

연잎 에탄올 추출물의 항산화 효과

이경석 · 김민규 · 이기영[†]

호서대학교 식품생물공학과

Antioxidative Activity of Ethanol Extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf

Kyung-Seok Lee, Min-Gue Kim and Ki-Young Lee[†]

Dept. of Food & Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract

This study was investigated on the antioxidative activity of 70% ethanol extracts from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. The extraction yields of 70% ethanol extract was 8.16%. The extract was further fractionated subsequently by hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water. Antioxidative activity was examined by electron donating ability (EDA) using DPPH, TBA value, acid value (AV), and peroxide value (POV), in comparison with commercial antioxidants. Butanol fraction showed the highest extraction yields but ethyl acetate fraction showed the highest phenol content. The ethyl acetate fraction showed the highest EDA. The antioxidative activity of ethyl acetate fraction determined by AV and POV in accelerated oxidation condition of lard was similar to that of BHA.

Key words: antioxidant activity, lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf, 70% ethanol extract

서 론

최근 세계화에 따라 육류섭취가 증가하는 등 식생활의 다양한 변화와 더불어 늘어나는 각종 성인병 퇴치를 위한 자연 건강식의 개발과 기능성을 갖는 식품에 대한 요구가 커지고 있다. 특히 식료품으로부터 유래하는 생리활성을 나타내는 기능성 식품에 대한 연구가 최대의 관심사가 되고 있다(1).

항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 free radical과 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산 등의 손실을 최소화하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다(2). 현재는 α -tocopherol과 L-ascorbic acid가 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그 중 α -tocopherol은 안전성이 높으나 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(3) 가격이 비싸다는 단점이 있다. 일반적으로 많이 사용하는 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene) 등이 있으나 이들 페놀계 합성 항산화제의 안정성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(4-6). 이에 따라 항산화효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다.

우리들이 일상적으로 섭취하고 있는 식용 식물에는 비타민, minerals, polyphenol류 등 건강유지에 중요한 광합성 대사산물이 포함되어 있으며(7), 이러한 식용식물을 대상으로 주로 항산화 활성이 보고되고 있고(8-10), 천연 식물에서부터 분리한 천연항산화제는 화장품과 의약품 등에 널리 이용되고 있어(11-13) 식용이나 약용식물 등의 천연생리활성 물질에 대한 연구는 특히 기능성 식품의 개발 측면에서 그 의미가 크다고 할 수 있다.

연(*Nelumbo nucifera*)은 수생식물 중 부엽식물에 속하는 쌍떡잎식물로서 아시아 남부, 북호주가 원산지이다. 주로 연못에서 자라고 논밭에서 재배되기도 하는데(14,15), 이러한 연잎은 예로부터 출혈성 위궤양이나 위염, 치질, 출혈, 설사, 야뇨증, 각종 독성 물질에 대한 중화작용을 하는 것으로 알려져 민간치료제로 사용하여 왔다. 하지만 이러한 연잎에 대한 생리활성이나 성분분석에 관한 연구보고는 거의 전무하고 다만 연근에 대한 항산화효과(16,17), 연근전분의 특성(18), 연꽃 씨의 항산화효과(19) 등 일 이외의 부분에서 일부 연구되어졌다.

본 연구에서는 연잎의 항산화활성을 평가하기 위하여 용매 추출과 분획을 행하여 DPPH에 의한 전자공여능, TBA에 의한 지질 과산화, acid value(AV) 와 peroxide value(POV) 등을 측정, 기존의 시판 항산화제와 비교하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: kylee@office.hoseo.ac.kr
Phone: 82-41-540-5641. Fax: 82-41-532-5640

재료 및 방법

재료 및 시약

연잎은 충남 인취사에서 자생하는 것을 2005년 6월에 채취해 자연 건조한 것을 공급받아 분쇄하여 사용하였다. 추출 및 분획에 사용한 시약은 1급을, 나머지 시약은 특급을 사용하였다.

용매 추출

검색용 생리활성 물질은 건조 시료 150 g당 10배의 70% ethanol을 첨가한 후 환류냉각관을 부착한 80°C의 heating mantle에서 3시간 추출시켜 여과(Whatman No.2)하여 얻었다. 이렇게 2,3차 추출액을 얻어 모두 혼합한 후 rotatory vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 용액을 상압 가열 건조시켜 고형물 함량을 산출하였다(20).

70% ethanol추출물의 분획

70% ethanol추출물을 극성을 달리한 용매별로 분획하여 분획물을 얻었다(Fig. 1). 농축한 추출물을 water에 희석한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 순으로 각각 분액여두에서 3회 반복 추출한 다음 rotatory vacuum evaporator로 ethanol을 증발시킨 용액을 동결 건조시켜 고형물 함량을 산출하였다(20).

총 페놀함량

연잎 추출물 및 용매별 분획물의 총 페놀함량은 AOAC법(21)에 의하여 측정하였다. 즉, 연잎 추출물 및 용매별 분획물 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가하여 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 tannic acid로 환산하여 나타내었다.

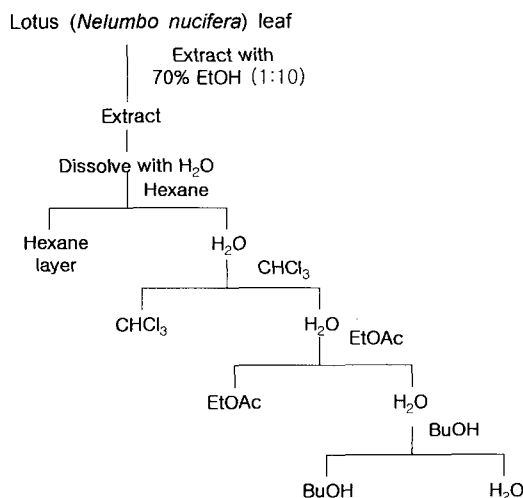


Fig. 1. Fractionation of antioxidant extracts from a lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf.

전자공여능(electron donating ability: EDA) 측정

각 시료의 전자공여능 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 즉 0~10 (µg/mL)사이 농도의 시료를 4 mL의 methanol에 녹여 1.5×10⁻⁴ M DPPH methanol 용액 1 mL를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(µg)을 EDA₅₀(50% electron donation ability)으로 나타냈으며, 기존 항산화제인 BHT, BHA와 비교하였다(22).

계산은 다음의 식과 같이 하였다. 즉 아래의 식에서 각각의 농도에 따른 EDA(%)를 구하고 50% EDA를 나타내는 시료의 농도를 산출하였다.

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

A: blank, B: sample

TBA가 측정

기질 용액은 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하였다. 이 기질 용액 20 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 19.2 mL, 500 ppm으로 조절한 시료 0.8 mL 첨가한 후 시료액 2.0 mL를 취하여 분석하였다.

위 시료액 2 mL에 35% trichloroacetic acid 1 mL와 0.75% TBA시약 2 mL를 가한 다음 30초 동안 진탕시킨 후 95°C 수욕 상에서 40분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1 mL, chloroform 2 mL를 가하여 진탕시킨 후, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상징액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 TBA값을 산출하였다(23). 계산은 다음의 식과 같이 하였다.

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

A: absorbance of sample

B: absorbance blank

Acid value(AV) 및 peroxide value(POV)의 측정

Lard 100 g에 DMSO(dimethyl sulfoxide)용액에 녹인 시료를 500 ppm 농도가 되도록 가하여 60°C 항온기에 저장한 후 10일 간격으로 공전삼각플라스크에 평취해 분석하였다. 위 유지시료 5 g을 취해 ethylether와 ethanol 혼합액(1:2, v/v) 100 mL를 가한 다음 완전히 용해시킨 후, phenolphthalein을 지시약으로 0.1 N KOH ethanol 표준용액으로 적정하여 AV를 산출하였다(24). 위 유지시료에 1 g chloroform 10 mL, acetic acid 15 mL 및 KI 포화용액 1 mL를 가하여 1분간 진탕시킨 다음 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하여 POV로 하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 값을 비교하였다(24). AV 및 POV의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$AV = (A - B) \times 5.611 \times F/S$$

A: 저장 후 시료의 0.1 N KOH 용액의 적정소비량(mL)

B: 실험 시작 시 시료의 0.1 N KOH 용액의 적정소비량(mL)
 F: 0.1 N KOH의 Factor
 S: 시료 채취량(g)

$$POV \text{ (meq/kg)} = (A - B) \times 0.01 \times F/S \times 1000$$

A: 저장 후 시료의 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액의 적정소비량(mL)
 B: 실험 시작 시 시료의 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액의 적정소비량(mL)
 F: 0.01 N Na₂S₂O₃의 factor
 S: 시료 채취량(g)

통계처리

본 연구의 결과는 평균으로 나타내었고, 각 실험군 간의 비교분석은 SAS system을 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha = 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

70% 에탄올 추출수율 및 용매별 분획물의 수율

연잎의 항산화효과를 검토하기 위해 자연 건조하여 마쇄한 시료를 70% ethanol로 추출하였다. 이것의 일부를 110°C에서 건조시킨 후 고형분 함량을 추출수율로 계산한 결과 추출수율은 8.16%로 측정되었다. 이를 용매별로 분획한 후 70% 에탄올 추출물에 대한 추출수율을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

70% ethanol 추출물의 용매별 분획물의 추출수율을 보면 butanol 분획이 36.12%로 가장 높았으며 water, ethyl acetate, chloroform, hexane 순이었다. 대체적으로 용매의 극성이 높아질수록 추출수율이 높은 것을 볼 수 있는데 이는 천년초(25), 거봉(26), 영경귀(27) 등의 용매별 분획물의 수율 또한 용매의 극성이 높을수록 분획물의 수율이 높은 것과 일치하는 결과를 보여주고 있다.

총 페놀함량

연잎 70% ethanol 추출물의 총 페놀함량은 0.362 mg/mL로 측정되었다. 이를 용매별로 분획한 후 추출수율을 측정한 결과 총 페놀함량은 Fig. 2와 같다. Ethyl acetate 분획물이 0.761 mg/mL로 총 페놀함량이 가장 높았으며 butanol, chloroform, hexane, water 순이었다.

전자공여능

70% ethanol 추출물을 유기용매별로 분획한 분획물의

Table 1. The yields of solvent fractions from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf by various solvents (%)

Solvent	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
Fraction yield	9.84	13.37	17.5	36.12	23.17

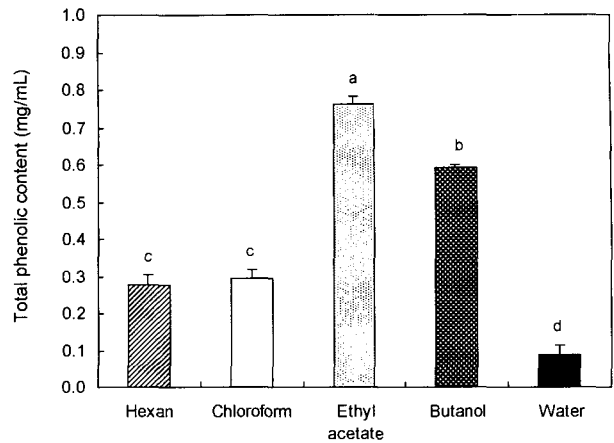


Fig. 2. Total phenolic contents in solvent fractions from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf by various solvents.

^{a-d}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Electron donating abilities of the solvent fractions from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf and commercial antioxidants

Solvents used	RC ₅₀ (µg/mL)
Hexane	94 ^{a1)}
Chloroform	26.1 ^b
Ethyl acetate	4 ^b
Butanol	6.3 ^b
Water	85.8 ^a
BHT	9.7 ^b
BHA	4.3 ^b

¹⁾Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

DPPH법에 의한 전자공여능을 비교한 결과는 Table 2와 같다. DPPH를 50% 환원시키는데 필요한 추출물의 첨가 농도 (RC₅₀)를 보면 연잎 추출물의 ethyl acetate분획물이 4.0 µg/mL로 다른 분획물보다 월등히 우수한 효과를 보여주었다. Ethyl acetate 분획물은 합성항산화제인 BHA(4.3 µg/mL)와 유사한 전자공여능을 나타내었으며 BHT(9.7 µg/mL)보다는 우수한 전자공여능을 나타내었다. Butanol 분획물 또한 RC₅₀값이 6.3 µg/mL로 ethyl acetate 분획물에 비하여 낮은 활성을 나타내었으나 BHT보다는 우수한 전자공여능을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물은 총 페놀함량 또한 가장 높게 나와 연잎의 항산화 물질은 페놀성 물질로 추정되며 ethyl acetate와 butanol 사이의 극성에서 잘 용해되는 것으로 추정된다.

TBA가 측정에 의한 지질 과산화 측정

DPPH법에 의해 전자공여능이 우수하게 나타난 ethyl acetate 분획물의 항산화력을 linoleic acid 자동산화조건에서 TBA가 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. BHA, BHT가 75%, 73%로 높은 값을 나타낸 반면 ethyl acetate 분획물은 54%로 비교적 낮은 값을 나타내어 전자공여능과 상이한 결과를 나타냈다. 이는 단일물질로 분리정제가 이루어지지 않

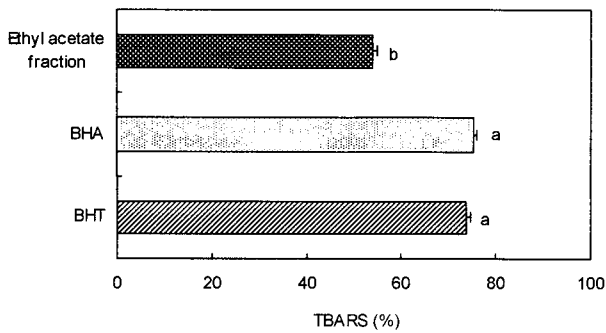


Fig. 3. Comparison of TBA value in linoleic acid substrates containing 500 ppm ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf with commercial antioxidants.

^{a-d}Means with different letters are significantly different (p<0.05).

은 ethyl acetate 분획물에서 malonaldehyde 이외 다른 성분이 TBA와 반응하여 발색한 결과로 추측되어진다(28).

Acid value(AV)와 peroxide value(POV)에 의한 항산화력

전자공여능이 우수하게 나타난 ethyl acetate 분획물의

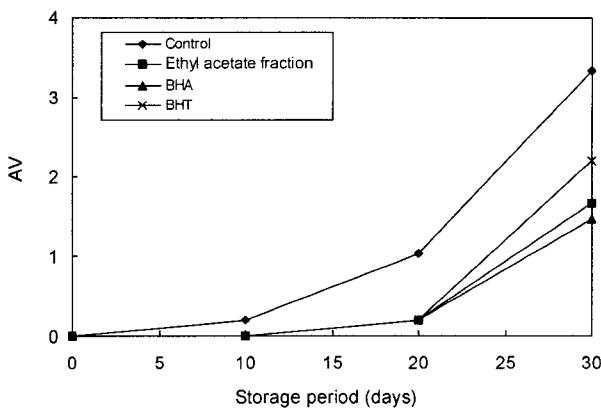


Fig. 4. Acid value of lard containing ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf during storage at 60°C.

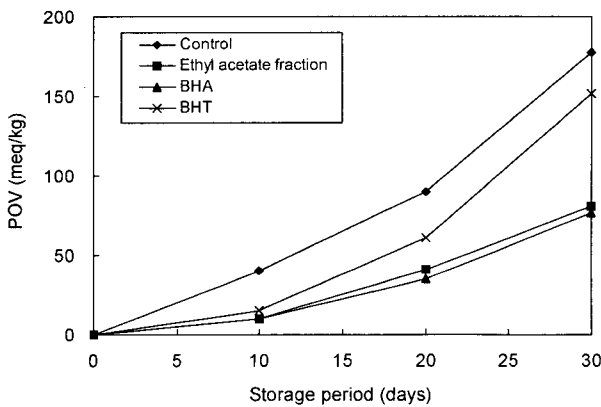


Fig. 5. Peroxide value of lard containing ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf during storage at 60°C (meq/kg).

lard에 대한 항산화력을 평가하기 위해 자동산화조건에서 AV를 측정된 결과는 Fig. 4와 같고 POV를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 유지의 산패지준으로서 AV는 유지의 유리지방산의 함량에 따라 달라지며, POV는 유지 초기 과산화물의 함량에 따라 달라진다. 60°C 항온기에 30일간 방치 후 AV는 BHA가 1.5로 가장 낮게 나타났으나 연잎 추출물의 ethyl acetate 분획물과 유의적인 차이는 없었다. BHT는 연잎 추출물의 ethyl acetate 분획물보다 높은 값을 보여 주었다. POV 역시 BHA가 77 meq/kg로 control의 절반에도 미치지 못하는 가장 낮은 값을 나타냈으나 연잎 추출물의 ethyl acetate 분획물과 유의적인 차이는 없었으며 BHT는 연잎 추출물의 ethyl acetate 분획물보다 높은 값을 보여 주었다. 이들 결과값은 전자공여능의 결과값과 일치됨을 볼 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 연잎 추출분획물의 항산화 활성을 비교, 검토하고자 하였다. 70% ethanol로 추출한 추출수율은 8.16%였으며 이를 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water로 순차 분획한 수율은 butanol층이 36.12%로 가장 높은 수율을 보였으나 대체적으로 극성이 높을수록 높은 분획수율을 나타내었다. 분획물간 총 페놀함량 측정결과 ethyl acetate 분획물의 총 페놀함량이 가장 높게 나왔으며 전자공여능 측정결과 또한 ethyl acetate 분획물에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. Ethyl acetate 분획물의 전자공여능은 BHA, BHT와 비교한 결과 BHA와 유사한 결과를 나타내었으며 BHT보다 우수한 값을 나타내었다. 항산화 활성이 높게 나타난 ethyl acetate 분획물을 취하여 TBA에 의한 지질과산화를 측정된 결과 BHA가 가장 우수한 활성을 보여 주었으며 ethyl acetate 분획물은 BHT보다도 활성이 떨어졌으나 이는 ethyl acetate 분획물이 단일물질로 분리정제가 이루어지지 않은 것으로 malonaldehyde 이외 다른 성분이 TBA와 반응하여 발색한 것으로 추측되어졌다. AV와 POV 측정결과 BHA가 가장 우수한 활성을 보여주었으나 ethyl acetate 분획물과 유의적인 차이는 없었으며 BHT에 비해서는 우수한 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 충남농업테크노파크 기업농육성사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. 1989. *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol I, p 223-244.
- Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2005. Antioxidant activity of

- extracts from the *Lespedeza bicolor*. *Korean J Food Preserv* 12: 75-79.
3. Halliwell B, Hoult RJ, Blake DR. 1998. Oxidants inflammation and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2: 2867-2870.
 4. Brannen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
 5. Ito N, Fukushima S, Hasebawa A. 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 70: 343-352.
 6. Chan KM, Decker EA, Means WJ. 1993. Extraction and activity of camosine a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* 58: 1-4.
 7. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extract. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
 8. Yoon JY, Song MR, Lee SR. 1990. Comparison of anti-thiamine activities of wild vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 20: 808-811.
 9. Lee YK, Lee HS. 1990. Effects of onion and ginger on the liquid peroxidation and fatty acid composition of mackerel during frozen storage. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 321-329.
 10. Park PS, Lee BR, Lee MY. 1994. Effect of onion juice on ethanol induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 750-756.
 11. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
 12. Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JL. 1992. Screening of natural antioxidant from plants and their antioxidative effect. *Korean J Food Sci Technol* 24: 142-148.
 13. Jamal NB, Ibrahim AW. 1994. Citric acid and antimicrobial affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J Food Sci* 59: 130-134.
 14. Borsch T, Barthlott W. 1983. Classification and distribution of the genus *Nelumbo adans* (Nelumbonacae). *Beitr Biol Pflazen* 68: 421-450.
 15. Dahlgren R, Rasmussen FN. 1983. Monocotyledon evolution characters and phylogenetic estimation. *J Evol Biol* 16: 255-265.
 16. Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS. 2003. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch Pharm Res* 26: 279-285.
 17. Hu M, Skibsted LH. 2002. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry* 76: 327-333.
 18. Yang HC, Kim YH, Lee TK, Cha YS. 1985. Physicochemical properties of lotus root (*Nelumbo nucifera* G.) starch. *J Korean Agric Chem Soc* 28: 239-244.
 19. Yen GC, Duh PD, Su HJ. 2005. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry* 89: 379-385.
 20. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
 21. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. Cd 8-35.
 22. Naik GH, Priyadarsini KI, Naik DB, Gangabhairathi R, Mohan H. 2004. Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine* 20: 530-538.
 23. Wong SF, Holliwell B, Richmond R, Skoweroneck WR. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J Inorganic Biochem* 14: 127-134.
 24. Kwak HJ, Kwon YJ, Jeong PH, Kwon JH, Kim HK. 2000. Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from onion (*Allium cepa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 349-355.
 25. Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyouncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1268-1272.
 26. Park SJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 121-124.
 27. Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. 2003. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. ussuriense KITAMURA. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 53-61.
 28. Kim DH. 1994. *Acidification of oil*. Korea University Press, Seoul. p 429-436.

(2005년 11월 3일 접수; 2006년 2월 3일 채택)