

탈지들깨박에서 분리한 페놀화합물의 항산화효과

이 기 영

호서대학교 식품영양학과

Antioxidant Effects of Phenolic Compounds Isolated from Deffated Perilla Seed Flour

Ki-Young Lee

Department of Food and Nutrition, Hoseo University

Abstract

The free, ester and insoluble bound phenolic acids in the extracts from defatted perilla seed flour were isolated and their antioxidative activities were evaluated in comparison with commercial synthetic antioxidants. Total phenolic content of the perilla seed was 0.75% as chlorogenic acid. Each percent ratio of the content of free, ester, and insoluble bound phenolic acid to total phenolic content was 87.5, 7.5 and 5.0% respectively. Chlorogenic acid was identified as a major phenolic acid and a small amount of caffeic acid was also identified in the free phenolic acid extract, but they were not found in soluble ester and insoluble bound phenolic extracts by two dimensional paper chromatography. Each type phenolic extract from 30g of defatted perilla flour showed antioxidant activity similar to that of BHT (0.02%, w/w) in 200g of soybean oil substrate inspite of the difference of each phenolic content.

Key words: phenolic compounds, perilla seed, antioxidative activity

서 론

들깨 기름은 우리나라에서 옛날부터 많이 이용해 오고 있는 식용유 중의 하나이다. 들깨의 국내 생산량 추이를 보면 1975년에 약 9,500톤, 1985년에 약 20,000톤, 1987년에는 약 28,000톤으로 매년 그 생산량이 증가하고 있는 추세이다⁽¹⁾. 특히 들깨 기름은 혈압저하, 혈전증 개선, 암세포증식 억제 등의 효과가 최근 발표됨에 따라 들깨 기름에 대한 영양학적 평가가 새로워지고 있으나, 착유된 들깨 기름은 리놀레닌산의 함량이 높아 쉽게 산패되는 문제점을 가지고 있다⁽²⁾. 한편 참깨기름의 경우 천연항산화제인 세사몰 등이 착유 후에도 기름으로 이행되어 안정성이 높은데 반하여, 착유 후의 들깨기름은 착유 전에 비해 상대적으로 안정성이 낮는데 이는 리놀레닌산함량이 높은 데도 기인되지만, 착유된 기름으로 이행된 천연 항산화물질들이 많이 존재하지 않기 때문인 것으로 생각된다⁽³⁾.

김⁽⁴⁾들은 대두유-물 에멀전 시스템에서 들깨박과 참깨박 추출물의 항산화 효과는 0.02%의 BHT보다 우수하였음을 보고하였다. 또한 이들은 탈지종자박 또는 이들의

에탄올 추출물에 토코페롤과 이들의 에스터들이 미량으로 존재하였으나, 강한 항산화 효과를 가진 들깨박에서의 추출물은 토코페롤과 이들의 에스터가 아님을 보고하였다. Hwang⁽⁵⁾들은 생 또는 볶은 한국 참깨와 들깨박의 메탄올 추출에서 세사몰의 함량을 측정된 결과 생, 볶은 참깨유의 메탄올 추출물 중의 세사몰 함량은 0.22와 0.096%이었고, 생, 볶은 들깨박의 메탄올 추출물 중의 세사몰 함량은 0.0022와 0.0043%에 불과했다고 보고하였다. Fukuda⁽⁶⁾들은 참깨와 이들의 압착박에는 토코페롤이나 세사몰 이외의 항산화물질 즉, 폴리 페놀화합물의 존재를 보고하였다. 폴리 페놀화합물은 여러 식물종자들에 널리 분포하며 페놀화합물은 식물체내에 유리 페놀산, 페놀산 에스터, 불용성 결합형 페놀산으로 존재한다. Rhee⁽⁶⁾들은 대두, 면실, 땅콩 및 해바라기씨같은 종자에 항산화성을 갖는 페놀화합물들이 있음을 밝혔으며, Fenton⁽⁷⁾들은 평지씨박 중의 가수분해물 중에서 caffeic acid, p-coumaric, ferulic, p-hydroxybenzoic, sinapic, trans-cinnamic, chlorogenic acid 등의 폴리 페놀화합물들을 보고하였다. Kim⁽⁸⁾은 무수 대두유와 대두유-물 에멀전 시스템에서 페놀화합물의 항산화 효과를 비교한 결과 caffeic acid, chlorogenic acid, gentisic acid에 강한 항산화 효과가 있음을 보고하였다. 들깨 종자박에도 상당량의 폴리페놀산이 함유되어 있으나, 들깨박 중의 페놀산의 존재 형태, 그 함량이나 이들 페놀산의 항산화

Corresponding author: Ki-Young Lee, Department of Food and Nutrition, Hoseo University, Asan-kun, Chung Nam-Do 337-850, Korea

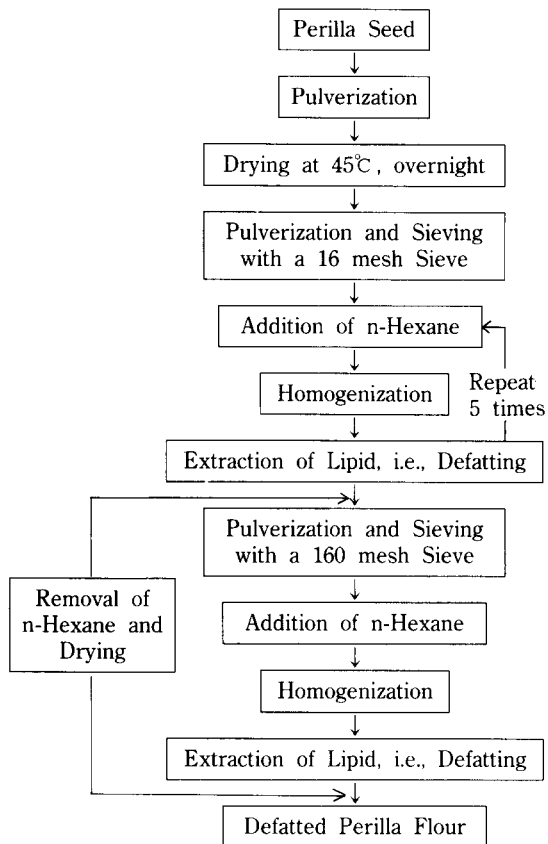


Fig. 1. A flow sheet for the preparation of defatted perilla flour

효과에 대한 구체적인 보고는 거의 없는 듯하다.

따라서 본 연구에서는 탈지 들깨박으로부터 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산을 추출하여 함량을 측정하고, 이들 추출물들의 항산화 효과를 시판 대두유를 기질로 하여 주요 합성 항산화제인 BHA, BHT, TBHQ 및 AP의 항산화 효과와 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 탈지박의 조제

실험에 사용된 들깨종자는 경기도에서 재배된 것을 사용하였으며 이 들깨 탈지박의 제조과정은 Fig. 1과 같다.

기질로는 시판 식용대두유를 사용하였으며(동방유량, 서울), 이들의 물리적, 화학적 특성은 Table 1과 같다. 검화가와 요오드가는 Pearson의 방법⁽⁹⁾과 AOAS-Wijs 방법⁽¹⁰⁾으로 각각 측정하였다. 과산화물가는 AOCS 방법 Cd 8-53⁽¹¹⁾으로 측정하였으며 meq/kg oil로 나타냈고, TBA가와 산가는 Sidwell의 방법⁽¹²⁾과 Triebold와 Auran의 방법⁽¹³⁾으로 각각 측정하였다. 굴절율은 Abbe refractometer(No.16093 Model, Erma Optical Co., Japan)

Table 1. Some physico-chemical characteristics of the soybean oil used as substrate

Saponification value	187.0
Iodine value	123.8 ± 0.8
Peroxide value	1.1 ± 0.1
Thiobarbituric acid(TBA) value	0.03 ± 0.01
Acid value	0.25 ± 0.05
Refractive index (at 25°C)	1.4725

Table 2. Proximate compositions of whole perilla and defatted perilla flour (%)

	Whole perilla	Defatted perilla
Moisture	7.1	4.7
Total ash	3.6	6.5
Crude protein ¹⁾	27.4	43.8
Crude fat	43.7	0.6

¹⁾Nitrogen conversion factor: 5.3

로 측정하였다.

본 실험에 사용된 합성항산화제는 BHA(butylated hydroxyanisol, Ueno Pharmaceutical Co., Japan), BHT(butylated hydroxytoluene, Ueno Pharmaceutical Co., Japan), TBHQ(tertiary butylhydroquinone, Eastman Chemical Products Inc., U.S.A.)와 AP(ascorbyl palmitate, Hoffman-La Roche., Ltd., Swiss)였다.

일반성분 분석

들깨종자와 탈지들깨종자의 수분, 조회분, 조지방분, 조단백질은 AOAS법⁽¹⁴⁾에 준하여 분석하였으며, 그 일반성분은 Table 2와 같다.

유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산의 추출 및 분석

탈지들깨박으로부터 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산의 추출은 Krygier⁽¹⁵⁾ 등의 방법에 따랐으며, 추출방법은 Fig. 2에 나타냈다. 50g의 탈지들깨박에 200 ml의 70% methanol/70% acetone(1 : 1, v/v) 혼합용매를 가한뒤 waring blender로 3분간 충분히 혼합하고 다시 원심분리시켜 상액을 분리하였다. 이같은 조작을 5번 더 되풀이 실시하여 탈지들깨박에 있는 유리페놀화합물들이 모두 추출되도록 한 뒤, 합친 상액 1,200 ml를 rotary vacuum evaporator에서 200 ml로 농축하여 이를 유리페놀산 및 페놀산 에스터의 분석용으로 이용하고 나머지 추출박은 불용성 결합형 페놀산의 정량에 이용하도록 냉장저장하였다. 농축된 상액은 6 N-염산으로 pH 2로 조정된뒤 부연 침전물들을 분리하기 위하여 4,000 rpm에서 30분간 원심분리시켰다. 맑은 상액은 separatory funnel을 이용하여 hexane으로 5회 추출하여 지방산이나 다른 오염유지물질들을 제거하였다. 이렇게 한뒤 유리페놀산들을 diethyl ether/ethyl acetate(1 : 1,

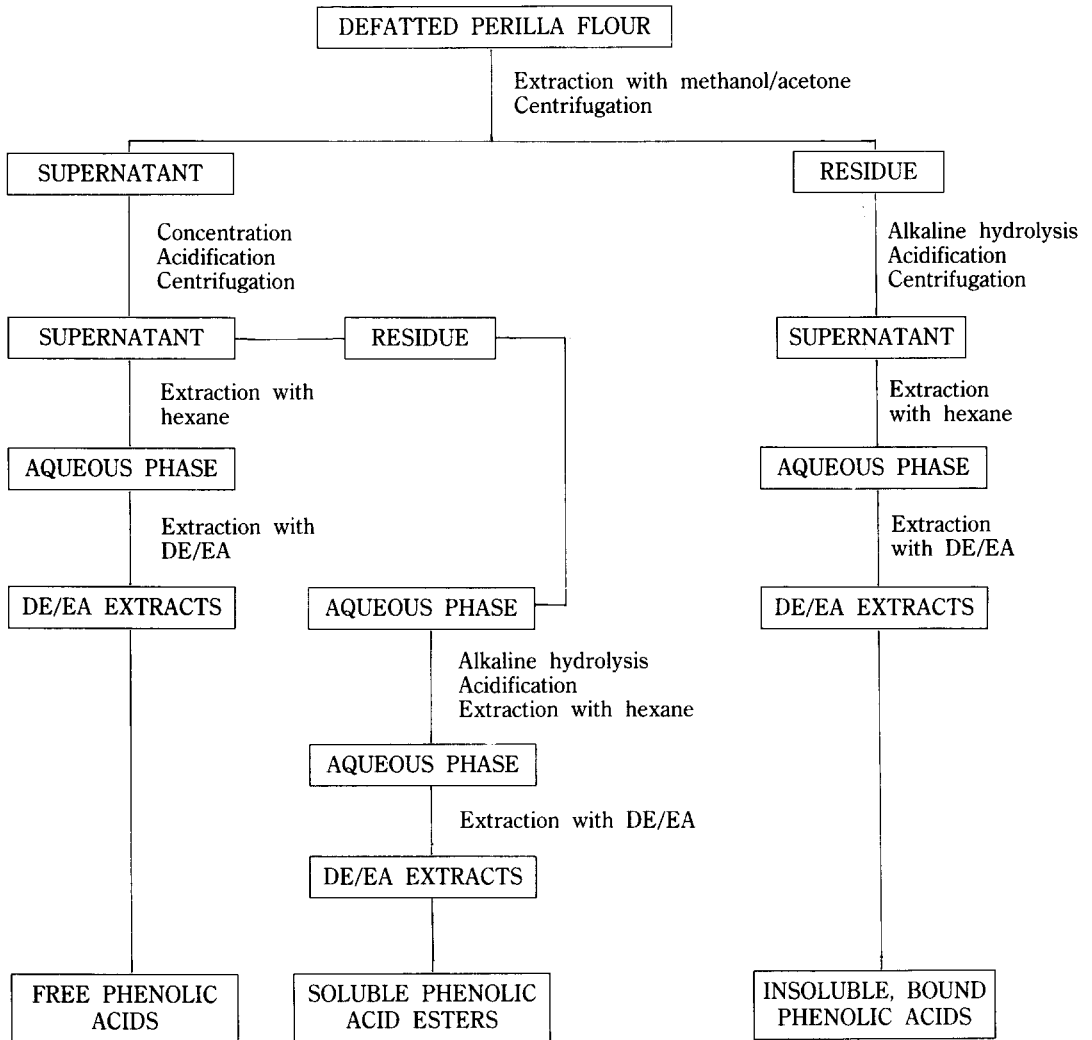


Fig. 2. Flow sheet for the separation of free, esterified and insoluble bound phenolic acids from defatted perilla flour (DE/EA=diethyl ether/ethyl acetate (1:1))

v/v) 혼합용매로써 6회 추출하였으며 이때 추출용매의 비율은 추출대상 수용액상에 대해 1 : 1(v/v)만큼 부가되었다. 추출액들은 함쳐진뒤 anhydrous sodium sulfate로 탈수시키고, 다시 30°C 에서 rotary vacuum evaporator로 건조시켜 용매들을 충분히 제거한뒤 methanol로 유리페놀산들을 추출하여 15 ml로 만든 후 냉장하에 보존하였고 유리페놀산의 분석에 이용되었다.

페놀산 에스터 형태의 페놀화합물들을 추출하기 위해 sodium sulfate를 씻은 물과 유리페놀산 추출시 남은 수용액상 및 분리시킨 부연 침전물을 혼합하였다. 다음 이 혼합액속의 페놀에스터들을 가수분해하기 위해 200 ml의 4 N-NaOH를 가하고 질소가스하의 상온에서 4시간 동안 유지하였다. 다시 여기에 산을 가하여 pH 2로 조

절한뒤, hexane으로 자유지방산들을 제거하였고, diethyl ether/ethyl acetate 혼합용매로써 전과같은 방법으로 페놀에스터에서 유래된 유리페놀산들을 추출하였고 용매제거 후 메탄올로 재추출하여 15 ml로 만들어 보관하였다.

불용성 결합형 페놀산을 추출하기 위해 위에서 남은 추출박에 직접 150 ml의 4 N-NaOH를 가하고 상온의 질소가스하에서 4시간 동안 가수분해시켰다. 이것을 다시 상기와 같은 방법으로 pH 2로 조절하여 원심분리시킨뒤 상액내의 지방불순물을 hexane으로 제거하였고 diethyl ether/ethyl acetate로 유리된 페놀산들을 추출한뒤 용매를 제거하여 메탄올로 추출해, 15 ml로 조절하여 보관하였다.

Table 3. The phenolic content of each type of phenolic acid in the phenolic extracts from defatted perilla flour

Phenolic acid type	Phenolic content ¹⁾ (g/30g defatted perilla flour)	Phenolic content in whole perilla(%)
Free acids	0.35	0.65
Soluble esters	0.03	0.06
Insoluble bound acids	0.02	0.04
Total sum	0.40	0.75

¹⁾Phenolic content[†] as chlorogenic acid

탈지들깨박 추출물 중의 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산 함량은 Rhee⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다. 시료 0.2 ml와 2% Na₂CO₃ 2 ml의 혼합액을 2분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약을 0.2 ml 첨가하여 30분 뒤에 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 chlorogenic acid를 사용하여 작성되었다.

각 추출물의 항산화효과의 측정

50g의 탈지들깨박에서 얻어진 유리형, 에스터형 및 불용성 결합형 페놀산 추출물들 각 15 ml 중에서 탈지들깨박 30g에 해당하는 각 9 ml를 200g의 대두유에 첨가하여 완전히 혼합한 뒤 항온수조에서 가온하여 용매를 제거하였다. 합성시판 항산화제도 메탄올에 녹여 0.02% 농도로 200g의 유지에 첨가, 혼합한 후 같은 방법으로 용매를 제거하였다. 이들을 동량씩 petri dish에 나누어 담은 뒤 45±0.1°C로 유지되는 항온기에 뚜껑을 열어놓은 상태로 저장하면서 5일 간격으로 시료를 채취하여 과산화물가를 측정함으로써 항산화효과를 비교하였다.

각 추출물에서의 caffeic acid와 chlorogenic acid의 분리 및 확인

탈지들깨박 추출물에서의 caffeic acid와 chlorogenic acid는 Chu⁽¹⁷⁾ 등의 방법에 따라 Whatman No.3 paper를 이용한 paper chromatography법에 의해 분리, 확인하였다. 2% acetic acid를 전개용매로 하여 UV lamp로 위치를 확인한 후, benzene/acetic acid/water(125 : 72 : 3, v/v/v)의 전개용매로 2차 전개하고, 1% ferric chloride 에 탄올용액과 Hoepfner 시약(0.5% acetic acid/0.5% sodium nitrate, 1 : 1, v/v)으로 발색하여 나타난 점의 Rf값과, 같은 조건으로 전개한 페놀산의 표준품(Sigma Chemical Co., U.S.A.)의 Rf값과 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

탈지들깨박 추출물 중의 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산의 함량

탈지들깨박에서 추출한 세 가지 형태의 페놀산의 함량은 Table 3에 나타났다. 탈지들깨박 추출물 중의 유

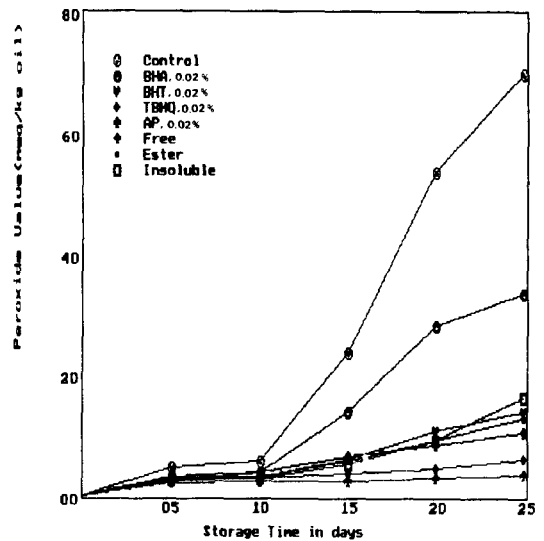


Fig 3. Changes of the peroxide values of the soybean oil substrates containing the phenolic extracts of defatted perilla seed flour and synthetic antioxidants (0.02%) during 25 days at 45°C

리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산의 탈지들깨박에 대한 함량은 chlorogenic acid를 표준페놀 화합물로서 비색법으로 측정시 각각 0.35, 0.03 및 0.02 %였고 총 페놀산에 대한 각각의 비율은 87.5, 7.5, 5.0%로 유리페놀산의 함량이 페놀산 에스터와 불용성 결합형 에스터의 함량보다 상당히 높았다. 들깨종자에 대한 전체페놀화합물의 함량은 0.75%였다.

각 페놀추출물의 항산화효과

각 페놀추출물 및 합성항산화제를 첨가한 대두유 기질들과 대조구의 저장기간에 따른 과산화물가의 변화는 Fig. 3에 나타났다.

대두유 기질에 대한 첨가함량이 각 0.02%인 BHA, BHT, TBHQ, AP 시료들과 유리페놀산(0.18% as Chlorogenic acid), 페놀산 에스터(0.02% as chlorogenic acid), 불용성 결합형 페놀산 에스터(0.01% as chlorogenic acid) 추출물들을 함유한 시료들과 대조구의 과산화물가는 25일 저장 후 각각 33.9±0.1, 14.3±0.1, 6.6±0.1, 4.0±0.1, 10.9±0.8, 13.4±0.3, 16.6±0.3과 70.0±0.2이었다. TBHQ와 AP를 첨가한 기질의 경우 가장 강한 항산화 효과를 보였으며, 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산을 함유한 추출물들의 항산화 효과는 BHT와 비슷하였으나 BHA의 항산화효과보다는 우수하였다. 저장기간 중간단계까지는 유리페놀산 추출물의 항산화효과가 다른 두 페놀산 추출물보다 약간 낮았으나 시간이 경과함에 따라 유리페놀산의 항산화효과가 다소 높게 나타났다. 유리페놀산들이 유지에 녹기 어렵고 이들

Table 4. Rf values and color¹⁾ response to UV light and spray reagent of six reference antioxidative phenolic acids

Phenolic acid	UV		UV+NH ₃		1% FeCl ₃	Hoepfner reagent	Rf values	
	365 nm	254 nm	365 nm	254 nm			2% HoAC ²⁾	BzAW ³⁾
trans-Caffeic acid	BIW	BIW	BIW	BIW	dGr	BR	0.23	0.25
trans-Chlorogenic acid	Bl	Bl	GBl	GBl	BlGr	YO	0.56	0.03
Ferulic acid	Bl	PBl	PBl	PBl	B	BY	0.28	0.76
Gentisic acid	Br.Bl	Br.Bl	Br.Bl	Br.Bl	GrBl	YB	0.56	0.31
p-Coumaric acid	N	P	P	P	Y	N	0.45	0.66
Syringic acid	dP	P	N	dP	dB	OY	0.51	0.3

¹⁾Bl: Blue, B: Brown, Br.: Bright, d: dark, G: Green, Gr: Gray, N: None, O: Orange, P: Purple, R: Red, W: White, Y: Yellow

²⁾2% HoAC (Acetic acid: Water=2:98)

³⁾BzAW (Benzene: Acetic Acid: water=125:72:3)

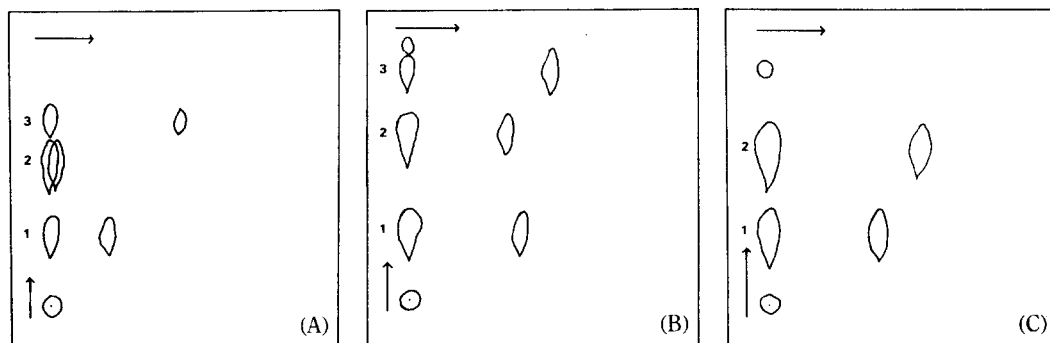


Fig. 4. Two dimensional chromatograms of the free phenolic acids (A), soluble phenolic acid ester (B) and insoluble bound phenolic acids (C) extracts

Table 5. Rf values and color response to UV light and spray reagent of the free phenolic acids, soluble phenolic acid ester and insoluble bound phenolic acids extracts from defatted perilla seed flour

Band No.	Rf ₁ ¹⁾	Rf ₂ ²⁾	Color at 365 nm		Color response to spray reagents		Identified compound
			UV	UV+NH ₃	FeCl ₃	Hoepfner	
Free phenolic acid extract							
1	0.24	0.23	BIW	BIW	dGr	BR	Caffeic acid
2	0.54	0.02	Bl	GBl	BlGr	YO	Chlorogenic acid
3	0.65	0.47	Bl	Bl	N	N	U ³⁾
Soluble phenolic acid ester extract							
1	0.27	0.41	BIW	BIW	N	R	U
2	0.62	0.35	Bl	BIW	N	BY	U
3	0.74	0.52	YG	G	N	Y	U
Insoluble bound phenolic acid extract							
1	0.25	0.39	BIW	BIW	N	R	U
2	0.56	0.55	BIG	BIG	N	N	U

¹⁾2% acetic acid

²⁾benzene: acetic acid: water=125:72:3

³⁾unknown

추출물의 함량이 다른 두 형태의 추출물보다 10배 가량 함량이 높다는 관점에서 볼 때, 들깨에 함유된 들깨기

름에 대한 실질적인 항산화효과에는 유리형 페놀산들 보다도 페놀산 에스터와 불용성 결합형 페놀산이 더

효과적으로 관계하는 것으로 추측된다.

탈지들깨 종자박 페놀추출물들 중의 중요 페놀산 동정 자연항산화제로서 일반적으로 그 효과가 잘 알려진 6개 페놀산의 Rf값, UV lamp에 대한 형광반응 및 분무시약에 대한 발색반응은 Table 4에 나타났다.

탈지들깨 종자박 추출물에서 확인된 페놀산은 Fig. 4에 나타났다. 유리페놀산 추출물에서는 chlorogenic acid와 caffeic acid가 표준시약과 일치하였고 1개의 미지의 물질이 분리되었다. 유리페놀산 추출물의 주요 페놀산은 chlorogenic acid로 생각되며 caffeic acid도 소량 존재하는 것으로 사료되었다.

페놀산 에스터 추출물에서는 미지의 3개 띠, 불용성 결합형 에스터 추출물에서는 미지의 2개의 띠가 분리되었다. Caffeic acid는 수용성 에스터와 불용성 결합형 페놀산 에스터 추출물에서 검출되지 않았는데, 이는 Krygier⁽¹⁵⁾ 등의 결과와 일치하며 caffeic acid의 큰 반응성 때문에 다른 화합물로 변화되었기 때문인 것으로 추측된다.

요 약

탈지들깨박으로부터 추출한 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 결합형 페놀산 형태의 페놀화합물들의 항산화효과를 일반 시판용 합성항산화제들과 비교하였다. Chlorogenic acid를 표준물질로써 비색법으로 측정된 페놀화합물들의 총함량은 0.75%였고 총페놀산중 유리페놀산, 페놀산 에스터 및 불용성 페놀산 추출물이 차지하는 비율은 각각 87.5, 7.5, 5.0%였다. 이차원 전개법에 의한 paper chromatography 성분분석 결과 유리페놀산 형태의 추출물에서는 대부분의 페놀화합물이 chlorogenic acid와 일치하였고 소량의 caffeic acid와도 일치되었으나, 페놀산 에스터와 불용성 결합형 페놀산 형태의 추출물에서는 나타나지 않았다. 30g의 탈지들깨 종자박에서 추출된 각 형태의 페놀산 추출물들은 각각의 페놀함량 차이가 크에도 불구하고 식용대두유 기질에서 0.02%(w/w) 농도로 첨가된 BHT와 비슷한 정도의 항산화 효과를 나타냈다.

문 헌

- 농림수산부: 농림수산 통계연보. p.88(1988)
- 이양자: 유지영양의 문제점과 개선방향. 식품과학과 산업, 23, No.2, 13(1990)
- Hwang, S.Z. and Ko, Y.S.: Studies on the constituents of Korean edible oils and fats(part 4): A studies of the natural antioxidants of sesame and perilla seed. *Korean J. Nutr.*, 15, 30(1982)
- Kim, E.H. and Kim, D.H.: Antioxidant activity of ethanol-extracts of defatted soybean, sesame, and perilla flours in a soybean oil-water emulsion system. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 13, 238(1981)
- Fukuda, Y., Osawa, T. and Namiki, M.: Antioxidant in sesame seed. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 28, 462(1981)
- Rhee, K.S., Ziprin, Y.A. and Rhee, K.C.: Antioxidant activity of methanolic extracts of various oilseed protein ingredients. *J. Food Sci.*, 46, 75(1981)
- Fenton, T.W., Leung, J. and Clandinin, D.R.: Phenolic components of rapeseed meal. *J. Food Sci.*, 45, 1702(1980)
- Kim, Y.H.: Antioxidant activity of various phenolic compounds in a soybean oil and a soybean oil-water emulsion system, M.S. thesis for the Degree of Master, Korea University, Seoul (1982)
- Pearson, D.: The Chemical Analysis of Foods, 7th ed., Churchill Livingstone, London, p.491(1976)
- A.O.A.C.: Official Method of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., p.440(1980)
- A.O.C.S.: AOCS Official and Tentative Method, 4th ed., Method Cd 8-53. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL. (1991)
- Sidwell, C.G., Salwin, H., Henca, M. and Mitchell, H. Jr.: The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 31, 603(1954)
- Triebold, H.O. and Aurand, L.W.: Food Composition and Analysis. D. Van Nostrand Co., Inc., New York, p.164(1963)
- A.O.A.C.: Official Method of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., p.223(1980)
- Krygier, K., Sosulski, F. and Hodge, L.: Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids (I): Extraction and purification procedure. *J. Agr. Food Chem.*, 30, 330(1982)
- Rhee, T. and Iida, T.: Antioxidant for fat and oils from canary seed: sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 75(1981)
- Chu, N.T. and Clydesdale, F.M.: Isolation and identification of some fluorescent phenolic compounds in cranberries. *J. Food Sci.*, 38, 1038(1973)

(1992년 8월 14일 접수)