

보이차(Pu-erh tea)의 항산화 효과

소은미¹ · 정은주¹ · 신장철¹ · 김성현¹ · 백순옥² · 김영만³ · 김일광^{1*}

¹원광대학교 자연과학대학, 기초과학연구소, 생명나노화학부,

²KT & G 중앙연구소, ³한국과학기술연구원 특성분석센터

(2005. 11. 21. 접수, 2006. 1. 12. 승인)

Antioxidant activities of Pu-erh tea

Eun Mee So¹, Eun Joo Jung¹, Chang Chul Shin¹, Sung Hyun Kim¹,
Soon Ok Baek², Young Man Kim³, Il Kwang Kim^{1*}

¹Bio-nano Chemistry, College of Natural Science, Institute of Basic Natural Science,
Wonkwang University, Iksan city, 570-749, Korea

²KT & G Central Research Institute, Daejeon, 305-805, Korea

³Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 136-791, Korea

(Received November 21, 2005, Accepted January 12, 2006)

요약 : 보이차를 물로 추출하고, 항산화성 물질을 얻기위해 n-hexane, ethyl acetate(EA), butanol(BuOH)로 분획하였다. 분획은 자유라디칼 소거 활성과 환원력 측정의 두가지 방법으로 항산화활성 정도를 조사하였다. 이들 항산화활성을 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT) 그리고 α -tocopherol 같은 비교표준 항산화제와 비교하였다. 보이차의 EA분획은 BHA와 BHT 보다 더 높은 항산화활성을 보였다.

Abstract : Puh-erh tea was extracted with water and then fractionated sequentially with n-hexane, ethyl acetate, n-butanol to find antioxidative compounds. The fractions were examined on the antioxidant activity using two different methods, free radical scavenging activity measurement and reductive potential. Those antioxidant activities were compared to standard antioxidants such as butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and α -tocopherol. EA fraction of Pu-erh tea was showed excellent antioxidative activities over BHA and BHT.

Key words : Puh-erh tea, antioxidant, free radical scavenging activity, reducing power

1. 서 론

차는 세계적으로 소비되는 가장 일반적인 음료중의 하나이며, 기호식품으로서 그 가공법에 따라 녹차와

홍차, 우롱차, 보이차(Pu-erh tea)로 나누어진다. 차는 flavanol, flavanone, fravonoid, phenolic acid 등을 포함한 폴리페놀류를 포함하고 있어 강한 항산화력을 나타낸다.^{1,2} 폴리페놀 화합물인 catechin은 혈압저하 및

★ Corresponding author

Phone : +82+63-850-6227 Fax : +82+63-841-4893

E-mail: ilkim@wonkwang.ac.kr

혈중 콜레스테롤 저하, 금속류 제거작용, 항균, 충치억제, 항암, 항 돌연변이 및 항 알레르기 등의 약리작용이 있는 것으로 보고되어 있으며, 특히 항산화 활성 및 혈소판 응집의 억제 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{3,4}

천연물에서 항산화활성을 측정하는 방법으로, aldehyde의 산화억제효과,⁵ 지질과산화의 억제효과,⁶ DPPH 라디칼 소거활성과 산화전위,^{7,9} 환원력 측정,¹⁰ 총페놀의 양 측정¹¹ 등 여러 가지가 있으며 많이 보고되어 있다.

중국 명차의 하나인 보이차는 각종 차 중에서도 강한 풍미를 가지고 있는 차이다. 보이차의 경우 제조과정에서 오래 묵히면 묵힐수록 고가품의 차가 된다. 보이차의 제조방식은 독특한 맛을 내기 위해 특별한 공정과정을 거친다. 먼저 보이차에 사용되는 차잎은 운남대엽종(運南大葉種)이다. 원료 차잎을 녹차와 같이 가열 처리하고, 적당히 수분을 가하여 대나무 통이나 상자에 퇴적시켜 공기 중의 미생물에 의한 발효가 일어나도록 한 뒤 숙성시켜 만든다. 미생물에 의한 발효라는 독특한 제조과정과 그로 인한 향내 때문에 숙칭 '곰팡이차'라고도 불린다.¹²⁻¹⁵

본 연구에서는 항산화 효과가 기대되는 보이차 추출물을 칼럼상에서 분획으로 분리추출하였다. 각 분획의 자유라디칼 소거활성(free radical scavenging activity)과 환원력(reductive potential)을 측정하여 항산화 효과를 조사하고 상호관련성을 비교하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

2.1.1. 시약

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), tris(hydroxymethyl) aminomethane, hydrochloric acid, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, potassium ferricyanide, iron(III) chloride, linoleic acid, iron(II) chloride, ammonium thiocyanate, silica gel, α -tocopherol, butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisol(BHA) 등의 시약은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였다.

용매로 사용된 methanol(MeOH), ethanol(EtOH), chloroform, ethyl acetate(EA), butanol(BuOH), n-hexane, dimethyl sulfoxide(DMSO), ethyl ether(EE) 등은 Aldrich Co. 제품을 구입하여 정제과정 없이 사용하였다.

2.2.2. 기기

원심분리기(Hanil Industrial Company)와 UV-visible spectrophotometer (Molecular Devices Spectra Max 190)를 사용하였다.

2.2. 용매분획 및 활성검색

액상으로 되어있는 보이차(pu-erh tea) 1 Kg을 증류수 1 L에 완전히 녹인 후, n-hexane 1 L를 넣어 일정 시간 동안 흔들어서 분배한 다음 n-hexane 층만을 따로 모았으며, 위의 과정을 2회 반복하여 합친 것을 농축하였다. n-hexane을 추출하고 남아있는 물층에 위와 같은 방법으로 ethyl acetate, butanol로 각각 추출하여 모으고, 마지막으로 남아 있는 물층도 농축하여 보관하였다. n-hexane 층에는 추출된 성분이 매우 소량이어서 주로 ethyl acetate, n-butanol, water의 농축물로서 이후 실험을 진행하였다.

보이차를 추출한 3개 용매분획의 항산화 활성을 검색한 결과 EA 층(8.65 g)이 가장 효과가 큰 것으로 확인되었다. Silica gel (60Å)로 채워진 칼럼(직경 3 cm × 길이 30 cm) 상에서 EA : acetone 혼합물로 용리하면서 EA 층을 분리하였다. 각각 20개의 분획으로 분리되었는데 TLC로 확인하여 P-2-1, P-2-2, P-2-3, P-2-4의 4개 fraction으로 나누었다. P-2-1, P-2-2, P-2-3, P-2-4에 대하여 항산화 활성을 검색한 결과 P-2-3가 가장 높은 효과를 보였다. Silica gel (60Å)을 채운 칼럼에서 chloroform : acetonitrile 혼합물로 용리하면서 P-2-3 층을 분리하였다. 분리된 P-2-3-1에서 P-2-3-10까지 10개의 fraction에 대하여 항산화 효과를 검색하였으며, 이 과정을 Fig. 1에 정리해 보였다.

2.3. 항산화 활성실험

2.3.1. 자유라디칼 소거활성(DPPH법)

보라색의 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 그 자체가 매우 안정한 자유라디칼 분자로서, 항산화 활성이 있는 물질(시료)과 만나면 라디칼이 소거되어 보라색이 탈색되며, 탈색되는 정도로 항산화 물질의 활성을 측정할 수 있다.¹⁶

추출물의 자유라디칼 소거활성 검색은 Shimada¹⁷ 방법에 따라 DPPH법으로 측정하였다. Ethanol에 녹인 0.5 mL DPPH 용액 1 mL에 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1 mL와 ethanol 1 mL를 가하였다. 이 혼합물에 여러 가지 농도 (0.5 μ g/mL~100 μ g/mL)의 보이차 분획물 혹은 ethanol(대조액)을 1 mL 가하고 혼합물을 잘 흔들

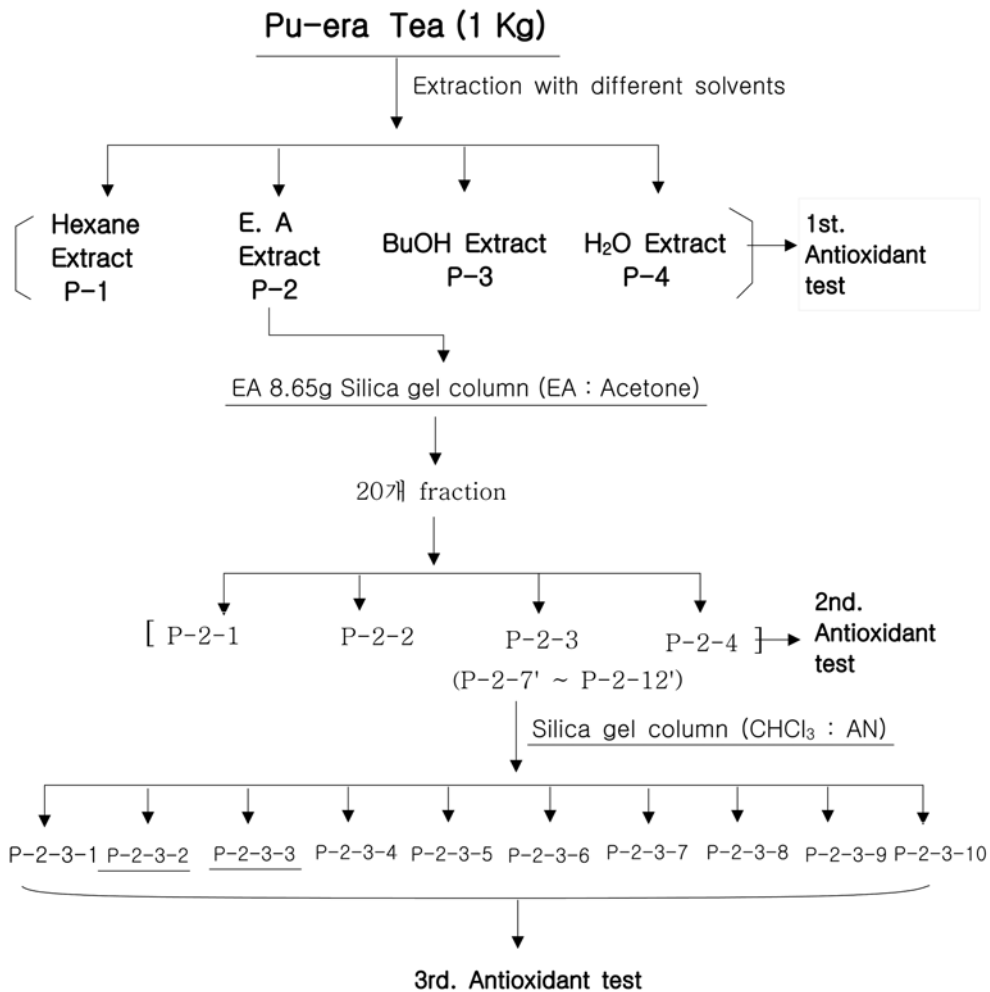


Fig. 1. A schematic diagram of activity guided fraction of Pu-erh tea.

어 혼합하였다. 실온에서 30분 동안 반응시키고 분광기를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 혼합물의 흡광도가 낮은 것은 자유라디칼의 소거활성, 즉 산화 저해율(inhibition)이 큰 것을 의미한다.

DPPH 소거활성을 % 저해율로 다음식 (1)에 나타내었다.

$$\% \text{저해율} = A_1 / A_0 \times 100 \quad (1)$$

여기서 A_0 는 대조반응의 흡광도를 나타내고, A_1 은 시료 존재하의 흡광도이다.

2.3.1. 환원력 측정

시료의 환원력(reductive potential) 검색은 Oyaizu¹¹ 방법에 따라 진행하였다. 여러 농도 범위(0.5 µg/

mL~100 µg/mL)의 보이차 시료 0.5 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6)와 1%(w/w) potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] 0.5 mL를 혼합하였다. 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후 10%(w/w) trichloroacetic acid 0.5 mL를 가하고, 원심분리기로 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 0.5 mL를 취하여 1%(w/w) $FeCl_3$ 0.1 mL를 가하고 분광기로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응혼합물의 높은 흡광도는 더 높은 환원력을 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 자유라디칼 소거활성

용매 추출(1차)된 시료와 기준 물질들에 대하여

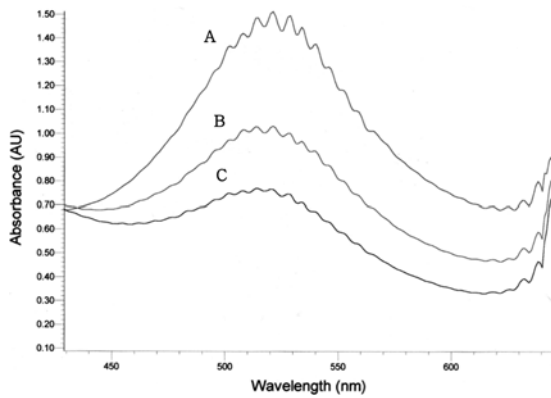


Fig. 2. A typical uv-visible spectrum on the DPPH measurements of solvent extracts and control standard (BHA). A: DPPH only, B: DPPH + EA extract, C: DPPH + BHA.

Table 1. IC₅₀ values of solvent fractions obtained from pu-erh tea in DPPH free radical scavenging activities

Extracts	IC ₅₀ (μg/mL)
EA fraction	7.09 ± 0.57
BuOH fraction	18.24 ± 3.52
H ₂ O fraction	> 100
BHA	6.02 ± 0.18
BHT	13.18 ± 0.65
α-tocopherol	9.86 ± 1.40

DPPH법으로 항산화활성을 측정하였다. DPPH와 EA 추출물, DPPH와 기준항산화제 그리고 DPPH만의 uv-visible 스펙트럼을 비교하여 Fig. 2에 보였고, 자유라디칼을 50% 억제하는데 요구되는 농도를 IC₅₀으로 환산하여 Table 1에 나타내었다. Table 1을 보면 Pu-erh tea를 용매 EA로 추출한 시료의 IC₅₀이 7.09 ± 0.57 μg/mL로 나타났는데, 이 값은 기준물질 중 α-tocopherol이나 BHT보다 항산화 효과가 좋으며, 가장 좋은 BHA (6.02 ± 0.18)의 경우와 매우 유사한 항산화 효과를 가진 것으로 볼 수 있다.

Silica gel로 채워진 칼럼으로 EA 층을 분리(2차)하였으며, 얻어진 분획들에 대한 항산화 활성을 측정하고 그 결과들을 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 IC₅₀ 값으로 비교해 볼 때 P-2-7'부터 P-2-12'까지의 분획들은 α-tocopherol과 BHT보다 좋은 항산화 효과를 나타내었고, 가장 좋은 BHA(4.326 μg/mL)와 같은 수준의 활성을 나타내었다.

항산화활성이 가장 좋은 것으로 나타난 P-2-7'에 대하여 IC₅₀ 값을 얻기 위한 % 농도에 따른 % 저해율

Table 2. IC₅₀ values of the silicagel column fractions obtained from EA extractive in DPPH free radical scavenging activities

Fraction	IC ₅₀ (mg/mL)
P-2-6'	9.85 ± 1.54
P-2-7'	3.31 ± 0.37
P-2-8'	4.78 ± 0.87
P-2-9'	4.00 ± 0.62
P-2-10'	3.53 ± 0.30
P-2-11'	4.30 ± 0.57
P-2-12'	6.17 ± 0.61
BHA	4.33 ± 0.34
BHT	7.39 ± 0.32
α-tocopherol	12.35 ± 2.31

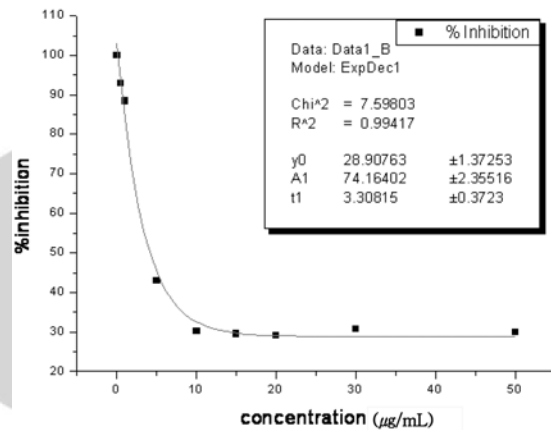


Fig. 3. Free radical scavenging activities of fraction (P-2-7') obtained from Pu-erh tea.

의 그래프를 예로 Fig. 2에 보였다.

P-2-7'~P-2-12'는 비슷한 성분들의 혼합물인 것을 TLC로 확인하였고, 모두 합하여 P-2-3으로 하였다. 항산화 활성이 높은 P-2-3 분획을 silica gel (60Å)이 채워진 칼럼(직경: 3 cm × 길이 30 cm)에서 분리(3차)하였다. 항산화 활성을 측정된 결과 9개의 분획 중에서 P-2-3-2와 P-2-3-3의 IC₅₀ 값들이 BHT, BHA 등의 기준물질과 비슷한 것으로 나타났다. 이들 분획들과 기준물질들의 IC₅₀ 값을 정리하여 Table 3에 나타내었으며, 농도에 따른 % 저해율의 그래프는 Fig. 3에 보였다.

3.2. 환원력

환원력의 그래프에서 기울기의 값이 클수록 낮은 농도에서 산화를 억제하는 효과가 크다.¹⁸ 용매추출된 시료와 기준물질들의 환원력 기울기 값들을 비교하여

Table 3. IC₅₀ values of the of the silicagel column fractions (3rd separation) obtained from P-2-3 in DPPH free radical scavenging activities

Fraction	IC ₅₀ (mg/mL)
P-2-3-1	19.21±3.02
P-2-3-2	9.75±1.65
P-2-3-3	12.62±2.07
BHA	4.99±0.21
BHT	9.48±0.59
α-tocopherol	13.54±2.69

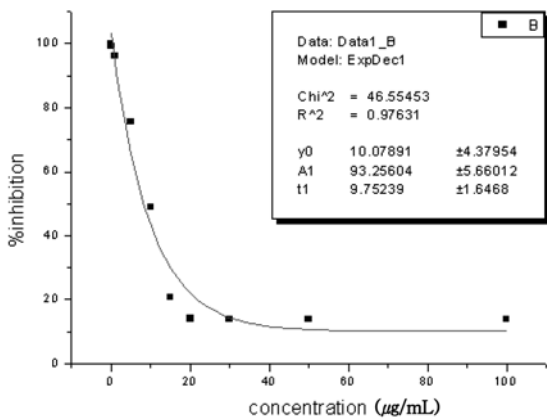


Fig. 4. Free radical scavenging activities of fraction (P-2-3-2) obtained from Pu-erh tea.

Table 4. Effect of the solvent extractive obtained from pu-erh tea in reductive potential test.

Extracts	IC ₅₀ (µg/mL)
EA fraction	3.48±0.17
BuOH fraction	1.11±0.11
H ₂ O fraction	0.34±0.02
BHA	2.74±0.13
BHT	1.87±0.07
α-tocopherol	1.14±0.05

Table 4에 나타내었다. Table 4의 결과에서는 EA 용매로 추출된 시료의 기율기 값(3.48±0.17 A/10⁻⁴ g/mL)은 기존 알려진 항산화제 BHA(2.74±0.13)보다 더 높은 항산화 효과를 보였다.

DPPH 측정에서 항산화 활성이 좋은 것으로 나타난 분획들과 기준물질들의 환원력을 농도별로 비교하여 Fig. 4에 보였다. 용매추출(1차)된 시료(P-2)의 환원력은 기준물질인 BHA, BHT와 대등하였으나 분리단계가 진행될수록 (P-2-3, P-2-3-2) 약간씩 감소되는 경향을 보였는데, 이것은 분리단계를 거칠수록 혼합물이

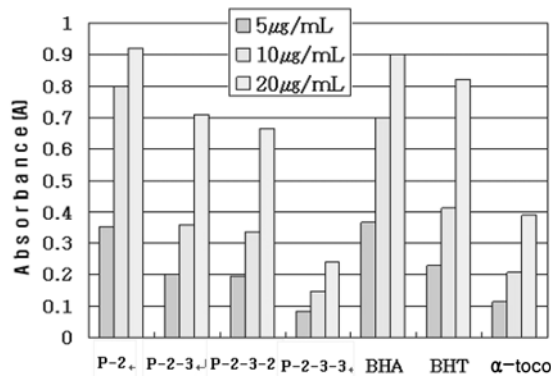


Fig. 5. Reductive potential for the different concentration of Pu-erh tea fractions.

세분화되면서 폴리페놀 유사물질들의 시너지효과가 감소되기 때문인 것으로 해석된다.

4. 결론

Pu-erh tea를 n-hexane, EA, BuOH 등으로 추출하여 DPPH법과 환원력 측정법으로 항산화 활성을 검색하였다. 항산화 활성 효과가 좋은 EA 추출물을 silica gel 칼럼으로 2차, 3차 분리하고 분획들의 항산화 활성을 측정하여 BHA, BHT, α-tocopherol과 비교하였다.

각 분획에서 환원력 측정과 DPPH법의 결과는 비슷한 경향의 항산화 활성을 보였으며, EA 추출물이 가장 높은 항산화 활성 효과를 가지는 것으로 나타났다. 분리단계가 진행될수록 항산화효과는 약간씩 감소되는 경향을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었으며, 이에 감사합니다.

참고문헌

1. S. H. Kim, D. S and J. D. Pack, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 542-547(2004).
2. H. Wang, G. J. Provan and K. Helliwell, *Food Chemistry*, **81**, 307-312(2003).
3. R. Macrae, R. K. Robinson, M. J. Sadler, "Encyclopedia of food science, food technology and nutrition". Academic Press, UK, 4521-4542(1993).

4. A. Scarbert and G. Willuamsson, *J Nutr.*, **1302**, 2073s-2085s(2000).
5. K. G. Lee, A. E. Mitchell, T. Shibamoto, *J. Agric. Foodchem.*, **48**, 4817-4820(2000).
6. K. G. Lee, T. Shibamoto, *J. Agric. Foodchem.*, **48**, 4290-4293(2000).
7. M. Uchiyama, M. Mihara, *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278(1978).
8. M. H. Ka, E. H. Choi, H. S. Chun, K. G. Lee, *J. Agric. Foodchem.*, **53**, 4124- 4129(2005).
9. M. Hatanaka, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino, *T. Bioorg. & Medicinal chem.*, **13**, 6763-6770(2005).
10. P. J. Tsai, H. P. Huang, *Food Res. Intl.*, **37**, 313-318(2004).
11. G. A. Spanos, R. E. Wrolstad, *J. Agric. Foodchem.*, **38**, 1565-1571(1990).
12. J Korean Soc. Food SciNutr., **33**(7), 1079-1084(2004).
13. E. Roberts and D. A. Wood, *Biochem. J.*, **49**, 414-419(1951).
14. S. H. Choi, *J. Food Sci. Technol.*, **33**, 529-533(2001).
15. T. Yamamishi, *Proceeding of international symposium on tea science*, Shizuoka, Japan, 1-11(1991).
16. M. S. Blois, *Nature*, **181**, 1191-1202(1958).
17. K. Shimada, K. Fujikawa, Yahara and T. Nakamura, *J. Agric. and Food Chem.*, **40**, 945-948(1992).
18. M. Oayizu, *Japan Journal of Nutrition*, **44**, 307-315(1986).

K C I