

복분자와 오디의 항산화 특성

전현일¹ · 김영애² · 김영수^{1*}

¹전북대학교 식품공학과
²대상 FNF(주) 한국식 신선연구소

Antioxidant Activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. Fruits

Hyun-II Jun¹, Young-Ae Kim², and Young-Soo Kim^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea
²R&D Center, Daesang FNF Co., Ltd., Gyeonggi 467-813, Korea

ABSTRACT The antioxidant activities of extracts from *Rubus coreanus* Miquel (black raspberry) and *Morus alba* L. (mulberry) fruits were investigated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay, and reducing power assay. Aqueous mixtures of ethanol, methanol, and acetone were analyzed in order to determine the most effective extraction solvent for the two fruits. Black raspberry and mulberry extracts with the 60:40 acetone-water mixtures (v/v) showed the highest DPPH radical scavenging activities (56.2 and 85.2%, respectively) compared to the other extraction solvents. The 60% acetone extract was finally selected as an extraction solvent and then sequentially fractionated according to solvent polarity. Among the fractions of the two fruits, the ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity as well as total phenolic and total flavonoid contents. In addition, there were high correlation coefficients between antioxidant activities and their contents. The EC₅₀ value of the ethyl acetate fraction from mulberry fruit was 2.2 times lower than that of butylated hydroxytoluene (BHT) in DPPH assay. The major phenolic acid and anthocyanin of the two fruits were protocatechuic acid and cyanidin-3-glucoside, respectively.

Key words: black raspberry, mulberry, total phenolic, total flavonoid, antioxidant activities

서 론

최근 서양화된 식습관에 의해서 암, 당뇨, 고혈압, 심장질환, 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환 유병률이 증가되면서 이들 질병을 지연시키거나 예방하기 위한 노력이 다방면에서 진행되고 있다. 식품분야에서도 천연에 존재하는 식물체를 대상으로 생리활성을 확인하고 기능성 물질을 규명하는 많은 연구들이 수행되어왔다. 이와 같은 많은 연구 결과에 힘입어 일상적인 먹거리로 여겨지던 식물자원의 영역도 건강에 도움을 주는 건강기능성 식품으로 크게 확대되었다(1). 특히 국내 건강기능식품의 시장규모가 크게 성장하면서 식물자원의 부가가치가 높아져 생산자의 소득 증가에 도움을 줄뿐만 아니라 건강에 관심이 많은 소비자들에게도 식품소재 선택의 폭을 넓혀주고 있다(2).

복분자와 오디는 붉은 색을 띠는 국내의 대표적인 베리류 과실로 딸기보다 크기가 작아서 생식용보다는 주로 잼, 음료, 주류 등과 같은 가공제품으로 소비되어 왔다(3). 이들 과실에 함유된 페놀산, 플라보노이드, 안토시아닌 등과 같은

페놀성 화합물과 비타민 C의 생리활성이 부각되면서 소비가 지속적으로 증가하였으며, 국내 생산량 역시 복분자는 2005년 2,222톤에서 2009년 4,914톤으로, 오디는 2008년 3,244톤에서 2011년 6,752톤으로 크게 증가하였다(4,5). 최근에는 복분자 및 오디 추출물의 단순 가공제품에서 벗어나 건강기능성 식품 소재로 활용하기 위한 방안도 모색하고 있다(6,7). 이와 같은 복분자와 오디의 건강기능성 식품 소재화를 통하여 만성질환의 지연이나 예방에 도움을 줄 수 있는 페놀성 화합물을 손쉽게 섭취할 수 있을 것으로 기대된다.

복분자와 오디에 대한 연구는 그동안 꾸준히 진행되어 왔다. 복분자딸기(*Rubus coreanus* Miquel, black raspberry)의 생리활성, 복분자 에탄올 추출물의 생리활성 탐색, 복분자에 함유된 항산화 물질의 동정 및 활성(8-10), 뽕나무(*Morus alba* L., mulberry) 품종별 오디의 영양 및 기능성 성분과 이화학적 품질 특성 비교, 용매에 따른 뽕잎과 생리활성 효과, 뽕나무 오디를 이용한 cyanidin-3-glucoside 함유 천연식용색소 개발(11-13) 등이 보고되었다. 특히 국내에서 자생하는 복분자딸기와 뽕나무의 과실인 오디는 protocatechuic acid, *p*-hydrobenzoic acid, gallic acid, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside 등과 같은 수

Received 18 November 2013; Accepted 28 January 2014

*Corresponding author.

E-mail: ykim@jbn.ac.kr, Phone: +82-63-270-2569

산기를 가지고 있는 페놀성 화합물이 유지의 자동산화 억제, free radical의 소거, 금속이온의 환원 및 생체 내의 활성산소 제거 등과 같은 항산화 활성에 영향을 주는 것으로 보고되었다(8-13). 이와 같이 우리나라의 대표적인 베리류에 속하는 복분자와 오디는 천연색소 자원 및 기능성 소재로서 적합하고 특히 항산화 효과가 높은 것으로 알려져 있으나 이들은 주로 단일식물만을 대상으로 실행된 연구 결과이며 특히 항산화 활성과 페놀성 화합물의 상관성에 관한 연구는 미비한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 복분자와 오디의 건강기능성 식품 소재로서의 이용 가능성을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 복분자와 오디에 적합한 추출용매를 선정한 후에 추출물과 이들의 분획물에 대하여 항산화 활성, 페놀성 화합물 함량 및 이들의 상관성을 분석한 결과를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 방법

본 연구에 사용한 복분자(*Rubus coreanus* Miquel fruit)와 오디(*Morus alba* L. fruit)는 전북 고창지역에서 2009년에 생산된 것을 구입하여 동결건조 한 후, 이를 150 μ m로 분쇄(Single type stainless roller, Shinpoong Eng. Ltd., Gyeonggi, Korea)하여 사용하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), Folin-Ciocalteu reagent, butylated hydroxytoluene(BHT), gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydrobenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, rosmarinic acid 등과 같은 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 밖의 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

추출물 제조 및 분획

복분자와 오디의 항산화 활성 연구에 적합한 추출용매의 선정은 복분자와 오디 분말 2.5 g에 20~100%(v/v)의 ethanol, methanol 및 acetone 추출용매 250 mL를 각각 첨가하여 상온에서 12시간 교반한 후에 Whatman No. 4(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 여과하는 과정을 2회 반복하였으며, 이 여과액을 모아 500 mL로 정용하여 분석시료로 사용하였다.

복분자와 오디의 조추출물은 복분자와 오디 분말 1 kg에 60%(v/v) acetone 10 L를 첨가하여 상온에서 12시간 교반한 후에 여과(Whatman No. 4)하는 과정을 3회 실시하였다. 이 여과액을 모아서 40°C에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후에 동결건조 하였다. 복분자와 오디의 조추출물(60%, v/v, acetone extract) 수율은 각각 63.3과 71.8%(w/w)이었다. 복분자와 오디의 분획물은 동결건조 한 복분자와 오디의 조추출물 120 g에 증류수 1.2 L를 첨가하여 상온에서 12시

간 교반한 후에 *n*-hexane(1.2 L, 1시간), chloroform(1.2 L, 1시간), ethyl acetate(1.2 L, 1시간), *n*-butanol(1.2 L, 1시간)을 순차적으로 첨가하고 교반하는 과정을 3회 반복하였다. 분획된 각 용액들은 모아서 40°C에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후에 동결건조 하였다. 복분자와 오디 분획물의 수율은 복분자가 각각 1.2, 0.3, 1.4, 17.1 및 78.8%(w/w)이었고, 오디가 각각 3.3, 0.3, 0.6, 15.3 및 78.0%(w/w)이었다. 제조된 조추출물과 분획물은 -20°C에서 보관하면서 항산화 활성의 분석시료로 사용하였다.

총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀성 화합물 함량(total phenolic content)은 Dewanto 등(14)의 방법을 이용하였다. 시료액 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 5 mL를 첨가하여 1분간 반응시킨 후에 5% Na₂CO₃ 3 mL를 첨가하였다. 암소에서 1시간 동안 반응시켜 725 nm(UV-1650PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)에서 흡광도를 측정하였으며, gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 검량곡선으로 함량을 계산한 후에 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 추출물 mg당 μ g gallic acid로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량(total flavonoid content)은 Jia 등(15)의 방법을 이용하였다. 시료액 500 μ L에 5% NaNO₂ 75 μ L를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 후에 10% AlCl₃ 150 μ L를 첨가하였다. 이 용액에 1 M NaOH 0.5 mL와 증류수 275 μ L를 첨가한 후에 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, catechin을 표준물질로 사용하여 작성한 검량곡선으로 함량을 계산한 후에 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 추출물 mg당 μ g catechin으로 나타내었다.

항산화 활성 측정

DPPH assay은 Brand-Williams 등(16)의 방법을 이용하였다. 시료액 0.2 mL에 60 μ M DPPH 용액 2.8 mL를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후에 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구로는 BHT를 사용하였다. DPPH radical 소거능 및 DPPH radical의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(the half maximal effective concentration, EC₅₀, μ g/mL)는 다음의 식에 의하여 얻어진 결과를 내삽법으로 계산하여 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$\frac{(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}})}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \times 100$$

ABTS assay는 Arts 등(17)의 방법을 이용하였다. 시료액 30 μ L에 ABTS radical cation 용액 3 mL를 첨가하여 암소에서 7분간 반응시킨 후에 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로는 BHT를 사용하였다. 분석 시 사용된 ABTS radical cation 용액은 7 mM ABTS 용액에 2.45 mM potassium persulfate를 첨가한 후에 암소에서 12시간 이상 실온에서 보관하여 최종농도가 2.45 mM인 ABTS

radical cation 용액을 제조하였으며, 분석 직전에 2.45 mM ABTS radical cation 용액에 5 mM phosphate buffer saline(pH 7.4)을 첨가하여 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 희석하여 사용하였다. ABTS radical cation 소거능 및 ABTS radical cation의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(EC₅₀, µg/mL)는 다음의 식에 의하여 얻어진 결과를 내삽법으로 계산하여 나타내었다

$$\text{ABTS radical cation scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}})}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \times 100$$

Reducing power는 Oyaizu(18)의 방법을 이용하였다. 시료액 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% K₂Fe(CN)₆ 2.5 mL를 첨가하여 50°C water bath에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하여 원심분리(2,200×g, 5분) 한 후에 상등액을 취하였다. 이 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% FeCl₃ 0.5 mL를 첨가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로는 BHT를 사용하였다. Reducing power는 시료액 첨가구와 무첨가구의 흡광도의 차이로 나타내었으며, reducing power에서 반응액의 흡광도가 0.5가 되는데 필요한 시료의 농도(EC₅₀, µg/mL)는 측정된 결과를 내삽법으로 계산하여 나타내었다.

Phenolic acid와 anthocyanin 조성

Phenolic acid 조성은 Abdel-Aal와 Rabalski(19)의 방법을 이용하였다. 각 시료는 HPLC용 메탄올을 사용하여 5 mg/mL의 농도로 용해한 후에 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 시료 주입량은 20 µL, 칼럼은 supelcosil LC 18 column(25 cm×4.6 mm, 5 µm, Supelco Co., Bellefonte, PA, USA), 칼럼 온도는 25°C 및 유속은 1 mL/min이었다. 이동상은 6% formic acid(용매 A)와 acetonitrile(용매 B)이었으며, gradient program은 0~35분은 용매 A를 100%에서 82%로 감소, 35~40분은 용매 A를 82%로 유지, 40~42분은 용매 A를 82%에서 100%로 증가, 42~60분은 용매 A를 100%로 유지하게 설정하였다. 검출기는 photodiode array detector(PDA, waters 2998, Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하여 protocatechuic acid와 p-hydrobenzoic acid는 260 nm, gallic acid, vanillic acid 및 syringic acid는 270 nm, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, salicylic acid 및 rosmarinic acid는 320 nm에서 검출하였다.

Anthocyanin 조성은 Kim 등(20)의 방법을 이용하였다. 각 시료는 HPLC용 메탄올을 사용하여 5 mg/mL의 농도로 용해한 후에 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였고, HPLC system은 Futecs NSG-Series(Futecs Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하였다. 시료 주입량은 20 µL, 칼럼은 GROM-SIL 120 ODS-5 ST column(25 cm×4.6 mm, 5 µm, Futecs Co. Ltd.), 칼럼 온도는 35°C

및 유속은 1.0 mL/min이었다. 이동상은 water : acetonitrile : acetone : phosphoric acid를 81.7:8.4:8.4:1.5(v/v)로 혼합한 용매를 사용하였고, 검출기는 UV detector를 사용하여 530 nm에서 검출하였다. 표준물질은 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-glucoside 및 peonidin-3-glucoside를 사용하였다.

통계분석

각 실험은 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 SAS 통계 프로그램(ver. 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 시료간의 유의성은 P<0.05 수준에서 one way ANOVA로 분산분석한 후에 Duncan's multiple range test로 비교하였으며, 총 폴리성화합물, 총 플라보노이드, 안토시아닌 등과 같은 항산화 성분과 항산화 활성의 연관성은 Pearson 상관 분석을 이용한 단순 회귀 분석(simple regression analysis)을 실시하여 비교하였다.

결과 및 고찰

복분자와 오디의 항산화 연구를 위한 추출용매 선정

Ethanol, methanol 및 acetone에 증류수를 첨가하여 조제한 다양한 농도(20~100%)의 aqueous 용매로 추출한 총 15개의 복분자와 오디 추출액의 DPPH assay 결과는 Table 1과 같다. DPPH assay는 DPPH의 free radical이 항산화 활성을 가지고 있는 물질에게 전자를 내어주고 소거되는 산화반응을 이용하는 분석방법으로 항산화 성분이 존재하는 다양한 식물체의 항산화 활성을 탐색하는데 주로 사용된다(16). 복분자와 오디 추출액의 DPPH radical 소거능은 각각

Table 1. DPPH assay of various aqueous extraction solvents from black raspberry and mulberry fruit

| Sample ¹⁾ | Solvent concentration (% v/v) | DPPH assay (%) | | |
|----------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Ethanol | Methanol | Acetone |
| Black raspberry | 20 | 44.1±0.1 ^{d2)3)} | 42.2±0.1 ^e | 48.6±0.4 ^d |
| | 40 | 46.8±0.1 ^c | 43.2±0.2 ^d | 52.5±0.3 ^c |
| | 60 | 50.0±0.1 ^a | 48.0±0.1 ^a | 56.2±0.0 ^a |
| | 80 | 48.2±0.1 ^b | 47.6±0.0 ^b | 54.2±0.0 ^b |
| | 100 | 38.2±0.2 ^e | 45.1±0.1 ^c | 9.2±0.1 ^e |
| Mulberry | 20 | 65.9±0.4 ^d | 68.3±0.3 ^c | 72.6±0.1 ^d |
| | 40 | 72.6±0.6 ^c | 73.4±0.4 ^c | 77.9±1.1 ^c |
| | 60 | 76.0±0.6 ^a | 74.4±0.3 ^b | 85.2±1.0 ^a |
| | 80 | 74.0±0.1 ^b | 78.4±0.1 ^a | 81.9±0.6 ^b |
| | 100 | 38.3±0.7 ^e | 72.8±0.1 ^d | 9.4±0.3 ^e |

¹⁾The concentration of sample is expressed as 2.5 g of black raspberry and mulberry fruit per 250 mL of each extraction solvent.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Different superscript letters (a-e) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

9.2~56.2%와 9.4~85.2%의 범위로 다양하게 나타났으며, 그중에서도 60% acetone으로 추출한 복분자와 오디 추출액이 가장 높은 활성을 보였다. 추출용매의 농도별로는 100%의 단일용매보다 단일용매에 증류수를 첨가한 60%와 80%의 농도에서, 추출용매별로는 acetone 용매에서 강한 항산화 활성을 보였으며, 복분자 추출액보다 오디 추출액의 DPPH radical 소거능이 높았음을 확인하였다. 이러한 결과는 추출용매의 농도별 DPPH assay에서 복분자 75% ethanol 추출물이 복분자 100% ethanol 추출물보다 1.1배 강한 활성을, 오디 50% ethanol 추출물이 오디 100% ethanol 추출물보다 1.9배 강한 활성을 보였다는 결과와 유사하였다(9,12). 또한 추출용매별 DPPH assay에서도 복분자 75% acetone 추출물이 복분자 80% methanol 추출물보다 강한 활성을 보여 동일한 시료일지라도 추출용매에 따라 항산화 활성에 차이를 보인다는 결과와도 유사하였다(8,21). 이런 현상은 식물자원에 존재하는 다양한 항산화 물질이 추출에 사용된 용매의 극성에 의해서 용해되는 정도가 다르기 때문으로 알려져 있다(22). 따라서 다른 추출용매보다 DPPH radical 소거능이 우수한 항산화 물질을 많이 함유하고 있는 것으로 판단되는 60% acetone을 복분자와 오디의 항산화 활성 연구를 위한 가장 적합한 추출용매로 선정하였다.

복분자와 오디의 항산화 활성 비교

복분자와 오디 60% acetone 추출물과 이들의 분획물을 대상으로 DPPH assay, ABTS assay 및 reducing power의 항산화 활성을 EC₅₀ 값으로 산출한 결과는 Table 2와 같다. 식물체 내에는 다양한 항산화 성분들이 함유되어 있으며, 이들의 특성에 따라 다른 항산화 활성을 나타낼 수 있기 때문에 항산화 활성을 정확하게 검증하기 위해서는 다양한

방법을 사용하여 측정해야 한다(23). 따라서 세 가지의 다른 항산화 활성 측정방법을 사용하여 항산화 활성을 측정한 결과, 복분자와 오디 60% acetone 추출물은 시료의 농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하는 농도 의존적인 특성을 보였으나(data not shown), 복분자 60% acetone 추출물이 오디 60% acetone 추출물보다 DPPH assay는 1.7배, ABTS assay는 1.1배, reducing power는 1.2배 높은 EC₅₀ 값을 나타내어 용매 선정과 유사한 경향을 보였다. 항산화 활성별로는 대조구로 사용된 BHT가 117.5~152.7 µg/mL의 범위에서 EC₅₀ 값을 나타내었으나 복분자와 오디 60% acetone 추출물의 EC₅₀ 값은 각각 813.4~1,422.1 µg/mL와 481.9~1,349.8 µg/mL로 대조구에 비해 낮은 항산화 활성을 나타내었다.

복분자 분획물별 EC₅₀ 값은 DPPH assay에서 water > *n*-butanol > chloroform > *n*-hexane > ethyl acetate 분획물 순으로, ABTS assay와 reducing power에서 water > chloroform > *n*-hexane > *n*-butanol > ethyl acetate 분획물 순으로 감소하였다. 반면에 오디 분획물별 EC₅₀ 값은 세 가지 항산화 활성에서 *n*-hexane > water > chloroform > *n*-butanol > ethyl acetate 분획물 순으로 감소하여 시료와 분획물별로 항산화 활성이 달라지는 것으로 나타났으나, 가장 강한 항산화 활성은 복분자와 오디 모두 ethyl acetate 분획물로 나타났다. 이는 유기용매를 사용하여 얻은 식물체의 조추출물을 극성용매로 분획하는 경우에 분획물의 항산화 활성은 페놀성 화합물의 용해가 잘 일어나는 ethyl acetate 분획물에서 가장 높게 나타난다는 결과와 유사하였다(24,25). 특히 오디 ethyl acetate 분획물은 DPPH assay와 reducing power에서 대조구로 사용된 BHT보다 각각 2.2와 1.2배 낮은 EC₅₀ 값을 보여 가장 강한 항산화 활성을 갖는

Table 2. EC₅₀ values of various extracts from black raspberry and mulberry fruit

| Sample | EC ₅₀ value ²⁾ (µg/mL) of antioxidant activity | | | |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | DPPH assay | ABTS assay | Reducing power | |
| Comparison ¹⁾ | 144.6±2.4 ³⁾ | 152.7±2.5 | 117.5±1.0 | |
| Black raspberry | 60% acetone extract | | | |
| | Fractions | 813.4±22.4 ⁴⁾ | 1,422.1±3.8 ^b | 870.6±5.7 ^b |
| | <i>n</i> -Hexane | 251.4±7.2 ^c | 966.1±21.0 ^d | 465.3±1.5 ^d |
| | Chloroform | 322.1±6.3 ^d | 1,097.2±18.4 ^c | 566.7±13.6 ^c |
| | Ethyl acetate | 166.2±2.9 ^f | 339.4±1.4 ^f | 176.5±0.2 ^f |
| | <i>n</i> -Butanol | 333.9±1.4 ^c | 666.7±10.9 ^e | 400.2±5.2 ^e |
| Mulberry | 60% acetone extract | | | |
| | Fractions | 481.9±5.9 ^d | 1,349.8±7.7 ^d | 745.9±5.2 ^d |
| | <i>n</i> -Hexane | 3,984.3±18.9 ^a | 7,462.6±34.2 ^a | 4,962.0±26.3 ^a |
| | Chloroform | 694.9±4.2 ^c | 1,692.0±5.0 ^c | 866.3±9.3 ^c |
| | Ethyl acetate | 64.9±1.5 ^f | 210.7±0.6 ^f | 101.9±1.4 ^f |
| | <i>n</i> -Butanol | 430.0±8.1 ^e | 846.0±6.5 ^c | 591.0±3.3 ^e |
| Water | 1,711.9±4.4 ^b | 3,955.6±26.7 ^b | 1,719.0±8.7 ^b | |

¹⁾Comparison is butylated hydroxytoluene (BHT).

²⁾EC₅₀ values are expressed as the effective concentration at which antioxidant activity using DPPH or ABTS cation radicals were scavenged by 50%; absorbance was 0.5 for reducing power.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different superscript letters (a-f) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

것으로 나타났다. 한편 복분자와 오디의 항산화 활성이 항산화 측정방법뿐만 아니라 시료 및 분획물별로 다른 결과를 보이는 이유를 알아보기 위해서는 이들 과실에 함유되어 있는 항산화 성분 분석이 필요하다고 판단된다.

복분자와 오디의 항산화 성분 및 이들의 상관성 비교

복분자와 오디의 60% acetone 추출물과 이들의 분획물을 대상으로 총 페놀성 화합물, 총 플라보노이드 및 안토시아닌 함량을 측정하고 이들이 항산화 활성에 미치는 영향을 단순 회귀 분석을 통하여 분석한 상관성의 결과는 Table 3 및 4와 같다. 복분자 60% acetone 추출물은 오디 60% acetone 추출물에 비해 안토시아닌 함량이 많았으나 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량이 적었다. 결과적으로 이들의 총 함량은 오디 60% acetone 추출물(77.9 µg/mg)

이 복분자 60% acetone 추출물(55.1 µg/mg)보다 1.4배 높게 나타났다. 이는 0~100%의 ethanol 농도별 복분자 추출물의 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량이 각각 48.8~67.1 µg/mg과 18.3~23.9 µg/mg, 오디 품종별 80% ethanol 추출물의 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량이 각각 9.9~22.5 µg/mg과 1.3~3.4 µg/mg이라는 기존의 결과와 비교하면, 복분자 60% acetone 추출물은 총 페놀성 화합물의 함량은 낮지만 총 플라보노이드 함량은 높게 나타났으며, 오디 60% acetone 추출물은 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량이 모두 높게 나타났다(9,11). 오디 60% acetone 추출물의 안토시아닌 함량 또한 기존에 보고된 오디 100% ethanol 추출물의 안토시아닌 함량(0.5 µg/mg)에 비해 약간 높은 함량을 나타내었다(13).

복분자 분획물별 항산화 성분의 함량은 총 페놀성 화합물

Table 3. Total phenolic, total flavonoid, and anthocyanin contents of various extracts from black raspberry and mulberry fruit

| Sample | | Total phenolic content ¹⁾ (µg/mg) | Total flavonoid content ²⁾ (µg/mg) | Anthocyanin content (µg/mg) | |
|-----------------|---------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Black raspberry | 60% acetone extract | 24.4±1.4 ^{e3)4)} | 29.9±0.5 ^e | 0.8±0.0 ^b | |
| | Fractions | <i>n</i> -Hexane | 57.2±0.8 ^c | 48.7±0.3 ^c | 0.1±0.0 ^e |
| | | Chloroform | 50.3±4.2 ^d | 37.6±0.2 ^d | ND ⁵⁾ |
| | | Ethyl acetate | 243.3±2.8 ^a | 140.3±2.6 ^a | 0.6±0.0 ^c |
| | | <i>n</i> -Butanol | 83.6±4.2 ^b | 64.2±0.1 ^b | 1.8±0.1 ^a |
| | | Water | 11.4±1.4 ^f | 18.2±0.2 ^f | 0.3±0.0 ^d |
| Mulberry | 60% acetone extract | 41.8±2.1 ^c | 35.5±0.2 ^c | 0.6±0.0 ^b | |
| | Fractions | <i>n</i> -Hexane | 11.3±0.6 ^f | 10.6±0.1 ^f | ND |
| | | Chloroform | 34.2±1.4 ^d | 30.6±0.2 ^d | ND |
| | | Ethyl acetate | 373.9±1.5 ^a | 256.8±1.1 ^a | 1.5±0.0 ^a |
| | | <i>n</i> -Butanol | 64.0±0.7 ^b | 57.3±0.5 ^b | 0.7±0.1 ^b |
| | | Water | 22.0±0.4 ^e | 14.8±0.1 ^e | 0.6±0.0 ^b |

¹⁾Total phenolic content expresses as µg gallic acid equivalent per mg of extract and fraction.

²⁾Total flavonoid content expresses as µg catechin equivalent per mg of extract and fraction.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different superscript letters (a-f) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

⁵⁾ND is an abbreviation for not detected.

Table 4. Correlations coefficient between each antioxidant component content and each antioxidant activity for various extracts from black raspberry and mulberry fruit

| Sample | Regression analysis ¹⁾ at an extract concentration of 100 µg/mL | | | | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | DPPH assay | ABTS assay | Reducing power | | |
| Black raspberry | 60% acetone extract | Y=0.146X ₁ +5.725, R=0.95 | Y=0.191X ₁ +12.961, R=0.99 | Y=0.004X ₁ +0.161, R=0.99 | |
| | Fractions | <i>n</i> -Hexane | Y=0.287X ₂ +1.002, R=0.96 | Y=0.369X ₂ +7.083, R=0.99 | Y=0.007X ₂ +0.045, R=1 |
| | | Chloroform | | | |
| | | Ethyl acetate | Y=9.211X ₃ +11.668, R=0.46 | Y=7.070X ₃ +23.673, R=0.29 | Y=0.077X ₃ +0.412, R=0.16 |
| | | <i>n</i> -Butanol | | | |
| Mulberry | 60% acetone extract | Y=0.154X ₁ +4.804, R=0.97 | Y=0.063X ₁ +2.988, R=0.84 | Y=0.001X ₁ -0.019, R=1 | |
| | Fractions | <i>n</i> -Hexane | Y=0.231X ₂ +3.253, R=0.98 | Y=0.095X ₂ +2.246, R=0.86 | Y=0.007X ₂ -0.045, R=1 |
| | | Chloroform | | | |
| | | Ethyl acetate | Y=35.390X ₃ -1.216, R=0.89 | Y=15.663X ₃ -0.176, R=0.83 | Y=0.290X ₃ -0.049, R=0.86 |
| | | <i>n</i> -Butanol | | | |
| Water | | | | | |

¹⁾X₁, X₂, X₃, Y, and R are total phenolic content, total flavonoid content, anthocyanin content, each antioxidant activity, and correlation coefficient, respectively.

과 총 플라보노이드의 경우 ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물보다 각각 10.0과 4.7배, 안토시아닌의 경우 *n*-butanol 분획물이 2.3배 높게 나타났다. 반면에 오디 분획물에서는 총 페놀성 화합물, 총 플라보노이드 및 안토시아닌 함량의 경우 ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물보다 각각 8.9, 7.2 및 2.5배 높게 나타났다. 한편 복분자와 오디의 분획물 중 chloroform 분획물에서는 안토시아닌이 검출되지 않았는데 이는 수용성이 강한 안토시아닌의 특성이 반영된 것으로 판단된다.

과일과 채소와 같은 식물체에 함유된 페놀성 화합물의 함량은 radical의 소거 및 산화를 촉진하고 금속이온을 환원시키는 활성과 밀접한 상관성을 가지고 있다고 알려져 있다 (25-27). 따라서 복분자와 오디의 추출물과 이들의 분획물을 대상으로 측정된 항산화 성분과 시료의 농도(100 µg/mL)에서 측정된 항산화 활성을 기준으로 상관성을 확인한 결과(Table 4), 복분자와 오디의 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량과 각 항산화 활성의 상관계수(correlation coefficient, R)는 각각 0.84~1과 0.86~1로 높은 상관성을 나타내었다. 반면에 안토시아닌 함량과 각 항산화 활성의 R은 복분자에서는 0.16~0.46의 낮은 상관성을, 오디에서는 0.83~0.89의 높은 상관성을 보였다. 복분자에서의 낮은 R은 오디와 달리 가장 낮은 EC₅₀ 값을 나타낸 ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물뿐만 아니라 *n*-butanol 분획물보다도 안토시아닌 함량이 낮았기 때문으로 판단된다.

복분자와 오디의 phenolic acid와 안토시아닌 조성 비교

복분자와 오디의 60% acetone 추출물과 ethyl acetate 분획물에서 phenolic acid와 안토시아닌 조성을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 복분자의 경우 60% acetone 추출물과 ethyl acetate 분획물에서 protocatechuic acid, *p*-hydrobenzoic acid 및 salicylic acid가 주된 phenolic acid이었으며, 이들의 함량은 ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물보다 각각 4.9, 3.4 및 1.8배 높았다. 오디의 경우도 protocatechuic acid > *p*-hydrobenzoic acid > salicylic acid 순으로 phenolic acid를 함유하였으며, ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물보다 각각 4.1, 2.5 및 31.2배 높은 함량을 나타내었다. 또한 복분자와 오디의 60% acetone 추출물과 ethyl acetate 분획물에서 vanillic acid, syringic acid 및 ferulic acid 등의 phenolic acid는 소량 검출되었으나 gallic acid, *p*-coumaric acid 및 rosmarinic acid는 검출되지 않는 경우도 있었다. 이러한 결과는 복분자 60% ethanol 추출물과 복분자 착즙액의 ethyl acetate 분획물의 주된 phenolic acid는 protocatechuic acid이며 *p*-hydrobenzoic acid, gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, coumaric acid, rosmarinic acid가 검출되었고, 오디 80% methanol 추출물의 주된 phenolic acid인 protocatechuic acid와 *p*-hydrobenzoic acid 이외에도 gallic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, syringic acid,

Table 5. Parameters of standard calibration curves for phenolic acid and anthocyanin and their composition for 60% acetone extract and ethyl acetate fraction from black raspberry and mulberry fruit

| Composition | Standards | | | Black raspberry (mg/100 g) | | Mulberry (mg/100 g) | |
|---------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| | Retention time (min) | Linearity range (mg/mL) | Equation ¹⁾ | 60% acetone extract | Ethyl acetate fraction | 60% acetone extract | Ethyl acetate fraction |
| Phenolic acid | Gallic acid | 3.41 | | ND ²⁾ | 0.2±0.0 ^b | ND | 0.9±0.2 ^c |
| | Protocatechuic acid | 10.25 | | Y=19,928X+80,049 | 28.4±0.0 ^{a3)4)} | 36.4±0.2 ^a | 148.3±2.2 ^a |
| | <i>p</i> -Hydrobenzoic acid | 15.80 | | Y=45,358X-1,014,183 | 10.6±0.9 ^b | 14.4±0.2 ^b | 36.7±0.3 ^b |
| | Vanillic acid | 22.35 | | Y=32,256X+3,177,047 | 0.6±0.0 ^c | 0.4±0.0 ^f | 2.0±0.1 ^f |
| | Syringic acid | 25.68 | 0.05 ~ 1.0 | Y=49,308X+10,206 | 0.4±0.0 ^c | 1.8±0.2 ^f | 0.5±0.0 ^g |
| | <i>p</i> -Coumaric acid | 29.34 | | Y=50,006X-53,624 | 0.1±0.0 ^g | 5.2±0.2 ^d | 1.1±0.1 ^g |
| | Ferulic acid | 32.74 | | Y=73,623X+55,360 | 0.8±0.0 ^d | 4.7±0.1 ^e | 3.5±0.1 ^e |
| | Salicylic acid | 41.28 | | Y=82,087X+39,787 | 6.6±0.2 ^e | 1.9±0.0 ^f | 4.0±0.1 ^c |
| | Rosmarinic acid | 45.74 | | Y=83,338X+24,571 | ND | 12.1±0.0 ^c | 28.1±0.6 ^c |
| | | | | Y=32,522X+27,724 | 0.99 | 0.6±0.0 ^g | ND |
| Anthocyanin | Cyanidin-3-glucoside | 9.36 | | Y=9,095X-507,111 | 1 | 61.7±1.8 ^a | 121.6±4.7 ^a |
| | Cyanidin-3-rutinoside | 8.44 | | Y=16,735X-453,607 | 0.99 | 12.2±0.8 ^b | 31.4±0.1 ^c |
| | Pelargonidin-3-glucoside | 10.94 | 0.1 ~ 0.4 | Y=1,935X+60,491 | 0.99 | 4.8±0.2 ^c | ND |
| | Peonidin-3-glucoside | 12.93 | | Y=22,888X-989,329 | 1 | 3.2±0.5 ^b | ND |

¹⁾X and Y are standard and area of standard, respectively.

²⁾ND is an abbreviation for not detected.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different superscript letters (a-h) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

coumaric acid, ferulic acid가 검출되었다는 기존의 연구 결과와 유사한 경향을 보였다(10,28,29).

복분자의 주된 안토시아닌은 60% acetone 추출물과 ethyl acetate 분획물에서 cyanidin-3-glucoside이었으며, 그 함량은 60% acetone 추출물이 ethyl acetate 분획물보다 2.8 mg/100 g 높았다. 반면에 오디의 주된 안토시아닌은 60% acetone 추출물과 ethyl acetate 분획물에서 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside이었으며, 이들의 함량은 ethyl acetate 분획물이 60% acetone 추출물보다 각각 3.3과 1.4배 높았다. 그러나 peonidin-3-glucoside는 총 4개의 시료 모두에서 검출되지 않았다. 특히 오디 품종의 주된 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside이며 그 함량은 각각 223.2~788.3 mg/100 g과 94.6~407.1 mg/100 g이라고 보고한 기존의 결과와 비교해 볼 때, 본 연구의 안토시아닌 조성은 유사하였으나 그 함량은 적게 나타났는데 이는 원시료와 추출물의 차이로 판단된다(11).

요 약

다양한 추출용매를 사용하여 얻은 복분자와 오디의 추출용액 중에서 가장 높은 항산화 활성을 보인 60% acetone과 이들의 분획물을 대상으로 측정된 항산화 활성에서 시료별로는 오디, 분획별로는 ethyl acetate 분획의 EC₅₀ 값이 낮게 나타났다. 복분자와 오디의 항산화 성분 중 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량이 안토시아닌 함량에 비해 매우 높게 나타났다. 항산화 성분과 항산화 활성의 상관성은 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드에서는 높은 상관성을 나타냈으나 안토시아닌에서는 오디에서만 높은 상관성을 나타내었다. 복분자와 오디의 주된 phenolic acid는 protocatechuic acid, *p*-hydrobenzoic acid 및 salicylic acid이었으며 주된 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside이었다. 위의 결과들을 종합해보면 복분자와 오디의 항산화 성분은 추출에 사용된 용매의 종류에 따라 함량 및 조성이 변화하며 그 결과로서 항산화 활성에 영향을 주게 됨을 확인할 수 있었다. 또한 오디 ethyl acetate 분획물은 DPPH assay와 reducing power에서 BHT보다 각각 2.2와 1.2배 낮은 EC₅₀ 값을 보여 천연 항산화 소재로서의 가능성을 보였다.

REFERENCES

- Lee HY. 2013. Approval of functional ingredient of health/functional foods in Korea. *Food Industry and Nutrition* 18: 1-7.
- Hur SJ, Lee SK, Kim YC, Choi IW. 2012. Development of *in vitro* human digestion models for health functional food research. *Food Sci Ind* 45: 40-49.
- Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim YS, Shin DH. 2006. Alcoholic fermentation of *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *Korean J Food Sci Technol* 38: 543-547.
- Lee Y, Kim JC, Hwang KT, Kim DH, Jung CM. 2013. Quality characteristics of black raspberry wine fermented with different yeasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 784-791.
- Park JH, Choi JH, Hong SI, Jeong MC, Kim D. 2013. Changes in quality of mulberry depending on distribution and storage temperature. *Korean J Food Preserv* 20: 141-150.
- 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-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 83-89.
- Park HM, Yang SJ, Kang EJ, Lee DH, Kim DI, Hong JH. 2012. Quality characteristics and granule manufacture of mulberry and blueberry fruit extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 28: 375-382.
- Cha HS, Park MS, Park KM. 2001. Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Food Sci Technol* 33: 409-415.
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR, Song JY. 2011. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19: 325-333.
- 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 Technol* 34: 898-904.
- Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberries from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1467-1475.
- Ju MJ, Kwon JH, Kim HK. 2009. Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 16: 442-448.
- Kim HB, Kim SL, Koh SH, Seok YS, Kim YS, Sung GB, Kang PD. 2011. The development of natural pigment with mulberry fruit as a food additive. *Korean J Crop Sci* 56: 18-22.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
- Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25-30.
- Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 42: 45-49.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
- Abdel-Aal ESM, Rabalski I. 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agric J* 2: 7-14.
- Kim SL, Hwang JJ, Song J, Song JC, Jung KH. 2000. Extraction, purification, and quantification of anthocyanins in colored rice, black soybean, and black waxy corn. *Korean J Breed* 32: 146-152.
- Jun HI, Song GS, Yang EI, Youn Y, Kim YS. 2012. Antioxidant activities and phenolic compounds of pigmented rice

- bran extracts. *J Food Sci* 77: C759-C764.
22. Naczki M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054: 95-111.
23. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72: 145-171.
24. Hong EY, Park KH, Kim GH. 2011. Phenolic-enriched fractions from *Perilla frutescens* var. *acuta*: determination rosmarinic acid and antioxidant activity. *J Food Biochem* 35: 1637-1645.
25. Cha MN, Jun HI, Lee WJ, Kim MJ, Kim MK, Kim YS. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) fruit. *Food Sci Biotechnol* 22: 523-529.
26. Kalt W. 2005. Effect of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci* 70: R11-R19.
27. Jacobo-Velázquez DA, Cisneros-Zevallos L. 2009. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J Food Sci* 74: R107-R113.
28. Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of *Bokbunja* (*Rubus coreanum* F.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 790-796.
29. Memon AA, Memon N, Luthria DL, Bhangar MI, Pitafi AA. 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Pol J Food Nutr Sci* 60: 25-32.