

제주도에 자생하는 수종 상록성식물의 열매에서 용매분획별 항산화활성 분석

오순자, 고석찬

제주대학교 생명과학과 · 기초과학연구소

요 약

제주도에 자생하는 8종의 상록성식물의 열매를 50% 메탄올로 추출하여 항산화활성을 검색하였으며 메탄올 추출물은 다시 여러가지 용매로 분획하여 분획별 활성을 비교·분석하였다. 8종의 50% 메탄올 추출물 중에 비쭈기나무, 쯤팡팡나무, 먼나무 열매의 추출물에서 50% 이상의 높은 전자공여능을 나타내었다. 그리고 이들 3종의 열매는 물 추출물보다는 메탄올 추출물에서 항산화활성이 높았으며, 50%와 100% 메탄올 추출물의 항산화활성은 서로 유사하였다. 그리고 메탄올 추출물의 용매 분획물의 항산화활성은 종에 따라 다소 달라서, 비쭈기나무와 쯤팡팡나무의 열매는 물 분획에서 높았으며, 먼나무는 50% 메탄올 추출물에서는 물 분획에서, 100% 메탄올 추출물에서는 ethylacetate 분획에서 높게 나타났다. 이러한 분획에 따른 항산화활성의 차이는 용매의 극성의 차이에서 기인한 것으로 보이며, 이들 3종의 열매에 있는 항산화성분은 극성 성분이 대부분을 차지하고 있는 것으로 보인다.

주요어: 항산화활성, 전자공여능, 열매, 비쭈기나무, 쯤팡팡나무, 먼나무

서 론

최근 식물자원에서 항암, 항알레르기, 항산화, 항균 활성을 가지는 기능성 물질을 탐색하고 이들 유용물질을 식품에 첨가하거나 그 자체를 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 기능성 물질들은 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로서 수많은 종류가 유용하게 이용되고 있으며, 새로운 물질

들이 개발되고 있다. 특히 항산화활성을 갖는 물질들은 독성의 활성산소 및 라디칼 제거에 효과가 있고, 다방면에 이용이 가능하여 이에 대한 연구가 활발하다.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 산소에서 유래된 것들로서 안정한 분자상태인 기저삼중항산소 (ground state triplet oxygen: 3O_2)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적,

화학적, 환경적 요인 등에 의하여 환원되어 생성되며, 수퍼옥사이드 라디칼 (superoxide anion radical: $\cdot O_2^-$), 하이드록실 라디칼 (hydroxyl radical: $\cdot OH$), 과산화수소 (hydrogen peroxide: H_2O_2), 일중항산소 (singlet oxygen: 1O_2) 등이 있다 (Fridovich, 1978; Alscher and Hess, 1993). 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막 분해, 지질 산화, 단백질 분해, DNA 합성 저해, 노화 촉진 등 심각한 생리적 장애를 일으키며, 심한 경우 세포사멸을 초래한다 (Alscher and Hess, 1993; Lester and Alexander, 1993).

활성산소종의 작용을 조절하거나 제거할 수 있는 물질로서는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalase 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, β -carotene, glutathione 등의 천연 항산화제 또는 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole), Trolox-C 등의 합성 항산화제가 알려져 있다 (Alscher and Hess, 1993; Inze and Van Montagu, 1995). 그 중 BHT, BHA 등이 항산화 효과가 높아 의약품 및 식품분야 등에서 많이 활용되고 있으나 안전성에 있어서 문제가 제기되고 있다 (최와 양, 1982). 따라서 보다 안전하면서도 효과가 우수한 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 이루어지고 있다. 하지만 대부분의 연구가 주로 식품이나 한약재로 이용되는 식물체에 중점을 두고 진행되고 있다.

제주도의 자생식물은 1,800 여종으로 우리나라 다른 어느 지역에 비해 종이 다양하다 (김, 1992). 그리고 제주도에 분포하는 상당수의 종들은 식물지리학적으로 북한계선 또는 남한계선 상에 분포하여 저온 또는 고온 스트레스에 노출되어 있어 항산화 방어체가 발달되어 있을 것으로 보인다. 안 (2000)은 35종의 제주 자생식물들 중 담팔수 (*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*), 말채나무 (*Cornus walteri*)

등에서 높은 활성을 나타내는 것으로 보고한 바 있으며, 이 등 (2001)은 9종의 식물을 대상으로 조사하여 그 중에 녹나무 (*Cinnamomum camphora*), 비파나무 (*Eriobotrya japonica*) 등에서 항산화활성이 높은 것으로 보고한 바 있다. 그러나 대부분의 연구가 식물 잎이나 줄기 (또는 수피)를 대상으로 수행되어 왔으며, 열매를 대상으로 한 검색 작업은 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 제주도에 자생하는 수종 상록성식물의 열매를 각종 용매로 추출 및 분획하여 항산화활성을 비교·분석하여 천연 항산화제로의 개발 가능성을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 비쭈기나무 (*Cleyera japonica*), 쯤굴거리 (*Daphniphyllum glaucescens*), 담팔수 (*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*), 호랑가시나무 (*Ilex cornuta*), 쯤팡팡나무 (*I. crenata* var. *microphylla*), 먼나무 (*I. rotunda*), 광나무 (*Ligustrum japonicum*), 제주광나무 (*L. lucidum*) 등 8종의 상록성식물의 열매를 사용하였으며, 2002년 11월 말에 한라수목원에서 채취하였다.

시료추출물의 제조

채취한 열매는 그늘진 곳에서 건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 분쇄한 시료 0.2g을 50% 메탄올 20ml에 넣고 상온에서 2일간 100rpm으로 진탕하여 추출한 후, Whatman filter paper No. 2로 여과하여 추출물을 얻었으며 이를 항산화활성 검색을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과, 항산화활성이 높은 비쭈기나무, 먼나무, 쯤팡팡나무 열매에 대해서는 증류수, 50%와 100% 메탄올로 추출하여 항산화활성을 비교하였다.

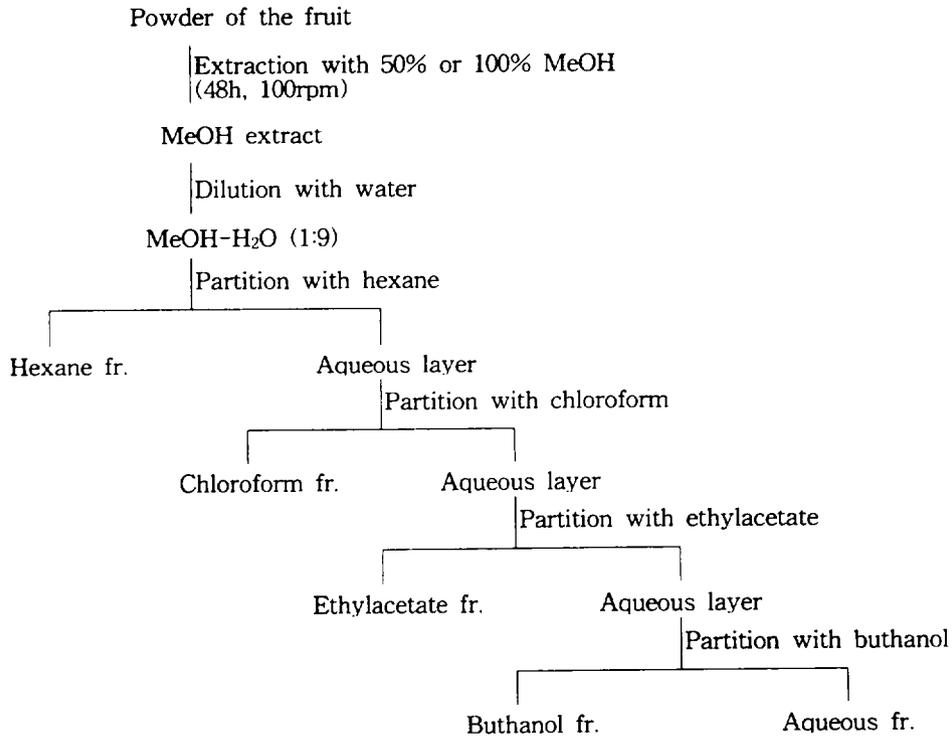


Figure 1. Fractionation procedure of antioxidative substances from methanol extract of the fruits.

용매분획의 제조

비쭈기나무, 먼나무, 졸팡팡나무 열매의 50%와 100% 메탄올 추출물을 증류수로 1/10 희석한 후 동량의 용매와 혼합하여 분획하였다. 분획에 사용한 용매는 n-hexane, chloroform, ethylacetate, buthanol 등을 순차적으로 사용하였다 (Fig. 1).

항산화활성 측정

항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하였다 (Blois, 1958). 즉, 메탄올 용액 3.5ml, 시료용액 0.5ml, 0.5mM DPPH 용액 1ml를 넣은 후 vortex mixer로 균일하게 혼합하고 암상태의 실온에서 30분간 방치하여 517nm에서 흡광도를 측정하여 시료용액의 전

자공여능으로 나타내었다. 전자공여능 (electron donating ability; EDA)은 시료 첨가구 (A)와 무첨가구 (B)의 흡광도를 이용하여 아래 수식에 따라 산출하였으며, 반응용액 1ml 당 시료 전체량 0.1mg의 전자공여능으로 나타내었다. 대조구로는 L-ascorbic acid (0.05mg/ml)를 사용하였다.

$$EDA (\%) = (1-A/B) \times 100$$

A, 시료 첨가구의 흡광도

B, 시료 무첨가구의 흡광도

결과 및 고찰

DPPH는 ascorbate, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류 등의 항산화능을 가지는 물질의 전자공여능에 의해

Table 1. Antioxidative activities of 50% methanol extracts from the fruits of eight evergreen plants native to Jeju-Do

Scientific name	† EDA (%)
	(0.1 mg dry wt./ml)
<i>Cleyera japonica</i>	77.3±6.85
<i>Daphniphyllum glaucescens</i>	27.8±5.26
<i>Elaeocarpus sylvestris</i> var. <i>ellipticus</i>	3.3±2.15
<i>Ilex cornuta</i>	27.8±10.75
<i>I. crenata</i> var. <i>microphylla</i>	50.4±7.54
<i>I. rotunda</i>	50.1±8.05
<i>Ligustrum japonicum</i>	10.0±2.34
<i>L. lucidum</i>	3.3±2.15
Ascorbic acid	63.5±8.91

† Antioxidative activities are shown as the mean±SD and compared with that of ascorbic acid (0.05mg/ml).

환원되어 짙은 자색이 탈색되며, 탈색의 정도로 어떤 물질의 항산화능을 측정할 수 있다 (Blois, 1958). 이러한 DPPH법을 이용한 전자공여능 측정법은 식물추출물의 항산화활성을 간단히 측정할 수 있으며 실제 항산화활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되는 방법이다. 본 실험에서 8종의 상록성식물의 열매를 50% 메탄올로 추출한 후 DPPH에 대한 전자공여능을 측정한 결과 (Table 1), 비쭈기나무, 좁팡팡나무, 먼나무 열매의 추출물에서 50% 이상의 높은 전자공여능을 나타내었다. 대조구로 사용한 L-ascorbic acid의 전자공여능이 0.05mg/ml 농도에서 63.5%의 활성을 보인 것과 비교하면 이들 식물의 전자공여능은 반응용액 1ml 당 시료 전체량 0.1mg의 활성을 나타낸 것이므로 매우 높다고 할 수 있다. 특히 비쭈기나무 열매의 추출물에서 77.3%의 높은 활

성을 보여, 비쭈기나무 열매의 메탄올 추출물에 전자를 공여하는 능력이 강한 물질이 존재하고 있음을 나타내준다고 할 수 있다.

50% 메탄올 추출물에서 비교적 높은 항산화활성을 보이는 비쭈기나무, 좁팡팡나무, 먼나무 열매의 분말시료를 증류수, 50%와 100% 메탄올로 추출하여 추출용매에 따른 전자공여능을 비교하였다 (Table 2).

이들 열매의 물 추출물과 메탄올 추출물의 항산화활성을 보면, 물 추출물보다는 메탄올 추출물에서 높은 전자공여능을 나타내었으며, 50%와 100% 메탄올 추출물은 유사한 활성을 보였다. 이러한 결과는 식품으로 사용되어 그 안전성이 확인된 각종 식물 및 약재를 메탄올과 물로 추출하여 항산화력을 검색한 결과, 메탄올 추출물이 물 추출물 보다 높은 항산화활성을 보인다는 보고와도 유사하다 (최 등,

Table 2. Antioxidative activities of water and methanol extracts from the fruits of *Cleyera japonica*, *Ilex crenata* var. *microphylla* and *I. rotunda*

Scientific name	† EDA (%), 0.1 mg dry wt./ml		
	DW	50% MeOH	100% MeOH
<i>Cleyera japonica</i>	47.9±15.13	77.3±6.85	75.9±5.92
<i>Ilex crenata</i> var. <i>microphylla</i>	12.1±2.03	50.4±7.54	50.2±7.66
<i>I. rotunda</i>	19.3±3.32	50.1±8.05	55.3±9.69
Ascorbic acid		63.5±8.91	

† Antioxidative activities are shown as the mean±SD and compared with that of ascorbic acid (0.05mg/ml).

1992; 장 동, 1992). 추출용매에 따른 항산화활성은 대상식물에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 알려지고 있는데, 고구마 (*Ipomoea batatas*)에서는 70% 메탄올 추출물에서 강한 항산화물질이 검출되는 등 식물성 항산화물질을 추출하는데 메탄올을 주로 사용하고 있다. 이는 메탄올을 사용함으로써 항산화활성이 높은 극성 물질을 추출할 수 있으며 추출 수율 또한 다른 용매에 비해 높기 때문인 것으로 보인다 (Hayase and Kato, 1984; 이 동, 1993). 그리고 쯤팡팡나무와 먼나무 열매의 물 추출물이 20% 이하의 낮은 전자공여능을 보이는 것

과는 달리 비쭈기나무 열매는 물 추출물에서도 대략 47.9%의 전자공여능을 보여, 먼나무와 쯤팡팡나무 열매와는 달리 비쭈기나무 열매에는 항산화성분 중 수용성인 것이 다소 포함되어 있음을 알 수 있다.

한편, 식물에 함유된 항산화성 유효성분의 분획에는 메탄올, n-hexane, chloroform, 물 등 극성이 다른 용매들이 널리 이용되고 있다. 비쭈기나무, 쯤팡팡나무, 먼나무 열매의 항산화활성 성분의 일반적인 특성을 살펴보기 위해 50%와 100% 메탄올 추출물을 증류수로 회석한 후 n-hexane, chloroform, ethylacetate,

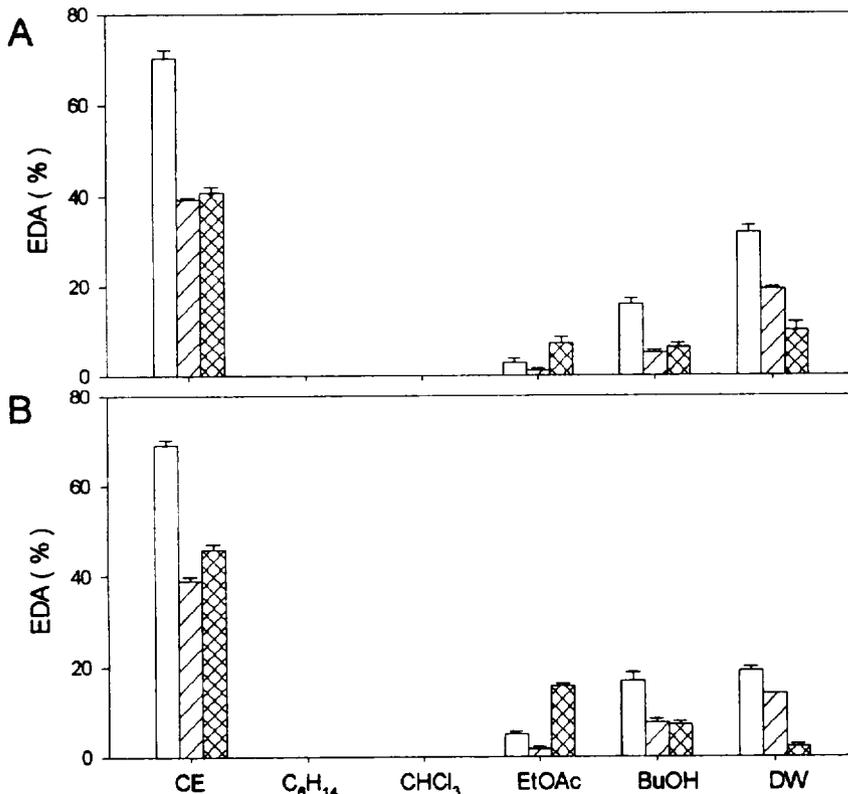


Figure 2. Antioxidative activities of solvent fractions from the fruits of *Cleyera japonica* (□), *Illex crenata* var. *microphylla* (▨) and *I. rotunda* (▩).

A, 50% methanol extract; B, 100% methanol extract. CE, MeOH crude extract; C₆H₁₄, hexane fraction; CHCl₃, chloroform fraction; EtOAc, ethylacetate fraction; BuOH, butanol fraction; DW, aqueous fraction.

buthanol, 물 분획을 순차적으로 얻어 각 분획의 전자공여능을 비교하였다 (Fig. 2). 3종에서 50%와 100% 메탄올 추출물 모두 n-hexane과 chloroform 분획물에서는 항산화활성을 보이지 않았다. 비쭈기나무와 쯤팡팡나무의 열매의 항산화활성은 50%와 100% 메탄올 추출물에서 모두 물, buthanol, ethylacetate 분획 순으로 높아서 이들 종의 열매에 있는 항산화성분은 극성 성분이 대부분을 차지하고 있는 것으로 보인다. 이러한 결과는 갯실새삼 (*Cuscuta chinensis*) 종자의 75% 메탄올 추출물을 분획하였을 때 chloroform 분획보다는 물 분획이나 ethylacetate 분획에서 항산화력이 높은 것과 유사하다 (Sun *et al.*, 1999). 하지만, 먼나무 열매의 항산화활성은 50% 메탄올 추출물에서는 물분획에서 높았으나 100% 메탄올 추출물에서는 ethylacetate 분획에서 가장 높아서 50%와 100% 메탄올 추출물에는 서로 다른 항산화물질이 존재하는 것으로 보인다.

앞으로 항산화활성이 높은 비쭈기나무, 쯤팡팡나무, 먼나무의 열매를 과육, 종자 등 각 부위별로 분리하여 항산화활성을 측정할 필요가 있다. 그리고 메탄올에 가용성인 것으로 보아 이들 식물의 열매에 함유하고 있는 항산화물질은 극성 화합물인 것으로 보이는 바, 이들 물질의 분리 및 정제, 구조 규명 등의 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

- Alscher R. G. and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton. pp.1-174.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science 201:875-880.
- Hayase, F. and H. Kato. 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 30:37-43.
- Inze D. and M. van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. Curr. Opin. Biotechnol. 6:153-158.
- Lester, P. and N. G. Alexander. 1993. Oxygen radicals in biological systems. Academic press INC., San Diego.
- Sun, W. S., J. S. Roh, S. U. Oh, J. I. Lee, W. T. Oh and J. H. Kim. 1999. Screening of antioxidants from Indonesian medical plants. Food Sci. Biotechnol. 8(2):93-96.
- 김문홍. 1992. 제주식물도감. 제주도
- 안용준. 2000. 연구보고서 - 제주산 식물체의 약리활성성분의 동정 및 산업화. 제주시청. pp.1-24.
- 이남호, 이선주, 정덕상, 부회정, 양홍철, 류기중. 2001. 제주산 식물을 이용한 Tyrosinase 억제활성, Hyaluronidase 억제 활성, 라디칼 소거 활성 검색. 생약학회지 32(3): 175-180.
- 이연재, 신동화, 장영상, 강우석. 1993. 붉나무 순차 용매 추출물의 항산화 효과 비교. 한국식품과학회지 25(6):677-682.
- 장영상, 최웅, 신동화, 신재익. 1992. 항산화효과가 있는 붉나무 추출물의 몇가지 synergist 첨가 효과. 한국식품과학회지 24(2): 149-153.
- 최석영, 양규환. 1982. 항산화제 BHT와 BHA의 안정성. 한국식품과학회지 14(3):283-188.
- 최웅, 신동화, 장영상, 신재익. 1992. 식물성 천연 항산화물질의 검색과 그 항산화력 비교. 한국식품과학회지 24(2):142-148.

Antioxidative Activities of Solvent Fractions from the Fruits of Several Evergreen Plants Native to Jeju-Do

Oh, SoonJa and Seok Chan Koh

Department of Life Science and Research Institute for Basic Sciences,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the antioxidative activities of 50% methanol extracts obtained from the fruits of eight evergreen plants native to Jeju-Do and to characterize the fractionation properties of the antioxidative substances. The antioxidative activities of *Cleyera japonica*, *Ilex crenata* var. *microphylla* and *I. rotunda* were higher than those of the other plants, showing the electron donating ability above 50%. When the antioxidative activities of water, 50% and 100% methanol extracts were compared one another, those of 50% and 100% methanol extracts were similar each other, and those of methanol extracts were higher than those of water extracts. When 50% and 100% methanol extracts from the fruits of these three species were fractionated with several solvents, the antioxidative activity of *I. rotunda* was highest in water fraction in 50% methanol extract, while highest in ethylacetate fraction in 100% methanol extract. However, the antioxidative activities of *C. japonica* and *I. crenata* var. *microphylla* were highest in water fractions both in 50% and 100% methanol extracts. These results suggested that the diversity of fractionation properties is due to the difference of solvent polarity and the antioxidative substances from the fruits of these three species have polar characteristics.

Keywords: antioxidative activity, electron donating ability, fruits, *Cleyera japonica*, *Ilex crenata* var. *microphylla*, *I. rotunda*