

뽕잎(桑葉)에 함유된 항산화성 물질

신 두 호

우송공업대학 식품공업과

Antioxidative Substances in Mulberry Leaves

Shin, Doo-Ho

Dept. of Food Technology, Woo Song Technical College

ABSTRACT

Antioxidative substances in Mulberry leaves were examined. Antioxidative substances in Mulberry leaves were extracted by 80% methanol aqueous solution. Antioxidative activity of the extract was determined by examining hydrogen donating ability on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and the inhibitory effect on the formation of the peroxide from linoleic acid in the test tube at 50°C. Antioxidative substances were, then, separated and indentified by thin layer chromatography(TLC), UV-Vis spectrum and High performance liquid chromatography(HPLC) methods. Hydrogen donating ability on DPPH and antioxidative ability on linoleic acid of the extracted antioxidative substances were higher than those of 100ppm butylated hydroxy toluene(BHT). The extracted antioxidative substances were separated by TLC using ethylacetate : chloroform : formic acid : water(8 : 1 : 1 : 1 v/v) as a solvent, and a spot at Rf=0.35 was detected. The spot was scraped from the plate, and extrated by methanol. The extract was analyzed by UV-Vis spectra and HPLC, and chlorogenic acid was identified as a antioxidative substance.

1. 서론

뽕나무(Morus alba Linne mulberry)는 우리나라 산지에 자생도하고 재배도하며 그 뽕잎은 옛부터 양잠사료와 식용으로 이용되어 왔다¹⁾. 한방에서는 혈당을 떨어트리고 혈압을 낮추는 효능이 있다 하여 생약으로 이용되어 왔으며 최근 건강차로도 음용되고 있다^{2,3)}. 뽕잎에는 Ca, Fe, Zn, Mg 등 무기질과 비타민 A, B, C 그리고 식물섬유를 풍부히 함유하고 있으며 특히 특수성분으로 DNJ (deoxinojirimicin)가 함유되어 있어 혈당상승을 억제하는 효능이 있으며 또 콜레스테롤 흡수를 억

제하는 후라보노이드도 풍부히 함유되어 있다^{4,5)}. 이와 같이 과학기술의 발전으로 식품분야에서도 식품에 함유된 특수성분의 기능이 밝혀짐에 따라 인체내에서 생리적으로 유용한 작용을 갖는 기능성 성분에 대한 관심이 높아지고 있다. 한편 불포화지방산의 산화로 생성되는 과산화지질은 노화와 관련이 있음이 알려지면서 천연에 존재하는 항산화물질에 대해 매우 높은 관심을 갖게 되었다. 특히 토코페롤과 아스코르빈산은 과산화지질 생성을 억제함이 입증되었으며 그의 식품중에 함유된 항산화성분들에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 따라서 뽕잎에도 항산화성분이 들어 있는지를 알아보기 위

해 병잎에 함유된 항산화성분을 메탄올로 추출하여 분리, 검색하였으며 항산화력을 측정하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

병잎은 1997년 6월 초순에 농촌진흥청 잠업시험장에서 채취한 것을 데친 후 음식에서 건조하고 80mesh로 분쇄한후 냉장고에 보관하여 시료로 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 항산화성분 추출

시료 3g을 80% 메탄올수용액 100ml에 넣고 80°C water bath에서 20분간 환류추출한후 여과하였다. 여과한 잔사에 대하여 같은 조작을 3회 반복 추출하였다. 추출액을 모두 합하여 30°C에서 감압농축하여 메탄올을 제거한 후 잔사를 증류수 100ml에 용해하였다. 여기에 같은양의 chloroform을 가하고 진탕하여 가용성 물질을 추출 제거(3회) 시킨 후 같은 양의 ethylacetate로 진탕하여 항산화물질을 ethylacetate 층에 이행시켜 추출(3회)하였다.

ethylacetate를 모두 합하여 감압농축한후 잔사를 메탄올 5ml에 용해하여 시료로하였다^{6,7)}.

2) 항산화능 측정

(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 수소 공여능

DPPH 16mg을 에탄올 100ml에 용해시킨 다음 UV-Vis spectrophotometer로 517nm에서 흡광도가 0.96이 되도록 조정하였다. 이 DPPH용액 4ml에 시료 100ppm 용액 0.2ml를 가하고 2~3초 동안 vortex mixer로 혼합한후 517nm에서 흡광도 변화를 5분간 측정하여 분당 흡광도 변화율(Δ Abs/min)을 구하고 factor 100을 곱하여 항산화활성도로 나타냈다^{8,9)}.

(2) Linoleic acid에 대한 항산화능

100ml 삼각후라스크에 0.1M-linoleic acid - 에탄올용액 100ml를 넣고 병잎 메탄올 추출물을 100ppm이 되도록 첨가하여 50°C에서 4일간 보존하면서 peroxide value(POV)와 thiobarbituric

acid(TBA)value^{10,11,12)}를 측정하였다.

3) 항산화성분의 분리 및 확인

(1) Thin layer chromatography(TLC)에 의한 항산화성분의 분리 및 동정

항산화성분 추출용액을 TLC plate(Kieselgel 60, Merck社製)에 점적하여 전개시킨다음 발색제로 발색시킨 후 표준물질의 Rf치와 비교하여 동정하였다. 이때 전개용매는 ethylacetate : chloroform : formic acid : H₂O = 8 : 1 : 1 : 1을 사용했다. 그리고 발색제는 0.3% K₃Fe(CN)₆와 0.3% FeCl₃수용액을 같은양 혼합한것(polyphenol류에는 청색으로 발색한다.)과 바니린 염산용액(1% Vanilin ethanol 용액 : 농염산 = 5 : 3의 비율로 사용직전에 혼합하여 사용한다. catechin류에는 홍색으로 발색한다.)을 사용했다^{6,13)}.

(2) TLC에 의한 항산화성분의 분취

항산화성분 추출용액을 TLC plate(Kieselgel 60F₂₅₄, Merck社製)에 2mm 폭으로 점적하고 상기 (1)과같은 방법으로 전개시킨후 UV lamp(254nm)로 조사하여 Rf = 0.35에 해당하는 발색 band를 긁어 떼어 내었다. 이것을 50ml메탄올로 추출한후 여과하여 3ml로 감압농축하였다.

(3) UV-Vis Spectra에 의한 동정

TLC에 의해 분취한 항산화성분을 메탄올에 용해하여 UV-Vis Spectrophotometer(UV-160, Shimadzu, Japan)로 200~400nm범위의 spectrum을 표준물질과 비교하였다^{14,15)}.

(4) High performance liquid

chromatography(HPLC)에 의한 동정

TLC에 의해 분취한 항산화성분을 HPLC로 분석하여 표준물질과 retention time을 비교하여 동정하였다. HPLC의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of polyphenol compounds in Mulberry leaves

Instrument	SYCAM Liquid Chromatography
Colum	ODS C ₁₈
Solvent	MeOH : 10%Acetic acid = 20:80
Detector	UV 280nm
Flow rate	1ml/min
Injection vol	20 μ l

III. 결과 및 고찰

1. 메탄올 추출물의 항산화능

1) DPPH에 대한 수소공여능

항산화활성 측정에 사용한 DPPH는 안정한 자유 래디칼로서 517nm에서 최대 흡수를 나타내며 전자 또는 수소 래디칼을 받으면 그러한 흡수가 없어지고 다시 산화되기 어렵다고한다¹⁸⁾. 항산화제는 자유래디칼과 반응하므로 이와같은 DPPH의 성질을 이용하여 뽕잎 메탄올 추출물의 항산화능을 합성항산화제인 BHT와 비교한 결과 표2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 DPPH의 소거 효과가 뽕잎 메탄올 추출물은 6.21, 100ppm BHT는 3.53으로 뽕잎 메탄올 추출물에는 상대적으로 강한 항산화물질을 함유하고 있음을 알수 있었다.

Table 2. Hydrogen donating ability of Mulberry leaves(ML) extract, compared to DPPH

Addition	Antioxidant activity (Δ Abs/min \times 100)
100ppm ML extract	6.21
100ppm BHT	3.53
Blank	0.17

2) Linoleic acid에 대한 항산화능

0.1M-linoleic acid를 기질로하여 뽕잎 메탄올 추출물을 100ppm의 농도가 되도록 첨가하여 50℃로 저장하면서 저장기간에 따른 POV와 TBA를 측정하여 무첨가와 BHT 첨가군과 항산화능을 비교한 결과 그림 1, 2와 같다. 그림에서 보는바와같이 뽕잎메탄올 추출물을 첨가한 것은 BHT 100ppm 첨가에 비해서 비교적 낮은 항산화작용을 나타냈으며 무첨가에 비해서는 큰차이로 낮은치를 나타냈다. 이는 뽕잎중에는 항산화성분이 들어있기 때문이라고 생각된다.

2. 뽕잎중에 함유된 항산화성분의 분리 및 확인

平山¹⁷⁾등에 의하면 알콜 및 물추출물에는 flavonoid 나 phenol류등이 함유된다고 하였다. 따라서 뽕잎 메탄올 추출물에는 어떤 항산화성분을 함유하고 있는지를 확

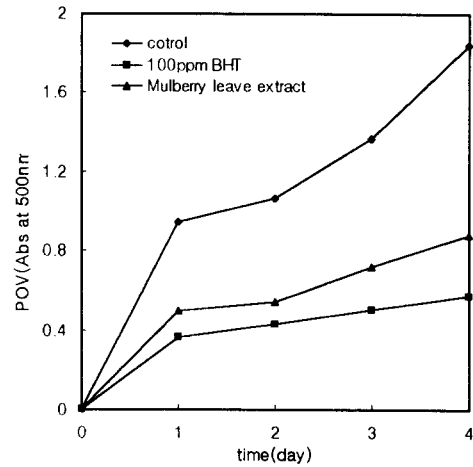


Fig. 1. Effect of Mulberry leaves extract on the autoxidation of linoleic acid at 50°C

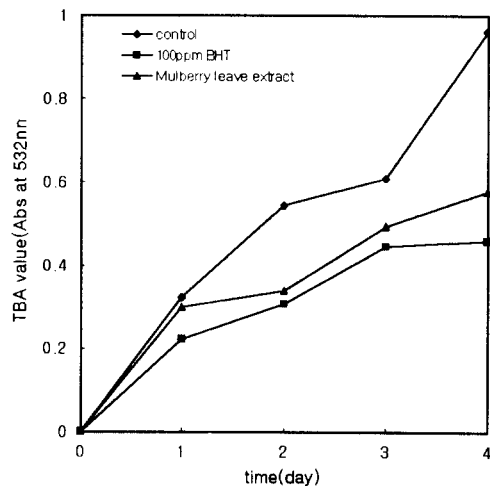


Fig. 2. Effect of Mulberry leaves extract on the autoxidation of linoleic acid at 50°C

인하기 위하여 TLC, UV-Vis Spectrophotometer, HPLC로 검색하였다.

1) TLC에 의한 항산화성분의 분리 및 확인

뽕잎 메탄올 추출물에서 항산화성분을 분리해내기 위하여 TLC plate에 전개시킨후 能勢⁶⁾의 방법으로 발색시킨 결과 0.3%potasium ferricyanid-ferric chloride 혼합용액에서 청색을 나타냈으며

1% vanilin ethanol 염산용액에서는 홍색반응을 나타내지 않아 catechin류가 아님을 알 수 있었다. 그림 3에서 보는 것처럼 시료획분에서 Rf=0.35의 spot가 관찰되었다. 이 spot는 표준물질의 chlorogenic acid의 Rf=0.34와 거의 같아 chlorogenic acid 라고 생각되었다.

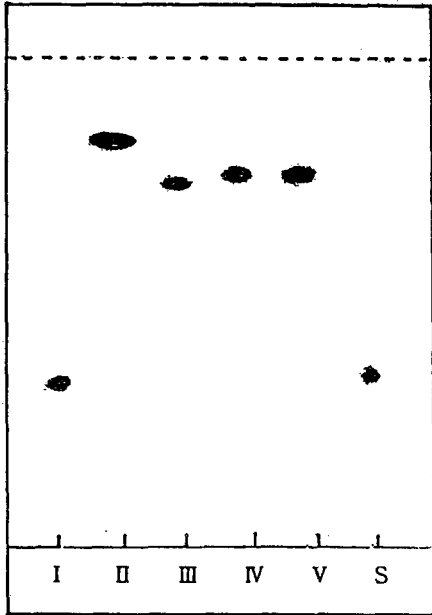


Fig. 3. Thin layer chromatogram of Mulberry leaves extract and polyphenol compounds

I : chlorogenic acid II : caffeic acid
 III : epicatechin IV : gallic acid
 V : catechin S : sample

2) UV-Spectrum 및 HPLC에 의한 확인

TLC에 의해 확인된 Rf 0.35의 spot가 chlorogenic acid 인지를 확인하기위해 Kieselgel 60F₂₅₄ Plate에 점적하여 전개시킨 후 UV lamp로 조사하여 발색 spot Rf=0.35를 분취하여 메탄올로 추출하여 소량으로 농축한후 UV-Spectra와 HPLC에 의해 분석을 하였다. 그림 4에서 보는 것처럼 Rf=0.35 spot의 최대흡수파장은 348nm로 표준물질인 chlorogenic acid 349nm와 같았다. 또한 Rf=0.35의 spot를 HPLC로 검색한 결과는 그림 5와 같이 Rf=0.35의 retention time은 5.4분 그리고 표준물질 chlorogenic acid의 retention time은 5.3분으로 동일 물질임이 확인되었다.

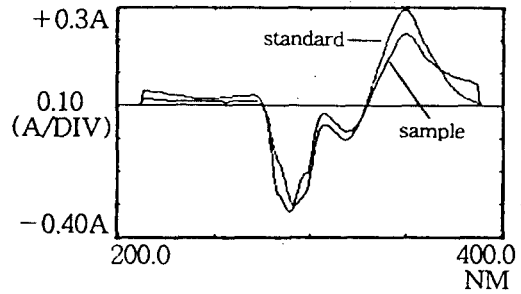


Fig. 4. UV-Vis absorption spectra of chlorogenic acid and isolated substance from Mulberry leaves

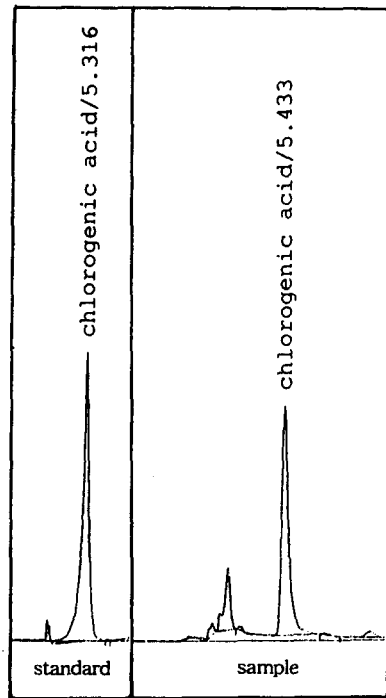


Fig. 5. HPLC of chlorogenic acid and isolated substance from Mulberry leaves

IV. 결론

병원에 함유된 항산화물질을 80% 메탄올로 추출하여 DPPH에 대한 수소공여능과 linoleic acid에 대한 항산화력(POV, TBA가)을 측정하고 TLC, UV-Vis spectrometer, HPLC에 의해 항산화성분을 분리, 검색실험을 실시하였다. 그 결과 DPPH에 대한 수소공여능과 linoleic acid에 대한 항산화효과

는 메탄올추출물이 BHT 100ppm보다 크게 나타났다. 뽕잎 메탄올 추출물에 대하여 TLC를 실시한 결과 Rf=0.35의 항산화성분이 검출되었으며 이는 표준물질인 chlorogenic acid (Rf=0.34)와 같았다. 이 물질이 chlorogenic acid 인지를 확인하기 위하여 Rf=0.35의 spot를 TLC판으로부터 긁어 떼어내어 메탄올로 추출하였다. 이 추출물을 UV-spectrum을 실시하여 Rf=0.35의 최대흡수 파장은 348nm 표준물질의 chlorogenic acid는 349nm이었다. 또한 HPLC에 의해 분석을 실시하여 Rf=0.35의 것은 retention time이 5.4분, 표준물질인 chlorogenic acid는 retention time이 5.3분이었다. 따라서 뽕잎중에는 항산화성분인 chlorogenic acid가 함유되어 있음이 확인되었다.

문헌

1. 安鶴洙, 李春寧, 朴壽現, 韓國農植物資源名鑑, p. 25, 一潮閣(1982)
2. 최옥자, 약초의 성분과 이용, p. 147, 일월서각(1994)
3. 金在佶, 原色天然藥物大辭典, 下卷, p. 148, 南山堂(1984)
4. 野田信三, 食品と科學, 40(1), 15(1998)
5. 野田信三, 食品と科學, 40(2), 102(1998)
6. Masako Nose, Naoko Fujino, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(9), 507(1982)
7. 申斗鎬, 한국유화학회지, 14(1), 103(1997)
8. YASUHI ENDO, RIICHIRO USUKI and TAKTSHI KANEDA, JAOCS, 62(9), 1387(1985)
9. 맹영선, 박혜경, 한국식품과학회지, 23(3), 311(1991)
10. 신두호, 조정순, 정승태, 한국유화학회지, 10(1), 103(1993)
11. 田熙貞, 마늘성분의 산화방지 작용에 관한 연구, p. 14, 16, 한양대학교대학원 박사학위논문(1990)
12. 崔康注, 홍삼 및 백삼의 지방질성분의 항산화성분에 관한 연구, p. 20, 고려대학교대학원 박사학위논문(1983)
13. Toshio Nakabayashi, Nippon Shokushin Kogyo Gakkaishi, 15(2), 73(1986)
14. Toshiko HIROSUE, Hideo KAWAI and Yutaro HOSOGAI, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(7), 418(1982)
15. 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순, 한국식품과학회지, 23(3), 256(1991)
16. 魏在峻, 인삼의 항산화 및 조혈 활성 분획성분의 분리 및 동정, p. 23, 서울대학교대학원 박사학위논문
17. 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号, p. 91(1992)