

## 감잎(柿葉)의 항산화 성분 분리

신 두 호

중경공업전문대학 식품공업과

### Separation of Antioxidant compounds from Persimmon Leaves

Shin, Doo-Ho

*Dept. of Food Technology, Joong Kyoung Technical Junior College*

(Received Jan., 15, 1997)

#### ABSTRACT

This study was carried out to separate and identify the antioxidative substances in persimmon leaves. The antioxidative substances in persimmon leaves were extracted by methanol. The extract was fractionated by SEP-PAK cartridge column. From these results five fractions(F-I~V) were obtained. Antioxidative activity of each fractions was examined by the DPPH method. The F-II, III and IV showed antioxidative activity and among them F-II and F-III showed the strongest. Five fractions were separated by TLC using ethylacetate : chloroform : formic acid : H<sub>2</sub>O(8 : 1 : 1 : 1 v/v) as the solvent. From these results were obtained spots of R<sub>f</sub> 0.71, 0.35 and 0.25. This spots were scraped from the plate and extracted by methanol. The extracts thus obtained were used for examination of identify by TLC, UV/VIS-spectrophotometer and HPLC. Among them spot of R<sub>f</sub> 0.71 were demonstrated to catechin and the spots of R<sub>f</sub> 0.35 and 0.25 was suggested to polyphenol substances.

#### I. 서 론

감나무(Diospyros Kaki Thumb.)는 우리나라 중부이남 지역에서 널리 재배되고 있다. 감 및 잎의 이용은 꽃감, 수정과, 감식초, 감잎차 등의 가공품이 있으며 특히 감꼭지는 딸꾹질을 막아주고 감잎은 혈압을 내려주는 약리 작용이 있다고하여 한방에서 고혈압증 및 혈소판 감소증 치료로 이용되고 있다<sup>1)</sup>. 감은 다른 과실과는 달리 독특한 떫은 맛을 갖고 있으며 그 성분은 탄닌류로서 Gallic acid, Catechins, Tannin acid, Leucoanthocyanin 등을 함유하고 있고 항산화작용이 있음이 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. 그러나 감잎 추출물의 항산

화력과 항산화 성분에 대한 연구보고는 별로 없는 것 같다. 따라서 본 실험에서는 감잎의 항산화 성분의 존재를 확인하기 위하여 감잎의 항산화 성분을 메탄올로 추출하여 항산화력을 측정하고 항산화 성분을 분리, 동정하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

#### II. 재료 및 방법

##### 1. 실험 재료

감잎은 충남 부여지역에서 1996년 6월 초순에 채취한 것을 증기로 데친후 음건하였다. 건조시료는 80mesh로 분쇄하여 냉장고에 보관하여 시료로 사용했다.

## 2. 실험 방법

## 1) 항산화 물질 추출

건조 분말 시료 3g을 10배량의 80%메탄올을 가하여 80°C에서 20분간 가열한 후 여과하였다. 다시 잔사에 대하여 같은 조작을 3회 반복 추출, 여과한 후 여액을 합하여 30°C에서 감압 증발시킨후 증류수 100mL로 용해하였다. 그리고 동량의 chloroform을 가하여 가용성 물질을 추출(3회) 제거한 후 동량의 ethyl acetate로 추출(3회)하였다. 추출 ethyl acetate를 모두 합하여 감압 농축을 한 후 메탄올 5ml로 용해하였다<sup>4,5)</sup>.

## 2) 항산화활성 측정

항산화 활성은 다음과 같이 측정하였다. 즉 DPPH 용액 (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 16mg/99.5% 에탄올 100mL)을 에탄올로 희석하여 UV/VIS-spectrophotometer(UV-160, Shimadzu, Japan)로 517nm에서 흡광도가 0.96~0.97이 되도록 조정하였다. 이 DPPH 용액 4mL를 취하여 시료 용액 일정량을 가하고 5초간 진탕후 517nm에서 흡광도 변화를 5분간 측정하여 분당 흡광도 변화율( $\Delta$ Abs/min)을 구하고 factor 100을 곱해서 항산화 활성도로 나타냈다.

## 3) 항산화 성분의 분리 및 확인

## (1) SEP-PAK에 의한 항산화성분 분획

SEP-PAK(silica cartridge colum, Waters社製)에 농축시료 1mL를 흡착시킨 후 ① ethyl acetate, ethyl acetate와 메탄올 혼합액(② 75:25, ③ 50:50, ④ 25:75)그리고 ⑤ 메탄올 각각 1mL로 차례로 용출시켜 분취한 F-I, F-II, F-III, F-IV, F-V에 대하여 항산화활성을 측정하였다<sup>5)</sup>.

## (2) TLC에 의한 항산화성분 분리 및 동정

SEP-PAK에 의해 분획하여 얻은 획분을 TLC plastic plate(Kieselgel 60, Merk社製) 위에 점적하여 용매로 전개시킨 다음 발색제로 발색시킨후 표준물질의 Rf치와 비교하여 동정하였다. 전개 용매는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : H<sub>2</sub>O=8:1:1:1을 사용했다. 그리고 발색제는 0.3% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>와 0.3% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 용액을 동량 혼합한것(polyphenol류에는 청색으로 발색)과 바니린 염산용액(1% Vanilin ethanol용액 : 농염산=5:3의 비율로 사용적

전에 혼합, catechin류에서는 홍색으로 발색)을 사용했다<sup>4),5)</sup>.

## (3) UV-흡수 spectrum에 의한 동정

TLC에 의해 분취한 활성 성분을 메탄올로 용해하여 UV/VIS-spectrophotometer(UV-160, Shimadzu, Japan)로 200~400nm의 범위에서 흡수 특성을 측정하여 표준물질과 비교하였다.

## (4) HPLC에 의한 동정

감압 메탄올 추출용액을 TLC plastic plate(Kieselgel 60F254, Merck社製)위에 점적하고 상기와 같은 방법으로 전개시킨후 UV lamp(254nm)로 조사하여 발색 band를 각각 분취하였다. 분취한 것을 50mL 메탄올로 추출한후 여과하여 3mL로 감압 농축하였다<sup>5,9)</sup>.

HPLC의 분석 조건은 Table 1 과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of tannin compounds in Persimmon Leaves extracts

Instrument	SYCAM Liquid chromatography
Colum	ODS2
Solvent	H <sub>2</sub> O:MeOH:Acetic acid=55:30:15
Detector	UV 280nm
Flow rate	1 mL/min
Injection vol.	20 $\mu$ L

## III. 결과 및 고찰

## 1. DPPH법에 의한 항산화활성 측정

감압 메탄올 추출액을 농축한후 증류수를 가하여 용해시키고 chloroform으로 세척하고 항산화 물질을 ethyl acetate로 추출하여 농축한 용액을 SEP-PAK에 의해 용출시켰다. 각 용출 분획을 DPPH 용액에 대한 수소 공여능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. F-II, F-III, F-IV 분획에서 DPPH 용액에 대한 환원성을 나타내어 항산화 성분을 함유하고 있음을 알 수 있었으며 이중에서 F-II, F-III 분획의 것이 환원성이 가장 높아 항산화활성이 가장 강함을 알 수 있었다. 이<sup>10)</sup>와 최<sup>11)</sup>는 항산화 활성과 DPPH 용액에 대한 환원성은 비례한다고 보고하였다.

Table 2. Antioxidant activity of fractions isolated by SEP-PAK silica cartridge colum

Procedure	Antioxidant activity( $\Delta$ Abs /min $\times$ 100)
SEP-PAK cartridge colum chromatography	
F-I. eluate with ethyl acetate	0.77
F-II. eluate with ethylacetate : MeOH(75:25)	6.03
F-III. eluate with ethylacetate : MeOH(50:50)	6.86
F-IV. eluate with ethylacetate : MeOH(25:75)	4.01
F-V. MeOH	2.03
Extraction	
1. extract with ethylacetate	19.84
Control	
1. 100ppm BHT	3.53
2. 100ppm Vit. E	11.49
3. Blank	0.17

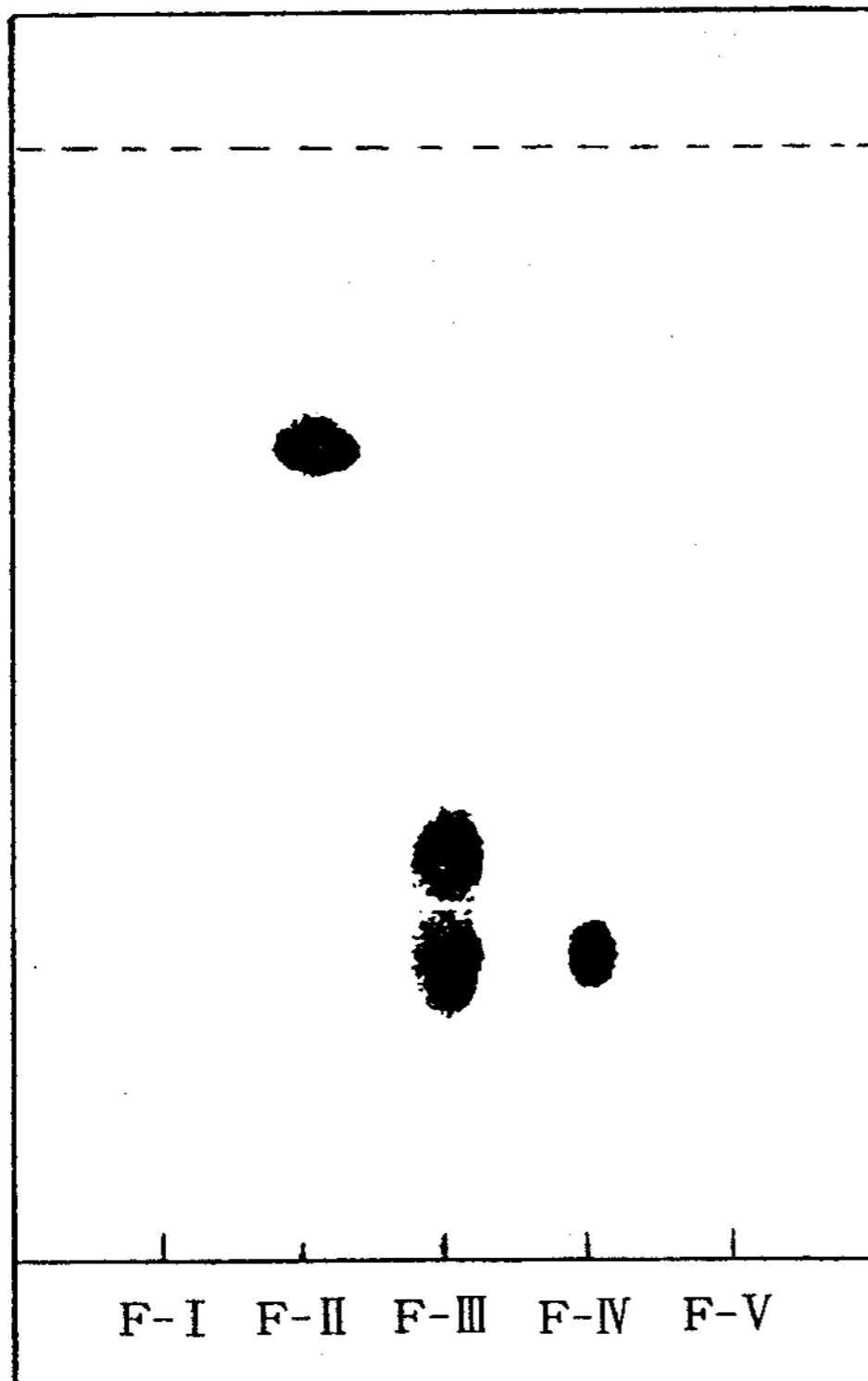


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of the isolated fractions by SEP-PAK cartridge colum.

2. TLC에 의한 분리 및 확인

각각의 용출 분획에서 항산화물질을 분리해내기 위해 TLC plate에 전개시킨후 0.3% potassium ferricyanid-ferric chloride 혼합용액으로 발색을 시킨 결과는 Fig. 1과 같다. F-II 분획에서 Rf 0.71, F-III 분획에서 Rf 0.35, 0.25 그리고 F-IV 분획에서 Rf 0.25의 spot 들이 관찰되었다. 따라서 이들 spot들이 어떤 종류의 탄닌인지를 확인하기 위하여 Kieselgel 60F<sub>254</sub> plate에 점적하여 전개시킨후 UV lamp로 조사하여 발색 spot Rf 0.71, 0.35, 0.25를 각각 분취하였다. 이들을 메탄올로 추출하여 소량으로 농축을 한 후 kieselgel 60 plate에 전개하여 발색시켜 표준물질의 Rf치와 비교하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 Rf 0.71의 것은 표준물질의 catechin(Rf 0.72)과 gallic acid(Rf 0.72)의 Rf치와 서로 비슷하여 구별을 할 수 없었다. 따라서 이들을 구별하기 위해 能勢<sup>4)</sup>, 신<sup>5)</sup>의 방법으로 발색을 시킨 결과 0.3% potassium ferricyanid-ferric chloride 용액에서는 모두 청색으로 착색되었다. 그러나 1% vanilin 염산 용액에서는 Rf 0.71과 catechin은 홍색으로 착색되고 gallic acid는 착색되지 않아 catechin 임이 확인되었다. 그리고 Rf 0.25와 0.35의 것은 확인을 할 수 없었으나 청색으로 착색을 일으키는 것으로 보아 polyphenol류의 한 종

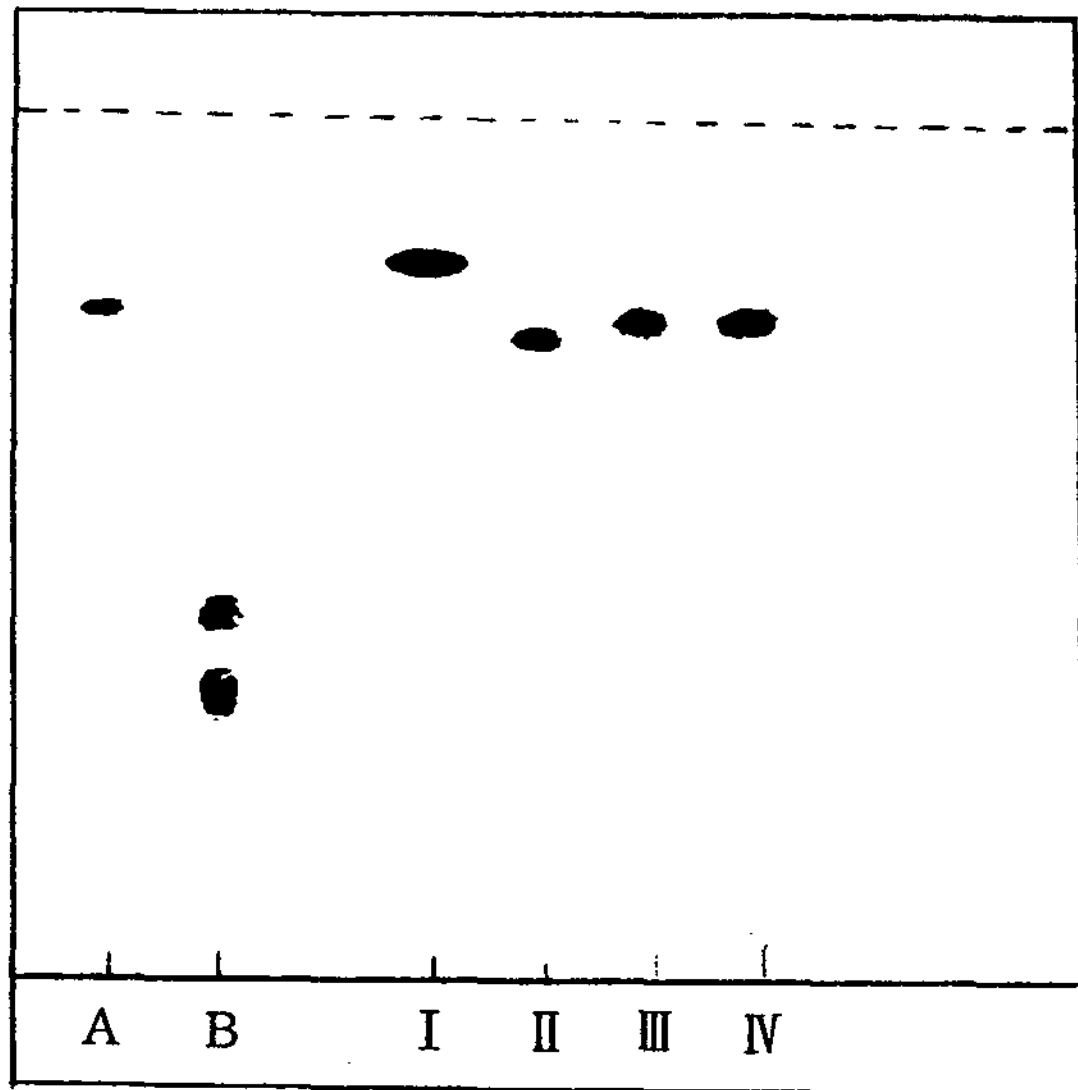


Fig. 2. Thin Layer Chromatogram of F- II, F- III and standard tannins.  
 A : F- II      B : F- III  
 I : caffeic acid    II : epicatechin  
 III : gallic acid    IV : catechin

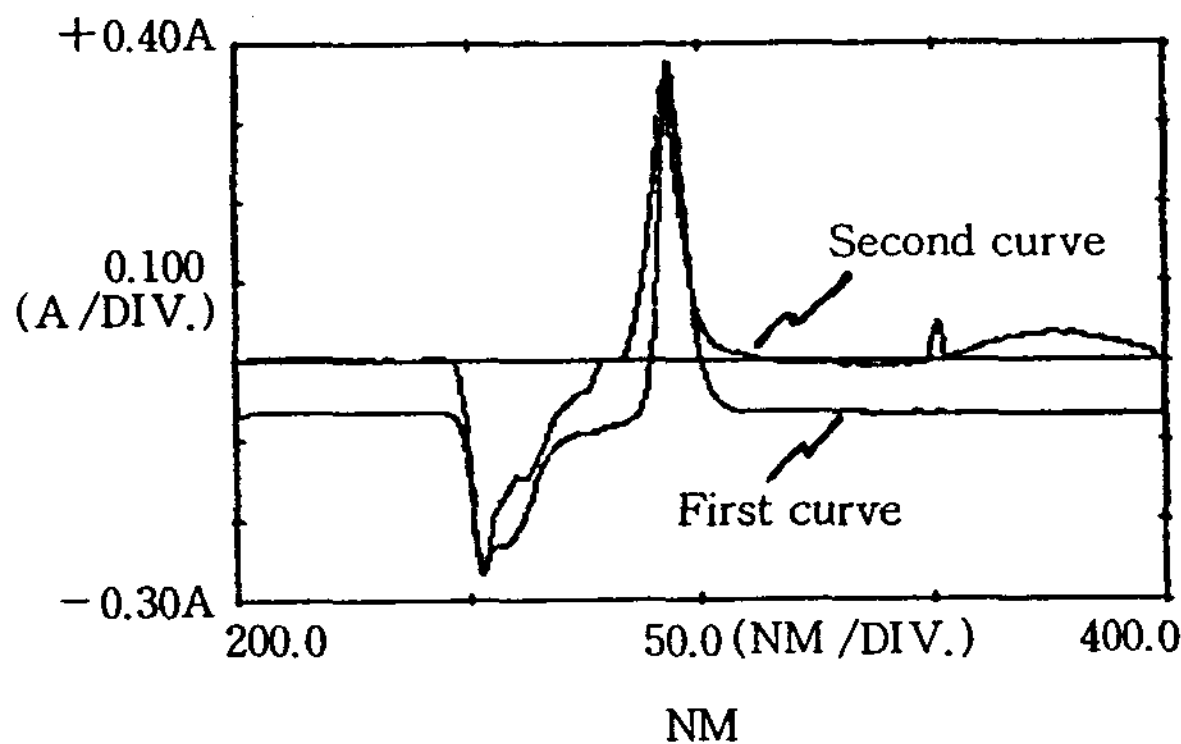


Fig. 3. UV absorption spectra of standard catechin and spot F- II.  
 First curve : standard catechin  
 Second curve : spot F- II (Rf 0.71)

류에 속하는 것으로 추정되었다.

3. UV-spectrum 및 HPLC에 의한 확인

TLC에 의해 분취된 Rf 0.71의 항산화 성분의 최대 흡수파장을 측정하여 표준물질 catechin과 비교한 결

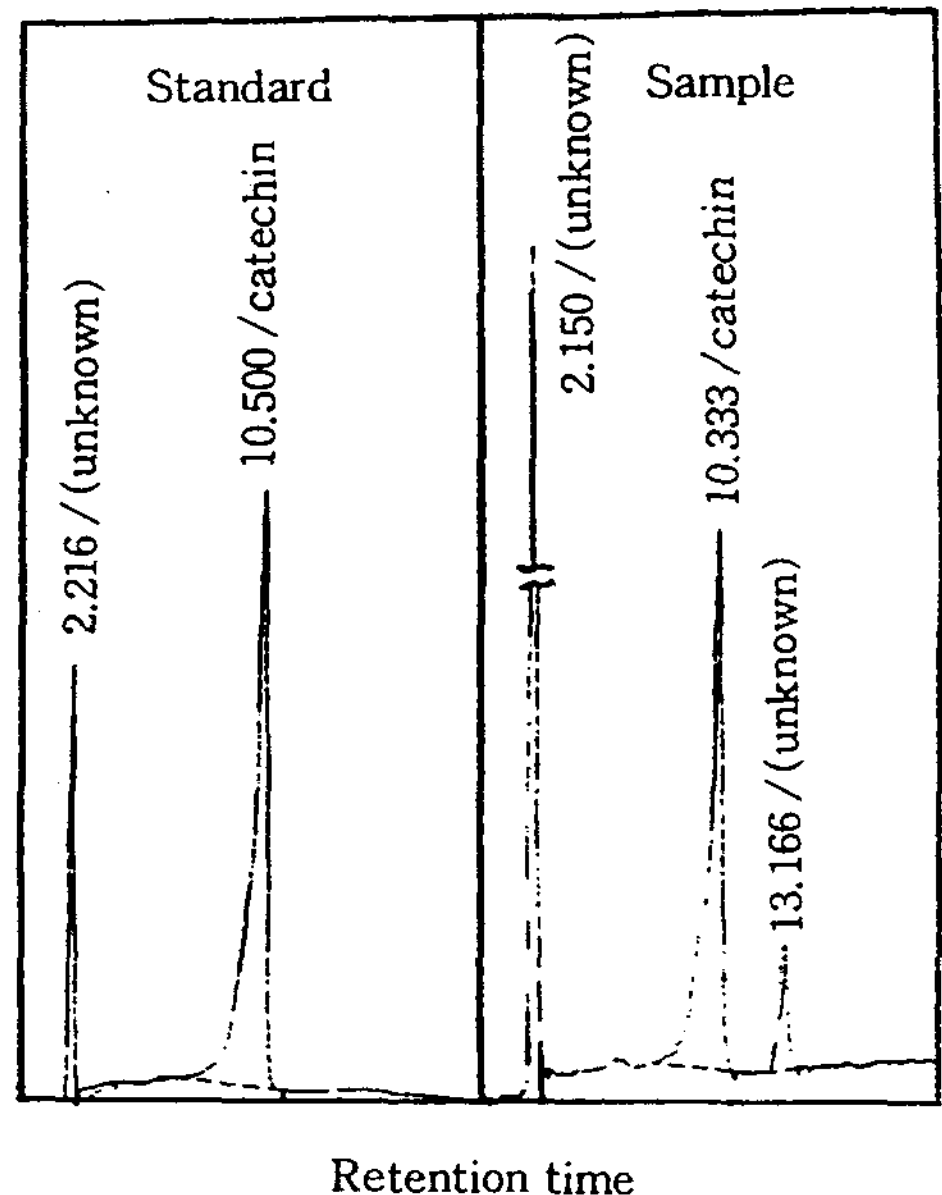


Fig. 4. HPLC of standard catechin and sample (Rf 0.71).

과는 Fig. 3과 같다. 그림에서 보는 바와같이 Rf 0.71 항산화성분의 최대 흡수 파장은 292nm 그리고 표준물질인 catechin의 최대 흡수 파장은 293nm으로 catechin 성분임이 확인되었다. 또한 TLC, UV에 의해 분리·동정된 catechin을 확인하기 위하여 HPLC로 검색한 결과는 Fig. 4와 같다. TLC에 의해 분리된 항산화 성분 Rf 0.71의 Rt는 10.3 그리고 표준물질 catechin의 Rt는 10.5로 동일 물질임이 확인되었다.

IV. 결 론

감염으로부터 항산화 성분을 분리, 동정하고자 메탄올로 추출하여 SEP-PAK cartridge column으로 분리, 정제한 항산화 성분을 DPPH법에 의해 항산화 활성을 측정하고 TLC, UV-spectrophotometer, HPLC에 의해 분리 및 동정 실험을 실시하였다. 그 결과 F- II, F- III, F- IV의 분획에서 항산화작용을 나타냈으며 이중 F- II, F- III의 분획의 것이 강한활성을 나타냈다. F- II, F- III, F- IV 분획에 대해 TLC를 실시하여 Rf 0.71, 0.35, 그리고 0.25의 항산화 성분이 검출되었다. 이들 항산화 성분들은 0.3% K3Fe(CN)6-0.3% FeCl3·6H2O 발색제에 의해 청색을 나타내

어 polyphenol류 입이 확인되었으며 바니린 염산용액에서는 Rf 0.71의 것만이 홍색을 나타내어 catehin류 입이 확인되었다. 한편 Rf-0.71의 spot를 TLC판으로부터 긁어 떼어내어 메탄올로 추출하였다. 이 추출물을 표준물질의 catechin과 함께 TLC를 행하여 Rf 값을 비교한 결과 0.71과 0.72로 동일 물질임이 확인되었다. 그리고 UV-spectrum을 실시한 결과 Rf 0.71의 최대 흡수 파장은 292nm, 표준물질의 catechin은 293nm이었다. 또한 HPLC에 의해 분석을 실시한 결과 Rf 0.71의 것은 Rt 10.3, 표준물질의 catechin은 Rt 10.5로 동일물질인 catechin임이 확인되었다.

## 문 헌

1. 中藥大辭典 : 新文豐出版公司, 910(1970).
2. 中林敏郎 : 日食工誌, 18(1), pp.33~37(1971).
3. Sabro ITO and Yasuyoshi OHIMA : Agr. Biol. Chem., 26(3), pp.151~161(1962).
4. Masako Nose and Naoko FUJINO : Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(9), pp.507~512(1982).
5. 신두호, 조정순, 저승태 : 한유화, 10(1), pp.93~101(1993).
6. 박재한, 강규찬, 백상봉, 이운형, 이규순 : 한식과, 23(3), pp.256~261(1991).
7. 맹영선, 박혜경 : 한식과, 23(3), 311~316(1991).
8. 山口直彦 : 日食工誌, 22(6), 270~274(1975).
9. 李微鉉 : 도토리 추출물의 항산화 효과, 충남대학교 대학원 석사학위 논문(1992).
10. 이가순 : 葛根 isoflavonoid의 항산화능에 관한 연구, 충남대학교 대학원 박사학위 논문(1990).
11. 崔康注 : 紅蓼 및 白蓼의 脂肪質 成分의 抗酸化 成分에 관한 研究, 고려대학교 대학원 박사학위 논문(1983).
12. 辛美慶 : 韓國產 野生 綠茶의 品質에 관한 綜合的 研究, 한양대학교 대학원 박사학위 논문(1985).
13. MILTON ZUCKER and JOHN F. AHRENS : Plant physiology 33, pp.246~249(1958).
14. Taeko MATSUZAKI and Yukihiro HARA : Nippon Nogeikagaku Kaishi, 59(2), pp.129~134(1985).
15. 中林敏郎 : 日食工誌, 15(2), pp.73~78(1968).
16. Hiromu KAMEOKA, Hiroshi OCHI, Jun SUGIMOTO, Mitsuo MIYAZAWA and Kazuyasu UMEMOTO : Nippon Nogeikagaku Kaishi, 63(2), 181~184(1989).
17. 崔鎮浩 : 高麗人蔘의 老化抑制作用에 關한 研究, 경희대학교 대학원 박사학위 논문(1982).
18. 田熙貞 : 마늘 成分의 酸化防止作用에 關한 研究, 한양대학교 대학원 박사학위논문(1983).
19. 神奈川縣科學技術政策推進委員會 : 機能性食品に 關する共同研究事業報告, 第1號(1992).
20. Toshio Nakabayashi, Nippon ShokuhinKogyo Gakkaishi : 15(2), pp.73~78(1968).