

은행(*Ginkgo biloba* L.) 종실 및 잎 추출물의 항산화 효과에 관하여

배재오 · 이기동 · 김정숙* · 윤형식

慶北大學校 農科大學 食品工學科 · *啓明專門大學

Antioxidative Effectiveness of Extract of Nut and Leaf of *Ginkgo biloba* L.

Bae, Jae Oh · Lee, Gee Dong · Kim, Jeong Sook* · Yoon, Hyung Sik

Dept. of Food Sci. and Tech., Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

*Dept. of Food Nutrition, Keimyung Junior College

Summary

Free phenolic acid, esterified and insoluble phenolic acid extract were extracted from Ginkgo nuts and leaves.

Antioxidative effectiveness was measured by Peroxide value and TBA value at each extract, control, 0.02% (w/w) BHA and BHT in corn oil, at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ and dark thermo-static oven for 45 days.

Laboratory tube was added by BHA, BHT, separated free phenolic acids, esterified and insoluble-bound phenolic acid extract of Ginkgo nuts and leaves 127, 95, 140, 121, 280 meq/kg, oil.

On the other hand, at the same condition TBA values of each antioxidative matter were 0.430, 0.153, 0.059, 0.175, 0.260, 0.187, 0.160, 0.174, 0.195.

This result remarkably appeared antioxidative effectiveness in corn oil substrate, *p*-Hydroxybenzoic acid, Syringic acid, Gallic acid, Protocatechuic acid, Pyrogallol, Caffeic acid, Coumaric acid, trans-Cinnamic acid, Phloroglucinol.

서 론

지방질 식품의 변패는 보통 유지성분의 자동산화에 의해 일어나고 이 자동산화는 고온, 광선, 산소, 중금속(Cu, Fe)에 의해 강력하게 촉진되며^{12, 15, 19)} 이러한 식용유지나 지방질을 함유하고 있는 가공식품의 산패를 억제 또는 지연시키기 위하여 이들 제품의 제조, 포장 및 저장시에 BHA(butylated hydroxyanisole)

BHT(butylated hydroxytoluene), TBHQ(tertiarybutylhydroquinone), P.G(propyl gallate)와 같은 페놀계 산화방지제와 토크페롤이 primary antioxidant로서 가장 많이 사용되고 있다.

그러나 최근에 합성 첨가물의 독성에 대한 문제점이 많아짐에 따라 천연 항산화성 물질에 대한 탐색연구가 많이 이루어지고 있는데 Chang et al³⁾은 rosemary의 에테르 추출물이

BHA, BHT, P.G.등보다 식물성 유지에 대하여 강한 항산화 효과가 있다고 보고하였으며, Chipault et al⁵⁾은 물-기름 에멀전 및 돈지에 대하여 clover, rosemary, sage등이 항산화 효과가 있다고 보고하였고, Hideharu et al¹⁰⁾은 생강, 고추, termeric 등의 알코올 및 에테르 추출물이 항산화 효과가 있음을 보고하였다.

천연 항산화제 및 천연 항산화성 물질로는 ascorbic acid, 토코페롤류 외에 플라보노이드류, 아미노산, 펩티드, 단백질 등이 알려져 있다. 또한 최등⁶⁾은 겨자의 메탄올 추출물에 대하여 김등¹³⁾은 오배자의 메탄올 추출물에 대하여 이등¹⁸⁾은 산쑥의 물 및 에테르 추출물에 대하여, 장등⁴⁾은 가자의 에테르 추출물에 대한 항산화 효과를 보고하였고, 미²²⁾는 건조 표고버섯의 각종 용매 추출물 중에서 메탄올 및 에탄올 추출물이 항산화 효과가 강함을 보고하였다. 또한 Masako et al²¹⁾은 12종류의 과일껍질과 37종류의 야채의 메탄올 추출물에 대한 항산화 효과를 보고하였다.

본 실험에 사용한 시료인 은행(*Ginkgo biloba* L.)은 은행나무과(*Ginkgoaceae*)에 속하는 식물로서 동남아시아 각 지역에서 자라는 낙엽교목¹⁷⁾으로, 그 종실은 주로 동양에서 옛부터 약용 또는 식용으로 많이 연구되어 오고 있다. 은행의 화학성분⁷⁾과 그 약리화학적 면^{11,11,20,25)}으로는 많은 연구가 이루어지고 있으나 식품학적인 면으로는 그 연구가 비교적 적은 편이다.

본 연구에서는 은행 종실 및 잎의 항산화 효과에 관한 특성을 조사하여 천연물의 항산화 효과에 대한 기초자료로 제시코자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 은행(*Ginkgo biloba* L.) 종실 및 잎은 1989년 10월 말에 본교에서 직접 채취하여 사용하였으며, 은행 종실 및 잎의 일반성분은 표 1과 같다.

Table 1. Chemical composition of Ginkgo nut and leaf

composition	content (%)	
	Nut	Leaf
Moisture	55.2	36.2
Crude ash	1.2	2.1
Crude fat	1.7	5.8
Crude protein	5.1	9.6
Carbohydrate	36.8	46.3

이들 추출물의 항산화력 측정 기질로써 식용 옥수수유(S사, 항산화제 무첨가)를 사용하였으며 기질로 사용한 옥수수유의 화학적 성상은 표 2와 같다.

Table 2. The result of some chemical analysis of the corn oil as used substrate

Peroxide value(meq/kg, oil)	2 ± 0.02
TBA value	0.015 ± 0.001
Iodine value	119 ± 1
Acid value	0.12 ± 0.01

2. 시약 및 분석기기

추출에 사용한 용매들은 시중 특급화학 시약을 구입하여 사용하였고 trimethylsilylation (TMS화)에 사용한 N.O-bis(trimethylsilyl) acetamide는 Fluka사 제품을 사용하였다. 페놀성 물질을 확인하기 위한 G.C.용 페놀산 표준품은 Sigma사 제품을 구입하여 TMS화 시킨 후 사용하였다.

사용기기는 TBA를 측정하기 위하여 영국제 Cecil spectrophotometer(CE 393)를 이용하였고 페놀산 확인은 Gas Chromatography (Pye Unicam Model number 304)를 사용하였다.

3. 실험방법

1) 은행 종실 및 잎의 일반성분 분석

은행 종실 및 잎의 수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 탄수화물등의 일반성분은 A.O.A.C법²⁾에 따라 실시하였다.

수분은 상압건조법, 조단백질은 Micro-kjel-dahl법, 조지방은 soxhlet추출법, 조회분은 550°C 직접회화법으로 분석하였다.

2) 옥수수유의 화학적 조성

과산화물가는 Lea¹⁶⁾ 법을 개량하여 측정하였으며 TBA(Thiobarbituric acid)가는 Sidewell et al.²⁷⁾의 방법으로 실시하였고, 산가와 요오드가는 A.O.A.C.-Wijs법¹²⁾에 준하였다.

3) 탈지 은행 종실 및 잎의 조제

탈지 은행 종실 및 잎은 그림 1과 같이 실시하였다.

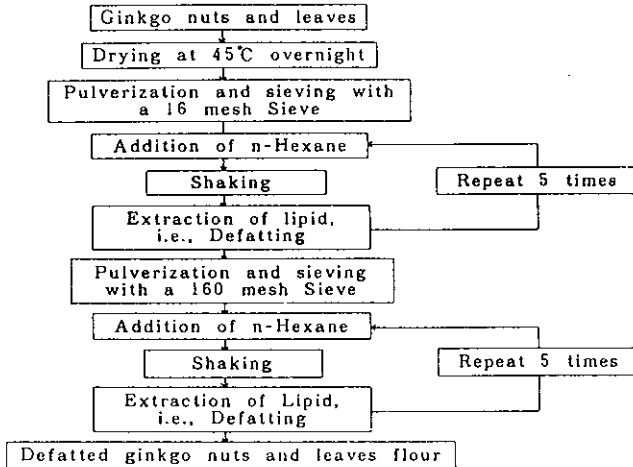


Fig. 1. Preparation of defatted Ginkgo nuts and leaves flour.

4) 페놀산의 추출

탈지 시료로부터 페놀성 물질 추출은 Krygier et al¹⁴⁾의 방법에 따라 그림 2와 같이 실시하였다.

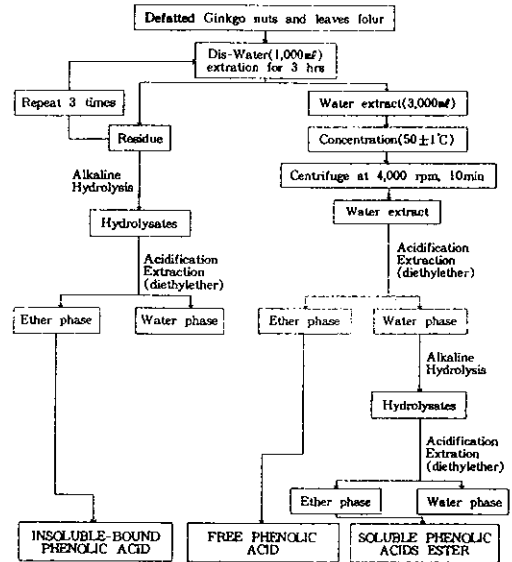


Fig. 2. Procedure for the extraction and separation of the free, esterified and insoluble phenolic compounds and their hydrolysis to phenolic acids.

즉 탈지시료 100g을 증류수 1,000ml로 3회 추출한 후 이들을 100ml로 감압 농축하여 사용하였다.

유리 페놀산을 추출하기 위하여 농축액을 1N-HCl로 pH2로 조절한 다음 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 부유물을 제거하였다. 상등액을 같은 분량의 diethylether로 6회 추출하였다. 유리페놀산을 함유한 diethylether 추출물을 30°C에서 증발시켜 잔사를 메탄올 100ml로 4시간 동안 실온에 방치하여 가수분해한 후 pH2로 하고 4,000rpm에서 10분간 원심분리하였다.

Hydrolysed 페놀산을 diethylether로 위와 같은 방법으로 농축하여 잔사를 메탄올 100ml로 녹였다.

불용성 페놀산을 추출하기 위하여 물로 추출한 잔사를 직접 질소 충전하에서 2N·NaOH 100ml로 4시간동안 실온에 방치하여 가수분해 한 후 산성화 시켜 원심분리한 상등액을 diethylether로 위와 같은 방법으로 농축하여 잔사를 메탄올 100ml로 녹였다.

5) 옥수수유 기질의 조제 및 저장

탈지시료 1g에 준하는 각각의 최종 페놀산 추출물 1ml와 0.02%(w/w) BHA, BHT를 식용 옥수수유 50g에 잘 혼합한 후 용매를 Water bath상에서 제거하였다.

페놀산 추출물과 인공항산화제를 첨가한 옥수수유를 Petridishes에 옮겨 45±1°C의 빛이 없는 항온기에서 45일간 저장하였다.

6) 항산화력의 측정

저장기간 동안 매 5일 간격으로 과산화물가와 TBA가를 측정하여 비교함으로써 항산화 효과를 검토하였다.

과산화물가는 Lea법¹⁶⁾ TBA가는 Sidewell et al²⁷⁾의 방법을 이용하였다.

7) 페놀산의 확인

탈지시료 추출물의 페놀산 확인은 Robert²⁴⁾의 방법에 따라 N.O-bis(trimethylsilyl)acetamide로 TMS화 시킨 후 Gas Chromatography로 분석하였다. TMS유도체를 만드는 방법은 다음과 같다.

추출물 1ml를 질소 충전하에서 용매를 증발시키고 Pyridine 0.1ml에 녹여 N.O-bis(trimethylsilyl)acetamide 1μl를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 G.C로 분석하였다. 또한 표준물질도 동시에 분석하였으며 각 Peak의 확인은 표준물질의 Retention time을 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 효과의 비교

1) 과산화물가

저장일수의 경과에 따른 과산화물가의 변화는 표 3과 같다.

Table 3. Variation of Peroxide values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo nuts and leaves with storage time (Peroxide value: meq/kg, oil)

Storage time	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Sample	(days)								
Control	4	8	20	30	53	89	150	235	280
BHA	4	3	8	21	35	51	81	105	133
BHT	3	3	4	9	15	25	34	48	52
*NF	3	3	4	11	24	48	70	95	115
NS	2	4	9	21	45	79	120	160	190
NI	3	3	5	19	40	67	95	110	127
LF	4	3	4	12	23	33	61	75	95
LS	3	3	6	19	30	58	89	105	140
LI	4	3	6	11	28	40	55	87	121

*NF; Ginkgo nuts free phenolic acid extracts 1ml
 NS; Ginkgo nuts soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 NI; Ginkgo nuts insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml
 LF; Ginkgo leaves free phenolic acid extracts 1ml
 LS; Ginkgo leaves soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 LI; Ginkgo leaves insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

대조구의 과산화물가는 저장일수가 경과함에 따라 크게 증가하였으나, 반면 은행종실 및 잎 추출물의 경우 전 실험기간 동안 과산화물가가 서서히 증가하였고 대조구보다는 상당히 낮은 값을 나타내었다. 이로 미루어

은행 종실 및 잎에는 산화억제작용이 강한 페놀성 물질이 있음을 추정할 수 있었다.

이들의 과산화물가를 그래프로 그림 3, 4에 나타내었다.

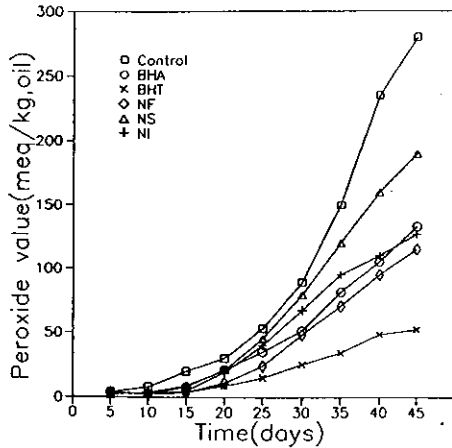


Fig. 3. Variation of Peroxide values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo nuts with storage time.

*NF: Ginkgo nuts free phenolic acid extracts 1ml
 NS: Ginkgo nuts soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 NI: Ginkgo nuts insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

즉, 대조구와 추출물사이의 상호 유도기간을 볼 때 대조구는 저장 15일경에는 유도기간이 끝나는 반면 추출물의 경우 대조구보다 5일에서 10일까지 유도기간이 연장됨을 볼 수 있었다. 식용 옥수수유에 대한 항산화력은 은행 종실 및 잎 추출물 공히 soluble, insoluble, free형 순으로 활성이 증가됨을 알 수 있

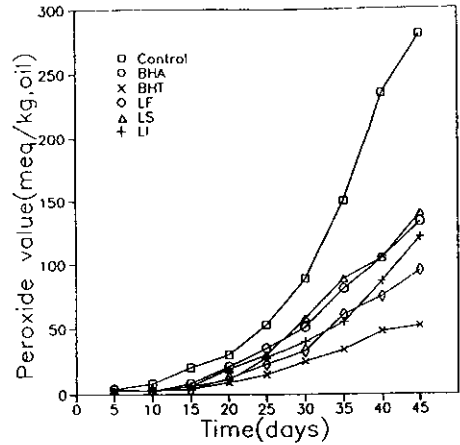


Fig. 4. Variation of Peroxide values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo leaves with storage time.

*LF: Ginkgo leaves free phenolic acid extracts 1ml
 LS: Ginkgo leaves soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 LI: Ginkgo leaves insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

었으며 전체적으로 볼 때 NS(LS(BHA(NI(LI(NF(LF(BHT순으로 활성이 증가됨을 볼 수 있었다.

2) TBA가의 변화

저장일수 경과에 따른 TBA가의 변화는 표 4와 같다.

Table 4. Variation of TBA values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo nuts and leaves with storage time (OD 530 nm)

Storage time	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Sample									(days)
Control	.027	.027	.039	.070	.099	.165	.210	.229	.430
BHA	.016	.015	.012	.041	.051	.081	.107	.113	.153
BHT	.025	.016	.013	.025	.038	.042	.040	.048	.059
*NF	.026	.018	.015	.031	.062	.081	.110	.135	.175
NS	.017	.016	.030	.055	.063	.130	.140	.191	.260
NI	.016	.021	.018	.063	.081	.109	.128	.159	.187
LF	.027	.025	.017	.032	.050	.084	.119	.145	.160
LS	.025	.017	.015	.057	.072	.097	.124	.152	.174
LI	.022	.017	.019	.036	.052	.073	.110	.125	.195

*NF: Ginkgo nuts free phenolic acid extracts 1ml
 NS: Ginkgo nuts soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 NI: Ginkgo nuts insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml
 LF: Ginkgo leaves free phenolic acid extracts 1ml
 LS: Ginkgo leaves soluble phenolic acids ester extracts 1ml
 LI: Ginkgo leaves insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

대조구의 경우 저장 20일의 흡광도는 0.070에서 10일후인 30일은 0.165로 지질산패 최종 산물인 Malonaldehyde가 급격히 생성됨을 알 수 있었고, 반면에 추출물의 경우 대조구보다 10일에서 20일이 더 지난후에야 Malonaldehyde가 생성됨을 볼 수 있는데 이는 이동⁹⁾의 산썩의 페놀산 추출물의 결과와 잘 일치하고 있다. 또한 식물체에 함유된 여러 페놀산은 강한 항산화 효과가 있다는 보고^{8,9,25)}와도 일치하고 있다.

TBA가도 과산화물가 결과와 같이 은행 종실 및 잎 추출물 공히 Soluble(Insoluble(Free형 순으로 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 전 실험기간을 통한 TBA가의 변화는 그림 5, 6에 나타내었다.

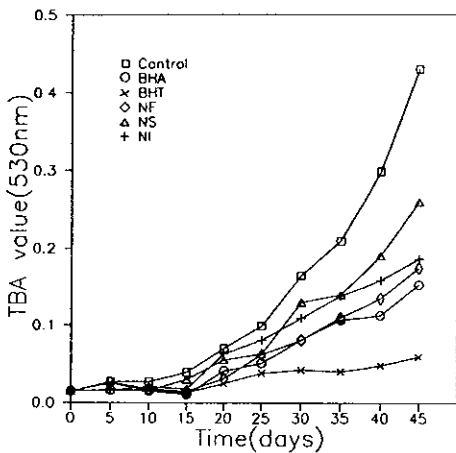


Fig. 5. Variation of TBA values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo nuts with storage time.

*NF; Ginkgo nuts free phenolic acid extracts 1ml

NS; Ginkgo nuts soluble phenolic acid ester extracts 1ml

NI; Ginkgo nuts insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

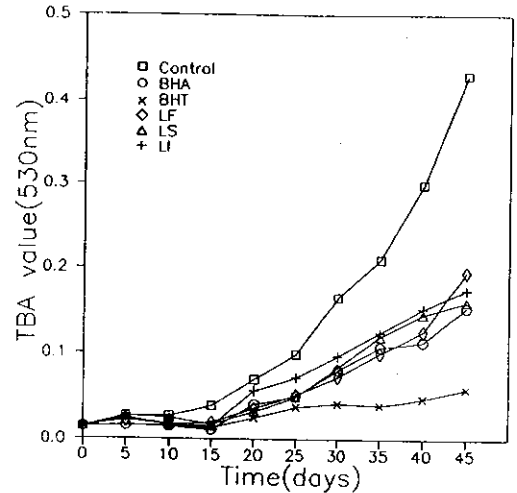


Fig. 6. Variation of TBA values of the corn oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts of Ginkgo leaves with storage time.

*LF; Ginkgo nut free phenolic acid extracts 1ml

LS; Ginkgo nut soluble phenolic acid ester extracts 1ml

LI; Ginkgo nut insoluble-bound phenolic acid extracts 1ml

이상의 결과로 미루어 은행 종실 및 잎 추출물은 식용 옥수수유에서 항산화 효과가 강함을 알 수 있었고 특히 잎 추출물이 종실 추출물 보다도 더 강한 항산화 효과를 나타내었다.

3) 페놀산의 확인

은행 종실 및 잎에 존재하는 페놀산의 종류를 확인하기 위하여 유리페놀산, 에스터형 페놀산, 불용성 페놀산의 Gas chromatogram을 그림 7, 8, 9, 10, 11에 나타내었다.

Gas chromatography로 부터 분리확인된 페놀산의 표준물질의 Retention time과 비교해 본 결과 은행 종실의 유리형 페놀산에는 trans-Cinnamic acid, Vanillin, ρ -Hydroxybenzoic acid, Syringic acid, Gallic

acid, Caffeic acid가 확인되었고, 불용성 페놀산에는 Vanillin, ρ -Hydroxybenzoic acid, Phloroglucinol, Protocatechuic acid, Coumaric acid, Gallic acid, Syringic acid가 분리 확인되

었으며, 불용성 페놀산에는 Pyrogallol, Vanillin, ρ -Hydroxybenzoic acid, Gentisic acid, Protocatechuic acid, Coumaric acid가 분리 확인되었다.

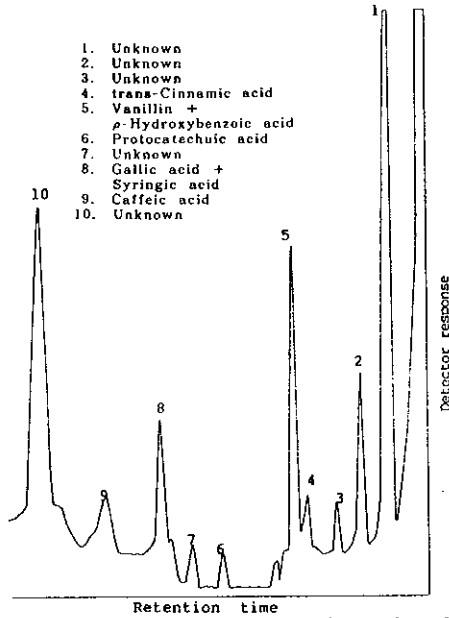


Fig. 7. Gas chromatogram of free phenolic acids of Ginkgo nuts.

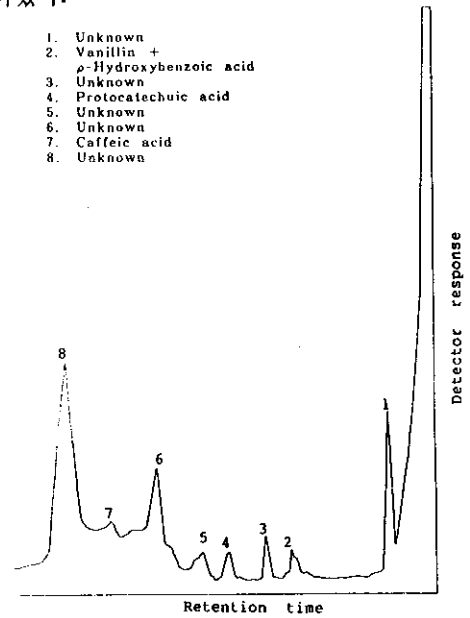


Fig. 8. Gas chromatogram of insoluble-bound phenolic acids of Ginkgo nuts.

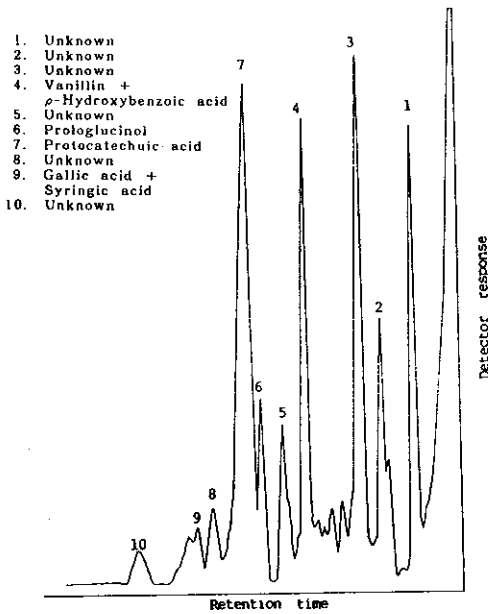


Fig. 9. Gas chromatogram of free phenolic acids of Ginkgo leaves.

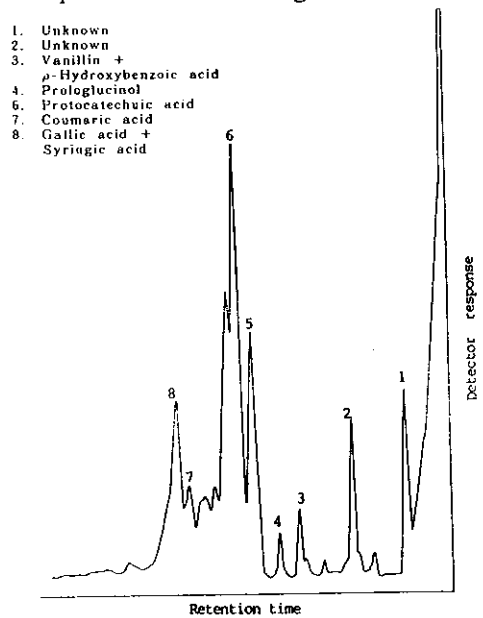


Fig. 10. Gas chromatogram of soluble phenolic acid esters of Ginkgo leaves.

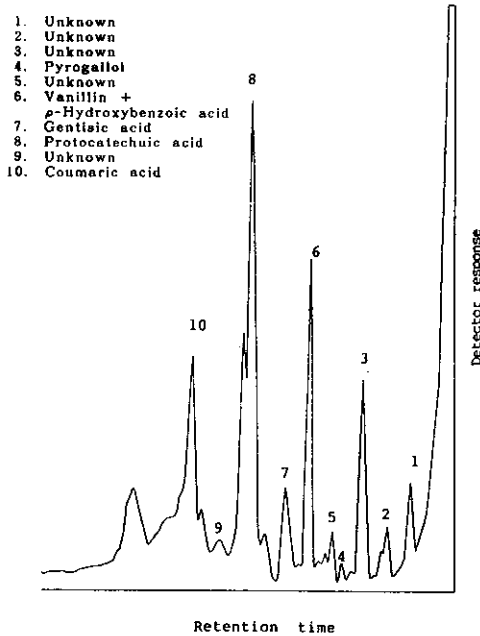


Fig. 11. Gas chromatogram of insoluble-bound phenolic acids of Ginkgo leaves.

적 요

탈지 은행 종실 및 잎에서 유리페놀산, 에스터형 및 불용성 페놀산을 추출하여 식용

옥수수유 기질에서 항산화 효과를 비교하고자 0.02%(w/w)의 BHA, BHT와 각 추출물 1ml(2% w/w)를 넣어 45±1°C의 항온기에서 45일간 저장하면서 매 5일 간격으로 과산화물가, TBA가를 측정하여 다음과 같이 항산화 효과를 추정하였다.

BHA, BHT와 은행 종실의 유리페놀산, 에스터형 및 불용성 페놀산, 잎의 유리페놀산, 에스터형 및 불용성 페놀산 추출물을 첨가한 시험구와 대조구의 45일 저장후 과산화물가는 각각 133, 52, 115, 190, 127, 95, 140, 121, 280meq/kg, oil이었다.

한편 같은 조건하에서 각 항산화성 물질의 TBA가는 0.153, 0.059, 0.175, 0.260, 0.187, 0.160, 0.174, 0.195 0.430이었다.

G.C.로 분리 확인된 페놀산은 은행 종실 및 잎 공히 Vanillin, *p*-Hydroxybenzoic acid, Syringic acid, Gallic acid, Protocatechuic acid가 확인되었고 은행 종실에서는 trans-Cinnamic acid, Caffeic acid가, 잎에서는 Coumaric acid, Gentisic acid, Phloroglucinol, Pyrogallol이 각각 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 은행 종실 및 잎의 페놀산은 식용 옥수수유 기질에서 우수한 항산화 효과가 있는 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

1. Adawadkar, Prakash D., El Sohly Mahmoud A. 1981. Isolation, purification and antimicrobial activity of anacordic acids from *Ginkgo biloba* Fruits. *Fitoterapia*. 52(3); 129-135.
2. A.O.A.C. Association Official Analytical Chemists. 1984. Washington.
3. Chang, S.S., Matijaservic, B.D., Hasieh, O. A.L. and Huang, C.L. 1977. *J. food Sci.* 43; 1102.
4. 장성준, 윤형식. 1990. 가자(*Terminalia chebula*) 추출물의 항산화 효과. 경북대 대학원 석사학위논문.
5. Chipault, J.R., Mizuno, G.R. and Lundberg, W.O. 1956. *Food Tech.* 10;209.
6. 최규홍, 김정숙, 윤형식, 1989. 겨자(*Brassica Juncea*) 메탄올 추출물의 항산화 효과, 경북대 농학지. 8;165~174.
7. 정안석, 신효선. 1978. 은행 종실의 지질 성분에 관한 연구. 한국식품과학회지. 10 (2);119-123.
8. Dan E. Pratt. *Lipid Antioxidant in Plant Tissue*. pp.737-741.
9. Hideharu, F., Takai, Y. and Iwao, H. 1974. *Eiyojaku Zasshi*. 32(1);1
10. Itokwa Hideji, Takeya Koich, Kondo Miyuki, Inamatsu Mutsumi, Morita Hiroshi. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from (*Ginkgo biloba* L.)

1989. Chem. Pharm. Bull. 37(6); 1619-1621.
11. 김홍열, 김동훈. 여러조건하에서 저장된 감자튀김의 산패에 있어서 BHA와 Ascorbic Acid의 상대적 억제효과에 대하여. 1972. 한국식품과학회지, 4(4); 245-251.
 12. 김태철, 윤형식. 1990. 오배자(*Rhus Japonica* L.) 메탄올 추출물의 항산화 효과에 관하여 경북대 대학원 석사학위논문.
 13. 大澤俊彦, 並木満夫. 1985. 天然抗酸化劑とその生理活性. フードケミカル. pp.42-50.
 14. Krzysztof Krygier, Frank Sosulski, Lawrence Hoggy. Free, Esterified and Insoluble-bound Phenolic acids. 1. Extraction and Purification Procedure. 1982. J. Food Chem. 30;330-334.
 15. 구자현, 김동훈, 1971. 식용유지의 산패과정에 대한 일사광선, 백열등광선, 형광등광선 및 살균등광선의 촉진작용에 대하여. 한국식품과학회지. 3(3):178-184.
 16. Lea, C.H. 1949. Peroxide number-cold method. J. Am. Oil Chem. Soci. 26;152.
 17. 이창복, 1980. 대한식물도감. 향문사. p. 57.
 18. 이기동, 윤형식. 1990. 산썩의 물 추출물과 에테르 추출물의 항산화 효과, 경북대 대학원 석사학위논문.
 19. 이영시, 김동훈. 1972. 착색 투명셀로판 및 피리딘, 벤조페놀, ρ -아미노 벤졸산 등으로 처리된 무색 투명 셀로판으로 덮은 식용대두유의 직사광선에 의한 산패에 대하여. 한국식품과학회지. 4(4); 239~244.
 20. Lotti, G. 1985. Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment. 14(4);263-270.
 21. Masako Nose, Naoko Fujino. 1982. antioxidant activity of some vegetable foods and activity component of Avocado Epicarp. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 29(9); 507-512.
 22. 마상조. 1983. 건조표고버섯의 각종 용매 추출물의 항산화 작용의 효과. 한국식품과학회지. 15(2); 150-154.
 23. 박동기, 박화진. 1990. 은행, 은행잎 및 들깨잎에서 추출한 지용성 성분이 쥐의 혈소판 응집에 미치는 영향. 한국영양식량학회지. 19(2);127-132.
 24. Robert J. Horvat, Samuel D. Senter. 1982. A Gas-Liquid chromatography method for analysis of phenolic acids in plants. J. Agri. Food Chem. 28;1292-1295.
 25. Schrall, R., Becker, H. 1987. Production of catechins and oligomeric proanthocyanidins in callus and suspension cultures of *Cartaegus monogyma* C. *Oxyacantha* and *Ginkgo biloba*. Planta Med. 32(4); 297-318.
 26. Sigezo Naito, Naiko Yamaguchi and Yoshio Yokoo. 1982. Fractionation of antioxidants from Cacao Bean Husk. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 29(9); 529-533.
 27. 小原哲二郎, 錦木陸雄, 岩尾裕之. 1975. 食品分析. pp.146-159. 建帛社. 東京.