

## 보리잎에서 분리된 용매 추출물의 항산화 작용

이영철 · 손종연 · 김경탁 · 김성수

한국식품개발연구원

### Antioxidant Activity of Solvent Extract Isolated from Barley Leaves

Young-Chul Lee, Jong-Youn Son, Kyung-Tack Kim, Sung-Soo Kim

Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku,

Songnam 463-420, Korea

#### Abstract

The antioxidant activity of solvent extracts isolated from barley leaves was investigated by measuring peroxide value. The fractions of methanol extract obtained from preparative TLC was also studied, with UV-Visible spectrum, total phenol contents and hydrogen donating ability(HDA). The antioxidant activity of various solvent extracts was, in decreasing order, methanol>ethyl ether> methylene chloride>ethyl acetate>acetone> hexane. The antioxidant activity of the fractions of methanol extract was, in decreasing order, fraction 2>fraction 3>fraction 1 and their activity was all superior to that of -tocopherol at 500 ppm level. All fraction(1, 2 and 3) exhibited a strong UV absorption at 280 nm which would be specifically produced by phenolic compound. UV absorption at 280 nm of fraction 2 was greater than those of fraction 1 and 3. In the visible spectrum of these fractions, the maximum absorption wavelengths of fraction 1, 2 and 3 were 660, 460 and 460 nm, respectively. Antioxidant activity of barley leaves seemed to be due to the flavonoids containing phenolic group by UV spectrum and total phenol content.

Key words : antioxidant activity, barley leaves, solvent extracts

#### 서 론

근래 합성항산화제에 대한 안정성 문제가 대두되면서 천연물로부터 생리작용이 분명한 항산화제 개발에 관심이 고조되고 있다<sup>1, 2)</sup>.

천연물 중에 수많은 항산화물질이 존재하지만 대표적인 것으로는 tocopherol, lignan 유도체, phenolic 화합물, flavone 유도체, 마이알만용 생성물, 아미노산, peptide, aromatic amine 등이 알려져 있다<sup>3~6)</sup>.

그러나 대부분의 천연 항산화 물질은 합성항산화제에 비해 그 항산화 효과가 상당히 떨어지기 때문에 tocopherol을 제외하고 실용적으로 사용되는 경우는 별로 없는 실정이다.

식물체에 존재하는 페놀성 화합물은 2차 대사산물의 하나로서 1,000여 종류 이상이 밝혀져 있으며 그중 flavonoid류가 대부분이며 단순한 monocyclic phenol류, phenyl propanoid류, phenolic quinone류도 상당량 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

한편 이들 페놀성 화합물들은 그들의 phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질, 항산화 효과, 2가 금속이온과의 결합능을 가지며 이들의 구조에 따라 이화학적 성질, 생리적 기능 및 항산화 효과가 다르게 나타난다<sup>8)</sup>.

보리잎에는 생리활성기능을 갖고 있는 효소, 단백질, 비타민 및 무기질 등이 함유되어 있으며 항염, 항퀘양작용, 에이즈와 암의 억제 및 DNA 수복효과 등의 약리작용에 대해 여러 연구자들에 의해 밝혀지고 있으

나<sup>9-11)</sup> 이들의 항산화 작용에 대한 연구보고는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 보리잎 중에 존재하는 항산화 물질을 여러가지 용매로 추출하여  $\alpha$ -tocopherol의 항산화 효과와 비교하고 메타놀추출물의 분획별 항산화 효과, UV-Visible spectrum, 총페놀 함량 및 수소공여능과의 관계를 조사하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

1994년 4월에 전라남도 흑산도에서 재배된 보리잎(겉보리)를 구입(가락동 농산물시장, 서울)하여 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서 동결한 후 동결건조기에서 건조하였다. 건조한 보리잎을 분쇄하여 50 mesh의 체로 분별한 50 mesh 이하의 보리잎 분말을 시료로 사용하였다.

### 2. 용매 추출

동결건조한 50 mesh이하의 보리잎 분말에 hexane, ethyl ether, methylene chloride, ethyl acetate, acetone, methanol을 10배량 가하여  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간동안 교반하면서 추출하였다. 추출후 여과하여 얻어지는 잔사에 다시 같은 추출용매를 가하여 추출을 2번 행하였다. 용매 추출액을 anhydrous sodium sulfate로 탈수시킨 후 여과하여 rotary evaporator로 농축하여 증량법으로 추출율을 측정하였으며, 추출율은 추출전 보리잎의 무게에 대한 추출물의 무게 백분율로 계산하였다.

### 3. 여러 용매 추출물의 항산화 효과 조사

농축한 여러 용매 추출물을 다시 추출용매에 소량 녹인 후 기질로 사용한 linoleic acid(Sigma Co. Ltd., U. S. A.)에 500 ppm 농도로 첨가하여 stirrer로 5분 동안 교반한 후 rotary evaporator로 용매를 제거하였다. 용매를 제거한 기질은 100 ml의 beaker에 50g씩 분취하여  $35^{\circ}\text{C}$ 를 유지하는 항온기에 저장하면서 1일 간격으로 과산화물가를 측정하였다. 산화 정도는 과산화물가를 AOCS cd 8-58 방법<sup>12)</sup>으로 측정하여 meq/kg oil로 나타내었다.

### 4. Preparative TLC에 의한 메타놀 추출물의 분획

Preparative TLC에 의한 메타놀추출물의 분획은 예비실험 결과 크게 3개의 부분으로 분획되는 chloroform:methanol(85:15, v/v) 전개용매를 이용하였다.

즉, 메타놀추출물 10 ml를 preparative TLC plate(Sigma Co. Ltd., U. S. A.)에 가로로 길게 spot한 후 chloroform:methanol(85:15, v/v) 전개용매로 상향법으로 17 cm 전개하여 3개의 분획띠를 scraping하였다. Scraping한 분획물을 다시 메타놀에 녹여 linoleic acid에 첨가하여 분획물의 항산화 효과를 위해 언급한 방법대로 조사하였다. 한편 천연항산화제로 알려진  $\alpha$ -tocopherol를 500 ppm의 농도로 첨가하여 이들의 항산화 효과와 비교하였다.

### 5. 분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수패턴은 UV/Vis spectrophotometer (Beckman DU-65, U. S. A.)를 사용하여 200~800 nm에서 측정하였다.

### 6. 분획물의 총페놀 함량분석

Preparative TLC에 의해 분리된 분획물의 총페놀 함량은 Folin-Denis법<sup>13)</sup>에 의해 행하였다. 즉, 100 ml 메스플라스크에 75 ml의 증류수와 분획물 1 ml을 넣고 잘 혼합한 후, Folin-Denis 시약 5 ml와 탄산나트륨 포화용액 10 ml을 넣은 후 증류수로 100 ml 용량으로 채웠다. 이것으로 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 % tannic acid 당량으로 환산하였다.

### 7. 분획물의 수소공여능(hydrogen donating ability, HDA)의 측정

Preparative TLC에 의한 분획물의 수소공여능은 DPPH(1,1-diphenyl-picrylhydrazyl)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 UV/Vis spectrophotometer (Beckman DU-65, U. S. A.)로 측정하였다<sup>14)</sup>. 즉, 분획물 1 ml와 DPPH용액( $6.25 \times 10^{-5}$  M) 3 ml를 시험관에서 5초 동안 vortex mixer로 혼합한 후 대조

구에 대한 흡광도의 감소비율로서 수소공여능을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 용매별 추출물의 추출율

동결건조한 보리잎에 hexane, ethyl ether, methylene chloride, ethyl acetate, acetone 및 methanol을 가하여 추출하였을 때 각각의 추출율은 Table 1과 같았다.

**Table 1. Yield of various solvent extracts**

Solvent	Yield(%)
Hexane	1.8
Ethyl ether	2.0
Methylene chloride	8.0
Ethyl acetate	9.1
Acetone	5.1
Methanol	17.7

Hexane, ethyl ether, methylene chloride, ethyl acetate, acetone 및 methanol의 추출율은 각각 1.8, 2.0, 8.0, 9.1, 5.1 및 17.7%로 보리잎 중에 함유되어 있는 성분들은 hexane과 같은 비극성 용매보다는 이보다 극성이 강한 methanol에서 용출되는 성분이 많은 것을 알 수 있었다.

Wax, 지질, terpenes 및 chlorophyll 등은 비극성 용매, phenolic compound, 방향족 아민, 단백질 및 탄수화물과 같은 수용성 물질은 acetone, ethanol, methanol 및 물 등의 극성용매에 잘 추출되는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>.

따라서 메타놀추출물의 추출율이 다른 용매 추출물보다 높은 것은 일반적으로 식물체에 존재하는 성분인 폴리페놀성 화합물을 비롯한 수용성 물질이 상당량 존재하기 때문인 것으로 생각되었다.

### 2. 용매 추출물의 항산화 효과

보리잎에서 추출한 용매 추출물이 첨가된 linoleic acid의 자동산화에 대한 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. 저장기간 9일째 methanol,

ethyl ether, methylene chloride, ethyl acetate, acetone, hexane추출물을 첨가한 기질과 대조구의 과산화물가는 각각 43.9, 44.8, 47.7, 49.9, 53.3, 61.0 및 98.9 meq/kg oil이었다. 각 용매별 추출물들은 용매추출물을 첨가하지 않은 대조구에 보다 낮은 과산화물가를 나타내어 항산화작용이 있음을 보여 주었다.

이들의 항산화 효과의 크기는 methanol>ethyl ether> methylene chloride≥ethyl acetate≥acetone>hexane순으로 methanol추출물의 항산화 효과가 가장 강하였으며 hexane추출물이 가장 낮은 효과를 보였다.

한편 각 용매별 추출비율의 결과에서 보는 바와 같이 methanol추출물의 추출율은 다른 용매추출물의 경우보다 높기 때문에 보리잎 중에 존재하는 항산화 물질은 주로 메탄올추출물에 존재하는 것으로 판단되어 methanol추출물을 분획하였다.

### 3. Preparative TLC에 의한 메타놀추출물의 분획

Chloroform:methanol(85:15, v/v)의 전개용매를 사용하여 메탄올추출물을 분획한 결과, 5개의 band가 확인되었다(Fig. 2).

이들의 Rf치는 각각 0.88, 0.61, 0.63, 0.67 및 0.0이었다. Rf치 0.88의 분획물(녹색)을 fraction 1, Rf치 0.61~0.67의 분획물(황색)을 fraction 2, Rf치 0.0의 분획물(갈색)을 fraction 3로 칭하여 각각의 수율을 조사한 결과, fraction 1, 2 및 3의 percent 함량은 각각 3.42, 5.36 및 91.20%로 나타나 대부분 fraction 3에 존재함을 알 수 있었다.

### 4. 분획물의 항산화 효과

Preparative TLC에 의한 메탄올추출물의 분획물 fraction 1, 2 및 3의 과산화물가는 Fig. 3과 같았다. 저장 9일째의 fraction 1, 2, 3,  $\alpha$ -tocopherol을 첨가한 기질과 대조구의 과산화물가는 각각 53.6, 36.4, 49.7 및 67.1 meq/kg oil이었다. Fraction 2에서 가장 큰 항산화효과를 보였으며 이어 fraction 3, 1의 순으로 나타나 분획한 fraction에 따라 보리잎의 항산화 효과는 다르게 나타났으며, 모두  $\alpha$ -tocopherol보다 우수한 것으로 나타났다.

또한 fraction 2와 3의 항산화 효과는 분획전의 메

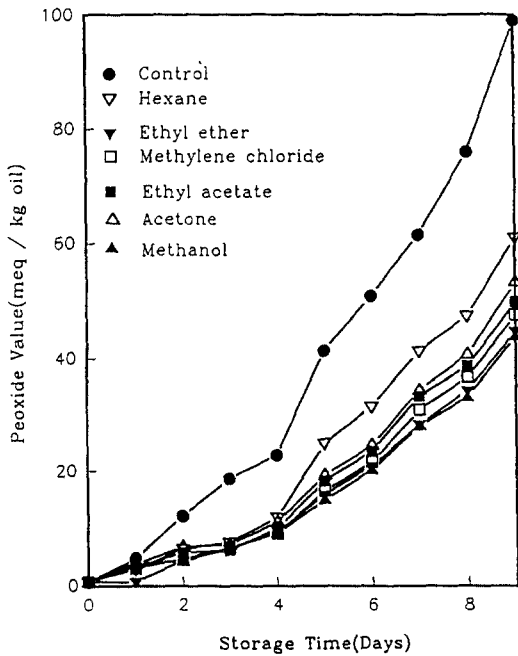


Fig. 1. The peroxide values of the control and substrates, containing the various solvent extracts from barley leaves.

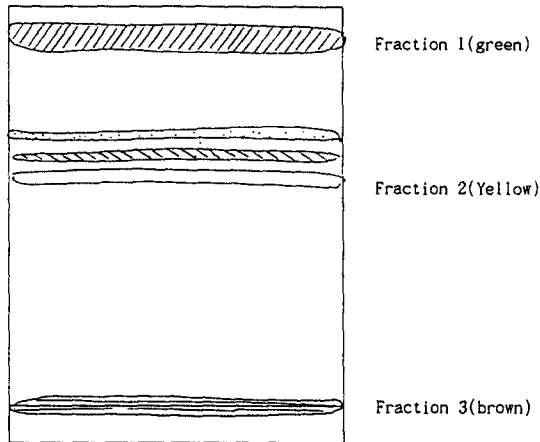


Fig. 2. Preparative TLC chromatogram of methanol extracts developed with solvent system chloroform : methanol(85:15, v/v).

타놀추출물보다 강한 항산화 효과를 나타내어 메타놀 추출물보다 강한 항산화 효과를 나타내어 메타놀추출물의 주요 항산화 물질은 대부분 fraction 2와 3에 존

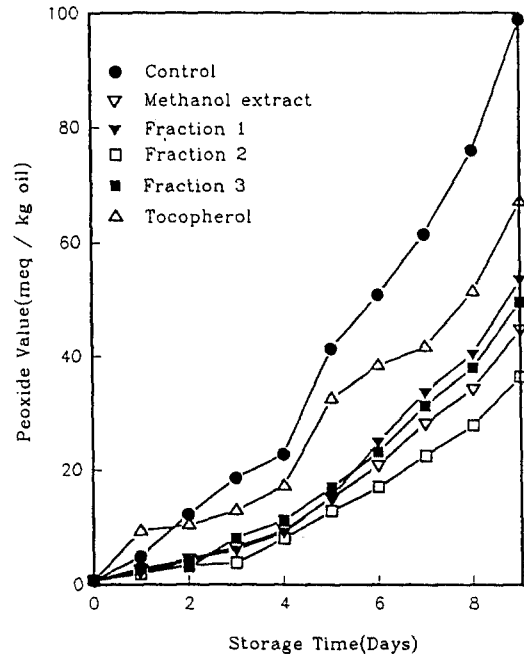


Fig. 3. The peroxide values of the control and substrates, containing the various fractions isolated from methanol extract.

재하는 것으로 보였다.

5. 분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수패턴

메타놀 분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수패턴을 조사한 결과는 Fig. 4와 같았다. Fraction 1과 2의 경우 230과 280 nm 부근에서 fraction 3의 경우 230, 280, 330 nm에서 강한 흡수 파장을 보였으며 280 nm에서 흡수는 fraction 2에서 가장 강하게 나타났으며 이어 fraction 1과 3의 순이었다.

가시광선부의 흡수파장을 조사한 결과 fraction 1에서는 660 nm와 460 nm에서, fraction 2와 3에서는 460 nm에서 최대흡수를 보였다.

Flavonoids는 여러 곡류나 차잎에 유리 또는 당류와 결합된 배당체로 존재하며 자외선을 강하게 흡수하는 성질을 가지고 있다. 또한 이들 배당체는 극성용매에 잘 용해되며, 유기용매에 잘 용해되지 않는다<sup>16)</sup>.

Geissman<sup>17)</sup>은 과실이나 잎에 존재하는 methyl-

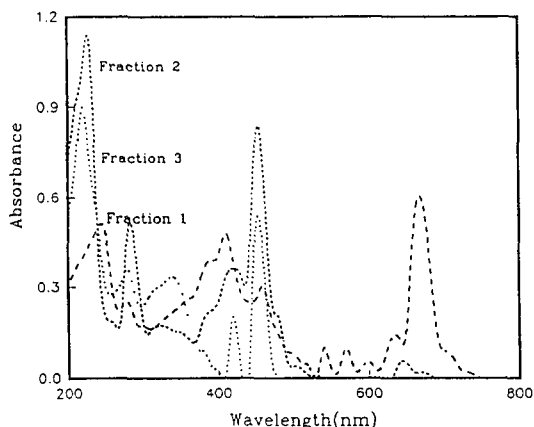


Fig. 4. UV-Visible spectra of various fractions isolated from methanol extract by preparative TLC.

ated flavones는 석유에테르와 같은 비극성용매에 의해 쉽게 추출됨을 설명하고 있다.

이러한 관점에서 fraction 2의 경우는 유리형태가, fraction 3은 배당체 형태의 flavonoid의 존재를 예상할 수 있었다.

이들 분획물의 흡수패턴으로 부터 fraction 1에는 chlorophyll과 flavonoid, fraction 2와 3의 경우는 유리 또는 배당체 형태의 flavonoid가 주로 존재하는 것으로 추정되며, 분획물들의 항산화작용은 이들 flavonoid류에 주로 기인되는 것으로 생각되었다.

#### 6. 분획물의 총페놀 함량과 수소공여능

각 분획물의 총페놀의 함량과 수소공여능을 측정된 결과는 Table 2와 같았다. Fraction 1, 2와 3의 총페놀의 함량은 건물기준시 0.47, 1.65 및 0.93%로 나타나 fraction 2에서 가장 높은 함량을 나타낸 반면 fraction 1은 상대적으로 낮은 함량을 나타냈다. 이러한 경향은 자외선 흡수에서 나타난 결과와 잘 일치하였다.

항산화성을 나타내는 phenolic compound은 280 nm에서 최대 흡수파장을 나타내는 것으로 알려져 있어<sup>15)</sup> 분획물들의 항산화 작용은 이들 페놀성 화합물에 기인되는 것으로 생각되었다.

자외선 흡수패턴, 총페놀의 함량의 측정결과로 부터

Table 2. Total phenol content and hydrogen donating ability(HDA) of fractions of methanol extract isolated by TLC

Sample	Total phenol content	HDA
Methanol extract	0.99	0.35
Fraction 1	0.47	0.33
Fraction 2	1.65	0.25
Fraction 3	0.93	0.31

fraction 1, 2 및 3에는 모두 phenolic hydroxy group을 갖는 물질이 존재하며 항산화 효과가 가장 크게 나타난 fraction 2에 가장 많은 phenolic 화합물이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

한편 fraction 1, 2와 3의 수소공여능은 각각 0.33, 0.25 및 0.31로서 항산화 효과가 가장 크게 나타난 fraction 2의 경우 가장 낮은 수치를 보여 총페놀함량과 수소공여능은 서로 다른 결과를 나타내었다.

이들 결과로 부터 분획물 중의 주요 항산화 물질은 페놀성 화합물로 생각되었으며 이들의 항산화 작용 기작은 반드시 수소공여능에 기인되는 것은 아님을 시사하고 있다.

Pratt등<sup>18)</sup>은 flavonoid의 항산화 작용은 phenolic group에 의한 free radical 억제 작용 이외에 3-hydroxy /4-keto group이나 5-hydroxy /4-keto group의 금속 킬레이트작용에 기인됨을 설명하고 있다.

따라서 분획물 중의 항산화 물질은 free radical inhibitor로서의 작용 이외에 금속 킬레이트 작용, 과산화물을 환원적으로 분해하는 작용 및 그외의 미지의 작용들도 관여하는 것으로 보인다.

## 요 약

보리잎 중에 존재하는 항산화 물질을 여러 용매로 추출하여 그 항산화 효과를 비교하고, methanol추출물의 preparative TLC에 의한 분획물의 항산화 효과, UV-Visible spectrum, 총페놀 함량 및 수소공여능과의 관계를 조사하였다. 각 용매추출물의 항산화 효과의 크기는 methanol>ethyl ether>methylene chloride>ethyl acetate≥acetone>hexane 순으

로 나타났다. 메타놀추출물의 분획물인 fraction 1, 2 및 3의 항산화 효과는 fraction 2 > fraction 1 > fraction 3의 순이었으며, 이들의 효과는 모두  $\alpha$ -tocopherol보다 강한 것으로 나타났다. 자외선 흡수스펙트럼을 조사한 결과, Fraction 1, 2과 3에서 페놀성 물질의 존재를 나타내는 280 nm에서의 강한 흡수가 보였으며 이들의 흡수는 fraction 2에서 가장 강하게 나타났다. 가시광선의 흡수스펙트럼의 경우 fraction 1, 2와 3는 각각 660 nm, 460 nm 및 460 nm에서 최대흡수파장을 보였다. 자외선 스펙트럼과 총페놀 함량의 조사 결과, 보리잎의 항산화효과는 phenolic group을 함유하는 flavonoids에 기인되는 것으로 생각되었다.

### 참고문헌

- 김동훈 : 식용유지의 산패, 고려대학교 출판부, p. 336(1994).
- 太田靜行 : 食品と抗酸化劑, 株式會社 食品資材研究會 p. 39(1987).
- Kajimoto, G., Yoshida, M and Shibahra, A. : A role of tocopherol on the heat stability of vegetable oils, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 301(1985).
- Fukuda, Y. and Nagata, M. : Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil and the effect of using the oil for frying. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 857 (1986)
- Hudson, B. and Lewis, J. : Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oil phospholipid as synergist. *Food Chem.*, **10**, 111(1983)
- Haumann, B. F. : Antioxidants : Firms Seeking Products They can. *Inform*, 1(12), 1002 (1990).
- Salunkhe, D. K., Chavan, J. K. and Kadam, S. S. : "Dietary Tannins: Consequences and Remedies", CRC Press Inc. Boca Raton, Florida (1990).
- 이정희, 이서래 : 식물성 식품중 페놀성 물질의 몇 가지 생리활성, *한국식품과학회지*, **26**(3), 317 (1994).
- 大竹英俊 : 大麥若葉の青汁成分の研究, ラットの食餌にする高コレステロール血症に對する影響, *藥學雜誌*, **105**, 1052(1985)
- 大竹英俊 : 大麥若葉の青汁成分の研究, 抗潰瘍因子について, *藥學雜誌*, **105**, 1046(1985)
- 武藤達秀 : 主として皮膚疾患に對する麥綠素の治験, *新藥と臨床*, **26**, 983(1977)
- AOCS : Method Cd 8-53. In: "AOCS Official and Tentative Methods". 4th edition, American Oil Chemists' Society, Chicago(1990)
- A.O.C.S. : "Official Methods of Analysis" 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. (1980).
- Endo, Y., Usaki, R. and Kaneda, T. : Antioxidant effect of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidant action of chlorophyll. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1387 (1985).
- 우원석 : 천연물화학연구법, 민음사. p. 45(1984).
- Herrmann, K. : Flavonols and flavanes in food plants: A review, *J. Food Technol.*, **11**, 433(1976).
- Gissman, J. A. : "Modern Methods of Plant Analysis", Vol. 3. Peach, K. and Tracey, V., Eds., Springer-Verlag, Berlin(1955).
- Pratt, D. E. : Role of flavones, and related compounds in retarding lipid oxidative flavor changes in foods. "In Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compound in Food Flavors", Charalambous, G. and Kats, I., Eds., American Chemical Society; Washington D. C. P. 1(1976).

(1994년 11월 24일 수리)