KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 37, No. 1, pp. 6~10 (2004)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

불로 구기 부위별 자유라디칼 소거효과에 관한 연구

김은혜 · 김현위[1] · 김수동[2] · 이보희[2] · 이철호[3] · 고경희*
가톨릭대학교 식품영양학과, [1]오뚜기 중앙연구소, [2]청양구기자시험장, [3]고려대학교 생명공학원 생물공학과

Free Radicals Scavenging Activity of *Bulro Kugi* (*Lycium chinense* Mill) Fruit, Leaf and Root

Eun-Hae Kim, Hyeon-Wee Kim[1], Su-Dong Kim[2], Bo-Hee Lee[2], Cherl-Ho Lee[3], and Kyung-Hee Koh*
Department of Food Science and Nutrition, The Catholic University of Korea
[1]*Ottogi Research Center*
[2]*Cheongyang Boxthorn Experiment Station*
[3]*Department of Food Engineering, Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University*

Free radical-scavenging activities of Korean *Bulro Kugi* (*Lycium chinense* Mill) fruit, leaf, and root were evaluated. Total phenolic contents of fruit, leaf, and root were 1,078.4±61.0, 939.9±19.8, and 3,792.2±106.6 mg/L, and their flavonoids were 396.7±15.2, 1,952.9±21.3, and 425.3±13.5 mg/L, respectively ($p < 0.001$). HPLC revealed main polyphenolic compounds in fruit were *p*-coumaric and syringic acids in fruit, *p*-coumaric, syringic, and procatechuic acids in leaf, and *p*-coumaric, syringic, caffeic, and procatechuic acids in root. Highest radical-scavenging activities of superoxide anion and hydroxyl were found in leaf and root, respectively ($p < 0.001$).

Key words: *Bulro Kugi* (*Lycium chinense* Mill), polyphenol and flavonoid compounds, radical scavenging activity, ESR

서 론

구기자 나무(*Lycium chinense* Mill)는 가지과(*Salanaceae*)에 속하는 낙엽송 소관목으로 아시아 지방이 원산지이며, 우리나라의 충남 청양군과 전남 진도군을 비롯한 중국, 대만, 일본, 유럽 등지에 자생하거나 재배되고 있는 생약재로 어린순을 천정초, 열매를 구기자, 잎을 구기엽, 뿌리를 지골피라고 한다(1-4). 본초강목에는 구기자를 복용하면 근골을 단단하게 하며 늙지 않고 더위와 추위를 타지 않으며 독성이 없고 염증, 갈증을 수반하는 당뇨병이나 신경이 마비되는 질병에 좋다고 기록되어 있다(3). 구기자에는 lysine, threonine, methione과 같은 필수아미노산과 탄닌 성분(6-8), zeaxanthin, physalien, rutin, β-sitosterol, choline 등이 함유되어 있고, 사람의 체질 강장효과와 노화방지, 혈당강하, 혈관연화, 콜레스테롤 저감 작용 등이 있으며 지방이 간세포에 침강하는 것을 억제하고 간세포의 신생을 촉진하는 작용과 빈혈을 치유하는 작용 등이 있어 예전부터 약용 또는 식용으로 사용되어 왔다(3,9). 구기자에 관한 연구로는 구기자의 건조방법이 품질에 미치는 영향(10), 가열처리에 따른 구기자 추출물의 성분변화(11), 구기자 등의 추출물의 유리당, 유리아미노산, 유기산 및 타닌의 조성(6), 구기자 추출물이 미생물 생육에 미치는 영향(12), 구기자 추출성분의 간암세포에 항발암 효과 및 비타민 C 첨가에 의한 상승효과(13)를 규명하고, 흰쥐에 있어서 구기자 추출물 첨가식이가 간조직의 유해산소 및 알코올 대사 효소활성(14)과 구기자 알코올 추출물이 oxygen free radical 소거효과(8,15) 및 alcohol 대사와 SOD, catalase 효소활성에 미치는 영향(15)에 대해 동물실험을 수행하였다.

본 연구는 1995년 교잡육종법으로 계통 육성하여 2002년 새로운 품종으로 선발된 불로 구기의 부위별 항산화력이 있는 polyphenolic 성분들을 확인하고, ESR을 통한 라디칼 소거효과에 관한 연구를 하였다.

재료 및 방법

재료

불로 구기열매, 잎, 뿌리는 충남농업기술원 청양구기자 시험장에서 재배하여 수확한 2003년산 불로구기를 제공받아 −70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 시료 제조는 구기부위별 착즙하여 냉동건조 시킨 분말을 증류수로 희석하여 농도별로 실험하였다. 총 페놀함량 측정에는 Folin & Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Co. MO, USA)와 anhydrous sodium carbonate (Oriental chemical Ind., Korea)가 사용되었다. ESR 측정을 위해

*Corresponding author: Kyung-Hee Koh, Department of Food Science and Nutrition, The Catholic University of Korea, Yokkok-2 dong, Wonmi-gu, Puchon 420-743, Korea
Tel: 82-2-2164-4313
Fax: 82-2-2164-4111
E-mail: verokoh@catholic.ac.kr

사용된 hypoxanthin(HPX), xanthin oxidase(XOD), diethylene triaminepentaacetic acid(DTPA), 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)는 Sigma 제품(Sigma Co. MO, USA)을 사용하였다. HPLC 분석을 위한 표준품은 gallic acid, procatechuic acid, catechol, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, syringenic acid, 4-methyl catechin, *p*-coumaric acid, tocopherol은 Sigma (Sigma Co. MO, USA) 제품을 사용하였다.

총 페놀함량

Folin-Ciocalteu 법(16)을 사용하여 불로 구기자 부위별 총 페놀 함량을 측정하였다. 구기 부위별 시료 1 mL에 증류수 60 mL를 가하고, Folin-Ciocalteu's reagent 5 mL를 첨가하여 30초 동안 반응시킨 후 15 mL의 포화 탄산나트륨 용액을 가하여 실온에서 2시간 반응 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성한 검량곡선으로부터 mg/L GAE(gallic acid equavalent)로 환산하였다.

총 플라보노이드 함량

불로 구기자를 Maria 등(17)의 방법으로 구기 부위별 시료 0.1 mL에 80% ethanol 0.9 mL, 0.5 mL에 10% aluminium nitrate 0.1 mL와 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 첨가한 후 40분 반응 후 415 nm에서 측정하고, quercetin 검량곡선을 구하여 mg/L quercetin으로 환산하여 계산하였다.

Polyphenolic compounds 분석

Chen 등(18)의 방법으로 구기열매, 잎, 뿌리 30 g과 동량의 ethyl acetate를 혼합한 후 분별 깔대기에서 ethyl acetate층을 분리, 추출하였으며 이 과정을 3회 반복하여 ethyl acetate 추출물을 합한 후 무수황산나트륨을 가하고 여과하여 50°C에서 회전진공농축기로 완전히 농축한 후 0.2 M 인산완충액(pH 3.0) : 메탄올 : 물 = 2 : 3 : 15(v/v/v)를 6배로 잘 희석한 용액을 0.45 μm로 여과한 후 HPLC(Hewlett Packard 1100, Palo Alto, CA, USA)로 측정하였다.

Superoxide radical 소거실험

불로 구기의 항산화 효과를 측정하기 위해 hypoxanthin-xanthin oxidase(HPX-XOD) 체계에서 electron spin resonance spectroscopy(ESR, Model JEOL-JES-TE 200, Japan)로 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 186 μL, 50 μM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) 2 μL, 180 mM DMPO(5.5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 4 μL, 1 mM xanthine 4 μL, 0.25 unit xanthine oxidase 2 μL, 65 unit catalase 2 μL와 구기부위별 시료를 microtube에 넣어 잘 혼합하여 1분 후에 ESR로 측정하였다. 각 radical peak가 control peak에 비해 작아진 정도의 비를 계산하여 나타내었다(19,20).

Scavenging activity(%) =
[100 – {(sample peak height/control peak height)×100}]

Hydroxyl radical 소거실험

불로 구기의 hydroxyl radical scavenging activity를 측정하기 위해 0.1 M Kpi buffer (pH 7.4) 188 μL, 10 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 4 μL, 90 mM DMPO 2 μL, 200 μM $FeSO_4$ 2 μL, 100 μM H_2O_2 4 μL와 구기부위별 시료를 microtube에 넣어 잘 혼합하여 1분 후에 ESR(Model JEOL-JES-TE 200, Japan)로 측정하였다(19,20).

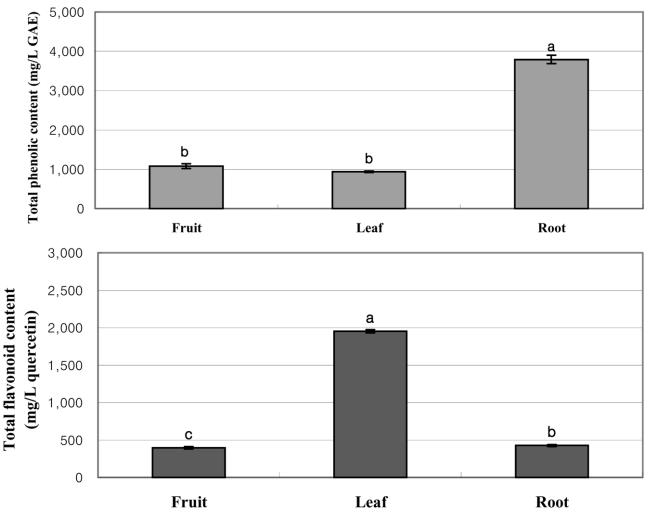

Fig. 1. Contents of total phenolics and flavonoids of *Bulro Kugi* fruit, leaf, and root.
Means (n=3) with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.001$).

통계처리

SAS(Statistical Analysis System)를 사용하여 분산분석을 행한 후 Duncan's multiple range test로 각 시료간의 유의성을 검증하였다(21).

결과 및 고찰

총 페놀 및 플라보노이드 함량

Fig. 1은 불로구기의 부위별 총 페놀과 총 플라보노이드 함량들을 나타낸 그림이다. 열매, 잎, 뿌리의 총페놀 함량은 각각 1,078.4±61.0, 939.9±19.8, 3,792.2±106.6 mg/L으로 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다($p < 0.001$). Quin 등(8)은 메밀의 경우 플라보이드 함량이 140 mg/kg이라고 하였다. 본 연구에서 부위별 총 플라보노이드 함량으로 잎은 1,952.9±21.3 mg/L, 뿌리에는 425.3±13.5 mg/L, 열매는 396.7±15.2 mg/L으로 잎, 뿌리, 열매의 순으로 함유되어 있었으며($p < 0.001$) 구기열매에는 메밀보다 약 2.5배의 플라보이드 함량을 가지고 있었다.

Polyphenol compounds 함량

Fig. 2는 불로 구기 부위별 항산화력이 있는 polyphenol 성분들을 HPLC로 분석하였다. 열매에서는 *p*-coumaric acid 0.018 mg/100 g, syringic acid 0.006 mg/100 g이 검출되었고, 잎에서는 *p*-coumaric acid 0.068 mg/100 g, syringic acid 0.064 mg/100 mg, procatechuic acid 0.05 mg/100 mg이 검출되었다. 뿌리에는 *p*-coumaric acid 0.178 mg/100 mg, syringic acid 0.046 mg/100 mg, caffeic acid 0.043 mg/100 g과 procatechuic acid 0.022 mg/100 mg이 검출되었다. Quin 등(8)은 에타놀로 추출한 구기열매의 주요 플라보노이드 성분은 procatechuic acid, rutin이라고 하였으며, 본 연구에서 주요 폴리페놀 성분들은 열매의 경우 *p*-coumaric acid과 syringic acid이었고, 잎에서는 열매에서 확인되지 않은 caffeic acid가, 뿌리에서는 caffeic acid, procate-

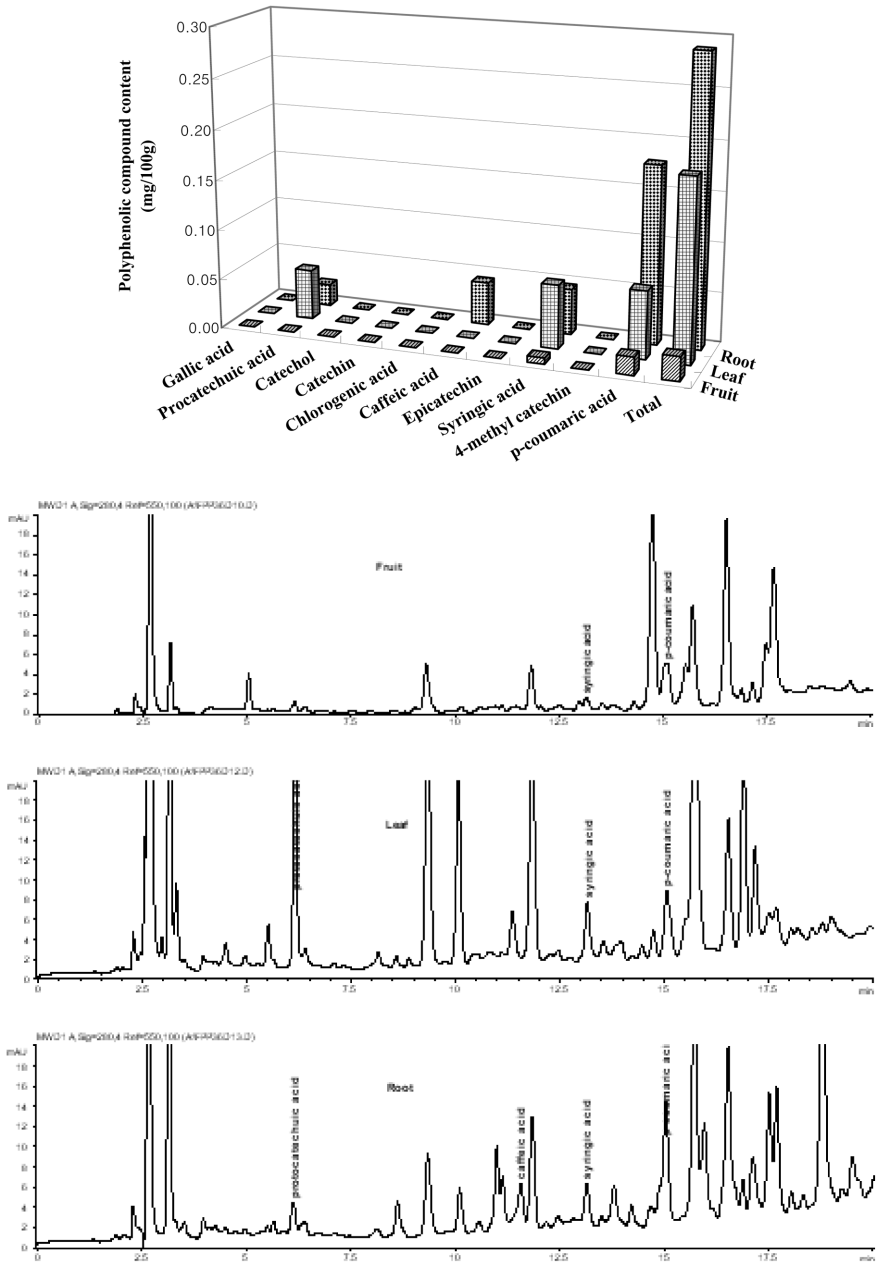

Fig. 2. Polyphenolic compounds and HPLC chromatogram of *Bulro Kugi* fruit, leaf, and root.

chuic acid 성분이 함유되어 있었다. 총 폴리페놀 함량은 뿌리는 0.29 mg/100 g, 잎은 0.18 mg/100 g, 열매는 0.03 mg/100 g의 순으로 뿌리에 제일 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

Superoxide radical 소거효과

Fig. 3은 불로구기 부위별 superoxide anion radical 소거효과를 나타내었다. Superoxide anion radical을 xanthine/xanthine oxidase로 생성시켜 반응 속도가 매우 빠르므로 불안정하므로 DMPO(5.5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)를 이용해서 생성된 radical을 안정하게 trapping 해주므로 ESR을 이용해 이 신호를 탐지하고, 이때 생성되는 금속이온을 제거하기 위해서 DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid)를 첨가하여, superoxide radical은 시간이 지남에 따라 과산화수소도 생성하므로 이를 제거시키기 위해 catalase를 첨가하였다. 불로 구기의 부위별 superoxide radical 소거능력은 잎, 뿌리, 구기열매가 각각 60.8±0.1%, 47.7±0.1%, 21.6±0.1%의 순으로 잎에서 가장 높은 소거효과를 나타내었다($p < 0.001$).

Hydroxyl radical 소거효과

Fig. 4는 불로 구기별 hydroxyl radical 소거효과에 관한 결과이다. Hydroxyl radical은fenton reaction에 의해서 생성이 되며, 이 라디칼을 DMPO(5.5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)로 trapping 하여 ESR로 그 신호를 탐지한다. 불로 구기의 부위별 시료의 hydroxyl radical 소거능력은 superoxide anion radical 소거능력에 비해 효과가 낮으나, 잎과 뿌리에서 각각 7.4±0.1%, 34.6±0.1%로 뿌리에서 가장 높은 소거효과가 있는 것으로 나타났다($p < 0.001$).

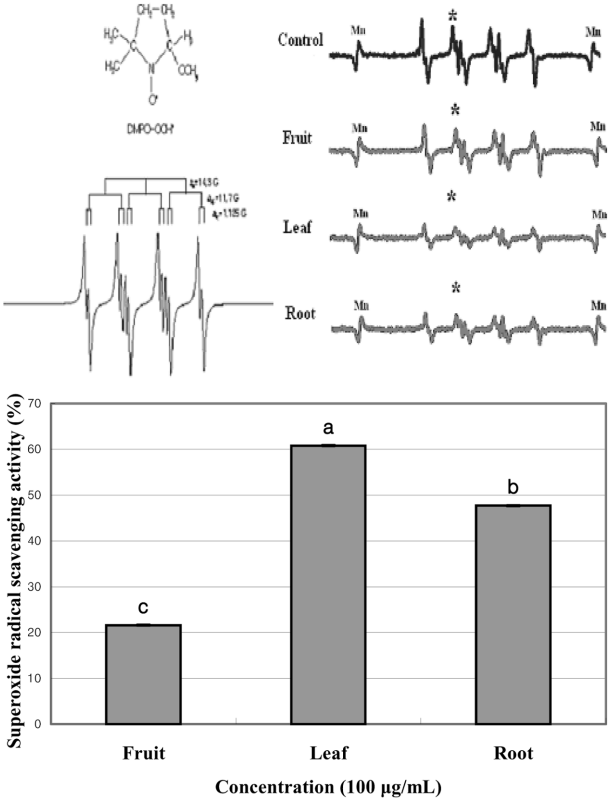

Fig. 3. Superoxide anion ESR spectra and radical scavenging activity of *Bulro Kugi* fruit, leaf and root.
The conditions of ESR analysis: microwave frequency 9.416270 [GHz], microwave power 1.00 [mW], modulation amplitude 0.1 [mT].
For abbreviations see Fig. 1.

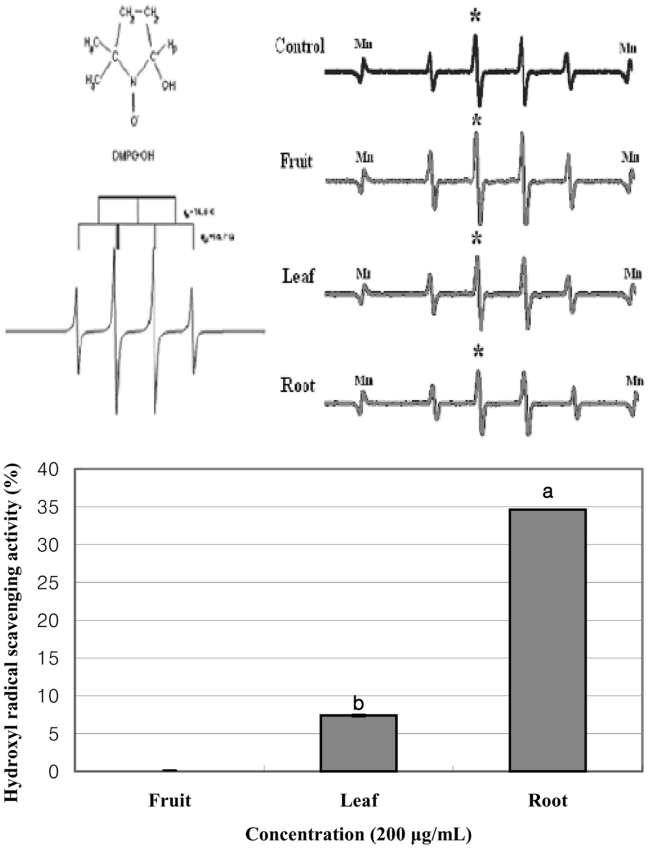

Fig. 4. Hydroxyl ESR spectra and radical scavenging activity of *Bulro Kugi* fruit, leaf and root.
The conditions of ESR analysis: microwave frequency 9.416270 [GHz], microwave power 1.00 [mW], modulation amplitude 0.1 [mT].
For abbreviations see Fig. 1.

요 약

불로 구기의 부위별 열매, 잎, 뿌리의 라디칼 소거 효과를 연구하였다. 총 페놀함량은 불로 구기열매, 잎, 뿌리에서 각각 1,078.4±61.0 mg/L, 939.9±19.8 mg/L, 3,792.2±106.6 mg/L의 함량을 나타내었으며 총 플라보노이드 함량은 구기열매, 잎, 뿌리에서 각각 396.73±15.2, 1,952.94±21.3, 425.29±13.5 mg/L의 함량을 나타내었다($p < 0.001$). 열매에서는 *p*-coumaric acid 0.018 mg/100 g, syringic acid 0.006 mg/100 g이 검출되었고, 잎에서는 *p*-coumaric acid 0.068 mg/100 g, syringic acid 0.064 mg/100 mg, procatechuic acid 0.05 mg/100 mg이 검출되었다. 뿌리에는 *p*-coumaric acid 0.178 mg/100 mg, syringic acid 0.046 mg/100 mg, caffeic acid 0.043 mg/100 g과 procatechuic acid 0.022 mg/100 mg이 검출되었다. 불로구기의 주요 폴리페놀 성분들은 *p*-coumaric acid과 syringic acid이었으며 잎에서는 열매에서 확인되지 않은 caffeic acid가 뿌리에서는 caffeic acid, procatechuic acid 성분이 함유되어 있었다. 총 폴리페놀 함량은 뿌리 0.29 mg/100 g, 잎 0.18 mg/100 g, 열매 0.03 mg/100 g의 순으로 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 불로 구기의 부위별 superoxide anion radical 소거능력은 잎, 뿌리, 구기열매가 각각 60.8±0.1%, 47.7±0.1%, 21.6±0.1%의 순으로 잎에서 가장 높은 소거효과가 나타났으며, hydroxyl radical 소거능력은 superoxide anion radical 소거능력에 비해 효과가 약하나 뿌리에서 34.6±0.1%로 높은 소거효과를 나타내었다($p < 0.001$).

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발과제(2002-2005년)의 연구지원비에 의하여 수행하였으며 연구지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. Lee BY, Kim EJ, Choi HD, Kim YS, Kim IH, Kim SS. Physico-chemical properties of Boxthorn (*Lycii fructus*) hot water extracts by roasting conditions. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 768-772 (1995)
2. Lee BY, Kim HM, Kim CJ, Park MH. Rheological properties of hot-water extractable concentrates of Boxthorn (*Lycii fructus*) and mixed Boxthorn. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 597-602 (1992)
3. Her J. Orient Medicine Handbook. p. 1966. Pubin Press, Seoul (1999)
4. Cheongyang Boxthorn Experiment Station. *Kugija* Chungnam agricultural reaserch and extension services. Chungnam, Korea pp. 1-2 (2000)
5. Chung KJ, Kim MJ, Jang MS. Effect of *Kugija* (*Lycium chinensis Miller*) on the sensory properties and lactic acid bacterial count of Nabak Kimchi during fermentation. Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 19: 521-528 (2003)
6. Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. Composition of free sugars, free amino acids, non-volitile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis M., A. acutiloba K., S. chinensis B.* and *A. sessiliflorum S.* Korean J. Food Sci. Technol. 22: 76-81 (1990)

7. Lee MY, Sheo HJ. Quantitative analysis of amino acids and free sugars in *Lycii fructus.* J. Korean Soc. Food Nutr. 15: 249-252 (1986)
8. Qian J. Liu D. Huang A. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. Food Chem. 87: 283-288 (2004)
9. Tang, W., Eisenbrand, G. Chinese Drug of Plant Origine. p. 633. Springer-Verlag, NY, USA (1986)
10. Cho IS, No JG, Park JS, Li RH. Effect of drying methods on the quality in *Lycii fructus*. Korean J. Med. Crop Sci. 4: 283-287 (1996)
11. Yi SD, Lee MH, Son HJ, Bock JY, Sung CK, Oh MJ, Kim CJ. Changes of chemical constituents in extract of *Lycii fructus* by various heat treatment. Agric. Chem. Biotechnol. 39: 268-273 (1996)
12. Joo IS, Sung CK, Oh MJ, Kim CJ. The influence of *Lycii fructus* extracts on the growth and physiology of microorganism. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 625-631 (1997)
13. Park YJ, Kim MH, Bae SJ. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Lycii fructus* with vitamin C. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 143-148 (2002)
14. Yoon CG, Kim HH, Chae SN, Oh MJ, Lee GH. Hepatic oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats fed diets supplemented with *Lycium chinense* ethanol extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 668-672 (2001)
15. Yoon CG, Jeon TW, Oh MJ, Lee GH, Jeong JH. Effect of the ethanol extract of *Lycium chinense* on the oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 268-273 (2000)
16. Zoecklein BW, Fugeksang KC, Gump BH, Nury FS. Production wine analysis, pp. 129-168. Van Nostrand Reinhold, NY, USA (1990)
17. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)
18. Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. J. Chromatography 913: 387-395 (2001)
19. Lissi EA, Salim M, Psacual C, Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential and total reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. Free Radicals Biol. Med. 18: 153-158 (1995)
20. Mitsuta K, Mitsuta Y, Kohno M, Hiramatsu M, Mori A. The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63: 187-191 (1990)
21. SAS. SAS User's Guide. SAS Institute, Ver. 8.2, Cary, NC. USA (1990)

(2004년 7월 27일 접수; 2004년 12월 9일 채택)