

추출방법에 따른 복분자 추출물의 생리활성

권지웅 · 이희권 · 박희전 · 송지영[†]

(재)고창복분자연구소

Physiological Activities of *Rubus coreanus* Miq. Extracts Using Different Extraction Methods

Ji Wung Kwon, Hee Kwon Lee, Hee Jeon Park and Ji Young Song[†]

Gochang Black Raspberry Research Institute, Gochanggun, 585-943, Korea.

Abstract

This study was carried out to evaluate biological activities concerning extracts according to extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq. The extraction methods were HWE (hot water extraction for 4 hr at 100°C), SFE (extraction for 3 hr at 40°C under 300 bar, 100% of CO₂ fluid), USE (ultrasonification extraction for 4 hr at 50°C with water), USE+HWE (hot water extraction for 2 hr at 100°C after ultrasonification process for 2 hr), VE (vacuum extraction for 4 hr at 90°C under 0.9 bar with water). VE extract showed the highest contents of total polyphenol (178.78±3.79 mg/g) and total flavonoid (40.93±0.68 mg/g). IC₅₀ values of DPPH radical scavenging activity, linoleic acid peroxidation inhibition activity and LDL (low density lipoprotein) oxidation inhibition activity of HWE extract showed the lowest 35.39±0.25 µg/mL, 12.61±0.31 µg/mL and 1.31±0.02 µg/mL among other all extracts, respectively. IC₅₀ values of α-glucosidase inhibitory activities of VE and HWE extracts showed lower 14.34±0.20 µg/mL and 15.83±0.20 µg/mL than those of other extracts, respectively. Specifically, HWE and VE extracts have relatively better biological activities than other extracts; these could be potentially used as a bioactive source for health functional foods.

Key words : *Rubus coreanus* Miq., antioxidant activity, linoleic acid peroxidation, low density lipoprotein, α-glucosidase

1. 서론

복분자 딸기(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)의 낙엽관목이며, 중국이 원산지이고 일본, 한국 등 동아시아에 분포한다. 우리나라는 남부 및 중부지방에서 해발 50~1000 m의 산기슭 양지에 자생하며, 5~6월에 꽃이 피고 지역, 품종에 따라 다르지만 6월 중순에서 7~8월에 열매가 성숙되는데 등글고 붉은색으로 익은 후 검붉은 색으로 완숙되어 단맛과 신맛, 독특한 향을 갖는다(Park PJ 등 2004, Kim JY 등 2011).

복분자의 성분에 대한 연구는 Kim YH와 Kang SS(1993)이

23-hydroxytormentic acid, rosamultin, nigaichigoside F1, F2를 보고하였으며, Cho JY 등(2011)은 복분자 와인에서 ethyl succinate, vanillic acid, furan-2-ol 등도 분리·동정하였다. Phenol성 물질에 대한 연구에서는 앞으로부터 ellagic acid 등 6종을 분리 보고되었다(Lee MW 1995). 복분자의 생리활성에 대한 연구는 복분자에서 분리한 탄닌의 항산화 활성(Kim KH 등 2000), 페놀화합물에 의한 효소적 지질과산화 억제활성(Yoon I 등 2002), 진통·항염작용(Choi JW 등 2003), 위염과 류마티즘 관절염에 대한 항염증효과(Nam JH 등 2006), 복분자 추출물에 의한 내피세포 유래 NO합성효소의 활성화와 발현 증가(Yoon HJ 등 2011), 여드름 원인균에 대한 복분자 과육과 종자 추출물의 항균 활성(Lee KI 등 2011) 등이 보고되어 있다.

추출방법에 따른 복분자 생리활성에 관한 연구는 초음파 병행 추출에 의한 항암활성(Park JH 등 2004) 및 면역활성 증진 효과(Kim DH 등 2005), 초임계 추출에 의한 항산화 활성(Kim ID 등 2008), 열수 추출물의 과일세포 분화 억제(Oh JM

[†]Corresponding author: Ji Young Song, Gochang Black Raspberry Research Institute.

Tel: +82-63-561-6768

Fax: +82-63-563-6680

E-mail: jysong@gbri.re.kr

등 2011) 등 일부 연구가 보고되어 있을 뿐 복분자 시료를 이용하여 다양한 추출방법에 따른 생리활성의 효과를 비교한 경우는 거의 없다.

본 연구는 열수추출법, 초임계추출법, 초음파추출법, 초음파와 열수 병행추출법, 감압추출법으로 복분자 추출물을 제조한 후 이에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 측정하고 생리활성 등을 비교하여 기능성 식품 소재를 개발하는데 기초자료로 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

(1) 실험재료

본 실험에 사용된 복분자는 고창군에서 재배된 것으로 2010년 6월부터 과실의 색이 녹색인 것을 미숙과로 수확하여 -20℃에서 냉동 보관하여 사용하였다.

(2) 시약

본 실험에 사용된 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 gallic acid, rutin hydrate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, BHA(butylated hydroxyanisole), α -tocopherol, linoleic acid, ferrous chloride, CuSO₄, α -glucosidase, PBS(phosphate-buffered saline), TBA(thiobarbituric acid), PNPG(p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside), TCA(trichloroacetic acid), LDL(low density lipoprotein), acarbose는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Na₂CO₃ 등 다른 시약은 Junsei(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다.

(3) 추출물 제조

복분자 미숙과의 추출방법은 열수 추출(HWE), 초임계 추출(SFE), 초음파 추출(USE), 초음파와 열수 병행추출(USE+HWE), 감압 추출(VE) 방법으로 추출물을 제조하였다.

열수 추출은 생과 400 g에 증류수를 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용하여 2시간 동안 가열 추출하였고, 이것을 2회 반복 하였다.

초임계 추출은 초임계 이산화탄소 추출장치(일신오토클레이브, 대전, Korea)를 이용하여 추출을 진행하였다. 초임계유체 추출 조건은 열풍 건조 후 마쇄한 복분자 미숙과 100 g을 100% CO₂를 이용하여 40℃에서 300 bar의 압력으로 3시간 추출하였다.

초음파 추출의 경우 생과 400 g에 증류수를 넣고 초음파추출기(JEIO TECH, 대전, Korea)를 이용하여 50℃에서 40 KHz의 초음파로 2시간동안 2회 추출하였다.

초음파와 열수 병행 추출은 생과 400 g에 증류수를 넣고 초음파추출기(JEIO TECH, 대전, Korea)를 이용하여 50℃에서 40 KHz의 초음파로 2시간동안 1회 추출한 후 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용 2시간 동안 1회 가열 추출하였다.

감압 추출은 생과 400 g에 증류수를 넣고 감압추출기(경서기계, 인천, Korea)를 이용하여 90℃로 4시간 동안 0.9 bar의 압력 하에서 추출하였다.

추출 방법별로 추출한 추출물은 여과지(ADVANTEC No.2, Tokyo, Japan)를 이용 여과한 후 감압농축 후 동결 건조하였다.

(4) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(Amerme MA와 Ough CS 1980)을 응용하여 측정하였다. 추출 방법별로 추출물을 농축한 후 시료 용액에 Folin-Ciocalteu's 시약 1 mL를 가하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 용액(w/v) 2 mL를 넣고 1시간 실온에서 방치한 후 700 nm에서 비색정량 하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Davis 방법(Chang CC 등 2002)을 이용하여 측정하였는데, 시료용액에 diethylene glycol 2 mL, 1 N-NaOH 0.02 mL를 가한 다음 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 방치하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

(5) DPPH 라디칼 소거능 활성 측정

추출 방법별로 추출물의 항산화 활성을 조사하기 위하여 자유라디칼인 DPPH를 사용한 항산화활성 측정법(Choi JS 등 1993)을 이용하였다. 각 시료를 농도별로 용매 1.0 mL에 용해하여 사용하였다. 농도별로 조제한 시료에 2×10⁻⁴M DPPH 용액을 가한 후 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하여 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(%)을 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 EtOH을 첨가하여 실험 하였으며, 대조군 BHA, α -tocopherol을 사용하여 활성을 비교하였고, 각 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

(6) 지질과산화 억제활성 측정

추출 방법별로 추출물의 linoleic acid의 지질과산화에 대한 억제활성 측정은 Inatani R 등(1983)의 방법에 따라 실시하였다. 각 시료를 농도별로 용매 1.0 mL에 용해하여 사용하였다. 시료(1 mL), EtOH에 녹인 2.51% linoleic acid, 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0), 증류수, EtOH을 첨가하여 40℃의 암소에 5일 동안 방치하였다. 이 반응액 0.1 mL을 취해 75% EtOH, 30% ammonium thiocyanate, 3.5% HCl에 녹인 0.02 M ferrous chloride와 혼합하여 3분이 지난 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하여 산화양상을 측정하였다. 대조구는 시료대신 EtOH를 사용하였으며, 대조군은 BHA, α -tocopherol을 사용하여 활성을 비교하였고, 각 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

$$\text{Linoleic acid peroxidation inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

(7) LDL 산화 억제활성 측정

추출 방법별 추출물을 농도별로 DMSO에 녹여 20 μL 를 취하고 LDL 50 μL , 10 mM PBS, 0.25 mM CuSO_4 를 가해 반응시키고 20% TCA 1 mL를 가해 반응을 중단시켰다. 이 반응액을 vortex 한 후 0.05 N NaOH에 녹인 0.67% TBA을 혼합하여 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 분간 가열하고 냉각한 후 원심분리 하여 분리된 상등액 1 mL을 semi-micro cuvette에 분주하여 540 nm에서 생성된 MDA(malondialdehyde)의 흡광도를 측정하였다 (Miller CP 등 1996).

(8) α -Glucosidase 활성 억제 효과

추출 방법별 추출물을 농도별로 50 μL 를 취하여, 0.75 unit/mL의 α -glucosidase 효소액, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 2 mM PNPg로 반응 시킨 후 0.5 M CuSO_4 용액으로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 계산하였다(Kim BN 등 1991). 양성대조구로는 acarbose를 사용하였다.

(9) 통계처리

실험결과는 3회 반복실험 한 값을 SAS Package(release 9.1.3)를 이용하여 평균값의 $p < 0.05$ 의 수준에서 분산분석으로 유의성을 검정하고 Duncan의 다중범위 분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

(1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

추출 방법별 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같았다. 총 폴리페놀 함량은 감압 추출물이 178.78 \pm 3.78 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 초음파와 열수 병행 추출물 139.37 \pm 0.57 mg/g, 열수 추출물 130.3 \pm 0.13 mg/g, 초임계 추출물 87.52 \pm 2.48 mg/g, 초음파 추출물 70.40 \pm 0.19 mg/g의 순으로 함량이 낮았다. 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과도 감압 추출물이 40.93 \pm 0.68 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 초음파와 열수 병행 추출물, 열수 추출물, 초임계 추출물, 초음파 추출물은 24.75 \pm 0.55과 35.48 \pm 0.79 mg/g 사이에 있었으며, 총 폴리페놀 추출방법에서와 같은 결과의 순서를 보였다. 이러한 결과들은 동일한 시료라도 추출방법에 따라 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량에 차이가 있다는 보고 (Jeong HJ 등 2010)와 유사한 결과를 보였다. Kim JH 등 (2010)도 스테비아 잎에서 총 페놀성 화합물의 함량을 추출방법에 따라 측정한 결과 감압 추출물이 열수 및 발효 처리된 추출물보다 페놀성 화합물의 함량이 더 높았다고 보고하였다.

따라서 유효성분을 추출하기 위해서는 시료에 따른 최적의 추출방법을 사용하는 것이 중요하다고 생각되었다.

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq.

Extraction method ¹⁾	Total phenolic content (mgGA/g) ²⁾	Total flavonoid content (mgRE/g) ³⁾
HWE	130.30 \pm 0.13 ^{cd)}	34.30 \pm 0.25 ^c
SFE	87.52 \pm 2.48 ^d	30.29 \pm 0.75 ^d
USE	70.40 \pm 0.19 ^e	24.75 \pm 0.55 ^c
USE+HWE	139.37 \pm 0.57 ^b	35.48 \pm 0.79 ^b
VE	178.78 \pm 3.78 ^a	40.93 \pm 0.68 ^a

¹⁾HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction

²⁾Gallic acid (GA) was used as a standard for measuring of the total phenolics content.

³⁾Rutin (RE) was used as a standard for measuring of the total flavonoid content.

⁴⁾Each value represents the mean \pm SD(n=3). Different alphabets within a column show significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) DPPH 라디칼 소거능 활성

DPPH는 아스코르빈산 및 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다(Jeong HS 등 2009).

추출 방법별 추출물을 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같이 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 높아지는 경향을 나타냈다. 추출 방법별로는 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 좋았는데, 5, 25, 50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 각각 10.60 \pm 0.15, 34.79 \pm 0.22, 59.91 \pm 0.13, 78.34 \pm 0.22, 90.78 \pm 0.13%를 나타내었다. 감압 추출물은 3.33 \pm 0.83~88.14 \pm 0.19%, 초음파 추출물은 0.31 \pm 0.35~62.53 \pm 2.00%, 초음파와 열수 병행 추출물은 1.46 \pm 0.74~90.42 \pm 0.66%이었으며, 초임계 추출물은 0.90 \pm 0.52~5.13 \pm 0.87%로 항산화활성이 가장 낮았다. 추출 방법별 추출물의 IC₅₀ 값을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 열수 추출물의 IC₅₀ 값이 35.39 \pm 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 항산화제인 BHA, α -tocopherol의 IC₅₀ 값과 보다는 높은 값을 보였으나 다른 추출 방법보다는 가장 낮은 값을 보였다.

Jung SJ 등(2004)은 일부 약용식물 추출물에 대하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 0.1 mg/mL 농도에서 창이자의 경우 19.1%이며, 결명자, 오매 등은 0~6.7%의 라디칼 소거능을 나타냈다고 하였는데 복분자 미숙과의 추출방법별 추출물에 대한 항산화 활성은 더 낮은 농도에서도 비슷하거나 더 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. 또한 Jeon YH 등(2011)은

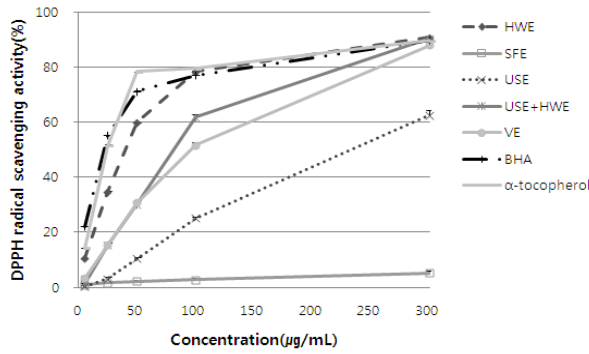


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq. HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE: ultrasonification extraction, USE+HWE: ultrasonification extraction+hot water extraction, VE: vacuum extraction. Each value represents the mean±SD(n=3).

Table 2. Comparison of IC₅₀ values of DPPH radical scavenging activity of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq.

Extraction method ¹⁾	DPPH scavenging activity(IC ₅₀ , µg/mL)
HWE	35.39±0.25 ^{d2)}
SFE	> 500 ^a
USE	208.13±5.84 ^b
USE+HWE	78.33±0.11 ^c
VE	78.39±3.66 ^c
BHA	13.19±0.21 ^f
α-Tocopherol	18.16±0.23 ^e

¹⁾HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction, USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction

²⁾Each value represents the mean±SD(n=3). Different alphabets within a column show significantly different at p<0,05 by Duncan's multiple range test.

서리태 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값이 128.46 µg/mL을 보였고 보고하였는데, 복분자 미숙과의 경우 열수 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물, 감압 추출물은 각각 35.39, 78.33, 78.39 µg/mL로 서리태 보다 뛰어난 결과를 보여 천연 항산화제 소재로 개발될 수 있을 것으로 생각되었다.

일반적으로 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거능도 높아지는 것으로 알려져 있다(Choi SY 등 2005). 그러나 본 연구에서는 감압 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물이 열수 추출물보다 총 폴리페놀의 함량은 높았으나 DPPH 라디칼 소거능은 오히려 낮았다. 이러한 결과는 폴리페놀 이외에 고온에서 추출되는 항산화 물질이 더 많이 추출되었기

때문으로 생각된다. 또한 초임계추출물의 경우 DPPH 라디칼 소거능이 낮았는데 이는 폴리페놀 이외의 다른 물질이 항산화 활성에 영향을 주는 것으로 판단되어진다.

(3) 지질과산화 억제활성

생체막 구성 지방산의 일종이며, 다양한 자연식품에 함유되어 있는 linoleic acid는 산소에 의하여 쉽게 산화되어 세포 손상을 유도하며(Seo JS 등 2008), 식품에 포함된 linoleic acid의 과산화는 영양소 파괴, 관능저하 및 변질을 유발하므로(Lee SE 등 2008) linoleic acid의 과산화억제는 다양한 분야에 적용될 수 있는 중요한 생리활성 중에 한가지이다.

다양한 추출 방법별 추출물의 지질과산화 억제 활성을 농도별로 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 실험에 사용된 모든 추출물이 농도 의존적으로 지질과산화 억제 활성이 높아지는 경향을 나타내었다. 대조군으로 사용한 BHA는 25 µg/mL 이상의 농도에서 94~95%, α-tocopherol의 경우 25 µg/mL 이상의 농도에서 84~88% 정도의 억제 활성을 보였다. 열수 추출물, 초음파 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물, 감압 추출물은 지질과산화 억제 활성이 높아 50 µg/mL 이상의 농도에서 70% 이상의 억제 활성을 나타내었으나 초임계 추출물은 10%정도의 낮은 억제 활성을 보였다.

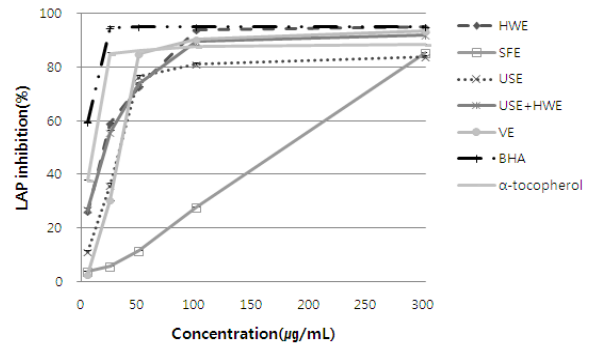


Fig. 2. Linoleic acid peroxidation(LAP) inhibition of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq. HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction. Each value represents the mean±SD(n=3).

Table 3은 추출 방법별 추출물의 지질과산화 억제 활성을 IC₅₀ 값으로 나타낸 결과이다. 열수 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물의 IC₅₀ 값은 각각 12.61±0.31, 16.52±0.35 µg/mL로 비교적 낮은 값을 보였으나 초임계 추출물, 초음파 추출물, 감압 추출물의 IC₅₀ 값은 각각 145.17±0.81, 29.59±0.56, 31.35±0.05 µg/mL으로 열수 추출물 및 초음파와 열수 병행 추출물과 비교했을 때 높게 나타났다. Woo JH 등(2010)은 추출 방법에 따른 남구절초와 코스모스 추출물의 지질과산화 억제활성을 분석한 결과 지질과산화 억제 활성이 추출방법에

따라 다르게 나타났으며, 특히 환류냉각추출한 남구절초 지상부가 처리구 중 가장 억제 활성이 우수하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 동일 식물의 시료도 추출방법에 따라 생리활성 물질의 함량 및 생리활성 정도에 차이가 있기 때문이라고 하였는데 본 연구에서도 유사한 결과를 보였다.

Table 3. Comparison of IC₅₀ values of linoleic acid peroxidation (LAP) inhibition of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq.

Extraction method ¹⁾	LAP inhibition(IC ₅₀ , µg/mL)
HWE	12.61±0.31 ^{e2)}
SFE	145.17±0.81 ^a
USE	29.59±0.56 ^c
USE+HWE	16.52±0.35 ^d
VE	31.35±0.05 ^b
BHA	4.25±0.04 ^g
α-Tocopherol	5.56±0.10 ^f

¹⁾HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction

²⁾Each value represents the mean±SD(n=3). Different alphabets within a column show significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(4) LDL 산화 억제 활성

LDL은 죽상동맥경화의 병리적 측면에서 중요한 유발인자로 쉽게 산화되어 동맥혈관이 좁아지는 역할을 하나 vitamin C, vitamin E, carotenoid(jialal I 등 1991), probucol(Thomas EC 등 1987) 등의 항산화제가 첨가되면 산화가 억제된다. 본 실험에서는 추출 방법별 추출물을 농도별로 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도를 0.5, 1, 2, 4, 8 µg/mL로 처리한 결과는 Fig. 3과 같으며, 모든 추출물이 농도 의존적으로 LDL 산화 억제 활성이 높아지는 경향을 보였다. 특히 열수 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물의 LDL 산화 억제 효과는 2 µg/mL 농도에서 65.40±3.06% 이상의 억제 활성을 나타냈으나 초임계 추출물의 경우는 1.20±0.69~7.57±1.50%로 가장 낮은 활성을 보였다. 이들의 IC₅₀ 값을 측정된 결과는 Table 4와 같았다. 열수 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물, 초음파 추출물, 감압 추출물의 IC₅₀ 값은 1.31±0.02~2.40±0.84 µg/mL 사이였으며 지질과산화 억제 활성과 같은 경향을 보였다.

Lee SE 등(2004)은 땅콩의 품종간 항산화 활성 비교에서 0.02 mL/2.2 mL 농도로 처리한 결과 땅콩의 LDL 산화 억제 효과가 85.3~91.0%로 우수하다고 보고하였는데, 복분자의 경우도 땅콩보다는 억제 효과가 조금은 낮았지만 동맥경화를 예방할 수 있는 식품 소재로 생각된다.

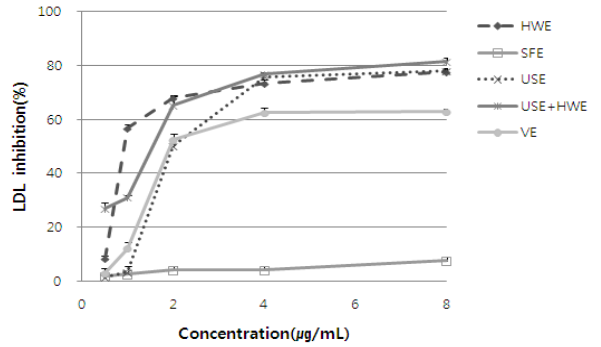


Fig. 3. LDL(low density lipoprotein) oxidation inhibition of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq. HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction. Each value represents the mean±SD(n=3).

Table 4. Comparison of IC₅₀ values of LDL oxidation inhibition of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq.

Extraction method ¹⁾	LDL oxidation inhibition (IC ₅₀ , µg/mL)
HWE	1.31±0.02 ^{e2)}
SFE	> 8 ^a
USE	2.39±0.11 ^b
USE+HWE	1.47±0.09 ^c
VE	2.40±0.84 ^b

¹⁾HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction

²⁾Each value represents the mean±SD(n=3). Different alphabets within a column show significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(5) α-Glucosidase 활성 억제 효과

α-Glucosidase는 α-amylase에 의해 분해된 당질을 최종적으로 단당류를 전환시킨다. 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연시킴으로 식후 당 농도를 제한한다(Shinde J 등 2008). 따라서 α-glucosidase 저해제는 제2형 당뇨와 같은 당질 관련 질병을 위한 치료제 개발에 유용하다(Baron AD 1998).

추출 방법별 추출물의 α-glucosidase 활성 억제 효과를 측정한 결과는 Fig 4와 같았다. 모든 추출물이 농도 의존적으로 α-glucosidase 활성을 억제하는 경향을 나타내었다. 감압 추출물과 열수 추출물은 25 µg/mL에서 각각 81.82±1.04%,

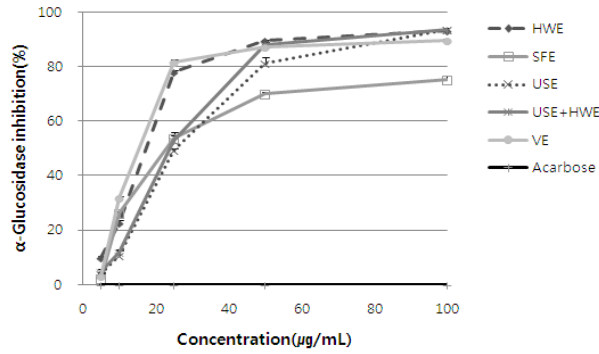


Fig. 4. α-Glucosidase inhibitory activity of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq. HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction. Each value represents the mean±SD(n=3).

Table 5. Comparison of IC₅₀ values of α-glucosidase inhibitory activity of extracts by different extraction methods from unripened fruit of *Rubus coreanus* Miq.

Extraction method ¹⁾	α-Glucosidase inhibitory activity(IC ₅₀ , µg/mL)
HWE	15.83±0.26 ^{d2)}
SFE	26.44±0.67 ^b
USE	25.53±0.87 ^b
USE+HWE	23.43±1.14 ^c
VE	14.34±0.20 ^c
Acarbose	> 5,000 ^a

¹⁾HWE : hot water extraction, SFE : supercritical fluid extraction USE : ultrasonification extraction, USE+HWE : ultrasonification extraction+hot water extraction, VE : vacuum extraction

²⁾Each value represents the mean±SD(n=3). Different alphabets within a column show significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

77.97±0.79%를 나타내었으며, 초임계 추출물, 초음파 추출물 초음파와 열수 병행 추출물은 50%정도의 억제 활성을 나타내었다. 추출방법별 추출물의 IC₅₀ 값은 Table 5와 같이 감압 추출물의 값이 14.34±0.20 µg/mL로 가장 낮은 값을 보였으며, 열수 추출물, 초음파와 열수 병행 추출물, 초음파 추출물, 초임계 추출물의 IC₅₀ 값은 각각 15.83±0.26, 23.43±1.14, 25.53±0.87, 26.44±0.67 µg/mL을 나타내었다. 양성대조구로는 시판 되는 α-glucosidase 저해제인 acarbose를 사용하였으며 5 mg/mL에서 40.0% 정도의 억제 활성을 보였다(data not shown). 이들 추출물은 acarbose 보다 좋은 효과를 보이므로 향후 기존 당뇨병 치료제를 대체할 수 있는 천연물 제제 및 기능성 식품으로 개발 가능성이 높다고 본

다. 시판되고 있는 α-glucosidase 저해제는 장기간 복용할 경우 일부 환자에 있어서 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용을 나타낼 수 있어 그 사용이 제한될 수 있다. 그러므로 부작용이 적은 천연물로부터 혈당강하제를 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 황금(Nishioka T 등 1998), 메밀(Kim JE 등 2009) 등의 추출물이 α-glucosidase 저해활성이 높다고 보고되어 있다. 본 연구에서도 복분자 추출물이 α-glucosidase 저해 활성을 보여 어떤 화합물이 저해 활성을 나타내었는지 추후 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

IV. 결 론

복분자 미숙과의 추출 방법에 따른 추출물의 생리활성을 측정된 결과는 다음과 같았다.

추출 방법별 추출물의 총 폴리페놀 함량은 감압 추출(VE) 추출물이 178.78±3.79 mg/g으로 가장 많이 함유되었으며, 초음파와 열수 병행 추출물(USE+HWE), 열수 추출물(HWE), 초임계 추출물(SFE), 초음파 추출물(USE) 순으로 함량이 낮았다. 총 플라보노이드 함량은 감압 추출물이 40.93±0.68 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 총 폴리페놀 함량도 같은 경향이었다.

추출물의 DPPH 항산화 활성, 지질과산화 억제 활성, LDL 산화 억제 활성 및 α-glucosidase 억제 활성 효과는 모두 농도 의존적으로 높아지는 경향이였다.

DPPH 라디칼 소거활성, 지질과산화 억제 활성, LDL 산화 억제 활성은 열수 추출물이 가장 좋았으며, 각각의 IC₅₀ 값은 35.39±0.25 µg/mL, 12.61±0.31 µg/mL, 1.31±0.02 µg/mL을 나타내었다. α-Glucosidase 활성 억제 효과의 경우는 감압 추출물이 가장 좋았으며, IC₅₀ 값은 14.34±0.20 µg/mL을 보였다. 본 연구 결과 복분자 미숙과를 이용한 기능성 식품소재 개발 시 열수 추출, 감압 추출 방법이 우수한 것으로 판단되었다.

V. 감사의 글

본 연구는 전북 고창군에서 시행한 2010년 지역농식품 선도클러스터육성사업 중 건강기능식품 개별인정등록사업비의 일부로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for analysis of musts and win, Wiley and Sons, New York, USA, pp 176-180
 Baron AD. 1998. Postprandial hyperglycemia and α-glucosidase inhibitors, Diabetes Res Clin Pract 40(1):51-55

- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chen JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3):178-182
- Cho JY, Kim SJ, Lee HJ, Kim JY, Lym IJ, Kang SK, Park KY, Moon JH. 2011. Isolation and identification of low molecular volatile compounds from ethyl acetate layer of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) win. *Korean J Food Sci Technol* 43(5):558-563
- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus caviara*. *Korean J Pharmacogn* 24(4):299-303
- Choi JW, Lee KT, Ha JH, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ. 2003. Antinociceptive and antiinflammatory effects of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol Pharm Bull* 26(10):1436-1441
- Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 37(4):549-556
- Inatani, R, Nakatani N, Fuwa H. 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric Biol Chem* 47(3):521-528
- Jeon YH, Won JH, Kwon JE, Kim M. 2011. Antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from *Seoritae*. *Korean J Food Cookery Sci* 27(3):1-9
- Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ. 2010. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Korean J Food Sci Technol* 42(5):571-577
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2009. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsuled water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17(2):83-89
- Jialal I, Norkus EP, Grundy SM. 1991. β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1086(1):134-138
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47(1):135-140
- Kim BN, Park HK, Kwon TB, Maeng YS. 1991. Analysis of rutin contents in buckwheat noodles. *Korean J Food Sci* 7(1):61-66
- Kim DH, Park JH, Kim JH, You JH, Kwon MC, Lee HY. 2005. Enhancement of immune activities of *Ephedrae* Herba and *Rubi fructus* at low temperature extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 13(3):81-86
- Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. 2008. Supercritical extraction of oriental herb: Anti-aging and anti-wrinkle effects. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23(6):529-534
- Kim JE, Joo SI, Seo JH and Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(8):989-995
- Kim JH, Sung NY, Kwon SK, Jung PM, Choi JI, Yoon YH, Song BS, Yoon TY, Kee HJ, Lee JW. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(2):313-318
- Kim JY, Baek SH, Kim SJ. 2011. Effect of compost fermented Korean medicinal herb waste on physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(6):839-847
- Kim KH, Lee YA, Kim JS, Lee DI, Choi YW, Kim HH, Lee MW. 2000. Antioxidative activity of tannins from *Rubus coreanus*. *Yakhak Hoechi* 44(4):354-357
- Kim YH, Kang SS. 1993. Triterpenoids from *Rubi fructus* (Bogbunja). *Arch Pharm Res* 16(2):109-113
- Lee KI, Kim SM, Kim SM, Pyo BS. 2011. Comparison of fatty acids and antibacterial activity against pathogen of acne in different parts ripened black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(3):466-469
- Lee MW. 1995. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. *Yakhak Hoeji* 39(2):200-204
- Lee SE, Park CH, Bang JK, Seong NS, Chung TY. 2004. Comparison on antioxidant potential of several peanut varieties. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(6):941-945
- Lee SE, Sung JS, Jang IB, Kim GS, Ahn TJ, Han HS, Kim JE, Kim YO, Park CB, Cha SW, Ahn YS, Park HK, Bang JK, Seong NS. 2008. Investigation on antioxidant activity in plant resources. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16(5):356-370
- Miller CP, Jirkovsky I, Hayhurst DA, Adelman SJ. 1996. In vitro antioxidant effects of estrogens with a hindered 3-OH function on the copper-induced oxidation of low density lipoprotein. *Steroids* 61(5):305-308
- Nam JH, Jung HJ, Choi JW, Lee KT, Park HJ. 2006. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits

- Rubus coreanus* in a rat model. Biol Pharm Bull 29(5):967-970
- Nishioka T, Kawabata J, Aoyama Y. 1998. Baicalein, an alpha-glucosidase inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. J Nat Prod 61(11):1413-1415
- Oh JM, Lee MS, K JJ, Lee JH, Chae SU, Kim HY, Jeon BH, Park KI, Moon SY, Cho HJ. 2011. Effect of water extract of *Rubi fructus* in RANKL-induced osteoclast differentiation. Korean J Oriental Physiol Pathol 25(4):669-673
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. 2004. Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Hams, *Ephedra sinica* Stpf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. Korean J Medicinal Crop Sci 12(4):273-278
- Park PJ., Lo SC, Han SS. 2004. Control of disease, insect pest and weed cultivation area of *Rubus coreanus* Miquel. J Life Sci Nat Res. 26:56-67
- Seo JS, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(2):129-135
- Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, Placido J, William ZS. 2008. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syagium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki(GK) rats. Carbohydr Res 343(7):1278-1281
- Thomas EC, Dawn CS, Daniel S. 1987. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Proc Natl Acad Sci 84(21):7725-7729
- Woo JH, Shin SO, Chang YD, Lee CH. 2010. Antioxidant effect according to extraction method in extracts of *Dendranthema zawadskii* var. *yezoense* and *Cosmos bipinnatus*. Korean J Hort Sci Technol 28(3):462-468
- Yoon HJ, Park SY, Oh ST, Lee KY, Yang SY. 2011. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. J Life Sci 21(1):44-55.
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH. 2002. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit. Korean J Food Sci Technol 34(5):898-904