

솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리

부용출* · 전체옥 · 오지연

태평양 중앙연구소

초록 : 솔잎으로부터 프리 라디칼 소거 작용이 있는 물질을 분리하고, 여러 기기 분석 결과에 근거하여 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone으로 동정하였다. 아울러 xylose와 glycine의 Maillard 반응을 통하여 이 물질을 합성하였다. 이 물질은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 프리 라디칼에 대해 소거 작용을 보였으며(100 M의 DPPH의 50%를 환원 시키는데 필요한 농도, 즉 $SC_{50}=26 \mu M$) 이는 구조적으로 유사한 공지의 항산화 물질인 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone($SC_{50}=53 \mu M$)과 3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone($SC_{50}=4.0 mM$)에 비해 강력한 것이다. 4-Hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone은 3,4-dihydroxyphenylalanine과 linolenic acid의 자동 산화에 대해서 억제 작용을 나타내었다(1994년 7월 26일 접수, 1994년 8월 2일 수리).

서 론

식물체는 다양한 형태의 항산화 물질을 함유하고 있으며¹⁾ 이들로부터 분리된 항산화 물질들은 각종 프리 라디칼이 관여하는 것으로 여겨지고 있는 노화 관련 질환들에 대하여 유익한 작용을 할 것으로 기대되고 있다.^{2,3)} 본 연구자들은 약물학적으로 유익한 천연 항산화제를 찾기 위한 연구를 수행하여 오고 있으며⁴⁾ 본 보에서는 이러한 연구의 일환으로 진행된 솔잎의 항산화 성분에 관한 연구 결과를 보고하고자 한다.

솔잎은 예로부터 중풍을 예방하고 건위, 보혈작용이 있으며, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같은 노화 관련 질환을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔다.⁵⁾ 또한 솔잎의 추출물이 유지의 자동 산화를 억제하는 항산화 작용이 있다고 보고된 바 있다.⁶⁾

재료 및 방법

기기 및 시약

녹는점 측정에는 Thomas Hoover capillary melting point apparatus를, 원소 분석에는 Carlo-erba elemental analyzer model 1106을 이용하였다. EI-MS 스펙트럼은 JEOL JMS-DX 303 spectrometer로 측정하였다. UV 및 IR 스펙트럼은 각각 CECIL CE5500 spectrometer와 BIO-RAD FTS-40 spectrometer를 이용하여 측정하였으

며 ¹H- 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 BRUKER AM 500 spectrometer를 이용하여 얻었다. HPLC 분석에는 Thermo separation products사의 CM 4100 pump, SM 5000 detector를 이용하였다. 특별히 언급하지 않은 경우 시판 일급 시약을 그대로 사용하였다.

솔잎으로부터 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리

수원 근교 야산에서 채취한 솔잎(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini)을 풍건한 것 100 g에 10배 부피의 50% 수용성 에탄올을 가하고 3시간 환류 추출하였다. 그 추출액을 감압 농축하여 얻은 추출물 23.2 g을 물 500 ml에 분산시키고 동 부피의 초산에틸로 3회 분배 추출하였다. 초산에틸층을 모아 농축 증발시켜 얻은 물질 6.4 g에 대해서 Lichrosorb RP-18 column(Merck, 7×45 cm)을 이용한 크로마토그래피를 실시하여(용리액, 5% 수용성 아세트니트릴) compound-A(4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone), 40 mg를 얻었다.

Colorless needles from methanol; mp. 120~121°C; C₅H₆O₃, calculated, C(52.62%), H(5.30%), O(42.08%); found, C(52.48%), H(5.50%); UV λ_{max} (MeOH) 290 nm ($\epsilon=9150$); IR ν_{max} cm⁻¹(KBr) 3190, 2953, 1698, 1639, 1461, 1315, 1195, 1145, 999, 920, 704; ¹H-NMR, (DMSO-d₆) δ 2.11(3H, s), 4.51(2H, s), 8.31(1H, s); ¹³C-NMR(DMSO-d₆) δ 13.12, 72.58, 134.56, 173.03, 195.48;

Key words : pine needles, *Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini, 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone, antioxidant

*Corresponding author : Y.-C. Boo

EI-MS, m/z(%) 114(M⁺, 85.8), 85(1.9), 71(4.8), 55 (16.0), 43(100)

Maillard 반응에 의한 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 합성

Xylose와 glycine을 각 0.25 mole씩 함유한 수용액 1 리터를 120°C에서 2시간 반응시킨 후 솔잎 추출물의 경우와 동일한 방법으로 정제하여 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone 약 1.2g을 얻었다.

프리 라디칼 소거 작용

100 μM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(Sigma) 프리 라디칼과 여러 농도의 시료를 함유한 에탄올 용액 2 ml를 37°C에서 30분간 정치한 후 516 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁷⁾

3,4-Dihydroxyphenylalanine의 자동 산화에 대한 억제 작용

500 μM의 3,4-dihydroxyphenylalanine(Sigma)과 여러 농도의 시료를 함유한 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.8) 2.0 ml를 37°C에서 48시간 동안 정치한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁸⁾

Linolenic acid의 자동 산화에 대한 억제 작용

7.2 mM의 linolenic acid(Sigma), 10 mg/ml의 Tween-20 그리고 여러 농도의 시료를 함유한 0.2 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4) 1.0 ml를 37°C에서 24시간 동안 대기 중에 정치하였다. 그 반응액 중 0.1 ml를 취하고 9.7 ml의 80% 에탄올로 희석한 후 0.1 ml의 30% ammonium thiocyanate와 0.1 ml의 5% ferrous ammonium sulfate-3.5% HCl를 가하여 섞고 3분 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁹⁾

결과 및 고찰

지질 과산화의 연쇄 반응 등에 관여하는 산화성 프리 라디칼을 소거함으로써 또는 환원력에 의해 항산화 작용을 하는 물질을 검색함에 있어서, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 프리 라디칼이 이용될 수 있다.¹⁰⁾ 이 라디칼은 환원되어 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine의 형태로 되면서 탈색되며 516 nm에서의 흡광도 감소로 이를 측정할 수 있다. 솔잎의 50% 수용성 에탄올 추출물은 ascorbic acid와 α-tocopherol에 비해 다소 높은 농도에서 이 프리 라디칼을 소거하는 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Scavenging effect of pine needle extract against DPPH free radicals

materials	SC ₅₀ (μg/ml)
pine needle extract	16
ascorbic acid	3.3
α-tocopherol	9.5

The ethanolic solution of 100 μM of DPPH free radicals with the addition of test materials was kept at 37°C for 30 min, and then the absorbance was measured at 516 nm. SC₅₀ denotes the concentration of the material which is required to scavenge 50% of 100 μM DPPH radicals.

Table 2. Carbon-carbon coupling constants of compound-A

chemical shifts (ppm)	C-C coupling constants (Hz)
13.12	49.9
72.58	42.6
134.56	61.6 90.4
173.03	49.9 90.4
195.48	61.6 42.6

이 추출물에 대해서 용매 분획과 액체 크로마토그래피를 실시하여 그 유효 성분으로 compound-A(mp 120~121 °C)를 분리하였다.

이 화합물은 원소 분석 결과 그 화학식이 C₅H₆O₃(분자량 계산치, 114.0317)인 것으로 추정되었으며 고해상 MS스펙트럼에서 이를 확인하였다(m/z, 114.0311, M⁺). IR스펙트럼에서 O-H, C-H, C=O, C=C기의 존재를 추정할 수 있었다(v_{max} cm⁻¹: 3190, 2953, 1698, 1639). ¹H-NMR 스펙트럼에서 3종의 서로 다른 환경에 놓인 수소들의 존재를 알 수 있었으며(δ, ppm: 2.11(3H, s), 4.51(2H, s), 8.31(1H, s)) 중수 치환 실험에서 8.31 ppm의 피크가 소실됨이 관찰되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 5종의 탄소의 존재가 확인되었고(δ, ppm: 13.12, 72.58, 134.56, 173.03, 195.48), 이들 탄소와 수소들 간의 coupling 양상으로 보아 13.12 ppm과 72.58 ppm에 해당하는 탄소는 각각 methyl, methylene기의 형태로 존재함을 알 수 있었다. 또 탄소들간의 coupling constants를 측정하여 13.12-173.03-134.56-195.48-72.58 ppm의 탄소순으로 연결되어 있음을 알 수 있었다(Table 2). 이상의 기기 분석 결과에 근거하여 이 화합물은 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone으로 동정되었다(Fig. 1). 이 화합물은 몇몇 종의 식물체에서도 드물게 발견되며¹¹⁾ 당류와

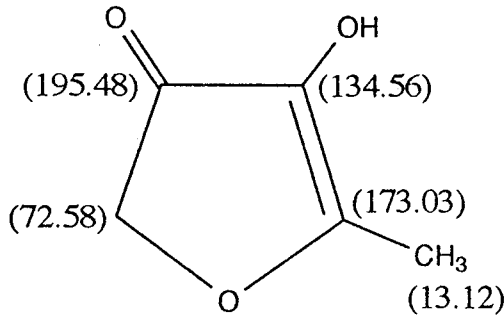


Fig. 1. Structure of compound-A isolated from pine needles. The chemical shifts of NMR carbon signals are shown in parentheses.

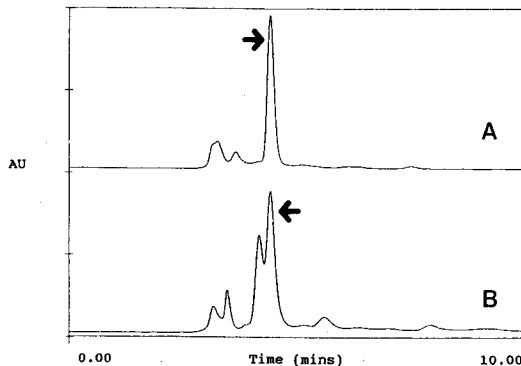


Fig. 2. Typical HPLC traces obtained from the xylose/glycine reaction mixture (A) and the pine needle extract (B). The peaks of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone are indicated by arrows [column, Lichrosorb RP-18 (4.6×250 mm); eluent, 5% aqueous acetonitrile (1.0 ml/min); detection, absorbance at 254 nm].

아미노산류의 Maillard반응에 의해서도 합성되는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 본 연구에서도 xylose와 glycine의 반응을 이용하여 이 화합물을 합성할 수 있었다(Fig. 2).

4-Hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone은 DPPH 프리 라디칼에 대하여 소거 작용을 보였다(100 μ M의 DPPH의 50%를 환원 시키는데 필요한 농도, 즉 SC_{50} =26 μ M). 이는 구조적으로 유사하고 그 항산화 작용이 보고된 바 있는 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone¹³⁾ (SC_{50} =53 μ M)과 3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone¹⁴⁾ (SC_{50} =4.0 mM)에 비해 매우 강력한 것이다(Table 3). 또한 3,4-dihydroxyphenylalanine(Dopa)의 자동 산화에 대한 억제 작용을 조사하여 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone(500 μ M)의 Dopa의 자동 산화를 50% 억제 시키는데 필요한 농도,

Table 3. DPPH free radical scavenging activity

compounds	SC_{50} (μ M)
4hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone	26
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone	53
3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone	4000

The ethanolic solution of 100 μ M of DPPH free radicals with the addition of each compound was kept at 37°C for 30 min, and then the absorbance was measured at 516 nm. SC_{50} denotes the concentration of the compound which is required to scavenge 50% of 100 μ M DPPH radicals.

Table 4. Antioxidative activity against the Dopa auto-oxidation

compounds	IC_{50} (μ M)
4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone	530
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone	1100
3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone	25000

For the assay of antioxidative activity against the Dopa autoxidation, the reaction mixture (2.0 ml) containing 500 μ M Dopa and 50 mM potassium phosphate (pH 6.8) in the presence of each compound at various concentrations was incubated for 48 hours at 37°C, and then the absorbance at 475 nm was measured. IC_{50} denotes the concentration of the compound which is required to inhibit 50% of the autoxidation of 500 μ M Dopa.

즉 IC_{50} =530 μ M), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone(IC_{50} =1.1 mM), 3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone(IC_{50} =25 mM)의 순으로 항산화력이 강함을 알 수 있었다(Table 4). 이 결과로부터 DPPH 프리 라디칼에 대한 소거 작용과 Dopa의 자동산화에 대한 항산화 작용이 일차적인 상관 관계가 있고, 또한 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone이 상대적으로 강력한 항산화 성분임을 알 수 있었다. 4-Hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone은 linolenic acid의 자동산화 모델에서도 항산화 작용을 보였다. 즉 7.2 mM의 linolenic acid를 함유한 인산 완충액에 시료를 첨가하여 37°C에서 24시간 대기 중에 방치한 후 지질의 과산화물을 ferric thiocyanate 방법으로 측정된 결과, 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone은 280 μ M의 농도에서 과산화 반응을 90% 이상 억제하였다. 이는 ascorbic acid에 비해 강력한 것이다(Table 5).

한편 활성 산소를 비롯한 산화성 프리 라디칼은 정상적인 세포 대사 과정, 약물 대사 과정, 허혈 재관류, 자외선 등에 의해 세포내에서 지속적으로 생성될 수

Table 5. Inhibitory effect on the autoxidation of linolenic acid

compounds	IC ₉₀ (μM)
4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone	280
ascorbic acid	710

The reaction mixture (1.0 ml) containing 7.2 mM linolenic acid, 10 mg/ml Tween-20 and 0.2 M potassium phosphate (pH 7.4) in the presence of each compound at various concentrations was incubated for 24 hours at 37°C. Then the lipid peroxidation was measured by a ferric thiocyanate method. IC₉₀ denotes the concentration of the compound which is required to inhibit 90% of the oxidation.

있으며¹⁵⁾ 따라서 생체는 프리 라디칼 반응의 유해 효과에 항상 노출되어 있다고 볼 수 있다. 특히 세포의 연령 증가에 따라 그 유해 효과가 점진적으로 축적되어 각종 노화 관련 질환을 유발하는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾ 본 연구는 이러한 생체의 노화 관련 질환에 대응할 수 있는 물질을 찾기 위한 노력의 일환으로 진행되었으며, 그 결과로 술잎으로부터 프리 라디칼 소거 작용이 뛰어난 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone을 분리할 수 있었다. 이 화합물은 술잎에서는 처음으로 분리된 것이며, 또 이 화합물의 항산화 작용에 대해서는 아직까지 연구된 바 없는 것으로 조사되었다. 이에 본 연구자들은 향후 이 화합물의 항산화 작용을 응용하기 위한 연구들을 계속할 계획이다.

참 고 문 헌

- Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry* 27(4), 969-978
- Lettron, P., G. Labbe, C. Degott, A. Berson, B. Fromenty, M. Delaforge, D. Larrey and D. Pessayre (1990) Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice, *Biochem. Pharmacol.* 39, 2027-2034
- Masuda, T., A. Jitoe, J. Isobe, N. Nakatani, and S. Yonemori (1993) Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*, *Phytochemistry* 32(6), 1557-1560
- Boo, Y. C. and C. O. Jeon (1993) Antioxidants of Theae Folium and Moutan Cortex, *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 36(5), 326-331
- 김완희 (1983) *최신 동의 보감*, p.960, 태평양출판공사, 서울, 한국
- 백태홍, 이민수, 이준홍 (1987) 송엽중의 항산화성 물질이 리놀산의 광산화에 미치는 영향, *한국 유화학회지*. 4(2), 25-30
- Fujita, Y., J. Uehara, Y. Morimoto, M. Nakashima, T. Hatano and T. Okuda (1988) Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids, *Yakugaku zasshi* 108(2), 129-135
- Joshi, P. C., C. Carraro and M. A. Pathak (1987) Involvement of reactive oxygen species in the oxidation of tyrosine and dopa to melanin and in skin tanning, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142(1), 265-274
- Igarashi, K., M. Itoh and T. Harada (1990) Major antioxidative substances in leaves of Atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica comoestris* L., *Agric. Biol. Chem.* 54, 1053-1055
- Smith, R. C., J. C. Reeves, R. C. Dage and R. A. Schnettler (1987) Antioxidant properties of 2-imidazolones and 2-imidazolthiones, *Biochem. Pharmacol.* 36, 1457-1460
- Idstein, H. and P. Schreier (1985) Volatile constituents from Guava (*Psidium guajava*, L) fruit, *J. Agric. Food Chem.* 33, 138-143
- Heibl, J., F. Ledl and T. Severin (1987) Isolation of 4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-3(2H)-furanone from sugar amino acid reaction mixtures, *J. Agric. Food Chem.* 35, 990-993
- Eiserich, J. P., C. Macku and T. Shibamoto (1992) Volatile antioxidants formed from an L-Cysteine/D-glucose Maillard model system, *J. Agric. Food Chem.* 40, 1982-1988
- Han, B. H., M. H. Park, L. K. Woo, W. S. Woo, and Y. N. Han (1979) Studies on the antioxidant components of Korean ginseng[I], *Korean Biochem. J.* 12(1), 33-40
- Halliwell, B. and M. Grootveld (1987) The measurement of free radical reactions in humans; some thoughts for future experimentation, *FEBS LETTERS*, 213(1), 9-14
- Lunec, J. (1990) Free radicals; Their involvement in disease processes, *Ann. Clin. Biochem.* 27, 173-182

Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from Pine Needles as an Antioxidative Principle

Yong-Chool Boo*, Che-Ok Jeon, and Ji Yeon Oh, Pacific R & D Center, San #1, Bora-ri, Kiheung-eup, Yongin-kun, Kyounggi-do, Korea, 449-900

Abstract : An antioxidant was isolated from pine needles. This compound was identified as 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone on the basis of spectroscopic evidences and by the comparison with the synthetic one from the Maillard reaction of xylose and glycine. It scavenged 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals more efficiently than 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone and 3-hydroxy-2-methyl- γ -pyrone did. It exhibited inhibitory effects on the autoxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine and linolenic acid.