	45.197	73.1
개가시 나무	가지	86.342	72.484	61.449	51.792	48.038	55.8
	EtOAc 층	94.544	79.928	67.302	58.801	53.410	13.5
아왜나무	잎	67.422	56.542	48.957	45.57	43.158	138.9



<그림 3> 화합물 1(epicatechin)의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, HMBC spectra.



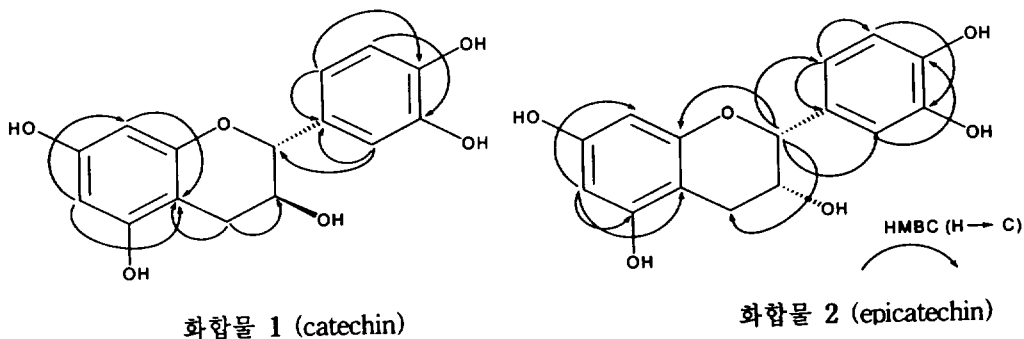
<그림 4> 화합물 2(catechin)의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, HMBC spectra.

<표 2> 화합물 1, 2의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, HMBC 스펙트럼 데이터(in CD<sub>3</sub>OD)

C No.	화합물 1				화합물 2			
	$\delta$ H (multi, J Hz)	$\delta$ C (ppm)	DEPT	HMBC (H→C#)	$\delta$ H (multi, J Hz)	$\delta$ C (ppm)	DEPT	HMBC (H→C#)
2	4.56(d, 7.6)	82.7	CH	9, 2', 6', 3	4.82(s)	79.8	CH	4, 6', 2', 9
3	3.98(ddd, 8.08, 7.82, 5.12)	68.7	CH		4.18(ddd, 3.79, 3.68, 1.48)	67.4	CH	9, 10, 1'
4	2.85 (dd, 16.1, 2.85) 2.51 (dd, 16.1, 8.3)	28.4	CH <sub>2</sub>	2, 3, 8, 9	2.86 (dd, 16.6, 4.64) 2.74 (dd, 16.6, 2.92)	29.2	CH <sub>2</sub>	10, 2, 3
5		157.4	C			158	C	
6	5.93(d, 2.2)	96.2	CH	8	5.92(d, 2.2)	96.2	CH	5, 8, 10
7		157.2	C			157.6	C	
8	5.86(d, 2.2)	95.4	CH	5, 6, 10	5.94(d, 2.2)	95.9	CH	6, 7, 10
9		156.8	C			157.3	C	
10		100.7	C			100	C	
1'		132.1	C			132.3	C	
2'	6.72 (dd, 8.04, 1.96)	120	CH	2, 3', 2'	6.76 (dd, 8.54, 1.96)	119.3	CH	1', 6', 4'
3'	6.75(d, 8.04)	116.1	CH	4', 6'	6.8(d, 8.54)	115.8	CH	1', 4', 2
4'		146.2	C			145.9	C	
5'		146.1	C			145.7	C	
6'	6.84(d, 1.96)	115.1	CH	2', 3', 4', 2	6.98(d, 1.96)	115.3	C	3, 2', 4'

하는 것으로 판단된다. 또한 <sup>13</sup>C스펙트럼으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. DEPT의 자료로부터 <sup>13</sup>C스펙트럼에 나타난 15개의 탄소 중 4급 탄소가 7개, CH가 7개, CH<sub>2</sub>가 1개라는 것을 알 수 있었다. 두 화합물의 가장 큰 차이는 화합물 1인 경우 2번탄소에 붙어있는 수소피크가 doublet으로 쪼개진 반면에 화합물 2인 경우 singlet으로 나타났다. 이러한 현상은 2번과 3번 탄소에 붙어 있는 수소들의 각도에 의한 결과로 보여 진다. 화합물 1인 경우 2번 탄소와 3번 탄소에 붙어있는 수소가 *trans*형태로 존재하며, 화합물 2인 경우 *cis* 형태로 존재하는 것으로 판단된다. HMBC의 결과로부터

화합물 1과 2의 구조를 예상할 수 있다. 화합물 1인 경우 화학적 이동 4.56 ppm의 수소(H-2)로부터  $\delta$  156.8인 4차탄소(C-9)와  $\delta$  120인 탄소(C-2')와 상관관계를 나타내는 것으로 보아 두 골격이 탄소 C-2와 C-1'이 연결되어 있음을 알 수 있었고, 2.85 ppm의 수소(H-4)로부터  $\delta$  100.7 (C-10)과 상관관계를 나타내는 것으로 보아 C-4와 C-10이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실들로부터 화합물 1은 catechin으로 확인되었다(그림 5). 화합물 2인 경우 또한 HMBC 결과로부터 epicatechin으로 확인되었다(그림 5).



화합물 1 (catechin)

화합물 2 (epicatechin)

<그림 5> 화합물 1과 2의 중요한 HMBC 상호관계.

개가시에서 분리한 화합물의 항산화 능력을 알아보기 위해 DPPH 실험을 행하였다. 그 결과 두 화합물 모두 대조군으로 사용한 녹차보다 더 좋은 능력을 보였고, 두 화합물 중에서도 catechin이 더 좋은 항산화 활성을 보였다 (표 3). 대조군인 녹차추출물의  $SC_{50}$ 이  $6.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 인데 비하여, catechin 및 epicatechin의  $SC_{50}$ 은 각각  $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  및  $2.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

개가시나무에서 추출해낸 항산화물질의 항산화 정도를 확인하였다. 그리고 NMR 스펙트럼 분석을 통한 구조 동정으로 개가시 나무에서 추출한 항산화물질은 녹차잎에 주요 성분으로 함유된 catechin과 epicatechin임을 확인을 하였다. 개가시나무의 항산화성분으로 catechin과 epicatechin이 밝혀진 것은 이번이 처음이다.

<표 3> Catechin, epicatechin의 DPPH 소거 활성 효과.

sample name	DPPH inhibition(%)			$SC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	10 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	2 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
녹차추출물	94.606	30.305	6.767	6.3
catechin	95.228	61.922	39.549	2.0
epi-catechin	94.398	52.521	35.138	2.8

## 결 론

제주의 식물자원인 개가시 나무의 줄기를 이용한 천연항산화제 개발에서 좋은 항산화활성을 확인하고 개가시 나무에서 추출, 분획 등의 과정을 거쳐 항산화 물질을 분리해내었다. 추출해낸 물질로써 녹차를 대조군으로 하여 DPPH 라디칼 제거 활성 실험을 시행하여

## 참 고 문 헌

- Giese, J. *Food Technol.* 1996, 5, 73.
- Pszcczola, D. E. *Food Technol.* 2001, 55, 51.
- Frankel, E. N. *Food Chem.* 1996, 57, 51.
- Son, J. Y.; Rhim, J. H. ; Son, H. S. *Korean J. Food Nutr.* 1995, 8, 88.
- Kim, K.H. ; Choi, M. H. *Korean J. Posthavest.* 1999, 5, 121.
- Tachi, Yasuhide. ; Kamano, Yashiaki. ; Sawada, Jiro. ; Tanaka, Ichiro. ; Itokawa, Hideji. *Yakugaku Zasshi.* 1976, 96, 1213.
- Itokawa, Hideji. ; Tachi, Yasuhide.; Kamano, Yashiaki. ; Iitaka, Yoichi. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 1978, 26, 331.