

항산화 활성 검정법

이준설*[†] · 박양균**

*작물과학원, **목포대학교

I. 서 언

유지식품이나 식품 가공 산업에서 산화는 화학적 품질변화의 주요 원인 중 하나이다 (Lolinger, 1991).

산화적 변화는 효소촉매반응이나 광(光)등에 의하여 형성된 라디칼(radical)로부터 시작되는데, 이들은 먼저 지질을 산화시키고, hydroperoxides 같은 지질산화산물은 다시 단백질을 산화시켜 중국에는 향이나 맛 등에 영향을 줌으로써 품질을 저하시킨다. 따라서 각종 유지식품 가공에서는 합성항산화제인 BHT, BHA 등을 첨가하여 산패를 방지하고 있다.

항산화에서 다른 하나의 주요 관점은 노화억제 효과와 관련한 기능성 식품에 대한 현대인들의 요구 증가이다. 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등 각종 요인에 의하여 형성된 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, O_2^{\bullet}) 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, HO^{\bullet}), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen, 1O_2)와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소(Reactive oxygen species, Ros)종을 효과적으로 소거함으로써 인체면역 및 생리활성에 도움을 주는 항산화 고함유 식품을 선호하고 있기 때문이다.

식물이나 식품에는 페놀성 화합물, 비타민 등 항산화 활성을 가지는 각종 phytochemical이 다양하게 함유되어 있다. 식물체에 널리 분포되고 있는 페놀화합물은 phenolic hydroxyl 그룹을 가지고 있어 단백질 또는 효소단백질, 기타 2가 금속이온 및 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 및 항미생물 효과를 나타낸다(kumar 등, 1984; Salunkhe, 1990). 또한 페놀화합물이 함유된 과일이나 채소를 많이 섭취할 경우 심장관련 질병, 뇌혈관질환, 악성 암을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Hertog et al., 1997).

항산화반응은 문헌에 따라 'antioxidants power' 'antioxidants effectiveness' 'antioxidants ability' 'antioxidants activity' 'antioxidants capacity' 등으로 표현되는데, 이중 항산화 활성(antioxidants activity)은 항산화 작용(antioxidants action)의 정도를 측정한다는 의미로써 산화과정에서 생성성된 기(基, radical) 혹은 중간생성물의 총량이 항산화제에 의하여 소멸되는 정도를 의미 한다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0143 (E-mail) jsl@rda.go.kr

II. 분석방법

1. 유지 산패를 이용한 항산화력 측정

식용 유지 또는 지질을 함유하고 있는 식품은 저장이나 유통과정에서 온도, 산소, 광선, 금속, 효소 등의 작용으로 유리라디칼이 형성되고, 이들의 계속적인 반응 결과 hydroperoxide이나 기타 과산화물이 생성되면서 이취가 발생하고 색깔, 맛 등의 품질이 저하되는 산패(rancidity) 현상이 일어나게 된다.

일반적으로 유지가 산소를 흡수하는 속도는 처음 어느 일정한 기간은 거의 일정하고 산소 흡수량도 적지만 어느 기간을 지난 후에는 유지의 산소 흡수 속도가 급격하게 증가하고 산화생성물의 양도 급증하여 유지의 여러 가지 화학적, 물리적 성질의 급격한 변화를 가져와 산패가 일어나게 된다. 이와 같이 유지의 산소 흡수 속도가 매우 느린 어느 일정 기간 즉, 유지를 저장하여 산패가 발생하기 직전까지의 기간을 그 유지의 유도기간(Induction period)이라고 한다(채 et al., 2000).

Rancimat는 유지(oil)를 일정한 온도로 가열하면서 공기를 주입하면 유지가 산화되기 시작하면서 휘발성 carboxylic acid가 생성되고, 증류수의 전기전도도를 증가시켜 검출기에서 유도기간을 산정함으로써 산화안정성을 평가할 수 있는데, 이러한 방법을 이용하여 일정조건에서 유지 산패의 정도를 측정하거나 항산화제의 효율을 분석할 수 있다(M.M. Esquivel et al., 1999).

1) 장치 및 기구

- (1) Rancimat
- (2) Ultrasonicater

2) 시약

- (1) 항산화제가 첨가되지 않은 천연 유지(대두유, 옥수수유 등)
- (2) 항산화제 : 시료추출물, BHA, BHT, Tocopherol 등

3) 조작

- (1) 시료추출물에 포함된 용매를 완전히 제거한다.
- (2) 반응관에 각 시료추출물 0.020 g을 넣은 후 선정된 유지(Soybean Oil) 2.980 g을 넣어 3.00 g으로 맞춘다.
- (3) 초음파세척기를 이용하여 시료추출물과 유지가 잘 섞이도록 한다.
- (4) 공기 인입관 끝이 유지에 잠기도록 한다. (공기 인입관의 위치에 따라 유지량을 조절함)
- (5) 가열부의 가열 스위치를 보통 110°C로 조절한다. 지정된 온도에 도달하면 반응관을 가열부에 설치하여 10분 동안 정치한 후 공기 공급관과 전기전도도를 측정관에 연결한다.
- (6) 전도도를 측정하는 전극이 항상 물에 잠겨있도록 한다.
- (7) 공기 공급량은 20 l/h 수준이 적당하다.

4) 계산

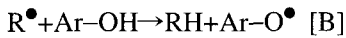
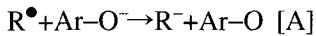
Antioxidant index(AI)는 각 분획별 추출물을 첨가한 실험구의 유도기간을 대조구의 유도기간으로 나눈 값으로 구한다.

Antioxidant (AI)=처리구의 유도기간(IP) /표준구의 유도기간(IP)

※ Induction period (IP.hr.min)

2. 전자화학(Electrochemical)반응을 이용한 항산화 측정

항산화 작용을 양적으로 측정 할 경우 일반적으로 전자화학반응(Electrochemical)에 기초한다. 즉 전자전이 (A) 혹은 수소원자전이 반응(B)을 측정하므로써 항산화능력이라 할 수 있는 전자 공여능을 알 수 있다.(Buettner, 1993; Hagerman et al., 1998; JORGENSEN& SKIBSTED 1998)



전자전이의 원리를 이용한 항산화력은 TEAC법, DPPH법, DMPD법, ORAC법 등이 있다.

2.1. TEAC법

TEAC(trolox equivalent antioxidants capacity) 분석법은 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)(ABTS+)의 색을 띠는 양이온 라디칼의 감소에 근거하며, 항산화력을 검사하고자 하는 시료와 똑같은 효과를 내는 수용성 비타민E의 유사물인 trolox의 총량(mM)으로 측정된다(Re et al., 1999; Frankel & MEYER 2000).

1) 장치 및 기구

- (1) 항온수조가 부착된 UV-VIS Spectrophotometer
- (2) 교반기
- (3) pH 메타기

2) 시약

- (1) ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt
- (2) PBS(phosphate buffered saline)

3) 조작

- (1) 5mM BPS 용액 : 증류수 적당량을 메스실린더에 넣고 NaCl 200 mg, KH₂PO₄ 5 mg, NA₂HPO₄.12H₂O 72.5 mg, KCl 5mg, NaN₃ 5 mg를 녹인 다음 최종 1 L로 정용하고, pH를 7.4로 맞춘다.

- (2) ABTS 0.0137 g을 5 mM PBS(phosphate- buffered saline)용액에 흡광도가 0.8이 되도록 희석한다.
- (3) (2)번 용액을 시험관에 넣고, 50 μ L의 시료액(항산화용액)을 첨가한다.
- (4) 1분뒤에 734 nm에서 흡광도를 읽는다.

4) 계산

$$\text{Inhibition } A_{734}(\%) = (1 - A_f/A_0) \times 100$$

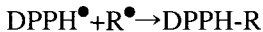
A_f =항산화제를 첨가하지 않은 용액의 흡광도(blank)

A_0 =항산화제를 첨가한 후 1분이 지난 용액의 흡광도

2.2. DPPH법

라디칼 양이온의 색깔반응을 이용한 접근은 Blois(1958)에 의하여 처음 연구되기 시작하여 몇몇 천연물의 항산화 활성을 측정하는 데 DPPH를 사용하였다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 화학적으로 안정화된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515~520 nm 부근에서 최대흡광도를 가지며 항산화성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼(DPPH)이 소거되고 색깔이 변한다(Brand-Williams et al., 1995; Bondet et al., 1997; Espin et al., 2000; Yordanov & CHRLSTOVA 1997). 화학적으로 안정성있는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH \bullet)은 반응 [C]의 원리를 이용하여 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물, 음료와 오일, 순수 페놀화합물 등의 항산화 효과를 분석할 수 있다(Larraurri et al., 1999; Porto, 2000; Espin et al., 2000).



1) 장치 및 기구

- (1) Spectrophotometer
- (2) 교반기

2) 시약

- (1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 혹은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

3) 조작

- (1) 4×10^{-4} M DPPH용액 100 ml 조제 : 0.0018 g의 DPPH(Sigma. Germany)을 ethanol 100 ml에 녹여 삼각 플라스크에 저장(시료를 Methanol로 추출한 경우 Methanol에 녹일 것)한다.
- (2) Ethanol 조추출물 0.2 ml에 4×10^{-4} M DPPH용액 2.8 ml를 가한 후 vortex mixer로 10 초간 혼합하여 10분간 방치한다.
- (3) 분광광도계를 사용하여 520(517)nm에서 흡광도 변화를 측정한다.

4) 계산

전자공여능(EDA; Electron donating ability)은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타낸다.

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

A : 시료첨가구의 absorbance

B : 무첨가구의 absorbance

2.3. DMPD 분석법

이 방법은 TEAC나 DPPH법과 같이 반응 결과 색을 띠는 라디칼의 소거 원리를 이용한 것이다(Vincenzo et al., 1995).

1) 장치 및 기구

- (1) Spectrophotometer(온도조절장치 및 교반기능이 있는 것)
- (2) 교반기
- (3) pH측정기

2) 시약

- (1) DMPD(N, N-dimethyl-p-phenylenediamine)
- (2) Acetate buffer, ferric chloride

3) 조작

- (1) 100 mM DMPD용액 : 증류수 10 mL에 DMPD 209 mg을 녹인다.
 - (2) 1번 용액 1 mL를 0.1M acetate buffer 100 mL에 첨가하여 pH를 5.25로 맞춘다.
 - (3) 2번 용액에 0.05M ferric chloride 용액 0.2 mL를 첨가하여 활성화되어 색을 띠는 라디칼 양이온(DMPD⁺)을 얻는다.
 - (4) 3번 용액 5 mL에 시료추출물(또는 표준 항산화물) 0.5 mL을 첨가하여 계속 교반 시키면서 25°C에서 10분간 반응 후 505 nm에서 흡광도를 읽는다.
- ※ 1~3번 과정은 O.D(optical density) 0.9±0.1의 흡광도의 단위를 얻기 위하여 매번 측정 때마다 새로 만들어서 사용한다. 한번 만들면 상온에서 12시간정도 유지하는 가능하다.

(5) 계산

$$\text{Inhibition } A_{505}(\%)=(1-A_f/A_o)\times 100$$

A_f : 시료의 흡광도

A_o : blank의 흡광도

2.4. ORAC 분석법

Cao 등(1993) 등은 다양한 생체 및 천연물 시료의 항산화력을 측정하는데 ORAC(oxygen radical absorbing capacity)분석법을 이용하였다. 이 분석법은 hydroxyl이나 peroxy와 같이 짧

은 시간 존재하는 라디칼에 대한 항산화반응을 측정 할 수 있으며, 유리기(라디칼)가 존재하는 상황에서 단백질인 β -phycoerythrin으로부터 형광성분을 제거하는 데에 기초하고 있다 (Johnson & Williamson 2003).

분석과정에서 사용되는 β -phycoerythrin(β -PE) or R-PE는 지시단백질로서, 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 peroxy radical 생성자로서, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(Trolox, 수용성비타민 E 유사물질)은 표준물질로 사용된다. 항산화력의 1 unit는 1 μ M Trolox와 동등한 항산화력, 즉 Trolox Equivalents(TE, 1 μ M TE/g)으로 나타낸다(Cao et al., 1997).

1) 장치 및 기구

- (1) ORAC자동분석기 : COBAS FARA II centrifugal analyzer(Roche Diagnostic System Inc., Branchburg, NJ, USA)

2) 시약

- (1) β -phycoerythrin(β -PE), R-phycoerythrin(R-PE)
- (2) 2', 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)
- (3) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, 수용성 비타민 E 유사물질)
- (4) Acetone
- (5) phosphate buffer

3) 조작

(1) 시료추출

증류수 추출물을 4°C에서 34,000rpm으로 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 phosphate buffer로 적당히 희석하여 ORAC를 측정한다. 비수용성 과육부분은 시료 : 아세톤 (1 : 7 w/v)의 비율로 첨가하여 상온에서 30분간 교반하면서 추출한 다음 상층액을 취하고 phosphate buffer로 적당히 희석하여 ORAC를 측정한다. 각 시료의 최종 ORAC활성은 증류수 추출물과 아세톤 추출물의 ORAC를 더한 값으로 한다.

(2) 측정방법

- ① 측정하기 전 R-PE, phosphate buffer, 시료추출물은 37°C에서 15분간 예열처리를 한다.
- ② 최종 측정용 혼합물에는 75 mM의 phosphate buffer(pH 7.0) 1.7mL, R-PE 100 μ L(3.4 mg/L), 320 mM의 AAPH 100 μ L, 시료추출물 100 μ L가 포함되도록 한다.
- ③ 표준물질은 Trolox 1 μ M사용한다(매시료마다 사용).
- ④ Fluorescence 필터는 excitation wavelength는 540 nm, emission wavelength는 565 nm로 조절한다.
- ⑤ Fluorescence cuvette에 측정용 혼합물 2 mL를 넣어 측정한다.
- ⑥ Blank는 phosphate buffer를 사용한다

- ⑦ AAPH를 첨가한 후 매 5분마다(조정가능) β-PE의 fluorescence 값이 자동으로 기록 되도록 프로그램이 설정되어 있다.
- ⑧ 마지막 fluorescence 값이 처음 값의 5% 미만으로 감소될 때 까지(약 60분~70분간) 측정한다.
- ⑨ Fluorescence 값은 초기값에 비례하여 측정되며, 최종 결과는 blank와 시료에 함유된 β-PE의 쇠퇴곡선에 대한 면적 차이를 이용하여 계산되고 단위는 1 μM TE/g, F.W(생중)으로 표현한다.

4) 계산

$$\text{ORAC}(\mu\text{mol TE/g F.W}) = 20K(S_{\text{sample}} - S_{\text{Blank}}) / (S_{\text{Trolox}} - S_{\text{Blank}})$$

K : 회석배수, S : fluorescence 감소곡선의 면적 값

Blank : 20 μL phosphate

참고문헌

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181 : 1199-1744.
2. Bonde, T. V., W. Brand-Williams, and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensm Wiss Technol*, 30 : 609-615.
3. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technol*, 28 : 25-30.
4. Buettner, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, -tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biochys*, 300 : 535-543.
5. Cao, G., H. M. Alessio, and R. G. Cutler. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 14 : 303-311.
6. Cao, G., E. Sofic, and R. L. Prior. 1997. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med*. 22 : 749-760.
7. Espin, J. C., C. Soler-Rivas, and H. J. Wichers. 2000. Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J Agric Food Chem*, 48 : 648-656.
8. Frankel, E. N. and A. S. Meyer. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J Sci Food Agric*, 80 : 1925-1941.
9. Hagerman A E, Riedl K M, Jones G A, Sovik K N, Ritchard N T, Hartzfeld P W and Riechel T L. 1998. 'High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants,' *J Agric Food Chem*, 46 : 1887-1892.
10. Hertog, M. G. L., P. M., Sweetnam, A. M. Fehily, P. C. Elwood, and D. Kromhout. 1997. Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a Welsh population of men. The Caerphilly study. *Am. J. Clin Nutr.* , 65 : 1489-1494.
11. Johnson, I., and G. Williamson. 2003. *Phytochemical functional foods*, CRC Press, Inc., Boca Raton,

- New York Washington DC. 330-333.
12. Jorgensen, L. V. and L. H. Skibsted. 1998. Flavonoid deactivation of ferrylmyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltametry, *Free Rad Res*, 28 : 335-351.
 13. Kumar, R. and M. Singh. 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food chem.*, 32 : 447.
 14. Larrauri, J. A., C. Sanchez-Moreno, P. Ruperez, and F. Saura-Calxto. 1999. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines, *J Agric Food Chem*, 47 : 1603-1606.
 15. Lølinger, J. 1991. The use of antioxidants in foods, in Aruoma OI, Halliwell B: Free Radicals and Food Additives, Traylor Francis, London. 1603-1606.
 16. Esquivel, M. M., M. A. Ribeiro, and M. G. Bernardo-Gil. 1999. Supercritical extraction of savoryoil: study of antioxidant activity and extract characterization. *Journal of Supercritical Fluids* 14:129138.
 17. Porter, W. L. 1993. Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems,' in Williams GM:*Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects, Princeton Scientific*, Princeton, N. J. 93-122.
 18. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Rad Biol Med*, 26 : 1231-1237.
 19. Salunkhe, D. K., J. K. Chavan, and Remedies. 1990. CRC Press, Inc., Borca Raton.
 20. Vincenzo Fogliano, Veronica Verde, Giacomino Randazzo, and Alberto Ritieni. 1999. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 1035-1040.
 21. Yordanov, N. D. and A. G. Christova. 1997. Ouantitative spectrometric and EPR-determination of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), *fres J Anal Chem*, 358 : 610-613.

Methods of Antioxidant Assays in Foods

Joon-Seol Lee*[†] and Yang-Kyun Park**

**Mokpo Experiment Station National Institute of Crop Science, R.D.A., Muan, 534-840, Korea*

***Food Science and Biotechnology Dept., Mokpo National University Muan, 534-729, Korea*

+82-61-450-0143, jsl@rda.go.kr