

추출 방법에 따른 아스파라거스 빈 추출물의 항산화 활성

장은서, 홍지혜, 김효빈, 연수빈, 유채람, 조영호†
건양대학교 제약생명공학과
e-mail:micael@konyang.ac.kr

Antioxidant Activity of *Vigna unguiculata* Extracts by Extraction Methods

Eun-Seo Jang, Hye-Ji Hong, Hyo-Bin Kim, Su-Bin Yeon, Chae-Ram Yoo, Young-Ho Cho†
Dept. of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University

요약

본 연구에서는 추출 용매로 70% 에탄올을 사용하여 아스파라거스 빈의 초음파 및 환류 추출물을 각각 제조하여 항산화 활성을 비교하였다. 아스파라거스 빈을 70% 에탄올로 추출하였을 때, 환류 추출 대비 초음파 추출을 하였을 때 추출 수율이 약 2배가량 증가하였다. 폴리페놀과 플라보노이드 함량, ABTS 라디칼 소거능 측정, 환원력 측정 시험은 추출법에 따른 차이가 경미하게 나타났으나, DPPH radical, 초과산화 음이온 라디칼, NO radical 소거능 시험에서는 환류 추출물 대비 초음파 추출물에서 소거능이 각각 1.16%, 1.32%, 1.20% 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 초음파 추출법이 항산화 활성을 높일 수 있는 방법이었으며, 아스파라거스 빈 추출물은 기능성 화장품 및 식품 개발을 위한 천연 항산화 물질로 사용가능할 것으로 사료된다.

1. 서론

아스파라거스 빈(*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*)은 쌍떡잎식물 장미목 콩과의 한해살이풀로 신장을 보호하고 위장을 튼튼히 하고, 혈액순환을 촉진시켜 당뇨, 설사, 요실금에 도움을 준다. 또한, 비타민 C가 풍부하여 피부 미용, 면역력 강화, 피로 해소 등에 좋으며 엽산, 마그네슘이 함유되어있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

초음파는 20,000Hz 이상의 높은 주파수의 음파로서, 진동에 의한 공동현상으로 매우 큰 에너지가 발생하고 이때의 에너지 충격으로 인해 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 확산이 용이해지기 때문에 유효성분의 추출 효율이 높아진다. 따라서 초음파 추출기술은 고효율, 고품질, 친환경 추출물을 얻을 수 있는 추출법이다.

본 연구에서는 70% 에탄올을 용매로 하여 추출 방법에 따른 아스파라거스 빈의 항산화 활성을 비교하여 최적의 추출 방법을 확인하고자 하였다.

2. 기기 및 시약

2.1 기기

ELISA-Reader(TECAN, AUSTRIA)를 사용하였다.

2.2 시약

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), Nitrotetrazolium Blue Chloride, Sulfanilic acid, 1-Naphthylamine, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Potassium ferricyanide(III), Folin-Ciocalteu's reagent, quercetin, tannic acid 를 Sigma사(USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 모든 시약들은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

3. 실험방법

3.1 아스파라거스빈 추출물 제조

본 실험에서 사용한 아스파라거스 빈은 경상남도에서 재배된 것을 구매하여 사용하였다.

3.1.1 아스파라거스빈 환류추출물 제조

분쇄기로 분쇄한 아스파라거스 빈 분말 30 g에 70%(v/v) 에탄올 300 ml를 가해 환류 추출(3 cycle, 3 times)을 진행하

였다. 추출액은 감압여과 후 감압농축 및 동결건조하여 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

3.1.2 아스파라거스 빈 초음파추출물 제조

분쇄기로 분쇄한 아스파라거스 빈 분말 30 g에 70%(v/v) 에탄올 300 ml를 가해 60분간 침지 후 30분간 3회 반복하여 초음파 추출한 뒤 원심분리(5,000rpm, 30min, 4°C)하였다. 상등액은 감압여과 후 감압농축 및 동결건조하여 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

3.2 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Dennis²⁾의 방법으로 측정하였으며, Folin-Ciocalteu's reagent가 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하였다. 희석한 아스파라거스 빈 추출물에 증류수를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 넣어 8분간 방치한 다음, 10% sodium carbonate를 가하여 40분간 반응시킨 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 폴리페놀 함량은 tannic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

3.3 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량의 측정은 건강기능식품공전에 명시된 방법³⁾을 이용하여 측정하였다. 1.5 ml tube에 각 농도 별 시료를 가한 후 99.5% ethyl alcohol 300 μ l와 10% aluminum nitrate 20 μ l, 1M potassium acetate 20 μ l, 증류수 560 μ l를 차례대로 가하고, 충분히 교반시킨 뒤 40분간 정치시킨다. 이때 표준물질 및 시료의 공시험은 10% aluminum nitrate 대신 증류수 20 μ l를 가한다. 40분간 정치시킨 시험액을 96 well plate에 200 μ l 씩 가한 후 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

3.4 항산화 활성

3.4.1 DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능의 측정은 Blois법⁴⁾에 따라 실시하였다. 96 well plate에 추출물을 농도별 20 μ l 씩 각각 취한 다음 실험군에는 0.1 mM DPPH 180 μ l, 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간 혼합한 후 560nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거능을 구하였다.

3.4.2 ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능의 측정은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 nM potassium persulfate를

암소에서 24시간 동안 반응시켜 ABTS 라디칼이 형성된 ABTS stock solution을 제조한 후, 증류수를 이용하여 흡광도가 0.70±0.02 범위에 들도록 희석시켜 ABTS working solution을 제조하였다. ABTS working solution 270 μ l와 시료 30 μ l를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS radical 소거능을 구하였다.⁵⁾

3.4.3 환원력 활성

환원력(reducing power) 활성은 ferric ferricyanide(Fe^{3+})가 ferrous(Fe^{2+}) 형태로 환원될 때 푸른색을 띠는 원리를 이용하는 Oyaizu 방법에 따라 측정하였다⁶⁾. 농도별로 희석한 아스파라거스 빈 추출물에 200mM sodium phosphate buffer (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide를 차례로 가하여 50°C에서 20분간 반응하였다. 반응액에 10% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 멈춘 후, 2,000rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 96 well plate에 넣고 실험군에는 iron(II) chloride를, 대조군에는 시료를 녹인 용매인 DMSO를 가하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.4.4 Superoxide anion radical 소거 활성 측정

Superoxide anion radical 소거 활성은 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법(Gutteridge 방법⁷⁾)으로 측정하였다. 3 mM xanthine sodium salt와 0.6 mM NBT 용액, 15mM Na₂-EDTA 용액, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 각각 혼합하고, 농도별로 희석한 아스파라거스 빈 추출물과 50 mM xanthine oxidase(0.1 units/mL)를 첨가하였다. 5분간 차광 및 37°C에서 15분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.4.5 Nitric oxide (NO) 소거능 측정

Nitric oxide 소거능은 Kim 등의 방법⁸⁾에 따라 실시하였다. 2nM NaNO₂ 용액 100 μ l에 시료액 200 μ l를 가하고 0.2N HCl 700 μ l를 혼합한 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 96 well plate에 반응액 40 μ l를 취하여, 2% 초산 용액 200 μ l와 Griess reagent (30% 초산으로 용해한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용 직전에 조제) 16 μ l를 가한 후 암실에서 15분간 반응하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 소거율을 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4.1 아스파라거스 빈 추출수율

아스파라거스 빈 초음파 추출물과 환류 추출물의 수율은 각각 21.43%, 10.2%로 초음파 추출을 했을 때의 수율이 약 2

배 가량 더 높은 것으로 나타났다.

[표 1] Extraction yield of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis* by extraction method

Extraction method	Extraction yield(%)
Ultrasonic extract	21.43
Reflux extraction	10.2

4.2 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

페놀 화합물은 항산화 작용과 관련하여 생체 내에서 다양한 질환의 근원인 활성산소를 소거하는 능력이 우수한 것으로 연구되어 페놀 함량과 항산화 활성이 상관관계가 있다고 알려져 있다. 아스파라거스빈 환류 추출물과 초음파 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과를 표 2에 나타내었다. 실험 결과 아스파라거스빈 초음파 추출물과 환류 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 63.28 mg/g, 73.97 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 각각 11.68 mg/g, 16.06 mg/g을 가졌으며, 두 추출물 간 유의미한 차이는 보이지 않았다.

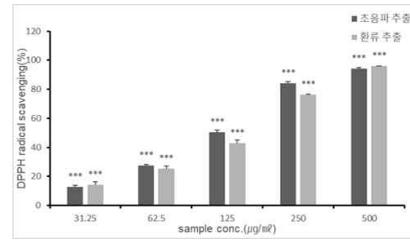
[표 2] Total polyphenol and flavonoid contents of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

	아스파라거스 빈 초음파 추출물	아스파라거스 빈 환류 추출물
Total polyphenol (tannic acid, mg/g)	63.28±2.69	73.97±3.51
Total flavonoid (quercetin, mg/g)	11.68±0.14	16.06±0.45

4.3 항산화 활성

4.3.1 DPPH radical 소거능 측정

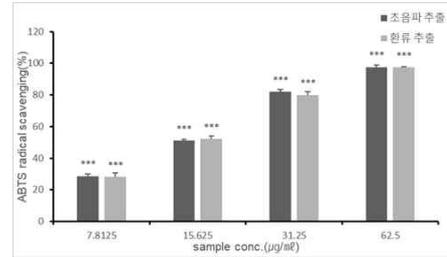
농도별로 측정된 아스파라거스 빈 추출물의 DPPH radical 소거능 결과를 그림 1에 나타내었다. DPPH는 다양한 천연소재의 항산화 효능을 알아보기 위해 많이 이용되며, 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 물질로 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자주색으로 탈색된다. 아스파라거스 빈의 DPPH radical 소거능 측정 결과 시료의 농도가 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml 일 때, 초음파 추출물의 소거율은 12.67±1.18%, 27.47±0.83%, 50.55±1.26%, 84.18±1.24%, 94.29±0.74%로 나타났으며, 환류 추출물의 소거율은 14.08±2.33%, 25.21±2.02%, 42.93±2.03%, 76.13±0.61%, 95.86±0.09%로 두 추출물 모두 소거능이 시료의 농도에 의존적으로 증가함을 보였다. 아스파라거스 빈 초음파 추출물과 환류 추출물의 SC₅₀값은 각각 132.18 µg/ml, 152.77 µg/ml로 초음파 추출물이 더 우수한 소거능을 나타내는 것으로 확인되었다. 양성대조군인 L-ascorbic acid의 농도는 3.68 µg/ml였다.



[그림 1] DPPH radical scavenging activity of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

4.3.2 ABTS radical 소거능 측정

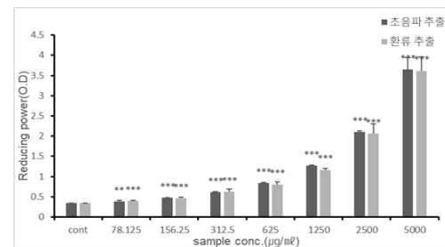
농도별로 측정된 아스파라거스 빈 추출물의 ABTS radical 소거능 결과를 그림 2에 나타내었다. 시료의 농도가 7.8125 µg/ml, 15.625 µg/ml, 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml 일 때, 초음파 추출물의 소거율은 28.75±1.09%, 51.01±1.46%, 82.02±3.07%, 97.59±0.22%로 나타났으며, 환류 추출의 소거율은 28.28±3.02%, 52.11±3.38%, 80.03±2.47%, 97.32±2.13%로 두 추출물 모두 소거 활성능이 시료의 농도에 의존적으로 증가함을 보였으나, 두 추출물 간 유의미한 차이는 없었다.



[그림 2] ABTS radical scavenging activity of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

4.3.3 환원력 측정

환원력은 활성산소 및 유리기에 전자를 공유하는 능력을 뜻하며 농도에 따른 환원력 측정 결과를 그림 3에 나타내었다. 농도 범위 78.125µg/ml~5000 µg/ml에서 아스파라거스 빈 초음파 추출물과 환류 추출물은 각각 0.37±0.04% ~ 3.64±0.31%, 0.40±0.01% ~ 3.61±0.34%의 환원력을 나타냈다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 환원력 활성이 증가하였으며, 두 추출물 간 유의미한 차이는 나타나지 않았다.

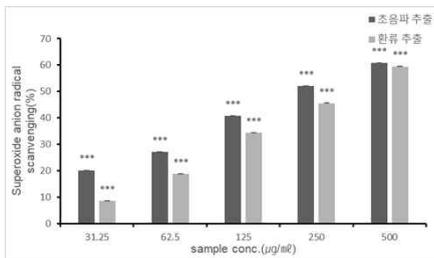


[그림 3] Reducing power of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

4.3.5 초과산화 음이온 라디칼 소거 활성 측정

ROS의 일종인 superoxide anion(O₂⁻)은 hydrogen

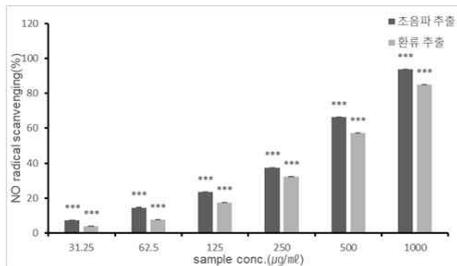
peroxide, hydroxyl radical을 유도하여 산화적 스트레스 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 초과산화 음이온 라디칼 소거 활성을 측정된 결과를 그림 4에 나타내었다. 시료의 농도가 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 초음파 추출물의 소거율은 20.22 \pm 3.62%, 27.14 \pm 5.62%, 40.80 \pm 1.41%, 52.00 \pm 4.72%, 60.77 \pm 31.20%, 환류 추출물의 소거율은 8.56 \pm 7.45%, 18.85 \pm 4.66%, 34.34 \pm 6.33%, 45.53 \pm 6.63%, 59.40 \pm 3.11%로 두 추출물 모두 소거 활성이 시료의 농도에 의존적으로 증가함을 보였다. 아스파라거스 빈 초음파 추출물과 환류 추출물의 SC_{50} 값은 각각 257.38 $\mu\text{g/ml}$, 338.64 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며 초음파 추출물이 1.32% 더 우수한 소거 활성을 가지는 것을 확인하였다. 이때 양성대조군인 L-ascorbic acid의 농도는 3.45 $\mu\text{g/ml}$ 였다.



[그림 4] Superoxide anion radical scavenging activity of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

4.3.6 Nitric oxide (NO) 소거능 측정

농도별로 측정된 아스파라거스 빈 추출물의 Nitric oxide 소거능 결과를 그림 5에 나타내었다. 실험에서, 시료의 농도를 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였을 때, 초음파 추출물의 소거율은 7.26 \pm 2.32%, 14.55 \pm 5.23%, 23.38 \pm 2.36%, 37.48 \pm 2.00%, 66.26 \pm 1.06%, 93.69 \pm 1.93%로 나타났으며, 환류 추출물의 소거율은 3.94 \pm 0.36%, 7.57 \pm 2.96%, 17.52 \pm 2.89%, 32.19 \pm 4.44%, 57.31 \pm 5.91%, 84.82 \pm 6.77%로 두 추출물 모두 소거 활성이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 아스파라거스 빈 초음파 추출물과 환류 추출물의 SC_{50} 값은 각각 358.11 $\mu\text{g/ml}$, 430.50 $\mu\text{g/ml}$ 로 초음파 추출물이 1.20% 더 우수한 소거능을 가짐을 알 수 있었다.



[그림 5] NO radical scavenging of extracts from *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis*

5. 결론

본 연구는 최적의 추출방법을 확인하고자 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 추출방법에 따른 아스파라거스 빈의 항산화 활성을 비교하였다. 아스파라거스 빈을 70% 에탄올을 용매로 하여 추출하였을 때, 환류 추출 대비 초음파 추출을 했을 때 추출 수율이 약 2배 가량 증가하는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정, ABTS radical 소거능 측정, 환원력 측정 결과 두 추출물 간의 유의미한 차이를 보이지 않았으나, DPPH radical, 초과산화 음이온 라디칼, NO radical 소거능 측정 결과 아스파라거스 빈 초음파 추출물이 환류 추출물 대비 각각 1.16%, 1.32%, 1.20% 증가하는 것으로 나타났다. 상기와 같은 결과를 종합하여 볼 때, 초음파 추출법이 항산화 활성을 높일 수 있는 방법이며, 아스파라거스 빈 초음파 추출물은 기능성 화장품 및 식품 개발을 위한 천연 항산화 물질로 사용가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] 본초강목(本草綱目)
- [2] A. D. Folin, W. Denis, "A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine", J. Biol. Chem., 22, p.305-308 (1915).
- [3] Korea Food and Drug Administration. Health Supplement Food Code. KFDA, Seoul, Korea (2004)
- [4] Blois M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 26, 1199-1203, (1958).
- [5] Y-J. Choi, Y-J. Oh, D-S. Jung, Radical Scavenging Activities of the Extracts from Punica granatum (Pomegranate) Peels, The Natural Science Institute Seoul Women's University, vol. 22 No.-, p.111-117 (2010).
- [6] J-S Yeo, S-S. Chun, J-H. Choi, Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Rosamultiflora, Journal of Life Science, 24, p.1217-1223 (2014).
- [7] M. Nishikimi, Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. Biochem Biophys Res Commun, 63, p.463-468 (1975).
- [8] S-J. Lee, N-J. Sung, H-G. Jeong, J-H. Shin, Y-C. Chung, J-K. Seo, Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Prunella vulgaris, J Korean Soc Food Sci Nutr, 37(12), p.1535-1574 (2008).