

## 머루종자 에탄올 추출물로부터 항산화활성물질 분리 및 동정

김난영 · 최재호 · 김영국 · 장미영<sup>1</sup> · 문제학<sup>1</sup> · 박근형<sup>1</sup> · 오덕환\*

강원대학교 바이오산업공학부, <sup>1</sup>전남대학교 응용생물공학부 및 기능성식품연구센터

### Isolation and Identification of an Antioxidant Substance from Ethanol Extract of Wild Grape (*Vitis coignetiea*) Seed

Nan-Young Kim, Jae-Ho Choi, Young-Guk Kim, Mi-Young Jang<sup>1</sup>, Jea-Hak Moon<sup>1</sup>,  
Geun-Hyung Park<sup>1</sup>, and Deog-Hwan Oh\*

School of biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology and Functional Food Research Center, Chonnam National University

**Abstract** Antioxidant compound(s) were identified from the ethanol extract of wild grape (*Vitis coignetiea*) seed. Organic solvent fractions of *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol were obtained from the ethanol extract of wild grape seed, among which ethyl acetate fraction showed the strongest reducing power. Ethyl acetate fraction was further purified through ODS column chromatography and HPLC, and isolated antioxidative active compound was identified through <sup>1</sup>H-NMR as (+)-catechin (52.7 g/100 g). (+)-Catechin and ethyl acetate fraction both showed approximately 80% scavenging effect. These results indicated (+)-catechin in the ethyl acetate fraction synergetically interacts with unknown antioxidative compound(s).

**Key words:** wild grape seed, *Vitis coignetiea*, antioxidant, reducing power, (+)-catechin

## 서 론

최근 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 녹차, 초코렛, 포도주 등과 같은 폴리페놀물질의 함량이 높은 식품에 대한 섭취가 증가하고 있으며, 이들 식품은 우리 몸의 각 기관에서 항산화 작용 및 항암작용을 하거나 각종 심장질환을 억제한다는 보고가 있다(1,2). 또한 다양한 식용 또는 약용식물 소재로부터 각종 기능성 소재개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(3,4).

머루(wild grape, *Vitis coignetiea*)는 갈매나무목(*Rhamnales*) 포도과(*Vitaceae*)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 동북아시아 지역, 중국 및 한국 북반구의 해발 100-1,300 m에 분포한다. 포도와 형상이 비슷하나 산에서 야생으로 자생하며 내한성과 병충해 저항성이 강한 성질을 지녔다. 보통 열매는 술을 담그기 위하여 오래전부터 와인처럼 머루주를 만드는데 쓰였으며, 민간처방으로 잎 추출물을 구토와 설사, 동상, 빈혈을 위하여 사용하였고, 최근 연구에 의하면 뿌리는 항염작용이 있는 것으로 알려져 있다(5). 이들 연구를 바탕으로 국내에서는 왕머루(*Vitis amurensis*) 뿌리로부터 heyneanol을 분리하여 항종양(anti-tumor)에 대한 일부 메커니즘이 보고되었다(6).

머루와 동일 *Vitis*속인 포도의 경우, 국내 및 국외에서 생산부터 와인 가공에 이르기까지 육종, 성분분석, 항산화, 항암활성, 항

균활성 등 수많은 연구가 진행되어 왔으며, polyphenol 물질인 anthocyanin, procyanidin, catechin, epicatechin, resveratrol은 물론 유기산이 풍부한 것으로 보고되었다(7-9). Catechin 및 epicatechin은 자연계에 널리 분포하는 물질로 항암과 비만예방에 뛰어난 효과로 기능성 식품의 주요성분으로 주목되고 있다(10,11). 또한 flavonoid와는 다른 stilbene의 구조를 지닌 resveratrol은 항균 및 항암은 물론 심혈관 질환 예방에 뛰어난 효과를 지니고 있으며 현재 그 화합물을 대상으로 한 연구가 활발히 진행 중에 있다(12,13). 한편 포도주 제조과정 뒤 발생하는 부산물에도 많은 항산화 물질들이 존재하는 것으로 보고되면서 유용자원으로서의 재고성 검토에 관심이 집중되고 있다(14). 최근 기능성 oil의 일종으로 포도씨유의 생산이 증가하고 있으며, 포도종자에는 주로 sitosterol, campesterol 및 stigmasterol 등의 phytosterol들이 존재하는 것으로 보고되고 있다(15).

그러나 같은 포도과인 머루의 경우, 현재 국내에서는 과실상태로 판매하기 보다는 과실주 형태로 유통되고 있으며 머루주는 포도주보다 산미가 강하면서 안토시아닌 함량과 페놀성분이 많이 함유된 것으로 알려져 있다(16,17). 또한 Wang 등(18)은 머루종자에서 catechin이나 epicatechin 등이 oligomer로 결합된 고분자 형태의 procyanidin을 단리하였는데, 이는 산이나 열 등에 의하여 분해되어 다시 catechin이나 epicatechin 등을 생산한다고 보고하였다. 이처럼 포도종자와서와 마찬가지로 머루종자 또한 유용성분에 대한 상세한 연구가 필요하다고 판단되어, 저자 등은 전보(19)에서 머루종자의 적정추출조건 및 추출 분획물에 대한 free radical 소거능을 탐색한 결과, 머루종자 에틸아세테이트 분획물에서 가장 강한 항산화 활성을 지닌 것으로 보고하였다. 이에 본 연구에서는 머루종자 중에 함유된 항산화활성물질을 구명하기 위하여 에틸아세테이트 분획물로부터 항산화 활성물질을 분리·동정하고자 하였다.

\*Corresponding author: Deog-Hwan Oh, School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-6457

Fax: 82-33-250-6457

E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr

Received September 22, 2005; accepted December 20, 2005

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용된 머루종자(*Vitis coignetia seed*)는 경기도 파주의 감악산 머루 농원에서 재배한 것을 9월에 수확하여 자연건조한 후 분쇄하여 4°C에서 보관하며 사용하였다.

### 추출 및 분획

분쇄한 머루종자 200 g에 70% 에탄올(2 L)을 가하여 heating mantle에서 열(70°C)을 가해 환류하면서 6시간 2회 반복 추출하였다. 추출물은 감압여과(Whatman, No. 2)를 행하여 얻어진 여액을 농축하고 동결건조하여 사용직전까지 -70°C에 보관하였다.

한편, 추출물은 극성이 다른 용매를 이용하여 순차적으로 분획하였다. 즉, 70% ethanol 추출액의 농축물(13.8 g, 건조중량 200 g 상당량)을 증류수로 현탁 한 후, hexane(500 mL × 3), chloroform(500 mL × 3), ethyl acetate(500 mL × 10) 및 butanol(500 mL × 3)로 순차적으로 용매분획한 다음 각 획분을 농축하여 동결건조하였다. 이것들은 각각 밀봉하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 항산화 활성평가

**환원력의 측정:** Oyaizu의 방법(20)에 의거하여 머루종자 에탄올 추출물의 환원력을 측정하였다. 즉, 시료를 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL) 혼합용액( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , w/v)에 농도별로 가한 후, 50°C에서 20 분 동안 반응시킨 다음, 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하고, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride(1 mL)를 각각 첨가한 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로 trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, USA)를 이용하였다.

**정제 및 단리과정에서 항산화활성검정:** 정제된 획분이나 물질을 TLC(silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 spot 하여 적절한 용매(Tolunene-Ethyl acetate-Acetic acid-Methanol, 1:2:0.5:0.3, v/v)로 전개한 후 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 ethanol 용액(0.2 mM)을 plate에 분무하여 보라색이 탈색된 획분이나 물질을 항산화활성의 양성으로 확인하였다(TLC-DPPH법)(21).

**머루종자 중의 catechin 정량 및 회수율 검토:** 머루종자 1 g에 70% ethanol 10 mL를 가하여 10분간 초음파 추출을 행한 다음, 감압여과후 얻어진 추출물을 농축하여 ethanol을 제거하고, 농축물에 증류수를 가하여 20 mL가 되도록 정용하였다. 그 수용액을 hexane, chloroform, ethyl acetate 순으로(각 20 mL × 2) 순차 용매 분획한 후, 얻어진 ethyl acetate층을 농축하였다. 이 농축물에 methanol을 가하여 1 mL로 정용한 후, 이 중 20  $\mu\text{L}$ 를 HPLC 분석에 이용하였다. 정량분석은 Bondapak ODS column(3.9 × 300 mm, 15-20  $\mu\text{m}$ , Waters, USA)을 이용하여 1.0 mL/min의 유속으로 254와 280 nm의 검출과장에서 분석을 행하였으며, 이동상으로는 20% methanol을 사용하였다. (+)-Catechin(Trans-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan, Sigma, USA)을 이용하여 동일조건인 HPLC로부터 얻어진 농도별 피크면적에 의해 작성된 표준검량곡선으로부터 시료 중의 (+)-catechin의 농도를 계산하였으며, 회수율은 (+)-catechin 첨가군과 무첨가군으로 나누어 동일하게 조제된 시료를 HPLC 분석한 후, 얻어진 각각의 농도차를 기지농도 (+)-catechin의 농도(100%)와 비교하여 산출하였다.

**단리 화합물의 Free Radical-Scavenging 활성:** Free radical-scavenging 활성은 DPPH를 이용하여 평가하였다. 즉 여러 농도의 각 시료를 4 mL의 메탄올에 녹인 후,  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH methanol 용액 1 mL를 첨가하여 30분간 실온에 방치한 다음, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 70% ethanol 추출물, 용매분획후의 ethyl acetate층 및 단리 화합물의 radical-scavenging 소거능을  $\alpha$ -tocopherol과 비교하였다(22).

### 항산화 활성물질의 정제

**분취용 TLC에 의한 정제:** 용매분획 후의 ethyl acetate층 0.6 g (건조중량 32 g 상당량)을 분취용 TLC(silica gel 60 F TLC plate 0.25 mm, 10 × 20 cm; 3회)에 banding한 후, toluene-ethyl acetate-acetic acid-methanol(1:2:0.5:0.3, v/v)의 혼합용액을 이동상으로 이용하여 전개하고 254 nm의 광 조사 시 나타나는 밴드의 퍼턴을 기준으로 목적물질을 판별하여 그 부분의 silica gel을 긁어 모았다. 또한 회수된 silica gel에 methanol을 가하여 흡착성분을 용출시킨 후 얻어진 용출액을 농축하였다.

**ODS column chromatography에 의한 정제:** 분취용 TLC를 행하여 얻어진 획분을 대상으로 ODS column chromatography를 실시하였다. ODS gel을 100% methanol의 용매계로 24시간 팽윤시킨 후 column(1.5 × 29 cm)에 충전하고, 20% methanol로 column을 치환시킨 후, 시료를 소량의 20% methanol에 녹여 column에 charge하고, H<sub>2</sub>O/methanol을 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80, 0:100(v/v)으로 methanol의 농도를 단계별로 증가시키는 step wise 방법에 의해 용출·분획(각 단계별 50 mL씩)하였다.

**HPLC에 의한 정제:** ODS column chromatography 후의 활성획분에 대한 정제는 Waters delta prep 4000 system에서  $\mu$ Bondapak ODS column(7.8 × 300 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Waters, USA)을 이용하여 2.0 mL/min의 유속으로 254와 280 nm의 검출과장에서 분석을 행하였으며, 이동상으로는 trifluoroacetic acid(TFA)를 사용하여 pH를 2.63으로 조정된 20% methanol 용액과 45% methanol용액을 gradient 용출법(40 min)에 의하여 정제한 후, 얻어진 활성획분을 ISCOVERY<sup>®</sup> RP Amide C<sub>18</sub> column(25 cm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Supelco, USA)을 이용하여 1.0 mL/min의 유속으로 20% methanol을 이동상으로 한 isocratic 용출법(그 외 조건은 상기와 동일)에 의해 최종활성 물질을 단리하였다.

**분리된 활성 물질의 구조분석:** 정제된 활성물질의 구조해석은 <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance(<sup>1</sup>H-NMR)을 이용하여 분석하였으며, 내부 표준물질은 사용용매(CD<sub>3</sub>OD)를 기준점으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 용매분획물의 환원력

건조 머루종자(200 g)의 70% ethanol 추출물(13.8 g)을 극성을 달리한 순차 용매분획에 의해 hexane층(1.3 g), chloroform층(1.0 g), ethyl acetate층(3.8 g), butanol층(2.8 g) 및 water층(3.8 g)을 각각 얻었다. 70% ethanol 추출물 및 용매분획 후의 각 획분을 대상으로 그들 각각의 농도를 달리하여 금속이온의 환원력을 측정된 결과(Fig. 1), 모든 대상 시료들에 있어 농도 의존적으로 환원력의 증가 현상을 보였다. 용매분획 후의 water층, butanol층, chloroform층 및 hexane층은 용매분획 전의 70% ethanol 추출물과 대조구

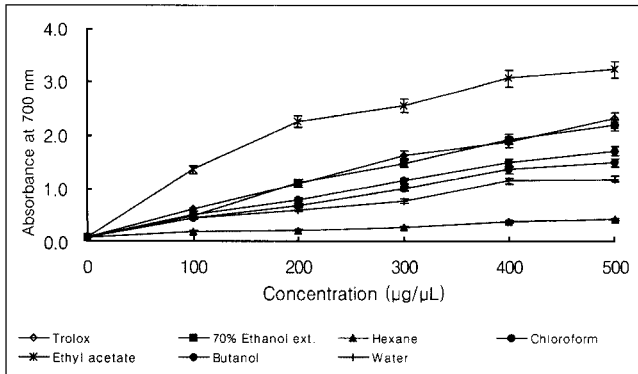


Fig. 1. Reducing power of each fractions obtained from 70% ethanol extracts of wild grape seeds.

trolox에 비해 환원력이 낮았으나, ethyl acetate층만이 그들보다 현저히 높은 환원력을 보였다. 이러한 현상은 동일 시료를 대상으로 행한 DPPH radical-scavenging 활성의 비교(19)에 있어서도 같은 경향이 관찰되었다. 이들 결과로부터 머루종자 중에 함유된 주요 항산화 활성 물질의 대부분은 용매분획 후 ethyl acetate층으로 이행되었음이 강하게 시사되었다.

**항산화 물질의 단리 및 정제**

용매분획 후의 각 획분에 함유되어 있는 항산화 활성물질의 존재 경향을 비교하기 위하여 용매분획 전의 70% ethanol 추출물과 함께 TLC분석을 행한 후 DPPH 용액을 분부하였다(TLC-DPPH법). 그 결과(data 생략), hexane층은  $R_f$  0.9부근에 2종의 spot이, chloroform층은  $R_f$  0.6-0.9에 4종의 spot이 미량 검출되었으나 그 활성은 매우 약하였다. 그리고 butanol층 및 water층에서는 항산화 활성 물질의 존재가 확인되지 않았다. 그러나 ethyl acetate층에서는  $R_f$  0.3에 소량의 화합물(항산화 활성 약함)의 존재와 함께  $R_f$  0.6에 현저한 항산화능을 보인 spot이 선명하게 검출되었다. 이로부터 ethyl acetate층이 강한 환원력을 보였던 상기의 결과(Fig. 1)는 TLC상의  $R_f$  0.6에서 검출된 화합물에 의한 효과였을 가능성이 시사되었다. 이에 본 TLC-DPPH법을 지표로  $R_f$  0.6에서 검출된 화합물의 구조를 해명하기 위해 용매분획 후의 ethyl acetate층을 대상으로 그 화합물의 단리·정제를 행하였다.

Ethyl acetate층 0.6 g(건조중량 32 g 상당량)을 분취용 TLC로 전개한 후,  $R_f$  0.6의 band를 긁어 모은 silica gel을 methanol 추출에 의해 흡착물질(307 mg)을 회수하였다. 분취용 TLC로부터 회수된 활성물질을 대상으로 ODS column chromatography를 행한 결과,

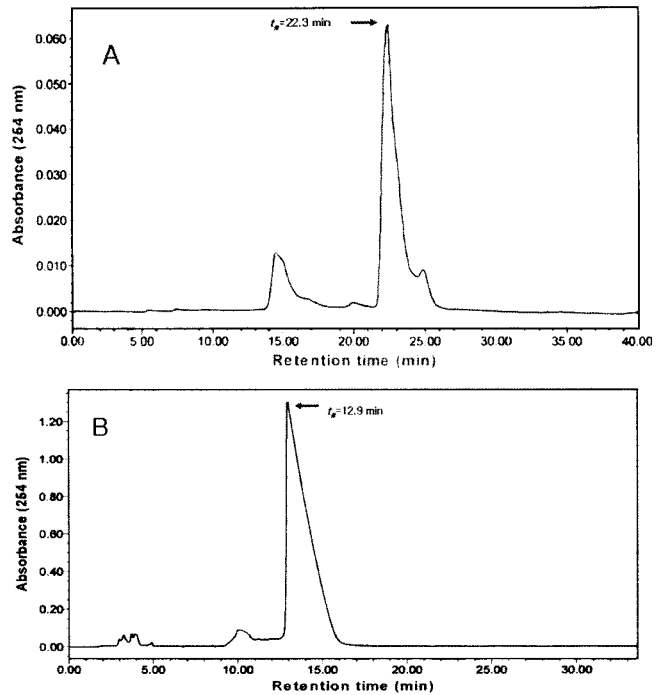


Fig. 2. HPLC for isolation of an antioxidative active compound. A: Column; µBondapak C18 (7.8 × 300 mm), mobile phase; 20% methanol pH 2.63 by TFA/ 45% methanol, wavelength of detector; 254 nm, flow rate; 2.0 mL/min. B: Column; ISCOVERY® RP Amide C<sub>16</sub> (25 cm × 4.6 mm); mobile phase, 20% methanol, wavelength of detector, 254 nm, flow rate; 1.0 mL/min.

30-40% methanol 용출 획분(50.2 mg)에서  $R_f$  0.6의 화합물이 검출되었다. 그 활성획분을 더욱 정제하기 위하여 µBondapak C<sub>18</sub> column(7.8 × 300 mm Waters, USA)을 이용한 HPLC를 실시한 결과(Fig. 2-A),  $t_R$  22.3분에서 활성물질이 검출되었으며 다시 ISCOVERY® RP Amide C<sub>16</sub> column(25 cm × 4.6 mm, 5 µm, Supelco, USA)을 이용하여 재정제를 행한 결과(Fig. 2-B),  $t_R$  12.9분(열은 황색분말, 2 mg)에서 용출된 화합물을 활성물질로 최종 단리하였다.

**단리된 항산화 물질의 구조동정**

단리 화합물의 구조 해석을 위해 <sup>1</sup>H-NMR분석을 행한 결과(Table 1), *sp*<sup>2</sup> 탄소에 결합된 등가 proton 2종의 signal( $\delta$  5.89와 5.97, 각각 1H, d,  $J=2.0$  Hz)이 검출되었고,  $\delta$  6.80-6.76에서 3치 환체의 방향족 탄소에 결합된 3H의 signals( $\delta$  6.76 (1H, dd,

Table 1. <sup>1</sup>H-NMR data of the active compound and the reference compound

Position	<sup>1</sup> H, $\delta$ (J, Hz)	
	Active compound (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz)	Reference compound <sup>26)</sup> (acetone-d <sub>6</sub> , 200 MHz)
2	4.60 (1H, J=8.0 Hz)	4.58 (1H, J=7.4 Hz)
3	4.01 (1H, ddd, J=5.5, 8.0, 8.2 Hz)	4.02 (1H, m, )
4(ax)	2.88 (1H, dd, J=5.5, 16.1 Hz)	2.93 (1H, dd, J=5.1, 16.2 Hz)
4(eq)	2.54 (1H, dd, J=8.2, 16.1 Hz)	2.55 (1H, dd, J=8.2, 16.2 Hz)
6	5.89 (1H, d, J=2.0 Hz)	6.05 (1H, d, J=2.4 Hz)
8	5.97 (1H, d, J=2.0 Hz)	5.90 (1H, d, J=2.4 Hz)
2'	6.88 (1H, d, J=1.9 Hz)	6.92 (1H, d, J=1.6 Hz)
5'	6.80 (1H, d, J=8.3 Hz)	6.83 (1H, d, J=8.0 Hz)
6'	6.76 (1H, dd, J=1.9, 8.3 Hz)	6.72 (1H, dd, J=1.9, 8.4 Hz)

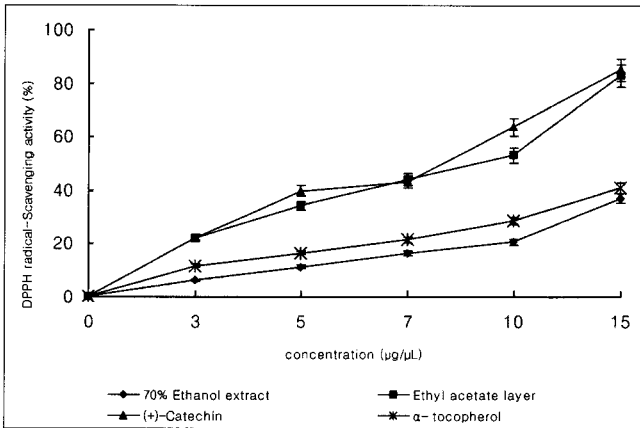


Fig. 3. DPPH radical-scavenging activity of the antioxidants from ethyl acetate layer of ethanol extracts of wild grape seed.

$J=1.9, 8.3$  Hz, H-6'),  $\delta$  6.80(1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-5'),  $\delta$  6.88 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-2')가 검출되어 단리 화합물이 flavonoid일 가능성이 시사되었다(23,24). 또 AB type의 geminal proton 유래의 signals [ $\delta$  2.88 (1H, dd,  $J=5.5, 16.1$  Hz, H-4ax),  $\delta$  2.54 (1H, dd,  $J=8.2, 16.1$  Hz, H-4eq)]로부터 시작된 일련의 이웃한 탄소에 결합된 proton 유래로 판단되는 2종의 signals [ $\delta$  4.01 (1H, ddd,  $J=5.5, 8.0, 8.2$  Hz, H-3),  $\delta$  4.60 (1H,  $J=8.0$  Hz, H-2)]가 검출되어 단리 화합물이 catechin일 가능성이 강하게 시사되었다. 또 2위와 3위 proton의  $J$ 값이 8.0 Hz 이상을 보였던 것으로부터 그 proton들이 trans 배향을 취하고 있음이 시사되어 단리 화합물이 (+)-catechin일 가능성이 시사되었다. 그래서 단리 화합물의  $^1\text{H-NMR}$  data를 (+)-catechin의 보고 논문(25) data와 비교를 행하였다(Table 1). 그 결과 단리 화합물의 data가 기존의 (+)-catechin의 data와 일치하여 머루종자 중에 함유된 주요 항산화 활성물질은 (+)-catechin으로 동정하였다.

#### 머루종자 중의 catechin 정량

머루종자 중에 함유된 주요 항산화물질로 (+)-catechin이 동정되어 그 함유량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 표준품의 (+)-catechin과 동일 retention time을 갖는 피크를 대상으로 그 함유량을 산출한 결과, 건조 머루종자 100 g 당 (+)-catechin은 52.7 mg(회수율 72%) 함유되어 있음을 확인하였다. 이것은 Ramila 등(26)이 보고한 포도종자 중에 함유된 (+)-catechin의 함량(189 mg/100 g)에 비해 낮은 수준이었으나 그럼에도 불구하고 머루종자 중에 함유된 항산화물질로써 (+)-catechin이 주요한 작용을 하고 있음이 시사되었다.

(+)-Catechin은 1902년 Perkin에 의하여 epicatechin과 함께 마호가니 나무로부터 최초로 확인된 물질로써, 차엽(27) 뿐만 아니라 천연에 폭넓게 존재하는 flavanol형의 대표적인 항산화 flavonoid로 잘 알려진 화합물이다. 특히 (+)-catechin은 본 실험에 이용된 머루와 동일 과(Vitaceae)인 포도의 과육은 물론, 포도종자에도 존재한다고 보고되어진 바 있으며 과육과 껍질보다는 종자에 풍부하며 품종마다의 함량차이도 다양하다(28). 와인숙성 기간동안 껍질, 과육 및 종자로부터 (+)-catechin 및 다른 폴리페놀 물질이 추출되어 나오기 때문에 이들의 함량을 증대시키기 위한 다양한 연구가 진행중이다(29). 또한 머루를 여러 가지 공정에 의하여 담긴 머루주 중에 함유된 성분을 HPLC분석한 결과로부터도 (+)-catechin이 56.0 mg/kg 존재한다고 보고 되어진 바 있다(30). 그러나 머루주 공정에서 발생하는 부산물의 그 대부분이 폐기되어지

고 있는 머루종자로부터 (+)-catechin이 동정·정량되어진 것은 본 연구가 처음이다. 더욱이 본 연구로부터 머루종자 중에 함유된 대표적인 주요 항산화 물질로써 (+)-catechin이 동정되어진 것은 부산물인 머루종자의 유용성 재고에 의미있는 기초 데이터를 제시한 결과라 판단된다.

#### 단리된 화합물의 항산화활성

(+)-Catechin은  $\alpha$ -tocopherol보다 동일량의 각 비교구에 있어 약 2배 이상의 DPPH radical-scavenging 활성을 보였다(Fig. 3). 그리고 머루의 조추출물(70% 에탄올 추출물)의 항산화활성에 비해 용매분획 후의 ethyl acetate층이 월등히 높은 항산화활성을 보인 것은 조추출물보다 ethyl acetate층에 상대적으로 항산화 물질의 농도가 증가했기 때문으로 판단되었다. 조추출물 10  $\mu\text{g}$ 의 DPPH radical-scavenging 활성(약 20%)이 (+)-catechin 약 2.6  $\mu\text{g}$ 의 활성에 상당한 결과가 관찰되었으며, 같은 농도(15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )에서 (+)-catechin과 ethyl acetate분획물의 DPPH radical 소거활성이 약 80%로 비슷한 결과를 나타낸 것으로 보아 그 조추출물 중에는 본 실험계에서 검출되지 않은 다른 radical scavenger가 존재하거나 상승효과를 발휘하는 화합물이 존재해 있을 가능성이 시사되었다.

## 요 약

본 연구는 머루종자 에탄올 추출물로부터 항산화 활성물질들을 분리·동정하고 분리 물질의 항산화 활성을 검토하기 위하여 수행되었다. 머루종자 70% 에탄올 추출물로부터 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, 및 수용액으로 순차 용매분획하여 그들의 항산화 활성 및 환원력을 비교한 결과, ethyl acetate층이 가장 강한 활성을 나타냈으며, 각 획분의 TLC-DPPH 분석에서도 ethyl acetate층에서 현저히 높은 항산화활성을 보인 화합물의 존재가 확인되었다. 이에 ethyl acetate층을 대상으로 ODS column chromatography 및 HPLC를 이용하여 활성분체를 단리하고,  $^1\text{H-NMR}$  분석을 통하여 (+)-catechin으로 동정하였다. 머루종자 중의 (+)-catechin 함량은 52.7 mg/100 g으로 확인되었으며, (+)-catechin이 머루종자 중의 주요한 항산화 물질로서 사료되었다. 한편, 같은 농도(15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )에서 (+)-catechin과 ethyl acetate 분획물의 DPPH radical 소거활성이 약 80%로 비슷한 결과를 나타낸 것으로 보아 ethyl acetate 분획물에는 (+)-catechin이외의 미확인 물질들이 서로 상승작용을 하여 강한 항산화 활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

## 문 헌

1. Francene MS, Monica MB, Carl LK. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. J. Am. Dietetic Assoc. 103: 215-223 (2003)
2. Record IR, Lane JM. Simulated intestinal digestion of green and black teas. Food Chem. 73: 481-486 (2001)
3. Bonilla F, Mayen M, Merida J, Medina M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. Food Chem. 66: 209-215 (1999)
4. Lu YR, Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chem. 68: 81-85 (2000)
5. Huang KS, Lin M and Cheng GF. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. Phytochemistry 58: 357-362 (2001)
6. Lee EO, Kwon BM, Song GY, Chae CH, Kim HS. Heayneanol A induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells. Life Sci. 74:2313-2326 (2004)

7. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.* 73: 285-290 (2001)
8. Jayaprakasha GK, Tamil S, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts. *Food Res. Intl.* 36: 117-122 (2003)
9. Oreste B, Susanna B, Maria SC, Saverio M. A new HPLC method for the determination of polyphenols in wines based on the use less aggressive eluents and a coupled revelation system. *Electroanalysis* 17: 1204-1207 (1998)
10. Babich H, Krupka ME, Nissim HA, Zuckerbraun HL. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. *Toxicol. in vitro* 19: 231-242 (2005)
11. Moon SO, Lee JY, Kim EJ, Choi SW. Improved method for determination of catechin and its derivatives in extract and oil of grape seeds. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35:576-585 (2003)
12. Marion MYC. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharm.* 63: 99-104 (2002)
13. Dourtoglou VG, Makris DP, Fabienne BD, Aonias C. trans-Resveratrol concentration in wines produced in Greece. *J. Food Comp. Anal.* 12: 227-233 (1999)
14. Maria C, Claudio C, Lisa E, Isabela N, Ingrid Z. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5226-5231 (2003)
15. Luque JM, Luque MD. Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta* 68: 126-130 (2005)
16. Kim SK. Deacidification of new wild grape wine. *Korean J. Food Nutr.* 9:265-270 (1996)
17. Kim SY, Kim SK. Winemaking from new wild grape. *Korean J. Food Nutr.* 10:254-262 (1997)
18. Wang JN, Kano Y, Nomura T, Chen YJ. Procyanidins from the seeds of *Vitis amurensis*. *Phytochemistry* 53:1097-1102 (2000)
19. Kim NY, Kim YK, Bae KJ, Choi JH, Moon JH, Park GH, Oh DH. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts and fractions of wild grape seed (*Vitis coignetia*). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 34: 755-758 (2005)
20. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315 (1986)
21. Takao T, Kitatani F, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1783 (1994)
22. Kim SM, Cho YS, Sung SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 626- 632 (2001)
23. Kim SJ, Cho JY, Wee JH, Jang MY, Kim C, Rim YS, Shin SC, Ma SJ, Moon JH, Park KH. Isolation and characterization of antioxidative compounds from the aerial parts of *Angelica keiskei*. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 58-63 (2005)
24. Wettasinghe M, Shahidi F, Amarowicz R. Identification and quantification of low molecular weight phenolic antioxidants in seeds of evening primrose (*Oenothera biennis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50: 1267-1271 (2002).
25. Sa JH, Shin IC, Jeong KJ, Shim TH, Oh HS, Park SK, Kim CM. Catechin content and antioxidative effect from *Rosa davurica* Pall. *Korean J. Pharmacogn.* 33: 177-181 (2002)
26. Ramila G, Stamatina K, Dimitris PM, Panagiotis K. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extract: Correlation with antiradical activity. *Food Chem.* 89: 1-9 (2005)
27. Peterson J, Dwyer J, Bhagwat S, Haytowitz D, Holden AL, Eldridge GB, Aladesanmi J. Major flavonoids in dry tea. *J. Food Comp. Anal.* 18: 487-501 (2005)
28. Susana GM, Julián CR, Celestino SB. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513: 283-289 (2004)
29. Zofia C, Lai YF, Lawrence JP. Compositional changes in lower molecular ewight flavans during prape maturation. *Phytochem.* 11: 1819-1822 (1979)
30. Koh KH, Kim HW, Han SH, Park YH, Lee CH. Polyphenolic compounds and superoxide radical scavenging activity of *Moru-Ju*. *Korean J. Food Sci. Biotechnol.* 12: 290-297 (2003)