



Antioxidant activity of ethanol extract and methanol fractions via column chromatography from *Psidium guajava* Leaf

Byeoung-Kyu Choi

구아바 잎 추출물 및 컬럼크로마토그래피를 이용한 메탄올 분획물의 항산화 활성

최병규

Received: 21 April 2023 / Accepted: 21 June 2023 / Published Online: 3 July 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstracts The antioxidant capacity of the *Psidium guajava* leaf extracted with EtOH and their MeOH fractions using column chromatography were evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging assays, total phenolic and flavonoid content, and Superoxide dismutase (SOD) assay. To determine its utility as a functional material, the crude extract was fractionated by flash column chromatography on ODS using a stepwise elution with combinations of MeOH/H₂O and then all the fractions were also investigated. In the results of antioxidant activities, the 40% and 60% MeOH fractions show the meaningful values, and then the two fractions were selected to examine the isolation and identification of the major constituents via HPLC and nuclear magnetic resonance. Further purification led to isolation of two quercetin derivatives; quercitrin (1) and isoquercetin (2). Through SOD assay, some methanol fractions via column chromatography and isolated compounds showed improved antioxidant activities compared to the extract.

Keywords Antioxidant activities · *Psidium guajava* · Quercetin derivatives

Byeoung-Kyu Choi (✉)
E-mail: choibk4404@dongyang.ac.kr

Department of Bio-convergence Engineering, Dongyang Mirae University, Seoul, Republic of Korea

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.

서론

산화적 스트레스는 호흡 과정에 관여하는 생물학적 연소가 발생하여 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이라고 불리는 유해한 중간 생성물이 생성되고, 체내의 과도한 ROS는 단백질, 지질, DNA에 산화적 손상을 초래하게 된다[1,2]. 세포는 산화적 손상으로 인해 생리학적 시스템의 부분적 또는 전체적인 기능적 손실을 받게 되는데, 이로 인해 발생하는 항산화 방어체계의 불균형으로 노화와 암, 심혈관계 질환, 신경퇴행성 질환, 류마티스 관절염, 동맥경화, 고혈압과 같은 많은 질병의 주요 원인으로 제시되어 왔다[3-5]. 따라서, 신체에서의 산화 균형은 건강한 생물학적 시스템을 유지하기 위한 중요한 개념으로 여겨지게 되어 곡물, 과일, 채소 등 천연 소재로부터의 산화 방지에 대한 연구가 많은 주목을 받고 있으며, 폴리페놀, 플라보노이드, 비타민, 카로티노이드와 같은 활성 산화 방지 화합물에 대한 새로운 천연 바이오 소재를 발굴하기 위한 노력이 이루어지고 있다[6,7].

구아바(*Psidium guajava* L.)는 남아메리카, 유럽, 아프리카, 아시아 등의 열대와 아열대 기후를 가진 국가에서 야생으로 자라는 식물이다[8]. 구아바 잎, 뿌리, 과일은 전통적인 용도로 다양하게 활용하고 있으며 주로 설사, 당뇨병의 예방 및 치료에 사용되어 왔다[9]. 또한, 위장염, 복통, 항산화, 항균, 항염증 작용이 있는 것으로 보고 되고 있다[10]. 최근 건강기능성 식품에 대한 높은 관심으로 구아바는 당뇨병, 고혈압, 비만과 같은 질병을 예방하는 용도로도 활용되고 있다[11]. 구아바 잎에는 catechins, quercetin, rutin, kaempferol, naringenin 및 gallic acid 등과 같은 항산화 활성을 나타내는 다양한 폴리페놀 화합물이 포함되어 있음이 보고 되었다[12]. 다양한 화합물 중 구아바 잎에서 많은 함량을 차지하는 quercetin은 플라보노이드 계열에 속하고 대표적인 식이 항산화제 중 하나로 알려져 있는데,

사과, 차, 양파, 견과류, 베리류, 양배추 등의 일반적인 음식들에서 발견된다[13,14]. 또한, 골다공증, 암, 폐 및 심혈관 질환과 같은 다양한 질병과 노화에 대한 보호작용도 있는 것으로 알려져 있다[15]. 이러한 quercetin 계열 화합물은 일반적으로 식물에서 탄수화물과 결합된 형태로 발견되는데 대표적인 quercetin 화합물로서 rutin (quercetin-3-rutinoside)와 thujin (quercitrin, quercetin-3-L-rhamnoside, 3-rhamnosyl quercetin) 등이 있다[16].

이미 많은 연구 결과를 바탕으로 구아바의 항산화 활성을 확인하였기에 본 연구에서는 구아바 잎 에탄올 추출물과 역상 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 극성에 따른 메탄올 분획물을 확보하였다. 추출물에서부터 용매의 극성에 따라 분리된 분획물들은 각기 다른 화합물들을 포함하고 있다. 따라서, 분획물을 활용하여 화학적 성질에 따른 생리활성을 탐색할 수 있을 뿐만 아니라 효능이 나타나지 않는 화합물이 제거가 될 수 있기 때문에 좀 더 효율적인 효능을 확인할 수 있다는 장점이 있다. 확보한 시료 중 항산화 능력이 우수한 분획물을 선정하고 유효성분을 파악하기 위해 각 분획물들의 항산화 활성을 비교하였다. 이후 항산화 능력이 유효성분으로부터 유래된 것을 확인하기 위해 단일물질, 추출물, 분획물과 비교하여 기능성식품의 원료로서의 사용가능 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 구아바 잎 파우더는 고품차 형태로 판매되는 국산 구아바 잎 100%를 온라인 쇼핑몰을 통해 구입하였다. 항산화 능력 비교를 위해 표준물질 ascorbic acid, gallic acid, quercetin을 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항산화 능력 평가를 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 및 Folin-Ciocalteu's reagent는 Sigma-Aldrich, EZ-SOD assay kit는 Dogenbio에서 구입하여 사용하였고, 항산화 활성, 추출 및 물질 분리를 위한 유기용매는 Sigma-Aldrich와 덕산약품에서 구입하였다.

추출 및 분획

구아바 잎 파우더 20 g에 100% 에탄올을 500 mL을 첨가하여 1시간 동안 상온에서 교반 추출하고 여과한 후 회전증발농축기 (Rotavapor R-100, BUCHI, Essen, Germany)에서 감압 농축하

여 구아바 잎 에탄올 추출물을 얻었다. 추출물에 대하여 ODS resin (12 nm, S-75 μ m, ODS-A, YMC Co.)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 실시하였으며, 메탄올:물, 2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 10:0 (v/v)로 각 용매 당 100 mL를 단계적으로 용리하였다. 극성에 따라 5개의 분획으로 나눈 용리액을 감압 농축하여 항산화 활성 시료로 준비하였다(Fig. 1).

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법을 참고하여 측정하였다 [17]. 메탄올을 용매로 0.004% DPPH 용액을 제조하였다. DPPH 용액 190 μ L와 시료 10 μ L를 넣어 교반한 뒤 암실에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (BioTek Synergy HTX, Agilent Technologies, Inc., CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 음성대조군은 시료 대신 시료를 녹인 용매를 사용하였고, 양성대조군은 ascorbic acid를 이용하여 시료와 같은 방법으로 진행하였다. DPPH 라디칼 소거능 결과는 IC₅₀값으로 산출했으며, IC₅₀값은 음성대조군 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 의미한다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Fellegrini 등의 방법을 수정하여 측정하였다[18]. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 증류수를 용매로 혼합하여 24시간 동안 암실에서 반응시키며 ABTS 라디칼을 형성시킨다. 실험에 사용하기 위해 ABTS 라디칼 용액의 흡광도 값이 1.0 이하가 되도록 에탄올로 희석하였다. 조제한 ABTS 용액 190 μ L와 시료 10 μ L를 혼합하여 빛을 차단하여 10분간 방치한 다음 ELISA reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 음성대조군은 시료 대신 시료를 녹인 용매를 사용하였고, 양성대조군은 ascorbic acid를 이용하여 시료와 같은 방법으로 진행하였다. ABTS 라디칼 소거능 결과는 IC₅₀값으로 산출했으며, IC₅₀값은 음성대조군 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 의미한다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법을 이용하여 측정하였다 [19]. 시료 10 μ L와 Folin-Ciocalteu's reagent 10 μ L를 가하여 진탕하고 3분간 방치한 다음 10% Na₂CO₃ 용액 150 μ L를 섞어 1시간 후 ELISA reader를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였으며, gallic acid equivalent (mg GAE eq/g)로 표시하였다.

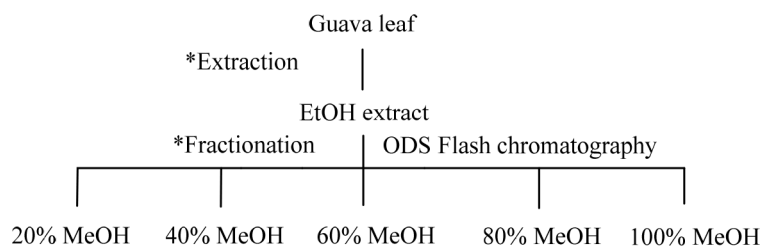


Fig. 1 Scheme for the fractionation from the Guava leaf

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno의 방법을 이용하여 측정하였다[20]. 농도별로 희석된 시료 20 µL와 80% 에탄올 172 µL, 10% aluminium nitrate 4 µL, 1M potassium acetate 4 µL를 각각 추가하여 40분간 실온에서 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin를 사용하여 표준 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였으며, quercetin equivalent (mg QE/g)로 표시하였다.

화합물 분리 및 구조결정

40, 60% 메탄올 분획물을 역상 HPLC (Column: YMC-ODS-A, 5 µm, 4.6×250 mm, 검출기: UV detector)로 정제하여 2종의 화합물 quercitrin (1), isoquercetin (2)을 얻었다. HPLC 분석은 gradient elution으로 수행하였으며, 이동상 용매는 증류수 (solvent A)와 메탄올 (solvent B)을 사용하였다. 용매 A, B를 70:30 (% , v/v)로 설정하여 안정화를 시켜주고 이후 30분까지 30:70의 용매조성으로 물질을 분석하였으며 10분간 washing 해주었다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 360 nm에서 화합물을 검출하였다. 360 nm 파장 영역에서 20.4, 23.3분에서 의미 있는 피크를 확인할 수 있었다. 두 피크를 시험관에 받아 단일물질로 분리하여 회전증발농축기로 감압농축하였다. 두 단일물질의 ¹H NMR 스펙트럼은 숙명여자대학교 공동기기실 Bruker 500 MHz FT-NMR Spectrometer (AvanceIII HD500, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany)을 활용하였고, LCMS system (1260 infinity, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 질량을 분석하였다.

항산화 효소(Superoxide dismutase, SOD) 활성 측정

항산화효소 활성은 EZ-SOD assay kit를 활용하여 측정하였다. 구입한 kit에 들어있는 설명서에 따라 시료 well, Blank 2에 20 µL씩 넣어주고 Blank 1와 Blank 3에는 시료를 녹인 용매를 20 µL씩 넣어주었다. 모든 well에 WST working solution 200 µL를 넣어주고 Blank 2와 3에는 Dilution buffer를 20 µL 넣었다. 그 후 효소 활성을 확인하기 위해 시료 well과 Blank 2에 Enzyme working solution을 20 µL 넣어 준 후, 37°C에서 20분간 반응시켜주었다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank 1의 흡광도가 0.7보다 낮게 나오는 경우 반응 시간을 늘린 후 재측정한다.

통계처리

모든 실험결과는 3회 이상의 반복 실험을 실시하여 분석한 후 그 평균값으로 나타내었다. 통계분석은 SPSS package program (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 검증한 후 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

구아바 잎 에탄올 추출물 및 분획물의 항산화 활성

구아바 잎 분말을 에탄올로 추출한 물질의 항산화 효과를 확인

Table 1 IC₅₀ of DPPH and ABTS radical scavenging activity of the *P. guajava* leaf ethanol extract and MeOH fractions

Samples	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	
	DPPH	ABTS
Ethanol extract	25.77±0.35 ^d	21.67±0.57 ^d
20% Methanol fraction	23.37±0.53 ^e	30.53±0.11 ^c
40% Methanol fraction	32.13±0.66 ^c	31.54±0.74 ^c
60% Methanol fraction	39.16±0.35 ^b	18.79±0.99 ^e
80% Methanol fraction	63.03±0.64 ^a	54.46±0.86 ^b
100% Methanol fraction	63.74±1.78 ^a	60.09±1.20 ^a
Ascorbic acid ²⁾	4.71±0.03	2.33±0.02

All values are mean ± SD. Values not sharing a common letter (a-e) are significantly different among groups ($p < 0.05$)

¹⁾The concentration in µg/mL required for 50% reduction of DPPH and ABTS radical.

²⁾Positive control

Table 2 Total polyphenolic and flavonoid contents of the *P. guajava* leaf ethanol extract and MeOH fractions

Samples	Total polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg QE ²⁾ /g)
20% Methanol fraction	24.45±3.03 ^c	0.58±0.07 ^d
40% Methanol fraction	39.53±4.40 ^a	1.29±0.05 ^a
60% Methanol fraction	28.37±2.42 ^b	1.34±0.08 ^a
80% Methanol fraction	20.03±3.39 ^e	1.04±0.04 ^b
100% Methanol fraction	12.81±4.03 ^d	0.91±0.07 ^c

All values are mean ± SD. Values not sharing a common letter (a-d) are significantly different among groups ($p < 0.05$)

¹⁾GAE: gallic acid equivalents

²⁾QE: quercetin equivalents

하기 위해 라디칼 소거 활성을 측정하였고, 이후 추출물을 ODS 컬럼 크로마토그래피로 분획물을 조제하여 항산화 능력 활성을 측정한 결과는 Table 1, 2와 같다. 구아바 잎 에탄올 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 평가에서 IC₅₀값은 각각 25.77±0.35과 21.67±0.57 µg/mL를 나타내어 우수한 항산화력을 확인하였다. 추출물로부터 확보한 메탄올 분획물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량을 확인한 결과, DPPH 라디칼 소거 활성 IC₅₀값은 20%, 40% 메탄올 분획물이 각각 23.37±0.53, 32.13±0.66 µg/mL로 눈에 띄는 항산화 활성을 나타냈고, ABTS 라디칼 소거 활성 IC₅₀값은 60% 메탄올 분획물이 18.79±0.99 µg/mL로 가장 강력한 항산화 활성을 보였다. 총 폴리페놀 함량은 40% 메탄올 분획물이 39.53±4.40 mg GAE/g으로 가장 높게 측정이 되었고, 총 플라보노이드 함량은 40, 60% 메탄올 분획물이 각각 1.29±0.05 mg QE/g, 1.34±0.08 mg QE/g로 측정되었다. 이에 40, 60% 메탄올 분획물에서 항산화 활성을 나타내는 화합물이 함유되어 있음을 확인하고, 2개의 분획물을 혼합하여 활성 물질 분리 및 구조 동정 수행을 위해 각 분획물의 nuclear magnetic resonance (NMR) 데이터 분석을 진행하였다.

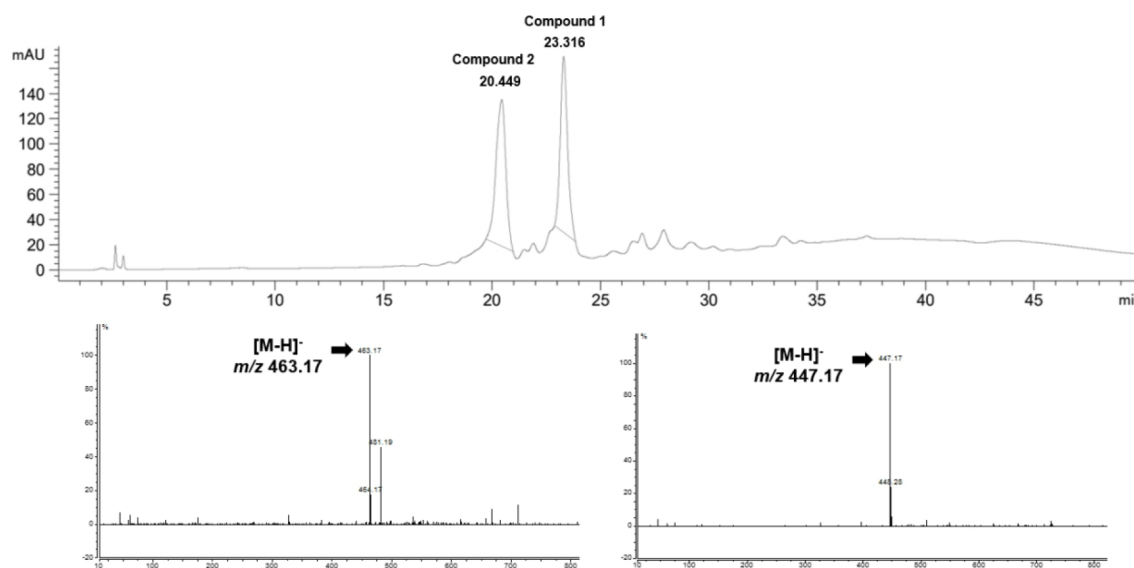


Fig. 2 HPLC chromatogram of the combined 40%, 60% MeOH fraction and MS spectra of two major compounds. Quercitrin (1), Isoquercetin (2)

화합물 분리 및 구조결정

구아바 잎 에탄올 추출물로부터 ODS gel을 충전제로 이용한 컬럼크로마토그래피를 수행하여 메탄올 분획물을 확보하였고, 항산화 활성 및 HPLC 분석을 통해 40, 60% 메탄올 분획물을 선정하여 HPLC를 진행하였다. 40, 60% 메탄올 분획물에서 분리 가능한 화합물을 모두 확보하기 위해 두 분획물을 혼합하여 진행하였고 2종의 주요 피크를 확인하였다. 분리된 화합물은 ^1H NMR과 LRMS 스펙트럼을 측정 후 문헌과 비교하여 구조를 동정하였다(Fig. 2).

화합물 1은 노란색의 분말 형태로 분리되었으며, LRMS 스펙트럼 측정 결과 m/z 447.17 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 에서 ion peak를 확인하였다. 화합물 1의 ^1H NMR 스펙트럼을 분석한 결과, 6-8 ppm 사이에서 aromatic ring으로 예상되는 peak 5개를 확인할 수 있었다. 또한, 3-5.5 ppm 사이에서 5개의 peak를 확인할 수 있었고, 1 ppm 근처에서 doublet 메틸 peak를 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼의 aromatic proton 영역에서 벤젠고리 유래의 ABX type proton signals (δ_{H} 6.91, 7.31, 7.34)을 관찰하였다. H-5' (δ_{H} 6.91)와 H-6' (δ_{H} 7.31)은 $J=8.3$ Hz로 서로 o -coupling하고 있는 doublet, H-2' (δ_{H} 7.34)와 H-6' (δ_{H} 7.31)은 $J=2.1$ Hz로 서로 m -coupling하고 있는 doublet으로 해석할 수 있었다. 추가적으로, H-6 (δ_{H} 6.20)와 H-8 (δ_{H} 6.37)은 $J=2.1$ Hz로 서로 m -coupling하고 있는 doublet을 확인하였다. 3-5 ppm 영역에서 anomeric proton signal로 예측되는 δ_{H} 5.35 (H-1'')를 관찰하였고, 당에 해당하는 4개의 proton signals (δ_{H} 4.22, 3.74, 3.42, 3.35)을 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼으로 해석한 구조를 바탕으로 flavonoid ring구조와 한 개의 당이 존재함을 예상할 수 있었다. 구아바 추출물을 활용한 유효성분 탐색 연구 논문들을 확인하여 다양한 quercetin 화합물들이 분리된 것을 알 수 있었고, doublet 메틸인 δ_{H} 0.94 (H-6'') 신호를 바탕으로 당의 형태가 rhamnose로 확인하였다. 검색한 논문들의 화합물들과 분리한 물질의 데이터를 비교한 결과 분리한 물질이 quercitrin임을 알 수 있었다 [21].

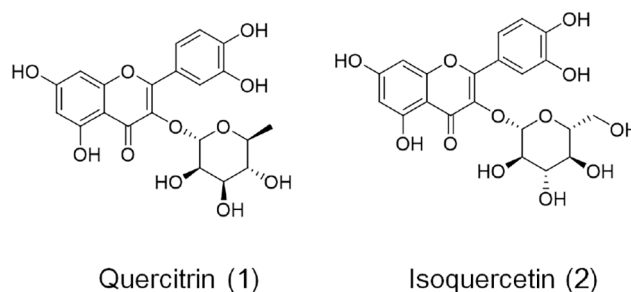


Fig. 3 The structures of compounds isolated from the methanol fractions of *P. guajava*

Quercitrin (1): Yellow powder, LRMS m/z 447.17 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_{H} 7.34 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), δ_{H} 7.31 (1H, dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, H-6'), δ_{H} 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), δ_{H} 6.37 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), δ_{H} 6.20 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), δ_{H} 5.35 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1''), δ_{H} 4.22 (1H, m, H-2''), δ_{H} 3.74 (1H, dd, $J=9.4, 3.4$ Hz, H-3''), δ_{H} 3.42 (1H, m, H-5''), δ_{H} 3.35 (1H, m, H-4''), δ_{H} 0.94 (3H, d, $J=6.1$, H-6'') (Fig. 3).

화합물 2는 노란색의 분말 형태로 분리되었으며, LRMS 스펙트럼 측정 결과 m/z 463.17 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 에서 ion peak를 확인하였다. 화합물 2의 ^1H NMR 스펙트럼을 분석한 결과, 화합물 1과 마찬가지로 벤젠고리 유래의 ABX type proton signals과 당 특이적인 peak를 확인할 수 있었다. 반면, 화합물 1과의 차이점은 doublet 메틸이 사라지고 3-4 ppm 사이에 signal이 추가된 것을 확인하였다. 화합물 1에서의 aromatic pattern은 거의 유사한 것으로 보아 quercetin 화합물인 것으로 예상하였고, 검색한 논문들의 화합물들과 분리한 물질의 데이터를 비교한 결과 분리한 물질이 isoquercetin임을 알 수 있었다[22].

Isoquercetin (2): Yellow powder, LRMS m/z 463.17 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_{H} 7.71 (1H, d, $J=2.2$

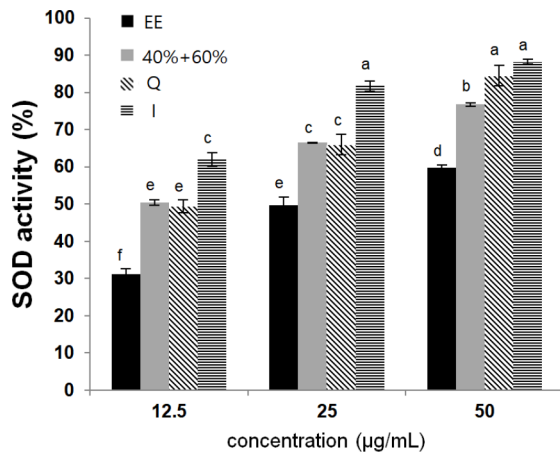


Fig. 4 The effect of EtOH extract, combined 40%, 60% MeOH fraction, and quercetin derivatives isolated the MeOH fractions on the superoxide dismutase (SOD) activity. Values are presented as mean±standard error in three independent experiments. EE: EtOH extract, 40%+60%: Fraction Combined 40% MeOH fraction with 60% MeOH fraction, Q: quercitrin, I: Isoquercetin. Values not sharing a common letter (a-e) are significantly different among groups ($p < 0.05$)

Hz, H-2'), δ_H 7.58 (1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz, H-6'), δ_H 6.87 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), δ_H 6.38 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), δ_H 6.20 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), δ_H 5.24 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1"), δ_H 3.72, 3.57 (2H, dd, $J=11.9, 2.3$ Hz, H-6"), δ_H 3.49 (1H, m, H-5"), δ_H 3.43 (1H, m, H-2"), δ_H 3.35 (1H, m, H-3"), δ_H 3.23 (1H, m, H-4") (Fig. 3).

구아바 추출물, 분획물 및 단일물질의 Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정 비교

생리학적인 과정에 관여하는 활성산소 중 슈퍼옥사이드 라디칼은 DNA, 단백질 및 기타 생물학적 분자를 손상시키는 것으로 알려져 있다. 생체는 매우 강력한 산화제인 슈퍼옥사이드를 제거하여 세포 손상을 막는 항산화 방어시스템을 가지고 있는데 그 중 SOD 효소는 슈퍼옥사이드 라디칼을 과산화수소 및 산소 분자로 분해하는 것을 촉매한다[23]. 본 실험에서는 앞선 DPPH, ABTS, total phenol 및 total flavonoid에서 높은 항산화력을 가진 추출물을 선정하였고, 이를 바탕으로 생체 내에서 일어나는 산화적 스트레스를 효과적으로 제거할 수 있는지를 확인하기 위해 SOD 활성을 추가적으로 측정 및 비교하였다. SOD 활성은 구아바 잎의 에탄올 추출물, 40% 메탄올 추출물과 60% 메탄올 추출물을 합친 추출물, 그리고 40, 60% 분획물의 주요 화합물 중 2종을 활용하였다. 그 결과, 구아바 잎의 모든 시료에서 SOD 활성도가 나타났고, 에탄올 추출물에서 단일물질로 점차 정제가 될수록 SOD 활성이 유의적으로 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 40, 60% 혼합 메탄올 분획물과 quercitrin의 SOD 활성이 농도 별로 비슷한 결과값을 얻을 수 있었고, isoquercetin이 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도에서 가장 높은 활성도를 나타냈다(Fig. 4). 물질분리 과정에서 isoquercetin의 양이 후에 분리된 quercitrin의 양보다 적게 분리되었고, 더 강한 항산화력을 나타내기 위해서는 isoquercetin의 함량의 증가가 필요

하다고 예측되었다. 본 실험을 통해 추출물로부터 얻어진 분획물들의 항산화 활성이 각기 다르게 측정되었고, 가장 우수한 측정값을 보인 분획물의 항산화 능력은 주요성분인 quercitrin, isoquercetin에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 추출물에서의 다양한 구성 성분의 복합성으로 인하여 정확한 활성의 능력을 알기 어렵다. 그러므로, 시료에 따라 유효성분을 파악하여 적절한 분획법을 사용한다면 경제적이고 더 효율적인 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

초 록

본 실험에서는 에탄올로 추출한 *Psidium guajava* 잎과 껌껌크로마토그래피를 이용한 메탄올 분획물의 항산화 능력을 측정하기 위해 DPPH, ABTS 라디칼소거능법, 총 페놀, 플라보노이드법, SOD assay법을 활용하였다. 항산화 활성 결과에서 40, 60% 메탄올 분획물이 의미있는 측정값을 나타냈고, 두 분획물을 선정하여 HPLC와 핵자기공명(NMR)을 활용한 화학적 분석을 통해 주요 성분의 분리 및 물질탐색을 진행하였다. HPLC 정제를 통해 quercitrin (1)와 isoquercetin (2) 두 종류의 quercetin 유도체를 분리 및 구조 동정하였다. SOD assay 결과에서 껌껌크로마토그래피법을 활용하여 얻은 몇몇의 분획물과 단일물질로 분리한 화합물들은 추출물보다 향상된 항산화 활성을 보였다.

Keywords 구아바 잎 · 퀘세틴 유도체 · 항산화 활성

감사의 글 본 연구는 한국연구재단 기본연구지원사업 (과제번호 2022R1F1A1062230)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

References

- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem* 57(5): 1768–1774. doi: 10.1021/jf803011r
- Temple NJ (2000) Antioxidants and Disease: More Questions than Answers. *Nutr Res* 20(3): 449–459. doi: 10.1016/S0271-5317(00)00138-X
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. *Nature* 408: 239–247. doi: 10.1038/35041687
- Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects. *J Funct Foods* 18: 820–897. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018
- Xirley Pereira N, Fabrício Souza S, Jackson Roberto Guedes da SA (2012) Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. *IntechOpen* pp 1–20. doi: 10.5772/26956
- Somogyi A, Rosta K, Pusztai P (2007) Antioxidant Measurements. *Physiol Meas* 28(4): 41–55. doi: 10.1088/0967-3334/28/4/R01
- Thompson LU (1994) Antioxidants and Hormone-Mediated Health Benefits of Whole Grains. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34: 473–497. doi: 10.1080/10408399409527676
- Gutiérrez RM, Mitchell S, Solis R (2008) *Psidium guajava*: a Review of its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *J Ethnopharmacol* 117(1): 1–27. doi: 10.1016/j.jep.2008.01.025
- Arima H, Danno G (2002) Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and Their Structural Elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66(8): 1727–1730. doi: 10.1271/bbb.66.1727

10. Biswas B, Rogers K, McLaughlin F (2013) Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Int J Microbiol* 746165. doi: 10.1155/2013/746165
11. Verma AK, Rajkumar V, Banerjee R (2013) Guava (*Psidium guajava* L.) Powder as an Antioxidant Dietary Fibre in Sheep Meat Nuggets. *Asian-Australas J Anim Sci* 26(6): 886–895. doi: 10.5713/ajas.2012.12671
12. Seo J, Lee S, Elam ML (2014) Study to Find the Best Extraction Solvent for Use with Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) for High Antioxidant Efficacy. *Food Sci Nutr* 2(2): 174–180. doi: 10.1002/fsn3.91
13. Naseer S, Hussain S, Naeem N (2018) The Phytochemistry and Medicinal Value of *Psidium guajava* (guava). *Clin Phytoscience*. 4(1): 32–39. doi: 10.1186/s40816-018-0093-8
14. Zhang M, Swarts SG, Yin L (2011) Antioxidant Properties of Quercetin. *Adv Exp Med Biol* 701: 283–289. doi: 10.1007/978-1-4419-7756-4_38
15. Okamoto T (2005) Safety of Quercetin for Clinical Application. *Int J Mol Med* 16(2): 275–278. doi: 10.3892/ijmm.16.2.275
16. Lakhnupal P (2007) Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet J Medical Update* 2(2): 20–35. doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851
17. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200. doi: 10.1038/1811199a0
18. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3- ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379–389. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99037-7
19. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243. doi: 10.1016/S0021-9258(18)88697-5
20. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109–114. doi: 10.1016/s0378-8741(99)00189-0
21. Tsatsop Tsague RK, Kenmogne SB, Djiobie Tchienou GE (2020) Sequential extraction of quercetin-3-O-rhamnoside from *Piliostigma thonningii* Schum. leaves using microwave technology. *SN Appl Sci* 2(7): 1230–1246. doi: 10.1007/s42452-020-3031-6
22. Heřmanková-Vavříková, E, Křenková A, Petrásková L (2017) Synthesis and Antiradical Activity of Isoquercitrin Esters with Aromatic Acids and Their Homologues. *Int J Mol Sci* 18(5): 1074–1087. doi: 10.3390/ijms18051074
23. Park A, Lee YJ, Kang N, Kang D-H, Heo SJ (2022) Antioxidant efficacy of Jeju crop extracts using Jeju lava seawater as a solvent. *J Plant Biotechnol* 49: 347–355. doi: 10.5010/JPB.2022.49.4.347