

활나물 부위별 추출물의 항산화 활성 비교

우나리야¹ · 김태수¹ · 박희운² · 박춘근² · 성하정³ · 고상범³ · 정진우⁴ · 강명화^{1†}

¹호서대학교 식품영양학과, ²농촌진흥청 작물과학원

³한국화학시험연구원 안전성 평가본부, ⁴영산대학교 식품영양학과

Comparison of Antioxidative Activities of *Crotalaria sessiflora* L. Extracts from Leaves, Seed, Stem and Root

Na Ri Yah Woo¹, Tae Su Kim¹, Hee Woon Park², Chun Geon Park², Ha Jeong Seong³,
Sang Beom Ko³, Jin Woo Jung⁴ and Myung Hwa Kang^{1†}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Rural Development Agriculture, National Institute of Crop Science, Suwon 441-707, Korea

³Safety Assesment Center, Korea Testing and Research Institute for
Chemical Industry, Gimpo 415-871, Korea

⁴School of Culinary Art & Food Management, Yangsan University, Busan 612-743, Korea

Abstract

This study was carried to develop the new functional food material by exploring natural antioxidant substances of *Crotalaria sessiflora* L. We compared antioxidative activity of potential antioxidant substances extracted from *Crotalaria sessiflora* L. The order of extract yield of *Crotalaria sessiflora* L. were stem>leaves>seed>root. Antioxidative activities of *Crotalaria sessiflora* L. were measured by total polyphenol contents, EDA (electron donating activity), SOD (superoxide dismutase)-like activity, hydroxyl radical scavenging ability and hydrogen peroxide radical scavenging ability. Total polyphenol acid content was much higher in leaves Ex than other extracts. And leaves Ex showed the most excellent antioxidative activity (86.27%) in terms of SOD-like activity. The EDA was ordered leaves Ex>stem Ex>seed Ex>root Ex. Hydroxy radical scavenging ability was the most effective in leaves Ex, and hydorogen peroxide radical scavenging ability was the highest in seed Ex. Therefore we could be certain that leaves Ex was the most effective in antioxidative activity from *Crotalaria sessiflora* L.

Key words: *Crotalaria sessiflora* L. antioxidant, total phenolic acid content, SOD-like activity, hydroxyl radical scavenging ability, hydrogen peroxide radical scavenging ability

서 론

식물자원은 항암(1,2), 항알레르기(3), 항비만(4), 항산화(5,6), 항균(7) 등 기능성 물질이 다양 함유되어 있는 물질의 보고라고 할 수 있으며, 이들 유용성분을 식품에 첨가하거나 그 물질 자체를 이용하려는 연구가 다양하게 진행되고 있다. 이 중 항산화물질은 유지의 자동산화과정의 연쇄반응을 억제시키는 radical scavenger나 혹은 LDL(low density lipoprotein)산화에 의한 동맥경화, 심장병예방, 노화억제 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(8,9). 최근 노화와 성인병 질환의 원인인 활성산소를 조절할 수 있는 물질로써의 항산화제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

효소계일인 SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathionperoxidase 등과 천연항산화제인 vitamin C, carotenoid,

glutathion 그리고 합성항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxyanisole) 등의 항산화제의 효능이 보고되고 있다(10,11). 식품의 가공 또는 저장 중 발생되는 산화를 방지하기 위한 수단으로 가장 많이 사용되는 천연 항산화제는 tocopherol로 효과는 비교적 낮은 편이고(12), 합성항산화제인 BHA, BHT의 효과는 우수하나 변이원성과 독성이 지적되어(13), 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다. 따라서 보다 안전하고 효력이 높은 천연항산화제의 개발이 요구되고 있다. Cha 등(14)은 국내 유용식물의 항산화 효과를 검색한 결과 솔잎, 땅빈대의 메탄올 추출물의 항산화 활성이 높았다고 보고하였다. 또한 안전성이 확보된 천연물로부터 천연항산화제에 대한 탐색연구에 의하면 패모, 어성초, 쇠비름과 같은 식물자원의 추출 분획물에서 항산화효과가 있었고, 추출 용매의 종류에 따라서도 활성이

*Corresponding author. E-mail: mhkang@office.hoseo.ac.kr
Phone: 82-41-540-5630. Fax: 82-41-548-0670

큰 차이가 있는 것으로 나타났다(15). 약용식물들은 다양한 항산화 효과를 보이고(16), 블나무(17)와 propolis 추출물(18)에서 새로운 항산화 물질을 규명하였다. 수산 자원인 김, 미역, 다시마 등의 항산화 활성도 비교적 높았다(19,20). 따라서 천연식품 소재에 함유되어 있는 항산화 물질을 포함한 기능성 물질을 규명함으로써 부가가치가 높은 식품소재를 제공할 수 있을 것으로 예상된다.

활나물(*Crotalaria sessiflora* L.)은 두과식물로서 우리나라 산야에서 야생하고 있는 잡목으로 크기는 20~70 cm이며, 갈색의 긴 털을 가진 특성을 지니고 있다(21). 종양, 암, 만성 기관지염 등 각종 질환의 치료제나 해독제로 민간요법으로 널리 이용되어 왔으며, 활나물 성분 중 monocrotaline은 전초와 종자에 각각 0.02, 0.4%정도 함유되어 다양한 생리활성과 항암효과를 가지고 있다(22). 그 외에 다양한 alkaloid 계통의 물질이 함유되어 있어 생리 활성 효과가 높은 것으로 알려져 있으나(23), 야생 활나물은 종자발아율이 매우 부진하고 타 작물의 발아를 억제하는 특성을 지니고 있다(24). 최근에는 활나물의 자원화를 위해 종자 휴면타파를 위한 저온처리방법, 저온 대체효과를 가지는 gebberellin(GA₃), KNO₃ 처리로 발아율을 높이는 방법이 개발되고 있다(23).

따라서 본 연구는 야생하고 있는 식물 자원의 하나인 활나물의 부위별 항산화 활성 효과를 규명하고 천연물의 항산화 활성과 새로운 기능성 식품 신소재 개발의 기초 연구자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

활나물(*Crotalaria sessiflora* L.)은 수원 작물과학원 약용작물시험포장에서 2004년 수확한 것을 뿌리, 줄기, 잎, 종자로 분류하여 세척한 후 그늘에서 자연 건조하여 실험재료로 사용하였다. 활나물의 지표물질인 crotaline과 가장 대표적인 천연항산화물질인 tocopherol, sesamol(Sigma Co, USA)을 사용하였으며, methylene chloride, ethanol을 각각 특급용매를 추출용으로 구입하여 사용하였다.

추출방법

활나물의 잎, 줄기, 뿌리, 종자의 각각의 부위를 methylene chloride, ethanol 혼합용매(3:1)로 water bath를 이용하여 3일간 상온에서 3일간 반복 추출한 후 여과지(whatman No.2)에 거른 후 rotary evaporator(EYELA N-1000, Japan)로 감압 농축하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기로 건조시켜 각 추출물의 수율을 계산하였다(Fig. 1).

총 폐놀성 화합물 정량

활나물 부위별 추출물의 총 폐놀성 화합물을 Folin Denis 법(25)을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 즉, 각 시료 0.2 mL에 Na₂CO₃를 2.0 mL 가하고 2분간 실온에 방치한 후,

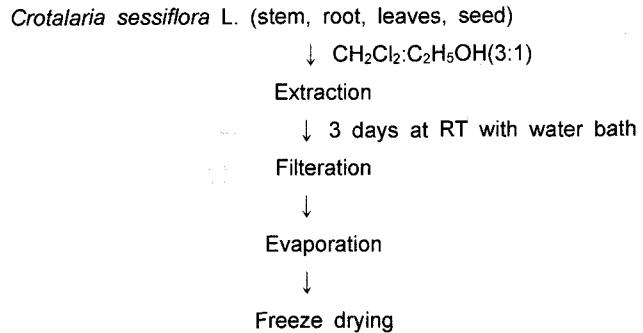


Fig. 1. The extract method from each part of *Crotalaria sessiflora* L.

50%의 Folin Denis시약을 0.2 mL 가하고 혼합하고 30분 정 치하여 750 nm에서 흡광도를 반복 측정하였으며, catechine 농도를 달리하여 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.

SOD 유사 활성 측정

SOD 유사활성 측정은 각 추출물 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 3 mL와 0.2 mM pyrogallol을 가하여 25°C에서 10분간 방치한 후, 1 N-HCl로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 UV-visible spectrophotometer(Ultraspec 3000 Biotech, Germany)를 이용하여 측정하였다(26).

Hydroxy radical 소거능 측정

FeSO₄/EDTA 용액, 2-deoxyribose, 각 분획물, phosphate-buffer, H₂O₂를 혼합한 후 2시간 동안 반응시킨 후 TCA(trichloro acetic acid)용액과 TBA(thiobarbituric acid)용액을 넣고 15분 가열한 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 비교하였다(27).

Hydrogen peroxide radical 소거능 측정

일정량의 lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소가스를 이용하여 용매를 완전히 제거한 한 추출물, 2 mM FeSO₄, 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 30분간 incubating 한 후 과산화 지질을 TBARS법(2-thiobarbutric acid relative substance)에 의하여 측정하였다(28).

통계처리

본 연구의 결과는 SAS system를 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

추출수율

활나물의 methylene chloride, ethanol 혼합 용매에 의하여 부위별로 추출한 결과는 줄기 4.47, 잎 3.95, 종자 2.90, 뿌리 2.67%의 순으로 줄기 부분의 추출수율이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 1). Choi 등(29)의 연구에 의하면 포도씨를 단일용매인 메탄올로 추출한 경우가 각각 1.7~1.9%의 추출

Table 1. Extract yield of *Crotalaria sessiflora* L.

Sample	Yield (%)
Stem	4.47
Leaves	3.95
Seed	2.90
Root	2.67

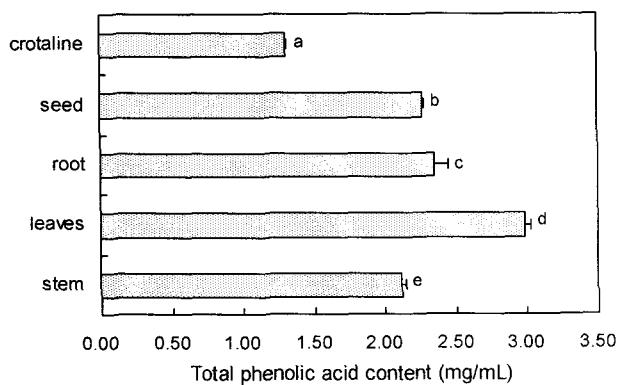


Fig. 2. Total phenolic acid contents of extracts from each part of *Crotalaria sessiflora* L.
Different letter indicates significantly difference by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$.

수율이었다고 보고하였다. 따라서 활나물의 혼합용매에 의한 추출수율이 높은 수준임을 알 수 있었다.

총 페놀성 화합물 함량

총 페놀성 화합물 함량은 잎 추출물에서 가장 높게 나타났으며, 줄기 추출물에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 즉 총 페놀함량은 잎 2.98, 뿌리 2.34, 종자 2.26, 줄기 2.11 mg/mL 이었으며, 활나물의 지표물질로 알려진 crotalaine은 1.35 mg/mL로 측정되었다(Fig. 2). 페놀화합물을 식물자원에 함유되어 있는 천연물질로써 다양한 구조와 생리활성 기능을 가지고 있다. Kang 등(30)의 연구에 의하면 활나물을 에탄올 용매로 추출한 경우 부위에 따른 페놀 함량이 0.71~0.99 mg/mL라고 보고하였는데, 이는 용매에 의한 추출수율과 페놀 함량이 다르게 측정됨을 알 수 있었다. Jayaprakasha 등(31)은 포도씨에서 총페놀성 화합물을 추출하는데 10~15%의 water를 첨가하는 것이 최적 추출조건이라고 하였다. 따라서 천연물에서의 총 페놀성 화합물의 추출조건은 추출용매에 따라 추출효율이 변화되는 가장 큰 요인이 된다(32).

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

Superoxide dismutase는 세포내 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 생체내의 항산화 효소 중 하나이며, SOD에 의하여 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxydase에 의하여 물분자와 산소분자로 전환된다(26). SOD 유사활성은 잎 추출물의 활성이 86.27%로 가장 높았으며, 줄기와 뿌리 추출물은 각각 56.32, 50.29%이었으며, 종자 추출물의 경우 16.82%로 가장 낮았다(Fig. 3). 활나물의 잎, 줄기, 뿌리 추출물의 SOD 유사활성은 천연항산화제인 tocopherol보다 매우

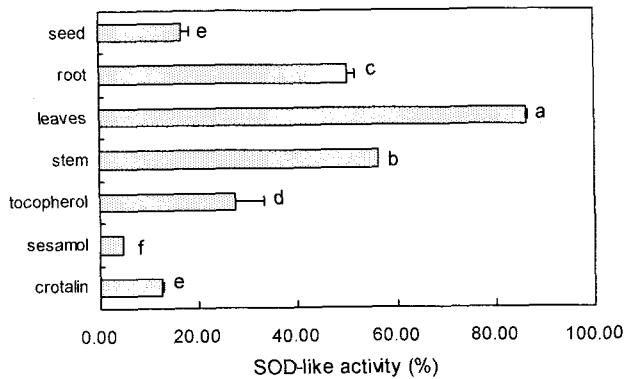


Fig. 3. SOD-like activites of extracts from each part of *Crotalaria sessiflora* L.
Different letter indicates significantly difference by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$.

높게 측정되었다. 녹차추출물의 SOD 유사활성이 85.3%인 결과(33)와 비교하여 볼 때 활나물의 잎 추출물의 SOD 유사 활성이 비슷한 경향을 나타내었고, 활나물 잎 추출물은 superoxide anion 제거능이 높은 물질을 함유하고 있다고 사료된다.

Hydroxy radical 소거활성 측정

Hydroxy radical($\cdot\text{OH}$)은 활성산소 중 반응성이 매우 강하여 생체 산화에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다(27). 활나물 부위별 추출물에 대한 hydroxy radical 소거활성은 Fig. 4와 같다. 즉 활나물의 잎 추출물에서 42.90%로 가장 높았으며, 줄기, 종자, 뿌리 추출물은 각각 41.03, 37.80, 37.62% 이었고, 천연항산화제인 tocopherol 32.38%로 가장 낮은 결과를 보여주었다. 한국산 약초잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삽주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거 능이 90%이상이었다는 결과(34)와 비교할 때 활나물 추출물의 hydroxy radical 소거활성은 다소 낮았다.

Hydrogen peroxide 소거활성 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 SOD에 의하여 생성된 과

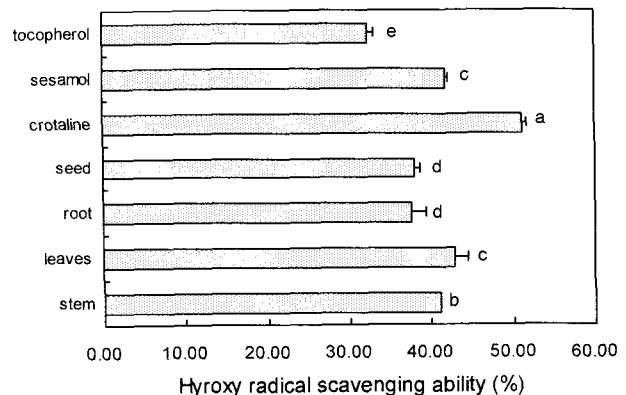


Fig. 4. Hydroxy radical scavenging ability of extracts (mg/mL) from each part of *Crotalaria sessiflora* L.
Different letter indicates significantly difference by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$.

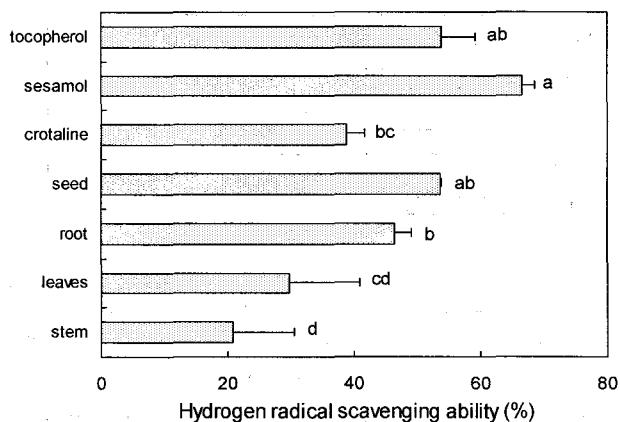


Fig. 5. Hydrogen radical scavenging ability of extracts (mg/mL) from each part of *Crotalaria sessiflora* L.
Different letter indicates significantly difference by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소 분자로 환원시켜 최종적으로 산페를 억제시켜 주는 항산화능력을 측정하는 방법(28)으로 활나물의 hydrogen peroxide 소거활성이 Fig. 5와 같다. 활나물의 종자 추출물의 hydrogen radical 소거능이 53.51%로 가장 높아, 천연 항산화제인 tocopherol의 53.81%와 비슷한 수준이었으며, sesamol의 66.51%보다는 낮은 결과를 보여주었다. 활나물의 종자 추출물에 대한 hydrogen radical 소거능은 Yoo 등(35)의 포도 과피의 항산화 활성 55.6~66.6%와 유사한 결과를 보여 천연물로서의 항산화 소재로 개발 가능할 것으로 여겨진다.

요 약

활나물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 잎, 줄기, 뿌리 및 종자의 부위별로 분리하여 methylene chloride와 ethanol 혼합용매에 의해 추출하였다. 활나물의 부위로 추출수율은 줄기 4.47%, 잎 3.95%, 종자 2.90%, 뿌리 2.67%의 순으로 줄기 부분의 추출수율이 가장 높았다. 총 페놀성 화합물 함량은 잎 2.98, 뿌리 2.34, 종자 2.26, 줄기 2.11 mg/mL로 잎 추출물에서 가장 높았다. SOD 유사활성은 잎 추출물의 활성이 86.27%로 가장 높았으며, 줄기와 뿌리 추출물은 각각 56.32, 50.29%이었으며, 종자 추출물은 경우 16.82%로 가장 낮았다. 잎, 줄기, 뿌리 추출물의 SOD 유사활성은 천연 항산화제인 tocopherol보다 매우 높았다. 활나물 부위별 추출물의 전자공여능은 잎과 줄기 추출물에서 각각 16.87, 16.06%로 매우 높았으며, 뿌리 추출물과 종자 추출물이 각각 11.13, 9.31%로 tocopherol 9.28%보다 높았다. 활나물 부위별 추출물에 대한 hydroxy radical 소거활성은 잎 추출물에서 42.90%로 가장 높게 나타났고, 줄기, 종자, 뿌리 추출물은 각각 41.03, 37.80, 37.62%이었으며, 천연 항산화제인 tocopherol 32.38%이 가장 낮은 결과를 보여주었다. 종자 추출물의 hydrogen radical 소거능이 53.51%로 가장 높게 나타났으며, tocopherol

의 53.81%와 비슷한 활성 수준을 보여 주었다. 따라서 활나물 부위별 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과 잎 추출물이 가장 항산화 활성이 높았으며, 활나물은 천연항산화제로의 개발 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2004년도 농림부 농림기술센터의 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 현

- Kim KH, Chang MW, Park KY, Rhee SH, Rhee TH, Sunwoo YI. 1993. Antitumor activity of phytol identified from perilla leaf and its angmentative effects on cellular jmmune response. *Korean J Nutr* 26: 379-389.
- Kim YI, Lee SH, Cho TS. 1996. Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. *Kor J Pharmacogn* 27: 238-245.
- Park KH, Koh DS, Lim YH. 2001. Anti allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. *J Korean Soc Agric Biotechnol* 44: 40-42.
- Choo JJ. 2000. Anti obesity effects of Kochujang in rats fed on a high fat diet. *Korean J Nutr* 33: 787-793.
- Shim KH, Young HS, Lee TW, Choi JS. 1995. Studies on the chemical components and antioxidative effects of *Solanum lyratum* Thunb. *Kor J Pharmacogn* 26: 130-138.
- Han YB, Kim MR, Han BH, Han YN. 1987. Studies on antioxidant component of mustard leaf and seed. *Kor J Pharmacogn* 18: 41-49.
- Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2273-2276.
- Monach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Taxier O, Regeat F, Remesy C. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivative which retain antioxindnat properties. *FEBS Lett* 426: 331-336.
- Rice ECA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationship of flavonoid and phenolic acid. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
- Hatano T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* 49: 357-363.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Acitive oxygen scavenging acitivity of plants. *Biol Pharm Bull* 18: 162-166.
- Corl MM. 1977. Antioxidant activity of tocopherol and ascorbyl palmitate and their mode of action. *JAOCs* 51: 321-325.
- Barene AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluen. *JAOCs* 52: 59-63.
- Cha BC, Lee SK, Lee HW, Lee E, Choi MY, Rhim TJ, Park HJ. 1997. Antioxidative effect of domestic plants. *Kor J Pharmacogn* 28: 15-20.
- Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1993. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Korean J Food Sci Technol* 25: 683-688.
- Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidant activity of ethanol extract from Korean medical plants. *Korean J Food Sci Technol* 28: 83-89.

17. Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1992. Antioxidant activity of ethanol extract from *Rhus javanica* Linne on edible oil. *Korean J Food Sci Technol* 24: 320-326.
18. Lim DK, Choi U, Shin DH, Jeong YS. 1994. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Korean J Food Sci Technol* 26: 622-627.
19. Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algaee. *Korean J Food Sci Technol* 23: 256-262.
20. Cho SY, You BJ, Chang MH, Lee SJ, Sung NJ, Lee EH. 1994. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Korean J Food Sci Technol* 26: 261-266.
21. Shin MK, Song HJ, Kang YS, Ryu HS, Han DS, Kang KU, Baeks SH. 1999. Studies on the cytotoxicity and antitumor activity of *Herba crotalariae sessiliflorae*. *Korean J Pharm* 30: 130-136.
22. Lee H, Lin JY. 1999. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res* 204: 229-234.
23. Kang JH, Kim YJ, Jeon BS. 2001. Effects of presown cold stratification, GA₃, KNO₃ and aceton treatment on germination of *Crotalaria sessiliflora* L. *Korean J Medicinal Corp Sci* 9: 124-129.
24. Ohdan H, Daimon H, Mimoto H. 1995. Evaluation of allelopathy in *Crotalaria* by using a seed pack growth pouch. *Japanese J Corp Sci* 64: 644-649.
25. Choi YH, Kim MJ, Lee HS, Yun BS, Hu C, Kwak SS. 2001. Antioxidative compounds in aerial parts of *Potentilla fragarioides*. *Kor J Pharmacogn* 29: 79-85.
26. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
27. Chung SK. 1997. Hydroxy radical scavenging effects of speies and scavengers from brown mustard. *Biosci Biotech Biochem* 61: 118-123.
28. Muller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidese medium. *Microbio Hyg* 259: 151-155.
29. Choi CS, Song ES, Kim JS, Kang MH. 2003. Antioxidative activites of *Castanea Crenata Flos*. methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216-1220.
30. Kang MH, Choi CS, Kim JS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidant activites of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiliflora* L. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1098-1102.
31. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* 73: 285-290.
32. Jayaprakaya GK, Selvi T, Sakariah KK. 2003. Antibacterial and antioxidant acitivites of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts. *Food Reserch International* 36: 117-122.
33. Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrate scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
34. Kim YC, Chung SK. 2002. Relative oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Sci Biotechnol* 11: 407-411.
35. Yoo MA, Chung HK, Kang MH. 2004. Evaluation of physicochemical properties in different cultivar grape seed waste. *J Korean Soc Food Sci* 13: 26-30.

(2005년 8월 22일 접수; 2005년 10월 13일 채택)