추출 용매에 따른 흑미에 함유된 Tocotrienol의 함량 조사 및 항산화 효능에 관한 연구

이율하, 김효영, 송유진, 노현정, 이우일
건양대학교 의료신소재학과
e-mail: lee0519@konyang.ac.kr

A study on the Investigation of Tocotrienol content and Antioxidant Efficacy in Black Rice by Solvent Extraction.

Yul-Ha Lee, Hyo-Yong Kim, Yu-Jin Song, Hyeon-Jeong Noh, Woo-Yeil Lee
Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

요 약

토코트리에놀은 토코페롤보다 효과가 높지만 추출하는 데 많은 기술과 비용이 든다는 한계가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 저렴하고 쉽게 구할 수 있는 흑미에서 다양한 용매를 이용한 추출을 통해 높은 함량의 토코트리에놀을 추출하고자하였다. 에탄올, 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트 등의 유기용매를 사용하여 추출에 가장 적합한 용매를 결정하기 위해 각 용매에 대해 총 폴리페놀 함량 측정, DPPH 분석 및 MTT 분석 실험을 수행하였다. 총 폴리페놀 함량은 헥산에서 가장 높았으며, DPPH assay 결과 또한 hexane에서의 항산화 활성이 가장 높았다. MTT assay 결과, 모든 용매추출시료에서 80% 이상의 결과를 나타내었으며, 이를 통해 hexane을 이용한 추출법은 향후 토코트리에놀의 건강기능 식품 개발에 활용될 것을 기대할 수 있다.

1. 서론

현대인의 건강과 관련된 관심이 높아지는 추세에 따라 질병에 대한 예방 효과가 있는 영양소와 기능성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 일상적으로 섭취하는 식품에 함유되어 있는 다양한 영양소 중 지용성 비타민의 한 종류인 비타민 E는 특히나 노화와 관련하여 노인성 질환의 예방을 위한 영양소로 이미 입증된 사실이 있다 [1]. 비타민 E는 side chain에 이중 결합의 존재 유무에 따라 각각 α, β, γ, δ의 네 종류의 토코페롤과 네 종류의 토코트리에놀의 형태가 있다.

토코트리에놀은 산화로 발생하는 자유라디칼과 과산화 지방질의 생성으로 인해 세포막과 생체막의 약화 및 괴사 등을 억제하여 노화를 저지하며, 암세포의 학산을 방지하거나 사멸을 유도하는 역할을 한다. 최근 토코트리에놀은 생체 내에서 활성산소를 소거시켜 과산화 지질의 생성을 억제하는 항산화 작용과 더불어 하루 1,600 mg의 양을 투여하여도 부작용이 발생하지 않는다는 장점으로 인해 새로운 건강 기능 성분으로 주목받고 있다 [2].

초기 연구에는 비타민 E 중 α-토코페롤이 가장 생리활성이 강한 것으로 알려졌으나, 최근 연구에 의하면 토코트리에놀이 토코페롤의 항산화 작용의 40-60배 강력한 것이 밝혀졌다 [3]. 이는 분자 크기가 더 짧은 토코트리에놀의 구조적 차이로 인해 세포막 사이를 토코페롤에 비하여 50배 빠르게 움질일 수 있어 활성산소의 효율적인 제거에 기인한 결과로 보이며, 이에 따라 토코트리에놀에 관한 관심과 연구가 최근 고조되기 시작하였다.

토코트리에놀은 식물성 기름과 과일, 화곡류 등 다양한 천연물에 함유되어 있으며, γ-, δ- 토코트리에놀의 효과가 가장 강력한데, 화곡류인 벼 품종별 비타민 E 함량 결과에 따르면 유색미 품종인 조생흑찰, 조은 흑미, 흑진주 중에서도 흑진주의 γ-, δ- 토코트리에놀 함량이 가장 높다는 연구가 조사된 바가 있다. 흑진주는 벼 품종의 다양화로 쌀의 이용도를 높이기 위해 중국에서 도입한 용금 1호를 배배양하여 육성한 것으로 γ-오리자놀, 안토시아닌 등 생리 활성 물질의 함량을 높인 개량종이다.

본 연구에서는 천연추출물 중 토코트리에놀 함량이 많은 화곡류인 흑미를 추출 소재로 하여 용매에 따른 토코트리에

놀의 함량을 조사하였으며, 추출 용매에 따른 흑미의 총 폴리페놀의 함량과 항산화능, 세포독성을 비교 분석하였다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 재료

본 연구에서 사용된 흑미는 ㈜농업회사법인 힘찬농부에서 구입한 진흑미를 사용하였다. 추출 용매로는 methanol (DAEJUNG, > 99.6 %, Republic of Korea) ethanol (DAEJUNG, > 99.0 %, Republic of Korea), hexane (Sigma, anhydrous, > 95 %, USA), ethyl acetate (TCI, anhydrous, > 99.8 %, JAPAN), water을 사용하였고, 항산화능 측정을 위한 2.2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)와 세포독성을 확인을 위한 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Abcam, UK)를 사용하여 분석을 진행하였다. 그 밖에 사용된 시약들은 모두 일급내지 이에 준하는 등급들로 구매하여 사용하였다.

2.2 진흑미 추출물의 제조

용매 추출법을 이용하여 진흑미의 추출을 진행하였으며, 사용된 용매인 methanol과 ethanol, hexane, athyl acetate는 모두 70 % (v/v)로 제조하여 24시간동안 냉장 보관 하였다. 추출물은 rotaty evaporator(N-1110, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 추출 온도는 용매의 끓는점을 고려하여 60 ℃로 설정하였으며, 농축된 용액은 감압 여과 장치를 사용하여 여과하였다.

2.3 폴리페놀 함량 측정 및 DPPH radical scavenging 활성 평가

진흑미 추출물이 함유한 폴리페놀의 함량 측정을 위해 증류수를 용매로 tannic acid의 비율을 각각 0, 6.25, 12.5, 25, 50 %로 표준품을 제조하여 Na_2CO_3 용액 1 mL를 가한 후 3분간 방치하였다. 이후 제조된 표준품과 추출물에 각각 50 % Folin-Ciocalteu reagent 50 μL를 첨가한 후 30분간 반응시킨 뒤 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

진흑미 추출물의 DPPH radical scavenging 활성 평가는 Blois(1958)의 방법을 응용하여 측정하였다. 0.2 mM DPPH 용액 0.8 mL에 시료 0.2 mL를 첨가한 후 실온의 암실에서 30분간 반응시켰다, 이 반응액을 분광광도계(UV-1700, shimadzu, Japan)을 이용하여 520 nm에서 흡광도 감소치를 측정하였다. DPPH radical scavenger activity는 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율 (%)로 나타냈다.

2.4 MTT assay

실험에 사용되는 살아있는 세포를 96 well plate에 사용하여 배양하였다. MTT 용액을 제조하기 위해 각 well 당 5 mg/mL의 PBS buffer를 첨가하고 여과 후 냉장 보관하였다. 제조된 MTT 용액 20 $\mu\ell$을 각 well에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하였으며 이후 media가 제거된 well에 DMSO 용액 200 $\mu\ell$를 첨가하였다. Cell viability는 550 ~ 595 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식과 같이 계산되었다.

$$Cell\ viability\,(\%) = \frac{O.D_{550-595}\ treatment}{O.D_{550-595}\ control} \times 100$$

2.5 HPLC 분석

추출 용매에 따른 흑진주의 토코트리에놀의 함량을 측정하기위해 HPLC (G4288C, Agilent Technology)를 사용하였으며 분석 조건은 [표 1]과 같다.

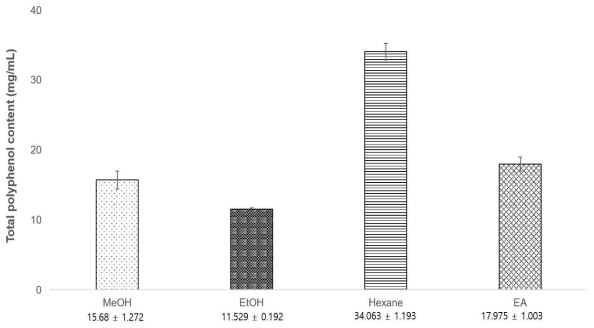
[표 1] Reverse phase HPLC conditions

Column	Reverse phase C18 silica
Pump	Binary
Column oven	40 ℃
Mobile phase	MeOH : 96 ~ 99 % Water : 4 ~ 1 %
Wavelength	290 nm
Flow rate	1.0 ㎖/min

3. 결과 및 고찰

3.1 총 폴리페놀 함량

흑진주 추출물의 tannic acid equivalent로 환산한 총 폴리페놀 함량은 [그림 1]와 같다. 실험결과 hexane이 34.063 ± 1.193 mg/mL로 가장 높았고 그 다음은 EA 17.975 ± 1.003 mg/mL, MeOH 15.68 ± 1.272 mg/mL, EtOH 11.529 ± 0.192 mg/mL 순으로 높은 값을 나타냈다. 이런 결과는 비타민 E가 지용성 비타민이기 때문에 무극성인 Hexane에서 가장 많이 추출되었고, 이에 반해 극성인 EtOH, MeOH에서 적게 추출된 것으로 여겨진다.

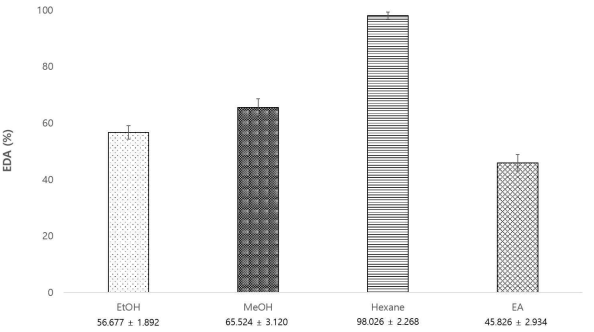


[그림 1] Total polyphenol content of *Oryza sativa* L..by solvent extraction.

3.2 항산화 활성

각 추출액에 대한 항산화 활성은 DPPH radica l 소거 활성을 측정하여 확인하였다. DPPH에 의한 전자 공여능(electron donating ability, EDA)을 측정한 결과는 [그림 2]와 같다. 흑진주 추출물의 EDA값은 hexane 98.026 ± 2.268 %, MeOH 65.524 ± 3.120 %, EtOH 56.677 ± 1.892 %, EA 45.826 ± 2.934 %로 hexane 추출물의 항산화 활성이 가장 높았으며, 이는 가장 낮은 항산화능을 보인 EA에 비해 약 2배 정도 높은 값을 나타냈다.

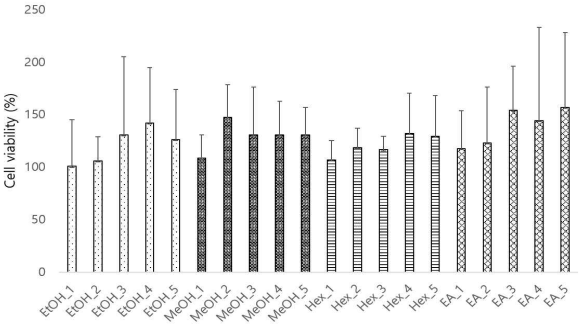
항산화 활성 측정 결과와 폴리페놀 함량 측정 결과를 비교해본 결과 유사한 경향성을 보였다. 즉, 총 폴리페놀 함량이 증가할수록 항산화 활성도 높아지는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 폴리페놀 화합물이 free radical을 안정한 형태로 변환하여 항산화 활성을 나타내기 때문이라고 여겨진다.



[그림 2] Total EDA content by extraction of Oryza sativa L. by solvent extraction.

3.3 세포독성시험

각 추출물에 대한 세포독성을 MTT assay 방법에 의해 측정한 결과는 [그림 3]와 같다. 각각 추출물의 cell viability는 EtOH 100.69~126.34 %, MeOH 108.37~130.84 %, hexane 106.82~129.20, EA 117.59~156.96 %로 나타났다. 따라서 모든 sample에 대해 80 %가 넘는 세포 생존율을 보여 유의한 세포 독성은 없는 것으로 판단된다.



[그림 3] Cytotoxicity by extraction of Oryza sativa L by solvent extraction (solvent_1 : 103xDilution,solvent_2:104xDilution,solvent_3:105xDilution,solvent_4:106xDilution,solvent_5:107xDilution).

4. 결 론

본 연구는 추출 용매에 변수를 두어 흑진주로부터 추출한 토코트리에놀을 이용하여 항산화, 항암 효과를 갖는 건강기능식품 개발을 목적에 두었다. 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 Hexane이 34.063 ± 1.193 mg/mL로 가장 높았으며 EA, MeOH, EtOH 순으로 높은 값을 나타냈다. DPPH assay 결과 hexane이 98.026 ± 2.268 %로 가장 높았으며 MeOH, EtOH, EA 순으로 높은 값을 나타내었다. 이는 총 폴리페놀 함량 측정 결과와 유사한 경향성을 보여준다. MTT assay 결과 모든 희석배수에서 cell viability가 80 % 이상의 값을 나타내어 용매 변수에 상관없이 세포독성이 없음을 확인하였다. 본 연구를 통해 Hexane을 이용한 추출법은 향후 토코트리에놀 건강기능 식품 개발에 활용될 것을 기대할 수 있다.

참고문헌

[1] 황계자. “노인과 비타민”, 병원약사회지, 제 19권 2호, pp. 147-152. 2002년

[2] 이동진. “바곡류 호 실의 토코페롤과 토코트리에놀 연구 현황과 전망”

[3] 이형옥. “토코페롤류의 항산화작용과 Linoleic Acid Methylester에서 생성된 cis/trans-, trans/trans-Hydroperoxide Isomer”한국식품과학회지, 제 25권 4호, pp. 307-312. 1993년