

초음파 처리에 의한 검정라즈베리 부위별 에탄올 추출물의 산화방지 활성

김기안 · 권지웅 · 김용석¹ · 박필재² · 채규서*

베리&바이오식품연구소, ¹전북대학교 농업생명과학대학 식품공학과, ²고창군 농업기술센터

Antioxidant Activities of Ethanol Extracts from Different Parts of the Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) Obtained Using Ultra-sonication

Ki An Kim, Ji Wung Kwon, Yong-Suk Kim¹, Pill Jae Park², and Kyu Seo Chae*

Berry&Biofood Research Institute

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

²Gochang Agriculture Technology Center

Abstract This study was carried out to investigate the antioxidant effects of different parts (stems, leaves, and seeds) of the black raspberry for utilization as food materials. Different parts of the black raspberry were subjected to extraction via ultra-sonication extraction methods using water and ethanol at various concentrations (25, 50, 75, and 100%). Antioxidant capability of the extracts were determined by amounts of phenolic compounds, with flavonoid contents, radical scavenging activity, and reducing power. Irrespectively of ethanol concentration, extracts of stem showed the highest total phenolic compounds and antioxidant activities among different parts of black raspberry. The total phenolic compounds extracted from the black raspberry stem using 25 and 50% ethanol showed 348.21±5.40 and 343.39±5.94 mg/g, respectively. Fifty percent ethanol extracts of the black raspberry stem showed the highest DPPH (EC₅₀ value: 60.89 µg/mL) and ABTS radical scavenging activities (EC₅₀ value: 82.57 µg/mL). Further, 25% ethanol extracts of the black raspberry stem (0.263±0.004) was found to have the highest reducing power. The highest antioxidant activity of black raspberry stem indicates that black raspberry stem may be useful source for functional food.

Keywords: Antioxidant activities, Ultra-sonication, Black raspberry (*Rubus occidentalis*)

서 론

식물은 페놀산(phenolic acid), 플라보노이드(flavonoids), 안토시아닌(anthocyanins), 탄닌(tannins), 리그닌(lignin), 카테킨(catechin) 등의 산화방지 물질을 나무, 줄기, 잎, 열매, 뿌리, 씨앗 등의 모든 부분에 다량 함유하고 있고(1), 이들 성분들을 통해 산화적 스트레스를 유발시키는 자유라디칼(free radical)의 생성을 지연시키거나 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(2,3). 산화적 스트레스를 유발시키는 자유라디칼은 수많은 화합물의 화학적 반응 및 여러 가지 산화, 환원 반응 등 내적 요인과 흡연, 음주, 스트레스, 대기오염 등 외적요인에 의해 생성되며, 생체 내에서 free 라디칼 반응에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 DNA 분절과 단백질의 불활성화 및 과산화 반응을 일으켜 생체기능을 저하시킴으로서 여러 질환을 유발하는 원인이 된다(4-6). 체내에서 생성되는 활성산소종은 세포내 산화방지 효소에 의해 조절되거나 식품으로부터 섭취되는 산화방지성분(비타민

및 폴리페놀성분)에 의해 소거되는 것으로 알려져 있다(7). 현재 우리나라에서 일반적으로 재배되고 있는 복분자는 검정라즈베리(*Rubus occidentalis*)로 복미가 원산지이며 줄기에 가시가 있는 것이 특징이고, 가지에는 3개의 잎이 자라고 꽃의 색은 흰색으로 국내 재래종 복분자(*Rubus coreanus* Miq.)의 5개의 잎과 분홍색의 꽃과 차이를 보인다(8,9). 검정라즈베리의 주요 안토시아닌은 사이아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside), 사이아니딘-3-루티노사이드(cyanidin-3-rutinoside), 사이아니딘-3-삼부바이오사이드(cyanidin-3-sambubioside), 사이아니딘-3-자일로실루티노사이드(cyanidin-3-xylosylrutinoside) 등이 알려져 있고(10), 엘라그산(ellagic acid)과 각종 안토시아닌 등이 풍부하여 천연 산화방지제로도 유용한 것으로 알려져 있다(11). 최근에는 검정라즈베리 열매, 잎, 줄기 추출물의 콜레스테롤 및 혈압 개선 효과(12), 산화방지 활성 및 식도암에 효과가 있다고 보고되어있다(13,14). 또한 최근에는 인삼의 부위별 산화방지 활성(15), 오가피 부위별 열수 추출액의 기능적 특성(16), 비파 부위별 용매추출물의 항균 및 산화방지 활성(17), 부위별 산뽕나무의 광보호 효과 및 산화방지 활성(18) 등 과실에만 한정되어지지 않고 각 부위를 천연 보존료 개발 및 새로운 기능성 식품의 소재로서 활용하기 위한 목적으로 산화방지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 부산물로 여겨지는 검정라즈베리 줄기, 잎 및 씨를 에탄올 농도별로 초음파 추출하고, 산화방지 활성을 비교분석하여 산화방지 활성을 가지는 천연소재로서의 이용가능성을 알아보고자 진행하였다.

*Corresponding author: Kyu Seo Chae, Berry&Biofood Research Institute, Gochang, Jeonbuk 56416, Korea
Tel: 82-63-560-5192
Fax: 82-63-563-6680
E-mail: 01088346256@naver.com
Received April 28, 2015; revised June 18, 2015;
accepted June 24, 2015

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용한 검정라즈베리 줄기와 잎은 2012년 5월초 전북 고창군 부안면 북분자시험장에서 채취한 것으로, 수세 후 60°C에서 3일 동안 열풍 건조하고 분쇄하여 -40°C에서 냉동 보관하여 사용하였다. 검정라즈베리 씨는 2012년 6월에 전라북도 고창군 선운산농협에서 구매한 검정라즈베리 열매를 씨분리기를 이용하여 분리한 것을 시료로 사용하였다. 실험에 사용한 추출용매인 에탄올은 Samchun Chemicals사(Seoul, Korea)에서, 폴린-시오칼토시약(folin-Ciocalteu's reagent), 뷰틸하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 다이에틸렌글리콜(diethylene glycol), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid), 갈산(gallic acid), 엘라그산(ellagic acid), 카페인(caffeic acid), 루테올린(luteolin), 퀘르세틴(querctetin), 레스베라트롤(resveratrol), 파라쿠마린산(*p*-coumaric acid), 탄닌(tannin) 등은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출물 제조

산화방지 활성 측정을 위한 검정라즈베리 부산물인 줄기, 잎 및 씨의 추출물 제조는 Kwon 등(19)의 방법을 응용하였다. 즉 검정라즈베리의 줄기, 잎 및 씨 건조분말 1 kg을 정량하여 물 및 25, 50, 75, 100%의 에탄올 10배수를 첨가하여 초음파 추출기 (Sonic Medical Plus up, MIRCO, Inchon, Korea)로 40 kHz에서 2시간 2회 반복 추출하였다. 추출하여 얻은 여액을 거름종이 (Whatman No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하고 감압농축기(Buchi R210, Buchi Co., Flawil, Switzerland)로 농축 후 동결 건조하여 -70°C 초저온냉동고(CLN-71UWM, NIHON, Japan)에서 보관하여 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량측정은 Amerine과 Ough(20)의 방법을 응용하여 측정하였다. 에탄올 농도별로 제조한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물을 100 µg/mL 농도로 제조한 용액에 폴린-시오칼토시약 1 mL를 가하고 3분간 반응시킨 다음 10% 탄산소듐(Na₂CO₃) 1 mL를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 UV/VIS 분광광도계(UV-2450, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 700 nm에서 비색정량 하였다. 이때 갈산(Sigma-Aldrich)을 표준물질로 사용하여 보정곡선을 작성하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

페놀성 화합물 분석

검정라즈베리 부위별 추출물의 페놀화합물(phenolic compounds) 함량을 분석하기 위하여 10개의 표준품을 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 LC/MS를 이용 Table 1 및 2의 조건으로 함량 분석을 하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Chang 등(21)의 방법을 응용하여 측정하였다. 에탄올 농도별로 제조한 검정라즈베리 초음파 추출물을 200 µg/mL 농도로 제조한 용액에 다이에틸렌글리콜 2 mL, 1 N-수산화소듐(NaOH) 0.02 mL를 가한 다음 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS 분광광도계(UV-2450, Shimadzu Co.)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 루틴(Sigma-Aldrich)을 표준물질로 사용하여 보

Table 1. HPLC conditions for phenolic compounds analysis

Items	Conditions		
System	Finnigan TSQ Quantum Ultra EMR		
Column	Zorbax Extend-C ₁₈ (2.1×150 mm, 5 µm)		
Column temperature	Room temperature		
Flow rate	200 µL/min		
Injection	10 µL		
Gradient condition	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	90.0	10.0
	10.0	10.0	90.0
	13.0	10.0	90.0
	14.0	90.0	10.0
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid in water		
	B: 0.1% acetic acid in acetonitrile		

Table 2. Mass spectrometer conditions for phenolic compounds analysis

Items	Conditions			
Ion source type	ESI			
Spray voltage	3000			
Sheath gas pressure	40			
Aux gas pressure	10			
Capillary temperature	300°C			
SRM	Compound names	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	CE
	Ferulic acid	163.00	119.12	17
	Coumaric acid	169.00	125.06	16
	Caffeic acid	179.00	135.07	18
	Rutin	193.00	134.07	19
	Quercetin	609.00	299.95	32
	Luteolin	227.00	184.95	20
	Keampferol	285.00	133.07	37
	Myricetin	285.00	186.95	31
	Gallic acid	301.00	150.98	24
Ellagic acid	317.00	178.94	21	
Resveratrol	301.00	228.95	20	

정곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

검정라즈베리 부위별 추출물의 산화방지 활성을 측정하기 위하여 자유라디칼인 DPPH를 사용한 산화방지 활성 측정법(22)을 응용하였다. 10, 50, 100, 200, 500 µg/mL 농도로 조제한 검정라즈베리 부위별 추출물 100 µL에 에탄올 200 µL를 가하고 2×10⁻⁴ M DPPH용액 300 µL를 가한 후 교반기로 교반하였고, 실온에서 30분간 반응시키고 microplate reader (Synergy HT, Biotec, Washington DC, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 에탄올을 첨가하여 실험 하였으며, 양성대조구는 BHA를 사용하여 활성을 비교하였다.

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

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성은 Art 등(23)의 방법을 응용하였다. 0, 50, 100, 200, 500 µg/mL 농도로 조제한 검정라즈베리 부위별 추출물 5 µL에 ABTS 라디칼 용액 195 µL를 첨가하여 7분간 반응시킨 후 microplate reader (Synergy HT, Biotec)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 시료 대신에 에탄올을 첨가하여 실험 하였으며, 양성대조구는 BHA를 사용하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

환원력

환원력은 Oyaizu(24)의 방법을 이용하여 측정하였다. 100 µg/mL 농도로 조제한 검정라즈베리 부위별 추출물 100 µL에 0.2 M 인산완충용액(pH 6.6, 2.5 mL)와 1% K₂Fe (CN)₆ 250 µL를 첨가하고 물중탕(50°C, 20분)에서 반응시켰다. 반응액에 10% 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid) 250 µL를 첨가하여 원심분리(3,000×g, 5분)한 후 상등액 250 µL를 취한 후 증류수 250 µL와 0.1% FeCl₃ 50 µL를 첨가하여 700 nm (Synergy HT, Biotec)에서 측정하였으며, 양성대조구는 BHA를 사용하였다.

통계 분석

실험에서 얻어진 결과 값은 SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 통계처리를 하였고, 던컨시험(Duncan's multiple range test)에 의해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 수율

검정라즈베리 부위별 최적 추출조건을 탐색하기 위하여 물 및 25, 50, 75, 100% 에탄올을 추출용매로 사용하는 추출수율을 Table 3에 나타내었다. 줄기의 경우 25, 50% 에탄올 추출물에서 각각 13.31, 13.10%로 가장 높은 추출수율을 보였고, 100% 에탄올을 이용하여 추출할 경우 5.04%로 가장 낮은 추출수율을 보였다. 잎의 경우는 물 및 25, 50, 75, 100% 에탄올 추출물에서 각각 17.32, 20.24, 19.21, 18.33, 9.02%로 25% 에탄올 추출물이 가장 높은 수율을 보였고, 100% 에탄올 추출물에서 가장 낮은 수율을 나타내었다. 씨의 추출수율은 100% 에탄올 추출물에서 23.05%로 모든 부위별 추출물 중에서 가장 높은 수율을 나타내었는데, 이는 씨 안에 존재하는 지방성분들이 비극성 용매인 에탄올에 의해 다량 추출되어져 높은 수율을 나타낸 것으로 판단된다. 결과적으로 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물을 제조할 경우 줄기와 잎은 추출용매로 25, 50% 에탄올을, 씨는 100% 에탄올 추출물이 추출수율을 증대시키는데 효과적인 것을 확인할 수 있었으나, 추출수율은 추출용매와 시료의 비율, 추출온도 및 시간 등 다양한 조건에 따라 달라질 수 있기 때문에(25), 추출방법의 변화, 추출 온도 및 시간의 영향 등을 추가로 조사할 필요가 있을 것으로 판단된다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 총 폴리페놀 함량

식물체에 널리 분포되어 있는 페놀화합물은 2차 대사산물로서 자유라디칼을 제거하는 산화방지 활성의 간접적인 지표가 되는 것으로 알려져 있다(26,27).

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 총

Table 3. Extraction yields of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Extraction solvents	Yield (%)
Stem	water	10.07±1.45 ^e
	25% ethanol	13.31±1.02 ^f
	50% ethanol	13.10±0.77 ^f
	75% ethanol	10.35±2.09 ^e
Seed	100% ethanol	5.04±0.74 ^k
	water	8.47±0.14 ⁱ
	25% ethanol	9.50±0.35 ^h
	50% ethanol	8.51±0.77 ⁱ
Leaf	75% ethanol	7.33±0.10 ^j
	100% ethanol	23.05±3.44 ^a
	water	17.32±1.47 ^c
	25% ethanol	20.24±2.07 ^b
Leaf	50% ethanol	19.21±0.75 ^c
	75% ethanol	18.33±3.44 ^d
	100% ethanol	9.02±0.45 ^{hi}

Date are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

^{a-k}Means in the same parts with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Total polyphenol contents of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Extraction solvents	Total polyphenol contents (GAE mg/g)
Stem	water	293.19±3.65 ^b
	25% ethanol	348.21±5.40 ^a
	50% ethanol	343.39±5.94 ^a
	75% ethanol	260.46±4.53 ^d
Seed	100% ethanol	208.15±1.82 ^e
	water	136.87±1.49 ^h
	25% ethanol	202.63±2.80 ^e
	50% ethanol	259.36±4.00 ^d
Leaf	75% ethanol	266.29±2.51 ^c
	100% ethanol	147.11±4.27 ^e
	water	133.65±2.11 ^h
	25% ethanol	149.02±4.28 ^e
Leaf	50% ethanol	161.06±3.57 ^f
	75% ethanol	143.29±4.31 ^e
	100% ethanol	120.00±2.63 ⁱ

Date are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

^{a-i}Means in the same parts with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

폴리페놀 함량은 Table 4와 같다. 검정라즈베리 줄기의 경우 25, 50% 에탄올 추출물이 각각 348.21±5.40, 343.39±5.94 mg GAE/g으로 가장 낮은 함량을 보인 100% 에탄올 추출물보다 약 1.5배 이상 높은 함량을 가지는 것으로 분석되었다. 물 및 75% 에탄올 추출물의 경우는 각각 293.19±3.65, 260.46±4.53 mg GAE/g으로 나타났다. 검정라즈베리 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물이 266.29±2.51 mg GAE/g으로 가장 높은 함량으로 분석되었고, 가장 낮은 함량을 보인 물 추출물보다 약 2배 가까운 함량을 보였다. 같은 용매조건으로 비교하였을 때 줄기보다는 낮은 함량을

가지는 것을 확인하였다. 검정라즈베리 잎의 경우는 전반적으로 줄기 및 씨보다 낮은 함량을 보였다. 50% 에탄올 추출물이 161.06±3.51 mg GAE/g으로 총 폴리페놀 함량이 가장 높았고, 100% 에탄올 추출물은 120.00±2.63 mg GAE/g으로 가장 낮은 것으로 분석되었다. 결과적으로 같은 추출용매조건으로 비교하였을 때 검정라즈베리 줄기의 총 폴리페놀 함량이 가장 높은 것을 확인하였다. Cho 등(28)은 검정라즈베리 열매를 열수 및 에탄올 추출물을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과에서 60% 에탄올 추출물이 41.3 mg GAE/g으로 가장 높은 함량을 가지는 것으로 보고하였는데, 이러한 결과는 본 실험에서 진행한 부산물로서 여겨지는 검정라즈베리 줄기, 씨 및 잎의 총 폴리페놀 함량보다 현저히 낮은 것으로 나타났으며, 특히 줄기의 경우 가장 높은 총 폴리페놀을 보인 25, 50% 에탄올 추출물의 경우 약 9배 이상 높은 함량을 보여 열매보다 우수한 산화방지 활성을 가지는 천연 소재로서의 이용이 가능할 것으로 생각되었다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 페놀성 화합물 분석

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 페놀성 화합물은 Table 5와 같이 갈산과 엘라그산이 가장 높은 함량의 화합물로 분석되었다. 갈산은 에탄올 농도별 추출물보다 물 추출물에서 약 4배 이상 높은 함량을 보였고, 엘라그산의 경우는 물 추출물보다 에탄올 농도별 추출물에서 높은 함량을 보였다. 결과적으로 추출용매 조건에 따라서 페놀성 화합물의 함량이 크게 차이가 나는 것을 확인하였고, 추출용매 조건과 상관없이 검정라즈베리 부위별 추출물의 주된 페놀성 화합물은 갈산과 엘라그산으로 나타났다. Ahn 등(29)은 일부 페놀성 화합물의 산화방지 효과 연구에서 퀘르세틴 및 루틴의 DPPH 라디칼 활성이 우수하다고 보고하였고, Bhatt 등(30)의 하자화 꽃으로부터 분리한 갈산의 라디칼 소거활성 연구에서 갈산이 양성대조구인 BHA보다 높은 활성을 보일만큼 강력한 산화방지 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 결과적으로 본 실험에서 진행한 검정라즈베리 부위별 추출물의 산화방지 활성에 10종의 페놀성 화합물이 영향을 미치는 것을 짐작할 수 있었다. 그러나 10종의 페놀성 화합물 외

에도 수많은 페놀성 화합물 및 다양한 기능성을 가지는 성분이 존재하며, 이러한 다양한 화합물은 직·간접적으로 산화방지 활성에 영향을 줄 것으로 미루어 볼 때 검정라즈베리 부위별의 기능성 물질에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 총 플라보노이드 함량

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 총 플라보노이드 함량을 비교분석한 결과는 Table 6과 같다. 검정라즈베리 줄기의 경우 추출용매조건에 따라서 25, 50, 75% 에탄올 추출물이 각각 76.02±4.23, 72.66±7.10, 74.35±2.46 mg RUE/g으로 총 폴리페놀 함량에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 100% 에탄올 추출물은 68.10±3.06 mg RUE/g의 함량을 보였고, 물 추출물의 경우 56.40±1.25 mg RUE/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. 검정라즈베리 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물이 82.40±2.49 mg RUE/g으로 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 것으로 나타났고, 가장 낮은 함량을 보인 100% 에탄올 추출물보다 약 6배 이상 높은 함량을 보였다. 물 및 25, 50% 에탄올 추출물의 경우는 각각 42.92±5.04, 63.96±4.25, 69.99±2.36 mg RUE/g의 함량으로 나타나 검정라즈베리 씨의 경우 100% 에탄올 추출물을 제외하고 에탄올의 농도가 높을수록 총 플라보노이드 함량도 높아지는 경향을 보였다. 검정라즈베리 잎의 경우 50% 에탄올 추출물이 82.28±0.54 mg RUE/g으로 줄기와 씨의 총 플라보노이드 함량보다도 높거나 비슷한 것으로 나타났다. 그 외에 물 및 25, 75, 100% 에탄올 추출물이 각각 51.91±0.41, 58.99±3.79, 73.42±2.25, 49.18±4.01 mg RUE/g으로 100% 에탄올 추출물이 가장 낮은 것으로 나타났다. Choi 등(31)의 추출조건에 따른 포도잎 추출물의 산화방지 효과 연구 중 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과에서 물 추출물에 비해 에탄올 추출물이 전반적으로 총 플라보노이드 함량이 높다는 연구보고와 본 실험결과가 유사한 경향을 보였다. 또한 Kim 등(32)의 토종 복분자 및 외래종 복분자 추출물의 산화방지 비교연구에서 본 연구와 같은 외래종 열매의 총 플라보노이드 함량이 50, 75, 100% 추출물에서 각각 11.78±0.81, 10.91±1.17, 11.78±0.19 mg/g의 함량으로 보고하였는데, 이러한 결과는 본 실험에서 진행한 검

Table 5. Phenolic acid contents of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Solvent	Phenolic compound (µg/g)									
		Ferulic acid	Coumaric acid	Caffeic acid	Rutin	Quercetin	Luteolin	Keampferol	Myricetin	Gallic acid	Ellagic acid
Stem	Water	ND*	3.37	17.20	0.08	3.55	0.07	ND	0.08	228.42	78.04
	25% ethanol	ND	0.87	5.35	0.22	4.02	0.09	0.05	ND	39.96	87.64
	50% ethanol	ND	0.64	4.46	0.35	3.22	0.1	ND	ND	28.26	89.88
	75% ethanol	0.37	0.96	5.55	0.40	3.77	0.11	0.04	ND	32.20	95.94
	100% ethanol	0.26	1.86	9.90	0.20	3.21	0.12	0.05	0.08	35.68	113.46
Seed	Water	0.28	3.85	1.87	2.65	0.19	ND	ND	0.08	47.92	34.52
	25% ethanol	0.46	4.28	2.35	3.67	0.60	0.07	ND	0.08	19.26	57.78
	50% ethanol	0.37	3.44	1.58	3.30	1.20	0.07	0.04	ND	16.06	65.28
	75% ethanol	0.27	4.59	2.66	4.55	2.18	0.07	0.04	ND	26.78	85.08
	100% ethanol	0.31	2.34	0.49	1.34	0.64	ND	ND	ND	4.32	45.22
Leaf	Water	2.88	19.69	27.96	2.52	1.45	0.06	0.16	0.08	24.73	5.49
	25% ethanol	0.29	2.26	6.23	3.97	11.18	0.07	3.53	ND	7.15	14.51
	50% ethanol	0.38	2.06	5.73	3.73	13.29	0.07	4.19	ND	7.08	16.18
	75% ethanol	ND	2.33	6.49	4.03	13.04	0.07	4.86	ND	7.18	14.55
	100% ethanol	0.49	8.30	14.44	3.59	17.76	0.09	6.26	ND	8.01	16.82

*: Not detected

Table 6. Total flavonoid contents of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Extraction solvents	Total flavonoid contents (RUE mg/g)
Stem	water	56.40±1.25 ^{fb}
	25% ethanol	76.02±4.23 ^b
	50% ethanol	72.66±7.10 ^{bc}
	75% ethanol	74.35±2.46 ^b
	100% ethanol	68.10±3.06 ^{cd}
Seed	water	42.92±5.04 ⁱ
	25% ethanol	63.96±4.25 ^{de}
	50% ethanol	69.99±2.36 ^{bc}
	75% ethanol	82.40±2.49 ^a
	100% ethanol	13.50±5.01 ^j
Leaf	water	51.91±0.41 ^{gh}
	25% ethanol	58.99±3.79 ^{ef}
	50% ethanol	82.28±0.54 ^a
	75% ethanol	73.42±2.25 ^{bc}
	100% ethanol	49.18±4.01 ^h

Date are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

^{a-j}Means in the same parts with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

정라즈베리 부산물인 줄기, 씨 및 잎의 총 플라보노이드 함량보다 같은 추출용매조건에서 크기는 약 7배 이상 낮은 것으로 분석되어 검정라즈베리 부산물인 줄기, 씨 및 잎의 총 플라보노이드 함량이 높은 것을 확인하였고, 추출용매의 종류에 따라서 플라보노이드 화합물의 추출수율의 차이가 큰 것으로 나타났다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성

DPPH는 아스코브산 및 토코페롤, 폴리하이드록시(polyhydroxy) 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 산화방지 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다(33).

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성의 EC₅₀ 값을 비교한 결과는 Table 7과 같다. 검정라즈베리 줄기의 경우 25, 50% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값이 각각 68.22, 60.89 µg/mL로 가장 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였고, 서로간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 가장 활성이 낮은 100% 에탄올 추출물보다는 약 2배 이상 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. 검정라즈베리 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값이 88.97 µg/mL로 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 우수하였으며, 가장 낮은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 물 추출물보다 약 5배 이상 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 검정라즈베리 잎의 경우 물 추출물과 100% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값이 >500 µg/mL로 가장 낮은 활성을 보였고, 50% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값은 256.13 µg/mL로 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으나 줄기 및 씨의 활성보다는 낮은 것을 확인하였다. 또한 양성대조구인 BHA의 DPPH 라디칼 소거활성에는 모든 시료가 미치지 못하였으나 검정라즈베리 줄기의 경우는 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 일반적으로 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거활성도 높아진다는 Choi 등(34)의 연구보고와 같은

Table 7. Comparison of EC₅₀ values of DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Extraction solvents	DPPH radical scavenging activity (EC ₅₀ µg/g)
Stem	water	84.14 ^h
	25% ethanol	68.22 ⁱ
	50% ethanol	60.89 ⁱ
	75% ethanol	93.87 ^e
	100% ethanol	156.70 ^f
Seed	water	436.10 ^c
	25% ethanol	158.50 ^f
	50% ethanol	98.79 ^e
	75% ethanol	88.97 ^{eh}
	100% ethanol	272.60 ^e
Leaf	water	>500 ^a
	25% ethanol	339.22 ^d
	50% ethanol	256.13 ^c
	75% ethanol	481.17 ^b
	100% ethanol	>500 ^a
BHA		34.94 ^j

^{a-j}Means in the same parts with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

결과를 보였다. 또한 Kwon 등(19)의 검정라즈베리 에탄올 추출물의 생리활성 탐색 연구에서 보고한 검정라즈베리 완숙과의 에탄올 농도별 DPPH 라디칼 소거활성보다 본 실험에서 진행한 검정라즈베리 부산물인 줄기의 DPPH 라디칼 소거활성이 100% 에탄올 추출물을 제외하고 모두 높은 활성을 보였고, 씨의 경우도 50, 75% 에탄올 추출물은 검정라즈베리 완숙과의 DPPH 라디칼 소거활성보다 높은 활성을 보여 산화방지 활성을 가지는 새로운 산화방지제 소재로의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성

ABTS는 과산화라디칼(peroxyl radical)이나 산화제에 의해 양이온 라디칼로 산화되며(35), ABTS 라디칼 소거활성은 산화방지제 존재 시 ABTS가 산화방지제에 의해 흡광도가 억제되는 것에 기초하여 산화방지제 존재 시 파랑/녹색의 ABTS^{•+}이 소거되는 정도를 흡광도로 분석하는 방법이다(36-40).

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성의 EC₅₀ 값을 비교한 결과는 Table 8에 나타내었다. 검정라즈베리 줄기의 경우 50% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값이 105.72 µg/mL로 추출용매 조건 중 가장 높은 활성을 보였고, 가장 낮은 활성을 보인 100% 에탄올 추출물보다는 약 1.9배 높은 활성을 보였다. 검정라즈베리 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물의 EC₅₀ 값이 146.90 µg/mL로 가장 ABTS 라디칼 소거활성이 높은 추출용매조건으로 확인되었다. 검정라즈베리 부산물 중 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 낮았던 잎의 경우는 ABTS 라디칼 소거활성도 줄기 및 씨보다 낮은 활성을 보였다. 이는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 페놀성 물질 함량과 높은 상관관계가 있고, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 정의 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다는 Jeong 등(41)의 연구 결과와 같은 경향을 보였다. 잎의 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높았던 추출용매조건은 50% 에탄올 추출물에서 EC₅₀이

Table 8. Comparison of EC₅₀ values of ABTS radical scavenging activity of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment

Parts	Extraction solvents	ABTS radical scavenging activity (EC ₅₀ µg/g)
Stem	water	112.90 ^e
	25% ethanol	87.41 ^{hi}
	50% ethanol	82.57 ⁱ
	75% ethanol	91.10 ^h
	100% ethanol	157.40 ^f
Seed	water	>500 ^a
	25% ethanol	294.14 ^d
	50% ethanol	178.65 ^e
	75% ethanol	146.90 ^f
	100% ethanol	>500 ^a
Leaf	water	>500 ^a
	25% ethanol	471.80 ^b
	50% ethanol	395.93 ^c
	75% ethanol	>500 ^a
	100% ethanol	>500 ^a
BHA		54.50 ^j

^{abj}Means in the same parts with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

395.93 µg/mL로 확인되었으며, 물 및 75, 100% 에탄올 추출물은 본 실험에서 최대 농도로 설정한 500 µg/mL 농도에서 EC₅₀ 값이 확인되지 않았다. 또한, 모든 시료에서 양성대조구인 BHA의 활성에는 미치지 못하였으나 줄기의 경우 높은 수준의 라디칼 소거활성을 보여, 합성산화방지제인 BHA를 대체할 수 있는 천연산화방지 소재로의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 환원력

환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 산화방지 활성을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타난다.

추출용매를 달리한 검정라즈베리 부위별 초음파 추출물의 100 µg/mL 농도에서 환원력을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 줄기의 경우 25, 75% 에탄올 추출물이 각각 0.263±0.004, 0.261±0.038로 가장 높은 환원력을 보였고, 잎의 경우는 50% 에탄올 추출물이 0.120±0.009로 가장 높은 환원력을 보였으며, 씨의 경우는 50, 75% 에탄올 추출물이 각각 0.212±0.008, 0.210±0.001로 가장 높은 환원력을 보였다. 같은 추출용매조건으로 줄기와 잎 및 씨의 환원력을 비교한 결과 줄기>씨>잎 순으로 높은 환원력을 보였다. 이러한 결과는 총 폴리페놀 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거활성 및 환원력도 증가한다는 Park 등(42)의 연구결과와 같은 경향을 보였다.

결과적으로 줄기의 산화방지 활성이 잎 및 씨보다 우수한 것을 확인하였고, 부위에 따라서 추출용매조건이 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 부산물로 여겨지던 줄기, 잎 및 씨의 산화방지 활성이 높은 것으로 나타나 산화방지 활성과 관련된 항노화, 간보호 등의 기능성을 가지는 의약품 및 건강기능식품으로의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

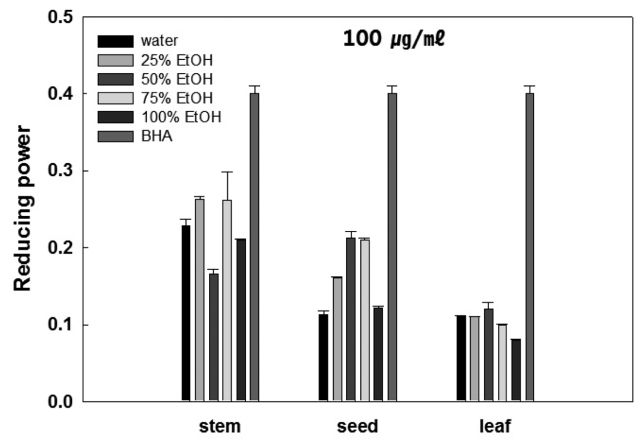


Fig. 1. Reducing power of ethanol extracts from different parts of black raspberry (*Rubus occidentalis*) by ultra-sonication treatment.

요 약

본 연구는 검정라즈베리 부산물인 줄기, 잎 및 씨 초음파 추출물의 산화방지 활성에 미치는 영향을 살펴보고, 산화방지 활성을 가지는 식품 및 의약품의 개발 가능성을 알아보기 위하여 수행되었다. 검정라즈베리 부위별을 물 및 25, 50, 75, 100% 에탄올을 추출용매로 초음파 추출하여 실험을 진행한 결과 총 폴리페놀 함량의 경우 검정라즈베리 줄기의 25, 50% 에탄올 추출물이 각각 348.21±5.40, 343.39±5.94 mg/g으로 가장 높은 함량을 보였고, 잎은 50% 에탄올 추출물이 161.06±3.57 mg/g, 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물이 266.29±2.51 mg/g으로 나타나 줄기의 총 폴리페놀 함량이 가장 높음을 확인하였다. 페놀성 화합물 10종의 분석 결과 모든 시료에서 갈산과 엘라그산이 가장 높은 함량의 화합물로 분석되었고, 퀴르세틴, 페롤산, 쿠마르산, 카페산, 루틴, 루테올린은 모든 추출물에서 분석되었다. 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과에서는 추출용매간에 함량에 차이가 나타나는 것을 확인하였는데, 줄기는 25% 에탄올 추출물이 76.02±4.23 mg/mL로 가장 높은 함량을 보였고, 잎의 경우는 50% 에탄올 추출물이 82.28±0.54 mg/mL로 가장 높았으며, 씨의 경우는 75% 에탄올 추출물이 82.40±2.49 mg/mL로 가장 높게 나타났다. 산화방지 활성 검증을 위한 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성의 EC₅₀ 값을 비교한 결과 총 폴리페놀 함량이 가장 높았던 줄기의 활성이 가장 높았으며, 씨>잎 순으로 높은 라디칼 소거활성을 보였고, 추출용매 조건에 따라서 활성의 차이가 크게 나타났다. 또한 환원력을 측정된 결과에서도 줄기>씨>잎 순으로 높은 환원력을 보였고, 검정라즈베리 부산물인 줄기, 잎 및 씨 모두 높은 수준의 산화방지 활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 추출조건으로는 줄기의 경우 25, 50% 에탄올, 잎의 경우 50% 에탄올, 씨의 경우 75% 에탄올 용매 조건에서 산화방지 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

결과적으로 검정라즈베리 부산물인 줄기, 잎 및 씨 모두 산화방지 활성이 우수한 천연소재로서의 이용이 가능할 것으로 판단되었고, 특히 줄기의 경우 산화방지 활성이 매우 뛰어나 건강기능식품 및 의약품과 같은 산업적 이용 가치가 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 고창군 지역농식품 선도클러스터 육성사업과 고창 북분자연연구소 건립사업의 일환으로 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

References

- Liyana-Pathirana, CM, Shahidi F, Alasalvar C. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chem.* 99: 121-128 (2006)
- Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosen RT. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem.* 85: 19-26 (2004)
- Elzaawely AA, Xuan TD, Koyama H, Tawata S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.). *Food Chem.* 104: 1648-1653 (2007)
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50 (1996)
- Morrissey PA, O'brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8: 463-472 (1998)
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 39: 44-84 (2007)
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Rev.* 89: 27-71 (2009)
- Lee YJ, Kim JC, Hwang KT, Kim DH, Jung CM. Quality characteristics of black raspberry wine fermented with different yeasts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 784-791 (2013)
- Lee JM, Dossett M, Finn CE. Anthocyanin fingerprinting of true *bokbunja* (*Rubus coreanus* Miq.) fruit. *J. Funct. Food.* 5: 1985-1990 (2013)
- Nybohm N. Cellulose thin layers for anthocyanin analysis, with special reference to the anthocyanins of black raspberries. *J. Chromatography A* 38: 382-387 (1968)
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Han JY, Chung HG. Changes in antioxidant activity, total phenolics and vitamin C content during fruit ripening in *Rubus occidentalis*. *Korean J. Plant Res.* 20: 461-465 (2007)
- Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. Improvement of cholesterol and blood pressure in fruit, leaf and stem extracts from black raspberry *in vitro*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 22: 177-187 (2014)
- Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agr. Food Chem.* 48: 140-146 (2000)
- Stoner GD, Chen T, Krestry LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: Potential mechanisms. *Nutr. Cancer* 54: 33-46 (2006)
- Lee SE, Lee SW, Bang JK, Yu YJ, Seong NS. Antioxidant activities of leaf, stem and root of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12: 237-242 (2004)
- Choi JM, Kim KY, Lee SH, Ahn JB. Functional properties of water extracts from different parts of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Food Eng. Prog.* 15: 130-135 (2011)
- Bae YI, Chung YC, Shim KH. Antimicrobial and antioxidant activities of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica*, Lindl.). *Korean J. Food Preserv.* 9: 97-101 (2002)
- Sa JH, Jin YS, Shin IC, Shim TH, Wang MH. Photoprotective effect and antioxidative activity from different organs of *Morus bombycis* Koidzumi. *Kor. J. Pharmacogn.* 35: 207-214 (2004)
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR, Song JY. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 19: 325-333 (2011)
- Amerine MA, Ough CS. Methods analysis of musts and wines. John Wiley and Sons, New York, NY, USA. pp. 176-180 (1990)
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182 (2002)
- Choi, JS, Lee JH, Park HJ, Kim HG, Young HS, Mun SI. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. *Kor. J. Pharmacogn.* 24: 299-303 (1993)
- Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Toxicol.* 42: 45-49 (2004)
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan J. Nutr.* 44: 307-315 (1986)
- Yu HE, Dela Paz LMM, Bae YJ, Lee DH, Park JS, Kwak HS, Kim HK, Lee JS. Screening and extraction condition of antiaging bioactive substances from medicinal plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1136-1142 (2005)
- Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM, Park CS. An analysis of the *Gyunggokgo's* ingredients and a comparison study on anti-oxidation effects according to the kinds of extract. *Kor. J. Herbology* 23: 23-136 (2008)
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agric. Life Sci.* 44: 57-66 (2010)
- Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanus* F.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 790-796 (2005)
- Ahn SI, Bok JI, Son JY. Antioxidative activities and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J. Food cook. Sci.* 23:19-24 (2007)
- Bhatt LR, Yook CN, Choi HJ, Baek SH. Radical scavenging activity of gallic acid from woodfordia fruticosa flowers. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 22: 903-906 (2008)
- Choi SK, Yu QM, Lim EJ, Seo JS. The effects of extraction conditions on the antioxidative effects of extracts from campbell early and muscat bailey a grapevine leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 168-174 (2013)
- Kim LS, Youn SH, Kim JY. Comparative study on antioxidant effects of extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1357-1362 (2014)
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* miquel. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 17: 83-89 (2009)
- Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 549-556 (2005)
- Re R, Pellegrinni N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295 (1997)
- Lee JH, Jhoo JW. Antioxidant activity of different parts of *Lespedeza bicolor* and isolation of antioxidant compound. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 763-771 (2012)
- Miller NJ, Rice-Evans CA. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rep.* 2: 161-171 (1996)
- Böhm V, Schlesier K. Methods to evaluate the antioxidant activity. *Prod. pract. Qual. Assess. Food Crop.* 3: 55-71 (2004).
- Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8: 121-137 (2002)
- Jeong JA, Kwon SH, Lee CH. Screening for antioxidative activities of extracts from aerial and underground parts of some edible and medicinal ferns. *Korean J. Plant Res.* 20: 185-192 (2007)
- Park YK, Cho SH, Kim SH, Jang YS, Han JG, Chun HG. Functional composition and antioxidant activity from the fruits *Rubus coreanus* according to cultivars. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 36: 102-109 (2008)