

Antioxidative Effects and Chemical Characteristics of *Annona muricata* Leaf Extracts

Young Wan Kim, Tae Hoon Kim, Hee Young Ahn and Young Su Cho*

Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received February 1, 2018 / Revised March 2, 2018 / Accepted March 5, 2018

Annona muricata, generally known as soursop, graviola, or sirsak, is native to the warmest tropical areas of North and South America and is now widely distributed throughout tropical and subtropical parts of the world, including India and Nigeria. This study tested the contents of polyphenolic compounds, flavonoids, and minerals, as well as the antioxidative effects of DPPH radical-scavenging activity, Fe/Cu-reducing power, linoleic-acid peroxidation using thiobarbituric-acid (TBA) methods and peroxidation of rat-hepatocyte microsomes, and β -carotene bleaching assay. These were tested with in-vitro experimental models using water, ethanol, and methanol extracts of the *Annona muricata* leaf (AMI). Water extracts of AMI showed the highest extraction yield (1.76%). The total polyphenol-compound concentration was the highest in the methanol extract of AMI. However, the flavonoids concentration was the highest in the ethanol extracts of AMI. AMI major minerals were Ca, K, and Mg. In DPPH radical-scavenging activity, the contents exhibited a strong scavenging effect on the ethanol and methanol extracts of AMI. Additionally, the Fe/Cu-reducing power was strong in ethanol and methanol extracts of AMI. Fe²⁺/ascorbate-induced linoleic-acid peroxidation using TBA methods and auto-oxidation of rat-hepatic microsomes showed strong antioxidative activities in ethanol extracts of AMI. β -Carotene bleaching was also highest in the ethanol extracts of AMI. These results may provide the basic data to understand the chemical characteristics and antioxidative effects of *Annona muricata* leaf extract for the development of functional foods.

Key words : Acetoginin, *Annona muricata*, antioxidative activity, biological activity

서 론

생물체들은 생체 내 생화학 반응이나 환경적 인자에 의하여 원자 구조상 하나 이상의 짝없는 전자를 가지는 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 생성한다. 활성산소종은 생체 내에서 정상적인 산화과정 중 생성되는 대사산물이지만 체내 항산화 시스템에 의해 제거된다. 하지만 체내 산화-항산화 시스템의 균형이 깨져 활성산소종의 생성이 증가하게 되면 산화적 스트레스로 인한 세포 내 단백질 및 지질 등의 손상으로 인하여 노화, 당뇨병, 고혈압, 암 등 다양한 질병 및 합병증을 유발하게 된다[13]. 한편, 산화적 스트레스에 의한 세포 내 구성성분의 손상을 억제시키거나 지연시켜 질병을 치료하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)과 butylated hydroxyanisole (BHA)는 좋은 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나

장기적으로 복용할 경우 간, 위장, 신장 등에 독성을 초래하며 발암의 위험성이 제기되고 있어 합성항산화제의 사용량이 법적으로 제한되고 있다[7, 23]. 식물 속에 함유된 phytochemicals과 physiological active substances는 체내에 들어오면 항산화 작용이나 세포 손상을 억제하는 작용을 통하여 항암, 항염증 등의 예방 기능을 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있다. 이에, 신체의 산화적 스트레스를 경감시킬 수 있는 안전하며 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 개발이 필요하다[14].

그라비올라(*Annona muricata*)는 가시여지(soursop), 구아나바나(guanabana), 포포(paw-paw), 시르삭(sirsak)이라고도 불리며, 남미와 북미의 열대성 지역에 주로 서식하며, 현재는 인도, 나이지리아, 말레이시아 등 세계의 열대 및 아열대 지역에 광범위하게 분포하고 있다. 그라비올라(*A. muricata*)는 포포나무과(*Annonaceae*)에 속하며, 크고 광택있는 짙은 녹색의 잎과, 녹색의 타원형의 식용 가능한 과육을 가지는 5~8 m 높이의 작은 상록수이다[20]. 그라비올라의 과육은 출산 후 모유의 양을 증가시켜주는 효과를 가지고 있으며, 열을 내려주고, 설사, 이질과 구충의 억제 효과가 있다. 또한, 그라비올라의 잎은 항종양, 항암, 진정제, 항경련, 혈압강하 등 효과를 가지고 있다[3]. 그라비올라 잎에는 polyphenols, flavonoids, essential oils, cyclopeptides, kaempferol, tannin, alkaloids, GABA (γ -aminobutyric acid) 등의 많은 화합물들을 가지고

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있으며[17], 그 중 acetogenin이라는 화합물은 다양한 암세포에 대한 세포독성을 가지고 있다고 보고되어, 좋은 천연항암제로서 관심을 가지고 있다[19].

본 연구에서는 그라비올라 잎에 존재하는 생리활성 물질을 효과적으로 이용하기 위한 구체적인 연구로 그라비올라 잎에 존재하는 생리활성물질의 소재 개발을 위하여, 그라비올라 잎을 용매별로 추출하여 총 페놀성 화합물 함량 및 *in vitro* 실험계에서의 항산화 효과에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 그라비올라(*A. muricata*)잎은 캄보디아에서 재배되고 있는 것을 GGSK IMPORT EXPORT CO., Ltd. (2015년)에서 제공받아 사용하였다. 그라비올라 잎은 음건한 후, 분쇄기로 분말화하여 실험에 사용하였다.

시료의 추출 및 수율

수용성 추출물을 얻기 위하여 그라비올라 잎 분말 100 g을 각각 취해 10배의 정제수를 가한 후 37°C 항온수조에서 3시간씩 교반 하면서 3회 반복 추출하였고, 95% 에탄올, 95% 메탄올 용매를 수용성 추출물과 동일한 방법으로 추출하였다. 추출액을 모아 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과시켜 얻은 여과액을 감압 농축(Buchi Rotavapor R-215, Flawil, Switzerland)하여 각각의 용매를 제거 시켜 동결건조(Eyela FUD-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 추출 수율(%)을 구하였다.

페놀성 화합물 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 각 용매별 추출물 시료에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 이용한 Folin-Denis법[21]으로 비색시켜 spectrophotometer (Hitachi U-2900, Tokyo, Japan)의 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 함량은 tannic acid를 일정 농도(0-500 µg/ml)로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정된 표준곡선으로부터 계산하였다.

Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[10]에 따라 측정하였다. 0.1% (w/v) 시료 용액에 5% NaNO₂ 용액 및 10% AlCl₃·6H₂O를 잘 혼합하여 반응시킨 용액을 spectrophotometer (Hitachi U-2900)의 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 함량은 표준 물질로서 (+)-catechin hydrate을 일정 농도(20-200 µg/ml)로 시료와 동일한 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

미네랄 함량 측정

미네랄 함량은 AOAC 분석 방법[1]에 준하여 측정하였다.

즉, 그라비올라 잎 건조 분말 1 g을 정확히 취해 550°C에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수용상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건조물에 3 N HCl를 가하여 여과한 후 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자 흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

DPPH에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성 측정은 Blois 방법[4]에 따라 측정하였다. 각 용매별 추출물을 각 0.01%, 0.05% 및 0.10%의 농도로 만든 시료에서 α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging 활성을 528 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 아래의 식에 넣어 백분율(%)로 표시하였다. 이때 활성 비교는 합성 항산화제 butylated hydroxytoluene (BHT)를 0.05% 농도로 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{sample absorbance } 528 \text{ nm}) / (\text{control absorbance } 528 \text{ nm})] \times 100$$

Fe/Cu 환원력 측정

Fe-환원력 측정은 Zhu 등의 방법[24]에 따라 각 용매별 추출물 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.50% 및 1.00%의 시료 용액에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 및 1%(w/v) potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆]를 혼합하여 50°C에서 반응 시키고 10% trichloroacetic acid (w/v) 상층액에 중류수 및 0.50% ferric chloride (FeCl₃)를 혼합한 후 실온에서 반응 시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, Cu-환원력 측정 또한 각 용매별 추출물 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.50% 및 1.00%의 시료 용액에 0.01 M CuCl₂, 7.5 mM ethanolic neocupprone solution 및 1 M NH₄OAc buffer를 혼합하여 상온에서 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원력 비교를 위하여 기존에 항산화제로 많이 사용되고 있는 천연 항산화제 ascorbic acid와 합성 항산화제 BHT를 각각 시료와 동일 농도로 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시료 반응액에서 흡광도가 증가된 만큼 강한 환원력을 나타내어 준다.

간 microsome의 지질 과산화 억제 활성 측정

간 microsome 분획을 이용한 지질 과산화 억제 활성은 Wong 등의 방법[21]에 따라 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 간 microsome 분획(1 ml 중 1 mg의 단백질 함유), 0.1 mM ascorbate와 5 mM FeSO₄ 반응액을 잘 혼합한 후 37°C에서 반응 시켜 과산화를 유도시켰다. 대조구는 시료를 첨가하지 않고 위와 동일한 방법으로 실시하였다. 반응액에 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액을 가하고 원심분리 후 상등액에 0.67% TBA를 넣고 가열하여 발색시켰다. 반응액은 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질과산화의 억제율

을 대조구 흡광도에 대한 저해율(%)로 나타내었다.

TBA (2-thiobarbituric acid)에 의한 항산화 활성 측정

Linoleic acid (25 mg/ml in EtOH)를 기질로 하여 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)와 각 시료 용액을 가하여 40°C에서 1주일 동안 과산화 지질을 유도하였다[5]. 과산화 지질 측정은 반응액에 35% trichloroacetic acid와 0.75% aqueous TBA를 혼합하고 가열처리 한 후 70% trichloroacetic acid를 가한 다음 원심분리 하여 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β-Carotene bleaching assay 측정

β-Carotene linoleate system을 이용한 항산화 효과의 측정은 Mattaus 의 방법[18]을 변형하여 측정하였다. Chloroform 10 ml에 1 mg β-carotene (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, U.S.A.)을 용해하여 β-carotene용액을 만든 후, β-carotene 용액 10 ml를 100 ml 둥근 플라스크에 취하고, linoleic acid (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA) 20 mg을 첨가하여 40°C 진공회전농축기로 클로로포름을 제거한 후, 증류수 100 ml를 첨가한 다음 진탕하여 에멀전 용액을 제조하였다. 이 에멀전 용액 0.2 ml에 시료 첨가군, ethanol (대조구) 및 positive control인 0.10% α-tocopherol과 0.10% BHT 용액 8 ul를 첨가하여 50°C 배양기(HB-103MP, Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 저장하였다. 저장기간 중 0분에서 180분 동안 30분 간격으로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내었다[9].

결과 및 고찰

그라비올라 잎의 용매별 추출 수율

천연물 내 생리활성 물질들은 추출되는 용매의 종류, 추출 온도 및 시간 등에 따라 추출되는 성분들이 달라지며 추출 수율 또한 많은 차이를 나타낸다[6]. 그라비올라 잎의 수율은 수용성 추출물, 에탄올 추출물 및 메탄올 추출물이 각각 1.76%, 1.40% 및 1.67%으로 에탄올 및 메탄올 추출물 수율보다 수용성 추출물 수율에서 높게 나타났다(Table 1).

총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량

대부분의 식물체에서 총 페놀성 화합물 함량이 flavonoid보다 많이 함유하고 있으며, 대체로 총 페놀성 화합물 함량이 많은 식물체에서는 flavonoid의 함량도 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[11]. 본 실험에 사용한 그라비올라 잎의

Table 1. Extract yield, the concentrations of total phenolic compounds and flavonoids in water (W), ethanol (E), methanol (M) extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf

	Extracted yield (%)	Total phenolic compounds concentrations (mg/100 g)	Flavonoids concentrations (mg/100 g)
W	1.76	431.29±2.57 ^{ab}	181.27±1.12 ^a
E	1.40	401.68±15.21 ^a	330.38±8.75 ^b
M	1.67	465.43±8.51 ^b	315.86±10.35 ^b

Values are mean ± S.E., n=3.

Values with different letters are significantly different at *p*<0.05.

총 페놀성 화합물 측정 결과 수용성 추출물에서 431.29 mg/100 g, 에탄올 추출물에서 401.68 mg/100 g, 메탄올 추출물에서 465.43 mg/100 g으로 나타났으며, 메탄올 추출물에서 가장 높은 결과를 나타내었다. Flavonoid 함량은 수용성 추출물 181.27 mg/100 g, 에탄올 추출물 330.38 mg/100 g, 메탄올 추출물 315.86 mg/100 g의 함량을 나타내었고, 에탄올 추출물 및 메탄올 추출물은 수용성 추출물보다 높은 함량을 나타내었다(Table 1).

미네랄 함량

그라비올라 잎의 미네랄 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 미네랄 성분 조성은 Ca, K, Mg, Na, Mn로 나타내었으며, 전체적으로 Ca, K, Mg 순으로 높은 비율을 차지하였다. Ca가 1.831 g/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, K는 1.627 g/100 g, Mg는 0.352 g/100 g의 순으로 함유되어 있었으며, Na, Mn는 소량 함유되어 있었다. 측정된 K, Mg, Ca 등은 인체에 중요한 필수 미네랄 성분으로 영양적인 측면에서도 매우 중요한 것으로 알려져 있다[16].

DPPH를 이용한 자유라디칼 소거 활성

DPPH는 짙은 자색의 안정한 라디칼로 ascorbic acid, tocopherol, glutathione, aromatic amine 등에 의해 전자나 수소를 제공받아 비라디칼로 전환되면서 색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 물질을 검색하는데 사용되고 있다[12].

본 실험에 사용한 그라비올라 잎의 DPPH의 free radical 소

Table 2. Mineral concentration in *Annona muricata* (Graviola) leaf

Minerals	Mineral concentrations (g/100 g dry weight)
Calcium	1.831±0.04
Potassium	1.627±0.01
Magnesium	0.352±0.01
Sodium	0.051±0.00
Manganese	0.003±0.00

Values are mean ± S.E., n=3.

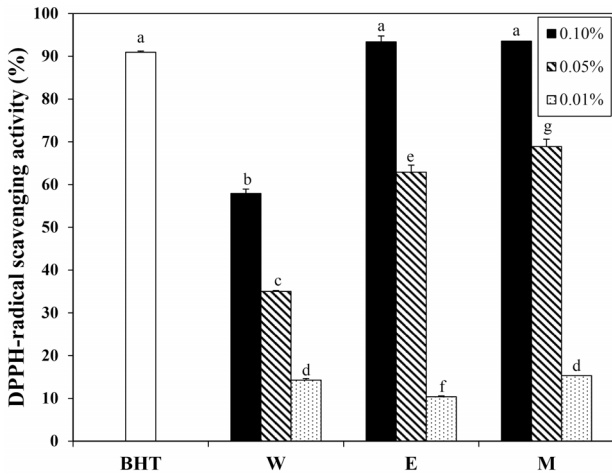


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of water (W), ethanol (E), methanol (M) extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf. BHT: Butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean ± S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

거를 이용한 항산화 활성을 본 결과는 Fig. 1과 같다. 각 용매별 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과, 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 결과를 나타내었다. 에탄올 추출물 0.10%와 메탄올 추출물 0.10%에서 각각 93.39%, 93.54%로 높은 radical 소거 활성을 나타내었으며, 대조구로 사용된 BHT 0.05%와 비슷한 항산화 활성을 나타내었다. DPPH radical 소거능은 phenolic compounds 및 flavonoids 화합물 및 기타 페놀성 물질에 대한 항산화능의 지표로서, 환원력이 클수록 라디칼 소거능은 상승하게 된다. 이와 같이 플라보노이드 함량이 높은 에탄올 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내는 근거로 뒷받침하고 있다.

환원력 활성

환원력(reducing power) 활성 정도는 항산화 작용의 여러 기전 중에서 수소 원자를 제공하는 free radical의 연쇄 반응으로 금속 이온(Fe^{3+} , Cu^{2+})을 환원시켜 Fe^{2+} , Cu^{+} 로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 것으로, flavonoid compound는 이것을 안정된 물질로 전환시키기 위해 유리기와 반응하거나 전자를 공여하여 환원과 유사한 반응이 일어나 유리 라디칼의 연쇄반응을 종료시킨다. 환원력의 세기가 높을수록 항산화 활성이 높다는 것을 나타낸다[2]. 각 용매별 추출물의 Fe-환원력은 수용성 추출물, 에탄올 추출물, 메탄올 추출물 각 1.00%에서 동일한 결과를 나타내었으나, 메탄올 추출물 0.10%에서 1.69로 에탄올 추출물 0.10%와 수용성 추출물 0.10%의 1.51, 1.03 보다 높은 결과를 나타내었다(Table 3). 반면, 각 용매별 추출물의 Cu-환원력은 수용성 추출물 1.00%에서 2.91, 에탄올 추출물 1.00%에서 3.61, 메탄올 추출물 1.00%에서 3.21로 에탄올 추출물에서 수용성 추출물과 메탄올 추출물에 비해

Table 3. Reducing power of water (W), ethanol (E), methanol (M) extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf

Composition	Conc.(%)	Fe-Reducing power	Cu-Reducing power
BHT	1.00	2.96±0.00	3.82±0.00
	0.50	2.87±0.00	3.61±0.00
	0.10	2.34±0.18	2.52±0.01
	0.05	1.95±0.02	2.05±0.02
	0.01	0.51±0.00	1.00±0.03
A.A	1.00	2.90±0.03	3.54±0.04
	0.50	2.88±0.05	2.37±0.02
	0.10	2.76±0.20	2.09±0.03
	0.05	2.14±0.02	1.74±0.02
	0.01	1.46±0.03	0.52±0.00
W	1.00	3.14±0.00	2.91±0.00
	0.50	2.98±0.02	2.33±0.01
	0.10	1.03±0.00	0.75±0.00
	0.05	0.55±0.01	0.43±0.00
	0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
E	1.00	3.14±0.00	3.61±0.00
	0.50	3.01±0.00	3.01±0.00
	0.10	1.51±0.02	1.84±0.03
	0.05	0.81±0.02	1.06±0.03
	0.01	0.20±0.01	0.24±0.00
M	1.00	3.14±0.00	3.21±0.00
	0.50	3.01±0.00	2.71±0.00
	0.10	1.69±0.06	1.74±0.05
	0.05	0.92±0.02	1.00±0.04
	0.01	0.22±0.01	0.26±0.03

BHT: butylated hydroxytoluene.

A.A: ascorbic acid.

Values are mean ± S.E., n=3.

높은 결과를 나타내었다. 따라서 총 페놀성 화합물 및 flavonoid 함량과 DPPH를 이용한 라디칼 소거 활성이 높게 나타난 에탄올 추출물에서 높은 항산화 효능을 나타낸 것으로 사료된다.

간 microsome의 지질과산화 억제 활성 측정

인지질의 불포화지방산은 생체막 구성성분으로서 활성 산소종과 같은 free radical에 의해 과산화 반응이 나타나게 되며, 연쇄적으로 진행된다. 이 free radical에 의한 과산화반응은 전반적으로 세포독성을 초래하여 노화현상, 염증 및 암 등 여러 질환의 원인이 될 수 있다[15]. 과산화물 생성 정도를 나타내는 TBARS 함량은 각 조직 세포의 microsome에 Fe^{2+} /ascorbate를 첨가하여 비효소적으로 유도하여 지질과산화 억제능(%)으로 나타낸 결과, 그라비올라 잎의 용매별 추출물에서 농도 의존적으로 높은 지질과산화 억제활성을 나타내었다(Fig. 2). 에탄올 추출물 1.00%에서 91.62%의 지질과산화 억제능을 나타내었으며, 대조구인 BHT의 지질과산화 억제능은 87.11%를 나

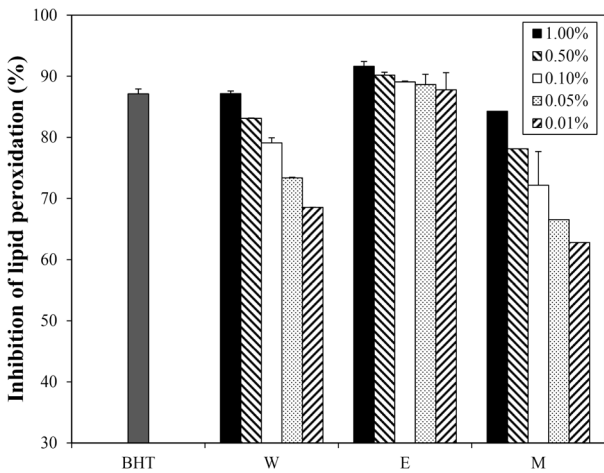


Fig. 2. Antioxidant activities of water (W), ethanol (E), methanol (M) extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf on lipid peroxidation using rat liver homogenate as measured by TBARS method. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean \pm S.E., n=3.

타내어 에탄올 추출물 1.00%에서 BHT보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 에탄올 추출물 0.50%, 0.10%, 0.05% 및 0.01%에서도 90.18%, 89.07%, 88.63% 및 87.77%로 대조구인 BHT보다 높은 활성을 나타내었다. 하지만 에탄올 추출물을 제외한 나머지 수용성 추출물, 메탄올 추출물 경우, 수용성 추출물 1.00%를 제외하고 대조구인 BHT보다 낮은 활성을 나타내어 그라비올라 잎의 에탄올 추출물에서 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 페놀성 화합물 함량이 많으며 DPPH를 이용한 라디칼 소거 활성 및 Fe/Cu 환원력 활성이 높게 나타난 에탄올 추출물에서 우수한 항산화능을 나타내었다.

Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 항산화 활성

불포화 지방산인 linoleic acid를 이용하여 그라비올라 잎의 용매별 추출물과 함께 일주일동안 일정한 온도로 저장하여,

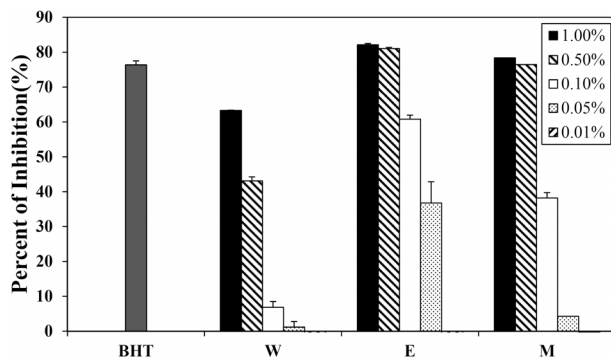


Fig. 3. Antioxidant activities of water (W), ethanol (E), methanol (M) extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf on linoleic acid oxidation as measured by ferric TBA method. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean \pm S.E., n=3.

이 과정에서 나타나는 지질과산화를 TBA법으로 용매별 추출물의 항산화 활성을 측정된 결과를 나타내었다(Fig. 3). 반응 7일째에 대조구에 대한 상대 활성으로 나타난 결과는 농도의존적으로 농도가 높을수록 높은 항산화 활성을 보였으며, 수용성 추출물 1.00%에서 63.29%, 에탄올 추출물 1.00%에서 82.13%, 메탄올 추출물 1.00%에서 78.40%로 에탄올 추출물에서 수용성 추출물과 메탄올 추출물보다 높은 산화 저해율을 나타내었다. 에탄올 추출물과 메탄올 추출물 0.50%는 1.00%와 큰 차이를 나타내지 않았으나, 수용성 추출물 0.50%는 1.00%와 큰 차이를 나타내어 농도가 낮아질수록 낮은 산화 저해율을 나타내었다. 이에 따라 그라비올라 잎의 에탄올 추출물은 항산화 소재의 가능성이 있는 것으로 사료된다.

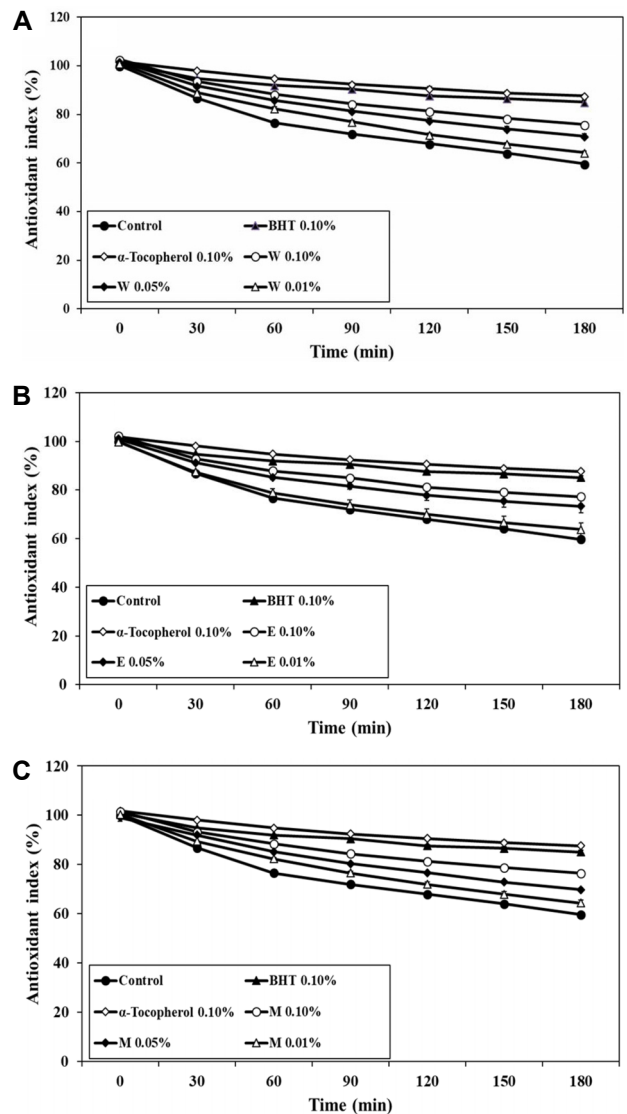


Fig. 4. β -Carotene bleaching assay of water (W) [A], ethanol (E) [B], methanol (M) [C] extracts from *Annona muricata* (Graviola) leaf. BHT: butylated hydroxytoluene. Values are mean \pm S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

β-Carotene bleaching assay 측정

그라비올라 잎의 용매별 추출물의 β-Carotene bleaching assay 측정 결과를 나타내었다(Fig. 4). β-Carotene bleaching assay는 β-Carotene의 황색이 lipid peroxy radical의 첨가에 의하여 탈색화되는 것을 측정하는 방법으로서, β-Carotene 용액은 시간이 흐름에 따라 탈색이 더욱 진행되어 흡광도가 감소하고, 각각의 시료에 대한 다른 탈색정도를 비교한다[8]. 무첨가군(Control)은 시간이 지남에 따라 흡광도의 감소 값이 100.00%에서 59.66%로 크게 나타났다. 양성 대조군(Postive control)인 BHT 0.10%와 α-tocopherol 0.10%은 각각 85.08%, 87.58%로 높은 항산화력으로 처리시간 동안 변화가 거의 없었다. 한편, 그라비올라 잎의 수용성 추출물 0.10%(Fig. 4A), 에탄올 추출물 0.10%(Fig. 4B) 및 메탄올 추출물 0.10%(Fig. 4C)은 각각 75.76%, 77.24% 및 76.51%로 모두 양성 대조군 보다 흡광도가 낮았으나 높은 항산화 효과를 나타내었으며, 농도가 감소함에 따라 흡광도의 감소가 크게 나타났다. 따라서 그라비올라 잎 추출물은 항산화 기전 중 lipid peroxy radical의 억제 능력이 있음을 확인할 수 있었으며, 항산화 소재로서 사용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 동아대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

1. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A.
2. Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3661-3667.
3. Baskar, R., Rajeswari, V. and Kumar, T. S. 2007. *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian J. Exp. Biol.* **45**, 480-485.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
5. Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 1999. Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1131-1136.
6. Cha, J. Y., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2009. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* **19**, 652-658.
7. Choe, S. Y. and Yang, K. H. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 283-288.
8. Choi, J. I., Kim, Y. J., Kim, J. H., Song, B. H., Yoon, Y. H., Byun, M. W., Kwon, J. H., Chun, S. S. and Lee, J. W. 2009. Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 131-135.
9. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
10. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
11. Kim, E. Y., Baik, I. H., Kim, J. H., Kim, S. R. and Rhyu, M. R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 333-338.
12. Kim, J. S., Lee, Y. J., Yang, J. F., Sa, Y. J., Kim, M. O., Park, J. H., Park, D. S., Yu, C. Y. and Kim, M. J. 2013. Biological activity of *Sorghum bicolor* M. cv. Bulgeunjangmoksusu extracts. *Kor. J. Plant Res.* **26**, 111-118.
13. Kim, M. J., Cho, S. Y., Lee, M. K. and Shin, K. H. 2004. Effects of *Aralia elata* water extracts on activities of hepatic oxygen free radical generating and scavenging enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 653-658.
14. Kim, M. J., Chu, W. M. and Park, E. J. 2012. Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1041-1048.
15. Lee, H. J., Lee, B. J., Lee, D. S. and Seo, Y. W. 2003. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **3**, 165-169.
16. Luthringer, C., Rayssiguier, Y., Gueux, E. and Berthelot, A. 1988. Effect of moderate magnesium deficiency on serum lipids, blood pressure and cardiovascular reactivity in normotensive rats. *Br. J. Nutr.* **59**, 243-250.
17. Matsushige, A., Kotake, Y., Matsunami, K., Otsuka, H., Ohta, S. and Takeda, Y. 2012. Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **60**, 257-259.
18. Mattaus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3444-3452.
19. McLaughlin, J. L. 2008. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat. Prod.* **71**, 1311-1321.
20. Moghadamtoushi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M. and Kadir, H. A. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 15625-15658.
21. Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I-The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83-88.
22. Wong, S. F., Holliwell, B., Richmond, R. and Skowronek, W. R. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem.* **14**, 127-134.
23. Yeo, J. S., Chun, S. S. and Choi, J. H. 2014. Antioxidant activities of solvent extracts from *Rosa multiflora*. *J. Life Sci.* **24**, 1217-1223.
24. Zhu, Q. V., Hackman, R. M., Jodilensunsa, X. X., Holt, R. R. and Keen, C. L. 2002. Antioxidative activities of Oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6229-6234.

초록 : 그라비올라 잎 추출물의 이화학적 특성 및 항산화 활성

김영완 · 김태훈 · 안희영 · 조영수*

(동아대학교 생명공학과)

그라비올라(*Annona muricata*) 잎으로부터 정제수, 에탄올, 메탄올로 추출하여 수율, 총 페놀성 화합물과 이에 속하는 flavonoid 함량, 미네랄 함량을 측정하고 DPPH free radical scavenging 활성, Cu/Fe 환원력, 간 조직의 microsome 생체막의 지질과산화 억제능 및 linoleic acid를 이용한 지질과산화, β -Carotene 탈색화 정도를 비교 검토하였다. 그라비올라 잎의 수율은 수용성 추출물이 가장 높았으며(1.76%), 총 페놀성 화합물 함량은 그라비올라의 메탄올 추출물에서 가장 높았으나 페놀성 화합물에 속하는 폴리페놀 함량은 에탄올 추출물에서 가장 높은 결과를 나타내었고, 미네랄 함량은 Ca, K, Mg, Na, Mn의 순으로 높게 측정되었다. DPPH를 이용한 radical 소거능을 측정한 결과, 그라비올라 잎의 에탄올과 메탄올 추출물에서 대조구인 BHT 0.05%와 가장 근접한 활성을 나타내었다. Fe와 Cu의 환원력은 모든 군에서 농도 의존적으로 증가하였고, 그 중 에탄올과 메탄올 추출물에서 Cu/Fe 환원력 활성이 매우 강하였다. 그러나 간 조직을 이용하여 측정하는 지질과산화 억제활성과 TBA법으로 지질과산화를 측정한 결과, 그라비올라 잎의 에탄올 추출물에서 지질과산화 억제능을 보였다. β -Carotene bleaching에서 높은 lipid peroxy radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 그라비올라 잎은 기능성 식품의 개발을 위한 천연 항산화제 소재로서 활용 될 수 있을 것으로 판단되어진다.