

꾸지 뽕나무 휘발성 향기성분의 항산화활성

고건희¹ · 남상해^{2*}

¹(재)산청한방약초연구소

²경남과학기술대학교 식품과학부

Antioxidant Activities of Volatile Aroma Components from *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau Extracts

Keun Hee Ko¹ and Sanghae Nam^{2*}

¹Sanchung Oriental Medicinal Herb Institute, Gyeongnam 666-831, Korea

²Division of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology,
Gyeongnam 660-758, Korea

Abstract

The antioxidant activities of volatile aroma extracts from *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau were examined using two antioxidant assays. Ten volatile aroma compounds identified in this plant were also tested for antioxidant activity. The volatile aroma extracts of stem and root from *C. tricuspidata* exhibited antioxidant activities with a clear dose response relationship in both aldehyde/carboxylic acid and lipid/malonaldehyde assays. Antioxidant activities of volatile aroma extracts from *C. tricuspidata* at 500 µg/mL were 77.02±8.12% (stem) and 74.19±6.82% (root) in the aldehyde/carboxylic acid assay. Antioxidant activities of volatile aroma extracts from *C. tricuspidata* at 160 µg/mL were 76.17±4.25% (stem) and 61.43±2.11% (root) in the lipid/malonaldehyde assay. Positively identified volatile aroma components in extracts of stem and root from *C. tricuspidata* were seven terpenes and terpenoids, 14 alkyl compounds, 11 nitrogen containing heterocyclic compounds, three oxygen containing heterocyclic compounds, 12 aromatic compounds, nine lactones, and seven miscellaneous compounds (possible contaminants). Among the positively identified compounds, eugenol, isoeugenol, and 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol exhibited antioxidant activities comparable to those of BHT and α-tocopherol. Vanillin and 2-acetylpyrrole showed moderate activities in the lipid/malonaldehyde assay. These results suggest that consumption of antioxidant-rich beverages prepared from *C. tricuspidata* could have beneficial effects on human health by preventing diseases caused by oxidative damage.

Key words: *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau, antioxidant, volatile aroma components, aldehyde/carboxylic acid assay, lipid/malonaldehyde assay

서 론

꾸지 뽕나무 [*Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau]는 우리나라와 중국, 일본 등의 동아시아에 주로 분포하며, 10여 종이 알려져 있으나 우리나라에는 충청남도, 전라도, 경상도 등의 남부 지방에 1종만이 자생하고 있다. 5~6월경에 황색의 꽃이 피며, 암꽃은 지름이 약 1 cm 정도이며 짧고 연한 털이 많은 대가 있다. 결실기는 9~10월이며, 열매는 구형에 가깝고 연한 적색이다(1).

꾸지 뽕나무는 다양한 기능성 성분을 함유하고 있으며, 주요 성분 중의 하나인 1-deoxynojirimycin은 포도당과 유사한 구조를 가지는 화합물로서 소화기관내에서 탄수화물 분해효소인 glucosidase의 경쟁적 저해제로 작용하여 식후의 혈당치 상승을 억제하는 것으로 알려져 있다(2,3). 한방에

서도 꾸지 뽕나무의 잎은 습진, 유행성 이하선염, 폐결핵, 타박상, 급성관절염 등의 치료에 쓰이며, 민간에서도 열매와 껍질이 이용되고 있다(4).

최근의 연구를 보면 꾸지 뽕나무로부터 6,8-p-hydroxy benzenyl taxifolin, keampferol, naringenin, 7-o-β-D-glucopyranoside 등 다양한 폴리페놀 화합물들이 분리 보고되었다(5-7). 또 꾸지 뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리를 이용한 항균 작용에 관한 연구, 항고혈압, 마우스에서의 지질 상승 억제, 지질 과산화 억제 작용 등이 보고되고 있다(8-10). 최근 노화와 관련된 퇴행성 질환과 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병이 사회적 문제가 되고 있으며, 그 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 산소 유해설이 점차 인정받고 있다(11).

천연식물의 잎이나 꽃에 존재하는 많은 향기성분들은 상쾌한 냄새뿐만 아니라, 건강에 유익한 효능이 있는 것으로

*Corresponding author. E-mail: shnam@gntech.ac.kr
Phone: 82-55-751-3274, Fax: 82-55-751-3279

알려져 있으나, 최근에 항산화 효과 등과 같은 의학적 가치는 뒤늦게 밝혀졌다. 실제로 eugenol, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, maltol 및 5-hydroxy methyl-furfural 등과 같이 잘 알려진 몇 종류의 천연 향기성분은 상당한 항산화력을 가지고 있는 것으로 보고되었으며(12), herbs와 spices(13), brewed coffee(14), clove buds(15) 및 beans(16) 등의 향기성분들에 대한 항산화효과도 다양한 방법으로 연구되었다.

그러나 현재까지 꾸지 뽕나무의 성분(5,6), 잎, 줄기, 뿌리 등의 추출물을 이용한 항산화효과(7), 항염증 작용(17) 및 고지혈증 억제 작용 등(18,19) 많은 보고가 되어 있으나 향기성분의 항산화 효과 연구는 거의 없는 상태이다. 본 연구에서는 꾸지 뽕나무의 줄기와 뿌리의 휘발성 향기성분을 분석하고, 이 중에서 일부 향기성분들의 항산화효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 꾸지 뽕나무는 2010년산을 경상남도 산청군 생약협동조합에서 구입하여 사용하였다. 구입한 꾸지 뽕나무는 줄기와 뿌리를 분리하였으며, 상태가 양호한 것을 선별하고 깨끗이 세정하여 음지에서 자연건조한 후 볶아서 사용하였다.

시약

본 실험에 사용한 시약들 중에서 (E)- β -Ionone을 비롯한 1-methyl-2-pyrrolidinone, 2-acetylpyrrole, phenylethyl alcohol, eugenol, 2,4-bis(1,1-dimethyl ethyl) phenol, iso-eugenol, benzophenon, vanillin, γ -amyl- γ -butyrolactone, hexanal, hexanoic acid, undecane, n-methylhydrazine (NMH), 2-methylpyrazine(2-MP), 1-methyl pyrazole(1-MP), sodium dodecyl sulfate(SDS), ferrous chloride, α -tocopherol은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였다. Cod liver oil (approximately 70% ω -3 fatty acid methyl esters), butylated hydroxy toluene (BHT), trizma hydrochloride 및 trizma base는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Hydrogen peroxide과 dichloromethane 및 ethyl acetate는 Fisher scientific Co.(Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였다. 2-MP 표준용액은 100 mg의 2-MP에 10 mL의 dichloromethane을 가하여 만들었으며, 4°C의 냉장고에 보관하였다. Authentic volatile chemicals는 TAKATA Koryo Co.(Osaka, Japan) 등에서 구입하여 사용하였다.

휘발성 향기성분의 추출

꾸지 뽕나무의 줄기와 뿌리의 향기추출물은 수증기증류법(steam distillation under reduced pressure)에 의하여 얻었다(13,15). 즉 잘 건조된 줄기 및 뿌리를 각각 30 g씩을

round bottom flask(3 L)에 넣고 1 L의 deionized water를 가한 뒤 mantle heater로서 가열(55°C)하면서 감압(95 mmHg) 하였으며, 환류냉각기를 이용하여 증류액을 4시간 동안 받아 모았다. 증류액이 약 900 mL가 되었을 때, 액체-액체 연속추출장치(LLE; liquid-liquid continuous extractor)를 이용하여 약 100 mL의 dichloromethane으로 약 6시간 동안 추출하였다. 추출액에 남아있는 수분을 제거하기 위해 무수황산나트륨(Na_2SO_4) 25 g을 가하여 냉동고에서 12시간 방치하여 수분을 완전히 제거한 뒤 filter paper로 여과하였다. 여과액은 감압하지 않은 회전농축기로서 용매를 제거하였으며 여과액이 약 1 mL 정도 남았을 때 멈추고, 질소농축기에서 정확히 0.5 mL로 줄어들 때까지 농축하였다. 농축액은 분석할 때까지 4°C에 보관하였다.

GC/MSD에 의한 휘발성 향기성분의 동정

꾸지 뽕나무에서 분리한 향기추출물은 gas chromatograph(GC, Agilent 6890, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 mass selective detector(MSD, Agilent 5791A, Hewlett-Packard Co.)를 부착한 GC-MSD system을 사용하여 각각의 향기성분을 분석하였다(13,15). GC에 의하여 분리된 각각의 휘발성 향기성분은 Kovats gas chromatographic retention index I(20) 및 각각의 peak의 MS fragmentation pattern을 authentic chemical의 pattern과 비교하였으며, Willy 6th edition MS spectra library와도 비교하여 동정하였다.

휘발성 향기성분의 GC 분석조건으로 analytical column은 DB-WAXTM bonded-phase fused-silica capillary column(0.25 mm ID×30 m, 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific Co., Folsom, CA, USA)을 사용하였고, injector 온도는 260°C, oven 온도는 50°C에서 분당 2°C로 210°C까지 올린 후 93분간 유지하도록 하였다. Carrier gas는 He를 사용하였고 평균 flow rate는 30 cm/sec로 고정하였으며, splitless mode로 하였고 시료의 주입량은 1 μ L로 하였다. 한편 휘발성 향기성분의 동정을 위한 MS의 분석 조건으로 MS ionization voltage는 70 eV, source 온도는 200°C, interface temperature는 280°C, mass spectrum scan range는 50~550 m/z로 하였다.

휘발성 향기성분의 정량

꾸지 뽕나무에서 분리한 휘발성 향기추출물은 analytical balance를 사용하여 함량을 측정하였다. 또한 향기성분의 정량은 GC를 이용하여 분리된 각각의 성분을 전체 피크 면적에 대한 백분율로 환산하였으며, 컴퓨터에 내장된 프로그램(GC chemstation, Hewlett-Packard Co.)에 의해 계산하였다. 향기성분의 전체 질량은 각 추출물의 질량에 전체 peak area percentage를 곱하여 계산되었다. 각각의 향기성분의 함량은 계산에서 구한 전체 향기성분의 질량에 각 성분의 백분율을 곱하여 얻었다.

$$\text{Concentration of each aroma components } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{Weight of condensed sample} \times \text{GC peak area} \% / \text{Weight of fresh sample plant} \times 100) \times 10^6}{}$$

Aldehyde/carboxylic acid assay에 의한 항산화활성

향기추출물의 항산화활성은 aldehyde/carboxylic acid assay로서 측정하였다. 즉 향기추출물(10, 50, 100, 500 µL)과 GC 내부표준 물질로서 undecane(0.2 mg/mL)이 포함된 hexanal(3 mg/mL)을 넣고 dichloromethane을 사용하여 최종부피가 정확히 2 mL가 되도록 하였다. 각 시료는 잘 밀폐되는 시료 병(8 mL)에 담고, 초기에 산화를 촉진하기 위해 60°C에서 10분 동안 중탕 열처리한 후 어두운 실온에서 보관하였다. 각 시료 병의 headspace에 처음 7일간 공기를 주입(1.5 mL/sec, 3 sec)시켜 산화를 촉진하였다. Hexanal의 감소량은 7일 간격으로 4주 동안 측정하였다. 표준물질로 사용된 항산화제 BHT에 대해서도 같은 방법으로 항산화활성을 측정하여 비교하였다.

Hexanal의 정량분석은 flame ionization detector(FID)가 부착된 GC를 사용하였다. Hexanal 정량을 위한 GC의 분석 조건으로 analytical column은 DB-1 bonded phase fused silica capillary column(0.32 mm ID×30 m, 0.25 µm film thickness, J&W Scientific Co.)을 사용하였고, injector와 detector의 온도는 각각 300°C와 280°C로 설정하였다. Oven 온도는 40°C에서 2분간 유지한 다음, 5°C/min로 180°C까지 상승시킨 후, 180°C에서 10분간 유지하도록 하였다. Carrier gas는 He을 사용하였으며, flow rate는 1.5 mL/min으로 고정하였고 split ratio는 20:1로 하였으며, 시료의 주입량은 1 µL로 하였다.

Lipid/malonaldehyde assay에 의한 항산화활성

불포화 지방산이 산화될 때 생성되는 malonaldehyde는 반응성이 너무 크고 불안정하여 정확한 측정이 쉽지 않다. 따라서 malonaldehyde가 형성된 후, NMH와 반응시켜 유도체인 1-MP로 변환시켜 nitrogen phosphorus detector(NPD)가 장착된 GC로 그 함량을 측정하였다. 이 방법은 이미 여러 천연물질의 항산화효과를 측정하는데 많이 사용되어져 온 방법이다(14-16,20). 즉 0.5 M의 trizma buffer(pH 7.4), 1 M의 potassium chloride, 1% SDS, 0.01 M의 ferrous chloride, 0.3%의 hydrogen peroxide, 30 µL의 대구 간유(cod liver oil)와 농도별(20, 40, 80 및 160 µg/mL) 휘발성 향기추출물 또는 선택된 각각의 향기성분을 시험관에 넣고 증류수를 가하여 전체 부피를 5 mL가 되도록 하였다. 그리고 자석교반기를 이용하여 교반하면서 17시간 동안 37°C의 incubator에 둔 후에 4%의 BHT 50 µL를 가하여 10분 동안 방치하여 산화를 정지시켰다. 그 후 NMH 30 µL를 가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켜 1-MP로 유도체화하였다. 이 1-MP는 solid phase extraction(SPE)법으로 분리·정제하는 과정을 거쳤다. 즉 SPE cartridge(MEGA BE-C₁₈, 1 g, 6 mL, Varian,

Harbor, CA, USA)의 activation을 위해서 ethyl acetate, methanol, 증류수의 순으로 각각 10 mL씩을 서서히 통과시키고 각 시료(NMH 반응 유도체 전량)를 가한 후, 증류수 5 mL를 먼저 통과시키고 이어서 ethyl acetate 10 mL를 통과시켜 반응 생성물인 1-MP를 추출하였다. 여기에 내부 표준물질로 2-MP 20 µL를 가하고 전체 부피를 ethyl acetate로서 10 mL로 정용하였다. 1-MP의 정량 분석은 GC-NPD를 사용하였다. GC의 분석조건으로 analytical column은 DB-wax column(0.32 mm ID×30 m, 0.25 µm film thickness, Hewlett-Packard Co.)을 사용하였고, injector와 detector는 모두 250°C로 설정하였다. Oven 온도는 60°C에서 4°C/min으로 160°C까지 상승시킨 후, 160°C에서 2분간 유지하도록 하였다. Carrier gas는 He을 사용하였으며, flow rate는 1.5 mL/min으로 고정하였으며 split ratio는 20:1로 하였으며 시료의 주입량은 1 µL로 하였다.

통계적 분석

분석결과는 통계프로그램인 SAS(Statistical Analysis System software, Version 9.0, Cary, NC, USA)를 이용하였고, 분산분석(ANOVA)을 실시하여 통계적 유의성(p<0.05)은 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

휘발성 향기성분의 추출

꾸지 뽕나무의 효능에 대한 연구는 대부분이 비교적 저 휘발성 물질인 polyphenols, flavonol glycosides 및 catechol xanthenes에 관한 것으로 보고되고 있다(4,17). 이 연구에서는 꾸지 뽕나무의 휘발성 향기성분에 대한 항산화효과에 중점을 두고자 하였다. 우선 줄기와 뿌리로부터 얻은 향기추출물의 총 수율은 각각 0.15±0.02%와 0.24±0.03%였다. Table 1은 향기추출물을 DB-WAX column과 FID가 장착된 GC로서 분리한 peak를 DB-WAX에 의한 Kovats index와 비교하여 동정하여 나타낸 것이다. 각 화합물의 농도는 아래의 등식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Concentration of each compounds} = \frac{\omega_{ext} \times \frac{A}{100}}{\omega_r}$$

ω_{ext} : the weight (g) of extract (without solvent)

ω_r : the weight of mulberry leaf or stem

A: the GC peak area (%)

Table 1에서 보는 바와 같이 꾸지 뽕나무 줄기와 뿌리의 향기추출물로부터 분리한 GC chromatogram에서 모두 88개의 peak가 관찰되었으며, 줄기와 뿌리로부터 확인된 향기 성분은 각각 32종과 48종이었다. 이 중에서 7종의 향기 성분은 표준물질로서 확인하지는 않았으나, MS library(NIST AMDIS version 2.1 software)와 90% 이상 일치하였다. 확실하게 동정된 향기성분은 7종의 terpenes과 terpenoides, 14

Table 1. Volatile aroma compounds identified in extracts from *C. tricuspidata*

Compounds	KI ¹⁾	Amount ($\mu\text{g/g}$ sample)	
		Stems	Roots
Terpenes and terpenoids			
Camphene	1085	— ²⁾	0.029
(Z)-Linalool oxide	1471	—	0.112
(E)-Linalool oxide	1472	—	0.018
(E)- α -Terpineol	1697	0.304	0.082
(E)-Geranyl acetone	1758	—	0.078
(E)- β -Ionone ⁴⁾	1936	0.124	0.021
Terpin hydrate	2083	—	0.631
Dihydroactinidiolide	2353	0.396	—
Drimenol	2508	—	0.106
Alkylalcohols, alkylaldehydes & alkylketone			
n-Hexanal	1082	—	0.015
n-Butanol	1128	—	0.248
n-Hexanol	1368	—	0.018
n-Nonanal	1379	0.040	0.039
2-Ethyl-1-hexanol	1484	0.496	0.038
Hexahydrofarnesyl acetone	2089	—	0.342
Nitrogen containing heterocyclic compounds			
Pyridine	1184	—	0.022
2,3,6-Trimethylpyrazine	1387	0.265	—
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1433	0.079	—
3-Ethyl-2,6-dimethylpyrazine	1442	0.035	—
4-Acetylpyrazole	1506	—	0.024
3-n-Butylpyridine	1559	0.020	—
2-n-Pentylpyrazine	1625	0.427	—
1-Methyl-2-pyrrolidone ⁴⁾	1764	1.104	0.025
2-Acetylpyrrole ⁴⁾	1953	1.860	—
5-Methyl 1H-pyrrole-2-carboxaldehyde ³⁾	2089	0.285	—
6-Pentyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one ³⁾	2116	0.532	0.221
Oxygen containing heterocyclic compounds			
5,5-Dimethyl-2(5H)-furanone	1608	—	0.138
3-Methyl-2(5H)-furanone	1710	—	0.080
5-Ethyl-2(5H)-furanone	1754	0.134	0.141
Aromatic compounds			
Phenylethyl alcohol ⁴⁾	1888	0.019	0.362
4-Methylguaiacol	1951	—	0.263
Phenol	1969	0.411	0.749
4-Ethylguaiacol	2030	0.052	0.145
(E)-Cinnamic aldehyde	2031	0.126	0.080
Anisaldehyde	2039	—	0.032
Eugenol ⁴⁾	2154	1.697	0.939
p-Vinylguaiacol	2169	0.568	0.217
2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol ⁴⁾	2305	0.713	—
Isoeugenol ⁴⁾	2322	—	1.024
Benzophenone ⁴⁾	2440	0.567	—
Vanillin ⁴⁾	2525	—	0.152
Lactones			
4-Valerolactone	1613	0.039	0.048
γ -Butyrolactone	1628	—	0.078
Lavender lactone	1669	—	0.057
γ -Caprolactone	1702	0.059	0.250
γ -Crotonolactone ³⁾	1749	—	0.071
γ -Butylbutyrolactone ³⁾	1918	0.097	0.110
γ -Amylbutyrolactone ⁴⁾	2015	0.128	0.512
γ -Dodecalactone	2294	0.222	0.084
γ -Palmitolactone ³⁾	2857	—	8.764

Table 1. Continued

Compounds	KI ¹⁾	Amount (µg/g sample)	
		Stems	Roots
Acids			
n-Pentanoic acid	1688	0.198	0.439
n-Hexanoic acid	1787	9.886	13.126
n-Heptanoic acid	1873	—	2.052
n-Octanoic acid	1974	—	1.741
n-Nonanoic acid	2089	—	1.483
(E)-2-Octenoic acid ³⁾	2164	0.389	0.939
n-Decanoic acid	2195	0.245	0.965
(E)-2-Decenoic acid ³⁾	2275	—	0.577
Miscellaneous compounds			
Carbitol	1624	—	0.302
2,2,2-Trichloroethanol	1691	0.043	0.025
Tri-n-butylphosphate ³⁾	2109	0.130	—
4-Acetoxy-3-methoxystyrene	2190	0.616	—
1,2-Diethyl phthalate	2353	—	0.595
Isobutylphthalate	2509	0.531	0.611
Dibutyl phthalate	2671	3.614	0.459

¹⁾Kovats index on DB-WAX.

²⁾Not detected or less than 0.01 µg/g.

³⁾Tentatively identified due to lack of authentic compound.

⁴⁾Tested for antioxidant activity.

중의 alkyl compounds(3종의 alcohols, 3종의 aldehydes, 1종의 ketone 및 8종의 acids), 11종의 nitrogen containing heterocyclic compounds(2종의 pyridines, 4종의 pyrazines, 3종의 pyrroles, 1종의 pyrazole과 pyranone), 3종의 oxygen containing heterocyclic compounds(3종의 furanones), 12종의 aromatic compounds, 9종의 lactones와 7종의 miscellaneous compounds(possible contaminants)이었다. 한편 2종 이상의 functional group을 가진 화합물에 대해서는 중복하여 헤아리지는 않았다.

줄기의 향기추출물로부터 확인된 32종의 향기성분들 중에서 n-hexanoic acid(9.886 µg/g)가 가장 많이 함유되어 있었으며, 2-acetylpyrrole(1.860 µg/g), eugenol(1.697 µg/g), 1-methyl-2-pyrrolidone(1.104 µg/g)의 순으로 많이 함유되어 있었다. 또한 뿌리의 향기추출물로부터 확인된 48종의 향기성분들 중에서도 n-hexanoic acid(13.126 µg/g)가 가장 많이 함유되어 있었으며, γ-palmitolactone(8.764 µg/g), n-heptanoic acid(2.052 µg/g), octanoic acid(1.741 µg/g), n-nonanoic acid(1.483 µg/g), isoeugenol(1.024 µg/g)의 순으로 많이 함유되어 있었다. 또한 차나 식품을 볶거나 구울 때 발생하는 향기성분인 pyrazine류(21)는 4종이 확인되었는데 특히 줄기에 많이 존재하였다. Pyrazine류는 열처리를 통한 Maillard 반응에 의하여 식품이나 음료에서 형성되는 것으로 알려져 있다(22). 그러나 pyrazine류는 뚜렷한 항산화효과를 나타내지 않기 때문에 항산화활성을 가진 향기성분에 초점을 맞추고 있는 이 연구에서는 중요한 성분은 아니었으나, 비교적 큰 항산화활성을 갖는 2-acetylpyrrole, 5-methyl-1H-pyrrole-2-carboxyaldehyde 등의 pyrrole류가 발견되었다(23).

한편 (E)-β-ionone, 1-methyl-2-pyrrolidone, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, eugenol, 2-acetylpyrrole 및 benzo-phenone 등은 줄기에만 존재하거나 특히 많이 함유하고 있는 향기성분이었으며, phenylethyl alcohol, isoeugenol, vanillin 및 γ-amylobutyrolactone 등은 뿌리에만 존재하거나 특히 많이 함유하고 있는 향기성분이었다. 본 연구에서는 줄기와 뿌리에서 추출한 향기추출물에 대한 항산화활성을 aldehyde/carboxylic acid assay와 lipid/malonaldehyde assay로 측정하였으며, Table 1에 표시한 바와 같이 10종의 선택된 향기성분에 대하여는 lipid/malonaldehyde assay에 의한 항산화활성을 실험하였다.

Aldehyde/carboxylic acid assay에 의한 항산화활성

Aldehyde는 그 자체가 매우 불안정한 형태의 화합물이므로 쉽게 공기 중에서 산화하여 carboxylic acid로 전환되는데, 이 실험방법은 aldehyde가 carboxylic acid로 전환되는 것을 저해하는 효과를 측정하는 실험 방법이다(13,15,24). Aldehyde/carboxylic acid assay는 식품의 slow oxidation 현상(식품의 shelf life가 경과되었을 때처럼 느리게 진행되는 산화)에 대한 항산화효과를 평가하기에 유용하고 편리한 방법이다(25). 또한 aldehyde/carboxylic acid assay는 용매 기반이 dichloromethane 등의 organic solvent로 구성되어 있으므로, 향기성분 등과 같은 비수용성 유기화합물의 시험에 적용하기 좋다. 본 연구에서 사용한 aldehyde는 hexanal(C₅H₁₁CHO)을 사용하였으며, 공기 중에서 쉽게 산화되어 hexanoic acid(C₅H₁₁COOH)로 전환되는데, 꾸지 뽕나무의 향기추출물이 hexanal의 산화를 저해하는 정도를 4주 동안 매주 1회씩 GC로서 측정하였다. Table 2는 꾸지 뽕나무

Table 2. Changes of remaining hexanal amounts after aldehyde/carboxylic acid assay on storage periods and different treated concentrations of aroma extracts from *C. tricuspidata*

Treated concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	Remaining hexanal (mg/mL) on storage periods (weeks)					
	0	1	2	3	4	
Butylated hydroxy toluene	500	$2.52 \pm 0.25^{1)}$	2.45 ± 0.27	2.39 ± 0.25	2.33 ± 0.23	2.25 ± 0.24
	100	2.52 ± 0.18^a	2.40 ± 0.14^{ab}	2.31 ± 0.10^{ab}	2.23 ± 0.23^{ab}	2.11 ± 0.25^b
	50	2.53 ± 0.19^a	2.33 ± 0.12^{ab}	2.21 ± 0.15^c	2.03 ± 0.13^{cd}	1.92 ± 0.13^d
	10	2.54 ± 0.17^a	2.24 ± 0.12^b	1.87 ± 0.14^c	1.65 ± 0.14^{cd}	1.55 ± 0.14^d
Stem aroma extracts	500	2.52 ± 0.23	2.45 ± 0.25	2.41 ± 0.23	2.26 ± 0.23	2.09 ± 0.23
	100	2.47 ± 0.24^a	2.30 ± 0.23^{ab}	2.14 ± 0.24^{ab}	2.04 ± 0.22^{ab}	1.92 ± 0.22^b
	50	2.48 ± 0.13^a	2.14 ± 0.18^b	1.83 ± 0.13^c	1.58 ± 0.15^{cd}	1.40 ± 0.17^d
	10	2.56 ± 0.12^a	2.20 ± 0.19^b	1.67 ± 0.11^c	1.31 ± 0.17^d	0.98 ± 0.14^e
Root aroma extracts	500	2.55 ± 0.13^a	2.36 ± 0.12^{ab}	2.20 ± 0.15^{bc}	2.09 ± 0.12^c	2.04 ± 0.13^c
	100	2.53 ± 0.13^a	2.22 ± 0.14^b	2.11 ± 0.15^{bc}	2.02 ± 0.14^{bc}	1.88 ± 0.12^c
	50	2.52 ± 0.14^a	1.77 ± 0.13^b	1.55 ± 0.13^{bc}	1.36 ± 0.14^{cd}	1.19 ± 0.15^d
	10	2.55 ± 0.14^a	1.60 ± 0.15^b	1.37 ± 0.12^b	1.02 ± 0.17^c	0.68 ± 0.13^c

¹⁾Values are mean \pm SD (n=3).

^{a-d}Means within a row with different superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences by Duncan's multiple range test.

향기추출물을 처리한 농도별로 4주간의 실험기간 동안 hexanoic acid로 산화되고 남은 hexanal의 함량을 나타낸 것이다. 즉 4주 후의 hexanal의 남은 양은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, BHT, 줄기 및 뿌리의 향기추출물에서 각각 2.25 ± 0.24 , 2.09 ± 0.23 및 2.04 ± 0.13 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 각각 2.11 ± 0.25 , 1.92 ± 0.22 및 1.88 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 각각 1.92 ± 0.13 , 1.40 ± 0.17 및 1.19 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때에는 각각 1.55 ± 0.14 , 0.98 ± 0.14 및 0.68 ± 0.13 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 이와 같이 꾸지 뽕나무의 추출물을 처리한 농도가 높을수록 기간의 경과에 따른 hexanal의 감소비율이 매우 완만하게 진행되었음을 알 수 있었다. 따라서 꾸지 뽕나무의 향기추출물이 어느 정도의 항산화력을 가지고 있음을 암시하는 것이라고 짐작할 수 있었다. 이는 Lee 등(26)의 연구에서 꾸지 뽕나무 뿌리에서 분리한 8종의 화합물이 DPPH 및 hydroxy radical의 소거에 상당한 활성을 가지고 있다고 하였고, Lee 등(27)은 꾸지 뽕나무의 잎, 뿌리, 줄기 추출물에 대하여 DPPH법, FTC법 및 TBA법으로 항산화활성을 측정하였으며 비교적 높은 효과를 나타내었다고 하였다. 한편 본 연구에서는 꾸지 뽕나무의 향기추출물은 뿌리보다 줄기에 좀 더 높은 항산화활성을 가진 향기성분을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

Fig. 1은 꾸지 뽕나무의 줄기와 뿌리의 향기추출물의 aldehyde 산화억제에 의한 항산화활성을 합성항산화제인 BHT와 비교하였다. 그 결과를 보면, 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서는 BHT, 줄기 및 뿌리의 항산화활성은 각각 85.07 ± 3.42 , 77.02 ± 8.12 및 $74.19 \pm 6.82\%$ 이었으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 각각 77.75 ± 4.10 , 67.99 ± 5.07 및 $66.13 \pm 4.98\%$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 각각 68.34 ± 3.25 , 41.68 ± 3.18 및 $31.13 \pm 2.83\%$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 각각 49.66 ± 3.60 , 20.52 ± 1.73 및 $5.05 \pm 2.49\%$ 였다. 즉 비교적 낮은 처리농도(10 또는 50 $\mu\text{g/mL}$)에서는 향기추출물의 항산화활성이 BHT와 비교해서 큰 차이를 보였으나,

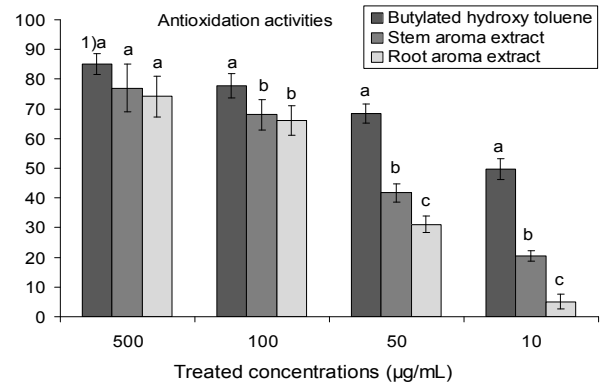


Fig. 1. Antioxidant activities of the extracts from *C. tricuspidata* examined by aldehyde/carboxylic acid assay. ¹⁾Values are mean \pm SD (n=3). ^{a-c}Means with different superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences by Duncan's multiple range test.

비교적 높은 처리농도(100 또는 500 $\mu\text{g/mL}$)에서는 BHT와 10~15% 이내의 근소한 차이를 보였다. 그리고 aldehyde 산화억제에 의한 항산화활성은 꾸지 뽕나무의 줄기에서 뿌리보다 약간 높게 나타났다.

Lipid/malonaldehyde assay에 의한 항산화활성

꾸지 뽕나무의 향기추출물의 항산화효과 측정을 위한 또 다른 방법은 불포화 지방산이 산화될 때 생성되는 malonaldehyde의 양을 측정하는 기본원리로 이루어진 lipid/malonaldehyde assay로 하였다. 이 방법은 지질과산화의 마지막 단계에서 형성되는 malonaldehyde 등과 같은 이차지질과산화물의 분석과 genotoxic MA의 형성을 얼마나 저해하는지를 관찰할 수 있는 유용한 방법이다(28). 본 연구에서는 줄기와 뿌리의 향기추출물을 농도별로 처리하여 이 assay에서 최종적으로 생성되는 1-MP의 양을 측정하고 이를 BHT와 α -tocopherol의 효과와 비교하여 봄으로써 항산화효과를 예측하고자 하였다. Table 3에는 처리농도별 생성된 1-MP의 양을 나타내었다. 이 결과를 보면 20, 40, 80 및 160 $\mu\text{g/mL}$

Table 3. Amounts of 1-methylpyrazole converted from malonaldehyde after lipid/malonaldehyde assay on different treated concentrations of aroma extracts from *C. tricuspidata*

Tested samples	Amounts of 1-methylpyrazole (nmol)			
	20	40	80	160
Butylated hydroxy toluene	2.36±0.60 ^{1)a}	0.95±0.05 ^b	0.95±0.08 ^b	0.79±0.03 ^b
α-Tocopherol	3.34±0.37 ^a	1.66±0.08 ^b	1.45±0.18 ^b	1.02±0.18 ^c
Stem aroma extract	9.19±0.42 ^a	6.57±0.32 ^b	4.37±0.27 ^c	3.74±0.54 ^c
Root aroma extract	7.06±1.35 ^a	5.43±0.36 ^b	4.16±0.08 ^c	2.31±0.33 ^d

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

^{a-d}Means within a row with different superscript letters indicate significant (p<0.05) differences by Duncan's multiple range test.

의 농도로 처리하였을 경우, BHT에서는 각각 2.36±0.60, 0.95±0.05, 0.95±0.08 및 0.79±0.03 nmol씩의 1-MP가 형성되었고, α-tocopherol에서는 각각 3.34±0.37, 1.66±0.08, 1.45±0.18 및 1.02±0.18 nmol, 줄기의 향기추출물에서는 각각 9.19±0.42, 6.57±0.32, 4.37±0.27 및 3.74±0.54 nmol 그리고 뿌리의 향기추출물에서는 각각 7.06±1.35, 5.43±0.36, 4.16±0.08 및 2.31±0.33 nmol의 1-MP가 형성되었다. 이와 같이 형성된 1-MP의 함량은 대체로 처리한 농도가 높을수록 적게 나타났다. 이는 지방산의 기질로 사용된 cod liver oil의 산화생성물인 malonaldehyde가 처리한 향기추출물의 농도가 높을수록 적게 생성되었음을 의미하므로 꾸지 뽕나무의 줄기와 뿌리의 향기추출물에는 항산화활성을 가진 성분이 포함되어 있을 것으로 예측할 수 있었다. 또한 줄기보다는 뿌리의 향기추출물에서 1-MP가 더 적게 형성되었으므로, 뿌리에 항산화활성이 더 큰 성분이 존재하거나 함량이 많을 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 이는 줄기에서 활성이 높게 나타난 aldehyde/carboxylic acid assay와는 약간 상이한 결과를 나타내었다.

Fig. 2에는 지질의 산화억제에 의한 꾸지 뽕나무 줄기 및 뿌리의 향기추출물의 항산화효과를 나타내었으며, 그 활성을 BHT 및 α-tocopherol과 비교하였다. 그 결과는 가장 높은 처리농도인 160 µg/mL에서는 BHT, α-tocopherol, 줄기 및 뿌리 추출물의 항산화효과가 각각 91.90±0.96, 89.47±

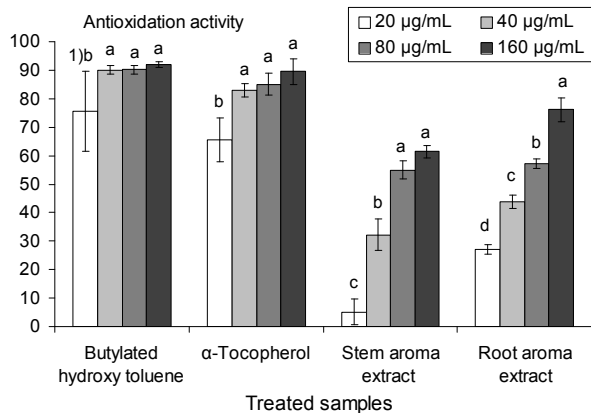


Fig. 2. Antioxidant activities of the extracts from *C. tricuspidata* examined by lipid/malonaldehyde assay. ¹⁾Values are mean±SD (n=3). ^{a-d}Means with different superscript letters indicate significant (p<0.05) differences by Duncan's multiple range test.

4.67, 61.43±2.11 및 76.17±4.25%로 비교적 높게 나타났다. 가장 낮은 처리농도인 20 µg/mL에서도 줄기와 뿌리 향기추출물에서 각각 5.15±4.42와 27.16±1.59%의 활성이 나타났다. Park 등(17)도 꾸지 뽕나무의 뿌리 추출물에 항산화활성이 존재한다고 보고한 바가 있다.

꾸지 뽕나무 향기성분의 항산화활성

Fig. 3에는 lipid/malonaldehyde assay로 측정된 꾸지 뽕나무의 줄기와 뿌리의 주요 향기성분들의 항산화효과를 나타내었다. 그 결과를 보면 시험한 모든 향기성분들에서 처리한 농도에 비례적으로 항산화활성을 나타내었다. 이 중에서 가장 높은 처리농도인 160 µg/mL에서 eugenol(91.74±1.33%), isoeugenol(94.00±0.59%) 및 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol(91.22±4.74%)은 높은 항산화활성을 나타내었으며, BHT(91.90±0.42%) 및 α-tocopherol(89.47±3.04%)과 비교할 만한 활성을 나타내었다. Leem 등(29)은 eugenol과 그

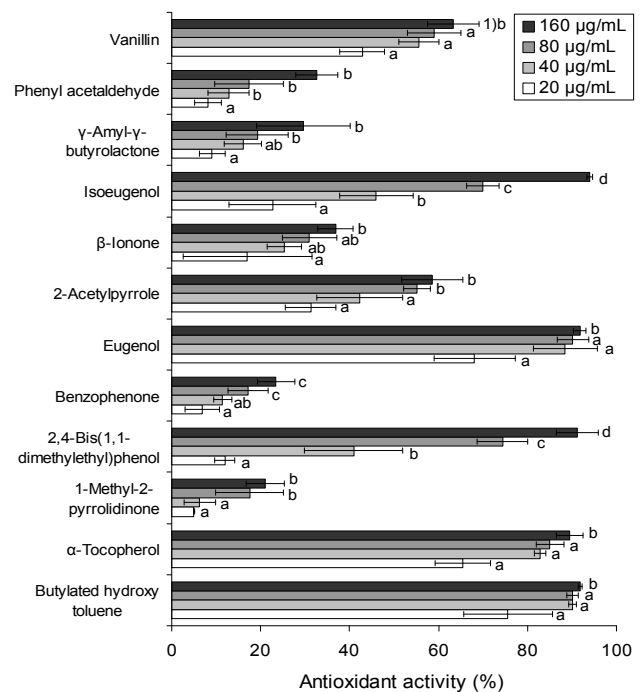


Fig. 3. Antioxidant activities of selected chemicals identified in volatile aroma extracts from *C. tricuspidata* examined by lipid/malonaldehyde assay. ¹⁾Values are mean±SD (n=3). ^{a-d}Means with different superscript letters indicate significant (p<0.05) differences by Duncan's multiple range test.

유도체들이 높은 항산화활성을 가지고 있다고 보고한 바가 있으며 본 연구의 결과와도 일치하였다. 한편 동일 처리농도에서 vanillin($63.36 \pm 5.83\%$)과 2-acetylpyrrole($58.62 \pm 6.83\%$)은 중간정도의 항산화활성을 나타내었으며, β -ionone($36.84 \pm 4.00\%$), phenyl acetaldehyde($32.61 \pm 4.67\%$), γ -amyl- γ -butyrolactone($29.61 \pm 10.43\%$), benzophenone($23.49 \pm 4.21\%$) 및 1-methyl-2-pyrrolidinone($21.05 \pm 4.31\%$)으로서 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 일반적으로 알려진 바와 같이 eugenol 및 vanillin 등의 phenol 유도체들이 강력한 항산화활성을 나타내었으며(13,15,16,29), 비페놀성 화합물인 β -ionone, benzophenone, 1-methyl-2-pyrrolidinone과 phenyl acetaldehyde는 항산화활성이 매우 약하거나 거의 없었다. 꾸지 뽕나무의 줄기의 항산화활성은 뿌리에서보다 훨씬 많이 존재하는 eugenol 및 뿌리에는 존재하지 않는 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol이 많이 함유되어 있기 때문이며, 뿌리의 항산화활성은 줄기에는 존재하지 않는 isoeugenol이 많이 함유되었기 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 꾸지 뽕나무는 좋은 항산화 소재로 식품에 사용될 수도 있을 것 같았다.

요 약

꾸지 뽕나무(*C. tricuspidata*)의 휘발성 향기추출물의 항산화활성을 2 가지의 시험방법을 이용하여 측정하였다. 그리고 꾸지 뽕나무의 향기추출물에서 동정된 10종의 휘발성 향기성분에 대한 항산화활성도 측정하였다. 꾸지 뽕나무의 줄기 및 뿌리 향기추출물들은 2가지 실험법에서 모두 뚜렷하게 처리농도에 비례하여 항산화활성을 나타내었다. 즉 aldehyde/carboxylic acid assay에서 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 줄기와 뿌리의 향기추출물은 각각 $77.02 \pm 8.12\%$ 와 $74.19 \pm 6.82\%$ 의 항산화활성을 나타내었으며, lipid/malonaldehyde assay에서 160 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 줄기 및 뿌리의 향기추출물은 각각 61.43 ± 2.11 및 $76.17 \pm 4.25\%$ 의 항산화활성을 나타내었다. 꾸지 뽕나무의 향기추출물에서 동정된 향기성분들은 7종의 terpenes and terpenoides, 14종의 alkyl compounds, 11종의 nitrogen containing heterocyclic compounds, 3종의 oxygen containing heterocyclic compounds, 12종의 aromatic compounds, 9종의 lactones와 7종의 miscellaneous compounds였다. 꾸지 뽕나무의 향기추출물에서 동정된 향기성분들 중에서 eugenol, isoeugenol 및 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol은 lipid/malonaldehyde assay에서 160 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 각각 91.74 ± 1.33 , 94.00 ± 0.59 및 $91.22 \pm 4.74\%$ 의 항산화활성을 나타내었다. 이는 동일한 방법에서 BHT와 α -tocopherol의 항산화활성이 각각 $91.90 \pm 0.42\%$ 와 $89.47 \pm 3.04\%$ 인 것과 비슷한 수준이었다. 한편 동일한 처리농도에서 vanillin과 2-acetylpyrrole은 각각 63.36 ± 5.83 과 $58.62 \pm$

6.83% 로서 중간 정도의 항산화활성을 나타내었다. 따라서 꾸지 뽕나무는 산화적 손상으로 인한 질병의 예방과 사람들의 건강에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

1. Lee CB. 1985. *Daehanshikmuldogam*. Hyangmoonsha, Seoul, Korea. p 285.
2. Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. 1995. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (folium mori) and cortex mori radices in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115: 476-482.
3. Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. 1999. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan-induced diabetic mice. *Kor J Pharmacogn* 30: 123-129.
4. Jang IM. 2003. *Treatise on Asian herbal medicines*. Institute of Natural Products Science, Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 7.
5. Hano Y, Matsumoto Y, Sun JY, Nomura T. 1990. Structures of four new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes H, I, J, and K. *Planta Med* 56: 478-481.
6. Hano Y, Matsumoto Y, Sun JY, Nomura T. 1991. Structures of four new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes L, M, N, and O from *Cudrania tricuspidata*. *Planta Med* 57: 172-175.
7. Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. 1993. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 68-72.
8. Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Kosino H, Uramoto M, Yoo ID. 1996. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 41: 213-216.
9. Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh HC, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. 2002. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci* 70: 2599-2609.
10. Cha JY, Cho YS. 2001. Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the concentrations of lipid and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J Food Sci Technol* 33: 128-134.
11. Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Kim HS. 1999. Investigation of anti-aging effect and determination of chemical structures of pine needle extract (PNE) through the animal experiments. I. Effects of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in liver of SD rats. *Korean J Life Sci* 9: 466-472.
12. Koga T, Moro K, Mastudo T. 1998. Antioxidative behaviors of 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone against lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 46: 946-951.
13. Lee KG, Shibamoto T. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J Agric Food Chem* 50: 4947-4952.
14. Singhara A, Macku C, Shibamoto T. 1998. Antioxidative

- activity of brewed coffee extracts. II. Medicinal plants and other foods. ACS symposium series 701. American Chemical Society, Washington, DC, USA. p 101-109.
15. Lee KG, Shibamoto T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry]. *Food Chem* 74: 443-448.
 16. Lee KG, Mitchell AE, Shibamoto T. 2000. Determination of antioxidant properties of aroma extracts isolated from various beans. *J Agric Food Chem* 48: 4817-4820.
 17. Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS. 2006. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 5580-5583.
 18. Ryu YB, Curtis-Long MJ, Lee JW, Ryu HW, Kim JY, Lee WS, Park KH. 2009. Structural characteristics of flavanones and flavones from *Cudrania tricuspidata* for neuraminidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 4912-4915.
 19. Oh SS, Seo EJ, Kim HY, Ryu YB, Lee JH, Gal SW, Park KH. 2007. Tyrosinase inhibitory xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *J Life Sci* 17: 476-481.
 20. Kovats E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr* 1: 229-247.
 21. Osada Y, Shibamoto T. 2006. Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems. *Food Chem* 98: 522-528.
 22. Shibamoto T. 1983. Heterocyclic compounds in browning and browning/nitrite model systems: Occurrence, formation mechanisms, flavor characteristics and mutagenic activity. In *Instrumental Analysis of Foods*. Charalambous G, Inglett G, eds. Academic Press, New York, NY, USA. Vol 1, p 229-278.
 23. Chan EWC, Soh EY, Tie PP, Law YP. 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Res* 3: 266-272.
 24. Lee KG, Shibamoto T. 2001. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *J Sci Food Agric* 81: 1573-1579.
 25. Moon JK, Shibamoto T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 57: 1655-1666.
 26. Lee BW, Lee JH, Lee ST, Lee HS, Lee WS, Jeong TS, Park KH. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 5548-5552.
 27. Lee JS, Han GC, Han GP, Nobuyuki K. 2007. The antioxidant activity and total polyphenol content of *Cudrania tricuspidata*. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 696-702.
 28. Frankel EN. 1980. Lipid oxidation. *Progr Lipid Res* 19: 1-22.
 29. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1361-1370.

(2012년 7월 13일 접수; 2012년 8월 22일 채택)