Hanguk Nonghwahak Hoechi
(J. Korean Agric. Chem. Soc.)
36(3)1, 203~207(1993)

산사 및 가자 에테르 추출물의 항산화 효과

김정숙 · 이기동 · 권중호 · 윤형식
경북대학교 식품공학과

초록 : 탈지된 산사(*Crataegus pinnatifida* Bunge) 및 가자(*Terminalia chebula* Retz)로부터 유리형, 용성 에스테르형 및 불용성 페놀성분을 추출하여 대두유 기질에서 이들의 항산화 효과를 BHA 및 BHT와 비교하고, HPLC에 의해 항산화성 물질의 패턴을 확인하였다. 과산화물가와 TBA가에 의해 측정된 항산화 효과 비교실험은 45℃에서 25일간 실시되었는데, 산사와 가자 추출물은 BHA 및 BHT보다 아주 우수한 항산화성을 보였으며, 특히 가자는 산사보다 다소 높은 항산화력을 보였다. 추출 성분들 중에서는 산사는 유리형, 가자는 용성 에스테르형에서 높은 항산화 효과가 나타났다. 추출물에 대한 크로마토그래피에서 산사의 유리형 페놀산은 3개의 성분으로, 용성 에스테르형 및 불용성 페놀산은 각각 2개의 성분으로 나타났으며, 가자의 경우에는 모든 추출물들이 각각 3개의 성분으로 분리되었다(1993년 2월 5일 접수, 1993년 5월 24일 수리).

식용유지나 지방질 식품은 가공 또는 저장 중에 지방성분의 자동산화 등에 의한 풍미의 저하[1]와 필수 지방산이나 각종 지용성 비타민의 파괴[2] 등을 가져올 뿐만 아니라 이들의 분해 생성물들은 생체내에서 유해한 것으로 알려져 있다.[3] 따라서 산패를 억제하기 위한 여러 방법들이 연구되어 왔으며, 이 방법 중의 하나가 항산화제를 첨가하는 것이다. 지질의 자동산화를 억제하는 항산화제로서는 천연 항산화제와 합성 항산화제가 있으며,[4] 합성 항산화제는 간 비대증[5] 및 각 장기 조직의 병리적 변화로 인한 암 유발[6] 등의 문제점이 많아짐에 따라 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

천연물 중에는 여러가지 산화방지 작용을 가진 물질이 존재하는데, 그 중에서도 생약 중의 phenol 성분들은 항산화 작용을 가진 대표적인 물질로 보고되어 있다.[7,8] 또한 이들 성분의 항산화 효과 정도는 식물의 종류 및 항산화 성분의 종류에 따라 다르며,[9,10] 추출 방법에 따라 차이가 난다고 알려지고 있다.[11,12] 따라서 본 실험에서는 생약재로서 많이 사용되는 山査(*Crataegus pinnatifida* Bunge)와 訶子(*Terminalia chebula* Retz)를 실험대상으로 선택하였다. 지금까지 산사와 가자에 대해서는 대부분 임상학적 연구나 약리학적 연구가 많이 진행되어 있으나[13-19] 항산화성에 관한 연구는 이루어지지 않았으므로, 본 연구에서는 산사 및 가자로부터 페놀성 물질을 추출하여 1차적으로 이들의 항산화 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 시험에 사용된 천연물 시료로는 강원도 산 山査(*Crataegus pinnatifida* Bunge)와 경북 산 訶子(*Terminalia chebula* Retz)를 90년 10월 산지에서 구입하여 음건 후 사용하였다.

일반성분 분석

산사 및 가자의 일반성분으로서 수분, 조단백질, 조지질, 탄수화물의 조회분 함량은 A. O. A. C.[20] 방법에 따라 분석하였다.

탈지 시료의 제조

산사 및 가자시료의 탈지는 최[21]의 방법을 개량하여 실시하였다. 즉, 건조된 시료를 제핵, 분쇄하고 0.07 mm 체를 통과시킨 다음 n-hexane으로 5회 반복 추출하였다. 건조 후 다시 petroleum ether로 1회 탈지하고 상온에서 건조하여 탈지 시료로 사용하였다.

Phenol성 물질의 추출

Phenol성 성분의 추출은 Krygier[22]의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 500 g의 탈지시료를 methanol과 acetone

Key words : *Crataegus pinnatifida*, *Terminalia chebula*, ether, extracts, antioxidative effectiveness
Corresponding author : H.-S. Yoon

혼액 2l로 5회 추출하고 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상징액과 잔사로 분리하였다. 이 상징액을 200 ml로 감압 농축한 후 free phenolic acids 및 soluble phenolic acid esters의 분리에 사용하였으며, 잔사는 insoluble-bound phenolic acids의 추출에 사용하였다. 위의 농축액을 6 N-HCl로 pH를 조절한 다음 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 부유물을 제거하였고, hexane으로 3회 추출하여 지질을 제거하였다. 수층은 diethyl ether와 ethyl acetate(DE/EA) 혼액으로 6회 추출하였으며, sodium sulfide anhydrous로 잔여수분을 제거하고 용매를 증발시켜 free phenolic acids를 얻었다. 한편 soluble phenolic acid esters의 추출을 위해서는 수층을 200 ml의 4 N-HaOH로 가수분해 하고 pH 2로 조절하여 원심분리한 다음 상징액을 DE/EA 혼액으로 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하여 soluble phenolic acid esters 획분으로 하였다. Insoluble phenolic acids의 추출을 위하여 methanol로 추출한 잔사를 알카리 가수분해하고 pH 2로 산성화시켜 원심분리한 상징액을 hexane으로 3회 추출하여 지질을 제거하였다. 수층을 DE/EA혼액으로 위와 같은 방법으로 농축하여 insoluble phenolic acids를 얻었으며, 이상의 phenol성 성분들은 25 ml에 용해하여 사용하였다.

기질의 조제와 항산화 시험

본실험에서 phenol성 추출물의 항산화 효과 시험에는 식용 대두유가 기질로 사용되었으며, 이때 유지의 성상은 POV(meq/kg) 2± 0.5, TBA가(O.D.530 nm) 0.03± 0.01, IV 128± 1 및 SV 190± 5로 산패도가 낮은 상태였다. Phenol성 추출물의 항산화 효과는 합성 항산화제인 BHA 및 BHT와 비교시험 되었다. 대두유 기질 50 g에 항산화 시험액 1 ml를 가하여 40℃ 수조에서 용매를 제거한 후 직경 14 cm petri dish에 옮겨 45± 1℃ 항온기에서 25일간 산화시키면서 경시적으로 시험액의 POV와 TBA가를 측정하여 산사 및 가자 추출물의 항산화성을 검토하였다.

Table 1. Chemical composition of *Crataegi Fructus* and *Terminalia Fructus*

Composition	Contents (%)	
	Crataegi Fructus	*Terminalia Fructus*
Moisture	10.87	10.65
Crude protein	8.78	11.63
Crude fat	4.79	0.53
N-free extract	29.52	44.50
Crude fiber	42.56	29.20
Crude ash	3.48	3.49

항산화성 물질의 Pattern 확인

각 분획별 phenol성 물질의 대체적인 pattern을 확인하기 위하여 HPLC(Waters Associates 440)를 사용하여 분리해 보았다. HPLC용 시료의 준비는 추출물을 SEP-PAK sillca cartridge에 통과시켜 정제하였으며, 기기조건은 U-bondapak C-18(3.9 mm×30 cm) reversed-phase column을 사용하여 integrator로 분석하였다. 이때 mobile phase A는 0.001 M triethyl amine을 함유하는 0.05 M ammonium phosphate 용액을 조제하여 85% 인산용액으로 pH를 2.6으로 고정하였고, mobile phase B는 80%(v/v)의 acetonitrile과 20%(v/v)의 mobile phase A를 사용하였으며, 용매의 linear gradient는 0%에서 시작하여 40%의 mobile phase B에 도달하는데 30분이 걸리도록 시료당 분석 시간은 40분으로 하였다. Detection은 200 nm에서 행하였으며, 시료는 20 μl씩 주입하였고 flow rate는 4 ml/min로 하였다.

결과 및 고찰

산사 및 가자의 일반 성분

산사 및 가자의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

두 시료의 수분과 조회분의 함량은 비슷한 것으로

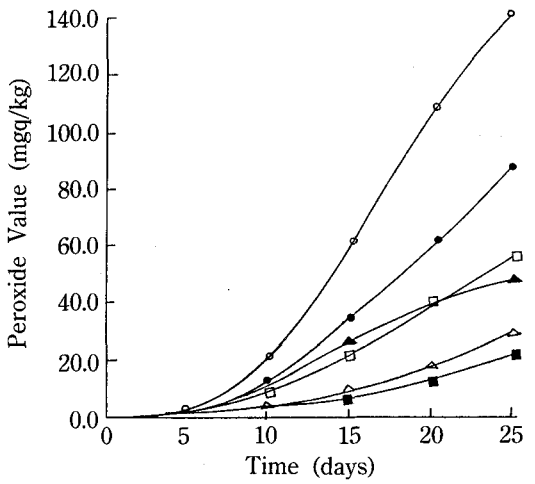

Fig. 1. Comparison of peroxide values in soybean oil substrates containing BHA, BHT and various Crataegus Fructus extracts during storage at 45℃ (—○—, control ; —●—, BHA ; —□—, BHT ; —■—, free phenolic acid ; —△—, soluble phenolic acid ester ; —▲—, insoluble bound phenolic acid).

나타났으나 조지방과 조섬유질은 산사가 더 높았다. 특히 조지방의 함량은 산사가 가자보다 9배나 더 높은 것으로 나타났으며, 조단백질과 당의 함량은 가자가 더 높은 것으로 나타났다.

항산화 효과의 비교

과산화물가(POV)의 변화에 의한 항산화 효과의 검토에서 Fig. 1은 산사 추출물에 대한 경시적 변화를 나타낸 것이다. 모든 시험군의 과산화물가는 저장기간 동안 대조군보다는 상당히 낮은 값을 나타냈으며, 대조군의 경우 저장 10일째부터 과산화물가가 급격히 상승하면서 산패가 진행됨을 알 수 있었다. 그리고 각 phenolic acids군의 과산화물가는 서로 다르게 나타났으며, 산사에서는 free acids가 항산화성이 뛰어난 것으로 나타났고, 그 다음이 soluble esters 및 insoluble acids의 순이었다. 이상의 산사 추출물의 항산화 효과는 합성 항산화제(BHA, BHT)보다 우수하였으며, 이 같은 결과는 겨자 추출물의 항산화성과 유사하였다.[23] 또한 가자에서 추출한 phenol성 성분을 첨가한 대두유 각군의 과산화물가 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 낮았으며, 그 항산화성은 합성 항산화제보다 효과적이었고 free acid, soluble esters 및 insoluble acids의 순으로 나타났다. 이와 같이 phenol성 추출성분 중 free acids의 항산화성이 가장 높게 나타난 것은 오배자에 대한 실험에서도 확인된 바 있다.

한편 산사 추출물을 첨가한 대두유의 TBA가의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 대조군에 비하여 각군은 10일째부터 산화가 진행되는 것으로 나타났고, 25일째는 대조군 다음으로 BHA, BHT, insoluble phenolic acids, soluble phenolic esters, free phenolic acids의 순으로 나타나서 각 추출물의 TBA가도 POV와 유사한 경향을 나타내었으며, 가장 양호한 효과를 나타내는 것은 free phenolic acids와 soluble phenolic acid esters로 나타났다. 가자 추출물을 첨가한 대두유의 TBA가의 변화는 Fig. 4와 같다. 유리형보다는 용성 에스테르형이나 불용성 페놀산이 다소 항산화 효과가 높은 것으로 나타났으며, 이는 오배자의 결과와 유사하였다.[24] 대조군의 경우 10일째부터 급격히 산패가 일어난 반면에 세가지형의 가자 추출물 모두가 식용 대두유의 저장성을 높여주는 것으로 나타났으며, 가자에서도 TBA가의 변화는 POV와 유사한 경향을 나타내었다.

Paik 등[25]이 인삼을 여러가지 유기용매로 추출하여 지질에 대한 항산화력을 측정한 결과를 보면, chloroform과 methanol을 2 : 1로 섞어서 추출한 추출물의 항산화력은 산사 및 가자의 methanol/acetone 추출물의 항산화효과와 유사하였으며, 다른 유기용매 추출물보다는 강한 항산화력이 있었다. Ma 등[26]은 건조 표고버섯으로부터 여러 유기용매를 사용한 추출물의 항산화력을 보고하면서 그 중 methanol 및 ethanol 추출물이 항산화 효과가 강함을 보고하였다. Masako 등[27]은 avocardo

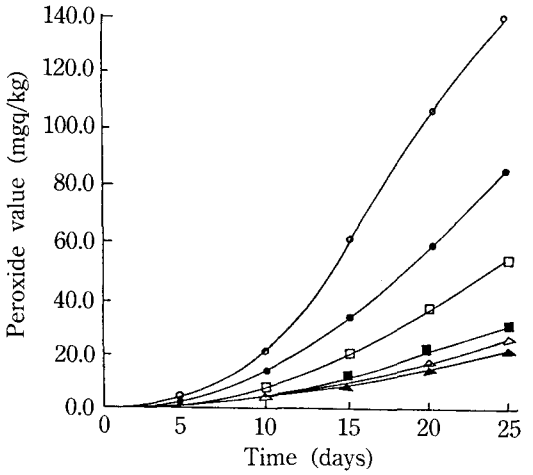

Fig. 2. Comparison of peroxide values in soybean oil substrates containing BHA, BHT and various *Chebulae Fructus* extracts during storage at 45℃ (—○—, control ; —●—, BHA ; —□—, BHT ; —■—, free phenolic acid ; —△—, soluble phenolic acid ester ; —▲—, insoluble bound phenolic acid).

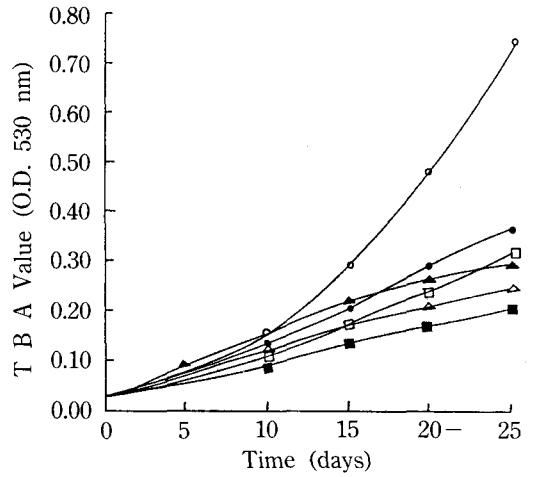

Fig. 3. Comparison of TBA values in soybean oil substrates containing BHA, BHT and various *Crataegus Fructus* extracts during storage at 45℃ (—○—, control ; —●—, BHA ; —□—, BHT ; —■—, free phenolic acid ; —△—, soluble phenolic acid ester ; —▲—, insoluble bound phenolic acid).

과피로부터 phenol성 성분을 추출한 다음 methyl linoleate에 첨가하여 50℃에서 2일간 산화시킨 후 POV를 측정한 결과 chloroform과 ethyl acetate 2 : 1 및 1 : 2 용액에서 보다 1 : 1 용액에서 가장 우수한 항산화력을 나타내었음을 보고하였다. 또한 Toshiko 등[28]의 *Glycyrrhizae Radix*의 acetone 추출물의 항산화력을 측정한 결과보다 본 실험에서의 산사 및 가자 추출물의 항산화 효과가 우수함을 알 수 있어 acetone 단일 용매를 사용한 추출물보다 methanol과 acetone 혼합 용매의 추출물에 강한 산화력이 있음을 알 수 있었다. Hong 등[29]은 생강을 hexane과 ether(1 : 1) 용액으로 추출하여 lard를 기질로 하여 50℃에서 4일간 산화시킨 후 POV를 측정한 결과 대조군에 비하여 우수한 항산화 효과를 나타냈었다고 보고하였으므로 본 실험에서 methanol과 acetone 1 : 1 용매를 사용하여 추출한 산사와 가자추출물의 항산화력은 우수하며, 그 각 추출물 중에는 여러 항산화 활성물질들이 존재할 것으로 사료되었다.

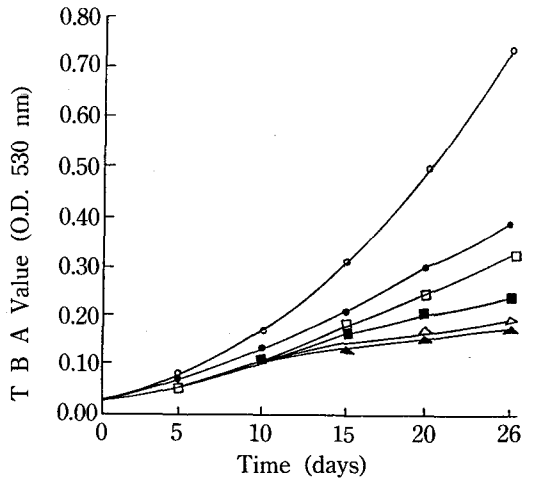

Fig. 4. Comparison of TBA values in soybean oil substrates containing BHA, BHT and various *Chebulae Fructus* extracts during storage at 45℃ (—○—, control ; —●—, BHA ; —□—, BHT ; —■—, free phenolic acid ; —△—, soluble phenolic acid ester ; —▲—, insoluble bound phenolic acid).

Table 2. Contents of phenolic acids in *Crataegus Fructus* and *Terminalia Fructus*

Sample	Contents (%, dry basis)			
	Free	Soluble Ester	Insoluble	Total
Crataegus Fructus	0.11	0.09	0.07	0.27
Terminalia Fructus	0.15	0.10	0.13	0.38

Phenol 성분의 함량 및 패턴

산사 및 가자에서 용매로 추출한 phenol성 추출물의 함량은 Table 2와 같이 전반적으로 free phenolic acids의 함량이 제일 높았으며, 산사에 비해 가자가 높은 값을 나타내었다.

한편 이와 같은 추출물의 항산화 효과의 검토와 아울러 원인물질에 대한 확인 연구에 앞서 각 추출물 구성성분의 종류와 패턴을 비교해 보고자 HPLC에 의해 분리해 본 결과, Fig. 5 및 6에 나타낸 바와 같이 산사의 free pheno-

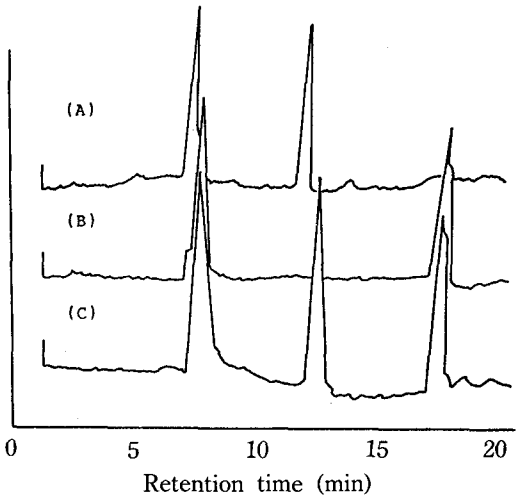

Fig. 5. HPLC chromatogram of free (A), soluble ester (B) and insoluble bound phenolic acids (C) in *Crataegus Fructs.*

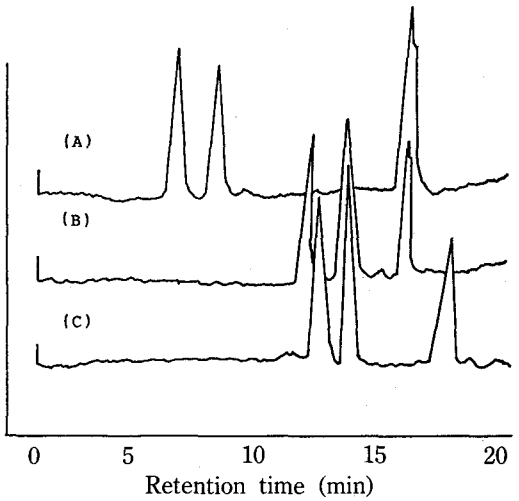

Fig. 6. HPLC chromatogram of free (A), soluble ester (B) and insoluble bound phenolic acids (C) in *Chebulae Fructus.*

lic acids는 3개의 compounds로, soluble ester와 insoluble acids는 2개의 compounds로 나타났으며, 유리형과 용성 에스테르형 페놀산의 compound 1은 동일물질로 나타났다. 또한 용성 에스테르형과 불용성 페놀산의 compound 2도 동일물질로 사료되어 이들 물질에 대한 동정 및 확인 연구가 계속 중에 있다.

감사의 글

이 논문은 1991년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Privett, O.S. and Blank, M.L. : J. Am. Oil Chem. Soc., 39 : 465(1962)
2. Kazuo, M. and Toru, T. : J. Am. Oil Chem. Soc., 63 : 1380(1986)
3. Coleman, J.E. and Hampson, J.W. : J. Am Oil Chem. Soc., 41 : 347(1964)
4. Choe, N.Y. and Yang, Y.H. : Korean J. Food Sci. Technol., 14 : 283(1982)
5. Branen, A.L. : J. Am. Oil Chem. Soc., 52 : 59(1975)
6. Hayes, R.E., Bookwalter, G.N. and Bayley, E.B. : J. Food Sci., 42 : 1527(1977)
7. Avena, S.L. and Hinoat, L.V. : J. Food Sci., 42 : 551 (1977)
8. Kozlowska, H. and Zadernowski, R. : J. Am. Oil Chem. Soc., 60 : 1119(1983)
9. Taylor, M. : J. Food Sci, 45 : 1223(1980)
10. Shigezo, N. : Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 28 : 291(1981)
11. Beckel, R.W. : J. Food Sci., 48 : 996(1983)
12. Rhee, K.I., Yolanda, A.Z. and Rhee, K.C. : J. Food Sci., 46 : 75(1981)
13. 한덕룡 : 현대 생약학, p. 124, 학창사(1986)
14. 아주택 : 한국 식물 대보감, p. 444, 도서출판 일홍 (1989)
15. 相賀徹夫 : 中藥 大辭典, p. 941, 上海 科學 技術 出版社(1985)
16. 김재길 : 천연약물대사전, p. 419, 남산당(1984)
17. 陣挎仁 : 漢方醫藥辭典, p. 380, 東部文化社(1984)
18. 안주택 : 한국자원식물, p. 704, 미도문화사(1984)
19. 오경상 : 현대인의 생활한방, p., 생활한방연구소(1988)
20. A.O.A.C : Official Methods of Analysis, llth Ed., p. 123, Washington D.C.(1970)
21. 최규홍 : 겨자 메탄올 추출물의 항산화 효과, 경북대학교 석사학위 논문(1988)
22. Krygier, K. : J. Agric. Food Chem., 30 : 330(1982)
23. 최규홍, 김정숙, 윤형식 : 경북대 농학지, 9 : 61(1989)
24. 김태철 : 오배자 메탄올 추출물의 항산화 효과, 경북대 석사학위 논문(1990)
25. Paik, T.H. : Korean J. Food Sci. Technol., 14 : 130 (1982)
26. Ma, S.J. : Korean J. Food Sci. Technol., 15 : 150 (1983)
27. Masako, N. and Naoko, F : Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29 : 507(1982)
28. Toshiko, H. : Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29 : 418(1982)
29. Hong, J.H. and Yang, H.C. : J. Korean Agric. Chem. Soc., 33 : 143(1990)

Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets

Jeong-Sook Kim, Gee-Dong Lee, Joong-Ho Kwon and Hyung-Sig Yoon (Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

Abstract : Free phenolic acid, soluble ester and insoluble phenolic acid were extracted from defatted *Crataegus pinnatifida* and *Terminalia chebula*. Their antioxidative effectiveness was compared with BHA and BHT for soybeen oils by measuring peroxide and thiobarbituric acid values at 45℃ for 25 days. The patterns of these extracts were compared by using high performance liquid chromatography. Ether extracts from *Crataegus* and *Terminalia* showed a higher antioxidative effectiveness than BHA and BHT, and the latter was more effective than the former. Among phenolic extracts, free phenolic acid and soluble phendic acid ester were found most effective in *Crataegus* and *Terminalia*, respervively, Each phenolic extract was confirmed to be composed of two or three individual compounds.