

Effective extraction of antioxidative oligomeric proanthocyanidins from mountain grape seeds

Yun-Suk Huh, Won Hi Hong, Tae Hee Hong*

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon 305-701, Korea and

*Department of food & nutrition, Daejeon health science college, Daejeon 300-711, Korea

TEL: +82-42-869-3959, FAX: +82-42-869-3910

Abstract

The interest of oligomeric proanthocyanidins(OPCs) as therapeutic agents against diseases involving radical damage is growing. Proanthocyanidins are a class of polyphenolic compounds in several plant species and are oligomers of flavan-3-ol monomer units. Polyphenols in green and black tea, grape seeds, grapes and wine have raised much attention but mountain grape seed has not been investigated intensively up to now. This study investigated the total OPCs contents and the total antioxidant activity of mountain grape seeds. Total antioxidant activity using DPPH method was employed and OPCs contents were determined by means of the UV-VIS spectrophotometer. The total OPCs yield of mountain grape seeds was about 1.45 % and total antioxidant activity was 15.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Introduction

OPCs에 대한 연구는 1940년대 이후로 소나무, 포도씨 등으로부터의 기능성 물질에 관해 언급된 연구 논문 및 특허 외에 수없이 많은 연구논문이 있으며, 현재에도 계속 세계 각처에서 연구되고 있다. Lazarus 등의 최근 연구에 의하면, 1량체에서 12량체에(V. A. P. Defreitas *et al.* 1998)이르는 다양한 proanthocyanidin이 포도씨, 사과, 계피, 땅콩, 아몬드 등에(J. Yamakoshi *et al.* 2002) 존재하는 것으로 밝혀졌다(Lazarus *et al.*, 1999). 또한, proanthocyanidin은 유해산소의 작용을 차단하는 항산화력(抗酸化力)이(J. Wollgast & E. Anklam 2000) 비타민 C나 인공 항산화제(BHA)보다 50배 이상 우수한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 머루씨로부터 proanthocyanidin 물질을 추출 정제하여 각종 질병을 예방치료하고 더 나아가서 노화를 지연할 수 있는 제품을 산업화하는 공정을 개발하는 것이 목적이다.

머루는 포도과에 속하며 야생 포도라 부르는 넝쿨성 목본 식물로 해발 100~1,300m 지역의 산기슭에서 10m 안팎까지 자란다. 머루의 성분은 칼슘, 인, 철분, 회분들의 성분이 포도보다 10배 이상 성분이 높고 특히 항산화 작용을 하는 안토시아닌 성분이 다량 함유되어 있다. 이러한 머루는 일본, 중국, 만주등지의 일부 국한된 지역에서 야생 또는 재배되고 있기 때문에 국내외 학자들에 의한 머루씨 종자 연구는 아직 미흡한 상황이다.

천연 항산화물질이 함유된 포도종실 추출물의 제조방법에 대한 연구는 이미 많이 이루어져 있으며 한국 공개특허 제99-035867호에서는 한외여과 방식, 역삼투압 방식 및 상기 2가지 방식의 조합방식으로 프로안토시아닌의 추출 및 단리방법을 개시하고 있다. 그러나, 이들 방법에는, 사용 용매에 염소계의 용매가 포함되어 있고, 또한 용매 조성이 복잡하기 때문에 용매의 회수 재사용이 어렵고, 또한 이동상에 농도 구배를 적용하는 기울기 용출법이 필수로 되는 등의 문제가 있으므로, 이들 방법은 안전성이나 경제성의 면에서 대량 정제를 목적으로 하는 공업적 분리 방법으로는 적합하지 않다. 또한 프로안토시아닌 올리고머의 분리에는 세파덱스(Sephadex) LH-20이나 셀룰로스 분말 또는 셀라이트(Celite) 등이 연구목적으로 이용되고 있으나 비용이 많이 드는 단점이 있어 산업적으로는 거의 활용되지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 분쇄된 과실을 에탄올 혼합용매에 첨가한 다음, 40℃에서 환류 추출하여 농축시킨 과실추출물을 알킬벤젠계 폴리머로 구성된 대공 흡부수지에 얹은 다음, EtOH 함량이 20 %, 70 %, 95 %의 농도구배를 갖는 물과 EtOH의 혼합용매로 순차적으로 proanthocyanidin화합물을 용리 시킴으로써 얻을 수 있다. 본 실험에서는 대공 흡부수지를 사용함으로써 세파덱스 LH-20(L. Y. Foo *et al.* 1997; J. Wollgast & E. Anklam 2000)이나 셀룰로스 또는 셀라이트에 비하여 저렴하고 간단한 조작만으로 재사용이 가능하여 안전할 뿐만 아니라 산업적으로 활용될 수 있는 이점이 있다.

Materials and Methods

Wild grape seeds

본 실험에 사용한 머루씨는 대전 판암동 근교의 농가에서 머루 가공품의 부산물로 발생하는 머루씨를 얻어 실험에 사용하였다.

Extraction

분쇄한 머루씨(200 g)를 80 % EtOH(600 ml)(F. Romeyer1984; B. Pekic *et al.*

1997; J. Yamakoshi *et al.* 2002)로 80 °C에서 6시간동안 2회 추출한 후, 여과 농축하여 머루씨 추출물을 얻을 수 있었다. 추출물을 얻은 후, open column에 적용하기 전에 전체적인 수율 및 proanthocyanidins 물질 확인을 위해 TLC(L. Y. Foo *et al.* 1997; S. A. Lazarus *et al.* 1999; J. Wollgast & E. Anklam 2000), DPPH(P. Trouillas *et al.* 2003) 및 vanillin reagent(J. Wollgast & E. Anklam 2000; B. Pekic *et al.* 1997; R. B. Broadhurst & W. T. Jones 1978)로 정성 및 정량분석을 실시하였다.

Chromatography

포도씨나 머루씨에는 poly-phenol 성분들을 다량함유하고 있으며 보통 수용성보다는 지용성을 띤다. 따라서 resin을 선택할 때는 분리하고자 하는 물질의 특성에 따라 resin을 선택하여 사용해야 한다. 본 실험에서는 흡착제의 역할을 할 수 있는 AB-8 macro-porous polymer resin(China, tsinghua Univ.)을 사용하였다. column 작업을 하기 위해서 우선 resin을 충전 시킨 후, 95 % EtOH을 흘려보낸 후, 100 % 증류수 세척하여 사용하였다. equilibrium된 resin에 머루씨 농축액을 resin에 흡착되도록 흘려 보낸다. 용출용매로는 EtOH 20 %, 60 %, 95 %의 농도 구배를 통해서 분획하였다. 또한 column 실험을 수행한 이후에도 TLC, DPPH 및 vanillin reagent로 정성 및 정량분석을 실시하여 최종 수율을 확인한다.

Analysis

추출하는 각 단계에서 정성 및 정량 분석을 위해 TLC(silica gel 60 TLC, Merck, Darmstadt, Germany), DPPH 및 vanillin reagent를 적용하였다.

Silica-TLC 추출하는 각 단계에서 OPCs의 확인을 위해 TLC를 이용하였다. 표준 물질은 1 mg/ml catechin(Sigma co., USA)를 사용하였다. 전개용매는 Toluene/acetone/acetic acid(3:3:1, by vol.)로 전개하였으며, OPCs의 spot은 UV lamp(280 nm)나 vanillin-HCl(G. L. Lees *et al.* 1994)로 확인하였다.

Reagent with vanillin OPCs의 정량은 vanillin method를 이용하였다. vanillin 방법은 Solution A(30 % v/v H₂SO₄ in methanol)과 Solution B(1 % m/v vanillin in methanol)을 제조하여 사용하기 바로 전에 1:1 비율로 혼합하여 이용한다. 표준물질로는 (+)-catechin을 사용하였으며 흡광도는 510 nm에서 측정하였다.

DPPH(항산화반응) DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내며 polyphenol 물질의 활성 측정에 널리 이용되고 있다.

Results and Discussions

머루씨의 추출 농축액을 컬럼에 얹은 후 용출용액을 20, 70, 95%로 농도구배를 주어 OPCs를 용출하였다. 20% 용출분획을 TLC에서 확인한 결과 OPCs의 모노머형태인 카테킨물질은 검출되지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 70, 95%용출분획에서는 카테킨 물질이 높은 농도로 검출됨을 볼 수 있었다. 또한 70%용출분획의 활성도는 인공항산화제(BHA)보다 10배정도 높은 활성도를 보임을 알 수 있었다. 95%용출분획은 보다 낮은 활성도를 보이고 있는데 이는 항산화 능력이 우수한 OPCs가 완전 지용성 성질을 띠기보다는 지용성과 수용성의 중간성질을 가지면서 극성을 보이기 때문으로 사려된다. Table 1에서 보는 바와 같이 건조무게 500g의 샘플을 칼럼실험 후 최종 수율은 2.24%로서 매우 높은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 항산화 능력인 IC₅₀값이 15.8 $\mu\text{g/ml}$ 과 33.7 $\mu\text{g/ml}$ 로 인공항산화제(BHA)보다 우수한 활성을 보임을 알 수 있었다.

Table 1. Extraction table

Extraction step	Total mass (g)	Yield ^a (%)	Activity IC ₅₀ ^b ($\mu\text{g/ml}$)
Dried seeds	500	-	-
Crude extract	12.48	2.5	25.3
70 % Elution	7.25	1.45	15.8
95 % Elution	3.93	0.79	33.7

a Yield is based on the total dried seeds. b Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

References

1. Broadhurst, R. B., Jones, W. T. (1978), Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin, *J. Sci. Food Agric.* **29**, 788-794.
2. Defreitas, V. A. P., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. (1998), Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry, *Phytochemistry* **49**, 1435-1441.
3. Foo, L. Y., Lu, Y. McNabb, W. C., Waghorn, G., Ulyatt, M. J. (1997), Proanthocyanidins from lotus pedunculatus, *Phytochem.* **45**, 1689-1696.
4. Lees, G. L., Hinks, C. F., Suttill, N. H. (1994), Effect of High Temperature on Condensed Tannin Accumulation in Leaf Tissues of Big Trefoil(*Lotus uliginosus* Schkuhr), *J. Sci. Food Agric.* **65**, 415-421.

5. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3693-3701.
6. Lazarus, S. A., Adamson G. E., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. (1999), High performance
7. Wollgast, J., Anklam, E. (2000), Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food res. Int.* **33**, 423-447.
8. Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E., Revilla, E. (1997), Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds, *Food Chem.* **61**, 201-206.
9. Romeyer, F. (1984), Les composés phenoliques du raisin, *Vitis vinifera*: evolution au cours de la maturation et consequences technologiques, These de 3 eme cycle. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc.
10. Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., Duroux, J. L. (2003), Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas, *Food Chem.* **80**, 399-407.
11. Yomakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., Kikuchi, M. (2002), Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Food Chem. Toxicol.* **40**. 599-607.
12. 던컨켈빈 (1999), 식물에서 채취한 재료로부터 프로안토시아니딘을 추출하는 방법, Korean Patent, 10-1999-0035867.