

바나바(*Lagerstroemia speciosa* L. Pars.) 잎 추출물의 분획 및 그들의 항산화 특성

황호성 · 이윤경 · 이광근
동국대학교 식품공학과

Fractionation of Banaba Leaves Extract (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers) and its Antioxidant Activity

Ho-Sung Hwang, Yun-Kyung Lee, Kwang-Geun Lee
Department of Food Science and Technology, Dongguk University

Abstract

Dried Banaba Leaf (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers.) has been traditionally used for treatment of diabetes as a folk medicine in the Philippines. Dried Banaba leaf contains corosolic acid which has a function as like insulin does. In this study, an antioxidant activity of Banaba leaves was measured. Dried Banaba leaves were pulverized and extracted by water, methanol, ethanol at above 80°C for 90 minutes. The extracts were tested for their antioxidant activity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity assay. The ethanol extract showed the highest antioxidant activity. The ethanol extract of Banaba leaf was fractionated using XA-2 resin and various solvents according to polarity. The antioxidant activity of each fraction was measured by lipid/MA (malonaldehyde) assay. Fraction I (the most polar) displayed the highest antioxidant activity.

Key words: Banaba leaves, *Lagerstroemia speciosa* L. Pers., antioxidant activity, DPPH

서 론

바나바(*Lagerstroemia speciosa* L. Pars.)는 Lythraceous종의 식물로, 주로 필리핀, 인도, 말레이시아, 중국 그리고 호주 등의 아열대 지역에 널리 분포되어 있다. 꽃은 열은 보라색이며, 타원형의 두꺼운 잎이 특징인데 이 잎을 건조시켜 사용한다. 바나바 잎은 오래전부터 민간요법에서 당뇨병 예방 및 치료에 사용되어 왔으며, 뛰어난 효과로 많은 나라에서 인정받고 있다(Horokazu *et al.*, 2003; William *et al.*, 2003). 특히, 필리핀에서는 모든 연령대에서 차로 마시고 있다. 유효성분 분석 결과 바

나바에는 혈당치를 저하시키는 인슐린과 유사한 기능을 하는 것으로 알려진 코로솔린산(Corosolic Acid)을 함유하고 있고(Liu *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2004; Dou *et al.*, 2005), 탄닌도 다량 함유하고 있는 것으로 보고되었다(Hayashi *et al.*, 2002; Takeo *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2003). 또한 아연, 철분, 칼슘, 칼륨 등 천연식물성 생리활성 미네랄이 다양하고 풍부하게 함유되어 있음이 밝혀졌다(Sato *et al.*, 2000; Yoshihito *et al.*, 2003). 국내에서는 최근 바나바추출물이 식약청의 개별인정형 원료로 등록되어, 그 기능성이 알려지기 시작하였는데, 그 기능성은 혈당조절에 도움을 줄 수 있음이 몇 가지 인체시험에서 확인되었다(한국식품의약품안전청). 바나바 추출물의 혈당조절 기능을 제외한 항산화능에 대한 연구는 전무한 실정이다.

식약청 자료의 정의에 의하면 항산화 작용은 세포손상을 유발시키기도 하는 자유기(유해산소)로부터 인체를 보호함이라고 정의하고 있다(한국식품의

Corresponding author: Kwang-Geun Lee, Assistant Professor,
Department of Food Science and Technology, Dongguk University,
26, 3-Ga, Pil-dong, Jung-gu, Seoul, 100-715, Republic of Korea
Phone: 02-2260-3372, Fax: 02-2260-3372
E-mail: kwglee@dongguk.edu

약품안전청). 즉, 우리 인체는 끊임없이 반응성이 강한 산소화합물(reactive oxygen species; ROS)과 유리기를 생성함으로써, 산화물질(pro-oxidants)을 축적한다. 또한, 이에 대한 방어기전으로 산화억제물질(antioxidants)을 형성하여 산화물과 균형을 이루어 건강을 유지하게 한다. 그러나 현대인들은 증가하는 스트레스, 환경오염, 약물, 유전적 요인 등에 의해 생성되는 산화물에 노출되어있기 때문에, 산화와 항산화물간의 동적 평형 상태를 유지하지 못하고 있다. 그 결과 심혈관계 및 만성 퇴행성 질환, 동맥경화증, 백내장, 노화, 암등 각종 성인병의 질병 이환율 빈도가 점점 더 증가하고 있다. 따라서 산화물을 제거하고 더 이상의 산화 진행을 막아주는 항산화물의 중요성과 필요성은 더욱 높아지고 있다.

이러한 항산화제들은 식물 등에서 유래한 자연성 분으로 섭취해 주는 것이 바람직한데 SOD (superoxide dismutase)의 원료인 망간, 아연, 구리와 Se 등의 미네랄, 비타민 C나 비타민 E, 베타카로틴, Lutein, Lycopene 등이 강력한 항산화 능이 있다고 보고되고 있다(Santos *et al.*, 1995). 이렇게 항산화제에 대한 중요성이 증대되고 있는 가운데, 최근 식약청에 의해 개별인정형 원료로 인정된 바나바주정추출물의 원료인 바나바잎의 항산화제로서의 활용성과 이에 대한 검토를 하고자 이 연구를 시작하였다. 본 연구에서는 우선, 바나바 잎의 추출 시 어느 유기용매에서 가장 높은 항산화능을 보이는지 실험하였다. 또한 항산화능이 가장 높은 유기용매 추출물을 극성에 따라 분획하여 이들을 Lipid MA assay법으로 측정하여 극성에 따른 항산화능을 측정하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 바나바(*Lagerstroemia speciosa* L. Pers) 잎은 필리핀산으로 건조된 잎을 0. mm~3.0 mm로 분쇄하여 실험에 사용하였다.

시약 및 표준물질

N-methylhydrazine(NMH), 2-methylpyrazine, sodium dodecyl sulfate(SDS), ferrous chloride, α -tocopherol (vitamin E),와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Aldrich(Milwaukee, WI, 미국) 제품을 이용하였다. Dichloromethane은 Junsei사 제품(Tokyo, Japan)

을 사용하였다. 모든 다른 시약들은 화학분석용 제품을 구입하여 실험하였다. Cod liver oil(약 70% ω -3 fatty acid methyl esters), butylated hydroxytoluene(BHT), trizma hydrochloride, 그리고 trizma base 는 Sigma 제품((St. Louis, MO, 미국)을 구입하여 사용하였다. Hydrogen peroxide, 그리고 ethyl acetate 는 Fisher Scientific Co.의 제품을 이용하였다(Fair Lawn, NJ, 미국). 2-methylpyrazine의 표준시약은 100 mg의 2-methylpyrazine을 10 ml의 dichloromethane에 녹여 5°C에 저장하여 사용하였다. 1-methylpyrazole(1-MP)은 malonaldehyde(MA)와 N-methylhydrazine을 이용하여 이미 발표된 합성법을 이용, 합성하여 사용하였다(Umano *et al.*, 1988).

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용한 항산화능 측정

바나바 잎의 추출은, 건조된 바나바잎을 mixer기(Philps, barblender plast.& chop)에서 5분정도 분쇄하여 이 분쇄물중 5 g을 distillation flask에 각각 넣고, water, methanol, ethanol을 각각 100 ml씩 넣어 hot-plate에서 80°C이상에서 90분 동안 magnetic bar를 이용하여 교반하면서 추출하였다. 냉각 후 filtering을 하고, 시료를 각각 500, 1000, 5000ppm으로 희석하여 DPPH를 시험하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, sigma, Mo, USA)을 ethanol 과 물의 50:50 용액으로 DPPH시약($1.52 \times 10^{-7} M$)을 제조한다. DPPH시약 4.5ml과 시료 0.5ml을 vortex로 혼합하여 암소에서 20분 동안 반응시킨 후 517 nm 파장의 UV-vis spectrophotometer에서 흡광도를 측정하였다. Control은 Ethanol 50%용액을 사용하였다.

극성에 따른 바나바 추출물의 분획

바나바의 에탄올 추출물을 rotary evaporator를 사용하여 60°C로 가열하면서 1 ml 수준으로 농축한다. 이를 XA-2 resin으로 충전한 glass column (40 cm \times 3 cm)에 가한다. 1000 ml의 분획 용매비율(water/methanol)은 100/0(Fraction i), 60/40(Fraction ii), 80/20(Fraction iii), 0/100(Fraction iv)과 1000 ml의 acetone (Fraction v)의 비율로 연속적으로 가하여 분획을 얻었다.

각 분획의 항산화능 측정 (Lipid/MA assay)

5개의 분획은 rotary evaporator를 이용하여 최대한 수분을 제거한 상태까지 농축시킨 후 각 농도별로 Lipid/MA(malonaldehyde) assay법으로 항산화 테

스트를 실시하였다. 분획하여 얻은 각각의 농축 물을 Methanol에 녹여 1g/100 ml의 농도로 만든 후, 시험관에 Tris-buffer(0.5M) 500 µl, KCl(1M) 750 µl SDS(10 g/l) 1 ml(계면활성제 역할)을 순서대로 넣고, 시료를 500 µl 가한다. 산화촉진을 위해 FeCl₂ (0.01 M) 100 µl, H₂O₂(0.3%) 23 µl를 넣은 후 총 5 ml이 되도록 증류수를 첨가한다. 각각의 시료를 37°C에서 17시간동안 shaking(190rpm) 하면서 산화시킨다. 산화된 시료에 산화를 중지시키기 위해 4% BHT (Butylated Hydroxy Toluene)를 50 µl 가한 후 10분 동안 방치 후 화학적 변환을 위해 N-methylhydrazine을 30 µl가해준다. 이 시료를 1시간동안 shaking(상온; 160rpm)한다. SPE(Solid Phase Extraction)를 사용해 용매를 바꿔주는데, SPE는 C₁₈ 카트리지로 Ethylacetate를 5 ml씩 2번, Methanol을 5 ml씩 2번, Water로 5 ml씩 2번, 시료를 5 ml로 loading 한 후, 다시 Water로 5 ml로 1번, 그리고 Ethylacetate를 5 ml씩 2번을 loading 시킨다. 이때 Ethylacetate를 넣은 후 빠져나오는 추출액을 받아 각 시료를 만든다. 각각의 시료를 Ethylacetate로 총 부피를 10 ml로 맞춘 후, GC(NPD)를 사용하여 분석되었다. 1-MP의 정량 분석은 nitrogen phosphorous detector (NPD)가 부착된 gas chromatograph (model 6890, Hewlett-Packard, USA)을 사용하였다. GC의 분석조건으로 컬럼은 DB-wax column (0.32 mm I.D.×30 m length, 0.25 µm film thickness, Hewlett-Packard, USA)을 사용하였고, injector 온도와 detector 온도는 모두 250°C이었다. Oven 온도는 60°C에서 분당 4°C로 160°C까지 올린 후 160°C에서 2분간 유지하도록 하였다. 운반기체는 helium을 사용하였고, 유속은 1.5 ml/min로 고정하였으며 split ratio는 20:1로 1 µL 주입하였다.

결과 및 고찰

추출용매에 따른 바나바 추출물의 항산화능 비교
바나바잎을 Methanol, Ethanol, Water로 각각 추출하여, 이를 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 본 결과 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 각 용매별 추출물이 농도와 DPPH 라디칼 소거능과는 비례관계를 보여 주었으며, 세 용매 중에는 Ethanol로 추출하였을 때 가장 높은 항산화 능이 있다는 결과를 얻었다. 바나바 추출액 농도가 가장 높은 5000 µg/g에서는 세 추출물의 소거능이 별 차이가 없었으나, 낮은 농도에서 에탄올 추출물이 약 3-4배의 높은

Table 1. Inhibitory effect of an each extract of Banaba leaves and α -tocopherol on the formation of DPPH radicals

Solvent	Inhibitory activity (%)		
	500 µg/g	1000 µg/g	5000 µg/g
Methanol	8.9±2.1	26.3±4.2	50.7±6.1
Ethanol	24.2±4.9	47.5±5.8	58.3±5.1
Water	5.1±2.8	14.7±2.4	50.3±4.9
α -tocopherol	49.2±5.2	52.1±5.1	75.3±6.8

활성을 보여 주었다. 이것은 바나바 추출물들의 극성이 높으면서도 항산화 효능이 있는 성분들이 에탄올에 가장 잘 녹는 성분일 것이라는 결론을 가지게 한다. 또한 추후 항산화 실험에서 가장 효과적인 바나바 추출을 위한 용매는 에탄올이라는 것을 알게 해 준다. 같은 농도에서 동일한 조건으로 실험한 천연항산화제인 α -tocopherol의 경우 에탄올 추출물에 비해 500 µg/g에서는 2배의 효과를 보인 반면 그 이상의 농도에서는 1.1배에서 1.3배의 항산화능을 보여 주었다.

바나바 추출물의 분획

추출용매 중 가장 높은 항산화능을 보여 주었던 Ethanol로 추출한 바나바잎 추출물을 rotary evaporator로 1 ml로 농축하여, 이를 XA-2 resin으로 충전한 glass column으로 분획을 실시하였다. 사용한 용매, 분획시간, 최종 분획물의 무게 등의 분획조건은 Table 2와 같다. 분획1(Fi)이 가장 극성이 높은 것이고 분획5(Fv)가 가장 비극성 조건에서 분획한 것이다. 최종 분획물의 무게는 0.6에서 1.6 g 정도의 분포로 분획되었다.

극성에 따른 각 분획의 항산화 능

Ethanol로 추출한 바나바잎 추출물을 분획하여 얻은 분획물을 동일 농도인 300 µg/ml로 하여 그들이 가진 항산화능을 비교하기 위해 lipid/MA 항산화능

Table 2. Experimental conditions for fractionation of Banaba leaf extract

	Volume (ml) of solvent			Fractionation time(min)	Solution's weight (g)
	Water	Methanol	Acetone		
Fi	1000	-	-	130	0.691
Fii	600	400	-	110	1.614
Fiii	200	800	-	80	1.333
Fiv	-	1000	-	70	1.142
Fv	-	-	1000	70	0.761

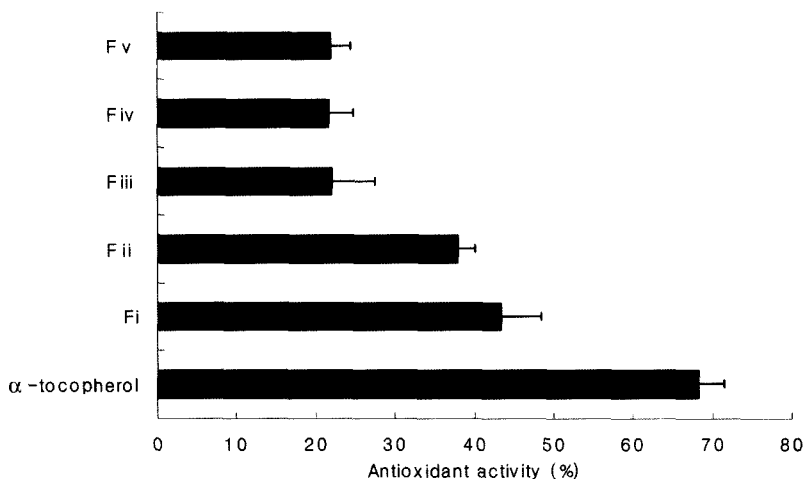


Fig. 1. Antioxidant activity of each fraction isolated from Banaba leaves measured by lipid/MA assay

측정법을 이용하여 측정하여 보았다. Lipid/MA 항산화능 측정법은 이미 여러 식물 추출물의 항산화능을 측정하기 위해 사용되어 왔다(Lee와 Shibamoto, 2000, 2001). 이 측정법은 항산화능 측정시 가장 널리 쓰여 왔던 thiababuric acid(TBA) 측정법을 응용한 것이다. 즉, 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)을 Fenton's reagent를 이용하여 인위적으로 산화시키면 말론알데히드(malonaldehyde, MA)가 생성되는데 이 MA를 정량적으로 정확히 분석하는 것이 이 측정법의 핵심이다. 기존의 TBA 측정법은 TBA라는 시약을 이용하여 반응성이 매우 큰 MA를 532 nm의 파장에서 정량이 가능한 화합물로 변환시킨다. 하지만 TBA 측정법은 가열에 따른 부산물 생성, MA 이외의 다른 알데히드 등과의 반응성이 강해 지나치게 높게 positive false 현상이 발생하여 문제점으로 지적되어 왔다. 따라서 정확하게 MA만 반응시키는 N-methylhydrazine을 이용하여 1-methylpyrazole(1-MP)을 형성시켜 가장 감도가 높은 검출기인 GC-nitrogen phosphorus detector(NPD)로 정량 및 정성분석을 시도한 것이 lipid/MA 측정법이다.

본 실험에서는 각 실험을 3반복하여 정확도와 정밀도를 높였으며, 1-MP를 보다 정확히 분석하기 위해 내부표준물질(Internal standard: IS)로 2-methylpyrazine(2-MP)을 이용하여 두 물질의 GC peak 면적비를 계산하여 정량하였다. 각 분획의 MA 형성 저해능을 실험한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험 결과 분획1(Fi)이 가장 높은 항산화능을 보여 주었다. 분획1이 43%의 항산화능을 보였고, 그 뒤를 이

어 분획2(Fii)가 38% 그리고 분획3(Fiii), 분획4(Fiv), 분획5(Fv)는 22% 정도를 나타내었다. 천연항산화제인 α -tocopherol에 비해서는 가장 높은 항산화능을 보인 분획1이 63%의 항산화능을 보여 주었다. 본 실험결과에 의하면 바나바 추출물의 항산화능 성분들은 비극성 보다는 극성에 가깝다는 결론을 내리게 된다. 바나바 추출물의 항산화능은 현재까지 전 세계에서 발표된 것이 없어 비교하기가 매우 어렵지만 본 실험을 통해 바나바의 고기능성이 항산화능과도 관련이 있음을 알 수 있다. 현재 바나바 추출물에 항산화능을 부여한 각 분획들의 정성분석 실험은 본 연구실에서 진행 중이다.

요 약

고기능성을 지닌 천연 식물인 바나바(*Lagerstroemia speciosa* L. Pars.) 잎의 항산화능을 실험하여 보았다. 먼저 최적 용매를 결정하기 위해 세가지 용매인 methanol, ethanol, water로 각각 추출하여, 이를 DPPH 라디칼 소거 억제능을 측정하였다. 그 중 ethanol로 추출한 바나바잎 추출물에서 가장 높은 항산화능을 보였다. 가장 높은 항산화능을 보인 ethanol 추출물을 이용하여 추출물의 항산화능 성분의 성질을 파악하기 위해 각 극성별로 분획을 실시하였다. 이들 5가지 분획을 천연항산화제인 비타민 E와 함께 천연물 항산화능 측정법인 lipid/MA 측정법으로 실험하였다. 다섯가지 분획 중 가장 극성이 높은 분획1이 가장 높은 항산화능을 보여 주었다. 이를 통해 바나바잎의 항산화능을 부여하는 물질

들은 극성에 가깝다는 결론을 얻었다. 아울러 현재 각 분획들의 성분 분석 실험을 진행중이다.

참고문헌

- 바나바(banaba ; *Lagerstroemia speciosa* Pers.). 식품원재료 데이터 베이스, 한국식품의약품안전청
- Dou, H., R. Zhang, X. Lou, J. Jia, C. Zhou and Y. Zhao. 2005. Constituents of three species of *Lagerstroemia*. *Biochem. Syst. and Ecol.* **33**(6): 639-642
- Hattori1, K., N. Sukenobul, T. Sasaki1, S. Takasuga1, T. Hayashi, K. Ryoji, K. Yamasaki and O. Hazeki. 2003. Activation of insulin receptors by *Lagerstroemin*. *J. Pharmacol Sci.* **93**: 69-73
- Hayashi, T., H., Maruyama, R., Kasai, K., Hattori, S., Takasuga, O., Kazeki, K., Yamasaki and T., Tanaka. 2002. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Planta Med.* **68**: 173-175
- Horokazu, H., S. Akio, S. Yuko, S. Iwao and K. Takami. 2003. Isolation and quantitative analysis of the α -amylase inhibitor in *Lagerstroemia speiosa* (L.) Pers. (Banaba). *The Pharmaceutical Society of Japan.* **123**(7): 599-605
- Lee, K.G and T. Shibamoto. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4947-4952
- Lee, K.G and T. Shibamoto. 2001. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 1573-1579
- Liu, F., J.K. Kim, Y. Li, X.Q. Liu, J. Li and X. Chen. 2001. An extract of *Lagerstromia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *American Society for Nutritional Sci.* **01**: 0022-3166
- Miura, T., Y. Itoh, T. Kaneko , N. Ueda , T. Ishida, M. Fukushima , F. Matsuyama and Y. Seino. 2004. Corosolic acid induces GLUT4 translocation in genetically type 2 diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* **27**(7): 1103-1105
- Santos, A.C., L.F. Salatino Maria and A. Salatino. 1995. Flavonoids of species of cuphea(*Lythraceae*) from brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* **23**(1): 99-103
- Sato, J., K. Goto, F. Nanjo and S. Kawai. 2000. Kousakumurata antijungal activity of plant extracts against *Authrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *J. Biosci. Bioeng.* **90**(4): 442-446
- Takeo, H., M. Haruko, K. Royji, H. Katsuji, T. Shunsuke, K. Osamu, Y. Kazuo and T. Takashi. 2002. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Planta Med.* **68**: 173-175
- Umamo, K., K.J. Dennis and T. Shibamoto. 1988. Analysis of free malonaldehyde in photoirradiated corn oil and beef fat via a pyrazole derivative. *Lipids*, **23**: 811-814.
- William, V.J., P.H. Siva, W.W. Stogsdill, S.J. Janet, M.A N. Ypusryand P. Richard. 2003. Antidiabetic activity of a standardized extract(GlucosolTM) from *Lagerstroemia speciosa* leaves in type II diabetics a dose-dependence study. *J. Ethnopharmacol.* **87**: 115-117
- Yoshihito, O., O. Ayako, and O. Toru. 2003. A new triterpenoid isolated from *Lagerstronemia speciosa* (L.) Pers. *Chem. Pharm. Bull.* **51**(4): 452-454