

오디씨로부터 항산화성 폴리페놀화합물의 분리 및 동정

이유진 · 김은옥 · 최상원[†]
대구가톨릭대학교 식품영양학과

Isolation and Identification of Antioxidant Polyphenolic Compounds in Mulberry (*Morus alba* L.) Seeds

Yu-Jin Lee, Eun-Ok Kim, and Sang-Won Choi[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract

Eleven polyphenolic compounds, including procatechuic and chlorogenic acids, (+)-dihydroquercetin, rutin, isoquercitrin, quercitrin, (+)-dihydrokaempferol, *trans*-resveratrol, moracin, quercetin and 4-prenylmoracin were isolated and purified from the methanolic extract of defatted mulberry seed residue by a series of column chromatography including silica gel, Sephadex LH-20, and ODS-A, and their chemical structures were identified by spectral analysis. The antioxidant activities of the eleven isolated polyphenolic compounds were measured spectrophotometrically using DPPH radical. Among the eleven polyphenolic compounds tested, rutin (IC₅₀=20.2 μM), isoquercitrin (IC₅₀=22.5 μM), quercitrin (IC₅₀=24.6 μM), quercetin (IC₅₀=27.8 μM), (+)-dihydroquercetin (IC₅₀=28.9 μM), and chlorogenic acid (IC₅₀=30.6 μM) exhibited stronger antioxidant activity than L-ascorbic acid (IC₅₀=31.5 μM) and α-tocopherol (IC₅₀=52.3 μM), whereas procatechuic acid (IC₅₀=68.2 μM) showed lower activity. In addition, (+)-dihydrokaempferol (IC₅₀=33.8 μM), *trans*-resveratrol (IC₅₀=36.2 μM), moracin (IC₅₀=47.6 μM), and 4-prenylmoracin (IC₅₀=48.2 μM) exhibited moderate antioxidant activity. Furthermore, levels of the eleven polyphenolic compounds from three different types of mulberry seeds were quantified by HPLC, and their contents were as follows: rutin (31.1~60.0 mg/100 g) > quercitrin (7.2~34.2 mg/100 g) > (+)-dihydroquercetin (13.2~33.1 mg/100 g) > quercetin (15.8~19.5 mg/100 g) > 4-prenylmoracin (10.5~43.3 mg/100 g) > isoquercitrin (5.8~15.4 mg/100 g) > chlorogenic acid (0.0~15.3 mg/100 g) > moracin (4.7~7.2 mg/100 g) > procatechuic acid (0.0~11.6 mg/100 g) > (+)-dihydrokaempferol and *trans*-resveratrol (<0.1 mg/100 g). The 'Daesungppong' mulberry seeds among the three cultivars had higher flavonoid contents, such as rutin and quercetin derivatives, while the 'Iksuppong' seeds had the highest contents of phenolic acids and moracin derivatives. 'Cheongilppong' had lower amounts of polyphenolic compounds than the other two mulberry seeds. These results indicate that mulberry seeds containing antioxidant polyphenolic compounds may be potentially useful sources of anti-diabetic, anti-hypertensive, and anti-aging agents for functional foods and cosmetics.

Key words: mulberry (*Morus alba* L.) seed, polyphenolic compounds, antioxidant activity, HPLC, quantification

서 론

항산화물질(antioxidants)은 지방의 자동산화과정에서 생성되는 유리라디칼종(R·, ROO·, RO·)과 지질과산화물(ROOH)을 포착 또는 제거하여 지방의 산패를 억제해 줄 뿐 아니라 생체 내 생성되는 여러 활성산소종(¹O₂, O₂⁻, H₂O₂, ·OH)에 의한 지질과산화반응을 억제하여 암, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨, 염증 및 노화를 예방해주는 생리활성물질로서 크게 각광을 받고 있다(1,2). 항산화물질에는 합성항산화제와 천연항산화제가 있으며, 최근합성항산화제의 독성 및 발암성 등의 안전성이 문제시되면서 식물로부터 보다 안전하고 효과 있는 천연항산화제의 개발이 활발히 이루어지고 있다(3).

폴리페놀화합물(polyphenolics)은 자연계에 널리 존재하는 천연색소로서 주로 액포 및 세포막에서 유리형, 에스테르형 또는 결합형으로 존재하며(4), benzoic 및 cinnamic acids를 포함하는 phenolic acids와 anthocyanins, flavonoids, proanthocyanidins, resveratrols, lignans 및 tannins 등이 있다(5,6). 식물에 존재하는 대표적인 폴리페놀화합물에는 녹차의 catechins, 감의 tannins, 콩의 isoflavones, 아마종자의 lignans, 포도 및 땅콩의 resveratrols, black foods(검정쌀, 검은콩, 검은깨 등)의 anthocyanins, 커피의 chlorogenic acid, 고추의 capsaicin, 및 울금의 curcumin 등이 알려져 있으며, 이들은 항암을 비롯하여 항고혈압, 항염증, 항당뇨, 항산화 및 항노화 등 여러 생리적 및 약리적 효능이 있는 것으로 밝혀져 왔다(7,8).

[†]Corresponding author. E-mail: swchoi@cuer.ac.kr
Phone: 82-53-850-3525, Fax: 82-53-850-3516

뽕나무(*Morus alba* L.) 열매 오디는 예로부터 백발을 검게 하며 소갈(당뇨)을 덜어주고 오장을 이롭게 하는 자양·강장제로서 뿐만 아니라 빈혈, 고혈압, 관절통 및 대머리 치료제로 사용되어져 왔다(9,10). 지금까지 오디의 성상, 화학적 성분과 생리활성작용에 관한 많은 연구가 보고된 바가 있으나(11-14) 오디씨의 화학적 성분 및 생리활성작용에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 포도, 망고 및 베리 등의 과일 가공 시 부산물로 대량 얻어지는 씨를 착유하여 기름과 탈지박을 생산하고, 이중 탈지박에는 항산화성 폴리페놀화합물이 다량 함유되어 있어 기능성 소재로서 식품 및 화장품 산업에 널리 활용되고 있다(15-17). 이와 유사하게 오디주스 및 오디와인 제조 시 부산물로 얻어지는 오디씨에는 리놀레산 및 리놀렌산 등의 불포화지방산을 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 tocopherol 및 phytosterol 등이 함유되어 있으며, 아울러 항암, 항고혈압 및 항당뇨 성분인 quercetin, resveratrol 및 4-prenyl-moracin 등이 함유되어 있음을 전보(18)에서 보고한 바가 있다. 또한, 오디씨에는 그 외에도 여러 폴리페놀화합물이 존재하고 있어 다른 뽕나무 부위보다 높은 생리활성을 지니고 있음이 확인된 바가 있다(18). 따라서 오디씨를 기능성 식품 및 화장품 소재로 활용하기에 앞서 오디씨의 주된 항산화 물질이 무엇인지를 보다 상세하게 밝힐 필요가 있다.

본 연구는 뽕나무 열매 오디씨로부터 11가지 폴리페놀화합물을 분리 및 동정하고 그들의 항산화활성을 DPPH radical을 이용하여 측정하였으며, 아울러 3가지 뽕나무 품종으로부터 얻어진 오디씨의 항산화성 폴리페놀화합물을 HPLC를 이용하여 정량하여 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 오디씨는 2010년 6월 경북 김천에서 생산된 뽕나무(*Morus alba* L.) 품종 ‘익수뽕’ 오디를 이용하여 오디주스 제조 시 부산물로 얻어지는 오디박으로부터 수세 및 침지를 여러 차례 반복 실시하여 분리하여 탈수한 후 50±5°C에서 열풍건조한 것을 실험재료로 사용하였다. 또한, 경북 영덕 및 상주에서 각각 생산된 ‘대성뽕’ 및 ‘청일뽕’ 오디로부터 동일하게 오디씨를 분리 및 건조하여 정량분석용 시료로 사용하였다.

시약 및 크로마토그래피용 충전제

본 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), L-ascorbic acid는 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, α-tocopherol, phosphoric acid는 Wako Pure Chem. Ind. Ltd.(Osaka, Japan)로부터 각각 구입하여 사용하였다. 그리고 물질정제를 위한 column chromatography용 충전물질로 silica gel 60(230~400 mesh, Merck, Darmstadt, Germany), ODS-A gel(12 nm, 150 μm, YMC, Inc., Allen-

town, PA, USA) 및 Sephadex LH-20(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하였으며, 물질분석을 위한 thin layer chromatography(TLC)는 pre-coated silica gel 60 (0.25 mm, Merck) plate를 사용하였다. 그 외 모든 시약은 HPLC급(Merck) 또는 분석용 특급 시약을 사용하였다.

오디씨로부터 폴리페놀화합물의 추출, 분리 및 정제

오디씨로부터 폴리페놀화합물의 추출, 분리 및 정제는 Fig. 1과 같이 실시하였다. 건조 오디씨(18 kg)를 연속식 압착 expeller(Poongsan, Daegu, Korea)를 이용하여 착유하여 오디씨유와 탈지박(13.13 kg)을 각각 얻은 후 탈지박은 95% 메탄올용액(36 L)을 가하여 ultrasonic cleaner(Power Sonic 420, Hwashin Instrument, Seoul, Korea)에서 연속적으로 추출한 후 여과 및 농축하여 오디씨탈지박 메탄올추출물(550 g)을 얻었다. 메탄올추출물을 80% 메탄올수용액(4 L)에 용해한 후 노르말-헥산(4 L)을 가하여 2회 반복 수세하여 탈지하고 얻어진 하층을 농축한 후 물(3 L)을 가하여 현탁시킨 후 디클로로메탄(3 L), 에틸아세테이트(3 L) 및 노르말-부탄올(1 L)을 차례로 가하여 2회 분획한 후 무수 Na₂SO₄을 가하여 탈수한 다음 감압·농축하여 디클로로메탄(10.5 g), 에틸아세테이트(4.8 g) 및 노르말-부탄올(20.3 g) 분획물을 각각 얻었다. 3가지 분획 중 에틸아세테이트 분획물(4.8 g)을 클로로포름-메탄올(5:1, v/v) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 실시한 후 TLC 분석을 통해 성분이 유사한 분획을 모아 5개의 분획(fr. 1, 1.33 g; fr. 2, 2.22 g; fr. 3, 0.66 g; fr. 4, 0.39 g; fr. 5, 0.20 g)으로 나누었다. 각각의 분획을 80% 메탄올용액으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였으며, 분획 1로부터 화합물 1(Comp. 1, 13.7 mg)과 화합물 2(Comp. 2, 3.4 mg)를 각각 분리하였으며, 분획 2로부터 Sephadex LH-20 및 ODS-A column chromatography를 순차적으로 실시하여 화합물 3(Comp. 3, 33.6 mg), 화합물 4(Comp. 4, 4.1 mg), 화합물 5(Comp. 5, 2.4 mg), 화합물 6(Comp. 6, 2.2 mg), 화합물 7(Comp. 7, 3.6 mg)을 각각 얻었다. 또한 앞서 silica gel column chromatography로부터 분리된 분획 3으로부터 Sephadex LH-20 및 ODS-A column chromatography를 각각 순차적으로 실시하여 화합물 8(Comp. 8, 5.1 mg)과 화합물 9(Comp. 9, 7.1 mg)를 얻었고, 또한 분획 4와 5로부터 Sephadex LH-20 및 ODS-A column chromatography를 실시하여 화합물 10(Comp. 10, 4.1 mg)과 화합물 11(Comp. 11, 2.2 mg)을 각각 순수하게 분리하였다.

오디씨로부터 분리된 폴리페놀화합물의 화학구조 동정

오디씨로부터 분리된 11가지 폴리페놀화합물의 구조분석을 위해 먼저 UV-vis spectrophotometer(S-3100, SINCO, Seoul, Korea)를 사용하여 200 nm~600 nm 영역에서 scanning하여 최대흡수파장(λ_{max})을 조사하였다. 다음, ¹H-NMR(400 MHz)와 ¹³C-NMR(100 MHz) 분석은 Varian Unity

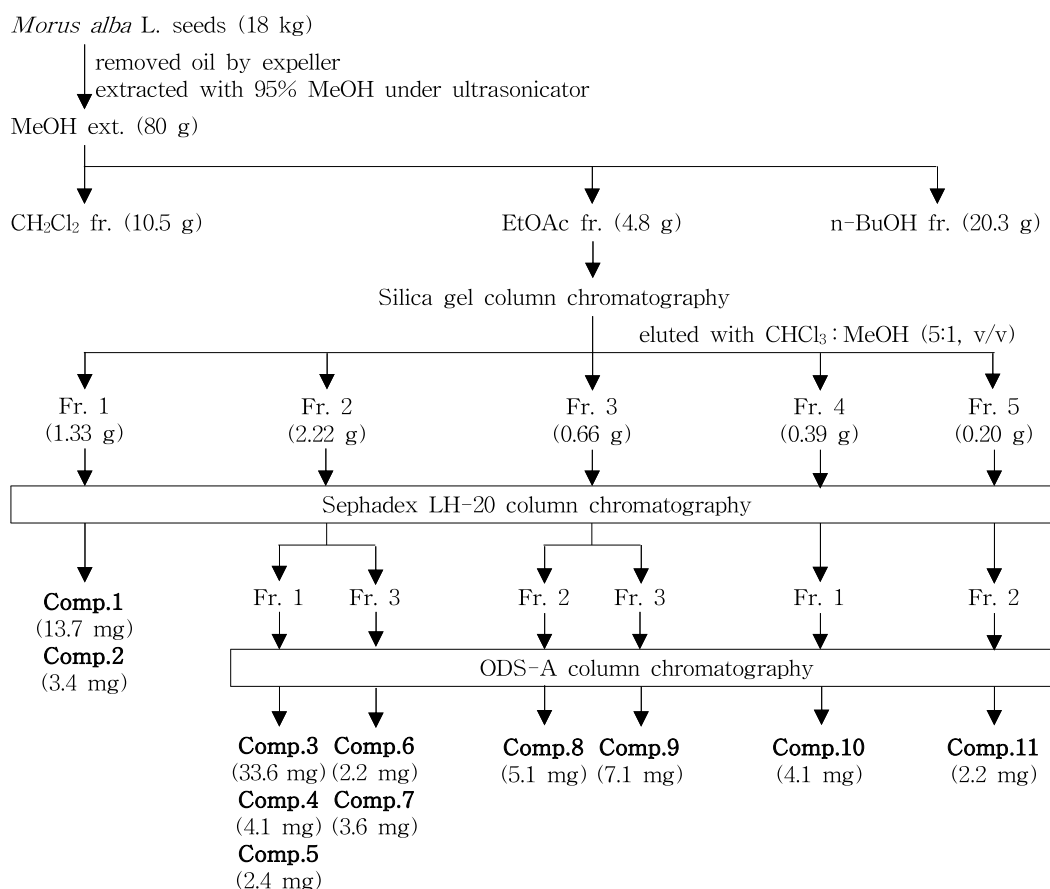


Fig. 1. Schematic procedure for extraction, isolation and purification of polyphenolic compounds from mulberry seeds.

Plus 400 spectrometer(Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 상온에서 측정하였으며, 이때 시료는 CD₃OD에 용해하였다. 그리고 tetramethylsilane(TMS)을 내부 표준물질로 첨가하여 시료의 화학적 이동값을 δ(ppm)로 나타내었다.

오디씨로부터 분리된 폴리페놀화합물의 항산화활성 측정
 오디씨로부터 분리한 11가지 폴리페놀화합물의 항산화활성은 Tagashira와 Ohtake의 방법(19)을 약간 변형하여 DPPH radical scavenging activity를 다음과 같이 측정하였다. 즉, 0.1 mM DPPH를 함유한 메탄올 용액 2 mL에 시료 용액 0.1 mL를 가해 vortex하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 UV spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이때 DPPH radical 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였다. DPPH radical scavenging activity(%)=(1-A/B)×100. A: absorbance of sample at 517 nm, B: absorbance of control at 517 nm. 여기서 시료를 넣지 않은 대조구를 함께 측정하여 시료의 상대적인 DPPH radical 소거활성을 측정 한 후 회귀분석에 의해 산출된 IC₅₀값(DPPH radical을 50% 저해하는 시료의 농도)을 나타내었다.

오디 품종별 오디씨의 폴리페놀화합물의 함량 측정

오디 품종별 얻어진 건조 오디씨(10 g)를 분쇄한 후 클로로포름 : 메탄올(2:1, v/v) 혼합용매(200 mL)로 상온에서 교반하여 탈지하고 여과하여 얻은 탈지박을 건조시켜 탈지오디씨박을 얻었고, 이를 90% 메탄올수용액(200 mL)으로 2시간 초음파 추출하여 얻은 메탄올추출물을 여과 및 농축하여 메탄올추출물을 얻었다. 다음 이를 90% 메탄올용액(15 mL)으로 용해한 후 그중 일부 원액을 취하여 0.45 μm PVDF syringe filter(Whatman, Maidstone, England)를 통과시킨 후 전보의 방법(18)에 따라 HPLC로 11가지 폴리페놀화합물의 함량을 측정하였다. 이때 분리된 각각의 폴리페놀화합물은 앞서 순수 분리한 폴리페놀화합물의 retention time과 비교하여 확인하였으며, photodiode array detector를 사용하여 각 화합물의 최대흡수파장을 측정 한 후 290, 310, 330 및 350 nm에서 각 화합물의 calibration curve를 회귀분석그래프를 이용하여 작성한 후 각각의 폴리페놀화합물의 함량을 계산하였다. 그리고 11가지 폴리페놀화합물의 회수율을 측정 한 결과, procatechuic acid(95%), chlorogenic acid(95%), rutin(95%), isoquercitrin(93%), quercitrin (92%), dihydroquercetin(90%), dihydrokaempferol(90%), *t*-resveratrol (93%), quercetin(90%), moracin 및 4-prenylmoracin(90%)

이었다.

통계처리

모든 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 처리별 평균치간의 유의성 검정은 SPSS 14.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 분산분석을 실시하였다. 평균간 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

오디씨로부터 폴리페놀화합물의 추출·분리 및 정제

사전 연구에서 뽕나무 부위별(열매, 씨, 잎, 뿌리) 항산화 활성을 측정된 결과, 오디씨가 가장 강한 항산화작용을 나타내었다(18). 따라서 오디씨의 주된 항산화물질을 분리하기 위해 오디씨의 메탄올추출물을 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올로 각각 용매분획한 후 이중 항산화활성이 가장 강한 에틸아세테이트 분획을 silica-gel, Sephadex LH-20 및 ODS-A column chromatography를 순차적으로 실시하여 앞서 Fig. 1과 같이 11가지 폴리페놀화합물을 분리 정제하였다.

오디씨로부터 분리된 폴리페놀화합물의 화학구조 동정

오디씨로부터 분리된 11가지 폴리페놀화합물 중 7가지 폴리페놀화합물(Comp. 1, Comp. 2, Comp. 4, Comp. 5 및 Comp. 6, Comp. 8, Comp. 10 및 Comp. 11)은 이미 뽕나무 열매인 오디와 오디씨로부터 분리 및 동정된 바(18,20)가 있기에 본 연구에서는 오디 및 오디씨로부터 아직 분리된 바가 없는 그 외 3가지 폴리페놀화합물의 구조를 NMR spectroscopy 분석과 사전 연구에서 밝혀진 NMR spectra 결과와 비교하여 동정하였다. 먼저 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 측정한 결과, δ 6.71(d, $J=8.4$ Hz), 6.76(dd, $J=2.0$ & 8.4 Hz) 및 6.88(d, $J=2.0$ Hz)에서 flavonoid 화합물 benzene B ring의 ABX system을 나타내는 3가지 aromatic proton과 δ 5.79(d, $J=2.0$ Hz) 및 5.83(d, $J=2.0$ Hz)에서 benzene A ring의 2개의 *meta*-coupled doublet proton, 그리고 δ 4.82(d, $J=11.2$ Hz) 및 δ 4.42(d, $J=11.6$ Hz)에서 H-2 및 H-3의 methine proton을 각각 확인하였고 coupling constant($J=11.2$ Hz)로부터 그들의 proton들이 서로 *trans* configuration 관계를 가진 것을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 관찰한 결과, δ 85.14(C-2), 73.71(C-3) 및 198.43(C-4)의 탄소 signal로부터 C-2와 C-3이 *trans* configuration하고 있는 3-flavanol 구조를 확인할 수 있었으며, δ 146.82(C-3') 및 δ 147.17(C-4')에서 benzene B ring의 2개의 hydroxyl group을 가진 탄소 signal과 δ 163.78(C-9), 164.54(C-5) 및 168.79(C-7)에서 benzene A ring의 3개의 hydroxyl group을 가진 탄소 signal

들을 각각 확인할 수 있었고, 그 외 δ 96.35(C-8), 97.38(C-6), 101.88(C-10), 115.94(C-2'), 116.14(C-5'), 120.97(C-6'), 129.91(C-1')에서 quercetin 유사물질의 탄소 signal 분리패턴을 나타내었다. 이와 같이 $^1\text{H-}$ & $^{13}\text{C-NMR}$ spectra를 측정한 결과를 종합해 볼 때, Comp. 3은 (+)-dihydroquercetin임을 확인할 수 있었으며, 지금까지 *Opuntia ficus-indica*를 포함한 여러 식물로부터 본 화합물이 분리된 바(21)가 있었으나 오디 및 오디씨에서 확인된 바는 본 연구가 처음이다.

화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 측정한 결과, δ 6.84(d, $J=8.8$ Hz) 및 7.37(d, $J=8.8$ Hz)에서 flavonoid 화합물 benzene B ring의 A_2B_2 system(*meta*-coupled doublets)을 나타내는 1,4-disubstituted(*para*-substituted) aromatic proton과 δ 5.89(d, $J=2.0$ Hz) 및 5.93(d, $J=2.0$ Hz)에서 benzene A ring의 2개의 *meta*-coupled doublet proton, 그리고 앞서 dihydroquercetin과 같이 δ 5.0(d, $J=11.6$ Hz) 및 4.56(d, $J=11.6$ Hz)에서 H-2 및 H-3의 methine proton을 각각 확인하였고 coupling constant($J=11.6$ Hz)로부터 그들의 proton들이 서로 *trans* configuration 관계를 가진 것을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정한 결과는 δ 85.19(C-2), 73.85(C-3) 및 198.67(C-4)의 탄소 signal로부터 C-2와 C-3이 서로 *trans* configuration하고 있는 3-flavanol 골격임을 확인할 수 있었으며, δ 159.44(C-4'), 130.58(C-2' & C-6'), 및 116.35(C-3' & C-5')에서 benzene B ring의 *para*-hydroxyl group을 가진 5개의 탄소 signal과 δ 164.76(C-9), 165.55(C-5) 및 169.10(C-7)에서 benzene A ring의 two hydroxyl group을 가진 탄소 signal들을 각각 확인할 수 있었고, 그 외 δ 96.55(C-8), 97.58(C-6), 102.01(C-10) 및 129.52(C-1')에서 kaempferol 골격 탄소 signal의 분리패턴을 나타내었다. 이와 같이 Comp. 7의 $^1\text{H-}$ & $^{13}\text{C-NMR}$ spectra의 결과를 종합해 볼 때, 본 화합물은 (+)-dihydrokaempferol임을 확인할 수 있었으며, 지금까지 *Opuntia ficus-indica*를 포함한 여러 식물에서 분리된 바(21) 있으나 오디 및 오디씨에서 확인된 바는 처음이다.

화합물 9의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 측정한 결과, δ 6.76에서 *meta* coupling하고 있는 2개의 수소 signal(2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2' & H-6')과 δ 6.25에서 triplet로 분열되는 하나의 수소 signal(1H, t, $J=2.0$ Hz, H-4') 그리고 δ 6.91(1H, s, H-3)에서 single proton과 δ 7.35(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 6.90(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-7) 및 6.74(1H, dd, $J=2.4, 8.4$ Hz, H-5)에서 ABX type을 나타내는 benzene 치환체로부터 본 화합물은 arylbenzofuran 유도체임을 알 수 있었다(22). $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정한 결과, δ 160.09(C-3' & C-5'), 157.39(C-8), 156.98(C-6) 및 156.27(C-2)에서 hydroxyl benzene 탄소 signal과 δ 122.14(C-4), 113.39(C-5), 98.60(C-7), 123.18(C-9) 및 102.34(C-3)에서 benzofuran 골격의 탄소 signal 그리고 δ 133.95(C-1'), 104.06(C-2' & C-6') 및 103.64(C-4')에서 *meta*-coupled arylbenzene형으로부터

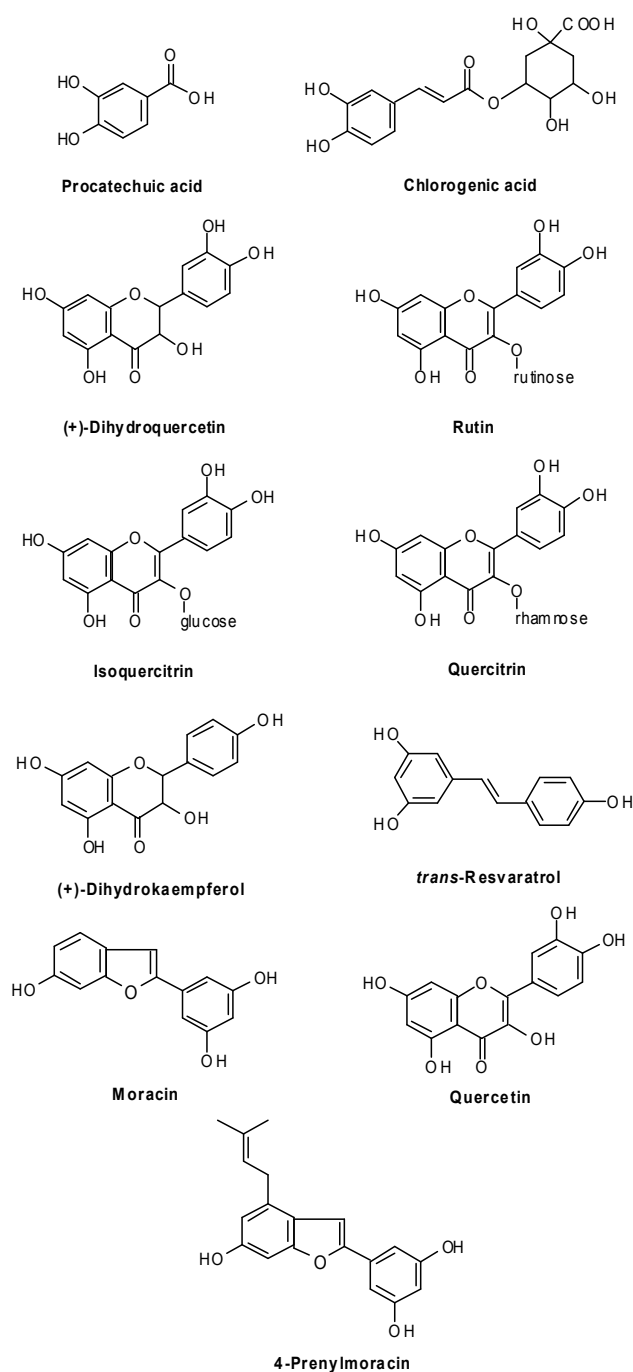


Fig. 2. Chemical structures of eleven polyphenolic compounds isolated from mulberry seed.

Comp. 9는 2-aryl-benzofuran 유도체인 moracin 화합물임을 확인할 수 있었다. Moracin 및 그 유도체는 오디뿐 아니라 상엽 및 상백피에 함유되어 있는 항당뇨 성분으로 잘 알려져 있으나(18,20,22,23), 오디씨에서 확인된 바는 본 연구가 처음이다. 이상과 같이 오디씨로부터 분리된 11가지 폴리페놀화합물의 화학구조를 보면 Fig. 2와 같으며, 여기서 처음으로 분리된 3가지 폴리페놀화합물의 ¹H- & ¹³C-NMR spectral data를 정리해보면 Table 1과 같다.

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of three polyphenolic compounds isolated from mulberry seeds

Position	Comp. 3	Comp. 7	Comp. 9
¹H-NMR			
2	4.82, d, (11.2)	4.99, d, (11.6)	
3	4.41, d, (11.6)	4.55, d, (11.6)	6.91, s
4			7.35, d, (8.4)
5			6.74, dd (2.4, 8.4)
6	5.79, d, (2.0)	5.89, d, (2.0)	
7			6.90, d, (2.0)
8	5.83, d, (2.0)	5.93, d, (2.0)	
2'	6.88, d, (2.0)	7.37, d, (8.8)	6.76, d, (2.0)
3'		6.84, d, (8.8)	
4'			6.25, t, (2.0)
5'	6.71, d, (8.4)	6.84, d, (8.8)	
6'	6.76, dd (2.0, 8.4)	7.37, d, (8.8)	6.76, d, (2.0)
¹³C-NMR			
1			156.27
2	85.14	85.19	102.34
3	73.71	73.85	122.14
4	198.43	198.67	113.39
5	165.34	165.55	156.98
6	97.38	97.58	98.60
7	168.79	169.12	157.39
8	96.35	96.55	123.18
9	164.54	164.75	
10	101.94	102.01	
1'	129.91	129.52	133.95
2'	116.14	130.58	104.06
3'	146.40	116.35	160.09
4'	147.24	159.44	103.64
5'	115.94	116.35	160.09
6'	120.97	130.58	104.06

Chemical shift in δ ppm, coupling constant (*J*) expressed in Hz in parenthesis and measured in the solvent CD₃OD, Taking TMS as an internal standard.

오디씨로부터 분리된 폴리페놀화합물의 항산화작용

오디씨로부터 분리한 11가지 폴리페놀화합물의 항산화활성은 DPPH radical 소거활성으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 2와 같다. 11가지 폴리페놀화합물 중 rutin(IC₅₀=20.2 μM)이 가장 강한 항산화활성을 나타내었으며, 그 다음으로 isoquercitrin(IC₅₀=22.5 μM) > quercitrin(IC₅₀=24.6 μM) > quercetin(IC₅₀=27.8 μM) > (+)-dihydroquercetin(IC₅₀=28.9 μM) > chlorogenic acid(IC₅₀=30.6 μM) 순으로 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 위의 폴리페놀화합물들은 모두 천연항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid(IC₅₀=31.5 μM) 및 α-tocopherol(IC₅₀=52.3 μM)에 비해 높은 항산화활성을 나타내었다. 반면, (+)-dihydrokaempferol(IC₅₀=33.8 μM), trans-resveratrol(IC₅₀=36.2 μM) 및 moracin(IC₅₀=47.6 μM)과 그 유도체인 4-prenylmoracin(IC₅₀=48.2 μM)은 L-ascorbic acid에 비해 낮은 항산화활성을 나타내었으나, α-tocopherol에 비해 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한, procatechuic acid(IC₅₀=68.2 μM)는 L-ascorbic acid와 α-tocopherol에 비해 DPPH 라디칼소거활성이 낮았다.

폴리페놀화합물은 DPPH 라디칼소거활성이 강한 천연항

Table 2. Antioxidant activity of eleven polyphenolic compounds isolated from mulberry seeds

Polyphenolic compound	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ , μM)
Procatechuic acid	68.2 ± 0.4 ^d
Chlorogenic acid	30.6 ± 0.2 ^c
(+)-Dihydroquercetin	28.9 ± 0.3 ^{cd}
Rutin	20.2 ± 0.2 ^e
Isoquercitrin	22.5 ± 0.2 ^e
Quercitrin	24.6 ± 0.2 ^{de}
(+)-Dihydrokaempferol	33.8 ± 0.3 ^c
<i>trans</i> -Resveratrol	36.2 ± 0.4 ^c
Moracin	47.6 ± 0.2 ^b
Quercetin	27.8 ± 0.2 ^d
4-Prenylmoracin	48.2 ± 0.2 ^b
L-Ascorbic acid	31.5 ± 0.2 ^c
α-Tocopherol	52.3 ± 0.4 ^b

IC₅₀ represents the concentration of a compound required for 50% inhibition DPPH radicals.

Values are mean ± SD of triplicate analyses.

Values with different superscript letters are significantly different at p < 0.05.

산화제로서 잘 알려져 있으며, 라디칼소거활성의 크기는 그들이 지니고 있는 hydroxyl group의 수와 conjugated double bond의 유무에 따라 달라진다(24,25). 따라서 quercetin과 그 배당체(isoquercitrin, quercitrin, rutin)는 거의 비슷한 라디칼소거활성을 나타낸 반면, chlorogenic acid가 procatechuic acid보다, quercetin이 (+)-dihydroquercetin보다, 그리고 resveratrol 성분이 moracin 및 그 유도체보다 강한 라디칼소거활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 폴리페놀화합물의 강한 라디칼소거활성은 자유라디칼에 의해 초래되는 지방의 자동산화반응을 억제하는 천연항산화제로서 뿐만 아니라 생체 내 활성산소에 의해 유도되는 지질과산화반응을 억제하여 암, 고혈압, 당뇨 및 치매와 같은 여러 생활습관병을 예방 및 치료하는 생리활성물질로서 작용할 수 있다(26,27). 한편, *trans*-resveratrol은 식물이 곰팡이와 같은 미생물이 침입하거나 자외선 조사에 의해 생성되는 생체방어물질 즉, phytoalexin 일종으로서 포도덩굴에서 처음으로 분리 및 동정되었으며, 포도뿐만 아니라 호장근, 대황, 하수

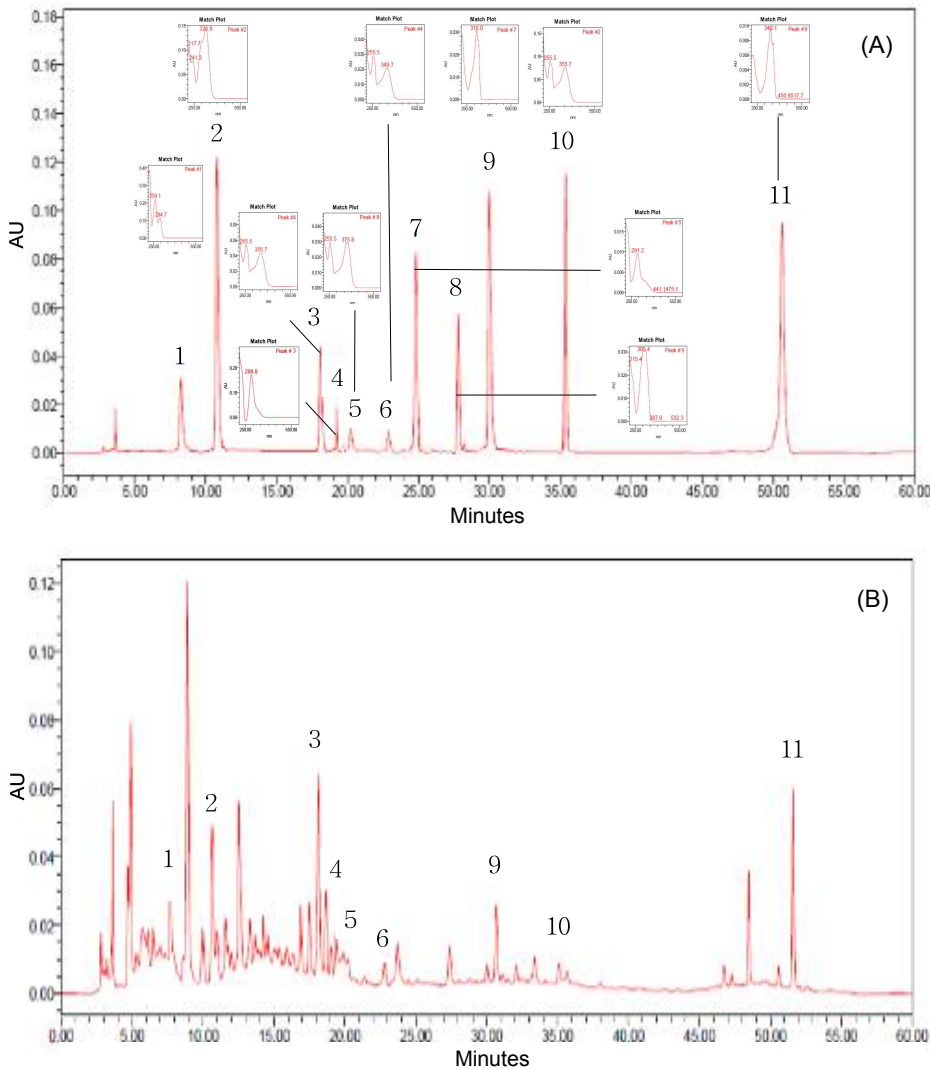


Fig. 3. HPLC chromatograms of eleven standard polyphenolic compounds (A) and the methanolic extract (B) of the mulberry seed residues. HPLC chromatograms were detected at 310 nm. 1: procatechuic acid, 2: chlorogenic acid, 3: rutin, 4: dihydroquercetin, 5: isoquercitrin, 6: quercitrin, 7: dihydrokaempferol, 8: *trans*-resveratrol, 9: moracin, 10: quercetin, 11: 4-prenylmoracin.

Table 3. Comparison of levels of 11 different polyphenolic compounds of mulberry seeds from three different *Morus alba* L. cultivars

Cultivar	Content ¹⁾ (mg/100 g, dry weight of seed)										
	PA	CA	RT	DQ	IQ	QC	DK	<i>t</i> -RT	MC	QT	4-PM
Daesung-ppong	ND ²⁾	11.9	54.9	33.1	15.4	34.2	Tr ³⁾	Tr	5.3	18.4	17.0
Iksu-ppong	11.6	15.3	60.0	24.0	11.6	24.1	Tr	Tr	7.2	19.5	43.3
Cheongil-ppong	ND	ND	31.1	13.2	5.8	7.2	Tr	Tr	4.7	15.8	10.5

Values are mean of triplicate analyses. Standard deviation and statistical analysis were omitted for simplicity.

¹⁾PA: procatechuic acid, CA: chlorogenic acid, RT: rutin, DQ: dihydroquercetin, IQ: isoquercitrin, QC: quercitrin, DK: dihydrokaempferol, *t*-RT: *trans*-resveratrol, MC: moracin, QT: quercetin, 4-PM: 4-prenylmoracin.

²⁾Not detected. ³⁾Trace (<100 µg/100 g).

오, 땅콩 등의 식품이나 생약에 존재하는 항암, 항고혈압, 항염증 및 항노화 성분으로 잘 알려져 있다(28,29). 그리고 resveratrol은 잠상산물 중 뽕나무 열매인 오디와 상엽 및 상백피에도 존재하며, 그 함량은 품종 및 부위에 따라 상당히 차이가 있는 것으로 보고되었고, 특히 오디의 레스베라트롤 함량은 포도보다는 156배, 땅콩보다는 780배나 많은 것으로 밝혀졌다(30,31).

뽕나무 품종별 오디씨의 폴리페놀화합물의 함량

오디씨에 함유된 폴리페놀화합물의 정량분석을 위한 11가지 standard 폴리페놀화합물과 탈지오디씨박 메탄올추출물의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3과 같고, 이로부터 3가지 뽕나무 품종별 오디씨의 11가지 폴리페놀화합물의 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 먼저 3가지 오디씨의 폴리페놀화합물의 함량(mg/100 g, 건조 오디씨)을 보면 rutin이 31.1~60.0 mg으로 가장 높았으며, 그 다음으로 quercitrin (7.2~34.2 mg) > (+)-dihydroquercetin(13.2~33.1 mg) > quercetin(15.8~19.5 mg) > 4-prenylmoracin(10.5~43.3 mg) > isoquercitrin(5.8~15.4 mg) > chlorogenic acid(0.0~15.3 mg) > moracin(4.7~7.2 mg) > procatechuic acid(0.0~11.6 mg) 순으로 낮았다. 반면, (+)-dihydrokaempferol 및 *trans*-resveratrol의 함량은 미량(< 0.1 mg)이었다. 한편, 3가지 뽕나무 품종별 오디씨의 폴리페놀화합물의 함량을 보면 대성뽕 오디씨는 항암, 항고혈압 및 항산화 플라보노이드 성분인 rutin 및 quercetin 유도체의 함량이 높음을 알 수 있었으며, 반면 익수뽕 오디씨는 procatechuic 및 chlorogenic acid와 같은 항산화성 페놀산의 함량이 높았고, 특히 항당뇨 성분인 moracin 및 4-prenylmoracin의 함량이 다른 오디 품종에 비해 1.5~2.5배 높음을 알 수 있었다. 반면, 청일뽕 오디씨는 3가지 품종 중 폴리페놀화합물의 함량이 가장 낮았고, 특히 procatechuic 및 chlorogenic acid는 검출되지 않았다.

이와 같이 뽕나무 품종 중 기능성물질이 많이 함유된 오디용 뽕나무로 잘 알려진 대성뽕은 오디뿐만 아니라 오디씨에도 유사하게 플라보노이드 함량이 높았으며(32), 반면 익수뽕은 비록 대성뽕보다 플라보노이드 함량은 낮았으나 다른 폴리페놀화합물, 특히 moracin 함량은 매우 높은 것이 특징이었고 이에 비해 청일뽕은 대성뽕 및 익수뽕 오디씨보다 폴리페놀 함량이 훨씬 낮은 수준이었으며, 이는 청일뽕 오디

가 다른 품종보다 달고 즙이 많은 대신 과실의 크기가 작아 상대적으로 오디씨의 항산화성 폴리페놀화합물의 함량이 낮은 것으로 생각된다. 한편, 오디뿐만 아니라 오디씨에도 항암, 항고혈압 및 항노화 성분인 *trans*-resveratrol이 함유되어 있고 오디 품종에 따라 다소 함량 차이를 보였으며(30), 전보(18)와 달리 3가지 뽕나무 품종 오디씨에는 거의 미량으로 존재함을 알 수 있었는데 이는 사용한 오디의 품종과 재배지의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

요 약

뽕나무(*Morus alba* L.) 열매 오디로부터 오디주스 및 오디와인 제조 중 부산물로 얻어지는 오디씨를 기능성식품 및 화장품의 신소재로 사용하기 위한 연구의 일환으로 먼저 오디씨로부터 11가지 폴리페놀화합물을 분리 및 동정하였으며, 아울러 그들의 항산화활성과 품종별 함량을 측정하였다. 먼저 탈지오디씨박의 메탄올추출물을 노르말-헥산으로 탈지한 후 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 노르말-부탄올로 용매분획하고, 이중 항산화활성이 강한 에틸아세테이트 분획물을 silica-gel, Sephadex LH-20 및 ODS-A column chromatography를 순차적으로 실시하여 11가지 폴리페놀화합물을 각각 순수하게 분리 및 정제하였으며, 그들의 화학구조를 NMR을 이용하여 동정하였다. 오디씨로부터 분리한 11가지 폴리페놀화합물의 항산화활성을 DPPH radical을 이용하여 측정된 결과, rutin(IC₅₀=20.2 µM)이 가장 강한 항산화활성을 나타내었으며, 그 다음으로 isoquercitrin (IC₅₀=22.5 µM) > quercitrin(IC₅₀=24.6 µM) > quercetin(IC₅₀=27.8 µM) > (+)-dihydroquercetin(IC₅₀=28.9 µM) > chlorogenic acid(IC₅₀=30.6 µM) 순으로 나타내었다. 반면, (+)-dihydrokaempferol(IC₅₀=33.8 µM), *trans*-resveratrol(IC₅₀=36.2 µM), moracin(IC₅₀=47.6 µM) 및 4-prenylmoracin(IC₅₀=48.2 µM)은 위의 폴리페놀화합물보다 낮은 항산화활성을 나타내었으며, procatechuic acid(IC₅₀=68.2 µM)는 가장 낮은 항산화활성을 나타내었다. 한편, 3가지 뽕나무 품종별 오디씨의 11가지 폴리페놀화합물의 함량을 측정된 결과, rutin이 31.1~60.0 mg/100 g으로 가장 높았으며, 그 다음으로 quercitrin (7.2~34.2 mg/100 g) > dihydroquercetin(13.2~33.1 mg/100 g) > quercetin(15.8~19.5 mg/100 g) > 4-prenylmor-

acin(10.5~43.3 mg/100 g) > isoquercitrin(5.8~15.4 mg/100 g) > chlorogenic acid(0.0~15.3 mg/100 g) > moracin(4.7~7.2 mg/100 g) > procatechuic acid(0.0~11.6 mg/100 g) 순으로 낮게 나타났으며, (+)-dihydrokaempferol 및 *trans*-resveratrol의 함량은 미량(< 0.1 mg/100 g)으로 나타났다. 또한, 3가지 품종 중 대성뽕 오디씨는 폴리페놀화합물 중 rutin 및 quercetin 유도체의 함량이 높았으며, 반면 익수뽕 오디씨는 procatechuic 및 chlorogenic acid의 함량이 높았고, 특히 moracin 및 4-prenylmoracin의 함량이 다른 오디 품종에 비해 높았으나, 반면 청일뽕은 3가지 품종 중 폴리페놀화합물의 함량이 가장 낮았다. 따라서 오디씨는 항산화성 폴리페놀화합물을 많이 함유하고 있기 때문에 암, 고혈압, 당뇨 및 노화를 예방하는 기능성식품 및 화장품의 신소재로 널리 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 대구가톨릭대학교 교내연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과로 이에 감사드립니다.

문헌

- Emerit J, Lippman J. 1990. Free radicals and lipid peroxidation in cell pathology. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 177-185.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-64.
- Ito N, Fukushima S, Tsuda H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenicity response by BHA and BHT, and other antioxidants. *Crit Rev Toxicol* 15: 109-150.
- Naczki M, Shahidi F. 2003. Phenolic compounds in plant foods: Chemistry and health benefits. *Nutraceuticals & Food* 8: 200-218.
- Wallace G, Fry S. 1994. Phenolic components of the plant cell wall. *Internat Rev Cytol* 113: 1223-1231.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43: 348-361.
- Nakatani N. 1990. Recent advances in the study on natural antioxidants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 569-576.
- Nozaki K. 1986. Current aspect and future condition of phyto-genic antioxidants. *Fragrance J* 6: 99-106.
- Kim SK. 1991. Beneficial medicine, mulberry fruit. In *Bonchohak*. Younglimsa, Seoul, Korea. Chapter 17, p 598.
- Kangjoshineuihakwon. 1985. *Jungyakdaesajon*. 2nd ed. Sohakkwyan, Sanghai, China. p 3717.
- Kim HB, Bang HS, Lee HW, Seuk YS, Sung GB. 1999. Chemical characteristics of mulberry syncarp. *Korean J Seri Sci* 41: 123-128.
- Park SW, Jung YS, Ko KC. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Korean Soc Hort Sci* 38: 722-724.
- Kim TY, Kwon YB. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seri Sci* 38: 100-107.
- Kim SY, Park KJ, Lee WC. 1998. Antiinflammatory and antioxidant effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean J Med Crop Sci* 6: 204-209.
- Cho HS, Ahn MS. 1999. Antioxidative effect of phenolic acid in defatted perilla flour in soybean oil. *Korean J Soc Food Sci* 15: 55-60.
- Kim EO, Lee KT, Choi SW. 2008. Chemical comparison of germinated- and ungerminated-safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1162-1167.
- Jang YS, Jeong JM. 2010. Antioxidative effect and digestive enzyme inhibition of grape seed extract (GSE). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 783-788.
- Kim EO, Yu MH, Lee YJ, Leem HH, Kim SA, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of functional constituents and biological activity of the seed extracts from two mulberry fruits. *J Food Sci Nutr* 15: 98-104.
- Tagashira M, Ohtake Y. 1998. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melisa officinalis*. *Planta Med* 64: 555-558.
- Kwon YJ, Rhee SJ, Chu JW, Choi SW. 2005. Comparison of radical scavenging activity of extracts of mulberry juice and cake prepared from mulberry (*Morus* spp.) fruit. *J Food Sci Nutr* 10: 111-117.
- Go DH, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Brain Res* 965: 130-136.
- Yang Y, Gong T, Liu C, Chen RY. 2010. Four new 2-arylbenzofuran derivatives from leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58: 257-260.
- Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH. 2009. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J Agric Food Chem* 57: 9133-9140.
- Giese J. 1996. Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol* 50: 73-78.
- Moon JK, Shibamoto T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 57: 1655-1666.
- Harborne JB. 1993. New naturally occurring plant polyphenols. In *Polyphenolic Phenomena*. Scalbert A, ed. INRA, Paris, France. p 19-22.
- Hasler CM. 1998. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol* 52: 63-70.
- Creasy LL, Coffee M. 1998. Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hort Sci* 113: 230-234.
- Kim YM, Yun JE, Lee CK, Lee HH, Min KR. 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. *J Biol Chem* 277: 16340-16344.
- Kim HB, Kim JB, Kim SL. 2005. Varietal analysis and quantification of resveratrol in mulberry fruits. *Korean J Seri Sci* 47: 51-55.
- Kim JS, Ha TY, Ahn JY, Kim HK, Kim S. 2008. Composition and quantitative analysis of stilbenoids in mulberry (*Morus alba* L.) leaves and fruits with DAD/UV HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 124-128.
- Kim EO, Lee YJ, Lee HH, Seo IH, Lee, Yu MH, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1467-1475.