

감잎의 항산화 효과

문숙희·박건영*

경남정보대학 식품영양과, *부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Antioxidative Effect of Persimmon Leaves

Suk-Hee Moon and Kun-Young Park*

Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam College of Information & Technology, Pusan 617-701, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The production of malondialdehyde(MDA) was significantly decreased when the methanol extract of persimmon leaves was added to the system. The methanol extract of persimmon leaves was fractionated by using various solvents such as hexane, chloroform, ethylacetate and butanol. Among the above fractions especially the chloroform fraction, ethylacetate fraction revealed the strong antioxidative activities. The hot water extract of the persimmon leaves was less effective than tannin which was extracted from persimmon leaves in antioxidative activity.

Key words: persimmon leaves, hot water extract, tannin, antioxidative acitivity.

서 론

감은 학명이 *Diospyros kaki* Thunberg로 감과실 및 감잎의 맵은맛은 품종에 따라서 차이가 많은데 탄닌 성분들은 잎에서 생합성되어 유관속계(維管束系)를 통해 과실로 이동되어 탄닌세포에 축적되며¹⁾, 맵은맛은 이 탄닌세포에 축적된 가용성 탄닌의 농도에 기인 한다²⁾. 감은 성숙하게 되면서 맵은맛을 소실하게 되는 감시(단감)와 성숙과에서도 맵은맛이 강한 삽시(떫은 감)로 나눌 수 있는데 본 실험에 사용한 삽시(떫은 감)의 경우 감잎 탄닌의 함량이 과실에 비해 전반적으로 높고 감잎의 탄닌함량의 변화는 과실과 유사한 경향을 나타낸다³⁾. 감(잎) 탄닌의 특성을 살펴보면, 감(잎) 탄닌은 열에 안정하며, 물에 잘 녹고 매우 많은 phenolic hydroxy group을 가지고 있어서 고농도에서 쉽게 gel화되며, 고분자 물질로서 강한 수소 결합을 형성하고 있어서 분자량 측정이 매우 어렵다^{3,4)}. 감(잎) 탄닌은 여러 가지 축합형 탄닌의 혼합물로 catechin, catechin-3-gallate, gallic acid, gallocatechin-3-gallate가 1:1:2:2의 비율로 이루어져 있고, 그 외

알려지지 않은 말단 잔기와 proanthocyanidin group에 속하는 것으로 구성되어 있다⁴⁾. 김잎은 비타민 A, C, D 및 엽록소가 풍부해서 항돌연변이 및 항발암성의 효과가 있다고 알려져 있으며^{5~9)}, 그 외 비타민 B₁, 판토텐산, 엽산의 함유량도 녹차엽보다 많아 성인병 예방에 좋다고 한다¹⁰⁾. 김(잎) 탄닌은 여러 가지 생물학적 활성과 함께 활성산소 유리기 소거작용¹¹⁾ 등이 알려져 있으며, 김잎 탄닌의 한 구성성분인 gallic acid의 경우 AZ-521 위암세포의 DNA 합성을 저해하며¹²⁾, 김잎으로부터 분리한 플라보노이드가 종양세포의 증식을 억제한다고 한다¹³⁾.

최근 김잎의 헥산 확분에서 동정된 물질의 항돌연변이 효과¹⁴⁾라는 보고에서 김잎의 메탄올 추출물을 첨가했을 때 강한 항돌연변이 효과가 관찰되었고, 이것을 각 용매별로 추출하여 얻은 헥산 확분도 농도에 비례해서 돌연변이 활성을 억제하였다. 이러한 억제효과를 나타내는 확분에서 항돌연변이 물질로 1'-oxocannabinol, 3B-acetoxy-methyl-5a-18(13-17)abeoandrost-13-ene, 4-methoxy-2',6'-dinitro-3,5-di-t-butylbiphenyl, 8,9-dihydro-5,6-dimethoxy-dibenz

*Corresponding author : Suk-Hee Moon

[c,h]isoquino [2,1,8-1 ma] carbazole-11,16-dione 등이 동정된 바 있다.

한편, 감잎 차액은 연한 연두색을 띠며, 맛과 향이 순하고 은은한데, 이러한 감잎차의 특유한 향기성분은 linalool 등의 알코올류에 기인한다¹⁵⁾. 그 외에도 다양한 cis-3-hexanol, 2,4-heptadienal, 소량의 jasmine lactone, methyl jasmonate 등이 함유되어 있고 감잎 차의 향기에 기여도는 낮으나 다른 차에는 잘 알려지지 않은 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene, 1,3-dimethylcyclopentadiene의 hydrocarbon 함량이 많다고 한다¹⁵⁾.

본 연구에서는 감잎의 경우 건강식품의 일종으로 감잎차로 마시는 경우가 많으므로 감잎의 열탕추출물, 감잎 탄닌과 함께 감잎의 메탄을 추출물 및 각 용매별 회분의 항산화효과를 살펴 보았으며, UV, IR, HPLC 등을 이용하여 감잎으로부터 추출한 추출물이 감잎 탄닌인지를 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 감잎(persimmon leaf: *Diospyros kaki* Thunberg)은 경남 하동군 회개면 탑리에서 6~7월에 채집한 삽시 품종의 감잎으로 이를 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 분획

시료의 용매추출 회분은 시료 중량의 20배의 메탄올로 3시간씩 3회 교반 추출하여 감압 농축한 후 극성이 다른 용매, 즉 혼산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 추출하여 각각의 회분으로 분획하였다. 메탄올 추출물 및 용매 추출물은 진공 감압 농축기로 용매를 제거한 후 실험에 사용하였다. 감잎의 열탕 추출물은 건조 분쇄한 감잎에 소량의 중류수를 넣고 120°C에서 1시간 가열한 뒤 감압 농축하고, 이를 cellulose membrane(12,000>M.W., Sigma Chemical Co., USA)으로 투석한 후 동결 건조하여 분말상의 감잎 열탕추출물을 얻었다. 감잎 탄닌은 Okonogi 등³⁾의 방법에 의해 분리하였다. 즉, 건조 분쇄한 100g의 감잎에 소량의 중류수를 넣고 120°C에서 1시간 가열하여 150ml 아세톤으로 추출한 뒤 농축하였다. 농축액에 메탄올 100ml를 넣고 여과(여과지 Whatman No. 2, England) 한 뒤, 이 여과액에 디에틸에테르 80ml를 넣고 염산을 이용하여 pH를 4.0으로 맞춘 뒤 cellulose membrane(12,000 > M.W., Sigma Chemical Co.,

USA)으로 투석한 후 동결 건조하여 분말상의 탄닌을 얻었다.

3. 항산화 활성 측정

1) 실험동물

SAM(Senescence Accelerated Mouse) R/1 마우스를 한국생명과학연구소(대구)로부터 구입하여 1주 일간 고형사료(삼양주식회사, 서울)로 예비 사육한 다음 체중 30g 전후의 것을 실험에 사용하였다.

2) Malondialdehyde(MDA)의 측정

SAM(Senescence Accelerated Mouse) R/1 마우스의 간을 채취하여 얻은 postmitochondrial 분획을 사용하였다. Postmitochondrial 분획 150μl, 50μM 인산 완충용액(pH 7.4) 150 μl, 0.5% H₂O₂ 100μl, 10mmol FeSO₄ 100 μl 및 50 μM 인산 완충용액(pH 7.4) 100μl를 가한 대조군과 0.1, 1.0, 10 μg/ml 농도의 감잎의 용매 추출회분, 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌 100 μl씩을 각각 가한 처리군으로 나누고, 20분간 37°C에서 배양시킨 다음 반응정지 용액(TBA-TCA-HCl-BHT 용액)을 3ml 가하였다. 그리고 95°C에서 20분간 가열하여 발색시킨 다음 냉각시키고, 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 그 상등액으로 535nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁶⁾.

4. 감잎 탄닌의 확인

1) UV spectrum 측정

Standard tannic acid의 최대 흡광도는 245~292 nm로 알려져 있으며, 감잎 및 녹차로부터 추출한 추출물의 UV spectrum을 UV-2100 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이 경우 standard tannic acid와 같은 탄닌의 주 구성성분의 UV spectrum(245~292nm)과 비교함으로써 이를 추출물이 tannic acid를 함유하고 있는지를 확인하였다.

2) Intra-red spectrum 측정

IR Spectrophotometer(Hitachi, Japan)를 사용하여 감잎으로부터 추출한 추출물의 IR spectrum을 측정하여 탄닌으로부터 관찰될 수 있는 특징적인 흡수 band를 확인하였다.

3) HPLC에 의한 gallic acid의 분리

감잎 탄닌의 활성 성분중 하나인 gallic acid의 존재

Table 1. The operating condition of HPLC for detecting of gallic acid

Instruments	ICL Instruments HPLC system(Australia) (30cm × 3.9mm, i.d.)
Column	μ -Bondapak C ₁₈
Mobile phase	0.5% H ₃ PO ₄ in 95% methanol
Flow rate	0.1ml/min.
Detector	UV 280nm
Sample size	20 μ l

유무를 표준품인 gallic acid를 이용하여 HPLC(ICL Instruments, Australia)로 비교 검토하였다. 이때 HPLC 분석조건은 Table 1과 같다¹⁸⁾.

결과 및 고찰

감잎의 항돌연변이(발암) 작용기전을 살펴보기 위해 발암의 한 요인으로 알려진 유리기 생성을 억제하는 항산화 작용을 검토하였다. *In vitro*에서 감잎의 메탄을 추출물, 용매별 희분, 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌이 유리기에 의한 지질의 과산화에 미치는 영향을 지질과산화의 중간생성물인 MDA 생성량의 변화를 측정하여 대조군과 비교함으로써 이를 감잎성분의 항산화능을 측정하였다. FeSO₄와 H₂O₂ 첨가에 의하여 생성이 촉진되는 MDA는 thiobarbituric acid에 의하여 complex를 형성함으로서 535nm에서 흡광도를 측정하여 그 생성량을 알 수 있다.

감잎의 메탄을 추출물의 농도에 따른 항산화작용을 검토한 결과, 메탄을 추출물의 첨가가 FeSO₄와 H₂O₂에 의해 촉진된 지질의 과산화를 크게 저해하여 메탄을 추출물 0.1, 1.0, 10.0mg/ml에서 각각 0%, 22%, 93%의 억제효과를 나타내어 감잎의 메탄을 추출물은 농도에 비례해서 큰 항산화 효과가 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 그 활성물질을 분리하기 위하여 극성이 다른 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄을 및 물 등으로 분획하였으며, 감잎의 메탄을 추출물에서 분획된 각 용매별 희분의 항산화효과를 살펴본 결과, 감잎의 헥산 희분의 농도에 따른 항산화작용은 0.1, 1.0, 10.0mg/ml에서 각각 1%, 3%, 65%의 억제효과를 나타내었고, 클로로포름 희분의 농도에 따른 항산화작용은 0.1, 1.0, 10.0mg/ml에서 각각 6%, 53%, 91%, 에틸아세테이트 희분은 각각 0%, 64%, 90%, 부탄을 희분은 각각 6%, 37%, 89%, 물 희분은 각각 4%, 11%, 86%의 항산화작용이 관찰되었으며, 그 중에서 가장 활성이 커던 희분은 클로로포름과 에틸아세테이트 분

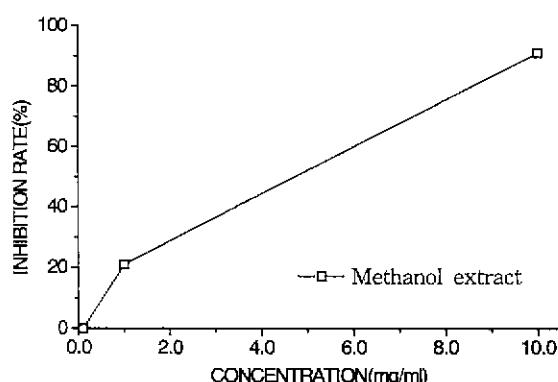


Fig. 1. Effects of methanol extract of persimmon leaves on the lipid peroxidation in postmitochondrial fraction of mouse liver induced by 1.67mM FeSO₄ and 0.08% H₂O₂.

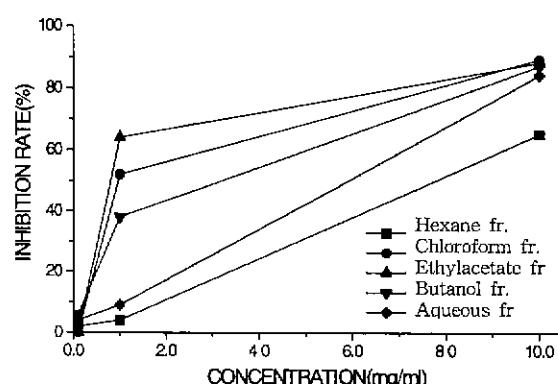


Fig. 2. Effects of hexane fr., chloroform fr., ethylacetate fr., butanol fr. and aqueous fr. of persimmon leaves on the lipid peroxidation in postmitochondrial fraction of mouse liver induced by 1.67mM FeSO₄ and 0.08% H₂O₂.

획들이었다(Fig. 2). 한편, 문¹⁸⁾은 감잎의 각 분획물에 대해 Ames test를 이용하여 항돌연변이 효과를 살펴본 결과 aflatoxin B₁(AFB₁)과 dimethyl-aminobiphenyl(DMAB)와 같은 간접 돌연변이원에 대해서는 감잎의 클로로포름 희분과 에틸아세테이트 희분이 농도에 비례해서 현저한 항돌연변이 효과를 나타냈으며, rec assay에서는 감잎의 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 희분이 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)의 돌연변이성을 억제한다고 하였다. 따라서 감잎의 메탄을 추출물에 존재하는 항돌연변이 및 항산화 활성이 큰 물질중의 하나는 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트에 추출되는 지용성 물질이라 추측되며, 이들 물질이 항돌연변이 효과를 나타내는 기작 중의 하나로서 지질의 과산화를 억제함으로써 세포의

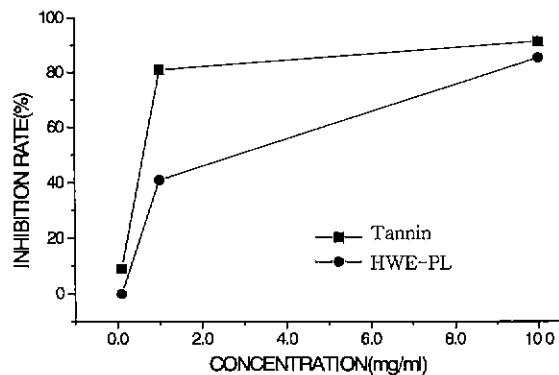


Fig. 3. Effects of hot water extract (HWE-PL) and tannin from persimmon leaves on the lipid peroxidation in postmitochondrial fraction of mouse liver induced by 1.67mM FeSO₄ and 0.08% H₂O₂.

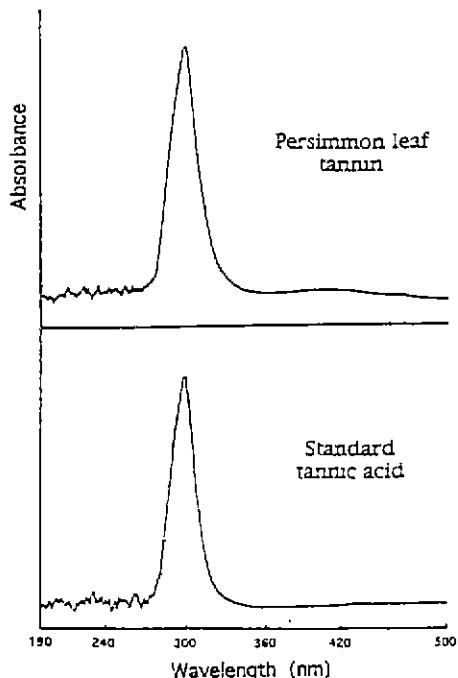


Fig. 4. The UV spectrum of tannin extracted from persimmon leaves and standard tannic acid.

손상을 억제하여 이러한 항발암 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감잎 열탕추출물과 감잎 탄닌이 지질 과산화에 미치는 영향을 검토한 결과 감잎 열탕추출물의 경우 0.1, 1.0, 10.0mg/ml에서 각각 0%, 42%, 88%, 감잎 탄닌의 경우 8%, 72%, 92%의 항산화 효과가 관찰되었다 (Fig. 3). Ames test, spore rec assay 및 SOS chromotest 등을 이용한 항돌연변이 실험¹⁹⁾ 및 암세포

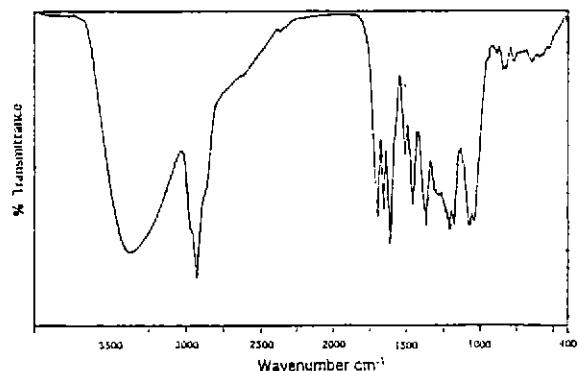


Fig. 5. IR spectrum of tannin extracted from persimmon leaves.

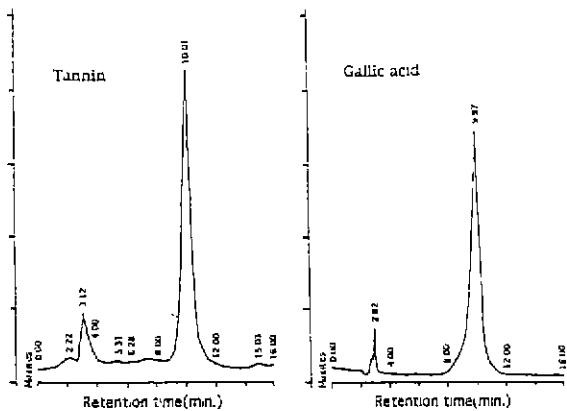


Fig. 6. High performance liquid chromatogram of tannin extracted from persimmon leaves and standard gallic acid.

성장 억제효과¹²⁾에서와 마찬가지로 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌의 농도에 비례해서 항산화 활성이 크게 나타났으며, 감잎의 열탕추출물에 비해 감잎 탄닌이 보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 감잎의 열탕추출물 및 감잎 탄닌에 함유된 항산화 활성을 갖는 주요 물질은 탄닌이라 추정되며, 감잎으로부터 추출한 추출물이 탄닌임을 확인하기 위하여 UV, IR, HPLC를 측정하였다. 탄닌의 UV spectrum은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 최대 흡광도는 298nm로 이는 standard tannic acid의 최대 흡광도와 잘 일치한다. 감잎으로부터 추출한 추출물의 IR spectrum은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 탄닌으로부터 판별될 수 있는 특징적인 흡수 band를 가지고 있었다. 이를 특징적인 흡수 band는 수소결합한 O—H의 신축진동에 의한 흡수 band($\sim 3369\text{cm}^{-1}$), 방향족 C=C의 신축진동에 의한 band($\sim 1600\text{cm}^{-1}$ 과 $\sim 1500\text{cm}^{-1}$) 그리고 aliphatic

C—H의 신축진동에 의한 흡수 band(2929cm^{-1})에서 나타났다. 감잎 탄닌 추출물을 HPLC로 분리한 결과 retention time이 standard gallic acid의 그것과 동일하였다. 이는 감잎 탄닌의 구성성분으로 함유되어 있는 gallic acid가 유리되어 나타난 것으로 생각된다 (Fig. 6). 한편 동결 건조된 감잎 분말로부터 얻어진 탄닌 생성량은 770mg% 였다.

Uchida 등¹¹⁾은 stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSP)에게 감에서 추출한 탄닌을 만성적으로 투여했을 때 혈압조절에 대한 영향은 적지만 수명 연장효과가 매우 커졌으며, 이는 감 탄닌의 지질 과산화의 억제작용과 radical 소거작용 때문이라 하였다. 또한 감잎으로부터 추출된 축합형 탄닌은 DPPH radical, O_2^- , OH 그리고 OOH radical을 소거하는 작용이 있으며, (-)-epicatechin과 비슷하게 활성 산소 유리기를 소거하는 효과가 있고, galloyl group을 가진 축합형 탄닌이 유리기를 소거하는 작용이 가장 크게 나타나 여러가지 축합형 탄닌 중에서 (-)-epigallocatechin 3-o-gallate가 가장 효과적이라고 보고된 바 있다¹¹⁾. 이 등¹⁸⁾은 도토리로부터 항산화 성분을 분리한 결과, 도토리 추출물의 항산화 성분은 주로 gallic acid에 기인한다고 하였으며, 감잎 탄닌의 경우도 gallic acid를 함유하고 있으므로 gallic acid가 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌의 항산화 성분중의 하나로 생각된다. 한편 감잎의 flavonoids 성분인 astragalin (kaempferol-3-glucoside)은 kaempferol로 쉽게 가수분해 될 수 있는데²⁰⁾, 감잎 탄닌의 성분중 하나인 catechin과 함께 kaempferol은 linoleic acid와 methyl linolenate의 자동산화를 억제하는 효과가 있으며, 이들의 항산화 활성은 linoleic acid와 methyl linolenate의 trans, trans-hydroperoxide isomers의 형성을 억제함으로써 이런 활성이 나타난다고 하였으므로²¹⁾ 감잎 탄닌 성분중 gallic acid와 함께 catechin과 astragalin이 항산화 활성을 나타내리라 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 감잎의 메탄올 추출물, 용매별 획분, 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌 모두가 농도에 비례해서 항산화 작용이 관찰되었으며, 감잎의 클로로포름 획분, 에틸아세테이트 획분 및 감잎 탄닌 성분이 보다 현저한 항산화 효과를 나타내었다. 감잎의 클로로포름 획분, 에틸아세테이트 획분 및 감잎 탄닌 성분은 여러 실험계에서 항돌연변이 효과와 암세포 증식억제 효과도 다른 획분에 비해 커으므로 이들 물질이 항돌연변이 및 항발암효과를 나타내는 기작중 하나로서 지질의 과산화를 억제함으로써 세포의 손상을 억제하여 항발암효과를 나타내는 것으로 사료된다.

요약

감잎의 메탄올 추출물은 농도에 비례해서 지질의 과산화를 크게 억제하였으며, 이들을 용매로 더 분획하여 얻은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 획분도 농도에 비례하여 항산화 효과가 관찰되었다. 이들중 가장 활성이 커던 획분은 클로로포름과 에틸아세테이트 획분이었다. 한편 감잎의 열탕추출물과 감잎 탄닌의 경우도 농도에 비례해서 큰 항산화 효과가 관찰되었으며, 항돌연변이 및 암세포 증식억제 효과에서와 마찬가지로 열탕추출물에 비해 감잎 탄닌이 보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이는 감잎의 열탕추출물에 함유된 탄닌의 농도에 기인하리라 생각되며, UV, IR, HPLC 등을 이용하여 감잎으로부터 추출한 추출물이 탄닌임을 확인하였다.

참고문헌

- 손태화, 성종환 : 감과실의 탄닌 물질생성 및 탈삽기구; 제4보, 감잎의 탄닌함량의 변화 및 현미경적 관찰. *한국농화학회지*, 25(4), 201~205 (1982).
- 滔荷妙子, 友枝幹夫 : 柿の脱脂に關する考察(第2報). タンニンの不溶和及びそれに關與する酵素活性の變動, *日本家政學會誌*, 43(4), 271~276 (1992).
- Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A. and Mitsui, S. : Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins, *Toxicon*, 17, 524~527 (1970).
- Matsuo, T. and Ito, S. : The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.), *Agric. Biol. Chem.*, 42(9), 1637~1643 (1978).
- Glatthaar, B. E., Hornig, D. H. and Moser, U. : The role of ascorbic acid in carcinogenesis, Hoffmann-La Roche Co., Ltd., Switzerland (1987).
- Lai, C., Butler, M. A. and Matney, T. S. : Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content, *Mutat. Res.*, 77, 245~250 (1980).
- Terwel, L. and Van der Hoeven, J. C. M. : Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigaret smoke condensate and benzo(a)pyrene in the *Salmonella* microsome assay, *Mutat. Res.*, 152, 1~4 (1985).
- Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart, J. and Brockman, H. E. : Chlorophyllin : A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures, *Mutat. Res.*, 173, 111~115 (1988).
- Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T. and

- Hayatsu, H. : Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 662~668 (1980).
10. 江蘇新醫院編: 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p.15 (1978).
11. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M. : Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin, *Chem. Pharm. Bull.*, 38(4), 1049~1052 (1990).
12. 박건영, 문숙희, 이숙희, 백경아, 임선영, 이세윤 : AZ-521 인체 위암세포에서 감잎 탄닌의 암세포 성장억제 및 Type IV Collagen mRNA 합성에 미치는 효과, *Environmental Mutagens & Carcinogens*, 15(1), 32~37 (1995).
13. Nose, K. : Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II, *Biochem. Pharm.*, 33, 3823~3826 (1984).
14. Moon, Suk-Hee, Kim, Jeong-Ok, Rhee, Sook-Hee, Park, Kun-Young, Kim, Kwang-Hyuk and Rhew, Tae-Hyong : Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22(3), 307~312 (1993).
15. 최성희 : 두충차와 감잎차의 향기성분, *한국식품과학회지*, 22(4), 405~410 (1990).
16. Shah, S.V., Price, L. and Baricos, W. H. : Adriamycin induced stimulation of superoxide anion production in renal cortical microsomes, *Kidney Int.*, 23, 691~695 (1983).
17. 이미현, 정재홍, 오만진 : 도토리 Gallic acid의 항산화성, *한국영양식량학회지*, 21(6), 693~700 (1992).
18. 문숙희 : 감잎의 향돌연변이 및 항암효과, 부산대학교 대학원 박사학위논문 (1993).
19. 문숙희, 박건영 : 감잎 열수 추출물 및 감잎 탄닌의 향돌연변이 효과, *한국영양식량학회지*, 24(6), 880~886 (1995).
20. Ito, S. and Oshima, Y. : Studies on the tannin of Japanese persimmon, *Agric. Biol. Chem.*, 26(3), 156~161 (1962).
21. Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P. : Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochemistry*, 25(2), 383~385 (1986).

(2000년 2월 18일 접수)