

가자(*Terminalia chebula* Retz) 추출물의 항산화 효과

장성준 · 이기동 · 김정숙 · 윤형식

경북대학교 농과대학 식품공학과

Antioxidative Effectiveness of *Terminalia chebula* Retz Extracts

Sung Jun JANG · Gee Dong LEE · Jeong Sook KIM · Hyung Sik YOON

Dept. of Food Sci. and Tech., Coll. of Agriculture
Kyungpook National University.

Abstracts

In this study, antioxidative effectiveness of BHA, BHT at 0.02% (w/w) was compared with those of separated free phenolic acid, ester form and insoluble bound phenolic acid which were extracted from 50 g of *Terminalia chebula* Retz by MeOH/aceton solvents. Antioxidative effectiveness was measured by peroxide values and TBA values for 7 days, storing respective substrates and contrast tube at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ for 35 days. Laboratory tubes was added by BHA, BHT, separated free, soluble and insoluble phenolic acid extracts and peroxide value of contrast tube after 21 day storage were 60, 30, 14, 11, 100. On the other hand, at the same conditions, TBA values of each antioxidants were 0.150, 0.108, 0.105, 0.073, 0.078, 0.185. This results remarkably appeared antioxidative effectiveness in meal soybean oil substrates. Phenolic acid separated and identified were *p*-coumaric acid, Ferulic acid, Phloroglucinol, Pyrogallol, Vanillic acid and Caffeic acid.

Key words : antioxidants, phenolic acids, terminalia chebula Retz

서 론

식품의 품질 열화는 여러가지 원인으로 알려졌다. 특히 지방질의 산패에 기인하는 경우가 대단히 큰 문제점으로 인식되어 왔다.

이들 지방질의 산패는 식품의 저장성 및 품질에 나쁜 영향을 줄 뿐 아니라, 산화에 의해

생성된 산화 생성물에 의한 인체에 대한 독성이 문제시 되고 있는 실정이다.

이들 지방질 식품의 품질 유지를 위해서 산화방지제 첨가 등과 같은 화학적인 방법이나 공기와의 접촉을 막기 위한 진공포장, 자외선 및 이온화 방사선 조사, 탈산소제의 사용등의 물리적 방법이 식품공업에서 널리 이용되어 왔

다.

특히 요즘에는 인공산화방지제의 독성에 대한 문제점(Seideman, 1976 ; Johnson, 1961)이 많아짐에 따라 천연산화방지물질에 대한 탐색 연구가 이루어지고 있다.

Masako와 Naoko(1982)는 열대식물인 Avocado과피 methanol 추출물의 methylinoleate에 대한 산화 억제 작용을 보고 하였고 Thshiko(1982)는 Glycyrrhizae뿌리의 acetone 추출물이 강한 산화억제 작용이 있음을 보고하였다.

Paik, Hong와 Hong(1982)은 여러가지 유기용매를 이용한 인삼 추출물이 불포화 지방산 methyl ester의 자동 산화 억제작용이 강함을 발표하였고, 윤(1979)은 Xylose와 L-alanine을 이용한 melanoidin반응 생성물이 해바라기유에 대한 산화억제 작용이 있음을 보고 하였다.

Taylor(1980) 등은 Cystein과 Sulfhydryl group을 함유한 10종의 Protein이 인공 산화 방지제인 BHA, BHT보다 강한 산화억제작용이 있으며, Sulfhydryl group이 항산화에 큰 영향을 준다고 추정하였다.

Mahoney(1986) 등은 citric acid와 EDTA등이 기질에서 강력한 산화 촉진제로 작용하는 금속 이온들과 킬레이트 화합물을 형성하여 이들 금속 이온을 자동산화 반응 체계에서 제거함으로써 항산화제의 활성을 강하게 하는 작용이 있음을 보고 하였다.

Shigezo(1981)는 생강, rosemary, sage, mace, clove, marjoram 등의 석유 에테르 가용분이 강한 항산화 효과가 있음을 보고 하였다.

또 Chang과 Matijaseric과 Hasieh과 Huang(1977)은 rosemary의 에테르 추출물이 BHA

(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate) 보다 강한 항산화 효과가 있음을 보고 하였다.

현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 ascorbic acid, tocopherol류, flavonoids와 그 유도체(Naohiko, 1984), 갈변반응 생성물(Beckel, 1983), 아미노산들(Mitsuo, 1982), 펩타이드들, 단백질(Naohiko, 1979) 등이 알려져 있다.

본 실험은 free radical의 활성을 잃게 하거나 생성을 지연시키면 자동 산화의 유도 기간을 연장할 수 있고 산패를 억제할 수 있으리라는 이론적 근거에서 출발하였다.

자신은 산화되면서 공명구조로 안정화 될 수 있는 phenol성 물질을 천연물로 부터 찾아내는 데 목적을 두고 실험을 하였다.

현재까지 알려진 인공 산화방지제인 BHA, BHT의 안정성이 문제시됨으로서 안정성이 확보된 천연 한방재로 부터 항산화성 물질을 추출하여 분리하고, 그 항산화력을 측정하여 그 물질을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

본 실험에 사용한 한방재인 가자(Terminalia chebula Retz)는 수확하여 음건한 것을 한약재상에서 구입하여 실험의 공시 재료로 사용하였다.

각 추출물의 항산화력 측정 기질로서 시판 식용 대두유를 사용하였으며, 기질로 사용한 식용 대두유의 화학적 조성은 Table. 1와 같다.

Table. 1. Properties of the soybean oil used substrate.

Peroxide value(meq/kg oil)	2 ± 0.5
TBA value	0.015 ± 0.005
Iodine value	130 ± 5
Saponification value	190 ± 5
Acid value	0.05

2. 시약 및 분석기기

추출에 사용한 용매들은 시중 특급시약을 구입하여 사용하였고 trimethylsilylation(TMS화)에 사용한 N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide는 Fluka 제품을 사용하였다. phenol성 물질을 확인하기 위한 G. C용 phenol 표준품은 Sigma사 제품을 구입하여 TMS화 한 다음 사용하였다.

사용기기는 TBA를 측정하기 위하여 영국제 Cecil Spectrophotometer를 이용하였고 phenol 산 확인은 Pye Unicam Model number 304 Gas chromatography를 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 대두유의 화학적 조성

과산화물가는 Lea(1949)법을 개량하여 측정하

였으며 TBA(thiobarbituric acid)는 Shahidi (1987)와 Sidewell, Salwin, Henca, Mitchell(1954) 등의 방법을 절충하여 사용하였다. 검화가와 요오드가는 A. O. A. C(1970)법에 준하였다.

2) 탈지 가자시료의 조제

공시재료인 가자의 탈지는 최(1988)의 방법을 개량하여 그림1과 같이 하였다. 구입한 가자열매를 수세, 건조한 다음 제핵, 분쇄하고 0.07mm sieve로 sieving한 후 n-hexane으로 5회 반복 추출하고 건조 후 petroleum ether로 1회 탈지하고 상온에서 건조하여 탈지시료로 하였다.

3) 페놀성 물질의 추출

탈지 시료로부터 페놀성물질의 추출은 Krygier와 Sosulski, Hogge(1982)의 방법에 준하여 그림2와 같이 추출하였다.

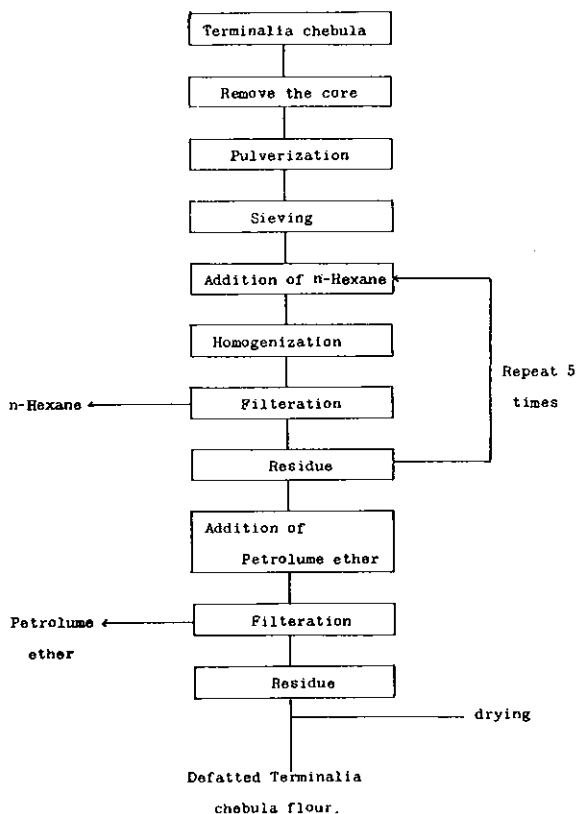


Fig. 1. Preparation of Terminalia chebula Retz flour.

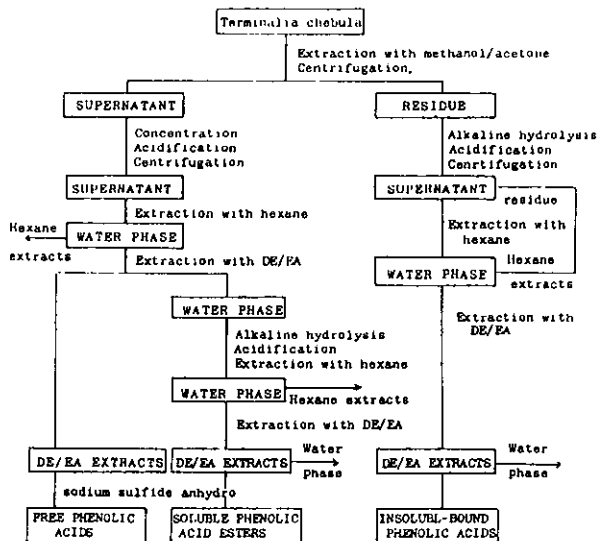


Fig. 2. Procedure for the extraction and separation of the free, esterified, and insoluble-bound phenolic compounds and their hydrolysis to phenolic acids (DE/EA=diethyl ether/ethyl acetate, 1 : 1)

탈지가자 50 g에 Methanol과 Acetone을 1:1 (V/V)로 혼합한 용매를 200ml씩 30분간 5회 반복 추출하여 원심분리하고 Methanol/acetone층과 잔사를 분리하였다.

MeOH/acetone 추출물은 free phenolic acid, soluble ester phenolic acid 추출에 이용하였다.

Free phenolic acids를 얻기 위해 MeOH/acetone액을 150ml까지 40°C 진공하에서 농축하고 6N-HCl로서 pH 2로 조절한 다음 4000rpm에서 30분간 원심 분리하였다.

부유물을 제거하고 n-Hexane은 분액깔대기를 이용하여 유리 지방산과 지방잔유물을 제거하였다.

n-hexane을 제거한 나머지 수층을 Diethylether (DE)/ethyl acetate(EA) 1:1로 5회 반복 추출하여 DE/EA층을 Na₂SO₃로 탈수하고 감압하에서 40°C로 증발 후 잔사를 Methanol 50ml에 녹여 Free phenolic acids로 하였다.

Free phenolic acids를 추출하고 남은 수층은 4N-NaOH 200ml로 4시간 가수분해하고 6N-HCl로 pH 2로 맞춘 후 원심분리하여 수층을 모아 분액 깔대기를 이용하여 n-hexane으로 5회 반복 탈지하였다.

n-hexane을 제거한 다음 DE/EA로 phenolic성 물질을 추출하고 Na₂SO₃로 탈수, 농축하여 ether 냄새가 완전히 사라진 후 Methanol 50ml에 녹여 Soluble ester phenolic acids로 이용하였다.

Insoluble-bound phenolic acid는 Methanol/acetone 추출 잔사 4N-NaOH로 4시간 가수분해하고 6N-HCl로 pH 2로 산성화시킨 다음 원심분리하고 상등액을 분액 깔대기를 이용하여 n-hexane으로 탈지를 하였다.

n-hexane을 제거하고 수층을 DE/EA용매로 200ml씩 5회에 걸쳐 추출한 후 Na₂SO₃로 탈수하고 40°C에서 진공농축하여 ether 냄새가 없어질 때까지 농축한 다음 methanol 50ml에 녹여 insoluble-bound phenolic acids로 사용하였다.

5) 대두유 기질의 조제 및 저장

탈지가자 1g에 준하는 각각의 최종 페놀산 추출물 1ml와 0.02% (W/W) BHA, BHT를 시판 식용 대두유 50g에 잘 혼합하고 용매를 water bath상에서 제거하였다.

Phenolic acids와 인공항산화제를 첨가한 대두유를 petridish에 옮겨 60±1°C의 항온기에 35일간 저장하였다.

6) 항산화력의 측정

저장기간동안 7일 간격으로 과산화물가(POV)와 TBA가를 측정하여 비교함으로써 항산화 효과를 검토하였다.

과산화물가는 Lea(1949)법, TBA가는 Shahidi(1987)와 Sidewell, Salwin, Henca, Mitchell(1954) 등의 방법을 절충하여 측정하였다.

7) 페놀산의 확인

가자 phenolic acids의 확인은 Robert와 Samuel(1982)의 방법에 따라 N.O-bis(trimethylsilyl)acetamide로 TMS화 시킨 후 Gas chromatography로 분석하였다. TMS 유도체는 추출물 2ml를 질소증진하에서 용매를 증발시키고 Pyridine 0.1ml에 녹여 N.O-bis(trimethylsilyl)acetamide 1μl를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 G.C로 분석하였다.

또한 표준물질도 동시에 실시하였다. 각 peak의 확인은 표준물질의 retention time과 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 효과의 비교

1) 과산화물가

저장일수의 경과에 따른 과산화물가의 변화는 그림 3과 같다.

대조구와 추출물 사이의 과산화유도기간을 볼 때 대조구는 14일 경에서 유도기간이 끝나는데 반면 추출물의 경우 35일째에도 유도기간이 진행됨을 볼 수 있었고 인공항산화제인 BHA, BHT는 21일부터 산패가 급격히 일어남을 볼 수 있었다.

식용대두유에 대한 항산화력은 대조구, BHA, BHT, free, soluble, insoluble-bound phenolic acid의 순서로 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 세가지 공히 인공항산화제인 BHA, BHT보다 강한 항산화력이 있음을 알 수 있었다.

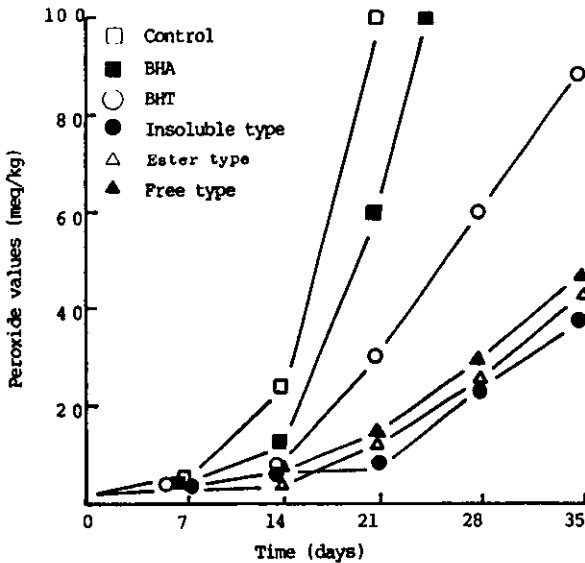


Fig. 3. Variations of Peroxide value of *Terminalia chebula* Retz.

2) TBA가의 변화

저장일수 경과에 따른 TBA가의 변화는 그림

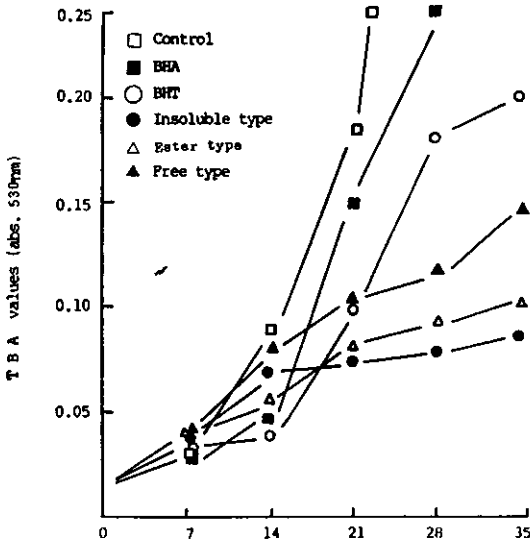


Fig. 4. Variations of TBA value of *Terminalia chebula* Retz.

세가지형의 추출물 공히 인공항산화제인 BHA, BHT보다 강한 항산화력이 있음을 볼 수 있었다. BHA, BHT의 경우 21일 이전에 산패가 시작된 반면 세가지 추출물 공히 유효기간이 계속됨을 볼 수 있다.

이로 미루어 보아 가자추출물은 식용대두유에서 저장성을 높여줌을 알 수 있었다. 백 (1982)은 인삼으로 부터 여러가지 유기용매로 추출하여 항산화력을 측정하여 볼 때 chloroform과 methanol을 2:1로 추출한 추출물의 항산화력과 가자의 Methanol/acetone 추출물의 항산화력이 비슷함을 볼 수 있었고 다른 유기용매 추출물 보다는 강함을 볼 수 있었다.

3) Phenolic acids의 확인

가자 추출물에 존재하는 phenolic acids의 종류는 gas chromatography로 확인하였다. 사용되는 G. C의 검출기로서 FID를 사용했고 column은 chromosorb W 3% OV 17를 사용하였고 오븐온도는 130-170-200-210°C까지 승온하였다. 주입구의 온도는 260°C였고 검출기의 온도는 270°C로 하였다. Carrier gas는 N₂ gas를 30ml/min로 하였으며 chart 속도는 10mm/min로 하였다. 각각의 G. C chromatogram은 그림 5에 나타내었다.

Gas chromatography로 부터 분리확인된 phenolic acids는 free에서 ferulic acid, vanillic acid, p-coumaric acid였고, soluble에서 caffeic acid, vanillic acid, p-coumaric acid였으며, insoluble에서 caffeic acid, phloroglucinol, pyrogallol으로 확인되었다.

요 약

탈지 가자박으로 부터 free, soluble 및 insoluble bound phenolic acids를 추출하여 식용대두유 기질에서 항산화효과를 0.02% (w/w)의 BHA, BHT의 항산화 효과와 비교하고자 각 기질과 대조구를 60±1°C에서 35일간 저장하면서 매 7일 간격으로 과산화물가, TBA가를 측정하였다.

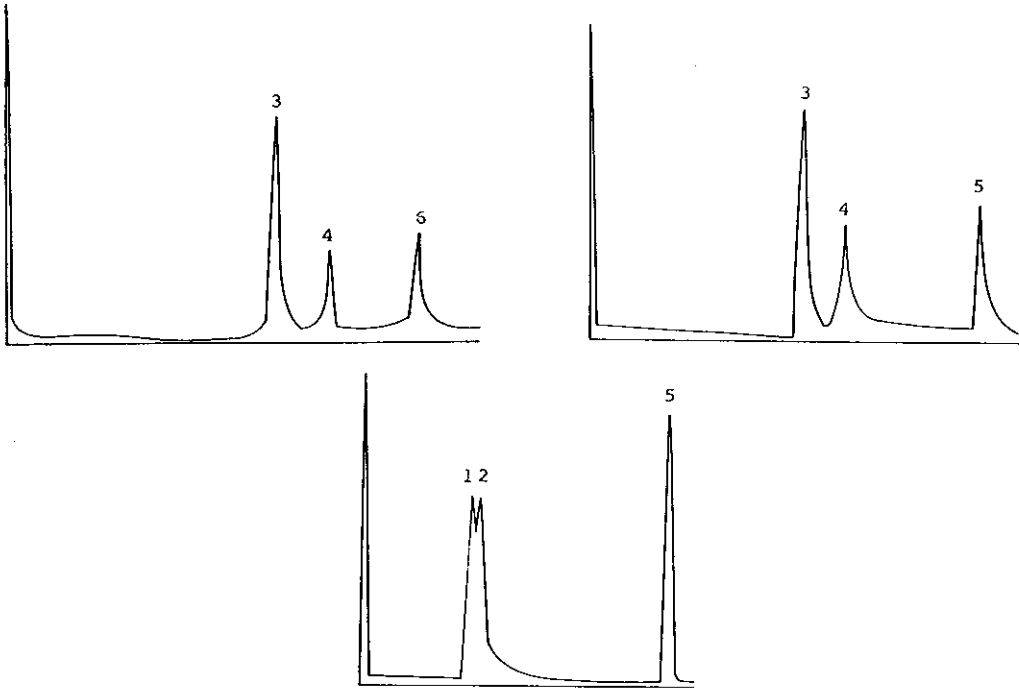


Fig. 5. Gas chromatogram of free phenolic acids (A), Soluble phenolic acids (B), Insoluble-bound phenolic acids (C), keywords : 1. unknown, 2. catecol, 3. p-coumaric acid, 4. ferulic acid, 5. vanillin

BHA, BHT와 free, soluble 및 insoluble bound phenolic acids를 첨가한 시험구와 대조구의 과산화물가는 21일의 경우 60, 30, 14, 11, 10, 100이었다. 같은 조건하에서 추출물의 TBA가는 0.150, 0.108, 0.105, 0.073, 0.078, 0.185이었다. 이것으로 보아 phenolic acids는 식용대두유 기질에서 우수한 항산화력을 나타내었다. 분리확인된 phenolic acids는 p-coumaric acid, ferulic acid, phloroglucinol, pyrogallol, vanillic acid, caffeic acid으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. A. O. A. C. 1970. Association official Analytical Chemists. Washington D. C.
2. Beckel, R. W. 1983. Antioxidative arginine-xylose maillard reaction products : conditions for synthesis. *J. Food Sci.* 48 : 996-997.
3. Chang, S. S., Matijaservic, B. D., Hasieh, O. A. L. and Huang, C. L. 1977. *J. Food Sci.* 42 : 1102.
4. 최규홍. 1988. 겨자 메탄을 추출물의 항산화 효과. 경북대학교 대학원 석사학위논문.
5. Johnson, A. B. 1961. *Aust. Exp. Biol. Med. Sci.* 39 : 353.
6. Krygier, K. 1982. Free, Esterified and Insoluble bound phenolic acid 1 extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* 30 : 330-334.
7. Lee, C. H. 1949. Peroxide number-cold method. *J. Am. oil Chem. Soc.* 26 : 152.
8. Mahoney, J. R. 1986. Role of α -tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *J. Food Sci.* 51 : 1293-1296.

9. Masako, N. and Naoko, F. 1982. Antioxidant activities of some vegetable food and active component of Avocado Epicarp. *Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi*. 29 : 507.
10. Mitsuo, N. 1982. Antioxidant effect of the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. *Agric. Biol. Chem.* 46 : 1199-1206.
11. Naohiko, Y. 1979. Antioxidative activities of Miso and Soybean sauce on linoleic acid. *Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi*. 26 : 20-24.
12. Naohiko, Y. 1984. Antioxidant preparations from Nonsalted Soybean Miso. *Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi*. 31 : 278-280.
13. Paik, T. H., Hong, J. T and Hong, S. Y. 1982. Studies on the antioxygenic substances in *Panax ginseng* roots. *Korean J. Food Sci. Tech.* 14 : 130-135.
14. Robert, J. H. and Samuel, D. S. 1982. A Gas-Liquid chromatography method for analysis of phenolic acids in plants. *J. Agric. Food Chem.* 28 : 1292-1295.
15. Seideman, S. C. 1976. *J. Food Sci.* 41 : 732.
16. Shigezo, N. 1982. Antioxidative activities of vegetables of *Allium* Species. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 28 : 291-296.
17. Shahidi, F. 1987. Control of lipid oxidation in cooked Ground Pork with Antioxidants and Dinitrosyl Ferrohemochrome. *J. Food Sci.* 52 : 564-567.
18. Sidewell, C. G., Salwin, H., Henca. M. and Mitchell, H. J. 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31 : 603.
19. Talor, M. J. 1980. Antioxidant activity of cysteine and protein sulphydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J. Food Sci.* 45 : 1223-1227.
20. Toshiko, H. 1982. Antioxidative substances in *Glycyrrhizae Radix*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 29 : 418.
21. 윤희식. 1979. 해바라기유의 저장조건에 따른 변화 (2). *경북대학교 교육대학원*. 11 : 101.