

머루종실의 용매별 추출물의 항산화 활성 비교

박 현 실¹

영남대학교 식품학부¹

Comparison of Antioxidant Activities of Wild Grape Seed (*Vitis coignetiea* seed) Extracts by Solvents

Park Hyun Sil¹

School of Food Science and Food Service Industry, Yeungnam University¹

Abstract

This study investigates the antioxidant activities of wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed) extracts by solvents. Organic extracts of hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol were obtained from the ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed). Total phenolic compound contents of extracts from wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed) by solvents were the highest in ethyl acetate extract, 64.9 mg/100 g. Electron donating abilities of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed were proportionally increased with concentration, and the ethyl acetate extract(90.0%) showed stronger activities than BHT and Ascorbic acid at concentration of 100 μ L/mL. Reducing power of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed was the highest in the ethyl acetate extract(2.83) at concentration of 1,000 μ L/mL. TBARS of the ethyl acetate extract was highest. Nitrite scavenging ability of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed(pH 1.2, 1,000 μ L/mL) was the highest in ethyl acetate extract(76.9%).

Key words: wild grape seed, electron donating ability, reducing power, TBARS, nitrite scavenging ability, antioxidant activity.

I. 서 론

최근 현대 의학의 발달과 경제 성장 및 국민 소득의 증대로 건강에 대한 관심이 커지고 있으며, 각종 기능성 소재 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 인체 내·외에서의 산화를 방지하기 위하여 지금까지 수많은 항산화 물질들이 개발 및 이용되어 왔는데 특히, 합성 항산화제인 BHA(Butylated hydroxy anisol) 및 BHT(Butylated hydroxy toluene)가 효과와 경제성 및 안정성 등

의 이유로 광범위하게 사용되어 왔다(Fridorich I 1978). 그러나 다량섭취로 인한 간 비대, 간의 microsomal enzyme 활성증가, 체내 발암 가능성의 문제점(Bararen AL 1975; Kim SM 등 1998)등과 함께 인위적으로 가공한 화학적 합성 첨가물에 대한 일반인들의 안전성과 관련된 문제의식이 상당히 고취되면서 이를 대체할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 더욱 필요하게 되었다.

천연 식품 중 생리활성을 나타내는 물질은 여러 가지가 알려져 있으며, 가장 대표적인 성분으

로는 페놀 화합물이 있다(Lee JH 등 1994). 페놀 화합물을 다량으로 함유하고 있는 대표적인 식품인 포도과에 속하는 머루(*Vitis Coignetia*)는 일명 산포도로 불리는 낙엽성 덩굴식물로 양질의 알칼리성 식품으로 칼슘, 인, 철분, 회분 등의 함유량이 포도의 10배 이상이며, 유기산과 수용성 비타민 등 필수 영양소가 골고루 들어 있어 성장기 어린이의 두뇌발달과 식욕 및 소화촉진의 기능을 가진다(Cheon KB 2000). 그러나 머루를 이용한 기능성 성분 탐색에 관한 연구는 아직 미약한 실정이며 중국 및 일본에서 머루종자 및 머루뿌리에 대한 성분 연구가 일부 보고 되어있는 등 아직 머루에 대한 기능성 소재로서의 연구는 상당히 미비한 실정이다(Kim SK 1996; Koh KH 등 2003; Wang JN 등 2000; Kim NY 등 2005; Kim NY 등 2006).

따라서 본 연구에서는 머루 종실을 이용하여 추출용매에 따른 수율을 조사하고 머루 종실의 용매별 추출물을 이용하여 항산화 효과를 살펴봄으로써 머루 종실의 천연 항산화제로서의 가치를 확인하고 이용가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 한다

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 머루는 2009년 10월 경북 봉화군의 머루 재배 농가에서 재배된 것으로 수확하여 흐르는 물에 씻은 후 3일 동안 음지에서 자연 건조하여 물기를 제거한 후 분쇄(IKA M20, IKA Co. LTD. Germany)하여 4℃에서 보관하며 사용하였다.

2. 추출 및 분획

건조 분말 100 g에 약 10배의 80% ethanol을 가하여 실온에서 12시간 동안 교반하여 3회 반복 추출한 후 회전식 증발기에서 완전 건조하여 ethanol 조추출물을 얻었다. 여기에 3차 증류수와 극

성이 다른 용매인 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 분획하여 여과한 여액을 감압·농축한 후 동결 건조하였다. 시료의 무게로부터 수율을 측정하고 다음 3차 증류수를 가하여 1,000 µL/mL의 농도가 되도록 하여 -20℃에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 총 페놀 및 플라보노이드

총 페놀은 Gutfinger T(1981)의 Folin-Ciocalteu 방법에 따라 시료 0.2 mL에 증류수 5 mL와 Folin-Ciocalteu 용액 0.5 mL를 가하고 3분간 정지 후 2% NaCO₃ 용액 1 mL를 가하여 혼합한 후 적정배율로 희석하고 1시간 방치하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability : EDA)은 Kang YH 등(1996)의 방법을 변형하여 시료에 대한 DPPH(α,α -diphenyl-picrylhydrazyl)의 전자공여 효과로 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에 4×10⁻⁴M DPPH 용액(99.9% EtOH에 용해) 0.8 mL를 가한 후, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 2 mL를 혼합하였다. 그리고 99.9% EtOH 2 mL를 가하여 총액의 부피가 5 mL가 되도록 한 후 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, JASCO, JAPAN)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

5. Reducing power 측정

시료의 reducing power는 Oyaizu M(1986)의 방법에 의해 시료에 pH 6.6 sodium phosphate buffer 2.5 mL, potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합시켰다. 혼합물을 50℃에서 20분 동안 incubation 시킨 후 trichloroacetic acid(TCA) 2.5 mL 첨가하고 10분 간 5000 rpm에서 원심분리 시켰다. 상층액 5 mL에 탈이온수 5 mL와 1% ferric chloride 1 mL를

첨가 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로 BHT를 시료와 동일한 농도로 제조하여 비교하였으며, 환원력은 흡광도의 값으로 나타내었다.

6. Thiobabituric acid reactive substances (TBARS) 측정

Buege JA 와 Aust SD(1978)의 방법에 따라 maleic acid buffer(pH 6.5)와 Tween-20 및 0.1 N HCl로 만든 oil emulsion 0.5 mL, 산소중(H₂O₂, FeCl₂, CuSO₄)을 첨가하고 3차 증류수를 이용하여 최종 반응물을 1 mL로 만들어 37°C에서 1시간 동안 산화 반응시켰다. 그리고 7.2% BHT 50 µL 와 TCA/TBA 용액을 2 mL 가하고 15분간 가열·냉각한 다음 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 상층액을 취하여 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS 값은 반응혼합물 L당 mg malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

7. 아질산염 소거능 측정

시료의 아질산염 소거능(nitrite-scavenging ability, NSA)는 Gray JJ 와 Dugan LR(1975)의 방법으로 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO₂용액 0.1 mL에 시료를 농도별로 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액(pH 1.2, 4.0 및 6.0)을 0.7 mL 가하여 반응용액의 최종부피를 1 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 여기에 2% 초산용액 5 mL, Griess 시약 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계 UV/VIS spectrometer, JASCO,

JAPAN)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 산출하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 시료 첨가 전·후의 아질산염 백분율로 표기하였다.

8. 통계 처리

본 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준 편차로 나타내었으며, SPSS 12.0을 이용하여 각 실험 군 간의 유의성을 검증한 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출 수율 및 총 페놀 함량

머루 종실 용매별 추출물의 추출수율 및 총 페놀 함량은 Table 1에 나타내었다. ethanol 추출물의 수율은 10.6%를 나타내었으며, 순차 용매분획은 butanol 추출물이 4.0%로 가장 높았으며, water 추출물, ethyl acetate 추출물의 순으로 나타났으며, ethanol 추출물을 제외한 다른 추출물의 경우 모두 5%미만이었다. 각각의 추출물을 1,000 µL/mL의 농도로 조정하여 총 페놀 화합물의 함량을 측정하였다. 그 결과 총 페놀 화합물은 64.9 mg/100 g으로 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 함량을 보였으며, 다음으로 butanol 추출물의 함량이 30.5 mg/100 g이었다. 그러나 hexane, chloroform 및 water 추출물은 30 mg/100 g미만으로 낮

<Table 1> Extraction yield and total phenolic compounds of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetia* seed)

	EtOH fr.	Hexane fr.	CHCl ₃ fr.	EtOAc fr.	BuOH fr.	H ₂ O fr.
Extraction yield(%)	10.6±0.3 ^{1)A}	0.8±0.1 ^E	1.0±0.1 ^D	1.2±0.1 ^D	4.0±0.2 ^B	1.7±0.2 ^C
Total phenolic compounds (mg/100 g)	33.7±0.8 ^D	5.1±0.2 ^A	16.8±0.2 ^B	64.9±1.0 ^F	30.5±0.7 ^E	27.6±1.1 ^C

¹⁾All data are mean±S.D of triplicates determinations.

^{A-F)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

은 함량을 보여 추출용매에 따라 총 페놀 화합물의 함량이 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었다. Kim NY (2006)은 머루종자의 용매 분획의 경우 ethyl acetate층과 water층에서 각각 2.9%, butanol층에서 1.4%의 수율을 나타내었으며, 총 페놀 함량 역시 ethyl acetate층에서 가장 높은 함량을 나타내어 본 실험과 일치하는 결과를 나타내었다. Jung MS 등 (2004)은 식물에 함유된 총 페놀 화합물들의 함량이 항산화 활성의 간접적인 지표가 된다고 보고하였는데 본 실험결과 ethyl acetate 추출물의 총 페놀 함량이 가장 높아 머루 종실은 ethyl acetate로 추출할 때 가장 우수한 항산화 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

2. 전자공여능

머루 종실 용매별 추출물의 농도를 달리하여 DPPH에 의한 전자공여능을 측정된 결과는 Table 2와 같다. BHT와 Ascorbic acid(A.A)를 대조구로 사용하였으며, 시료의 농도는 100, 250, 500, 1,000 µL/mL로 조절하여 실험하였다. 모든 시료에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능은 유의적으로 증가하였으며, 특히 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었는데, 100 µL/mL에서 90.0%의 전자공여능을 나타내어 대

조구인 BHT(77.6%)와 Ascorbic acid(61.9%)보다 유의적으로 높게 나타났으며, 1,000 µL/mL 첨가 시에 94.5%의 가장 우수한 활성을 보였다. 또한 butanol 추출물 역시 250 µL/mL 첨가 시 92.8%, 1,000 µL/mL 첨가 시에 93.9%의 뛰어난 전자공여능을 나타내었다. 그리고 hexane 추출물을 제외한 모든 추출물에서 500 µL/mL 첨가 시 90%이상의 우수한 활성을 나타내었으며, 1,000 µL/mL 첨가 시 대조구인 BHT와 Ascorbic acid의 활성과 유사하거나 또는 우수한 활성을 나타내었다. 이는 페놀성 화합물의 함량이 증가할수록 전자공여능이 함께 증가함으로써 서로간의 높은 상관관계를 보였다. 이는 전자공여능 및 페놀성 화합물의 함량이 항산화 효과와 높은 상관관계가 있다는 보고(Morris JR 등 1986)와 일치하는 결과를 보였다. Park BJ 와 Oh DH (2003)는 포도의 종자와 과피 용매추출물 모두에서 ethyl acetate와 butanol 추출물에서 가장 우수한 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였으며, 머루 종자 분획물의 경우 free radical 소거능(RC₅₀)은 ethyl acetate 추출물에서 8.65 µg/mL로 가장 높게 나타났다고 하였으며, Koh J 등(2005)은 석류씨 추출물에서 총 페놀의 함량이 가장 높은 ethanol 추출물에서 뛰어난 효과를 나타내었다고 보고하였다.

<Table 2> The activity of electron donating ability of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed)

	Concentration(µL/mL)				Scavenging ability(%)
	100	250	500	1,000	
BHT	77.6±0.96 ^{1)Ea}	90.5±0.62 ^{Db}	93.5±0.10 ^{Ec}	94.0±0.20 ^{Dc}	
Ascorbic acid	61.9±0.21 ^{Ca}	64.0±0.57 ^{Bb}	67.5±0.80 ^{Bc}	84.6±0.35 ^{Bd}	
Hexane fr.	13.5±0.21 ^{Aa}	38.5±0.78 ^{Ab}	53.7±0.37 ^{Ac}	81.4±0.86 ^{Ad}	
CHCl ₃ fr.	80.9±0.59 ^{Fa}	86.9±0.15 ^{Cb}	91.6±0.06 ^{Dc}	92.5±0.25 ^{Cd}	
EtOAc fr.	90.0±0.25 ^{Ga}	92.4±0.12 ^{Eb}	94.1±0.26 ^{Fc}	94.5±0.36 ^{Dc}	
BuOH fr.	67.9±0.39 ^{Da}	92.8±0.17 ^{Eb}	93.1±0.15 ^{Ec}	93.9±0.15 ^{Db}	
H ₂ O fr.	29.1±0.57 ^{Ba}	65.4±0.75 ^{Bb}	90.6±0.50 ^{Cc}	93.5±0.15 ^{Dd}	

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-C)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

3. Reducing power 측정

머루 종실 용매별 추출물을 농도별로 첨가하여 금속이온의 환원력을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 환원력은 reductones가 제공하는 수소원자가 free radical 사슬을 분해함으로써 시작되며 따라서 reducing power는 첨가되는 시료의 농도변화에 따라 큰 변화를 나타내고 흡광도의 값 자체가 시료의 환원력을 나타낸다(Gordon MF 1990). 전자공여능과 마찬가지로 시료의 농도에 비례하여 환원력도 유의적으로 높아졌다. 100 µL/mL 첨가 시 ethyl acetate와 butanol 추출물에서 각각 0.81, 0.75로 BHT(0.35)와 Ascorbic acid(0.45)보다 뛰어난 높은 활성을 보였다. 1,000 µL/mL 첨가 시 hexane과 water 추출물은 1미만의 낮은 활성을 보인 반면, 나머지 추출물은 2이상의 높은 활성을 보였으며, 특히 ethyl acetate와 butanol 추출물에서 각각 2.83, 2.78로 대조구인 BHT(1.17)보다 우수한 활성을 보였으며, Ascorbic acid(2.86±0.08)와 유사한 활성을 나타내었다. 또한 모든 용매별 추출물에서 농도가 증가함에 따라 환원력은 유의적으로 증가하였다.

4. TBARS의 함량

Oil emulsion을 기질로 하여 머루 종실 용매별

추출물을 농도별로 첨가한 후 활성 산소종(H₂O₂, FeCl₂, CuSO₄)과 반응하여 생성된 MDA의 양을 대조구와 비교하였다. H₂O₂를 첨가하여 TBARS를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 모든 용매별 추출물의 농도가 증가함에 따라 TBARS값이 낮아져 유의적으로 항산화 활성이 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 대조구(1,000 µL/mL 첨가 시 BHT 0.81 mg MDA/L, Ascorbic acid 0.86 mg MDA/L)와 비교하여 전체적으로 낮은 활성을 보였다. 그 중 ethyl acetate 추출물의 활성이 가장 뛰어났는데, 1,000 µL/mL 첨가 시 4.52 mg MDA/L의 우수한 활성을 보였으며, 다음으로 chloroform 추출물과 water 추출물의 순으로 나타났다. Kwon OC 등 (2006)은 유자 종실 ethanol 추출물의 대두유 기질의 항산화 효과를 측정한 결과 저장 16일에 시료 무첨가구에 비해서 유의적으로 높은 항산화활성을 나타내었다고 보고하였으며, 오미자 용매별 추출물의 경우 ethyl acetate 추출물에서 유지에 대한 항산화력이 가장 뛰어났다고 하였다(Jang EH 등 1996).

FeCl₂를 첨가하여 TBARS를 측정한 결과는 Table 5와 같다. TBARS값은 용매별 추출물의 농도가 증가할수록 감소하여 항산화 활성이 유의적

<Table 3> Reducing power of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed)

	Concentration(µL/mL)			
	100	250	500	1,000
BHT	0.35±0.02 ^{1)Ca}	0.61±0.02 ^{Cb}	0.90±0.01 ^{Cc}	1.17±0.01 ^{Cd}
Ascorbic acid	0.45±0.02 ^{Ea}	0.72±0.03 ^{Db}	1.52±0.05 ^{Dc}	2.86±0.08 ^{Ed}
Hexane fr.	0.19±0.01 ^{Ba}	0.33±0.01 ^{Bb}	0.43±0.02 ^{Bc}	0.75±0.02 ^{Bd}
CHCl ₃ fr.	0.41±0.01 ^{Da}	0.81±0.01 ^{Eb}	1.38±0.03 ^{Dc}	2.01±0.02 ^{Dd}
EtOAc fr.	0.81±0.01 ^{Ga}	1.53±0.02 ^{Fb}	2.44±0.03 ^{Fc}	2.83±0.02 ^{Ec}
BuOH fr.	0.75±0.01 ^{Fa}	1.49±0.06 ^{Fb}	2.31±0.04 ^{Ec}	2.78±0.03 ^{Ed}
H ₂ O fr.	0.15±0.01 ^{Aa}	0.16±0.02 ^{Ab}	0.21±0.02 ^{Ac}	0.42±0.01 ^{Ac}

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-G)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

<Table 4> Effect of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetia* seed) on lipid oxidation of oil emulsion containing hydrogen peroxide(H₂O₂)

	Concentration(μL/mL)			
	100	250	500	1,000
BHT	1.79±0.01 ^{1)Ea}	1.12±0.01 ^{Fb}	1.11±0.01 ^{Fb}	0.81±0.01 ^{Gc}
Ascorbic acid	1.33±0.03 ^{Fa}	1.16±0.02 ^{Eb}	0.90±0.01 ^{Gc}	0.86±0.01 ^{Fd}
Hexane fr.	10.12±0.12 ^{Aa}	9.58±0.04 ^{Bb}	9.30±0.04 ^{Ac}	9.05±0.02 ^{Ad}
CHCl ₃ fr.	9.40±0.05 ^{Ca}	8.90±0.04 ^{Cb}	8.62±0.04 ^{Cc}	7.95±0.06 ^{Dd}
EtOAc fr.	8.97±0.02 ^{Da}	6.07±0.04 ^{Db}	5.67±0.04 ^{Ec}	4.52±0.07 ^{Ec}
BuOH fr.	10.67±0.19 ^{Ba}	9.85±0.04 ^{Ab}	9.05±0.10 ^{Bc}	8.53±0.06 ^{Bd}
H ₂ O fr.	9.39±0.16 ^{Ca}	8.89±0.07 ^{Ca}	8.57±0.01 ^{Db}	8.24±0.03 ^{Cc}

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-G)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

으로 증가한 것을 볼 수 있으며, H₂O₂ 첨가 시보다 항산화 활성은 증가하였다. Ethyl acetate 추출물에서 가장 활성이 뛰어났는데, 100 μL/mL 첨가 시 5.61 mg MDA/L로 대조구인 Ascorbic acid (5.81 mg MDA/L)보다 우수한 활성을 보였지만, BHT(1.88 mg MDA/L)보다는 활성이 낮았다. 다음으로 chloroform 추출물이 2.22 mg MDA/L의 활성을 보였지만 다른 추출물들은 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 1,000 μL/mL 첨가 시 ethyl acetate 추출물과 chloroform 추출물은 각각 1.06

mg MDA/L와 1.13 mg MDA/L로 높은 항산화 활성을 보였으며, butanol, water hexane 추출물의 순으로 항산화 활성을 보였다. FeCl₂가 지방산화에 미치는 영향은 시료와 Fe²⁺, Fe³⁺이온의 결합력이 강할수록 높은 항산화 활성을 보이며, 그리고 Fe²⁺, Fe³⁺이온에 의한 과산화 정도는 Fe²⁺과 Fe³⁺이온의 비가 1:1일 때 최고로 나타난다고 보고하였다(Minotti G & Aust DS 1992).

CuSO₄를 첨가하여 TBARS를 측정 한 결과는

<Table 5> Effect of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetia* seed) on lipid oxidation of oil emulsion containing ferrous chloride(FeCl₂)

	Concentration(μL/mL)			
	100	250	500	1,000
BHT	1.88±0.02 ^{1)Fa}	1.53±0.02 ^{Gb}	1.49±0.02 ^{Eb}	1.28±0.02 ^{Fc}
Ascorbic acid	5.81±0.02 ^{Da}	4.78±0.02 ^{Fb}	3.87±0.03 ^{Dc}	3.78±0.02 ^{Ed}
Hexane fr.	6.23±0.03 ^{Ba}	6.13±0.01 ^{Ab}	5.65±0.08 ^{Ac}	5.44±0.01 ^{Ad}
CHCl ₃ fr.	6.33±0.01 ^{Aa}	6.03±0.03 ^{Bb}	5.67±0.03 ^{Ac}	5.45±0.04 ^{Ad}
EtOAc fr.	5.61±0.09 ^{Ea}	5.27±0.02 ^{Eb}	4.90±0.02 ^{Cc}	4.49±0.05 ^{Dd}
BuOH fr.	6.27±0.04 ^{Ba}	5.81±0.01 ^{Cb}	5.48±0.04 ^{Bc}	5.16±0.11 ^{Cd}
H ₂ O fr.	6.00±0.02 ^{Ca}	5.75±0.03 ^{Da}	5.62±0.04 ^{Ab}	5.33±0.01 ^{Bc}

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-G)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

Table 6과 같다. TBARS값은 용매별 추출물의 농도가 증가할수록 낮아져 항산화 활성이 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있으나, FeCl₂ 및 H₂O₂ 첨가 시보다 전체적으로 항산화 활성이 낮았다. Ethyl acetate 추출물의 활성이 가장 우수하였으며, 1,000 µL/mL 첨가 시 9.67 mg MDA/L로 대조구인 BHT(0.67 mg MDA/L)와 Ascorbic acid(1.03 mg MDA/L)에 비해 미미한 활성을 나타내었다. 다른 용매별 추출물은 11 mg MDA/L 이상으로 활성이 매우 낮았다. Choi SY 등 (2006a)은 머루 과피 추출물 중 ethyl acetate 추출물과 chloroform 추출물에서 높은 활성을 보였다고 보고하여 본 실험과 유사한 경향을 나타내었으나 활성(2.9~4.3)에서는 큰 차이를 나타내었는데, 이는 머루의 과피와 종실 간의 차이와 더불어 머루의 품종과 재배 조건 및 지역에 따른 차이에 기인한 것으로 생각된다.

5. 아질산염 소거능 측정

머루 종실의 용매별 추출물을 농도별로 첨가하여 pH 1.2 및 4.0에서 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Table 7과 같다. 인체 내의 소화 조건과 유사하게 pH를 조정하여 인공소화를 실시하여 실험을 진행한 결과, 반응조건의 pH가 낮을수록, 시

료 농도가 증가할수록 아질산염 소거능은 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있다. pH 1.2의 반응조건에서 ethyl acetate 추출물의 아질산염 소거능은 1,000 µL/mL의 농도의 경우 76.9%의 뛰어난 활성을 보였으며, 타 용매별 추출물은 50%이상의 우수한 활성을 나타내었으나, water 추출물의 경우 39.5%로 다른 용매별 추출물에 비해 비교적 낮은 활성을 보였다. pH 4.0의 반응조건에서도 역시 ethyl acetate 추출물의 활성이 가장 우수한 것을 볼 수 있다. 1,000 µL/mL의 농도에서 30.4%의 활성을 보였으며, 다른 용매별 추출물은 30%미만의 활성을 나타내었다. Lee SJ 등 (2000)은 식물류 추출물의 아질산염 소거능이 pH 1.2에서 가장 우수하였으며, 머루즙과 머루주의 아질산염 소거작용 역시 pH가 산성 영역일수록, 시료 첨가량이 증가할수록 활성은 증가한다고 보고(Choi SY 등 2006b)하여 본 연구결과와도 일치하였다. 오미자 추출물의 아질산염 소거능은 pH가 낮을수록 활성이 증가하며, 이는 오미자에 함유된 페놀화합물이 Nitrosamine 생성의 아민과 경쟁적으로 작용하기 때문이라고 추정하였다(Kim JS & Choi SY 2008). 상기의 결과를 종합해 보면 페놀 화합물의 함량이 많을수록, pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 우수하다는 결과와 유사한 경향을 나타내었

<Table 6> Effect of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetiea* seed) on lipid oxidation of oil emulsion containing cupric sulfate(CuSO₄) (mg MDA/L)

	Concentration(µL/mL)			
	100	250	500	1,000
BHT	1.45±0.04 ^{1)Ga}	0.93±0.03 ^{Gb}	0.82±0.02 ^{Fc}	0.67±0.02 ^{Fd}
Ascorbic acid	2.19±0.02 ^{Fa}	2.14±0.04 ^{Fa}	1.58±0.03 ^{Eb}	1.03±0.03 ^{Ec}
Hexane fr.	15.58±0.06 ^{Ca}	14.25±0.12 ^{Db}	13.37±0.21 ^{Cc}	11.34±0.26 ^{Cd}
CHCl ₃ fr.	16.66±0.21 ^{Aa}	15.80±0.01 ^{Ab}	15.20±0.02 ^{Ac}	13.59±0.04 ^{Ad}
EtOAc fr.	14.70±0.12 ^{Ea}	12.59±0.21 ^{Eb}	10.81±0.20 ^{Dc}	9.67±0.06 ^{Dd}
BuOH fr.	16.36±0.05 ^{Ba}	14.93±0.08 ^{Bb}	14.06±0.04 ^{Bc}	12.90±0.06 ^{Bd}
H ₂ O fr.	15.01±0.07 ^{Da}	14.64±0.08 ^{Cb}	14.28±0.16 ^{Bc}	13.55±0.04 ^{Ad}

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-G)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

<Table 7> Nitrite-scavenging activity of organic solvent fraction obtained from 80% ethanol extracts of wild grape seed (*Vitis coignetia* seed) in different pH reaction system

pH condition	Concentration (μL/mL)				
	100	250	500	1,000	
1.2	BHT	65.6±1.7 ^{1)Ea}	72.5±0.6 ^{Fb}	83.4±1.2 ^{Ec}	88.9±3.2 ^{Dd}
	Ascorbic acid	67.9±4.2 ^{Fa}	77.2±0.1 ^{Gb}	97.2±1.2 ^{Fc}	98.1±0.6 ^{Ec}
	Hexane fr.	30.7±0.1 ^{Da}	37.5±1.0 ^{Db}	48.2±1.6 ^{Cc}	54.1±1.6 ^{Bd}
	CHCl ₃ fr.	27.6±0.9 ^{Ba}	33.8±0.8 ^{Bb}	42.7±0.5 ^{Bc}	56.6±0.9 ^{Bd}
	EtOAc fr.	29.0±0.2 ^{Ca}	43.7±0.2 ^{Eb}	58.4±0.9 ^{Dc}	76.9±1.4 ^{Cd}
	BuOH fr.	26.7±1.3 ^{Ba}	35.1±0.4 ^{Cb}	43.9±1.3 ^{Bc}	55.6±1.0 ^{Bd}
	H ₂ O fr.	16.8±0.4 ^{Aa}	28.0±1.2 ^{Ab}	32.8±0.7 ^{Ac}	39.5±1.3 ^{Ad}
4.0	BHT	24.5±0.9 ^{Ea}	32.3±1.1 ^{Eb}	37.1±0.7 ^{Ec}	45.2±0.6 ^{Ed}
	Ascorbic acid	31.9±1.0 ^{Fa}	41.9±2.5 ^{Fb}	45.9±2.7 ^{Fb}	57.5±3.8 ^{Fc}
	Hexane fr.	13.3±1.0 ^{Ba}	17.6±0.5 ^{Bb}	18.9±0.2 ^{Bc}	22.4±0.8 ^{Bd}
	CHCl ₃ fr.	7.3±2.7 ^{Aa}	10.2±0.1 ^{Ab}	12.2±0.2 ^{Ac}	13.6±0.3 ^{Ad}
	EtOAc fr.	21.5±0.4 ^{Da}	23.9±0.2 ^{Db}	27.6±0.4 ^{Cc}	30.4±0.9 ^{Cd}
	BuOH fr.	18.5±0.3 ^{Ca}	21.9±0.4 ^{Cb}	25.3±0.2 ^{Cc}	29.0±0.9 ^{Cd}
	H ₂ O fr.	11.9±0.3 ^{Ba}	15.5±0.8 ^{Bb}	25.7±0.5 ^{Dc}	27.9±0.9 ^{Dd}

¹⁾All data are mean±SD of triplicates determinations.

^{A-G)}Each value with different superscripts within the same concentration was significantly different at p<0.05.

^{a-d)}Each value with different superscripts within the same column was significantly different at p<0.05.

다(Lee GD 등 1997; Kim SM 등 2001). 따라서 머루 종실 용매별 추출물은 아질산염을 소거시킴으로써 아민과 아질산염이 식품과 함께 섭취 시 nitrosamine에 의한 암 발생을 억제하는데 큰 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

IV. 결론 및 요약

새로운 천연 항산화제의 가능성 검토 및 머루 종실의 효율적 이용을 위하여 머루 종실 용매별 추출물에 대한 항산화 효과를 검증하였다. 총 페놀 화합물은 64.9 mg/100 g으로 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 함량을 보였으며, 전자공여능도 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었는데, 100 μL/mL에서 90.0%의 전자공여능을 나타내어 대조구인 BHT와 Ascorbic acid보다 유의적으로 높게 나타났으며, 1,000 μL/mL 첨가 시에 94.5%의 가장 우수한 활성을 보였으며 농도

가 증가함에 따라 전자공여능 역시 증가하는 경향을 보였다. 금속이온의 환원력을 측정된 결과 ethyl acetate 추출물에서 활성이 가장 우수하였는데, 100 μL/mL 첨가 및 1,000 μL/mL 첨가 시 각각 0.81, 2.83의 유사한 활성을 나타내었다. H₂O₂, FeCl₂ 및 CuSO₄에 대한 항산화 활성도 머루 종실 용매별 추출물의 농도가 높아짐에 따라 유의적으로 활성이 증가하는 경향을 보였으며, ethyl acetate 추출물에서 가장 활성이 높았다. 아질산염 소거능 역시 1,000 μL/mL의 농도 첨가 시 ethyl acetate 추출물에서 가장 우수하였으며, 1,000 μL/mL의 농도 첨가 시 pH 1.2, 4.0의 반응조건에서 각각 76.9%, 30.4%의 소거능을 나타내었다. 따라서 상기의 결과를 종합해 보면 머루 종실의 ethyl acetate 추출물은 우수한 항산화 활성을 나타내어 천연 항산화제의 소재로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

한글 초록

본 연구는 머루 종실의 용매별 추출물을 이용하여 항산화 효과를 살펴봄으로서 머루 종실의 천연 항산화제로서의 가치를 확인하고 이용 가능성에 대한 기초자료를 제시하고자 하였다. 머루 종실의 ethanol 조추출물을 얻은 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 분획하였다. 머루 종실의 용매별 추출물의 총 페놀 화합물 함량은 64.9 mg/100 g으로 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 함량을 보였으며, 전자공여농도 100 $\mu\text{L/mL}$ 에서 90.0%로 대조구인 BHT 및 Ascorbic acid보다 활성이 높았으며, 농도가 증가함에 따라 전자공여능 역시 증가하는 경향을 보였다. 환원력 역시 농도가 1,000 $\mu\text{L/mL}$ 일 때 ethyl acetate 추출물에서 2.83로 가장 뛰어난 활성을 보였다. H_2O_2 , FeCl_2 및 CuSO_4 에 대한 항산화 활성도 머루 종실 용매별 추출물의 농도가 높아짐에 따라 유의적으로 활성이 증가하는 경향을 보였으며, ethyl acetate 추출물에서 가장 활성이 높았다. 아질산염 소거능은 pH 1.2의 반응조건에서 1,000 $\mu\text{L/mL}$ 의 농도 첨가 시 ethyl acetate 추출물이 76.9%의 소거능을 나타내었다.

참고문헌

- Bararen AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxy anisol and butylated hydroxy toluene. *JOACS*. 52(1): 59-63
- Buege JA and Aust SD. 1987. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 52(2): 302-310
- Cheon KB. 2000. Screening of antioxidant from *Vitis coignetia*, *Vitis vinifera* L. and comparison of its antioxidant activity. Master degree thesis, *Kon-Kuk University*. p 33-36
- Choi, SY, Cho HS and Sung NJ. 2006a. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from Wild grape (*Vitis coignetia*) skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 35(8): 961-966
- Choi SY, Cho HS, Kim HJ, Ryu CH, Lee JO and Sung NJ. 2006b. Physicochemical analysis and antioxidative effects of Wild grape (*Vitis coignetia*) juice and its wine. *Korean J. Food & Nutr*. 19(3): 311-317
- Fridorich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*. 201(4359): 875-881
- Gordon MF. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson, Food antioxidants. London: *Elsevier Applied Science*. p1-18
- Gray JI and Dugan Jr. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci*. 40(5): 981-984
- Gutifinger T. 1981. Polyphenols in olives. *JAACS*, 58, p966
- Jang EH, Pyo YH and Ahn MS. 1996. Antioxidant effect of Omija(*Schizandra Chinesis* Baillon) Extracts. *Korea J. Food Cookery Sci*. 12(3): 372-376
- Jung MS, Lee GS and Chan HJ. 2004. In vitro biological activity assay of ethanol extract of Radish. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 47(1): 67-71
- Kang YH, Park YK and Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds(in korean). *Korean. Food Sci. Technol.*, 28(2): 232-239
- Kim JS and Choi SY. 2008. Physicochemical properties and antioxidative activities of Omija (*Schizandra chinensis* Bailon). *Korean J. Food & Nutr*. 21(1): 35-42
- Kim NY, Choi JH, Kim YG, Jang MY, Moon JH, Park GH and Oh DH. 2006. Isolation and identification of an antioxidant substance from ethanol extract of Wild grape (*Vitis coignetia*) seed. *Korean J. Food Sci. Technol*. 38(1): 109-

- 113
- Kim NY, Kim YG, Bae KJ, Choi JH, Moon JH, Park GH and Oh DH. 2005. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts and fractions of Wild grape seed (*Vitis coignetia*). *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 34(6): 755-758
- Kim SK. 1996. Deacidification of new wild grape wine. *Korean J. Food & Nutr.* 9(3): 265-270
- Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH and Sung SK. 1998. Effect of water extracts of *Salvia miltorrhiza* Bge. *Prunus persica* Stoke, *Angelica gigas Nakai* and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27(3): 399-405
- Kim SM, Kim KH and Ahn JK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extract. *Korean J. Food Sci Technol.* 33(6): 623-632
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY and Son JY. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Korea J. Food Cookery Sci.* 21(2): 171-179
- Koh KH, Kim HW, Han SH, Park YH and Lee CH. 2003. Polyphenolic compounds and superoxide radical scavenging activity of Moru-Ju. *Food Sci Biotechnol.* 12(3): 290-297
- Kwon OC, Shin JH, Kang MJ, Lee SJ, Choi SY and Sung NJ. 2006. Antioxidant activity of extracts from Citron(*Citrus junos* SIEB ex TANA KA) seed. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 35(3): 294-300
- Lee GD, Chang HG and Kim HK. 1997. Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci Technol.* 29(3): 432-436
- Lee JH, and Lee SR. 1994 Analysis of phenolic substancers content in Korean plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26(3): 310-316
- Lee SJ, Chung MJ, Shin JH and Sung NJ. 2000. Effect of natural plant components on the nitrite scavenging. *J. Fd Hyg. Safety.*, 15(1): 88-94
- Minotti G and Aust DS. 1992. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids.* 27(3): 219-221
- Morris JR, Sistrunk WA, Junek J and Sims CA. 1986. Effect of fruit maturity, juice storage, and juice extraction temperature on quality of 'concord' grape juice. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111(5): 742-746
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr.* 44(6): 307-315
- Park BJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging of seed and skin extracts form black olympia grape (*Vitis labruscana* B.). *Korean J. Food Sci. Technol.* 35(1) : 121-124
- Wang JN, Hano Y, Nomura T and Chen YJ. 2000. Procyanidins from the seeds of *Vitis amurensis*. *Phytochemistry.* 53(8): 1097-1102

2010년 12월 27일 접수
 2011년 1월 18일 1차 논문수정
 2011년 1월 19일 게재확정